

# Bakteriální společenstva v povrchových vodách

**Bakterie tvoří populace a společenstva jako všechny organismy, jen na ně nemůžeme vztáhnout klasická učebnicová měřítka. Pokusíme se zde problém zjednodušeně a pragmaticky popsat a aplikovat na povrchové vodní ekosystémy – jezera a toky. Biolog stojící na břehu řeky nebo jezera může na první pohled získat obecnou představu o řadě společenstev, která tam žijí, a s poměrně jednoduchou technikou (vzorkování, přímá mikroskopie) je může úspěšně popisovat a studovat. O bakteriích jako složce ekosystému se ale takto nedoví téměř nic a musí použít někdy složité laboratorní metody. Bakteriemi zde myslíme prokaryotní organismy, které nejsou schopny fotosyntézy s produkcí volného kyslíku (jako sinice – cyanobakterie). Pro účely tohoto článku sem můžeme zahrnout i příslušníky relativně nově popsáné podříše *Archaea* (dříve archebakterie).**

Společenstvo se standardně pojímá jako soubor populací organismů obývajících určitý prostor nebo plochu, který vykazuje ještě jiné vlastnosti, než jsou vlastnosti jednotlivých populací (Odum 1977; Begon a kol. 1997). V akvatické ekologii (hydrobiologii) se studují společenstva v „základních prostorech“ povrchových vod typu plankton (ve vodním sloupci), bentos (na dně) a litorál (v příbřeží), s dosti zásadním rozlišením na vody stojaté a tekoucí. Až potud můžeme pro bakteriální společenstva používat též měřítka jako pro rostliny či živočichy, dále už se celkové pojetí i technické možnosti studia bakteriálních společenstev rozcházejí. Zásadní problém totiž spočívá v tom, co považujeme za druh, a tedy za populaci. Definice populace je jednoduchá (Odum 1977): skupina organismů stejného druhu (nebo jiných skupin, uvnitř kterých si jedinci mohou vyměňovat genetické informace), zaujímající určitý prostor, která má vlastnosti skupiny, nikoli jednotlivců. Ovšem pojetí druhu u eukaryot, tedy rostlin a živočichů (ačkoli ani zde není bez problémů) je pro

prokaryota použitelné jen omezeně. Pouze pro sinice, tedy striktně vzato cyanobakterie, existuje standardní taxonomie založená na morfologii, která ovšem pro ostatní „klasické“ bakterie nebyla nikdy použita ani použitelná. Vodní mikrobiologie se totiž vyvíjela jinak než klasické zoologické a botanické disciplíny (včetně nauky o řasách – algologie) a do ekologických studií se také zařadila až po nich. Proč to tak je?

## Historie

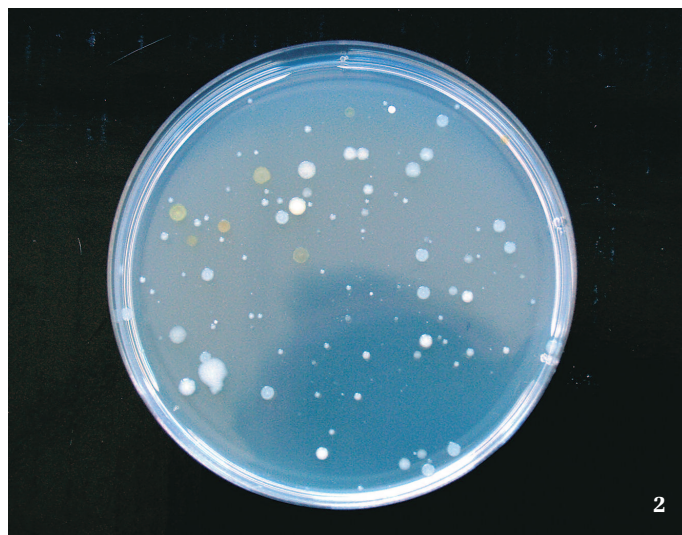
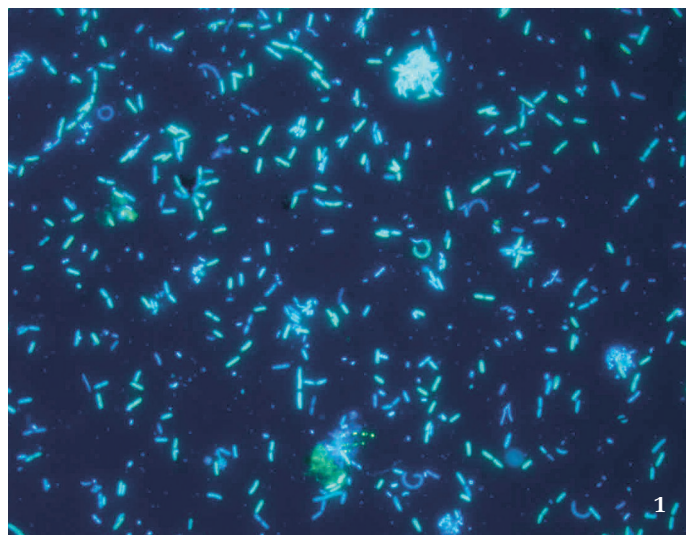
Ke konci 19. stol. se mikrobiologie metodicky ustálila na použití kultivačních metod a pracovala s kmeny, které rostly na živných půdách a tvořily viditelné kolonie na agarových plotnách, zákal ve zkumavkách apod. V té době se také vedle medicínského zaměření postupně objevily první práce ekologické, především v oblasti transformace dusíku v půdách. Izolace na živných půdách umožňovala práci s čistými kmeny (= populacemi, ovšem vyrostlými z jediné buňky ve vzorku), stanovení jejich výskytu a četnosti v přírodě, experi-

mentální stanovení jejich charakteristik atd. Až na výjimky bylo ovšem brzy jasné, že v přírodě se tyto kmeny nemohou setkat s podmínkami, které jim připravili mikrobiologové v laboratořích. Nebylo tedy zřejmé, jsou-li to jediné bakterie žijící v přírodě, resp. v příslušném vzorku, ani jak se jejich (v laboratoři stanovené) vlastnosti mohou v přírodním prostředí projevovat. Mikroskopické pozorování bylo prakticky možné jen na kulturách nebo v koncentrovaných prostředích, s využitím klasických způsobů barvení. Když se po r. 1930 objevily první práce, které zakoncentrovaly vodu na membránovém filtru a po jednoduchém barvení ukázaly, že v mililitru vody mohou být miliony bakteriálních buněk, řada mikrobiologů je nebrala vážně, protože na klasických půdách jich dostávali jen stovky až tisíce.

Později byly vypracovány přímé (mikroskopické) metody stanovení celkové počtu bakterií s barvením akridinovou oranží, poté se začala používat epifluorescenční mikroskopie (AODC s akridinovou oranží) a po r. 1980 bylo zavedeno barvení DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol). Tyto metody umožňují rutinní práci, dokonce jistý stupeň automatizace s použitím analýzy obrazu, ale stále dávají jen obraz červených, zelených, oranžových nebo modrých (DAPI) kulovitých bakterií (koků), tyčinek a vláken a celkový počet bakterií ve vzorku. Tradice práce s Petriho miskami vedla k názoru, že tyto bakterie jsou neaktivní nebo mrtvé (na rozdíl od počtů

**1** Obraz v mikroskopu – přímý počet bakterií po nabarvení DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol budící záření 360 nm): vidíme jen obraz ve zvolené části spektra. Pověšimněte si různých morfologických typů, velké tyčinky mají délku cca 1 μm. Shluky bakterií jsou přisedlé na neviditelných vložkách, nebo kumulovány v potravních vakuolách prvoků. Organismy jiné než bakterie můžeme odlišit morfologicky nebo např. podle fluorescence chlorofylu při změně budícího záření

**2** Miska po kultivaci vzorku vody na nespecifickém agarovém médiu. Kolonie lze již podle barvy a tvaru atd. zařadit a dále identifikovat. Jsou to však obecně kopiotrofní typy (vázané na vysokou koncentraci organického uhlíku v prostředí), ve vodních ekosystémech nepůvodní



vyrostlých na miskách) – tato představa byla stoprocentně vyvrácena až s použitím mikroautoradiografie a genových sond. Ukázalo se totiž konečně, že i 100 % buněk mikroskopicky stanoveného celkového počtu přijímá během krátkodobé inkubace radioaktivně značené substráty, nebo se na ně váží genové sondy, čili jsou v okamžiku odběru vzorku živé.

Dnešní představa počítá s tím, že větší na bakterií izolovaných v laboratořích na půdách (na miskách nebo v tekutých půdách) s vysokým obsahem substrátů je ve vodě alochtonní, tj. pochází z jiného prostředí, a autochtonní vodní bakterie, fungující v nízkých koncentracích dostupných substrátů, na těchto půdách nerostou. První skupina se označuje jako kopiotrofní, druhá jako oligokarbofilní bakterie. Zde začíná problém klasické mikrobiologie – pokud kmen nemůžeme izolovat na pevně nebo tekuté půdě a charakterizovat (morfologicky, biochemicky apod.), nelze jej popsat klasickým způsobem jako druh a taxonomicky zařadit např. podle Bergeyova manuálu, což je mezinárodní standard klasické určovací mikrobiologie. Prakticky to znamená, že většina bakterií odpovědných za reálné transformační procesy ve vodních ekosystémech nemá klasické jméno a odstavec v příslušném klíči. Tato „fenotypová taxonomie“ byla překlenuta až s použitím genových sond (viz dále).

Přímé mikroskopické metody přinesly velký pokrok, ale vedly k tomu, že nepochybná „bakteriální společenstva“ byla pojmána fakticky jako populace, nejvýš dělena na velikostní třídy a typy – koky, tyčinky, vlákna apod. A jako malý podíl (< 5 %) z ní bylo možno vydělit kopiotrofní bakterie rostoucí na kultivačních médiích. Podstatný pokrok přinesly metody mikroautoradiografie – vzorek byl krátkodobě inkubován se substrátem značeným izotopem vodíku tritiem ( $^3\text{H}$ ), pak fixován a ve tmě potažen fotografickou emulzí. Po vyvolání fotogramu a nabarvení DAPI bylo možno zjistit distribuci substrátů v jednotlivých buňkách a uvažovat, jsou-li to různé populace, různě fyziologicky aktivní jedinci atd.

### Dnešní metodické možnosti a jejich limity

Další zásadní pokrok přinesly genotypové metody, především značení bakterií ve vzorku genovými sondami – fragmenty ribozomální RNA označenými fluorochromem. Klasická je dnes především metoda FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), která má k dispozici sérii komerčně dodávaných sond. Kombinace s barvením DAPI pak dává informaci o zařazení do jednotlivých taxonomických skupin. Věc není zase tak jednoduchá – kromě technických problémů totiž především záleží na „taxonomické“ úrovni použitých genových sond. Tyto metodiky využívají konzervativní část genomu, takže umožňují stabilní zařazení podle „fylogenetického stromu“, v duchu revolučního genotypového přístupu k taxonomii bakterií. Ovšem uvážíme-li, že většina bakterií ve vodě je heterotrofních (chemoorganotrofních – energii i uhlík pro biosyntézu získávají z organických sloučenin), není informace o zařazení do příslušné širší nebo užší skupiny (fylotypu)



dostatečná pro úvahu o reálné roli příslušné skupiny ve společenstvu nebo ekosystému (tedy ekotypu). Další metody využívají pomnožení (amplifikace) genetických informací přímo ze vzorku a porovnávání s knihovny – ovšem opět nedostáváme informaci o „ekotypech“ a jejich roli ve společenstvu nebo ekosystému. Výjimkou jsou vysoce vývojově i metabolicky specializované typy, např. organismy oxidující amoniakální dusík (= nitrifikující apod.). Dnešní metody dovolují kombinovat označení příslušného typu genovou sondou a identifikaci jeho metabolismu např. autoradiograficky. Ovšem nikdy neurčujeme jednu bakteriální buňku jako reprezentanta populace – to je ten rozdíl.

Bakterie mají jednu základní a jedinečnou vlastnost – horizontální přenos genů, který vede k získávání nových metabolických vlastností, schopnosti využívat (degradovat) neznámé substráty, ale také virulence, rezistence na antibiotika apod. (viz seriál P. Šímy a I. Trebichavského o horizontálním přenosu genetické informace, Živa 2006, 1–6). To významně komplikuje klasický přístup k charakterizaci „druhů“, populací a společenstev, i když základní formulace populace (viz druhý odstavec textu) s tím v podstatě počítá. Řada prací dnes kritizuje příliš konzervativní pojetí fylogenetického stromu postaveného na hierarchizaci konzervativních úseků RNA, na kterém stojí uvedené genotypové metody. Pro náš problém to ale znamená jen větší otevřenost či plasticitu „druhu“ a odvozených kategorií proti klasické ekologii. Možná daleko větší problém než metody identifikace je časové a prostorové srovnání – generační doby bakterií žijících v přírodě jsou obecně v hodinách, ne ve dnech, měsících či letech, a počet bakterií na zeměkouli se odhaduje na  $10^{30}$  (počet „druhů“ možná na  $10^7$ ), takže naše znalosti jsou zatíženy především významným „podzvorkováním“ systému (nejen proti společenstvům savců). Pro distribuci bakterií po Zemi je proto stále živý rozpor a dialog mezi dnes uznávaným klasickým biogeografickým mechanismem, který předpokládá selektivní cesty podle mořských proudů, větrů, řek apod., a 70 let starou představou, že po Zemi je průběžně transportována „univerzální“ dávka bakterií (inokulum), z níž se na vhodných lokalitách uchytí některé druhy.

**3** Přehradní jezero s minimálním vlivem břehových partií. Základním společenstvem je bakterioplankton, který je vedle významné vertikální stratifikace ovlivňován také přísunem z říčního systému nad nádrží. Recyklace organického uhlíku probíhá v systému bakterioplankton – fytoplankton – zooplankton

### Typy vodních ekosystémů a bakteriální společenstva

Hranice, kde začíná vodní a končí terestrický nebo mokřadní ekosystém, je samozřejmě volná a budeme se zabývat základními typy povrchových vod – toky (od potůčků po řeky) a jezery (od tůňek po velké nádrže). Musíme vycházet z typických habitatů a uvažovat, jaká bakteriální společenstva v nich žijí a jaká je jejich role ve funkci ekosystému. Povaha bakteriálních společenstev (také vzhledem k uvedeným vlastnostem a metodickým možnostem) totiž obecně vede k posuzování jejich funkčních charakteristik, na rozdíl od strukturálních vlastností, které můžeme uplatňovat pro klasická společenstva eukaryot. Většina bakterií ve vodních ekosystémech je zřetelně heterotrofní (chemoorganotrofní). Autotrofní typy (v našem případě chemolitotrofní, tedy takové, které získávají energii oxidací anorganických sloučenin) se uplatňují v oxidaci amoniakálního dusíku (nitrifikace) a v metabolismu  $\text{C}_1$  sloučenin v sedimentech (metanogeneze). Konečnými produkty fermentace organických látek v anaerobních sedimentech jsou jedno- a dvojuhlikaté sloučeniny, které mohou být konvertovány na metan, nebo mohou být dále degradovány (mineralizovány) v aerobních podmínkách (tj. ve vodním sloupci).

### Stojaté vody

Klasický habitat je jezerní plankton – bez kontaktu se dnem a břehy, zásobovaný organickým uhlíkem z primární produkce fytoplanktonu. Bakterie se přímo podílejí na využití rozpustných produktů vylučovaných fytoplanktonem během denního cyklu fotosyntézy. Vlastní biomasa fytoplanktonu je využita buď při střídání jeho populací (odumírající a lyzující buňky), nebo průběžně prostřednictvím filtrujícího zooplanktonu (jako mechanicky rozložené a natrávené buňky). Recyklování bakteriálního buněčného materiálu funguje



třemi mechanismy: část zachytí a transformují filtrátoři, odhadem 30 % mortality bakterií padá za oběť aktivitě bakteriofágů (virů napadajících bakterie) a zbytek zkonsumují prvoci (jejich činnost může být odpojena od vyšších trofických hladin jako mikrobiální smyčka – loop). Činnost prvoků a zejména fágů může mít zásadní význam pro kontrolu druhového složení bakterioplanktonu. Naše „jezera“ jsou převážně umělé přehradní nádrže a můžeme v nich také sledovat změnu společenstva v podélném profilu – z „říčního“ na „jezerňá“. Sezonní změny bakterioplanktonu jsou tedy výsledkem interakce fytoplanktonu a zooplanktonu, prostřednictvím přísunu substrátů a predačního tlaku. Na tato sledování jsou dnešní metodiky dostatečně citlivé, nemůžeme však zatím čekat seznamy druhů. V malých tůňkách je významným zdrojem organického uhlíku rostlinný materiál z makrofyt vodních i terestrických, který ovšem musí být nejdříve „nadrčen“ kusadly vodních živočichů, transformován houbami apod.

V sedimentech funguje anaerobní respirace (redukce dusičnanu, síranu za nepřístupu vzduchu) a anaerobní procesy (fermentace), končící produkcí metanu, který je ovšem z velké části ihned zužitkován. I zde je podstatné recyklování sedimentujícího materiálu živočichy bentosu.

### Tekoucí vody

Pro tekoucí vody je základem podélný pohyb po proudu a pravidelné přecházení transportovaného materiálu (i rozpuštěných látek) z pohyblivé (driftující) vodní fáze do fáze přisedlé a zpět (spirální efekt). Tři hlavní habitaty určující příslušná společenstva jsou proudící voda, biofilm a hyporheál (viz dále). Studium bakteriálních společenstev a transformace látek v tocích zatím, zejména ve srovnání s jezery, zdaleka neposkytuje dostatečné výsledky a podklady pro popis funkčních mechanismů a bilancování toků materiálu a energie v systému. Je to vážný problém i z praktického pohledu na procesy degradace znečišťujících látek. Důvody jsou přinejmenším dva:

- Antropogenní ovlivnění řek je obrovské – od přímého znečištění přes erozi po úpravy koryt toků (ochrana před povodněmi, ochrana pozemků, energetika, plavba atd.).
- Na rozdíl od jezera jako jednotky je řeka

entita, která se mezi pramenem a mořem významně mění a vyvíjí a poznatky či mechanismy zjištěné v horních tocích jsou velmi omezeně použitelné na dolních tocích. (A můžeme se vrátit k předchozímu bodu.)

Na horních tocích je základním habitatem biofilm, který obrůstá pevné povrchy – kameny, dřevo apod. V něm se udržuje stálé společenstvo bakterií, sinic a řas, fixované v polymeru, který tvoří podstatnou část organického materiálu biofilmu. Toto přisedlé společenstvo přijímá a transformuje látky unášené vodou, včetně uvolňování produktů fotosyntézy. Do driftující vody se také uvolňují buňky bakterií a řas, které by v rychle proudící vodě nemohly růst. Dále po toku (a v zastínečných úsecích) už v biofilmu převládá bakteriální heterotrofní složka. Až na dolních tocích s pomalým prouděním se stává významným společenstvem tzv. říční plankton, tedy procesy ve vodním sloupci. S úpravami koryt a prohlubováním toků se říční plankton pravděpodobně vyskytuje podstatně výše po toku než v historických dobách, také přibýlo přerušení – vzduchových úseků přehrad, jezových zdrží apod. Na horních tocích je významným zdrojem organického uhlíku spád z okolí toku – jako substrát pro bakteriální společenstvo je ale dostupný až po rozkladu vodními živočichy.

Společenstvo biofilmu má některé zásadní rysy: základem je matrice vláken extracelulárních polymerů vyloučených specifickými bakteriemi, ve které jsou poměrně stále zachyceny buňky bakterií, řas, sinic atd., přičemž biomasa vlastních buněk tvoří jen zlomek organického materiálu matrice. Buňky zde fungují jako soubor (konsorcium) různých metabolických typů, ve kterém mohou jednotlivé bakteriální kmeny (populace, společenstva...) spolupracovat sdílením substrátů, metabolitů, efektivním využitím extracelulárních enzymů apod. Udrží se zde i pomalu rostoucí kmeny, např. nitrifikující bakterie. Kumulace v omezeném prostoru biofilmu podporuje horizontální výměnu genového materiálu mezi buňkami a při stálé existenci v jednom místě toku mohou selektovat organismy schopné využít různé specifické substráty včetně znečišťujících organických látek – polutantů. Polutanty se ostatně v biofilmu hromadí také působením fyzikálních a chemických sil a vazeb.

4 Velká řeka v prohloubeném a zjednodušeném korytě – zde existují planktonní společenstva, role přisedlých společenstev je nevýznamná. Snížení koncentrace organického uhlíku bakteriálním společenstvem je méně efektivní, roste význam primární produkce uhlíku fytoplanktonem

5 Horní tok potoka. Zdrojem organického uhlíku je přísun terestrického uhlíku z povodí, v případě oslunění přechodně primární produkce biofilmu v toku. Systém má silné kolísání teplot a průtoku vody a značnou část roku je bez osvětlení (zástín, spadané listy, sněhová pokrývka). V nižších partiích toku jsou přisedlá společenstva (biofilm, hyporheál) schopna účinně využít transportovaný organický uhlík, včetně polutantů. Snímky J. Fuksy

Na dně toků, např. ve šterkovém dně, funguje třetí říční habitat – hyporheál. Ten zásobuje voda, která je z řeky zatlačována do dna a opět pod tlakem vysávána. Postupově rychlosti vody jsou zde v metrech za hodinu, takže bakterie zde mohou žít vedle biofilmu na povrchu částic šterku také ve vymezené (intersticiální) vodě. Systém má sníženou koncentraci kyslíku, funguje zde denitrifikace, tvorba metanu a také např. dechlorace polutantů. Pokud je koryt řeky upraveno na hladký a rovný inženýrský tvar, tento zásadní biotop mizí.

### Závěrem

I moderní a laboratorně náročné metody dávají velmi omezenou možnost stanovení druhové struktury bakteriální složky vodních společenstev. Jejich popis tedy nemůže být identický se společenstvy rostlinnými nebo živočišnými. Rozhodující roli ve struktuře i funkci bakteriálních společenstev hrají podmínky prostředí, na které mohou společenstva reagovat vedle selekce také adaptací na genové úrovni. Významná je interakce s ostatními složkami systému – primárními producenty a konzumenty, kteří regenerují zdroje organického uhlíku. Většina vodních bakteriálních společenstev je heterotrofní, mezi nimi mají jedinečné postavení typy schopné redukovat dusičnan (denitrifikace), oxidovat amonný dusík (nitrifikace) a produkovat metan. Pro druhou a třetí skupinu lze už dnes uspokojivě určovat „druhy“, pro zbytek máme zatím k dispozici jen omezené, spíše signální informace.