



Výzkum hyporheických biofilmů Vltavy v NP Šumava s ohledem na juvenilní perlorodky, jejich potravní nároky a dostatečné nasycení intersticiální vody kyslíkem

RADKA ČABLOVÁ, MARTIN RULÍK, ADAM ČABLA, MAGDALENA FIRLOVÁ

Klíčová slova: biofilm – TOC – polysacharidy – kyslík – respirace – perlorodka říční

SOUHRN

Výzkum biofilmů probíhá v rámci projektu „Posílení a ochrana populace perlorodky říční v NP Šumava“ již od roku 2018, kdy byly hledány a testovány vhodné výzkumné metody a postupy studia vývoje biofilmů na hyporheických sedimentech (např. inkubace skleněných kuliček versus inkubace říčního sedimentu, granulometrický průzkum sedimentů dna) a vybrány nejvhodnější lokality pro umístění experimentálních zařízení. V roce 2019 byl proveden na

třech vybraných lokalitách testovací tříměsíční výzkum hyporheických biofilmů v toku Vltavy v NP Šumava s ohledem na juvenilní perlorodky, jejich potravní nároky a dostatečné nasycení intersticiální vody kyslíkem. Cílem tohoto výzkumu bylo jak ověření zvolených metod a účinnosti experimentálních zařízení pro sledování vývoje a kvantifikaci hyporheického biofilmu narůstajícího na inkubovaném říčním sedimentu za určitý čas, tak i sledování obsahu a koncentrace kyslíku rozpuštěného v intersticiální vodě a jeho změny ve vztahu k narůstající biomase hyporheického biofilmu.

Tento příspěvek se věnuje výzkumu hyporheických biofilmů řeky Vltavy v NP Šumava, který v návaznosti na zkušební výzkum v roce 2019 probíhal na stejných lokalitách od dubna do listopadu roku 2020. Výsledky analýz a měření poskytují odpovídající hodnoty kyslíku, teploty i biomasy biofilmu typické pro podhorský tok oligotrofního charakteru v chráněném území. Nasycení intersticiální vody kyslíkem je po většinu roku pro perlorodku říční dostačující, výjimku tvoří letní období, kdy na sledovaných lokalitách došlo k náhlým poklesům koncentrace, pro které zatím nemáme uspokojivé vysvětlení. Detekce polysacharidů jakožto proxy pro mikrobiální biofilm společně s naměřenými hodnotami celkového organického uhlíku (TOC) na inkubovaném sedimentu naznačují dostatečnou potravní základnu pro juvenilní perlorodky obývající intersticiální hyporheické prostředí Vltavy.

Kompletní vyhodnocení našeho sledování bude provedeno po ukončení výzkumu, který probíhá i v letošním roce 2021, a poskytne nám možnost porovnat data mezi sebou v průběhu dvou let.

ÚVOD

Perlorodka říční (*Margaritifera margaritifera*) je kriticky ohroženým druhem mlže s velmi složitým životním cyklem. Po larvální parazitické fázi na žábách rybiho hostitele a po procesu metamorfózy následuje vývoj juvenilní perlorodky v říčních sedimentech toku (tzv. hyporheická zóna). Toto období je považováno za jednu z nejkritičtějších fází jejího života [3], především v důsledku degradace těchto stanovišť znečištěním a následnou kolmatací [2], ale také v důsledku vývoje filtračního aparátu u těchto mladých perlorodek [3]. Mladé perlorodky zahrabané v hyporheickém sedimentu po dobu 5 až 10 let se tak mohou potýkat s nedostatečným nasycením intersticiální vody kyslíkem, ale i s nevhodnou skladbou potravy – detritu [1]. U perlorodky říční dochází během prvních 44 měsíců života k žaberní ontogenezi, která se odvíjí více od velikosti jedince než od jeho stáří. Až od velikosti 4–5 mm dochází u juvenilní perlorodky ke zvýšení počtu žaberních oblouků natolik, že je schopna efektivní filtrace. U jedinců menších sice dochází k postupné přestavbě a vývoji žaberních oblouků, ale ty ještě nejsou schopny filtrovat potravní částice z vody tak jako u dospělých jedinců (cilie nemají patřičnou hustotu). Mladé perlorodky (do 4–5 mm) si tak získávají potravu sběrem částic pomocí svalnaté nohy porostlé ciliemi [2, 3]. Z tohoto hlediska je pro mladé jedince, hledající si potravu stíráním hyporheických sedimentů, velmi důležitá permeabilita dnových sedimentů [1, 4]. Jako jedna z možností potravy pro juvenilní perlorodky vyvíjející se v říčních sedimentech se jeví hyporheický biofilm [5].

Hyporheál je druh habitatu, který je shora ohraničen vodou povrchovou a ze spodní strany vodou podzemní [9]. Jedná se o označení dnových sedimentů, které prostřednictvím pórů umožňují komunikaci vody říční s vodou podzemní [6]. K této komunikaci dochází v důsledku rozdílných tlakových zón, kdy se povrchová voda zanořuje do hyporheálu a my hovoříme o tzv. downwelling zóně. Tam, kde je z hloubky intersticiální voda vytlačována směrem k povrchu, hovoříme o upwelling zóně [9]. Hyporheická zóna slouží nejen jako refugium pro řadu vodních organismů [6], ale hraje také velmi důležitou roli v říčním metabolismu a koloběhu živin, jež jsou prostřednictvím hyporheického společenstva mikroorganismů zpřístupněny dalším konzumentům [6, 7]. Jednotlivá zrna hyporheického sedimentu jsou, stejně jako mrtvá rostlinná a živočišná hmota, pokryta biofilmem – společenstvem bakterií, archeí a hub spojených extracelulární polymerní maticí [8, 9]. Hyporheické biofilmy pokrývající sedimenty řek jsou označovány jako „mikrobiální kůže“ [8], která svou adsorpcí, retencí a transformací živin a látek významně ovlivňuje biogeochemické toky živin. Mezi nejdůležitější procesy, kterých se říční biofilmy účastní, patří koloběh uhlíku prostřednictvím degradace a transformace organického materiálu (OM) [7, 8]. Říční biofilmy slouží jako úložiště rozpuštěného organického uhlíku (DOC) a jejich činnost v přeměně rozpuštěného organického materiálu (DOM)

na partikulovaný organický materiál (POM) je mimo jiné jedním z hlavních procesů v říčním samočištění [10].

Stěžejním cílem tohoto výzkumu je prokázat přítomnost mikrobiálních biofilmů na inkubovaných sedimentech. Jako indikátor přítomnosti biofilmu (tzv. proxy) byly zvoleny polysacharidy, které tvoří základní strukturní jednotky tzv. extracelulární polysacharidové matrice biofilmů. Dalším z cílů pak bylo zjistit, zda rozvoj biofilmů a akumulace organických látek v intersticiálních sedimentech mohou nějakým způsobem ovlivnit hodnoty rozpuštěného kyslíku v intersticiální vodě sedimentů, jehož koncentrace je kritická pro přežívání juvenilních perlorodek.

MATERIÁL A METODIKA

Lokality

Pro umístění experimentálních zařízení byly záměrně vybrány tři odlišné lokality řeky Vltavy v NP Šumava (obr. 1). Výzkumné místo nacházející se na Teplé Vltavě, charakteristické standardním štěrkopískovým dnem je pro naše účely označeno jako Dobrá na Šumavě (48.8805625N, 13.8686922E). Ovesná (48.8258247N, 13.9356317E) leží pod soutokem Teplé a Studené Vltavy a je typická štěrkopískovým dnem, ve kterém je větší zastoupení písku. Poslední místo pro výzkum bylo zvoleno na Studené Vltavě (48.8632139N, 13.8630597E). Jedná se o pravostranný přítok Teplé Vltavy, jehož charakter dna odpovídá štěrkopísku s velkými kameny. Všechny toky leží v oblasti vyšší než 700 m n. m.



Obr. 1. Charakter sedimentů dna na lokalitách Dobrá na Šumavě, Ovesná a Studená Vltava (zleva)

Fig. 1. Character of bottom sediments at Dobrá na Šumavě, Ovesná a Studená Vltava (from left)

Experimentální zařízení

KRABICE

Původní model experimentální krabice byl vytvořen Puschem pro výzkum respirace společenstva hyporheických sedimentů, prostorové distribuce heterotrofní aktivity v sedimentech (krabice umožňovala výzkum biomasy biofilmu až do hloubky 40 cm) a jejího propojení s hydraulickými vlastnostmi toku [11]. Krabice velmi dobře splňuje požadavky pro růst biofilmu či akumulaci látek v různých hloubkách hyporheické zóny. Pro náš výzkum byly dle původního modelu, ve spolupráci s Martinem Rulíkem, vyrobeny tři krabice poloviční velikosti. Uvnitř krabic jsou ve stojanu, horizontálně v hloubkách 10 a 20 cm, umístěny dva válce o objemu 500 ml, jejichž konce jsou uzavřeny víčky se síťovinou o velikosti ok 1 mm. Válce umožňují výzkum biomasy biofilmu ve vertikálním profilu dna řeky. Samotná krabice exponovaná ve dně je stabilní a umožňuje snadné vyjmutí (či navrácení) vnitřního stojanu s válci se zachováním polohy krabice ve dně (obr. 2). Po vyjmutí je možné válce napojit na oxymetr a před dalšími analýzami změřit respiraci intaktního biofilmu *in situ*.



Obr. 2. Experimentální krabice

Fig. 2. Experimental box

VÁLEČKY

Pro zachycení variability v plošném nárůstu biomasy hyporheického biofilmu a zkoumání jeho vlivu na obsah kyslíku v intersticiální vodě válečků těsně pod povrchem dna (z důvodu dostatečného nasycení intersticiální vody kyslíkem je dle Simona [1] považována za maximální možnou hloubku výskytu juvenilů v hyporheálu hloubka 10 cm) byly vyrobeny experimentální válečky z nerezové síťoviny o délce 10 cm (obr. 3). Dovnitř válečků je zavedena silikonová hadička k jímání intersticiální vody a měření kyslíku *in situ* během inkubace válečků 3–5 cm pod povrchem dna. Voda je za pomoci injekční stříkačky nasávána nad hladinu říční vody z metr dlouhé silikonové hadičky ústící dovnitř válečku. Tato hadička byla na dolním konci ve válečku zakončena dvěma vrstvami tkaniny uhelou o velikosti ok 40 μm (vnitřní vrstva) a 100 μm (vnější vrstva), aby do ní nebyl nasát písek z válečku. Druhý konec hadičky, vyvedený z válečku do říční vody, byl opatřen gumovou zátkou. Prvních 10 ml vody (objem hadičky) bylo před měřením vždy nasáto a vylito, aby byl systém zbaven vody, která v něm stála, a propláchnut. V dalších 5 ml vody nasáté z válečku byl přenosným membránovým oxymetrem (WTW Multi 3320) s automatickou teplotní korekcí změřen, bezprostředně po odběru, obsah rozpuštěného kyslíku. Měření obsahu kyslíku z intersticiální vody válečků bylo opakováno každých 14 dní, včetně měření teploty a obsahu kyslíku v říční vodě.

Při tvorbě těchto výzkumných válečků jsme se inspirovali od výzkumníků Capoula a Pasca na konferenci v Bretani v roce 2014 [1]. Metoda jímání intersticiální vody z válečků za pomoci silikonové hadičky je podobná metodě použití minipiezometrů, kde je velmi žádoucí zavedení odběrového tělesa do podříčního dna hned na počátku výzkumu, aby nedocházelo ke kontaminaci vzorku intersticiální vody vodou povrchovou z důvodu opakovaného rozrušování sedimentů dna [12–16]. Ve své studii zaměřené na metodu měření kyslíku v říčních sedimentech za pomoci trubek z nerezové oceli, zavedených po celou dobu výzkumu do hyporheálu, autoři zjistili, že kontaminace zbytkovou vodou či zkrslením obsahu kyslíku v důsledku extrakce intersticiální vody pod tlakem jsou zanedbatelné [17].

SUBSTRÁT

Substrátem pro vývoj biofilmu ve válcích v experimentálních krabicích i v experimentálních válečcích byl písek o velikosti 1–2 mm odebraný z Vltavy (obr. 4). Je to nejmenší možná frakce substrátu z hlediska velikosti ok síťoviny válečků a válců i z hlediska výzkumu množství jemného naplaveného organického materiálu (FPOM). Nejmenší možnou velikost zrn písku jsme zvolili i z důvodu největšího výskytu partikulovaného organického materiálu (POM) na znech sedimentu o frakci < 1 mm [18]. Dle Leichtfriedové [19] je hlavním důvodem osídlení této velikostní frakce zrn sedimentu větší plocha k osídlení pro mikrobiální společenstvo. Obdobná velikostní frakce je optimální pro chov juvenilních perlorodek [1]. Odebraný říční písek byl před použitím přesítován a vyžhán pro sterilizaci.



Obr. 3. Experimentální válečky (foto vlevo: I. Ibrahimovič)

Fig. 3. Experimental rollers (left photo: I. Ibrahimovič)



Obr. 4. Odběr a zpracování písku o velikosti 1–2 mm z lokality Ovesná, který je následně inkubován ve válcích a válečcích

Fig. 4. Collection and processing of sand 1–2 mm in size from the Ovesná site, which is subsequently incubated in cylinders and rollers

UMÍSTĚNÍ

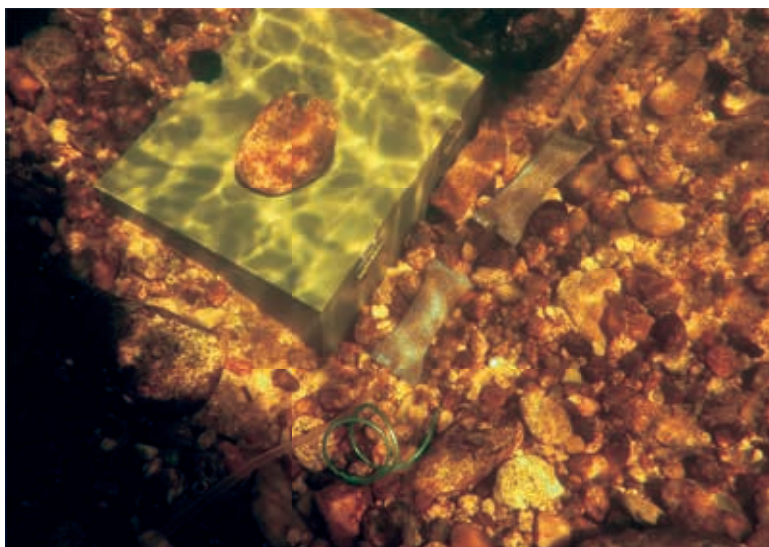
Na Dobré na Šumavě, Ovesné i Studené Vltavě zůstaly z podzimu 2019 umístěny ve dně experimentální krabice, do nichž byly 23. dubna 2020 vsunuty stojany s nově připravenými válci s vyžháným pískem. Do tří míst ve vzdálenosti 5 cm od krabice bylo umístěno vodorovně 6 malých válečků s hadičkami, vždy po dvojici. Jeden váleček z dvojice byl umístěn do hloubky 20 cm (stejně jako nejnížší válec v krabici) a druhý do hloubky 10 cm (stejně jako nejvyšší válec v krabici) (obr. 6). Dvě dvojice válečků byly doplněny o kontinuální teploměry HOBO Pendant® Temperature/Light 64K Data Logger, které byly také zavedeny do hloubky 10 a 20 cm za pomoci hřebíku. Teplota byla snímána každou hodinu.

Kolem krabice byla dále vybrána tři místa pro umístění sady vždy tří kusů malých válečků s hadičkami a jednoho velkého válce z krabice do hloubky 3–5 cm (obr. 5). Každé z míst bylo doplněno dvěma kontinuálními teploměry



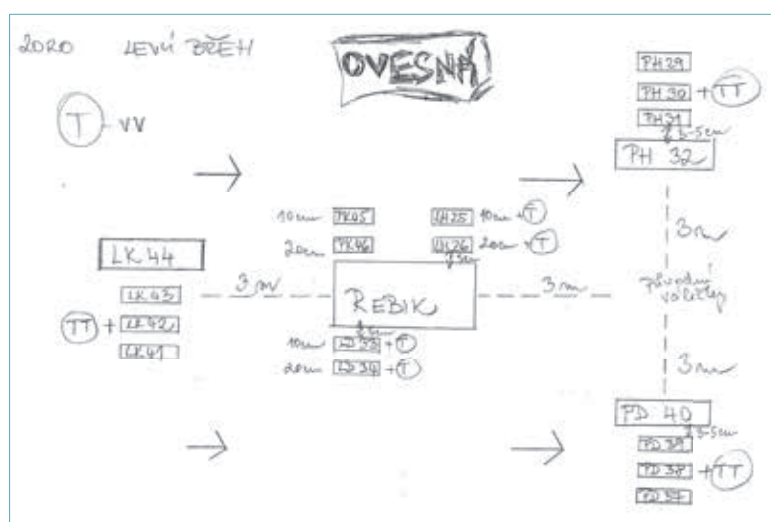
Obr. 5. Příklad umísťování válečků, teploměrů a jednoho válce do hloubky 3–5 cm hyporheálu na lokalitách Ovesná a Studená Vltava (zleva)

Fig. 5. Example of placing rollers, thermometers and one cylinder to a depth of 3–5 cm in the hyporheal at the Ovesná and Studená Vltava sites (from left)



Obr. 6. Příklad umístění válečků kolem experimentální krabice do hloubky 10 cm hyporheálu na lokalitě Studená Vltava (z válečků umístěných v hloubce 20 cm jsou již vidět jen hadičky)

Fig. 6. Example of placement of rollers around the experimental box to a depth of 10 cm of the hyporheal at the Studená Vltava site (only the tubes are visible from the hyporheal rollers placed at a depth of 20 cm)



Obr. 7. Náčes umístění experimentálních zařízení v hyporheických sedimentech na jedné z lokalit – Ovesná. REBIK – experimentální krabice se dvěma válci v hloubce 10 a 20 cm, malé obdélníky znázorňují malé experimentální válečky a velké obdélníky velké experimentální válce, T – kontinuální teploměr

Fig. 7. Drawing of the location of experimental equipment in hyporheic sediments at one of the sites (Ovesná). REBIK – experimental box with two cylinders at a depth of 10 and 20 cm, small rectangles represent small experimental rollers and large rectangles large experimental cylinders, T – continuous thermometer

umístěnými u válečku a pod ním. Rozmístění krabice a okolních válců a válečků bylo na všech třech lokalitách stejné. Ze všech malých válečků byla každých 14 dní jímána intersticiální voda za pomoci metr dlouhé silikonové hadičky a měřen obsah rozpuštěného kyslíku. Všechny válečky i válce byly označeny cedulkami s čísly, charakteristickými pro každou z lokalit (obr. 7).

Celkově bylo na každou z lokalit umístěno 15 kusů malých válečků s hadičkami, 5 kusů velkých válců, deset HOBO teploměrů do dna a jeden HOBO teploměr do říční vody.

Vyjmutí

Veškeré válce, válečky i teploměry byly vyjmuty 5. listopadu 2020 a ihned proběhlo jejich zpracování. Ve velkých válcích byla v podmínkách *in situ* měřena respirace. Válce byly postupně napojeny na obvod s membránovým oxymetrem (WTW Multi 3320) a čerpadlem, který simuloval proud vody prostupující hyporheickými sedimenty (sedimenty ve válci) (obr. 8). Celý oběh byl naplněn říční vodou z dané lokality. V průběhu měření bylo v 10minutových intervalech zaznamenáváno množství kyslíku v cirkulující vodě. Respirace biofilmu byla ve všech válcích měřena po stejný časový úsek (30 minut).



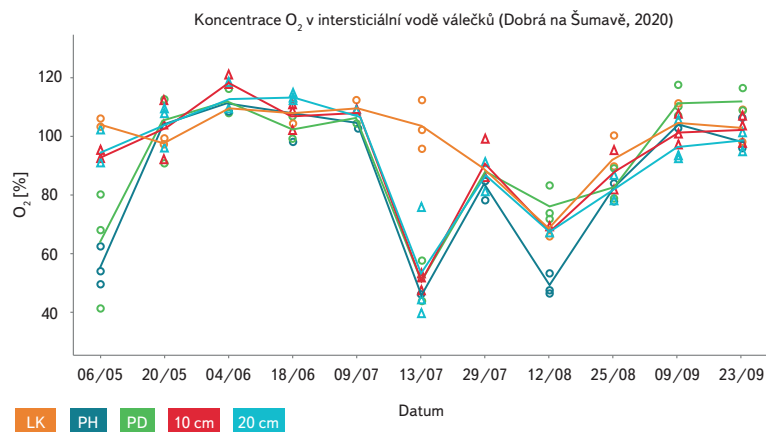
Obr. 8. Měření respirace ve válcích v podmínkách *in situ*

Fig. 8. Measurement of respiration in cylinders under *in situ* conditions

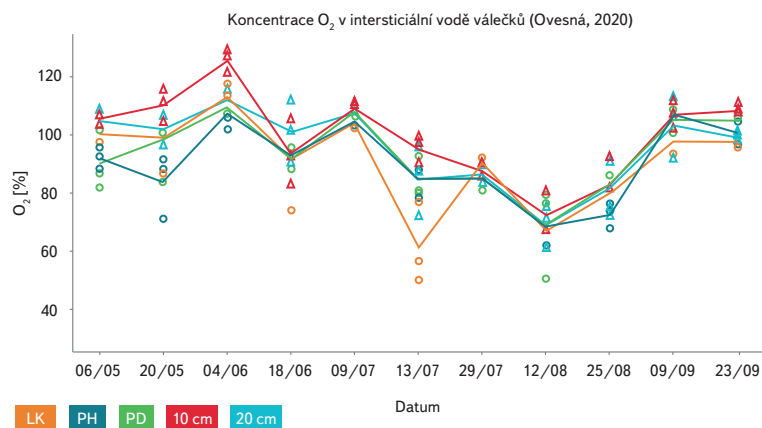


Obr. 9. Zpracování písku a jemného organického materiálu (FPOM) z vyjmutých válečků a válců v laboratoři (první foto: J. Horáčková)

Fig. 9. Processing of sand and fine organic material (FPOM) from removed rollers and cylinders in the laboratory (first photo: J. Horáčková)



Obr. 10. Průměrné hodnoty nasycení intersticiální vody kyslíkem (%) ve třech experimentálních válečkách na každém z 5 míst (LK, PH, PD 3–5 cm pod povrchem) ve vodním toku v období 6. května až 23. září 2020 na lokalitě Dobrá na Šumavě
Fig. 10. Average values of oxygen saturation in interstitial water (%) of three experimental rollers at each of 5 sites (LK, PH, PD 3–5 cm below the surface) in the stream during the period 6 May – 23 September 2020 at the Dobrá site in Šumava



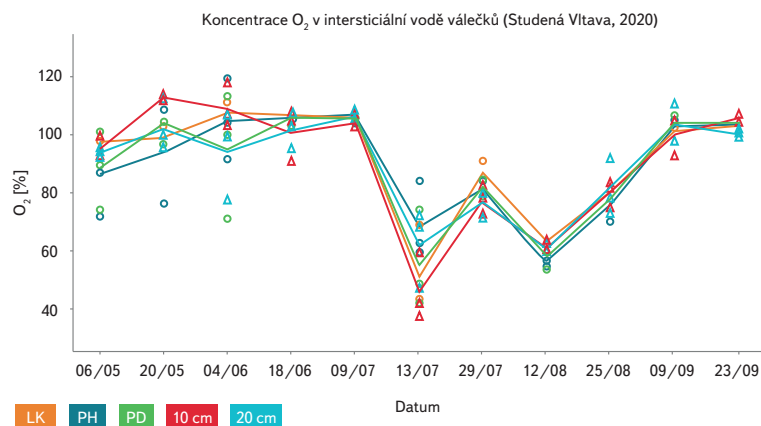
Obr. 11. Průměrné hodnoty nasycení intersticiální vody kyslíkem (%) ve třech experimentálních válečkách na každém z 5 míst (LK, PH, PD 3–5 cm pod povrchem) v toku v období 6. května až 23. září 2020 na lokalitě Ovesná
Fig. 11. Average values of oxygen saturation in the interstitial water (%) of three experimental rollers at each of the 5 sites (LK, PH, PD 3–5 cm below the surface) in the stream during the period 6 May – 23 September 2020 at the Ovesná site

Z malých válečků byl vyplaven jemný organický materiál (frakce FPOM, tj. menší než 1 mm), dekantován a zamrazen (obr. 9). Válce z experimentálních krabic žádný detrit neobsahovaly. Následně byl substrát každého válce i válečku rozdělen na podvzorky, které byly zamrazeny.

Analýzy

Po vyjmutí experimentálních válců byla změřena respirace biofilmu *in situ*, která je jedním z indikátorů přítomnosti hyporheického biofilmu na inkubovaném sedimentu [20]. Bakteriální respirace (aerobní) organického uhlíku na anorganický je prostřednictvím změn v koncentraci kyslíku velmi dobře měřitelným procesem heterotrofního metabolismu. [8, 10].

Jako hlavní proxy parametry vývoje hyporheických biofilmů na inkubovaných sedimentech jsme zvolili stanovení koncentrace polysacharidů dle Duboise a dále celkové množství organické hmoty na zrnech sedimentu a v FPOM, vyjadřované jako celkový organický uhlík (TOC) [21]. Obě analýzy byly



Obr. 12. Průměrné hodnoty nasycení intersticiální vody kyslíkem (%) ve třech experimentálních válečkách na každém z 5 míst (LK, PH, PD 3–5 cm pod povrchem) v toku v období 6. května až 23. září 2020 na lokalitě Studená Vltava
Fig. 12. Average values of oxygen saturation in interstitial water (%) of three experimental rollers at each of 5 sites (LK, PH, PD 3–5 cm below the surface) in the stream during the period 6 May – 23 September 2020 at the Studená Vltava site

provedeny na Přírodovědecké fakultě UP v Olomouci studentkou Magdalenou Firlovou pod dohledem doc. Martina Rulíka.

Stanovení celkového množství organické hmoty v biofilmu bylo provedeno metodou ztráty žiháním (loss of ignition, LOI) dle [22]. Podstatou metody je sušení inkubovaného sedimentu či FPOM 24 hodin při 100 °C v sušárně a jeho následné vyžhání v peci po dobu 3 hodin při teplotě 550 °C. Během procesu je zaznamenáván hmotnostní rozdíl sedimentu či FPOM po vysušení a následně po vyžhání. Získané hodnoty organické hmoty byly následně přepočteny na hodnoty TOC vynásobením koeficientem 0,45.

Stanovení koncentrace polysacharidů dle Duboise je popsáno jako metoda dehydratace cukrů ve vzorku za pomoci kyseliny sírové, následné kondenzace furfuralů a vzniku barevných produktů s fenolem, které lze stanovit za pomoci spektrofotometru [23, 24].

Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit software R. Vztahy mezi jednotlivými parametry hyporheického biofilmu byly ověřovány graficky a lineární regresí.

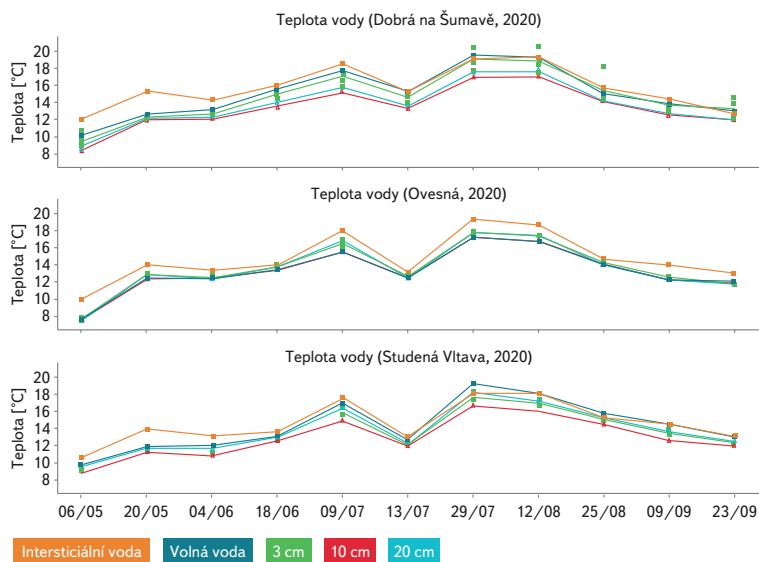
VÝSLEDKY

Měření kyslíku v intersticiální vodě

Nasycení intersticiální vody válečků kyslíkem (obr. 10–12) vykazovalo na jednotlivých lokalitách během roku 2020 velmi podobné hodnoty i trend. Koncentrace kyslíku v intersticiální vodě válečků přesahovala po většinu zkoumaného období hodnotu 65 % (jedná se o nejnižší možný obsah kyslíku ve vodě tolerovaný perlorodkou říční), výjimkou bylo letní období, kdy došlo na všech lokalitách k nápadnému poklesu nasycení pod tuto hraniční hodnotu.

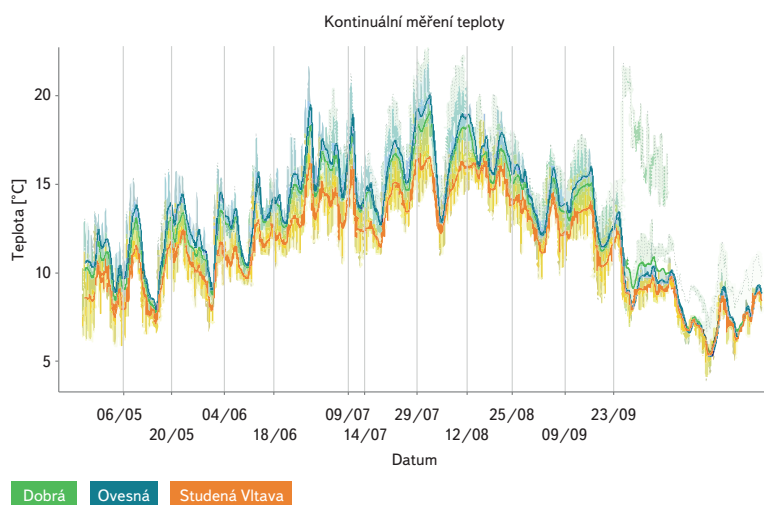
Teplota vody

Na obr. 13 je znázorněn záznam měření teploty za pomoci kontinuálních teploměrů HOBO Pendant[®], které byly umístěny v hyporheálu spolu s válečky v hloubkách 3, 10 a 20 cm. Jeden teploměr byl umístěn do volné říční vody. Zároveň byla každých 14 dní při měření koncentrace kyslíku v intersticiální vodě válečků klasickým digitálním teploměrem měřena i teplota intersticiální vody



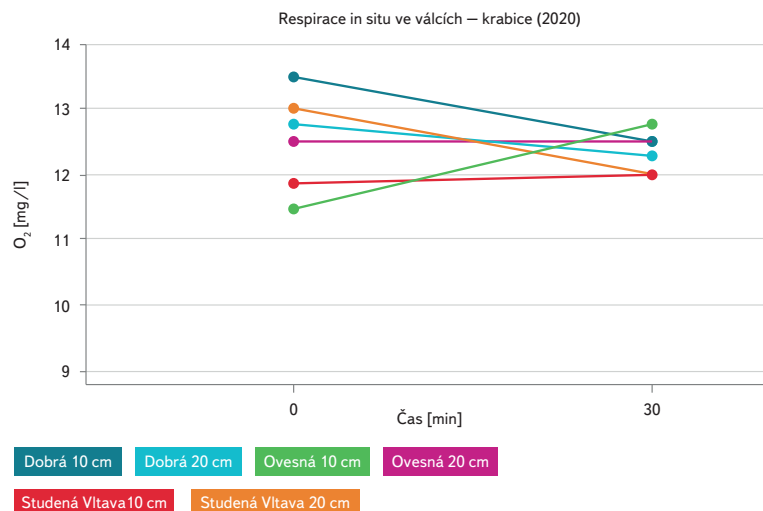
Obr. 13. Teplota intersticiální vody měřená za pomoci kontinuálních teploměrů HOBO Pendant[®] umístěných v hyporheických sedimentech spolu s experimentálními válečky v hloubkách 3, 10 a 20 cm v porovnání s teplotou („intersticiální voda“), která byla měřena klasickým digitálním teploměrem v intersticiální vodě malých válečků při každém měření koncentrace kyslíku, tj. od 6. května do 23. září 2020 na třech lokalitách Vltavy (Dobrá na Šumavě, Ovesná, Studená Vltava) a její porovnání s teplotou volné říční vody měřené kontinuálním teploměrem HOBO Pendant[®]

Fig. 13. Interstitial water temperature measured using HOBO Pendant[®] continuous thermometers placed in hyporheic sediments together with experimental rollers at depths of 3, 10 and 20 cm compared to the temperature („interstitial water“) measured with a conventional digital thermometer in the interstitial water of small rollers at each oxygen concentration measurement, i. e. 6 May – 23 September 2020 at three sites on the Vltava (Dobrá na Šumavě, Ovesná, Studená Vltava) and compared with the temperature of free river water measured with the HOBO Pendant[®] thermometer



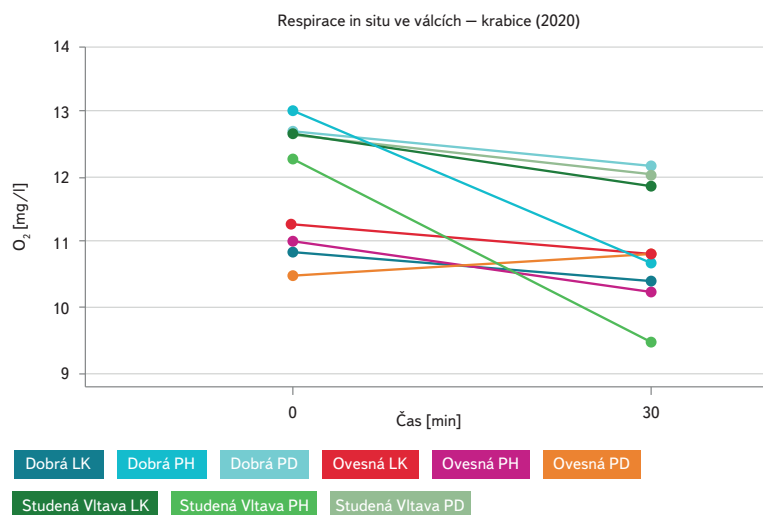
Obr. 14. Teplota intersticiální vody měřená od 6. května do 23. září 2020 na třech lokalitách (Dobrá na Šumavě, Ovesná a Studená Vltava) za pomoci kontinuálních teploměrů HOBO Pendant[®] umístěných ve volné říční vodě a v hyporheálu v hloubkách 3, 10 a 20 cm

Fig. 14. Interstitial water temperature measured from 6 May to 23 September 2020 at three sites (Dobrá na Šumavě, Ovesná and Studená Vltava) using HOBO Pendant[®] continuous thermometers placed in free river water and hyporheal at depths of 3, 10 and 20 cm



Obr. 15. Respirace *in situ* ve válcích z experimentálních krabic exponovaných na třech lokalitách (Dobrá na Šumavě, Ovesná a Studená Vltava) od jara do podzimu 2020

Fig. 15. In situ respiration in cylinders from experimental boxes exposed at three sites (Dobrá na Šumavě, Ovesná and Studená Vltava) from spring to autumn 2020



Obr. 16. Respirace *in situ* ve válcích exponovaných na třech místech kolem krabice v hloubce 3–5 cm spolu s malými válečky na lokalitách Dobrá na Šumavě, Ovesná a Studená Vltava

Fig. 16. Respiration in situ in cylinders exposed in three places around the box at a depth of 3–5 cm together with small rollers at the sites Dobrá na Šumavě, Ovesná and Studená Vltava

jímané stříkačkami. V grafu je viditelný shodný průběh teplot měřených ve stejné dny sezony, avšak odlišnými přístroji. Teploty naměřené ve stříkačkou odebrané intersticiální vodě válečků se od teplot naměřených kontinuálními teploměry zavedenými v hyporheálu lišily až o zhruba 2 stupně. Na obr. 14 je znázorněn velmi podobný průběh teplot snímaných všemi kontinuálními teploměry na třech výzkumných lokalitách (Dobrá na Šumavě, Ovesná a Studená Vltava). Nejteplejší lokalitou byla Ovesná, nejstudenější Studená Vltava.

Respirace

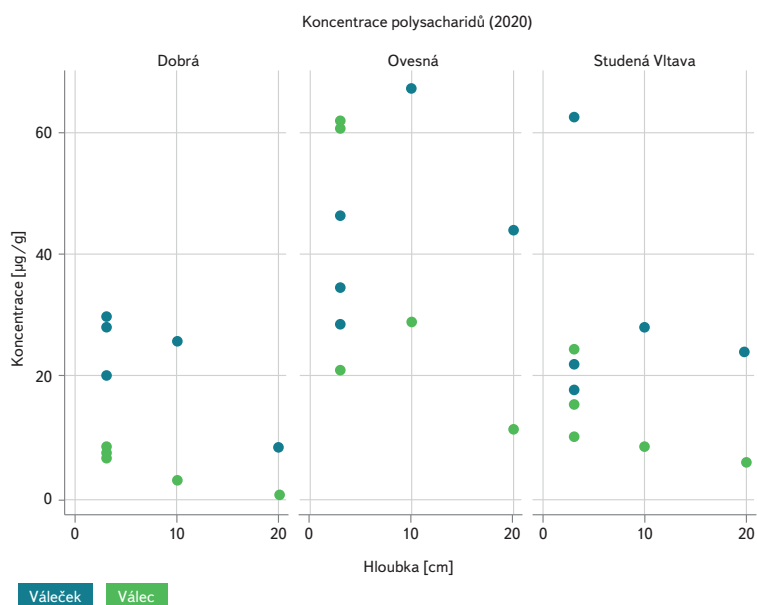
Měření respirace *in situ* ve válcích z experimentálních krabic poukázalo – prostřednictvím měření změn obsahu kyslíku po dobu 30 minut v každém

z válců – na přítomnost životaschopného mikrobiálního společenstva (obr. 15). U válců volně exponovaných v hyporheickém sedimentu 3–5 cm pod povrchem byly však při měření v intervalu 30 minut zaznamenány mnohem větší změny v koncentraci kyslíku v každém z válců (obr. 16). To naznačuje mnohem větší biomasu mikrobiálního společenstva, respektive vyšší aktivitu, než na sedimentu válců exponovaných v krabicích.

Koncentrace polysacharidů

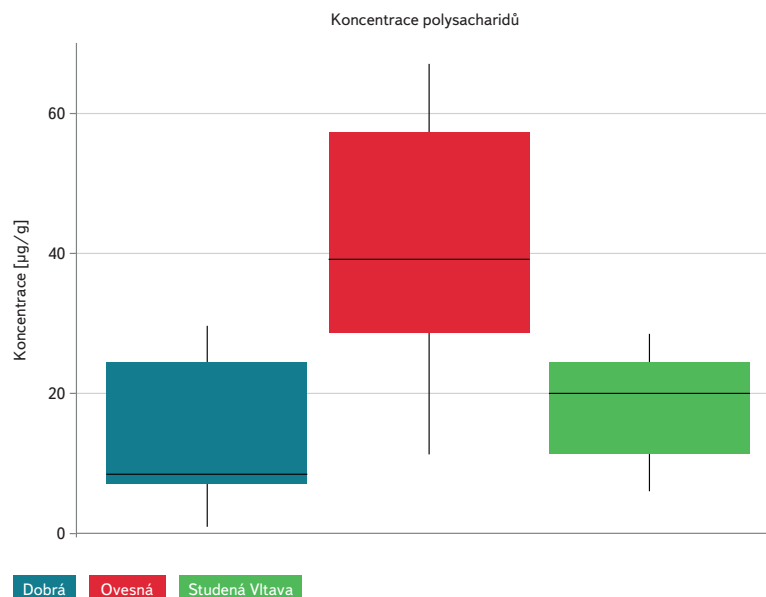
V inkubovaných hyporheických sedimentech byl Duboisovou metodou stanoven obsah polysacharidů, které tvoří hlavní stavební prvek biofilmů a nacházejí se v extracelulární polymerní matici (EPM). Touto maticí jsou jednotlivé buňky biofilmu obaleny a předpokládáme, že je produkována bakteriemi jako ochranná a propojující vrstva celého mikrobiálního společenstva – biofilmu [10].

Na obr. 17 vidíme, že nejnižší hodnoty koncentrace polysacharidů byly na lokalitách Dobrá na Šumavě a Studená Vltava naměřeny u válců, jež byly inkubovány v krabicích v hloubkách sedimentů 10 a 20 cm. Zajímavé je pozorování hodnot koncentrace polysacharidů u válečků umístěných volně v hyporheickém prostředí v blízkém sousedství krabice v hloubce 10 cm. U lokality Ovesná můžeme vidět, že u těchto válečků byly analyzovány vyšší koncentrace polysacharidů než u válečků umístěných těsně pod povrchem dna (hloubka 3–5 cm). Na základě této koncentrace polysacharidů lze předpokládat u válečků inkubovaných v hloubkách 10 a 20 cm kolem krabice i větší množství celkového organického uhlíku (TOC). Nejvyšší koncentrace polysacharidů v biofilmu byly obecně naměřeny na lokalitě Ovesná (obr. 18).



Obr. 17. Koncentrace polysacharidů v biofilmu na písku o velikosti zrn 1–2 mm, inkubovaného ve válečcích a vácích v hloubce 3–5 cm pod povrchem hyporheálu, válečcích v hloubkách 10 a 20 cm pod povrchem hyporheálu a ve vácích umístěných v krabici v hloubkách 10 a 20 cm na třech lokalitách (Dobrá na Šumavě, Ovesná a Studená Vltava) od jara do podzimu 2020

Fig. 17. Concentration of biofilm polysaccharides on sand with grain size 1–2 mm incubated in rollers and cylinders at depths of 3–5 cm below the hyporheal surface, rollers at depths of 10 and 20 cm below the hyporheal surface and cylinders placed in a box at depths of 10 and 20 cm at three sites (Dobrá na Šumavě, Ovesná and Studená Vltava) from spring to autumn 2020



Obr. 18. Koncentrace polysacharidů v biofilmu na písku o velikosti zrn 1–2 mm, stanovená ze všech experimentálních zařízení, která byla na dané lokalitě umístěna od jara do podzimu 2020 – porovnání všech tří lokalit

Fig. 18. Concentration of polysaccharides in biofilm on sand with grain size 1–2 mm, determined from all experimental devices deployed at a given site from spring to autumn 2020 – comparison of all three sites

Stanovení celkového organického uhlíku na sedimentu

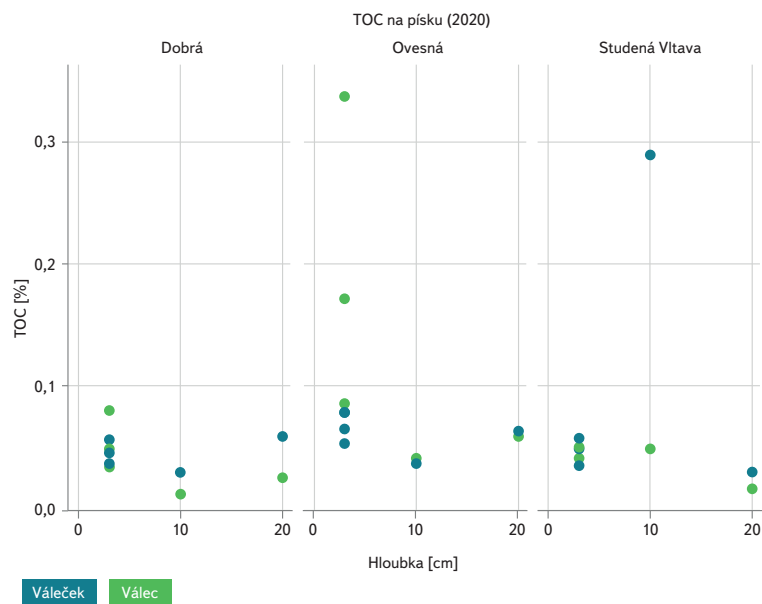
Nejvyšší hodnoty procentuálního zastoupení celkového organického uhlíku (TOC) byly zjištěny ve vácích exponovaných v hyporheické zóně v hloubce 3–5 cm pod povrchem na lokalitě Ovesná (obr. 19). Zajímavým zjištěním jsou velmi podobné hodnoty TOC ve vácích a válečcích umístěných volně v hyporheických sedimentech a ve vácích, které byly po celou dobu výzkumu exponovány v krabici na všech třech zkoumaných lokalitách (Dobrá na Šumavě, Ovesná a Studená Vltava). Dle obr. 20 byla nejvyššími hodnotami TOC (ze všech experimentálních zařízení dohromady) charakteristická lokalita Ovesná.

Vztahy mezi parametry

Při zkoumání vztahů mezi jednotlivými sledovanými parametry je vidět slabý přímý lineární vztah mezi množstvím TOC (%) na sedimentech a koncentrací polysacharidů v biofilmu (obr. 21). Mezi množstvím TOC a nasycením intersticiální vody kyslíkem nebyl zjištěn žádný statisticky signifikantní vztah (obr. 22).

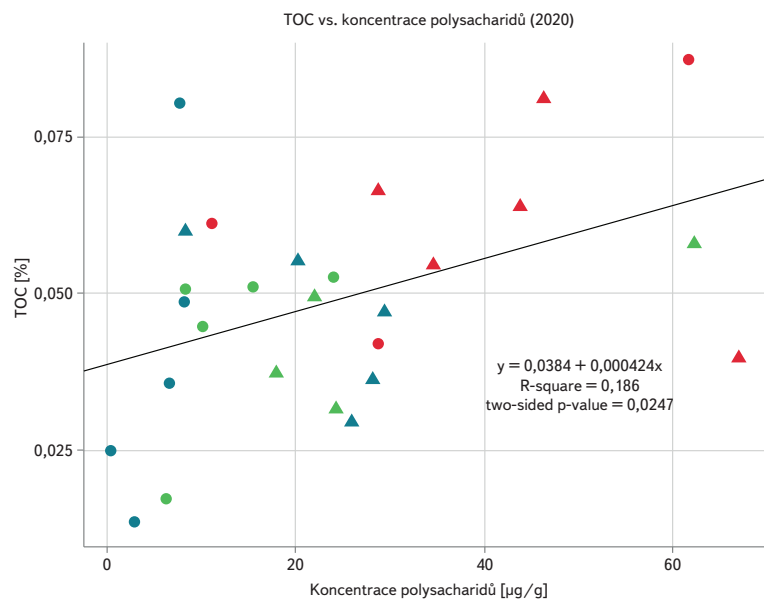
ZÁVĚR

Detekce polysacharidů jakožto proxy pro přítomnost biofilmu na inkubovaném sedimentu v experimentálních vácích a válečcích naznačuje, že intersticiální sediment byl v průběhu roku v různé míře kolonizován mikrobiálním biofilmem. Tento závěr podporují i výsledky z měření respirace *in situ* ve velkých vácích uložených v experimentálních krabicích i mimo ně. Kromě vlastního biofilmu se na zrnech písku nachází adheovaný organický materiál, který společně s vlastním biofilmem zahrnujeme pod označení TOC – tj. celkový organický uhlík. Nejvyšší hodnoty procentuálního podílu TOC i koncentrace polysacharidů byly zjištěny na sedimentech inkubovaných na lokalitě Ovesná, která



Obr. 19. Procentuální zastoupení celkového organického uhlíku (TOC) na písku o velikosti zrn 1–2 mm, inkubovaného ve válečcích a válcích v hloubce 3–5 cm pod povrchem hyporheálu, válečcích v hloubkách 10 a 20 cm pod povrchem hyporheálu a ve válcích umístěných v krabici v hloubkách 10 a 20 cm na třech lokalitách (Dobrá na Šumavě, Ovesná a Studená Vltava) od jara do podzimu 2020

Fig. 19. Percentual share of total organic carbon (TOC) in sand with grain size 1–2 mm incubated in rollers and cylinders at depths of 3–5 cm below the hyporheal surface, rollers at depths of 10 and 20 cm below the hyporheal surface and cylinders placed in a box at depths of 10 and 20 cm at three sites (Dobrá na Šumavě, Ovesná and Studená Vltava) from spring to autumn 2020



Lokalita
Dobrá Ovesná Studená Vltava
Typ
● Válec ▲ Váleček

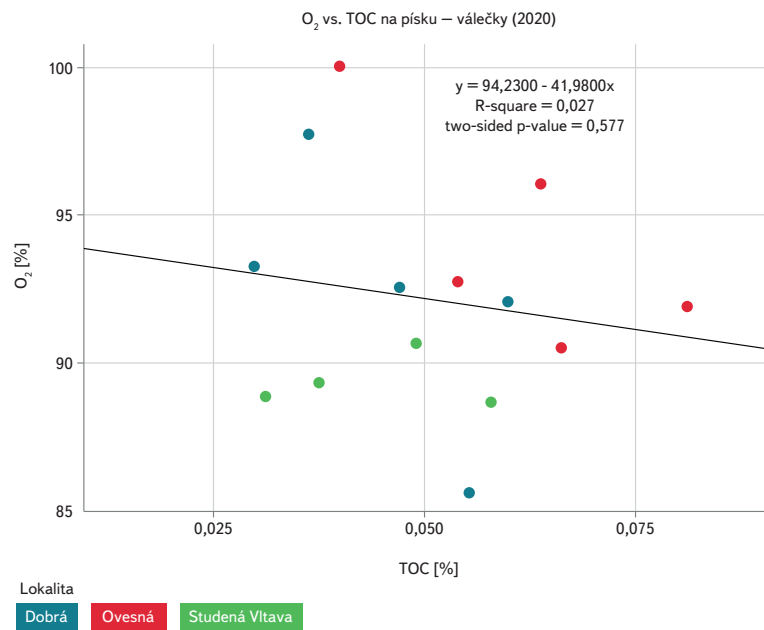
Obr. 21. Vztah mezi množstvím celkového organického uhlíku (TOC %) a koncentrací polysacharidů v biofilmu válečků a válců z lokalit Dobrá na Šumavě, Ovesná a Studená Vltava, 2020

Fig. 21. Relationship between the amount of total organic carbon (TOC %) and the concentration of polysaccharides in the biofilm of rollers and cylinders from the sites Dobrá na Šumavě, Ovesná and Studená Vltava, 2020



Obr. 20. Procentuální zastoupení celkového organického uhlíku (TOC) na písku o velikosti zrn 1–2 mm, stanovené ze všech experimentálních zařízení, která byla na dané lokalitě umístěna od jara do podzimu 2020 – porovnání všech tří lokalit

Fig. 20. Percentual share of total organic carbon (TOC) in sand with grain size 1–2 mm, determined from all experimental devices deployed at the site from spring to autumn 2020 – comparison of all three sites



Obr. 22. Vztah mezi množstvím celkového organického uhlíku (TOC %) a nasycením intersticiální vody válečků kyslíkem z lokalit Dobrá na Šumavě, Ovesná a Studená Vltava, 2020

Fig. 22. Relationship between total organic carbon (TOC %) and oxygen saturation in the interstitial water of rollers from the sites Dobrá na Šumavě, Ovesná and Studená Vltava, 2020

leží pod soutokem Teplé a Studené Vltavy a je charakterizována obecně vyšší koncentrací živin a nejvyšší průměrnou teplotou intersticiální vody.

Mezi množství organického uhlíku (TOC %), polysacharidů na inkubovaných sedimentech a kyslíkem rozpuštěným v intersticiální vodě nebyl prokázán žádný vztah. Fluktuační obsah kyslíku v intersticiální vodě v okolí inkubovaného sedimentu ve válečcích je ovlivněna spíše kolmatací sedimentů jemným organickým materiálem, nikoli rostoucí biomasou a respirací mikrobiálního společenstva (biofilmu). Koncentrace kyslíku v intersticiální vodě válečků přesahovala po většinu zkoumaného období hodnotu 65 % (jedná se o nejnižší možný obsah kyslíku ve vodě tolerovaný perlorodkou říční [25]), výjimkou bylo letní období, kdy byly naměřeny hodnoty nižší. Důvody tohoto náhlého poklesu obsahu kyslíku na všech studovaných lokalitách však zatím nejsme schopni exaktně vysvětlit, příčinou by mohlo být prudké zvýšení průtoků v důsledku letních bouřek spojené s erozí půdy a následnou kolmatací dna organickým materiálem.

Výzkum hyporheických biofilmů v NP Šumava pokračuje i v letošním roce (2021). Současně s tímto výzkumem probíhají ještě některé další analýzy vzorků z roku 2020, např. stanovení poměru C : N ve vzorcích FPOM, zachyceného v experimentálních válcích a válečcích, který nám poskytuje informaci o dostupnosti a kvalitě hyporheických biofilmů jakožto možné potravy pro juvenilní perlorodky.

Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory projektu „Posílení a ochrana populace perlorodky říční v NP Šumava: část 1 – Odchov, část 2 – Analýzy“ (NPS 04613/2017) a dvou interních grantů „Výzkum hyporheických biofilmů Vltavy v NP Šumava s ohledem na juvenilní perlorodky, jejich potravní nároky a dostatečně nasycení intersticiální vody kyslíkem“ (1645, 3600.52.11/2020) financovaných z prostředků na podporu rozvoje VÚV TGM. Děkuji též Vojtěchu Mrázkovi za technickou pomoc po celou dobu výzkumu.

Literatura

- [1] SIMON, O., TICHÁ, K., RAMBOUSKOVÁ, K., BÍLÝ, M., ČERNÁ, M., DORT, B., HORÁČKOVÁ, J., HRUŠKA, J., KLADIVOVÁ, V., ŠVANYGA, J., VYDROVÁ, A. Metodika podpory perlorodky říční (*Margaritifera margaritifera*). Praha: MŽP ČR, 2017, s. 283. ISBN 978-80-87402-63-4 (brož.), ISBN 978-80-87402-64-1 (on-line)
- [2] LAVICTOIRE, L., RAMSEY, A. D., MOORKENS, E. A., SOUCH, G., BARNHART, M. C. Ontogeny of Juvenile Freshwater Pearl Mussels, *Margaritifera margaritifera* (Bivalvia: Margaritiferidae). *PLoS ONE*, 2018, 13(3), s. 20, e0193637. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193637>
- [3] SCHARTUM, E., MORTENSEN, S., JAKOBSEN, K. P. From Pedal to Filter Feeding: Ctenidial Organogenesis and Implications for Feeding in the Postlarval Freshwater Pearl Mussel *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758). *Journal of Molluscan Studies*, 2017, 83, s. 36–42
- [4] DENIC, M., GEIST, J. Linking Stream Sediment Deposition and Aquatic Habitat Quality in Pearl Mussel Streams: Implications for Conservation. *River Research and Applications*, 2014, 31(8), s. 943–952. Dostupné z: doi: 10.1002/rra.2794
- [5] PASCO, P. Y., CAPOULADE, M., DURY, P., RIBEIRO, M., BEAUFILS, B., ROSTAGANT, L. Experiments on Reinforcement and N-situ Rearing Systems of the Pearl Mussel (*Margaritifera margaritifera*) in the Armorican Massif (France). In: MEHLER, K., BURLAKOVA, L. E., KARATAYEV, A. Y., DICKINSON, S. (eds.), *The Second International Meeting on Biology and Conservation of Bivalves*, Buffalo, New York, USA, 2015, October 4–8, s. 96
- [6] KABELKOVÁ JANČÁRKOVÁ, I. Význam hyporheické zóny pro samočištění mělkých řek na příkladu nitrifikace: 1. Experimenty a měření. *Vodní hospodářství*, 2000, 9, s. 199–204
- [7] LEICHTFRIED, M. Proteins: a Very Important Fraction of Particulate Organic Matter in River-Bed Sediments. *Advances In River Bottom Ecology*, 1998, s. 65–76
- [8] BATTIN, T., BESEMER, K., BENGTTSSON, M. et al. The Ecology and Biogeochemistry of Stream Biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14, s. 251–263. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.15>
- [9] FRANKEN, R., STOREY, R., WILLIAMS, D. Biological, Chemical and Physical Characteristics of Downwelling and Upwelling Zones in the Hyporheic Zone of a North-Temperate Stream. *Hydrobiologia*, 2001, 444, s. 183–195. Dostupné z: doi: 10.1023/A:1017598005228
- [10] RULÍK, M., BAUDIŠOVÁ, D., RŮŽIČKA, J., ŠIMEK, K. Mikrobiální ekologie vod. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013, s. 292. ISBN 978-80-244-3477-3.
- [11] PUSCH, M. The Metabolism of Organic Matter in the Hyporheic Zone of a Mountain Stream, and its Spatial Distribution. *Hydrobiologia*, 1996, 323, s. 107–118

[12] BURIÁNKOVÁ, I., BRABLCOVÁ, L., MACH, V., HÝBLOVÁ, A., BADUROVÁ, P., CUPALOVÁ, J., ČÁP, L., RULÍK, M. Methanogens and Methanotrophs Distribution in the Hyporheic Sediments of a Small Lowland Stream. *Fundamental and Applied Limnology* [online]. 2012, 181(2), s. 87–102. ISSN 18639135. Dostupné z: doi: 10.1127/1863-9135/2012/0283

[13] HARVEY, B. N., JOHNSON, M. L., KIERNAN, J. D., GREEN, P. G. Net Dissolved Inorganic Nitrogen Production in Hyporheic Mesocosm with Contrasting Sediment Size Distributions. *Hydrobiologia*, 2010, 658(1), s. 343–352. Dostupné z: doi: 10.1007/s10750-010-0504-4

[14] HAUER, R. F., LAMBERTI, A. G. *Methods in Stream Ecology*. 2nd edition. B. m.: Academic Press, 2007, s. 896. ISBN 13: 978-0-12-332908-0.

[15] HLAVÁČOVÁ, E., ČÁP, M. R. Anaerobic Microbial Metabolism in Hyporheic Sediment of a Gravel Bar in a Small Lowland Stream. *River Research and Applications*, 2005, 21, s. 1003–1011. Dostupné z: doi: 10.1002/rra.866

[16] TRULLEYOVÁ, Š., RULÍK, M., POPELKA, J. Stream and Interstitial Water DOC of a Gravel Bar (Sitka Stream, Czech Republic): Characteristics, Dynamics and Presumable Origin. *Archiv für Hydrobiologie*, 2003, 158, s. 407–420

[17] RISS, H. W., MEYER, E. I., NIEPAGENKEMPER, O. A Novel and Robust Device for Repeated Small-Scale Oxygen Measurement in Riverine Sediments-Implications for Advanced Environmental Surveys. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2008, 6(5), s. 200–207. Dostupné z: doi: 10.4319/lom.2008.6.200

[18] LEICHTFRIED, M. Organic Matter in Bedsediments – An Energy Source for Lotic Ecosystems (A Compilation of a Long Term Study). *Folia Facultatis Scientiarum Naturalium Universitatis Masarykianae Brunensis, Biologia*, 1995, s. 77–93

[19] LEICHTFRIED, M. Organic Matter in Gravel Streams (Project Ritrodal-Lunz). – *Verhandlungen der internationalen Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*, 1985, 22, s. 2058–2062

[20] RULÍK, M., HOLÁ, V., RŮŽIČKA, F., VOTAVA, M. Mikrobiální biofilmy. Olomouc: Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, 2011, s. 447. ISBN 978-80-244-2747-8.

[21] LEICHTFRIED, M. POM in Bed Sediments of a Gravel Stream (RitrodalLunz Study Area, Austria). *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*, 1991, 24(3), s. 1921–1925. Dostupné z: doi: 10.1080/03680770.1989.11899098

[22] HORÁKOVÁ, M., LISCHKE, P., GRUNWALD, A. Chemické a fyzikální metody analýzy vod. 1. vyd. Praha: SNTL, 1989, s. 389.

[23] DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 1956, 28, s. 350–356

[24] KÁŠ, J., KODIČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2006, s. 258. ISBN 80-7080-586-2.

[25] ČERNÁ, M., SIMON, O. P., BÍLÝ, M., DOUDA, K., DORT, B., GALOVÁ, M., VOLFOVÁ, M. Within-River Variation in Growth and Survival of Juvenile Freshwater Pearl Mussels Assessed by In Situ Exposure Methods. *Hydrobiologia*, 2018, 810(1), s. 393–414. Dostupné z: doi: 10.1007/s10750-017-3236-x

Autoři

Mgr. Radka Čablová¹

✉ radka.cablova@vuv.cz

ORCID: 0000-0003-4836-747X

Doc. RNDr. Martin Rulík, Ph.D.²

✉ martin.rulik@upol.cz

ORCID: 0000-0001-8643-3269

Ing. Adam Čabla, Ph.D.³

✉ adam.cabla@vse.cz

ORCID: 0000-0001-8549-801X

Bc. Magdaléna Firlová²

✉ magdalena.firlova01@upol.cz

¹Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, Praha

²Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta

³Vysoká škola ekonomická v Praze, Fakulta informatiky a statistiky

Příspěvek prošel lektorským řízením.

DOI: 10.46555/VTEI.2021.09.001

INVESTIGATION OF HYPORHEIC BIOFILMS OF THE VLTAVA RIVER IN ŠUMAVA NATIONAL PARK WITH REGARD TO JUVENILE PEARL MUSSELS, THEIR FEEDING REQUIREMENTS AND SUFFICIENT OXYGEN SATURATION OF INTERSTITIAL WATER

CABLOVA, R.¹; RULÍK, M.²; CABLA, A.³; FIRLOVA, M.²

¹T. G. Masaryk Water Research Institute Prague

²Palacký University in Olomouc, Faculty of Science

³University of Economics in Prague, Faculty of Informatics and Statistics

Keywords: biofilm – TOC – polysaccharides – oxygen – respiration – pearl mussel

The research on biofilms has been ongoing within the project “Strengthening and Protection of the Pearl Mussel Population in Šumava NP” since 2018, when suitable research methods and procedures for studying the development of biofilms on hyporheic sediments (e.g. incubation of glass beads versus incubation of river sediment, granulometric survey of bottom sediments) were sought and tested, and the most suitable locations for the placement of experimental facilities were selected. In 2019, a three-month trial study of hyporheic biofilms in the Vltava River in Šumava NP was carried out at three selected sites with respect to juvenile pearl mussels, their feeding requirements and sufficient oxygen saturation of the interstitial water. The aim of this research was to validate the chosen methods and the efficiency of experimental devices for monitoring the development and quantification of hyporheic biofilms growing on incubated river sediment over time; monitoring the content and concentration of dissolved oxygen in interstitial water and its changes in relation to the growing biomass of hyporheic biofilms.

This paper focuses on the research on hyporheic biofilms of the Vltava River in Šumava NP, which was carried out at the same sites from April to November 2020, following a trial research in 2019. The results of the analyses and measurements provide corresponding values of oxygen, temperature and biofilm biomass typical for a foothill stream of oligotrophic character in the protected area. The oxygen saturation of the interstitial water is sufficient for the river pearl mussel for most of the year, with the exception of the summer period when sudden drops in concentration occurred at the monitored sites, for which we do not yet have a satisfactory explanation. Detection of polysaccharides as a proxy for microbial biofilm together with measured total organic carbon (TOC) values on incubated sediment suggest a sufficient food base for juvenile pearl mussels inhabiting the interstitial hyporheic environment of the Vltava River.

A complete evaluation of our monitoring will be conducted after the completion of the study, which is still ongoing this year 2021, and will provide us with the opportunity to compare the data with each other over two years.