



Dynamika sezonowych zmian bioróżnorodności bakterii w jeziorach przymorskich: Łebsko i Sarbsko

Marcelina Jureczko^{}, Aleksandra Ziemińska-Buczyńska^{*},
Katarzyna Glińska-Lewczuk^{**}, Paweł Burandt^{**}, Szymon Kobus^{**},
Sylwia Lew^{**}, Krystian Obolewski^{***}*
^{}Politechnika Śląska, Gliwice*
*^{**}Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn*
*^{***}Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz*

1. Wprowadzenie

Wybrzeże południowego Bałtyku obfituje w zbiorniki będące w łączności z morzem, na które jednocześnie mają wpływ oddziaływania lądu (Cieśliński 2012). Często są to akweny o wodach słonawych, czyli o średniej zawartości soli, mieszczącej się w przedziale od 0,5 do 30‰ (Paturej 2005, Starmach i in. 1976). Do jezior przybrzeżnych o charakterze estuariów należą Łebsko i Sarbsko (Cieśliński 2012, Paturej 2005). Jako wody estuariowe są dynamicznymi ekosystemami o dużej i ciągłej amplitudzie gradientów fizykochemicznych i parametrów biologicznych, które wynikają ze zmian zasolenia, temperatury, pH, stężenia tlenu i nutrientów oraz zawartości materii organicznej, wywołanych ciągłym mieszaniem się w nich wód morskich oraz pochodzenia lądowego (Cieśliński 2011a, Paturej 2005). Na dynamikę przepływów oraz cechy fizyczne i chemiczne wód estuariów polskiego pobrzeża Bałtyku składają się różne zjawiska i procesy, takie jak: skład wód dopływających ze zlewni oraz natężenie dopływu wód morskich, kierunek i siła wiatru, pora roku i związane z nią zmieniające się warunki klimatyczne oraz czynniki antropogeniczne (Cieśliński 2011a, Cieśliński 2011b). Zbiorniki słonawe są

akwenami, w których występuje fauna i flora zarówno morska, jak i słodkowodna, jednak jedynie ta o odpowiednich zdolnościach adaptacyjnych (Paturej 2005). Główną masę występujących w estuariach żywych organizmów stanowią bakterie (Mudryk 1994). Dzięki wykorzystaniu narzędzi biologii molekularnej, w ostatnich dziesięcioleciach nastąpił bardzo duży postęp w ekologii drobnoustrojów i możliwa stała się charakterystyka mikroorganizmów na poziomie funkcjonalnym i filogenetycznym (Brzeszcz i in. 2013). Metody te, jak np. PCR-DGGE (ang. polymerase chain reaction – denaturing gradient gel electrophoresis), łącząca amplifikację z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy z elektroforezą w gradiencie czynnika denaturującego umożliwiają ocenę występowania różnic i podobieństw oraz uzyskanie profilu zbiorowisk mikroorganizmów występujących w badanej próbce, a także monitorowanie przestrzenne i czasowe zmian w strukturze zespołów mikroorganizmów, wywołanych na przykład wpływem czynników zewnętrznych (Brzeszcz i in. 2013, Frąc i Jezierska-Tys 2010, Ziemińska-Buczyńska i in. 2014, Ziemińska-Buczyńska 2015).

2. Materiały i metody

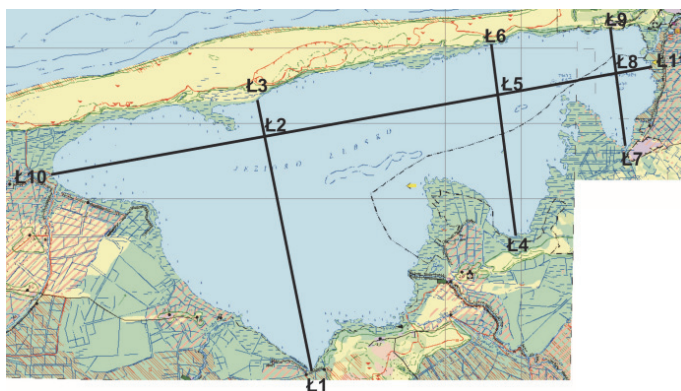
2.1. Materiał do badań

Materiałem do badań były próbki wody z jezior Łebsko i Sarbsko pobrane wiosną – w maju, latem – w lipcu i jesienią – w październiku 2014 roku w miejscach zaznaczonych na rysunkach 1 i 2. Probki pobrano przy powierzchni, a w miejscach S2, Ł2, Ł5 również przy dnie.

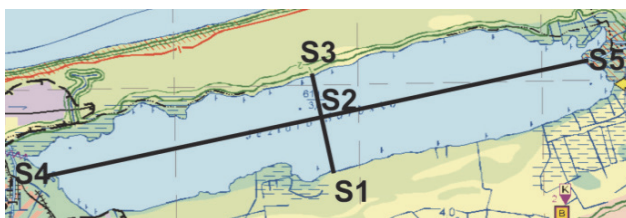
2.2. Izolacja DNA

Probki wody o objętości 100 ml przefiltrowano przez filtry poliwęglanowe (WHATMAN) o średnicy 47 mm i średnicy porów 0,2 μm . Następnie wycięto $\frac{1}{4}$ z każdego filtra i umieszczono w sterylnej probówce typu Eppendorf. Zawieszono w 1 ml 1 \times PBS (pH 7,4, skład: 8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/L Na_2HPO_4 , 0,24 g/L KH_2PO_4), a następnie worteksowano przez ok. 1 min., po czym wytrząsano w termomikserze w temp. 20°C przez 15 min., z prędkością 1 400 obr./min. Kolejno wyciągnięto filtry z probówek i próbki wirowano 5 min., przy 14 500 obr./min. Usunięto supernatant, a pozostały osad w każdej z probówek zawieszono w 100 μl buforu Tris (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) i dodano 20 μl

lizozymu (10 mg/ml, A&A Biotechnology). Po krótkim zwirowaniu, inkubowano w temp. 37°C przez 15 min. Po przygotowaniu materiału rozpoczęto procedurę izolacji zgodną z protokołem Genomic Mini DNA Isolation Kit (A&A Biotechnology).



Rys. 1. Mapa jeziora Łebsko z zaznaczonymi miejscami poboru próbek
Fig. 1. The map of the Łebsko lake with marked places of sampling



Rys. 2. Mapa jeziora Sarbsko z zaznaczonymi miejscami poboru próbek
Fig. 2. The map of the Sarbsko lake with marked places of sampling

2.3. Reakcja łańcuchowa polimerazy – PCR

W celu powielenia fragmentu bakteryjnego genu kodującego 16S rRNA o wielkości odpowiedniej do rozdziału w DGGE wykonano łańcuchową reakcję polimerazy, powielającą fragment o długości 180 pz. Reakcję PCR prowadzono z wykorzystaniem termocyklera w następujących warunkach: denaturacja wstępna: 95°C, 10 min; denaturacja: 95°C, 1 min.; przyłączanie starterów: 53°C, 1 min.; elongacja: 72°C, 2 min.; elongacja końcowa: 72°C, 12 min., z czego etapy 2, 3, i 4 były powtarzane 30 krotnie. W końcowej objętości 30 µl poszczególne składniki mie-

szaniny reakcyjnej miały następujące stężenia: $MgCl_2$ (2mM), buforu do polimerazy TAQ Go Flexi (2×), startery 1 i 2 (5 pmol/μl), mieszanina nukleotydów (20 pmol/μl), polimeraza TAQ Go Flexi (1,5 U, Promega) oraz DNA (0,2 μg/μl). Wykorzystane startery miały następujące sekwencje: 338f-GC: 5' CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG 3' i 518R: 5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3' (Muyzer i in. 1993).

2.4. Elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego – DGGE

W celu wykonania rozdziału fragmentów w gradiencie denaturacji - DGGE przygotowano bufor TAE oraz roztwory żelu poliakrylamidowego (8%) o stężeniu mocznika i formamidu 30% i 60%, zgodnie z protokołem zawartym w pracy Ziemińskiej-Buczyńskiej (2015). Następnie wleto żel poliakrylamidowy w rosnącym stężeniu czynnika denaturującego 30-60% pomiędzy dwie, odłuszczone przy pomocy alkoholu, odseparowane podkładami, umocowane w zaciskach i umieszczone w statywie szyby do DGGE. W tanku, do którego uprzednio wleto bufor TAE 1× umieszczono żel do którego do każdej z kieszonek nałożono po 25 μl produktów PCR. Elektroforezę w gradiencie denaturacji prowadzono w temp. 60°C przez 4,5 h przy napięciu 120 V. W kolejnym kroku żel barwiono przez 20 min. w roztworze barwnika SYBR Gold (1:10 000, Invitrogen) w stężeniu 0,05 μl/ml wody destylowanej, po czym odbarwiano w wodzie destylowanej, przez taki sam czas. Umożliwiło to wykonanie zdjęcia w świetle UV uwidaczniając powstałe fingerprinty.

2.5. Analiza bioinformatyczna i statystyczna

Korzystając z programu Quantity One 1D Software (BioRad) zaznaczono prążki i wykonano analizę densytometryczną. Następnie obliczono współczynnik podobieństwa Dice'a, oraz utworzono dendrogramy na podstawie algorytmu najbliższego sąsiada. Obliczono również indeks bioróżnorodności Shannona (H) – będący statystycznym wyrażeniem różnorodności biologicznej w ekosystemie według wzoru (1 i 2) (Fele-dyn-Szewczyk 2013, Ziemińska i in. 2011):

$$H = -\sum P_i \ln P_i \quad (1)$$

$$P_i = n_i / N_i \quad (2)$$

gdzie:

P_i – prawdopodobieństwo występowania określonych gatunków w próbce,
 n_i – liczba osobników i -tego gatunku,
 N_i – liczebność wszystkich osobników ze wszystkich gatunków na powierzchni pobranej.

Wyznaczono również istotność zależności bioróżnorodności przedstawionej w postaci indeksu Shannona od wybranych parametrów poprzez zastosowanie korelacji porządku rang Spearmana.

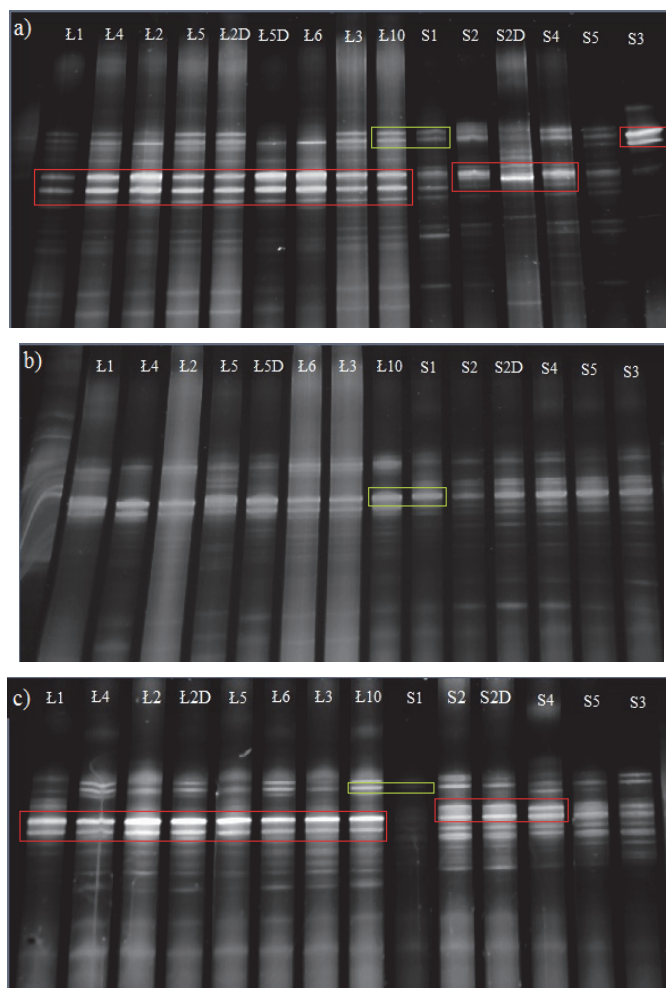
2.6. Badania fizyko-chemiczne

Badania fizykochemiczne obejmowały oznaczenie stężeń jonów anionowych (Br^- , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-}) i kationowych (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), które zostały zbadane z wykorzystaniem chromatografu jonowego Metrohm (881 Compact IC pro), wyposażonego w automatyczny dozownik próbek (863 Compact Autosampler) zgodnie z metodyką przedstawioną w Obolewski (2017) oraz Obolewski i in. (2017). Pomiar temperatury, pH i zawartości rozpuszczonego tlenu przeprowadzono *in situ*, za pomocą skalibrowanego multipleksera YSI 6600R2™ (Yellow Springs, OH, USA).

3. Wyniki badań i ich dyskusja

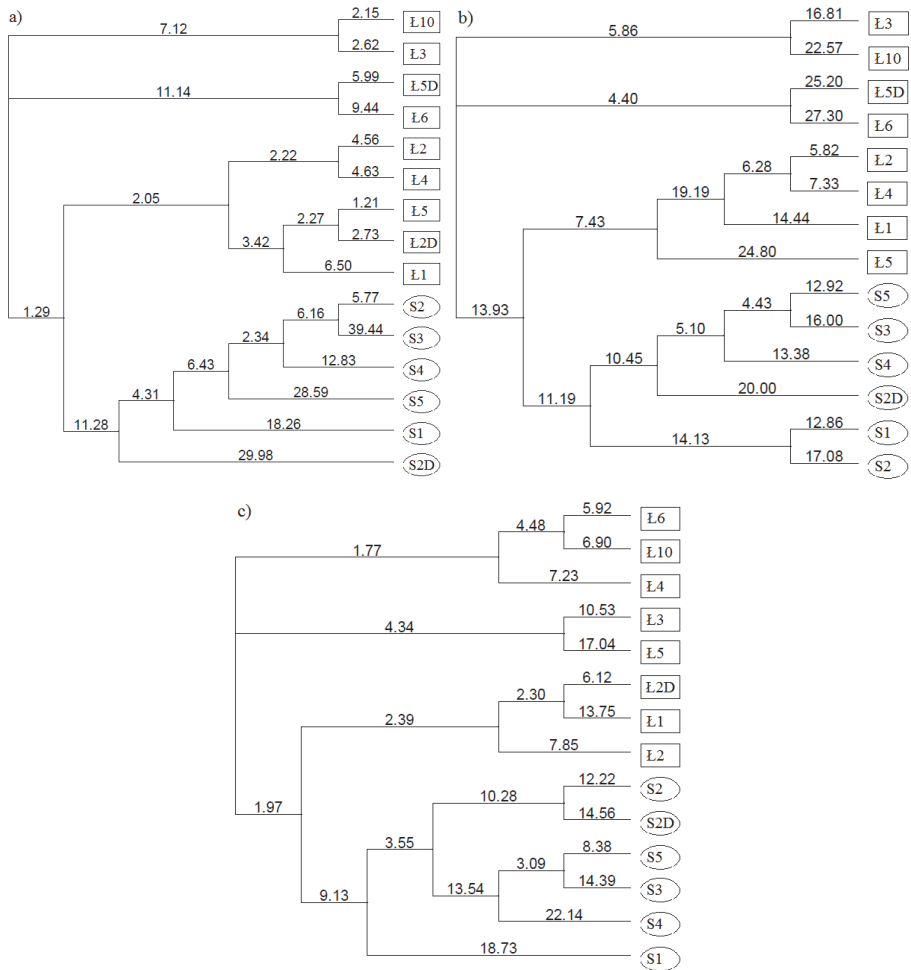
3.1. Wpływ zasolenia na zbiorowiska bakteryjne w estuariach

Jednym z najważniejszych parametrów wpływających na życie w estuariach, w tym na społeczność bakteryjną, jest stopień zasolenia i jego acykliczne zmiany (Beck i in. 2013, Jonassen 2013, Ling i in. 2011, Mudryk 1994). Zawartość soli w wodzie jest jednym z głównych czynników przyczyniających się do zmian w strukturze zbiorowiska i funkcjach życiowych mikroorganizmów (Campbell i Kirchman 2013). Strukturę genotypową badanych zbiorowisk bakteryjnych przedstawiono na zdjęciach, wykonanych w świetle UV po procedurze PCR-DGGE (rys. 3). Ich analizę statystyczną przedstawiono w postaci dendrogramów, utworzonych na podstawie algorytmu najbliższego sąsiada (rys. 4).



Rys. 3. Obraz w świetle UV próbek po PCR-DGGE fragmentów genu kodującego 16S rRNA bakterii pochodzących z jezior Łebsko (Ł) i Sarbsko (S) z powierzchni i dna (D) a) wiosną b) latem c) jesienią; czerwona ramka – intensywnie świecące prążki; zielona – przykład prążków znajdujących się na tej samej wysokości

Fig. 3. Image in UV light of samples after PCR-DGGE of 16S rRNA gene fragments of bacteria from Łebsko (Ł) and Sarbsko (S) lakes from the surface and bottom (D) a) in spring b) in summer c) in autumn; red frame – intensely glowing stripes; green – an example of stripes on the same height

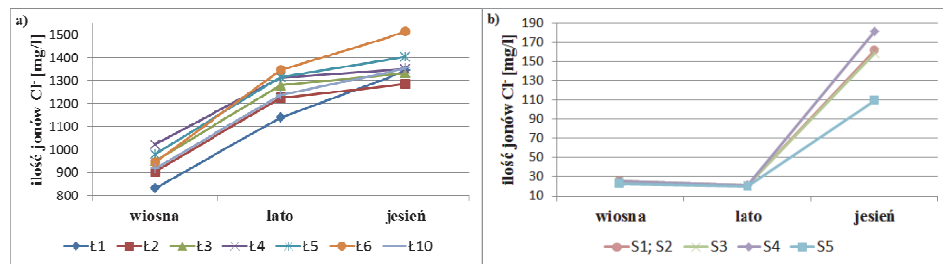


Rys. 4. Dendrogram utworzony na podstawie algorytmu najbliższego sąsiada, obrazujący podobieństwo bakterii z próbek wody jezior Łebsko (Ł) i Sarbsko (S) z powierzchni i dna (D) a) wiosną b) latem c) jesienią

Fig. 4. Dendrogram created on the basis of the nearest neighbor's algorithm, showing the similarity of bacteria from samples of Łebsko (Ł) and Sarbsko (S) lakes from the surface and bottom (D) a) in spring b) in summer c) in autumn

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można zauważyć, że zasolenie modeluje strukturę genotypową zbiorowisk bakteryjnych. Odzwierciedlają to dendrogramy utworzone na podstawie algorytmu najbliższego sąsiada w oparciu o analizę densytometryczną wzorów

prążkowych DGGE (rys. 3 a, b, c), które obrazują wzajemne podobieństwo pomiędzy próbkami. Zaobserwowano zmianę struktury genotypowej w cyklu sezonowym w jeziorze Sarbsko. Wiosną i latem widać sposób różnicowania się zbiorowiska bakterii, w którym próbki dla tego jeziora tworzą jeden klastrowy, grupę w której każda kolejna próbka jest coraz bardziej odległa od pozostałych. Wskazuje to na stopniowe różnicowanie się zbiorowiska bakterii (rys. 4a i 4b). Natomiast jesienią, kiedy gwałtownie wzrasta zasolenie tego jeziora, struktura genotypowa Sarbska zaczyna bardziej przypominać tę występującą w jeziorze Łebsko, którego zasolenie zawsze jest wysokie – jest podzielona na kilka nie związanych ze sobą klastrowych (rys. 4c). Istnieją dwie możliwe drogi reakcji zbiorowiska bakteriologicznego na zmiany zasolenia: aklimatyzacja istniejącej biocenozy - poprzez adaptację fizjologiczną lub genetyczną lub przesunięcie poszczególnych populacji w biocenozie (ang. population shift) – mikroby o niskiej liczebności początkowej stopniowo zaczynają dominować ze względu na konkurencyjną przewagę tolerancji wobec zmian zasolenia (Jonassen 2013). Zmiany zasolenia, wyrażone poprzez ilość jonów chlorkowych przedstawiono na rysunku 5.



Rys. 5. Zmiany ilości jonów chlorkowych w poszczególnych miejscach jeziora a) Łebsko i b) Sarbsko, w zależności od pory roku

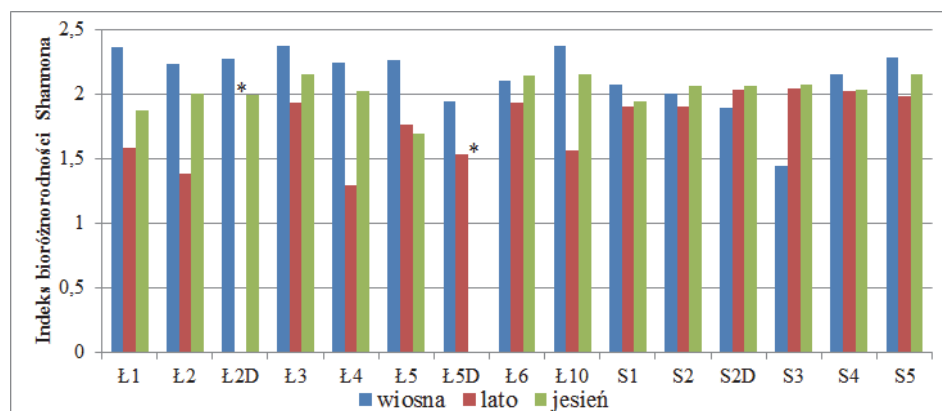
Fig. 5. Changes in the amount of chloride ions in individual parts of the lake a) Łebsko and b) Sarbsko, depending on the season of the year

Z jednej strony można zauważyć sezonowość zmian stężenia jonów chlorkowych. Dla obu jezior ich najwyższe stężenie występuje jesienią. Z drugiej strony należy pamiętać, że każdy z obiektów posiada inną zlewnię i morfometrię, oraz odmienne możliwości oddziaływania wód morskich, dlatego też każdy z nich powinien być rozpatrywany w sposób indywidualny (Cieśliński 2011a). To tłumaczy spadek stężenia

jonów latem względem wiosny w jeziorze Sarbsko oraz ich wzrost w jeziorze Łebsko. W jeziorze Łebsko obserwuje się stałe, słabe, bądź średnie, oddziaływanie morza (Cieśliński 2011a). Ponadto z przeprowadzonych badań wynika, że wody morskie wywierają większy i statystycznie istotny wpływ na jezioro Łebsko, niż Sarbsko. Jest to logiczne, ponieważ Łebsko należy do jezior, które mają bezpośrednie powierzchniowe połączenie z Morzem Bałtyckim za pomocą krótkiego odcinka ujściowego rzeki Łeby (Cieśliński 2011a, Cieśliński 2011b, Paturej 2005). W kanale Łeby możliwy jest dwukierunkowy przepływ, tzn. właściwy – od jeziora do morza, lub odwrotnie – od morza do jeziora, wywołując okresowe zjawisko intruzji wód słonawych. Wody morskie zasilają jezioro Łebsko przy sprzyjających warunkach hydrometeorologicznych, takich jak odpowiedni kierunek i prędkość wiatru, lub gdy poziom wody w Bałtyku jest wyższy niż w jeziorze (Cieśliński 2011a, Cieśliński 2011b, Paturej 2005). Z kolei jezioro Sarbsko nie posiada bezpośredniego połączenia z morzem. Łączy się jednak za pośrednictwem rzeki Chełst, która łączy się z kanałem Łeby (Cieśliński 2011a).

Różnica w zasoleniu między jesienią, a wiosną jest skutkiem zimowych zlodowaceń jezior, co spowodowało bardzo duży spadek ilości jonów chlorkowych. Według literatury zależność ta jest wprost proporcjonalna do długości występowania pokrywy lodowej. Z kolei w październiku dochodzi do najsilniejszego wpływu wód morskich, co tłumaczy wysokie stężenia jonów chlorkowych jesienią w obu jeziorach (Cieśliński 2011b). Zdaniem Cieślińskiego (2011a) w jeziorze Łebsko oprócz października i listopada, miesiącami z największą łączną liczbą dni z intruzjami wód morskich były czerwiec i lipiec, co jest wytłumaczeniem wzrostu ilości anionów chlorkowych w tym jeziorze latem. Ponadto napływy wód morskich mają inny charakter w tych dwóch porach roku. Jesienią wlewy wody morskiej są silniejsze, gwałtowniejsze i są głównie wynikiem sztormów, ale występują rzadziej, z kolei wiosną i latem są łagodniejsze, ale notuje się je częściej (Cieśliński 2011a, Paturej 2005). To przekłada się na mikroflorę bytującą w jeziorze. W jeziorze Łebsko 70-80% ogółu stanowią bakterie typu śródlądowego, a tylko 8-13% jest bakterii morskich. Wynika to z faktu, że w ogólnym bilansie wodnym jeziora Łebsko zdecydowaną przewagę mają dopływy wód rzecznych, będące głównym źródłem bakterii śródlądowych, nad wlewami wód morskich, które są nośnikiem bakterii morskich. Jednak stwierdzono se-

zonowość występowania bakterii typu śródlądowego i morskiego. Bakterie śródlądowe stanowią 90% ogółu mikroflory jeziora Łebsko wiosną. Z kolei bakterie morskie stanowią najliczniejszą grupę jesienią (Mudryk 1994). Wzrost zasolenia zmusza więc biocenozę do przesunięcia równowagi w kierunku mikroflory halotolerancyjnej (wykazującej wzrost w bardzo szerokim zakresie zasolenia) (Beck i in. 2013, Jonassen 2013). Można zauważyć związek z sezonowością napływu wód morskich. Latem jest też najniższy dopływ wód ze zlewni lądowych, połączenie tych czynników mogło rzutować na zmniejszenie bioróżnorodności przedstawionej w postaci indeksu Shannona (rys. 6).



Rys. 6. Zmiany wartości indeksu bioróżnorodności Shannona bakterii w zależności od pory roku i miejsca poboru próbek z wód jezior Łebsko (Ł) i Sarbsko (S); * brak próbki

Fig. 6. Changes in the biodiversity index Shannon of bacteria depending on the season and place of sampling from the lakes Łebsko (Ł) and Sarbsko (S); * no sample

Stężenie chlorków odzwierciedla oddziaływanie na zalew zarówno wód rzecznych, jak i morskich. Nie bez znaczenia jest też pora roku, a co za tym idzie, zmieniające się warunki klimatyczne, jak np. obfitość opadów czy zmiany temperatury, które razem mogą doprowadzić do wezbrania wód rzecznych i przyboru wód powodziowych (Cieśliński 2011a). Najmniejsze stężenie chlorków wiosną pokrywa się ze wzmożonym dopływem wód powierzchniowych ze zlewni lądowej, o tej porze roku, co również tłumaczy najniższe zasolenie jeziora Łebsko wiosną (Cieśliński 2011a).

Żyjące w estuariach mikroorganizmy muszą być odporne na nieustanne zmiany stężenia soli, które to wywiera określone ciśnienie osmotyczne na komórki znajdujące się w środowisku. Gatunki *stricte* słodkowodne lub typowo morskie mają problem ze znoszeniem większych wahań ciśnienia osmotycznego (Starmach i in. 1976). Cechą charakterystyczną estuariów jest wyraźna eliminacja bakterii śródlądowych i morskich w rejonach granicznych, w których zachodzi mieszanie się wody słodkiej i słonej, co powoduje, że żyjące w tych zbiornikach bakterie poddawane są ciągle stresowi związanemu z modyfikacją warunków życia. Zmiany ciśnienia osmotycznego, do którego bakterie muszą się szybko (często szybciej niż wynosi ich czas generacji) przystosować, powodują, że przy braku adaptacji giną (Mudryk 1994). Natomiast gatunki wód słonawych, ze względu na fakt, że żyją w ciągle wahających się stanach zasolenia są w dużym stopniu niewrażliwe i przystosowane do zmian koncentracji soli, które przenoszą się na zmiany ciśnienia osmotycznego (Starmach i in. 1976). Szczególną tolerancję przejawiają bakterie żyjące w warunkach optymalnego składu jakościowego i ilościowego substancji pokarmowych. Zasolenie w obrębie jednego zbiornika jest bardzo ważnym czynnikiem, wpływającym na dystrybucję gatunków bakteryjnych (Ling i in. 2011) i odgrywa ważną rolę w różnorodności mikrobiologicznej (Beck i in. 2013). W badaniach przeprowadzonych przez Campbell i Kirchman (2013), na wodach Zatoki Delaware, która jest zatoką Oceanu Atlantyckiego i stanowi estuarium rzeki Delaware, wykazano, że różnorodność bakteryjna w zbiorniku tym spadała w stosunku do bioróżnorodności wyznaczonej w oceanie i rzece.

Największe fluktuacje zasolenia występują w lecie, gdzie na zmianę występują obfite deszcze i wzmożone parowanie. Skutkuje to opanowaniem środowiska estuariowego przez gatunki bakterii przystosowanych do zmian ciśnienia osmotycznego (Starmach i in. 1976). Być może jest to odpowiedź na spadek bioróżnorodności w lecie w jeziorze Łebsko. Jednak spadek różnorodności biologicznej nie musi być tożsamy z mniejszą biomasą bakterii. W badaniach nad liczebnością bakterii w poszczególnych porach roku w jeziorze Sarbsko zaobserwowano ich największą liczbę wiosną, a najmniejszą latem (Obolewski i in. 2017), podczas gdy w przedstawionych badaniach uśredniony indeks Shannona dla tego jeziora jest niemal identyczny dla obu pór roku i wiosną wynosi 1,97, a latem 1,98. W badaniach przeprowadzonych przez Crump i in. (2004) udowod-

niono, że biomasa bakteryjna jest większa w etuariach w porównaniu z oceanem i rzeką, w wyniku mieszania wód, z których to estuarium powstało. Również Mudryk (1994) twierdzi, że estuaria charakteryzują się znacznie większą liczebnością bakterii niż morza i oceany, czy wody śródlądowe. Ponadto z jednej strony dane literaturowe podają, że liczebność bakterii w zbiornikach maleje wraz ze wzrostem zasolenia, zwłaszcza gdy jego zmiany są gwałtowne, z drugiej sugerują, że mikroorganizmy wcale nie giną, lecz wykazują okresowy brak aktywności metabolicznej lub przemieszczają się do osadów dennych (Mudryk 1994).

Warto też zwrócić uwagę, że w każdym żelu obrazującym fingerprinty DGGE znajdują się prążki DNA, które są na takiej samej wysokości zarówno w jeziorze Łebsko i Sarbsko, czyli zbiornikach o odmiennym zasoleniu (zaznaczone zieloną ramką na rysunkach 3a, 3b, 3c). Z jednej strony może to oznaczać, że pewne genotypy są obecne w jeziorach przybrzeżnych, niezależnie od zawartości w nich jonów chlorkowych. Sugeruje to, że są bakterie, na których obecność nie mają znaczącego wpływu zmiany parametrów fizykochemicznych w badanych zakresach. Z drugiej strony lokalizacja jakiegoś prążka na tej samej wysokości w żelu DGGE nie oznacza, że musi on zostać zidentyfikowany jako ten sam genotyp. Słabą stroną metody DGGE jest fakt, że niektóre fragmenty DNA, pomimo tego, że różnią się sekwencją nukleotydów, nie zostają rozdzielone podczas elektroforezy, gdyż mają jednakową temperaturę topnienia wynikającą z liczby wiązań wodorowych, a co za tym idzie, mobilność w żelu poliakryloamidowym (Brzeszcz i in. 2013, Frąć i Jezierska-Tys 2010). Co więcej, zdarza się, że jeden gatunek bakterii może wizualizować się w postaci kilku prążków z powodu kilku kopii genu kodującego 16S rRNA o niewiele różniącej się sekwencji (Frąć i Jezierska-Tys 2010). Podwójne prążki DNA w żelu mogą być także wynikiem degeneracji starterów lub powstania heterodupleksów DNA. Zaburza to wiarygodność informacji o różnorodności zespołu mikroorganizmów (Brzeszcz i in. 2013). W celu rozwiania wątpliwości konieczne byłoby przeprowadzenie niezależnego ich sekwencjonowania. W przedstawionej pracy nie zastosowano tej techniki, gdyż celem badań był monitoring zmian w strukturze genotypowej biocenozy bakteryjnej w zależności od zmian parametrów fizyko-chemicznych. Takie badania prowadzi się na stosunkowo krótkich amplikonach PCR (180 pz), które nie dają jednoznacznej odpowiedzi identyfikacyjnej, a co za tym idzie,

nie pozwalają zdefiniować składu genotypowego zbiorowiska. Ponadto, DGGE jako metoda bardzo czuła pozwala monitorować zbiorowisko na poziomie genotypowym, a nie gatunkowych (elektroforeza ta rozdziela fragmenty różniące się nawet pojedynczym podstawieniem nukleotydo-
wym), co dodatkowo utrudnia możliwość identyfikacji bakterii w zbiorowisku. W badaniach skupiono się więc na analizie wzorów prążkowych, ich podobieństwach i różnicach.

Analizując zdjęcia żeli, zwłaszcza te prezentujące próbki zebrane wiosną i jesienią w jeziorze Łebsko, można zauważyć bardzo intensywnie świecące prążki (zaznaczone czerwoną ramką na rysunkach 3a, 3c). Jeżeli na danym poziomie żelu we wszystkich próbkach występują wyraźne prążki, wskazują one na genotyp dominujący w badanej bioceno-
zie. Z jednej strony może to oznaczać, że w obu jeziorach, o każdej porze roku występuje wiele różnych genotypów bakterii, z drugiej strony można dojść do wniosku, że wyższe zasolenie promuje rozwój poszczególnych gatunków, które zaczynają dominować w tym środowisku. Natomiast większa liczba mniej wyraźnych, rozmazanych prążków, które można zaobserwować na wszystkich żelach i obu jeziorach, może świadczyć o występowaniu bardzo dużej liczby genotypów w próbce (Ziemińska-Buczyńska 2015). Należy jednak zwrócić uwagę, że DGGE to metoda jakościowa i zazwyczaj intensywność świecenia prążka nie jest proporcjonalna do liczebności mikroorganizmów. Można jedynie opierać się na założeniu, iż w większości przypadków bardziej intensywny prążek oznacza więcej kopii danego genu w obrębie analizowanego organizmu (Brzeszcz i in. 2013).

Chlorek sodu i jego poziom wpływa na żyjące w estuariach organizmy. Jak podaje Mudryk (1994) fluktuacje tego parametru mogą wpływać na aktywność fizjologiczno-metaboliczną bakterii morskich. Wpływa on np. na pobieranie aminokwasów, które zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia chlorku sodu, oraz syntezę glutaminy i proliny, której poziom rośnie także ze wzrostem zasolenia. W zależności od stopnia zasolenia obserwuje się również wyraźne zmiany w przyswajaniu i respiracji heksoz. Chlorek sodu stymuluje także aktywność enzymów, w szczególności lipaz i amylaz. Ponadto chlorek sodu, mogąc aktywnie migrować do i z wnętrza komórek chroni bakterię przed zmianami ciśnienia osmotycznego, a co za tym idzie przed pęcznieniem, deformacją, a następnie pękaniem i lizą pod wpływem szoku osmotycznego. Należy

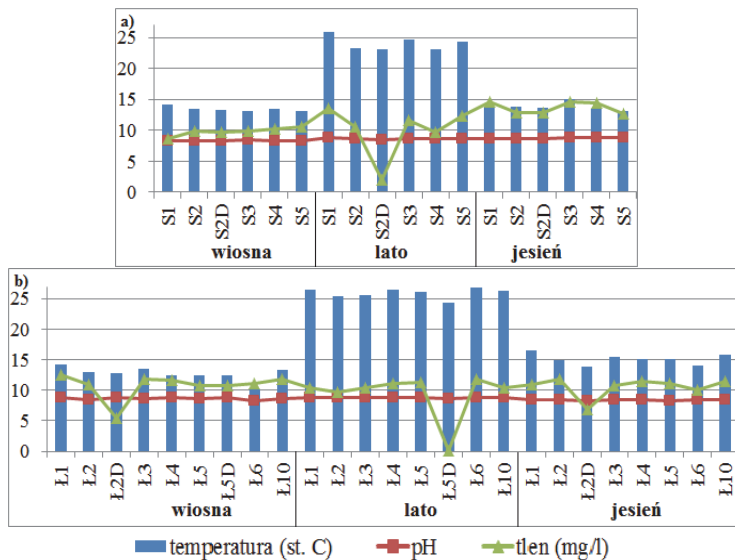
jednak pamiętać, że zasolenie inaczej wpływa na poszczególne bakterie w zależności od gatunku, a nawet szczepu (Mudryk 1994). Dane literaturowe donoszą, iż w ujęciu ilościowym nie obserwuje się korelacji między zasoleniem, a zmianami w zbiorowiskach bakterii Gram-ujemnych (Beck i in. 2013). Jednak generalnie bakterie Gram-dodatnie uznaje się za bardziej odporne na wyższe wartości zasolenia niż bakterie Gram-ujemne (Mudryk 1994). Wielu badaczy zwraca uwagę na ujemną zależność między zawartością NaCl w wodzie, a liczbą bakterii w estuariach. Z jednej strony małe ilości soli mogą korzystnie wpływać na przemiany kataboliczne, natomiast z drugiej strony większe dezorganizują proces rozmnażania przez hamowanie podziałów komórkowych. Koncentracja soli na poziomie 6-10% hamuje także wzrost większości bakterii typu śródlądowego, gdyż w tych stężeniach jest inhibitorem aktywności enzymów. Ponadto u bakterii halofobowych zmniejsza pobierania glukozy, które przy stężeniu NaCl równym 3 ‰ spada do zera. Takie mikroorganizmy jednak nie giną, lecz wykazują okresową inaktywację i przy ponownym wysłodzeniu natychmiast wznawiają wszelkie procesy życiowe. Aczkolwiek powyżej pewnej wartości zasolenia obserwuje się zmniejszanie liczby bakterii halofobowych, co jest wynikiem zaburzeń aktywności metabolicznej lub szoku osmotycznego. Warto nadmienić, że u bakterii morskich NaCl może być zastąpiony przez inne sole, jak np.: Na_2SO_4 , NaBr, KCl, czy MgSO_4 (Mudryk 1994).

3.2. Wpływ temperatury na bioróżnorodność bakterii

W badaniach przeanalizowano zmiany parametrów fizykochemicznych próbek wody, które przedstawiono na rysunku 7. Istotność zależności bioróżnorodności przedstawionej w postaci indeksu Shannona od wybranych parametrów zestawiono w tabeli 1.

Nie zauważono znacznych wahań temperatury w obrębie poszczególnych jezior w danej porze roku. Może mieć to związek z ich cechami. Łebsko, zajmujące powierzchnię równą $74,4 \text{ km}^2$ (Mudryk 1994, Paturej 2005, Starmach i in. 1976), a jego średnia głębokość wynosi 1,6 m (Cieśliński 2011b). Z kolei jezioro Sarbsko ma powierzchnię liczącą $6,517 \text{ km}^2$ oraz średnią głębokość wynoszącą 1,5 m (Bechtel i Woszczyk, 2008). Mała głębokość i brak osłony przed wiatrem w jeziorach Łebsko i Sarbsko oraz znaczna rozległość lustra wody w przypadku tego pierwszego, sprzyjają pełnemu mieszanemu się wód, co skutkuje bra-

kiem stratyfikacji termiczno-tlenowej (Mudryk 1994). Można natomiast zaobserwować wahania temperatury w cyklu sezonowym. Na podstawie przeprowadzanych badań można wywnioskować, że bioróżnorodność zbiorowiska w trakcie trwania eksperymentu nie była stała. Wartość indeksu Shannona oscylowała między wartościami od 1,38, do 2,37, co oznacza biocenozę wahającą się od stosunkowo ubogiej do przeciętnie bogatej genotypowo (Ziemińska-Buczyńska i in. 2014, Ziemińska-Buczyńska 2015), jednak jego najniższe wartości obserwowano latem, a najwyższe wiosną. Co ciekawe można zauważyć korelację pomiędzy dużym wzrostem temperatury latem, a spadkiem o tej porze roku wartości indeksu bioróżnorodności Shannona, który wystąpił w obu jeziorach. Jego fluktuacje jednak były znacznie mniejsze dla jeziora Sarbsko niż Łebsko i tylko dla tego drugiego zbiornika zależność ta jest statystycznie istotna (tab. 1). Oznacza to, że Sarbsko charakteryzują mniejsze sezonowe zmiany bioróżnorodności.



Rys. 7. Zmienność temperatury, pH i zawartości tlenu w jeziorze a) Łebsko b) Sarbsko w zależności od miejsca poboru próbek

Fig. 7. Variability of temperature, pH and oxygen content in the a) Łebsko b) Sarbsko lake depending on the place of sampling

Tabela 1. Statystyczna istotność korelacji indeksu bioróżnorodności Shannona oraz wybranych parametrów; oznaczone współczynniki korelacji są istotne z $p < 0,05$ i zostały zaznaczone kolorem czerwonym

Table 1. Statistical significance of the correlation of the Shannon biodiversity index and selected parameters; the correlation coefficients are significant with $p < 0.05$ and are marked in red

Para zmiennych	Korelacja porządku rang Spearmana							
	Łebsko				Sarbsko			
	N	R	t(N-2)	p	N	R	t(N-2)	p
wartości indeksu Shannona i temperatura [°C]	25	-0,71926	-4,96511	0,00005	18	-0,22763	-0,93505	0,36366
wartości indeksu Shannona i tlen [mg/L]	25	0,40177	2,10411	0,04650	18	0,09312	0,37410	0,71324
wartości indeksu Shannona i ilość jonów Cl [mg/L]	21	-0,44199	-2,14776	0,04484	15	0,27395	1,02703	0,32314

Analizę statystyczną zdjęć obrazujących strukturę genotypową zbiorowisk bakteryjnych przedstawiono także w postaci współczynników podobieństwa Dice'a (tab. 2).

Oprócz znacznie gwałtowniejszego spadku wartości indeksu Shannona w jeziorze Łebsko, zaobserwowano również dla tego jeziora i próbek pobranych w lipcu spadek współczynnika podobieństwa Dice'a. Oznacza to, że biocenoza w jeziorze Łebsko latem charakteryzuje się niższą różnorodnością. Spadek bioróżnorodności i podobieństwa nie musi mieć jednak związku z liczebnością bakterii w zbiornikach wodnych. Zgodnie z informacjami znalezionymi w literaturze stosunkowo wysoka o tej porze roku temperatura skutkuje letnimi maksymalnymi wartościami liczebności bakterii (Mudryk 1994). Temperatura oddziałuje na mikroorganizmy bezpośrednio – wpływając na tempo przemian metabolicznych lub pośrednio – poprzez zmiany fizykochemiczne parametrów wody jak pH, lepkość, zawartość tlenu, stężenie soli mineralnych oraz potencjał redoks. Spadek bioróżnorodności mógł więc wynikać z braku zdolności adaptacyjnych części bakterii na zmieniające się parametry fizykochemiczne, a ponowny wzrost jesienią prawdopodobnie wynikał z intruzji wód morskich, a co za tym idzie z napływem nowych gatunków bakterii morskich (Cieśliński 2011b). Sezonowe zmiany nasilenia czynników środowiskowych powinny znaleźć odzwierciedlenie w różnorodności, ilości, oraz aktywności bakterii. Ma to potwierdzenie w przeprowadzonych badaniach. Zmiany struktury w fingerprintach, pomiędzy różnymi porami roku (rys. 3a, 3b, 3c), jak np. różne liczby prążków, czy ich intensywności świecenia, dowodzą o zmianach w bioróżnorodności.

Tabela 2. Współczynnik podobieństwa Dice'a bakterii pochodzących z jezior Łebsko (Ł) i Sarbsko (S) z powierzchni i dna (D) a) wiosną b) latem c) jesienią; na szaro zaznaczono wartości > 60%

Table 2. Dice similarity coefficient of bacteria originating from Łebsko (Ł) and Sarbsko (S) lakes from the surface and bottom (D) a) in spring b) in summer c) in autumn; on gray values > 60%

a)	Ł1	Ł4	Ł2	Ł5	Ł2D	Ł5D	Ł6	Ł3	Ł10	S1	S2	S2D	S4	S5	S3
Ł1	100	86,1	79,8	88,9	89,6	67,4	64,8	79,5	79,9	51,7	50,2	47,4	49,5	41,3	13,3
Ł4	86,1	100	90,8	88,5	88,1	77,3	66,5	77,7	76,1	57,7	51,6	49,6	50,1	41,8	12,8
Ł2	79,8	90,8	100	84,8	81,8	84,7	71,2	77,5	74,7	56,5	53,2	51,8	51,6	40	11,7
Ł5	88,9	88,5	84,8	100	96,1	74,7	64,7	79,2	83,8	56,7	54,4	50,3	53	43,7	18
Ł2D	89,6	88,1	81,8	96,1	100	71,7	62,1	76,7	82,1	56,3	53,5	47,8	51,6	42,7	17,6
Ł5D	67,4	77,3	84,7	74,7	71,7	100	84,6	67,6	65,3	49	44,5	37,7	42,8	31,2	0
Ł6	64,8	66,5	71,2	64,7	62,1	84,6	100	78,6	75	46,8	42,6	34,8	40,6	27,2	0
Ł3	79,5	77,7	77,5	79,2	76,7	67,6	78,6	100	95,2	58,3	52	49	50,6	37,9	13,9
Ł10	79,9	76,1	74,7	83,8	82,1	65,3	75	95,2	100	59,8	53,7	48,2	51,7	38,6	17,8
S1	51,7	57,7	56,5	56,7	56,3	49	46,8	58,3	59,8	100	73,3	40,5	59,4	39,7	44,9
S2	50,2	51,6	53,2	54,4	53,5	44,5	42,6	52	53,7	73,3	100	55,7	75,5	42,4	54,8
S2D	47,4	49,6	51,8	50,3	47,8	37,7	34,8	49	48,2	40,5	55,7	100	59,4	28,3	34,9
S4	49,5	50,1	51,6	53	51,6	42,8	40,6	50,6	51,7	59,4	75,5	59,4	100	56,2	41,4
S5	41,3	41,8	40	43,7	42,7	31,2	27,2	37,9	38,6	39,7	42,4	28,3	56,2	100	38,4
S3	13,3	12,8	11,7	18	17,6	0	0	13,9	17,8	44,9	54,8	34,9	41,4	38,4	100

b)	Ł1	Ł4	Ł2	Ł5	Ł5D	Ł6	Ł3	Ł10	S1	S2	S2D	S4	S5	S3
Ł1	100	77,2	68,2	36,2	0	17,4	19,9	12	16,8	22,2	25,9	23,6	24,1	23,5
Ł4	77,2	100	86,9	51	11	12,9	30,6	23,7	15,6	21,4	17,4	15,8	12,7	13,6
Ł2	68,2	86,9	100	46,2	15,4	16,8	37,3	29,3	19,8	25,4	21,2	15,5	12,4	13,3
Ł5	36,2	51	46,2	100	35,4	17,3	29,8	22,4	23,8	9,5	25,5	40,7	33,3	43,1
Ł5D	0	11	15,4	35,4	100	47,5	51	40	13,4	7,3	15,5	16,3	14,1	18
Ł6	17,4	12,9	16,8	17,3	47,5	100	45,4	38,8	14,5	23,9	16	8,5	9,9	8,8
Ł3	19,9	30,6	37,3	29,8	51	45,4	100	60,6	19,8	19,2	6	14,3	10,5	18,9
Ł10	12	23,7	29,3	22,4	40	38,8	60,6	100	31,9	32,1	13,6	16,7	15,8	8,9
S1	16,8	15,6	19,8	23,8	13,4	14,5	19,8	31,9	100	70,1	52,5	41,8	29	25
S2	22,2	21,4	25,4	9,5	7,3	23,9	19,2	32,1	70,1	100	49,2	30,1	19,8	12,8
S2D	25,9	17,4	21,2	25,5	15,5	16	6	13,6	52,5	49,2	100	70,2	57,6	37
S4	23,6	15,8	15,5	40,7	16,3	8,5	14,3	16,7	41,8	30,1	70,2	100	75,6	59,8
S5	24,1	12,7	12,4	33,3	14,1	9,9	10,5	15,8	29	19,8	57,6	75,6	100	71,1
S3	23,5	13,6	13,3	43,1	18	8,8	18,9	8,9	25	12,8	37	59,8	71,1	100

c)	Ł1	Ł4	Ł2	Ł2D	Ł5	Ł6	Ł3	Ł10	S1	S2	S2D	S4	S5	S3
Ł1	100	66,5	73,5	80,1	58,5	77	58,3	70,7	53	56,5	53,2	34,8	47,2	43,6
Ł4	66,5	100	81,1	77	71,7	80,1	75,1	83,7	60,7	49,6	45,9	45	51,7	46,7
Ł2	73,5	81,1	100	86,3	70	76,7	66,5	72,9	60,8	57,7	52	39,4	51,2	44,3
Ł2D	80,1	77	86,3	100	61,5	81,6	67,8	76,9	60,8	51,8	53,8	34,5	48,7	39,4
Ł5	58,5	71,7	70	61,5	100	62,4	72,4	59,2	46,8	44	34,1	43,3	46,9	46,2
Ł6	77	80,1	76,7	81,6	62,4	100	74,2	87,2	54,4	47,1	45,6	30,2	40,1	34
Ł3	58,3	75,1	66,5	67,8	72,4	74,2	100	79	61,4	43,3	44,7	38,5	46,4	46
Ł10	70,7	83,7	72,9	76,9	59,2	87,2	79	100	60,8	48	48	34,8	43,2	37,3
S1	53	60,7	60,8	60,8	46,8	54,4	61,4	60,8	100	58,2	56	35,1	51,4	49,6
S2	56,5	49,6	57,7	51,8	44	47,1	43,3	48	58,2	100	73,2	42,1	51,4	43,3
S2D	53,2	45,9	52	53,8	34,1	45,6	44,7	48	56	73,2	100	40,4	53	43,1
S4	34,8	45	39,4	34,5	43,3	30,2	38,5	34,8	35,1	42,1	40,4	100	70,5	56,3
S5	47,2	51,7	51,2	48,7	46,9	40,1	46,4	43,2	51,4	51,4	53	70,5	100	77,2
S3	43,6	46,7	44,3	39,4	46,2	34	46	37,3	49,6	43,3	43,1	56,3	77,2	100

Latem, kiedy była najwyższa temperatura, prązków było najmniej i były one najslabsze w porównaniu ze zdjęciami żeli próbek pobranych wiosną i jesienią. Zmiany zaobserwowane na poziomie kwasów nukleinowych świadczą o zmianach w zespołach mikroorganizmów (Brzeszcz i in. 2013). Wpływ czynników środowiskowych może być bezpośredni - poprzez zmianę struktury białek czy aktywności enzymów, lub pośredni - poprzez skompilowaną sieć zależności ekologicznych np. w ramach pętli mikrobiologicznej (mikrobiologicznego obiegu materii) (Walczak 2009). W okresach, w których obumiera plankton roślinny wzrasta ilość bakterioplanktonu, co zabezpiecza zooplankton przed brakiem pokarmu (Mudryk 1994, Starmach i in. 1976). Organizmy bakteriożerne, takie jak wiciowce, orzęski, wrotki i widłonogi oraz fauna bentosowa kontrolują więc rozwój i liczebność bakterii (Mudryk 1994). Nie bez znaczenia na relacje bakterii i planktonu jest wpływ temperatury: w okresie wiosennym niska temperatura limituje przyswajanie przez mikroflorę wydzielin fitoplanktonu, a jednocześnie właśnie w tym okresie duża liczba bakterii jest wyjadana przez planktonowe organizmy bakteriożerne (Mudryk 1994). Fitoplankton ma więc o tej porze roku silny wpływ na bakterioplankton (Sapp i in. 2007). Ponadto bakterie żyjące w estuariach biorą udział w obiegu podstawowych pierwiastków w przyrodzie: węgla, fosforu i azotu, które są niezbędne m. in. dla wzrostu fitoplanktonu, jak i innych roślin wodnych (Brzeszcz i in. 2013, Starmach i in. 1976).

Warto nadmienić, że w badaniach przeprowadzanych przez Ling'a i in. (2011), wykazano, że temperatura jest drugim, zaraz po zasoleniu, czynnikiem fizykochemicznym, wpływającym na społeczność bakteryjną. Do podobnych wniosków doszli Sapp i in. (2007), którzy w wyniku swoich badań uznali temperaturę za najważniejszy czynnik wpływający na strukturę genotypową zbiorowiska wiosną, jesienią i zimą, a latem według nich strukturę tę modeluje pokarm. Z kolei w przedłożonej pracy, temperatura wydaje się głównym czynnikiem wpływającym na mikroorganizmy właśnie latem. Gwałtowniejszy w jeziorze Łebsko spadek indeksu bioróżnorodności Shannona i współczynnika podobieństwa Dice'a, jest zaskakującym zjawiskiem w kontekście badań przeprowadzonych przez Stanleya i Moritab (1968), którzy udowodnili, że im wyższe zasolenie tym większa tolerancja części bakterii pochodzenia morskiego na wzrost temperatury. Latem w jeziorze Łebsko stężenie jonów chlorkowych, które świadczą o zasoleniu, jest ponad 50-krotnie

wyższe niż w Sarbsku. Wytłumaczeniem może być fakt, że badania Stanleya i Moritab prowadzono na próbkach o zasoleniu 7-35%, podczas gdy stężenie soli w obu jeziorach jest na poziomie kilku promili.

3.3. Wpływ stężenia tlenu na zbiorowisko bakteryjne w estuariach

Nie zaobserwowano znacznych wahań stężenia tlenu w obu jeziorach w poszczególnych porach roku w zależności od miejsca poboru próbki (przy powierzchni). Jednak ze względu na porę roku można zaobserwować wahania tego parametru. Literatura podaje, że w miesiącach letnich, lepsze natlenienie jest związane z silnym rozwojem biomasy i wzrostem intensywności procesu fotosyntezy (Cieśliński 2011b), co tłumaczy i odpowiada wzrostowi tego parametru latem względem wiosny w jeziorze Sarbsko. Z drugiej strony miesiące letnie charakteryzują się również podwyższoną temperaturą, co zmniejsza rozpuszczalność tlenu w wodzie. Prawdopodobnie jest to odpowiedź na pytanie, dlaczego wzrost ten w jeziorze Sarbsko jest tak nieznaczny, oraz z jakiego powodu doszło do spadku zawartości tlenu latem w jeziorze Łebsko. Natomiast wzrost natlenienia w miesiącach jesiennych, jest spowodowany intruzją wód morskich oraz intensywnym falowaniem, występującymi o tej porze roku (Cieśliński 2011b). Ma to potwierdzenie na wykresach przedstawiających stężenia jonów chlorkowych (rys. 5a, 5b), które również sugerują wzrost wpływu morza jesienią. Dane literaturowe podają, że na społeczność bakteryjną ma wpływ stężenie rozpuszczonego tlenu (Ling i in. 2011). Również w tym eksperymencie zaobserwowano dodatnią korelację bioróżnorodności z tym parametrem, jednak tylko dla jeziora Łebsko jest ona statystycznie istotna.

3.4. Wpływ pH na strukturę genotypową zbiorowiska bakterii

Odczyn pH nie zmieniał się, ani w cyklu rocznym, ani w zależności od miejsca pobrania próbki. Mimo, iż dane literaturowe podają, iż w okresie fotycznym (w czasie nasłonecznienia) gwałtownie zwiększa się zużycie dwutlenku węgla rozpuszczonego w wodzie oraz tego występującego w formie kwasu węglowego, co skutkuje wzrostem odczynu pH (Walczak 2009), w badanych jeziorach nie zaobserwowano takiego zjawiska. Oznacza to, że można wykluczyć pH jako czynnik wpływający na strukturę genotypową bakterii w takim typie jezior.

3.5. Wpływ pór roku na różnorodność bakterii

Nie tylko temperatura, zasolenie, stężenie tlenu, czy organizmy bakteriożerne wpływają na liczebność, skład taksonomiczny, biomasę i aktywność metaboliczną bakterii żyjących w estuariach, ale są one kontrolowane również przez stężenie materii organicznej oraz poziom troficzny wód (Crump i in. 2004, Mudryk 1994, Tang i in. 2012). Nie bez znaczenia są także cykliczne zmiany innych warunków środowiskowych. Na przykład w okresie letnio-jesiennym obficie występują makrofity, wydzielające różne substancje, które bakterie wykorzystują jako substraty pokarmowe i przekształcają w biomasę bakteryjną. Co więcej, również w tym okresie występuje intensywny rozwój fitoplanktonu. Komórki glonów uwalniają i wydzielają materię organiczną, która również jest wykorzystywana jako pokarm przez mikroheterotrofy. Wymienione czynniki występujące w okresie letnio-jesiennym, skutkują występowaniem maksimum liczebności bakterii w badanych jeziorach w tych porach roku (Mudryk 1994). Należy jednak pamiętać, że liczebność bakterii, nie ma związku z ich różnorodnością, o czym świadczy fakt, że współczynnik Shannona maleje w kolejności: wiosna>jesień>lato. Jego najwyższa wartość wiosną mogła mieć związek z dopływem substancji biogennych. Ma to związek z gospodarką rolną, gdzie właśnie w okresie wiosennym mógł nastąpić wzrost ich stężenia, ale i bakterii lądowych wraz z napływem wody w wyniku roztopów. Ten sam spływ powierzchniowy poprzez rowy melioracyjne, przez pryzmat wzmożonych prac rolnych i dużych opadów atmosferycznych, mógł przynieść podobny efekt jesienią. Co więcej, październik, jest miesiącem najsilniejszego występowania intruzji wód morskich, które także wzbogacały florę bakteryjną jezior w bakterie morskie (Cieśliński 2011b). Warto mieć więc na uwadze, że w badanych próbkach mogły znaleźć się mikroorganizmy spłukane z środowisk sąsiadujących z estuariami, niezdolne do egzystencji w tych zbiornikach wodnych, zawyżając tym samym wartości wskaźnika różnorodności Shannona, którego wartość zależy również od czasu zatrzymania wody w zbiorniku (Crump i in. 2004, Tang i in. 2012).

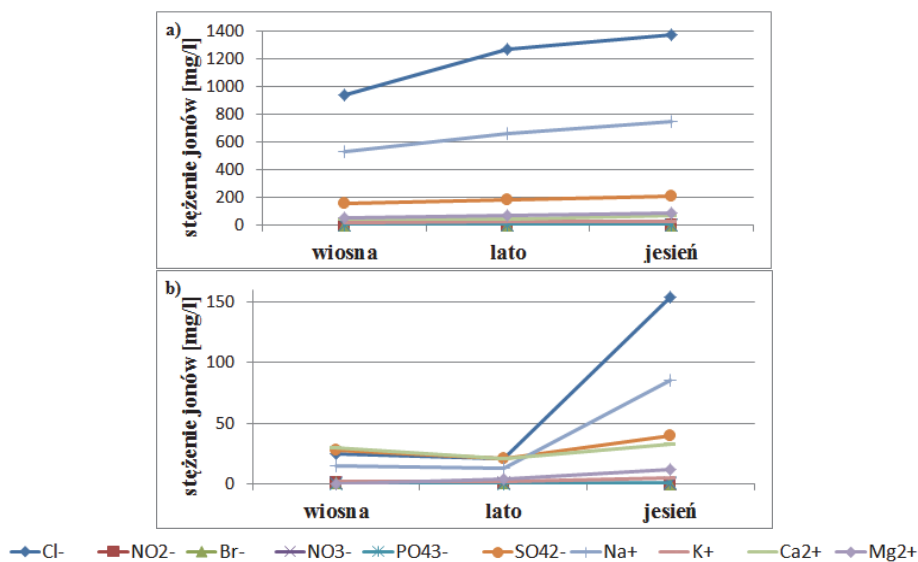
3.6. Wpływ głębokości na strukturę genotypową zbiorowiska bakterii

Biorąc pod uwagę współczynnik podobieństwa Dice'a oraz wartości indeksu Shannona, nie zaobserwowano znacznych różnic pomiędzy próbkami pobranymi z powierzchni a tymi pobranymi z dna. Jednak ana-

lizując dendrogramy można zauważyć bardzo dużą spójność próbek pobranych z powierzchni i dna jesienią, oraz niespójność wiosną i latem, gdzie próbki te są na bardzo oddalonych od siebie gałęziach, tworząc osobne klady z innymi próbkami. W żadnej porze roku nie można mówić o spójności genotypowej bakterii występujących przy dnie. Takie wyniki analizy genotypowej, podobnie jak zmiany fizykochemiczne tj. brak różnic temperatury i pH pomiędzy dnem i powierzchnią oraz występowanie deficytów tlenowych w niektórych miejscach, lub miesiącach, łatwo powiązać z charakterystyką tych jezior oraz specyfiką cyklicznych zmian w poszczególnych porach roku. Z jednej strony oba jeziora mają małą głębokość i brak osłony przed wiatrem. W przypadku jeziora Łebsko występuje także znaczna rozległość lustra wody. Te wszystkie czynniki sprzyjają pełnemu mieszaniu się wód w profilu poziomym i pionowym (Mudryk 1994). Z drugiej strony kształt misy jeziora Łebsko związany jest z występowaniem różnego rodzaju naturalnych zatok i przewężzeń, w których mieszanie wody jest utrudnione – tłumaczy to stratyfikację tlenową w każdej porze roku w tym jeziorze. Ponadto zjawiska zarastania i wypływania mis jeziornych mogą powodować, że utrudniona jest mikcja wody (Cieśliński 2011a), co może być wyjaśnieniem niższej wartości stężenia tlenu przy dnie latem w jeziorze Sarbsko w stosunku do innych pór roku, gdyż wtedy występuje najintensywniejszy rozwój roślinności (Cieśliński 2011b). To wszystko powoduje, że w jeziorach występują strefy, w których w różnych okresach zachodzi intensywne mieszanie się wód, jak i w których ten proces zaznacza się słabo (Cieśliński 2011a). Bardzo duża spójność genotypowa próbki pobranej z powierzchni i dna jesienią jest prawdopodobnie związana ze zmniejszoną ilością roślinności o tej porze roku, oraz wzmożonym falowaniem, spowodowanym działalnością wiatru, który najczęściej i najsilniej wieje w październiku (Cieśliński 2011b).

3.7. Wpływ jonów pochodzenia morskiego i lądowego na bakterie

Oprócz jonów chlorkowych przeanalizowano także zmiany innych jonów od morskich oraz pochodzenia lądowego w cyklu rocznym, co zobrazowano na rysunku 8.



Rys. 8. Zmiany stężenia jonów w zależności od pory roku w jeziorze

a) Łebsko b) Sarbsko

Fig. 8. Changes in ion concentration depending on the season in

a) Łebsko b) Sarbsko lake

Analizując wykresy zmian stężenia jonów w zależności od pory roku w jeziorach (rys. 8a, 8b), można zauważyć, że zarówno Łebsko, jak i Sarbsko należą do jezior typu chlorkowo-sodowego. Według literatury jezioro Łebsko należy do zlewni o wodach stale słonawych (Cieśliński 2012). Jego zasolenie wynosi 5,7‰, a stężenia chlorków w całej misie jeziornej zawsze przekracza wartość 409 mg/dm³ (Cieśliński 2011a, Cieśliński 2012, Mudryk 1994). Z kolei Sarbsko należy do jezior o wodach stale słodkich. Jego średnie zasolenie jest na poziomie około 0,1‰, a stężenie chlorków ani razu nie przekroczyło w nim wartości 200 mg/dm³ (Bechtel i Woszczyk 2008, Cieśliński 2011a, Cieśliński 2012). Analizując wykresy (rys. 8a, 8b) rzeczywiście widoczne jest, że wody słone mają znacznie większy udział w jeziorze Łebsko, niż Sarbsko. Potwierdza to analiza pozostałych jonów pochodzenia morskigo, jak potasu, magnezu i siarczanów (Cieśliński 2011b), których stężenia są znacznie wyższe w jeziorze Łebsko. Zgodnie z danymi literaturowymi w jeziorze Sarbsko nigdy nie odnotowano wysokich stężeń wskaźników pochodzenia morskigo (Cieśliński 2011a, Cieśliński 2011b). Ma to

przełożenie na mikroflorę bakteryjną. W jeziorze Sarbsko dominują bakterie typu śródlądowego, natomiast udział bakterii *stricte* morskich stanowi niewielki procent (Mudryk 1994). W przypadku Łebska obserwuje się w zasadzie stały wpływ Morza Bałtyckiego, dlatego wskaźniki charakterystyczne dla wód morskich nigdy nie spadają poniżej określonego stężenia tak, by pojawiła się woda typowo słodka (Cieśliński 2011b). W literaturze można znaleźć informację, że wysokie stężenia jonów Na^+ i Mg^{2+} są niezwykle ważne do przeżycia bakterii morskich, ponieważ zabezpieczają ich komórki przed cytolizą. Proces ten jest uzależniony od aktywności komórkowych enzymów litycznych, na które hamująco działają właśnie wyżej wymienione kationy. Ich obecność chroni więc mukopeptydową integralność struktury ściany komórkowej przed zniszczeniem (jony Na^+) i zabezpiecza jej stabilność funkcjonalną i elektrostatyczną (jony Mg^{2+}). Brak tych kationów w środowisku oznacza, dla bakterii morskich brak zdolności rozmnażania lub nawet śmierć poprzez lizę w wyniku szoku osmotycznego, ponieważ kationy sodu spełniają w komórkach tych bakterii funkcje osmoregulacyjne. Wszystkie bakterie, które funkcjonują w środowisku zasadowym (a taki charakter ma woda morska), wymagają do optymalnego rozwoju jonów Na^+ , ponieważ są one wyposażone w wewnątrzkomórkową pompę sodową. Ponadto kationy sodu spełniają również bardzo ważne funkcje związane z regulacją aktywności fizjologiczno-metabolicznej u bakterii morskich, jak np. udział w transporcie aminokwasów i cukrów przez błonę cytoplazmatyczną czy aktywacją łańcucha oddechowego. Kationy sodu biorą również udział w procesie tworzenia się ATP. Oprócz jonów sodu, także kationy potasu i magnezu indukują aktywność enzymów transportujących – permeaz. Jony sodu i potasu są również potrzebne w utlenianiu substancji pokarmowych oraz zwiększają syntezę kwasów DNA oraz RNA i przyspieszają wzrost bakterii morskich. Mimo, że bakterie morskie do optymalnego rozwoju wymagają jonów Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , zbyt wysokie stężenia tych kationów, może hamować ich wzrost i powodować deformację komórek. Z kolei wobec bakterii typu śródlądowego nie stwierdzono wyraźnie stymulującego czy hamującego wpływu poszczególnych kationów na ich rozwój (Mudryk 1994).

Natomiast analizując wskaźniki pochodzenia lądowego, jakimi są fosforany i azotany (Cieśliński 2011a), oraz jony wapnia (Paturej 2005), można zauważyć, że są one na podobnym poziomie w obu jeziorach,

oraz nie zmieniają się tak drastycznie w przeciągu pór roku. Oprócz ich niskiego zróżnicowania obserwowano także ich niskie stężenia. Potwierdzają to dane literaturowe, w których można znaleźć informację, że oddziaływanie łądu na jeziora jest bardziej stabilne i nie wpływa tak znacząco na zmienność ich składu hydrochemicznego (Cieśliński 2011a). Oznacza to, że raczej należy pominąć ten czynnik przy analizie struktury genotypowej zbiorowisk bakterii. Jedynym zaskoczeniem są jony wapnia, świadczące o wysłodzeniu wód, którego wartości są ok. 2-krotnie wyższe w jeziorze Łebsko, a nie Sarbsko. Prawdopodobnie jest to związane z działalnością człowieka, gdyż wpływ antropogeniczny jak okresowe zrzuty ścieków i wód z okolicznych łąk i pól uprawnych jest wyższy dla Łebska. Powoduje to obniżenie wskaźników od morskich i wzrost od łądowych np. wodorowęglanów, azotu ogólnego, azotanów, fosforu ogólnego, fosforanów, amoniaku, co z kolei może przyczyniać się do eutrofizacji zbiorników przybrzeżnych (Cieśliński 2011b). Zmiana dominacji wskaźników chemicznych w jeziorze Sarbsko, świadczy o okresowym wysładzaniu, jego wód wiosną i silniejszym wpływem od morskim jesienią (Cieśliński 2011a). Niezwykle trudne jest dokonanie hierarchizacji wpływów poszczególnych elementów na bioróżnorodność bakteryjną głównie ze względu na fakt ich łącznego oddziaływania, a także z powodu trudności w określaniu granic wpływów elementów środowiska przyrodniczego na jeziora (Cieśliński 2011b).

4. Podsumowanie

Z przeprowadzonych badań wynika, że bioróżnorodność zbiorowiska w trakcie trwania eksperymentu nie była stała. Wartość indeksu Shannona oscylowała między wartościami od 1,38, do 2,37, co oznacza biocezozę wahającą się od stosunkowo ubogiej do przeciętnie bogatej genotypowo. Jego najniższe wartości obserwowano latem, a najwyższe wiosną, a jego fluktuacje były znacznie mniejsze dla jeziora Sarbsko niż Łebsko. Oznacza to, że bioróżnorodność jeziora Sarbsko jest bardziej stała. Latem zaobserwowano także spadek współczynnika podobieństwa Dice'a w jeziorze Łebsko, co nie miało miejsca w jeziorze Sarbsko. O zmianach bioróżnorodności świadczą także zmiany w liczbie i intensywności świecenia prążków DNA obecnych stale i na tej samej wysokości w fingerprintach wszystkich próbek pobieranych w różnych porach roku.

Najniższa wartość indeksu Shannona latem była powiązana z fluktuacjami zasolenia. Można zauważyć także korelację z dużym wzrostem temperatury o tej porze roku. Spadek bioróżnorodności mógł więc wynikać z braku zdolności adaptacyjnych części bakterii na zmieniające się parametry fizykochemiczne, jak temperatura czy zmiany ciśnienia osmotycznego, wynikającymi ze stężenia jonów chlorkowych.

Zaobserwowano niewielką zmianę struktury genotypowej w cyklu sezonowym w jeziorze Sarbsko, a na dendrogramach widać stopniowe różnicowanie się zbiorowisk bakterii, co może być związane z sezonową zmiennością struktury biocenozy.

Nie zaobserwowano znacznych różnic w wartościach współczynnika podobieństwa Dice'a oraz indeksu Shannona pomiędzy próbkami pobranymi z powierzchni, a tymi pobranymi z dna. Dendrogramy prezentują dużą spójność próbek pobranych z powierzchni i dna jesienią, oraz jej brak wiosną i latem, gdzie próbki te są na bardzo oddalonych od siebie gałęziach, tworząc osobne klady z innymi próbkami. W żadnej porze roku nie zaobserwowano spójności genotypowej bakterii występujących przy dnie.

Badania zostały wykonane w ramach projektu numer UMO-2012/07/B/ST10/04359, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Hydroekologiczne uwarunkowania funkcjonowania ekosystemów jezior przybrzeżnych południowego Bałtyku” oraz przy wsparciu BK-261/RIE-8/18 (08/080//BK/0054).

Autorzy pragną podziękować Annie Banach z Politechniki Śląskiej za pomoc w analizie statystycznej.

Literatura

- Bechtel, A., Woszczyk, M. (2008). Skład materii organicznej jako wskaźnik genezy osadów jeziora Sarbsko. *Przegląd Geologiczny*, 56(2), 140-143.
- Beck, B. R., Holzapfel, W., Hwang, C. W., Do, H. K. (2013). Bacterial community structure shift driven by salinity: analysis of DGGE band patterns from freshwater to seawater of Hyeongsan River, Korea. *Journal of Life Science*, 23(3), 406-414.
- Brzeszcz, J., Kapusta, P., Turkiewicz, A. (2013). Zastosowanie metod molekularnych w badaniach bioremediacji substancji ropopochodnych. *Nafta-Gaz*, 11, 829-842.

- Campbell, B. J., Kirchman, D. L. (2013), Bacterial diversity, community structure and potential growth rates along an estuarine salinity gradient, *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 7, 210-220.
- Cieśliński, R. (2011a). *Geograficzne uwarunkowania zmienności hydrochemicznej jezior wybrzeża południowego Bałtyku*. Gdańsk: Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego.
- Cieśliński, R. (2011b). *Rola jezior przybrzeżnych polskiego wybrzeża Bałtyku południowego w transformacji jakości wód do nich dopływających: na przykładzie jeziora Łebsko i Gardno*. Gdańsk: Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego.
- Cieśliński, R. (2012). Zróżnicowanie hydro- i morfogenetyczne jezior przybrzeżnych polskiego wybrzeża południowego Bałtyku. *Geologia i geomorfologia*, 9, 175-187.
- Crump, B. C., Hopkinson, C. S., Sogin, M. L., Hobbie, J. E. (2004). Microbial Biogeography along an Estuarine Salinity Gradient: Combined Influences of Bacterial Growth and Residence Time. *Applied And Environmental Microbiology*, 70(3), 1494-1505.
- Feledyn-Szewczyk, B. (2013). *Wpływ sposobu użytkowania gruntów na różnorodność gatunkową flory segetalnej*. Puławy: Dział Upowszechniania i Wydawnictw IUNG-PIB.
- Frać, M., Jezierska-Tys, S. (2010). Różnorodność mikroorganizmów środowiska glebowego. *Post. Mikrobiol.*, 40(1), 47-58.
- Jonassen, K. R. (2013). *Effect of salinity shifts on microbial community composition in different nitrifying biofilms in continuous moving bed biofilm reactors*. Institut for bioteknologi.
- Ling, J., Zhang, Y., Dong, J., Wang, Y., Chen, L., Feng, J., Sun, H., Wang, D., Zhang, S. (2011). Spatial variation of bacterial community composition near the Luzon strait assessed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCRDGGE) and multivariate analyses. *African Journal of Biotechnology*, 10(74), 16897-16908.
- Mudryk, Z. (1994). *Bakterie heterotroficzne w procesach transformacji materii organicznej w jeziorach estuariowych*, Słupsk: Wydawnictwo Wyższa Szkoła Pedagogiczna w Słupsku
- Muyzer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3).
- Obolewski, K. (pod red.) (2017). *The Ecological Status of the Southern Baltic Coastal Lakes*. Bydgoszcz: Polish Scientific Publishers PWN.

- Obolewski, K., Astel, A., Kujawa, R. (pod red.) (2017). *Hydroecological Determinants of Functioning of Southern Baltic Coastal Lakes*. Bydgoszcz: Polish Scientific Publishers PWN.
- Paturej, E. (2005). *Zooplankton przymorskich jezior Pobrzeża Bałtyckiego*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego.
- Sapp, M., Wichels, A., Wiltshire, K. H., Gerds, G. (2007). Bacterial community dynamics during the winter-spring transition in the North Sea, *Federation of European Microbiological Societies FEMS Microbiol Ecol*, 59, 622-637.
- Stanley, S. O., Moritab, R. Y. (1968). Salinity Effect on the Maximal Growth Temperature of Some Bacteria Isolated from Marine Environments, *Journal of Bacteriology*, 95(1), 169-173.
- Starmach, K., Wróbel, S., Pasternak, K. (1976). *Hydrobiologia : limnologia*. Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Naukowe.
- Tang, X., Xie, G., Shao, K., Bayartu, S., Chen, Y., Gaocorresponding, G. (2012). Influence of Salinity on the Bacterial Community Composition in Lake Bosten, a Large Oligosaline Lake in Arid Northwestern China, *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1)3, 4748-4751.
- Walczak, M. (2009). *Bakterioneuston jezior*. Toruń: Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika.
- Ziemińska, A., Lalik, A., Węgrzyn, A. (2011). *Markery molekularne. Podstawy dla studentów kierunków technicznych*. Gliwice: Wydawnictwo Politechniki Śląskiej.
- Ziemińska-Buczyńska, A., Cema, G., Kalbarczyk, M., Żabczyński, S. (2014). Wykorzystanie metody PCR-DGGE do badania zmienności genotypowej bakterii zasiedlających złoża tarczowe oczyszczające modelowe ścieki koksownicze. *OCHRONA ŚRODOWISKA*, 36(1), 3-8.
- Ziemińska-Buczyńska, A. (2015). *Dynamika zmian bioróżnorodności zespołów bakterii biorących udział w przemianach związków azotu w złożu tarczowym oczyszczającym ścieki koksownicze*. Gliwice: Wydawnictwo Politechniki Śląskiej.

Dynamics of Seasonal Changes in Bacterial Biodiversity in Coastal Lakes: Łebsko and Sarbsko

Streszczenie

Polskie pobrzeże jest bogate w jeziora słonawe o charakterze estuariów. Należą do nich jeziora Niziny Gardnieńsko-Łebskiej. Każdy z tych akwenów ma własną specyfikę hydrologiczno-ekologiczną, co skutkuje faktem, że wiedza na temat tych dynamicznych ekosystemów wodnych jest niepełna i wymaga rozszerzenia.

W ramach eksperymentu badano bioróżnorodność bakteryjną w jeziorach Łebsko i Sarbsko w różnych porach roku. Materiał do badań stanowił materiał bakteriologiczny, pochodzący z przefiltrowania próbek wody tych jezior. W celu zbadania różnorodności biologicznej wykorzystano łańcuchową reakcję polimerazy – PCR (ang. Polymerase Chain Reaction), połączoną z elektroforezą w gradiencie czynnika denaturującego – DGGE (ang. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Markerem molekularnym wykorzystanym w badaniach był fragmentu genu kodującego 16S rRNA. Różnorodność biologiczną badano ze względu na gradient zasoleniowy oraz inne zmiany fizyko-chemiczne i biologiczne, wywoływane następującymi po sobie porami roku, oraz występującymi w obrębie zbiornika w zależności od głębokości. Efekty eksperymentu udokumentowano w postaci zdjęć w świetle ultrafioletowym rozdziłu w gradiencie czynnika denaturującego produktów PCR, na podstawie których wykonano analizę densyometryczną, obliczono współczynnik podobieństwa Dice'a, indeks bioróżnorodności Shannona oraz utworzono dendrogramy na podstawie algorytmu najbliższego sąsiada.

Badania wykazały, że bioróżnorodność zbiorowiska w trakcie trwania eksperymentu nie była stała i wahała się od stosunkowo ubogiej do przeciętnie bogatej genotypowo. Najniższe wartości indeksu Shannona obserwowano latem, co miało związek z fluktuacjami zasolenia i wysoką temperaturą. O tej porze roku zaobserwowano także spadek współczynnika podobieństwa Dice'a w jeziorze Łebsko. Sytuacja taka nie miała miejsca w jeziorze Sarbsko. W projekcie wykazano, iż jezioro Sarbsko ma bardziej stałą różnorodność bakteryjną, na co wskazują mniejsze fluktuacje wartości indeksu bioróżnorodności Shannona. Zaobserwowano nieznaczną zmianę struktury genotypowej w cyklu sezonowym w jeziorze Sarbsko, co obrazują dendrogramy, na których widać stopniowe różnicowanie się zbiorowisk bakterii. Temperatura w różnych porach roku również wpłynęła na różnorodność biologiczną bakterii. Ponadto zaobserwowano związek między bioróżnorodnością i stężeniem tlenu. Podczas eksperymentu nie było zmian w poziomie pH, więc parametr ten nie miał wpływu na bakterie.

Abstract

The Polish shore of the Baltic Sea is rich in brackish lakes of estuarine character. One of them are lakes of the Gardnieńsko-Łebska Lowland. Each of these reservoirs has its own hydrological and ecological specificity, which results in the fact that knowledge about these dynamic water ecosystems is incomplete and requires further researches.

The aim of this work was to study seasonal changes in bacterial diversity in coastal brackish lakes: Sarbsko and Łebsko. Biodiversity was studied for salinity gradient, as well as physicochemical and biological changes (caused by seasons and depth of the reservoir from which the test material was taken). To monitor the genotypic variation of individual microorganisms and estimate biodiversity of the bacterial community in the settlement and to estimate the genotype complexity of the samples PCR-DGGE method (polymerase chain reaction, combined with denaturing gradient gel electrophoresis) was used. The molecular marker used in the studies was a fragment of the 16S rRNA gene. The effects of the experiment were documented in the form of photos in the ultraviolet light of the PCR-DGGE products, on the basis of which densitometric analysis was performed, Dice similarity coefficient and Shannon biodiversity index was calculated, and dendrograms were created based on the nearest neighbor algorithm.

The research showed that the biodiversity of the community during the experiment was not constant and ranged from relatively poor to average genotypically rich. The lowest values of the Shannon index were observed in the summer, which was related to salinity fluctuations and high temperature. In the summer, a decrease in the similarity of Dice in the Łebsko lake was also observed. Such a situation did not take place in Sarbsko. The project showed that Sarbsko has a more stable bacterial diversity, which is indicated by smaller fluctuations in the Shannon biodiversity index. It was observed that bacteria genotypic structure has changed slightly in seasonal cycle in the Sarbsko lake, as dendrograms show. Temperature through the seasons also influence the bacterial biodiversity. What is more relation between biodiversity and oxygen concentration had been noticed. During the experiment there were no changes in pH level and this parameter has not got influence on bacteria.

Słowa kluczowe:

bakterie, bioróżnorodność, estuaria, PCR-DGGE

Keywords:

bacteria, biodiversity, estuaries, PCR-DGGE