

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra ekologie a životního prostředí



## **Detekce metanogenních archeí v podélném profilu Labe**

**Anna Molíková**

Bakalářská práce

předložená

na Katedře ekologie a životního prostředí

Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků

na získání titulu Bc. v oboru

Ekologie a ochrana životního prostředí

Vedoucí práce: Mgr. Iva Buriánková Ph.D.

Olomouc 2015



Molíková A. (2015): Detekce metanogenních archeí v podélném profilu Labe. Bakalářská práce, Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecké fakulta, Univerzita Palackého Olomouc, 24 str., v češtině.

**Abstrakt:**

Hlavním cílem bakalářské práce bylo stanovení celkového počtu mikroorganismů a detekce metanogenních archeí v podélném profilu sedimentu řeky Labe.

Práce probíhala v laboratoři, s využitím metody barvení DAPI, pro stanovení celkového počtu mikroorganismů a FISH (fluorescenční hybridizace in situ) k detekci metanogenních archeí.

Lokality v podélném profilu nevykazují žádný trend, můžeme tedy mluvit o nehomogenním zastoupení mikroorganismů v rámci jednotlivých lokalit. Důkaz pro zvyšující se abundanci ve smeru proudu ve směru po proudu nebyl nalezen. Zároveň výsledky ukazují existence míst se zvýšenou mikrobiální abundancí a abundancí metanogenů, v souvislosti s antropogenním vlivem okolí.

**Klíčová slova:** Labe, hyporheický sediment, bakteriální abundance, metanogenní archea, fluorescenční in situ hybridizace

Molíková A. (2015): Detection of methanogenic archaea along a longitudinal profile of Elbe river, Bachelor's thesis, Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, pp. 24.

**Abstract:**

The aim of this bachelor thesis was to determine the total number mikroorganisms and methanogenetic archeae detection in the longitudinal profile of the sediment of the Elbe river.

Work carried out in the laboratory using methods DAPI for determination of total microbial count and FISH (fluorescent in situ hybridization) to detect methanogenic archaea.

Individual locations overall, show no trend, so we can talk about inhomogeneous representation within individual sites. Evidence for accumulation in the downstream direction was not found. Simultaneously results show the existence of locations with increased abundance of mikroorganisms and methanogens.

**Key words:** Elbe, hyporheical sediment, bacterial abundance, methanogenic archaea, Fluorescent in situ hybridization

### **Prohlášení**

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

V Olomouci 27. 7. 2015

Podpis: .....

# Obsah

<b>Obrázková příloha .....</b>	<b>vii</b>
<b>Poděkování.....</b>	<b>viii</b>
1. ÚVOD.....	1
2. HLAVNÍ CÍLE.....	3
3. MATERIÁL A METODY.....	4
3.1 Odběr.....	4
3.2 Lokalita.....	4
3.3 Laboratorní metody.....	5
3.3.1 Sonikace a izopyknická hustotní centrifugace: úprava sedimentu.....	7
3.3.2 Barvení DAPI: stanovení mikrobiální abundance.....	8
3.3.3 Fluorescence in situ hybridization (FISH): detekce metanogenů .....	9
4. DISKUZE A VÝSLEDKY.....	13
4.1 Totální abundance mikroorganismů.....	13
4.2 Abundance metanogenních archeí.....	14
4.3 Porovnání výsledků metody FISH a Real-Time PCR.....	16
5. SOUHRN.....	18
6. LITERATURA.....	19
7. PŘÍLOHA.....	22

## **Obrázková příloha**

<b>Obrázek 2:</b> Lokalita Verdek.....	22
<b>Obrázek 3:</b> Lokalita Verdek- znečištění z papírny v Hostinné.....	22
<b>Obrázek 4:</b> Lokalita Valy.....	22
<b>Obrázek 5:</b> Lokalita Wachvitz.....	22
<b>Obrázek 6:</b> Lokalita Míšeň- řeka.....	23
<b>Obrázek 7:</b> Lokalita Míšeň- přístav.....	23
<b>Obrázek 8:</b> Lokalita Muehlberg.....	23
<b>Obrázek 9:</b> Lokalita Lutherstadt.....	23
<b>Obrázek 10:</b> Lokalita Hohewarte.....	24
<b>Obrázek 11:</b> Lokalita Buhne.....	24
<b>Obrázek 12:</b> Lokalita Arneburg.....	24
<b>Obrázek 13:</b> Lokalita Domitz.....	24

## **Poděkování**

Především chci tímto poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Ivě Buriánkové Ph.D. Za čas strávený v laboratoři, mnoho materiálů, studijní podklady a nově nabyté zkušenosti, které mě výrazně obohatily. Což by rozhodně nešlo bez užitečných a praktických rad Mgr. Lenky Brablcové Ph.D. Tímto jí velmi děkuji. Dalším klíčovým člověkem byl doc. Matřin Rulík, který mi poskytl kvalitní teoretické zázemí, podklady k mé práci a hlavně nezbytný pohled člověka z terénu. Velmi děkuji své rodině a blízkým lidem, kteří se mě snažili podpořit. V neposlední řadě jsem byla ráda, že jsem mohla pracovat v příjemném prostředí Katedry ekologie a životního prostředí v Holici.



# 1. ÚVOD

Hyporeál, tzv. poříční dno, je vrstva pod aktivním tokem řeky a po jejích bocích, vyplněná porézními sedimenty. Je trvale osídlena bentickými organismy vlastního toku až do hloubky několika metrů (Lellák, Kubíček 1991a). Infiltruje se zde říční voda, která se tak dostává do kontaktu s vodou podzemní (Hartman et al. 1998). Sedimenty říčního dna hrají důležitou roli v biochemických procesech, které se podílí na samočištění řeky. Proto jsou považovány za metabolická centra toku. Probíhá zde degradace a mineralizace organického materiálu. V těchto procesech jsou klíčová mikrobiální společenstva, která přisedají k různým povrchům a tvoří funkční konsorcia, nazývané biofilmy. (Rulík et al. 2011).

V lotických ekosystémech je poměrně dobře okysličeno i dno, což zapříčiňuje dynamičnost tekoucích vod. Změna nastává při překročení hranice mezi dnem aktivního toku a hyporeálem, kde se s klesající hloubkou snižuje koncentrace kyslíku. V sedimentu pak můžeme najít prostředí s nižší koncentrací kyslíku nebo bez jeho přítomnosti. Mění se tak i biochemické procesy a nastávají anaerobní pochody (Triska et al. 1993). Degradace organických látek probíhá rychleji za aerobních podmínek. Hlavní rozdíl je však v organismech, které se na rozkladu podílí a v jejich metabolických produktech (Lellák, Kubíček 1991). Taková stanoviště poskytují prostředí mnohdy velmi netypickým formám života. Mezi konkrétní případy řadíme doménu Archea, které spolu s Eukarya a Bacteria tvoří hlavní linie buněčného života na Zemi (Woese et al. 1975).

Na molekulární úrovni můžeme hlavní rozdíly mezi těmito třemi doménami pozorovat u nukleotidových sekvencí. U prokaryot se jako molekulární marker často využívá tzv. malá ribozomální podjednotka - 16S rRNA, u eukaryot pak 18S rRNA. Systém porovnávání sekvencí rRNA je dnes zásadní v mikrobiální taxonomii, fylogenezi a především k objasnění evoluce mikroorganismů. (Rulík et al. 2015).

Archea představují starobylou a velmi přizpůsobivou skupinu organismů. Dříve byly známy hlavně jako extrémofilní (horká vřídla, podmořské vývěry, zasolené prostředí) organismy. Dnes již víme, že jsou kosmopolitně rozšířené a početná i v méně extrémních prostředích, např. mořská voda (Rulík et al. 2015). Dle fyziologických procesů je můžeme dělit na extrémní termofily a halofily, dále reducenty sulfátů a metanogeny. Metanogenní archea spadají do kmene Euryarchaeota, vyskytují se hlavně v anoxickém prostředí a hlavním produktem jejich respirace a fermentace je metan. Základ metanogeneze tkví v enzymu metyl-

koenzym-M-reduktáza, který zprostředkovává poslední krok v biogenní produkci metanu (Hallam et al. 2003, Sheppard et al. 2005). Poskytuje také spolehlivé vodítko k detekci, protože je pro všechny producenty metanu společný (Tajima et al. 2001).

Metanogeneze je unikátní sled biochemických procesů. Biologickou produkci metanu zajišťují výhradně metanogenní archea. V anaerobním prostředí vodních ekosystémů je produkce metanu úzce spjata s koloběhem uhlíku, který je uložen v rostlinných a zvířecích tkáních a v půdní organické hmotě (White et al. 1992). Soubory organických molekul jsou transformovány do metanu díky vzájemné spolupráci celulytických, fermentačních, syntrofních a metanogenních mikroorganismů (Buriánková 2013). Metan je poté zpět přeměněn do formy oxidu uhličitého. Děje se tak činností metanotrofních bakterií, částečně díky bakteriím nitrifikačním (Conrad 2007). Metanotrofní archaea pak zpracovávají metan a tak snižují jeho tok do životního prostředí. Nejvýznamnější vstupní látky v procesu metanogeneze jsou acetát a vodík/oxid uhličitý. Dle přijímaného substrátu je můžeme dělit na acetoklastické a hydrogentrofní.

Dnes je metan dobře známý jako jeden z hlavních skleníkových plynů. Jeho role spočívá ve schopnosti absorpce infračerveného záření. V tomto procesu vykazuje mnohonásobně větší efektivitu než oxid uhličitý (Houghton et al. 2001). Právě proto je na něj zaměřena pozornost i v hydrobiologii, kde se sladkovodní ekosystémy, ve značné míře, podílejí na obsahu metanu v atmosféře (Cicerrone et Omerland 1998, Conrad 2009). Mezi místa s významným potenciálem produkce metanu patří rýžoviště, mokřady, jezera, trávicí trakt zvířat a taky extrémní stanoviště (např. hydrotermální vývěry). Říční ekosystémy jsou v této mozaice prozatím méně probádanou půdou. Přitom říční sedimenty vykazují nezanedbatelný metanogenní potenciál (Hlaváčová et al. 2006) a nabízí se tak jako zajímavý zdroj pro další výzkum.

Idea vzorkování Labe v jeho podélném profilu vzešla od Mgr. Anny Matoušů Ph.D. na jaře 2013. Vědecký tým dotvořil doc. Martin Rulík Ph.D. a Mgr. Vojtěch Kasalický Ph.D. K plavbě byla využita loď Thör Hayerdal, zapůjčená od ichtyologů z Jihočeské univerzity, roli kapitána zastal RNDr. Michal Tušer Ph.D. Plavba, tedy výzkum, započal 8. října 2013 a trval 19 dní. Laboratorní práce započaly optimalizací metod v červnu 2014 a navázali v srpnu téhož roku, kdy plynule pokračovali do roku 2015. Práci předcházela sběr vzorků docentem Rulíkem, který se uskutečnil v říjnu roku 2013.

## **2. HLAVNÍ CÍLE**

Samotná bakalářská práce je dílčí částí větší studie. Výzkum byl zaměřen na populační dynamiku metanogenních archeí a metanotrofních bakterií v sedimentech a ve vodním sloupci v podélném profilu českého a německého úseku Labe.

Tato část je zaměřena na:

1. Úprava vzorků sedimentů z podélného profilu řeky Labe.
2. Zjištění celkového počtu mikroorganismů v sedimentu a detekce metanogenních archeí za pomoci metod molekulární biologie (Fluorescence in situ hybridization, barvení DAPI).
3. Potvrzení nebo vyvrácení hypotézy o změně počtu mikroorganismů a metanogenů v podélném profilu.

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Odběr

Triplikáty vzorků se odebíraly z příbřežního sedimentu v horní vrstvě do 10 cm hloubky. Bylo tak provedeno ruční lopatkou. K uložení byly použity uzavíratelné zkumavky o objemu 50 ml. Množství vzorku odpovídalo přibližně 25 ml. Dále byl sediment doplněn do 50 ml konzervační látkou paraformaldehyd (koncentrace 2,5 %) a důkladně protřepán, aby došlo k proniknutí ke všem částem sedimentu ve zkumavce. Výsledná koncentrace paraformaldehydu po zředění byla 2%. Do zpracování byly vzorky nadále uchovány ve stabilním a chladném prostředí.

#### 3.2 Lokalita

Labe je jednou z největších řek Evropy. S délkou (od pramene po ústí) 1094 km a plochou svého povodí 148 268 km<sup>2</sup> se řadí na 4. místo (Manfred Simon et al. 2005). Pramení v Krkonošském národním parku na severu Čech v nadmořské výšce 1386 m.n.m. Povodí Labe zasahuje na území 4 států, České republiky, Polska, Rakouska a Německa. Samotná řeka protéká Českou Republikou a Německem, kde ústí do Severního moře.



**Obrázek 1:** Labe (bílá čára na obr.) protékající ČR, Německem, ústící v Severním moři

Odběr vzorků se uskutečnil v podélném profilu řeky (tzn. od pramene k estuáriu). Celkem bylo vybráno 11 lokalit, každá se třemi opakováními. Jednotlivé lokality jsou, Verdek, Valy, Wachwitz, Míšeň řeka, Míšeň přístav, Muelhberg, Lutherstadt, Hohenwarthe, Buhnen, Arneburg, Domitz (viz příloha: obrázky 2- 13).

S ohledem na různé habitaty, znečištění a průtok, je možné Labe dělit na několik částí, vyjma specifických lokalit. První sekce začíná pramenem a hranicí je oblast kolem Pardubic. Tato část je stále poměrně přirozeným tokem, pro který jsou charakteristické meandry a torentilní zóny. Okolní krajině dominují nízká pohoří.

Další část Labe protékající Českou Republikou je vymezena kolem Hradce Králové s dosahem kolem státních hranic. Úsek je výrazně znečištěn a zároveň nejvýznamněji pozměněn lidskou činností (Netzband et al 2002). Řeka je využívána pro lodní dopravu, koryto vedeno kanálem a nalezneme tady 21 jezů. Okolí reprezentuje urbanizovaná krajina. Tok je ovlivněn zemědělstvím, osídlením a rozvinutým okolním průmyslem (Matoušů et al 2015).

Německý úsek, až po oddělené ústí má řeka volně plynoucí přírodní charakter. Na rozdíl od české části, je v celé své délce (asi 600km) bez zdymadla. Řeka je regulovaná, pouze pomocí koncentračních výhonů (příčné hrázky), jako jediného umělého prvku v korytě. Výhony začínají v Labi pod Míšní, jsou dlážděné, výška cca 1 m a délka do 40-50 m. (Rulík, 2014 a).

Poslední sekce, kde Labe ústí do moře, je oddělena zdymadlem a jezem. Estuárium je výrazně ovlivněno prouděním a promícháváním slané a sladké vody, kdy vzniká výrazný zákal (Middelburg a Herman 2007).

### **3.3 Laboratorní metody**

Laboratorní proces začíná úpravou sedimentu. Kdy je potřeba oddělit buňky od podkladu, na který přisedají a zbavit se tak balastu. Pro oddělení buněk od podkladu a rozbití matrice biofilmu použijeme sonikaci, která k tomuto účelu využívá ultrazvukové vlny různé síly a frekvence. Následuje třepání s přidáním detergentem, které napomůže lepšímu oddělení buněk. Ze vzorku odebereme veškerý supernatant a připravíme ho na hustotní centrifugaci. Pod vzorek opatrně zavedeme hustotní médium a centrifugujeme. Výsledek pozorujeme jako

rozdělení látky podle její hustoty. Dostaneme tak strmý hustotní gradient, ve kterém můžeme určit vrstvu s buňkami a odebrat ji do uzavíratelné zkumavky. Hlavní cíl této metody je finální dočištění vzorku. Zbylý materiál ze sonikace a hustotní centrifugace využijeme k určení suché váhy sedimentu. Postupujeme tak, že si odměříme zvolený počet mililitrů vzorku do předem zvážených a popsanych zkumavek. Hodnoty si zapíšeme. Zkumavky se sedimentem umístíme do sušičky a necháme dehydratovat přes noc nebo nejméně čtyři hodiny, v závislosti na množství sedimentu. Po vysušení vzorky umístíme do exsikátoru a necháme vychladnout. Krok je nezbytný pro určení přesné váhy, protože při chladnutí může sediment vstřebat vlhkost. Poté vzorky zvažíme a od hodnoty odečteme váhu zkumavky. Tuto hodnotu vydělíme počtem mililitrů. Výsledná hmotnost je váha 1ml suchého sedimentu tj. dry weight [g DW]. Další krok je filtrace supernatantu na membránové filtry, tak oddělíme vodu od buněk, které zůstanou zachycené na filtru. Obarvíme DAPI (pro stanovení abundance mikroorganismů) či hybridizujeme s oligonukleotidovými sondami a poté obarvíme DAPI.

### **Barvení DAPI**

Metoda barvení DAPI byla v této práci použita pro stanovení celkového počtu mikroorganismů na daných lokalitách. Fluorochrom DAPI je barvivo, které se přednostně váže na DNA, výsledek správného navázání na DNA pak můžeme pozorovat pod epifluorescenčním mikroskopem jako modrou fluorescenci (Porter et Feig 1980).

### **Fluorescenční in situ hybridizace**

Metoda hybridizace oligonukleotidovými sondami byla využita k detekci metanogenních archeí. Princip metody spočívá v detekci sekvence nukleových kyselin za pomoci fluorescenčně značené DNA sondy. Tato uměle vytvořená sekvence nukleotidů (tzv. sonda) nasedne na řetězec ribozomální RNA dle komplementarity bází (Buriánková et al 2009). Pro tento účel byla využita sonda MPB1 značená fluoroforem (fluorescenční barvivo) indocarbocyanin (Cy3). Za předpokladu úspěšného průběhu hybridizace se sonda specificky váže ke komplementárnímu místu na rRNA uvnitř nepoškozené buňky (Moter et Göbel 2000). Výsledek pak pozorujeme pod červeným hranolem v epifluorescenčním mikroskopu jako červenou fluorescenci.

Veškeré použité laboratorní metody, použité v této práci jsou popsány v skriptech Vybrané kapitoly z molekulární ekologie mikroorganismů (Rulík et al. 2015)

### **3.3.1 Sonikace a izopyknická hustotní centrifugace: úprava sedimentu**

(Amalfitano et Fazi 2008)

#### **Potřebný materiál:**

- Membránové polykarbonátové filtry- Milipore- bílé (0,2  $\mu\text{m}$ , GTTP)
- Podpurné- nitrocelulozové filtry Milipore- bílé (0,2  $\mu\text{m}$ , GT)
- 50 ml uzavíratelné zkumavky
- 15 ml uzavíratelné zkumavky
- Skalpel nebo nůžky
- Injekční jehla a stříkačka
- Pipeta 1000 – 10 000  $\mu\text{l}$  + špičky
- Pipeta 1000 – 5000  $\mu\text{l}$  + špičky

#### **Chemikálie:**

- Fyziologický roztok
- Detergent Triton X-100
- Hustotní médium Nycodenz
- Deionizovaná voda

#### **Postup:**

Z fixovaných vzorků (paraformaldehyd, finální koncentrace 2%) sedimentu odebereme do 15 ml zkumavky 6 ml vzorku a přidáme 6 ml fyziologického roztoku (0,9% NaCl). K takto připraveným vzorkům přidáme cca 30-35  $\mu\text{l}$  detergentu (Triton X-100), vzorky třepeme přes noc nebo alespoň 5 hod předem (třepačka OS-10, 200 rpm) poté sonikujeme 3 x 30 s (Sonopuls HD 2200, 15 % power).

Z upravených vzorků odebereme do 15 ml zkumavky veškerý supernatant (6 nebo 7 ml) a 3 – 3,5 ml hustotního média Nycodenz opatrně zavedeme injekční jehlou pod vzorek.

Vzorky vložíme do centrifugy (Rotofix 32A, 3000 x g) na 45 min. Po skončení centrifugace je většinou patrné rozložení vzorku, kdy se na dně zkumavky nachází peleta vzorku, nad ní hustotní médium a svrchní vrstvu tvoří supernatant, kde by měly být zachyceny volné buňky. Pipetou opatrně odebereme svrchní vrstvu supernatantu o stejném objemu, jaký jsme do zkumavky napipetovali (tedy 6 nebo 7 ml). Potřebné množství supernatantu (závisí na typu vzorku, pro tento účel 50  $\mu$ l) nepipetujeme na membránový filtr, doplníme do 2 ml MQ vodou a dále postupujeme dle vybrané metodiky.

### **3.3.2 Barvení DAPI: stanovení mikrobiální abundance**

(Porter et Feig 1980)

#### **Potřebný materiál:**

- Pracovní rukavice
- Filtrační papír
- Podložní a krycí skla
- Petriho misky
- Pinzeta
- Pipeta 20 – 200  $\mu$ l
- Pipeta 2 – 20  $\mu$ l

#### **Chemikálie:**

- Deionizovaná voda
- Fluorochrom DAPI
- Imerzní olej
- 96 % etanol

#### **Postup:**

Pomocí vakuové filtrace nafiltrujeme vzorek na označené membránové filtry (v případě potřeby vzorek naředíme). Filtry necháme usušit na filtračním papíru, rozdělíme na patřičné množství sekcí a pipetou naneseeme fluorochrom DAPI (finální konc. 65  $\mu$ g/ml, laboratorní teplota). Vzorky inkubujeme v lednici na podložním skle cca 10 min. Po inkubaci filtry postupně promyjeme v MQ deioinizované vodě a etanolu, přičemž poslední fázi je voda. Filtr



opět necháme usušit na filtračním papíru a umístíme na podložní sklo s kapkou imerzního oleje. Na filtr přidáme kapku oleje a přikryjeme krycím sklíčkem. Krycí sklíčko jemně přitlačíme pro eliminaci vzduchových bublin mezi filtrem a krycím sklem. V epifluorescenčním mikroskopu (hranol pro pozorování fluorochromu DAPI při excitaci/emisi 358/461 nm (Olympus BX 60) počítáme alespoň 20 náhodně vybraných polí nebo 400 buněk ( $\pm 10\%$  chyba za předpokladu normálního rozdělení). Vlastní vyhodnocení provádíme pomocí programu NIS Elements. Zde počítáme celkovou abundanci buněk. Získaný počet buněk pak přepočteme na 1 ml vzorku ( $B$ ) podle vztahu:

Počet buněk v 1 ml vzorku (abundance) lze vypočítat podle vzorce:

$$B = n * F/P * V$$

$n$  je tzv. „průměrný snímek“ (tj. průměrný počet buněk na snímek)

$F$  .... plocha filtru (resp. Vnitřní průměr filtračního komína)

$P$  .... plocha, kterou stanovujeme (tj. plocha, na níž počítám, resp. Plocha snímku; lze ji zjistit v programu NIS)

$V$  .... objem zfiltrovaného vzorku v ml

### 3.3.3 Fluorescence in situ hybridization (FISH): detekce metanogenů

(Pernthaler et al. 2001)

#### Potřebný materiál:

- rukavice nitrilové
- pinzeta
- nůžky nebo skalpel
- zkumavky 50ml (uzavíratelné)
- mikrozukavka 1,5 ml
- mikrozukavka 0,5 ml
- pipeta 1000- 10 000  $\mu$ l + špičky
- pipeta 200- 1000  $\mu$ l + špičky

- pipeta 20- 200  $\mu$ l + špičky
- pipeta 2- 20  $\mu$ l + špičky
- Petriho misky
- podložní skla
- krycí skla
- buničitá vata
- filtrační papír

### **Chemikálie:**

- MQ deionizovaná voda
- destilovaná voda
- sonda MPB1
- fluorochrom DAPI
- hybridizační pufr
- prací pufr
- Mountining media (Cityfluor : Vectashield= 4 : 1)

### **Postup:**

#### **Filtrace vzorků na membránový filtr**

Vzorky filtrujeme pomocí filtrační aparatury na membránový filtr Millipore (0,2  $\mu$ m, GTTP) viz „Barvení DAPI“.

#### **Příprava hybridizačního a pracího pufru**

Přesná spotřeba hybridizačního a pracího pufru se odvíjí od množství použitých sond a vzorků; počet zkumavek s pracím pufrem odpovídá vždy počtu zkumavek s hybridizovanými vzorky. Postup přípravy pracího a hybridizačního pufru viz skripta Vybrané kapitoly z molekulární ekologie mikroorganismů (Rulík et al. 2015).

### **Zředění sondy na cílovou koncentraci**

Sondu ředíme MQ vodou na koncentraci  $c = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$  (nebo koncentraci uvedenou pro daný účel v literatuře), přičemž finální koncentrace sondy, jež je aplikována v hybridizačním pufru na vzorek je  $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$

<i>Použitá sonda</i>	<i>Sekvence dané sondy</i>
MPB1 (detekce metanogenních archea)	5'- CATGCACCWCCTCTCAGC-3'

### **Příprava hybridizační směsi**

Z hybridizačního pufru napipetujeme po  $x * 18 \mu\text{l}$  ( $x =$  počet vzorků, resp. sekcí filtru) do mikrozkušavky (eppendorf, objem 1,5 ml). K pufru přidáme vždy  $x * 2 \mu\text{l}$  sondy. Vzniklý roztok důkladně promícháme a uložíme do chladu a temna.

### **Vlastní hybridizace**

Hybridizace je náročná na čas i materiál, proto je výhodné jednotlivé filtry (průměr filtru 25 mm) rozřezat na díly a dále pracovat s nimi. Sekce filtrů od jednotlivých vzorků umístíme vedle sebe na podložní sklo. Na jednotlivé výřezy postupně napipetujeme  $20 \mu\text{l}$  směsi hybridizační pufr-sonda a sklíčka popíšeme.

Zkušavky (50ml) vysteleme buničitou vatou, zvlhčíme asi 4 ml hybridizačního pufru a do nich velmi opatrně, aby ze sekcí filtrů kapky směsi nestekly, vložíme po jednom podložním skle. Zkušavky důkladně uzavřeme a uložíme ve vodorovné poloze do inkubátoru. Inkubujeme při teplotě  $46^\circ\text{C}$  po dobu dvou hodin.

### **„Praní“**

V průběhu hybridizace připravíme pro každou zkušavku s hybridizovanými vzorky („hybridizační zkušavku“) cca 50 ml pracovní pufru a vložíme zkušavky s pufrům do vodní lázně předehřáté na teplotu  $48^\circ\text{C}$ . Společně s nimi necháme v jiných zkušavkách ohřát také destilovanou vodu určenou k vymývání (pro každou „hybridizační zkušavku“ vždy 1 zkušavka pracovní pufru a 1 zkušavka destilované vody). „Hybridizační zkušavky“ vytahujeme z inkubátoru postupně, opatrně z nich vyjmeme sklíčko a rychle je přemístíme do

zkumavky s ohřátým, pracím pufrem a zpět do lázně; zde probíhá vymývání v klidu po dobu 15 minut.

Poté vylijeme prací pufr i se vzorky do Petriho misky, pomocí pinzety je promyjeme v destilované vodě ohřáté na 48°C a následně ve studené destilované vodě. Proces vymývání zopakujeme a necháme na filtračním papíře dokonale usušit. (množství pracího pufru a destilované vody při dvou cyklech praní zdvojnásobíme).

### **Barvení DAPI**

Takto zpracované filtry dále obarvíme fluorochromem DAPI- obdobně jako při barvení bez hybridizace. Obarvené vzorky umístíme do roztoku Citifluor - Vecta Shield (tzv *mounting media*, poměr 4:1) a překryjeme krycím sklem.

### **Snímání a vyhodnocení obrazu**

V epifluorescenčním mikroskopu pozorujeme objekty obarvené danou sondou jako červené body. Na každém jednotlivém vzorku (resp. poli) zobrazeném v mikroskopu, snímáme celkový počet buněk obarvených DAPI a současně počet buněk obarvených příslušnou sondou (obě barviva přirozeně vyžadují odlišné hranoly). Vyhodnocení celkové mikrobiální abundance i podílu hybridizovaných buněk se provádí v programu NIS Elements.

## 4. DISKUZE A VÝSLEDKY

Cílem této práce bylo stanovit celkové počty mikroorganismů a metanogenních archea ze vzorku sedimentu. Vzorky byly odebrány v podélném profilu řeky na 11 lokalitách. Očekávala se tak určitá nehomogenita, resp. vzrůstající trend v počtu mikroorganismů směrem po proudu při srovnání jednotlivých lokalit, ale zároveň přítomnost metanogenů ve všech vzorcích. Všechny předpoklady, kromě kumulace mikroorganismů po proudu byly potvrzeny a byla také detekována místa s vysokým podílem metanogenních archei.

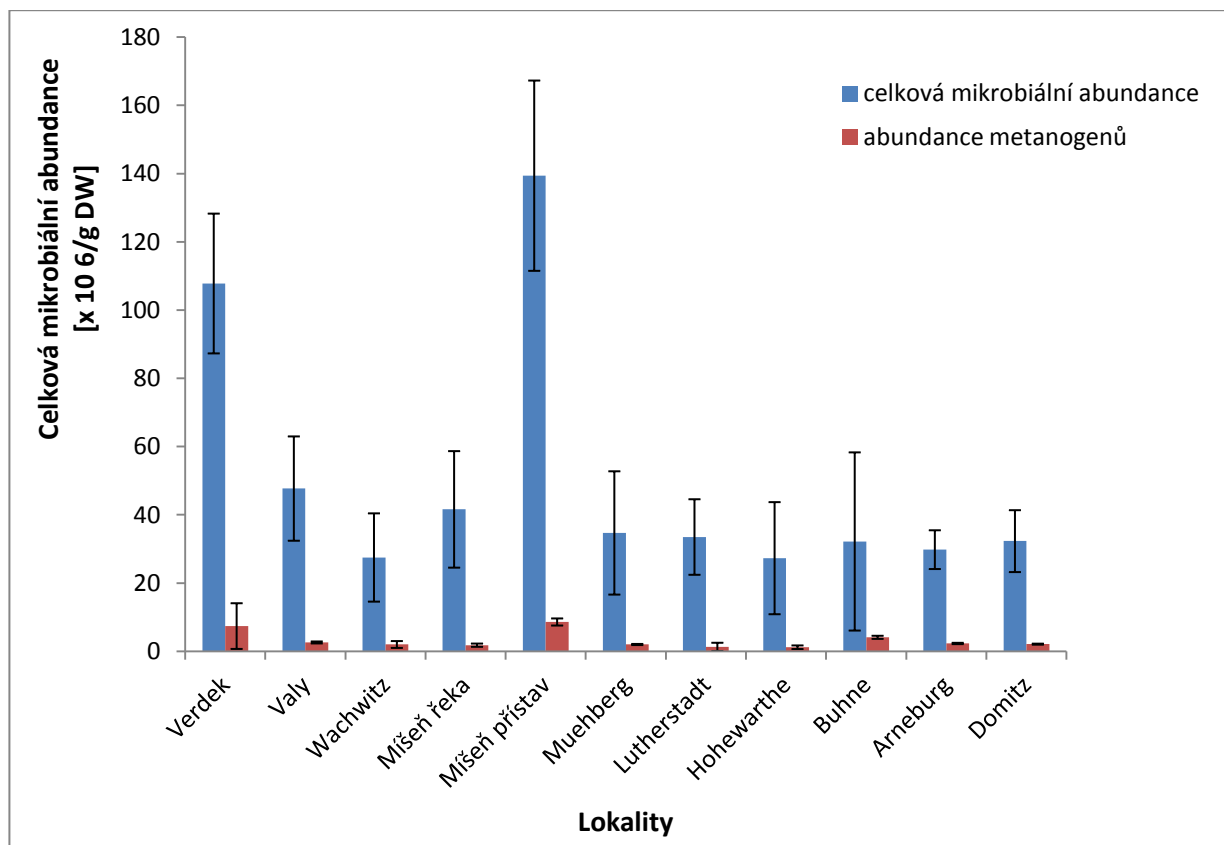
### 4.1 Totální abundance mikroorganismů

Metodou barvení DAPI byla nalezena přítomnost mikroorganismů na všech 11 lokalitách, Bylo zjištěno, že stanovené buňky ve svých počtech nevykazují žádný specifický trend (viz graf 1) jako je akumulace po proudu dolů nebo vyšší průměrné počty buněk ve střední části toku jak popisuje Brablcová et al. (2013). Zároveň se však totální abundance mikroorganismů dají srovnat se zjištěnými počty jiných autorů. Pokud vezmeme v úvahu podobnost odebírané vrstvy a zaměříme se na hloubku, ze které byl sediment odebrán (do 10 cm), jsou výsledky srovnatelné se závěry Brablcová et al. (2013) a taky s Wellsbury et al.(1996), kde bylo šetření provedeno na řece mírného pásu jako je Labe, v hloubce do 25 cm. Vyjma dvou specifických lokalit se zjištěná abundance buněk ve vzorcích pohybovala od  $27,3 \times 10^6$  –  $47,3 \times 10^6$ . Řádově podobné závěry měření potvrdila na řece Sitce Buriánková et al. (2012), kde bylo stanoveno rozmezí buněk pohybující se od  $2 - 12,4 \times 10^6$ .

Výsledky poukázaly na nezvykle vysoké totální abundance mikroorganismů u vzorků Verdek ( $107,8 \times 10^6$ ) a Míšeň přístav ( $139,4 \times 10^6$ ). Pravděpodobnou příčinu tohoto jevu u vzorku Verdek (obrázek č. 3), který se nachází v blízkosti pramene, vysvětluje znečištění vypouštěné z výroby papíru v Hostinném, která se nachází přibližně 10 km proti proudu. Od roku 1993 do roku 2000 snížila papírna množství vypouštěného odpadu více jak pětkrát (KRPA Holding, 2015). I přes tento fakt, je vliv papírenského průmyslu stále znatelný na vysokém množství mikroorganismů ve vzorku. Příčinou je zvýšení trofické hladiny v toku. U vzorku Míšeň-přístav byl nalezen vůbec nejvyšší počet buněk. Vzorek pochází z přístavu, kde je intenzivní využití řeky přímo spojeno s jejím znečištěním. Jedná se o tzv. syndrom urbanizovaných toků (Meyr et al. 2005a). Dnes už dobře popsany a běžně pozorovaný jev řek, které přichází do styku se zastavěnou a obecně lidmi využívanou krajinou. Zde je i spojení se

zemědělskou činností, která v nížinných partiích způsobuje vyšší hladiny živin v životním prostředí, jak uvádí Buriánková et al. (2013). Důsledkem je degradace vodních toků zvýšením hladiny živin a polutantů ve vodním sloupci (Meyer et al. 2005b). Příkladem je únik ropy z lodní dopravy, vypouštění splaškové vody nebo navýšení množství těžkých kovů.

Charakteristiky přírodního prostředí jako heterogenní kumulace organické hmoty, se mohou v sedimentech podstatně měnit v závislosti na nepředvídatelných pohybech intersticiální vody (Brablcová et al. 2013 a).

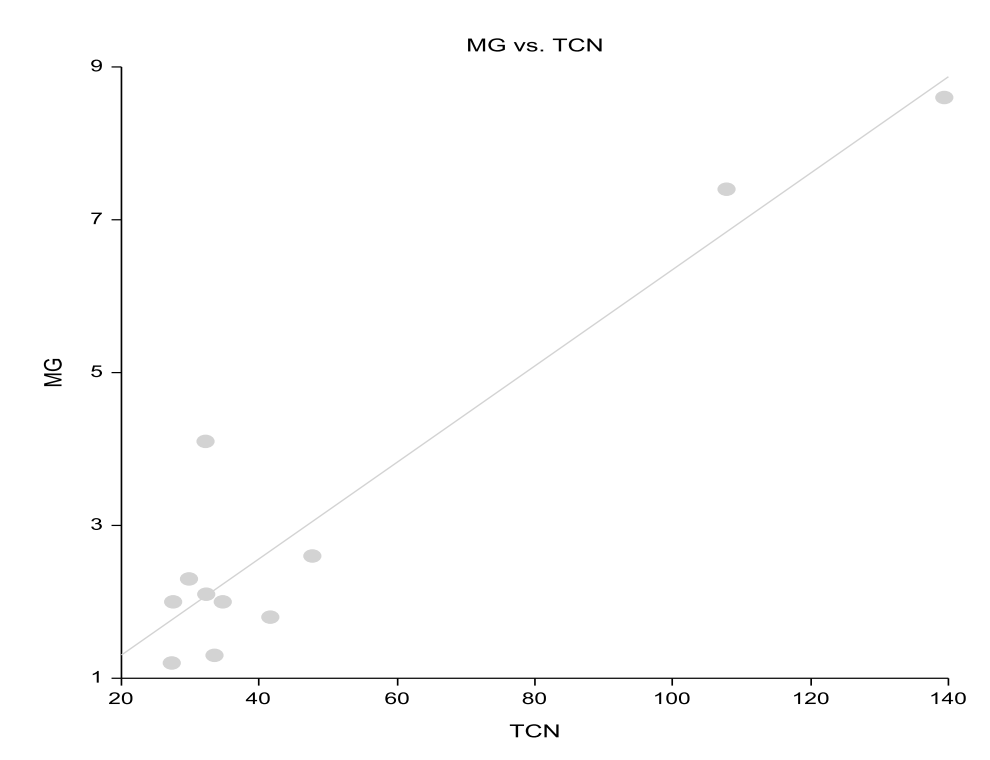


**Graf 1:** Totální abundance mikroorganismů a metanogenů na jednotlivých lokalitách

## 4.2 Abundance metanogenních archea

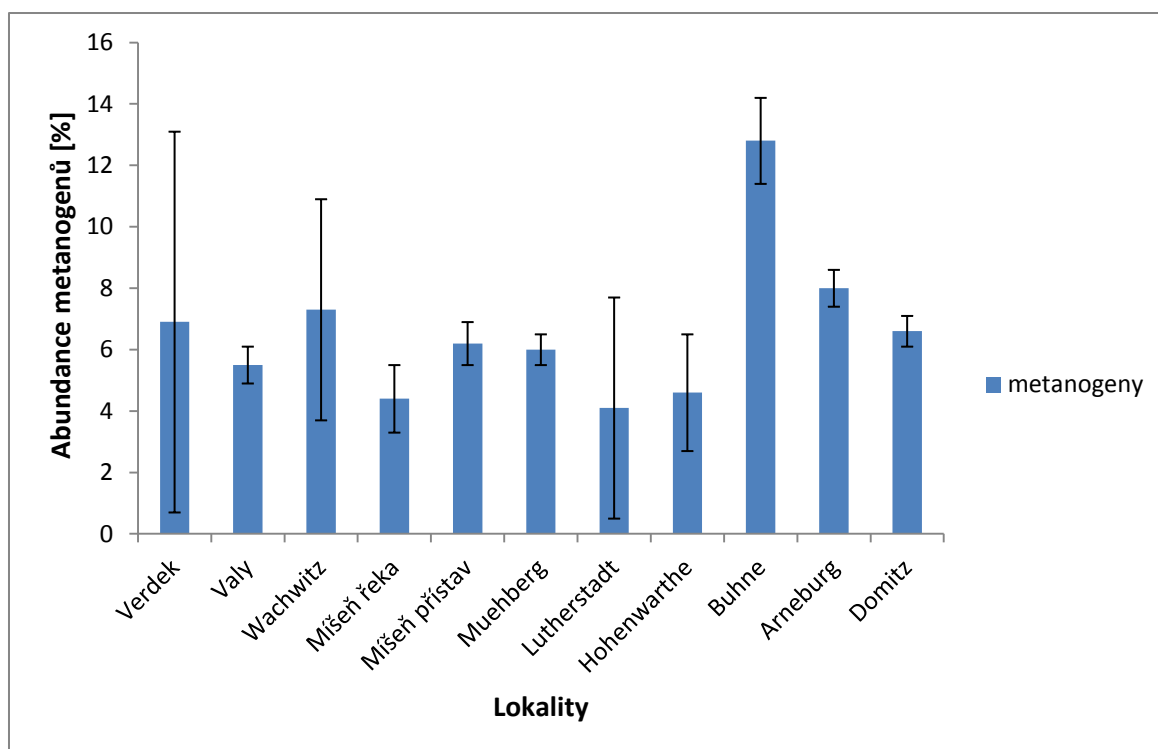
K zjištění abundance metanogenních archaeí byla použita metoda fluorescenční in situ hybridizace. Bylo zjištěno, že abundance metanogenů v podélném profilu toku nepotvrzuje hypotetický trend, ale vykazuje závislost na totální abundanci mikroorganismů (viz graf 2), . Zároveň se však poměry metanogenů a totální abundance lišily na všech lokalitách podobně, jako zjistila Brablcová et al. na řece Sítce (2013 b). Z výsledků vyplývá, že počty

metanogenních archaeí mají na řece Labe rozpětí od  $1,2 \times 10^6$  až  $8,6 \times 10^6$ . Podobné výsledky ve sladkovodním sedimentu pozoroval Casper et al. (2003). K jiným závěrům došla Gebert et al. (2006 a), kde abundance v německé části nížinného toku Labe byla  $2,8 \times 10^5$  a v přílivové zóně pak  $2,7 \times 10^7$ . Procentuelní zastoupení ve vzorcích kolísá od 4,1 % do 12,8 % (viz graf 3). Nejvyšší hodnota 12,8 % byla zjištěna u Buhnen. Lokalita je koncentrační výhon a má podobu příčné hrázky vstupující z břehu do řeky. Protiproudovou cirkulací vody zde dochází ke kumulaci jemného písku. (Rulík, 2014 b). Místo je atraktivním stanovištěm pro vodní ptactvo (Rulík, 2014 c). Vyprodukovaný ptačí trus a odpad (zbytky potravy, peří) může zvyšovat hodnotu trofické hladiny v sedimentu a tak zapříčinit vyšší podíl metanogenů. Podobně zvýšené hodnoty se často nalézají v blízkosti estuárií, jak popisuje na řece Wezeře a Labe (Gebert et al. 2006 b) nebo právě v nižších partiích toků, kde je okolní říční krajina ovlivňována člověkem, například část Rýnu (Gebert et al. 2006 c). Další místa s význačnou proporcí metanogenů jsou Arneburg 8 %, Wachvitz 7,3 % a Verdek 6,9 % (viz graf 3). Kdy u Arneburgu jako příčinu můžeme zvážit zvýšenou přívodní dopravu, která kulminuje právě v okolí tohoto místa (Rulík, 2014). Lokalita Verdek je specifická znečištěním z výroby papíru, jak už bylo výše zmíněno.



Y = Totální\_abundance\_mikroorganismů X = Abundance\_metanogenů  
Correlation= 0,94

**Graf 2:** Vztah mezi totální abundancí mikroorganismů a abundancí metanogenů



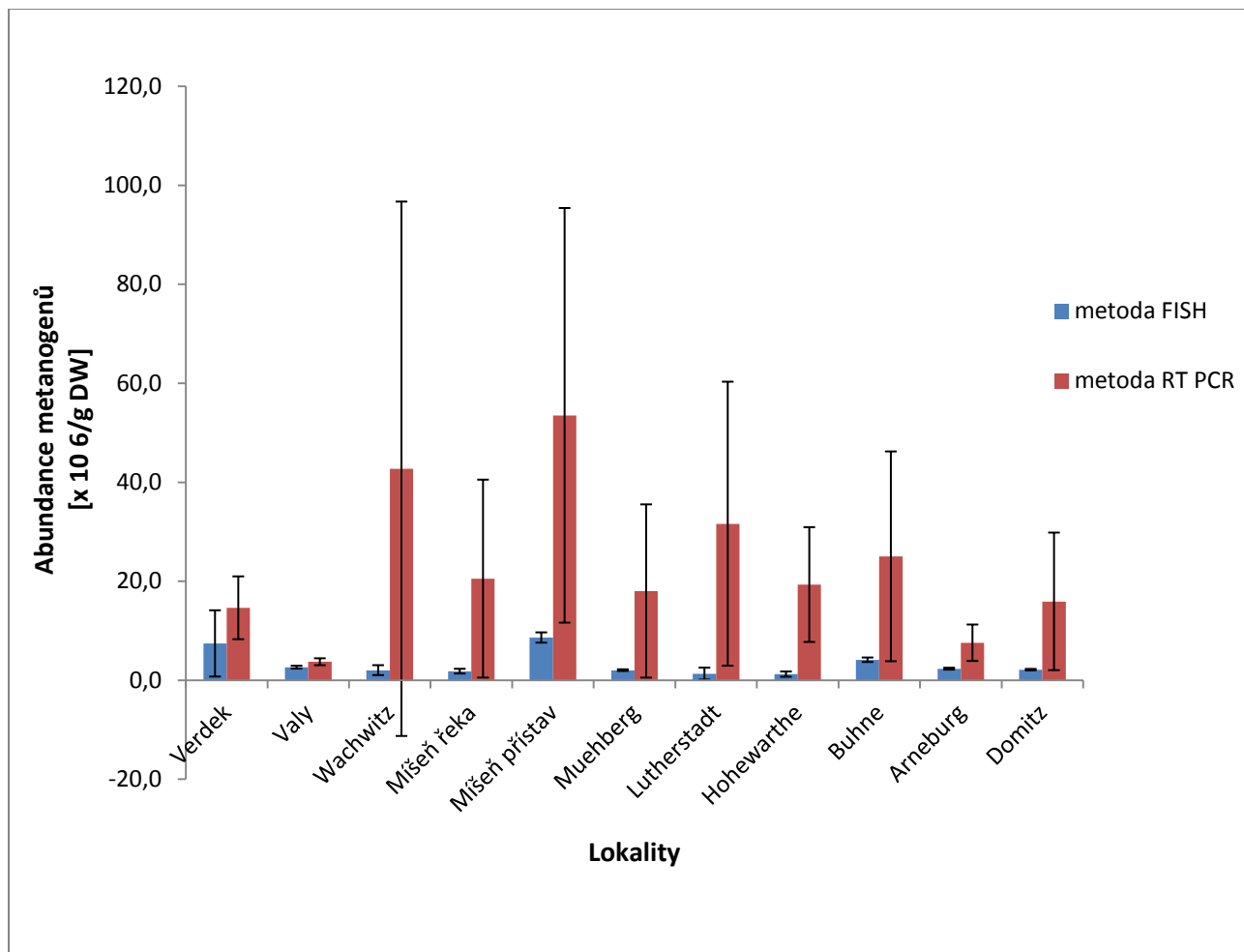
**Graf 3:** Procentuelní zastoupení metanogenů v jednotlivých vzorcích

### 4.3 Porovnání výsledků metody FISH a Real-Time PCR

Pro kvantifikaci metanogenních archaea v této práci byla využita metoda fluorescenční in situ hybridizace a tak se nabízí srovnání s výsledky získanými polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase (viz graf 4), které bylo použito pro stejný účel, ale v jiné práci. Výsledky z obou analýz poukázaly na přítomnost metanogenních archaea, ale pohybující se v jiných řádech. Konkrétně  $1,2 \times 10^6 - 7,6 \times 10^6$  u fluorescenční in situ hybridizace a  $1,4 \times 10^7 - 7,54 \times 10^7$  u Real-Time PCR. Tyto metody také porovnávala Nitkulincová (2011), ale na odlišném typu stanoviště a pro metanotrofní archaea. Při srovnání její výsledky vykazovaly odlišnost až na úroveň tří řádů, ale odhalily vyšší počty u metody CARD-FISH, zatímco v tomto případě byly vyšší hodnoty u Real-Time PCR. Z hlediska technologie by měla být přesnější polymerázová řetězová reakce. Nicméně hodnoty odchylek u výsledků z Real-Time PCR poukazují na nižší potenciál validity dat než u výsledků z FISH. Tyto odlišnosti mohla zapříčinit nehomogenita vzorků. Faktor nehomogenity lze také vztáhnout k heterogenitě prostředí v sedimentu. Přítomnost mikrohabitátů v hyporheálu jako jsou např. anoxické kapsy (prostředí vhodné pro metanogenních archaea), poskytuje velký prostor pro osídlení



rozdílnými mikrobiálními společenstvy, pak i na tak malé prostorové škále můžeme nalézt pestrou mozaiku mikroorganismů (Buriánková 2013).



**Graf 4:** Srovnání metod Real-Time PCR (RT PCR) a fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

## 5. SOUHRN

Hyporeická zóna je podstatný prvek říčního ekosystému. Její role spočívá v samočištění toku a mineralizaci látek, je to metabolické centrum řeky. Nachází se zde různá biofilmová společenstva. V této práci bylo cílem stanovit celkové počty mikroorganismů a detekovat abundanci metanogenních archea z hyporeického sedimentu.

Vzorky sedimentu byly odebrány z Labe a to v podélném profilu řeky. Každá z jedenácti lokalit má tři podvzorky. K analýze sedimentu bylo použito metod molekulární biologie a to barvení DAPI a fluorescenční in situ hybridizace. Veškeré výstupní hodnoty jsou uvedeny v gramech suché váhy [g DW] a pohybují se v řádu  $10^6$ . V rozšíření mikroorganismů a metanogenů v podélném profilu řeky nebyl nalezen žádný trend. Předpoklad jejich rozšíření napříč všemi vzorky byl potvrzen. Dále byla zjištěna korelace mezi abundancí metanogenních archei a totální abundancí mikroorganismů.

U počtu všech mikroorganismů byly pozorovány výraznější rozdíly než v hodnotách u metanogenních archea (graf č. 1). Všechny místa na toku, kde se vyskytla nezvykle odlišující se hodnota v početnosti, si jsou podobné v aspektu vnějšího antropogenního ovlivnění. Jsou to místa typická pro různé druhy znečištění, jako je vypouštění splaškových vod, kalů z papírny nebo možné úniky ropy při zvýšené lodní dopravě a další projevy člověka v urbanizované říční krajině.

## 6. LITERATURA

Amalfitano S., Fazi S. (2008): Recovery and quantification of bacterial cells associated with stream bed sediment. *J Microbiol Meth* 75, pp. 237- 243.

Brablcová L., Buriánková I., Badurová P., Rulík M. (2013) a: Occurrence and diversity of methanogenic archaea detected by FISH and DDGE in stream hyporheic sediment. Palacký University in Olomouc, Olomouc. pp 5.

Brablcová L., Buriánková I., Badurová P., Rulík M. (2013) b: Occurrence and diversity of methanogenic archaea detected by FISH and DDGE in stream hyporheic sediment. Palacký University in Olomouc, Olomouc. pp 4.

Buriánková I. (2013): Detekce a identifikace metanogenních archaea v hyporheickém sedimentu pomocí vybraných molekulárních metod. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

Buriánková I., Brablcová L., Cupalová J., Mach V., Rulík M. (2009): Využití moderních, molekulárních metod pro detekci metanogenů a metanotrofních bakterií ze sedimentu tekoucích vod. *Mikrobiológia vody*, pp. 120- 127.

Buriánková I., Brablcová L., Mach V., Hýblová A., Badurová P., Cupalová J., Čáp L., Rulík M. (2012): Methanogens and Methanotrophs distribution in the hyporheic sediment of a small lowland stream. *Fundam. Appl. Limnol.* Vol. 181/2, pp. 87-102.

Buriánková I., Brablcová L., Mach V., Dvořák P., Chaudhary P. P., Rulík M. (2013): Identification of Methanogenic archaea in the Hyporheic Sediment of Sitka Stream. *Plos One*, pp. 5

Buriánková I., Detekce a identifikace metanogenních archea v hyporheickém sedimentu pomocí vybraných molekulárních metod, Olomouc (2013), dizertační práce, Univerzita Palackého v Olomouci.

Casper P., Chan O. C., Furtado A. L. S., Adams D. D. (2003): Methane in an acidic bog lake: The influence of peat in the catchment on the biochemistry of methane. *Aquat. Science*, 36-46.

Cicerone R. J., Omerland R. S. (1998): Biochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochem Cy* 1:61- 86.

Conrad R. (2007): Microbial Ecology of methanogens and methanotrophs. *Advances in agronomy* 96: 1- 63.

Conrad R. (2009): The global methane cycle: Recent advances in understanding the microbial processes involved [Minireview]. *Environ. Microbiol. Reports* 1, 285- 292.

České Budějovice (2011): diplomová práce, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích.

Gebert J., Köthe H., Gröngroft A. (2006) a, b, c: Prognosis of Methane Formation by River Sediments. *Soil and Sediments*, 6: 75-83, 78.

Hallam S. J., Girguis P. R., Preston C. M., Richardson P. M., Delong E. F. (2003): Identification of Methyl koenzyme M Reductase A (mcrA) Genes Associated with Methane-Oxidizing Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5483- 5491.

Hartman P., Přikryl I., Štědranský E. (1998): *Hydrobiologie*. Informatorium, Praha.

Hlaváčová E., Rulík M., Čáp L., Mach V. (2006): Greenhouse Gases (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, N<sub>2</sub>O) emissions to the atmosphere from a small lowland stream. *Arch. Hydrobiol.* 165: 339- 353.

Houghton J. T., Ding Y., Griggs D. J., Noguer, Van der Linden P. J., Xiaosu D (eds.) (2001): *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)*, J. T. Houghton, Cambridge University Press, UK. pp 944.

KRPA Holding. Waste management. KRPA Holding [online]. Hostinné: KRPA Holding ©1994–2015 [vid. 2015-06-17]. Dostupný z: <http://www.krpa.cz/en/responsibility/waste>

Lellák J., Kubíček F. (1991)a: *Hydrobiologie*. Univerzita Karlova, Praha. s. 106

Lellák J., Kubíček F. (1991)b: *Hydrobiologie*. Univerzita Karlova, Praha. s. 183

Matoušů A., Rulík M., Tušer M., P.P. Chaudhary, A. Bednařík, K. Šimek, M. Blaser & I. Bussmann (2015): The possible origin and fate of methane in a river continuum – a case study of the River Elbe. Faculty of Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Hydrobiology, České Budějovice, Czech Republic, Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Czech Republic.

Meyer J. L., Paul M. J., Taulbee W. K. (2005)a: Stream Ecosystem Function in Urbanizing Landscapes. *Journal of the North American Benthological Society*, vol. 24, pp. 602-612.

Meyer J. L., Paul M. J., Taulbee W. K. (2005)b: Stream Ecosystem Function in Urbanizing Landscapes. *Journal of the North American Benthological Society*, vol. 24, pp. 602-612.

Middelburg J. J., Herman P. (2007): Organic matter processing in tidal estuaries. *Marine Chemistry*, vol. 106, pp 127–147.

Moter A., Göbel U. B. (2000): Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 41, pp. 85–112.

Netzband A., Reincke H., Bergemann M. (2002): The river Elbe. *Journal of Soils and Sediments*, vol. 2, Issue 3, pp 112-116.

Nitkulincová A., Společenstvo metanotrofních bakterií v půdách zimoviště skotu, Pernthaler J., Glockner F. O., Shonhuber W., Amann R. (2001): Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA- targeted Oligonucleotide Probes. *Methods in Microbiology* 30: 207- 225.

Porter J., Feig Y. (1980): The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr* 25: 943- 948.

Porter J., Feig Y. (1980): The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25, 5: 943–947.

Rulík M. (2014) a, c: Za metanem po Labi. *Limnologické noviny* č. 2, s. 2.

Rulík M. (2014) b: Za metanem po Labi. *Limnologické noviny* č. 2, s. 3.

Rulík M., Buriánková I., Brablcová L. (2015): Vybrané kapitoly z molekulární ekologie mikroorganismů. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

Rulík M., Buriánková I., Brablcová L. (2015): Vybrané kapitoly z molekulární ekologie mikroorganismů. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

Rulík M., Holá V., Růžička F., Votava M. a kol. (2011): Mikrobiální biofilmy. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.

Sheppard S. K., McCarthy A. J., Loughnane J. P., Gray N. D., Head I. M., Lloyd D. (2005): The impact of sludge amendment on methanogen community structure in an upland soil. *Appl. Soil Ecol* 28: 147- 162.

Simon M., Bekele V., Kulasová B., Maul Ch., Oppermann R., Řehák P. (2005): Labe a jeho povodí (geograficky, hydrologický a vodohospodářský přehled). Mezinárodní komise pro ochranu Labe, Magdeburg.

Tajima K., Nagamine T., Matsui H., Nakamura M., Rustam I and Aminov R. I. (2001): Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA libraries from the rumen suggests the existence of a novel group of archaea not associated with known methanogens. *FEMS Microbial Lett* 200: 67-72.

Triska F. J., Duff J. H., Avanzino R. J. (1993): Patterns of hydrological exchange and nutrient transformation in the hyporheic zone of a gravel-bottom stream: examining terrestrial-aquatic linkages. *Freshw Biology* 29: 259-274.

Wellsbury P., Herbert R. A., Parkes R. J., (1996): Bacterial activity and production in near-surface estuarine and freshwater sediments.- *FEMS Microbiol. Ecol.* 19: 203-2014

White I. D., Mottershead D. N., Harrison S. J. (1992): *Environmental systems* (Second Edition). Alden Press. Oxford. Great Britain.

Woese C. R., Fox G. E. (1977): Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary Kingdoms. *PNAS* 74: 5088-5090.

## 7. PŘÍLOHA

**Obrázek 2** Verdek (Rulík M.)



**Obrázek 3:** Verdek- znečištění z výroby papíru (Rulík M.)



**Obrázek 4:** Valy



**Obrázek 5:** Wachvitz



**Obrázek 6:** Míšeň- řeka (Rulík M.)



**Obrázek 7:** Míšeň- přístav (Rulík M.)



**Obrázek 8:** Muehlberg (Rulík M.)



**Obrázek 9:** Lutherstadt (Rulík M.)



**Obrázek 10:** Hohewarte (Rulík M.)



**Obrázek 11:** Buhne (Rulík M.)



**Obrázek 12:** Arneburg (Rulík M.)



**Obrázek 13:** Domitz (Rulík M.)

