

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

Faktory ovlivňující početnost a chování bakteriální skupiny

***Limnohabitans* sp. v eutrofizovaném prostředí**

Kateřina Pěchotová

Vedoucí práce: Mgr. Vojtěch Kasalický

Odborný konzultant: Prof. Dr. Karel Šimek, PhD.

České Budějovice, duben 2009

Pěchotová K. (2009): Faktory ovlivňující početnost a chování bakteriální skupiny *Limnohabitans* sp. v eutrofizovaném prostředí

[Factors influencing the abundance and ecology of bacterial group *Limnohabitans* sp. in eutrophic environment. Bachelor thesis] 34 pp., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Tato práce představuje grantovou žádost na projekt zabývající se růstovými vlastnostmi rodu *Limnohabitans* v eutrofních vodách a jeho vztahem se sinicemi rodu *Microcystis*.

Annotation:

This work represents the grant application for project dealing with growth characteristics of a new freshwater bacterial group *Limnohabitans* in an eutrophic system and with its interactions with blue-green algae *Microcystis*.

Práce byla financována v rámci projektu GAČR 206/08/0015
(hlavní řešitel Prof. Dr. Karel Šimek, PhD.)

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury. V souladu s § 47b zákona č.111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené elektronické podobě ve veřejné části databáze STAG na internetových stránkách Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

V Českých Budějovicích dne 30. dubna 2009

Kateřina Pěchotová

Abstrakt:

Bakalářská práce je zpracována formou grantové žádosti pro Grantovou agenturu České republiky. Cílem naší práce je popsat chování izolátů nového sladkovodního bakteriálního rodu *Limnohabitans* (Betaproteobacteria) v eutrofním prostředí. Budeme sledovat růstovou odpověď studovaného bakteriálního rodu na změnu pH, na jehož pozitivní vliv již poukázaly předběžné výsledky. Dále nás zajímá interakce sinic rodu *Microcystis* a bakterií *Limnohabitans*, která by dle dosavadních studií měla být antagonistická. Třetí plánovaný experiment přinese nové znalosti o diurnální dynamice rodu *Limnohabitans* v eutrofním systému. K dosažení přesných výsledků použijeme moderní metody - průtokovou cytometrii či CARD-FISH.

Abstract:

This Bachelor thesis was written in a form of a Grant Application for the Czech Science Foundation. The main theme of our work is to describe growth characteristics of isolated strains of the new bacterial group *Limnohabitans* (Betaproteobacteria) in eutrophic system. We will investigate *Limnohabitans*'s growth response to changes in pH as indicated by preliminary data. We will also study the interaction between the blue-green algae *Microcystis* and the bacteria *Limnohabitans*, where we expect antagonistic relationship as proposed by recent field studies. The third planned experiment will bring new knowledge on diurnal dynamics of the studied bacterial group in eutrophic environment. To obtain precise results, modern techniques will be applied as CARD-FISH or Flow-Cytometry.

Poděkování:

Ráda bych poděkovala za odbornou pomoc, ochotu a bezbřehou trpělivost především mému vedoucímu práce Mgr. Vojtěchu Kasalickému a také Prof. Dr. Karlu Šimkovi, PhD. za odborný dohled. Dalším, komu patří mé poděkování, je Karel Horňák PhD. a pracovnice laboratoře Oddělení mikrobiální ekologie vody, kde jsem mohla svou práci realizovat.

Obsah:

1. Shrnutí současných znalostí v kontextu s plánovaným pokusem	6
1.1. Sladkovodní planktonní bakterie	6
1.2. Živiny a vlastnosti sladkých vod ovlivňující dynamiku bakterioplanktonu	7
1.2.1. Fosfor, dusík a uhlík	8
1.2.2. Ekologická stechiometrie bakterií a řas ve vodách	9
1.2.3. Teplota a pH	10
1.3. Role mikrobiální smyčky v přenosu živin	11
1.4. Eutrofizace našich vod	12
1.4.1. Rozdělení vod podle množství a původu živin (trofie)	12
1.4.2. Lidskou činností navozená eutrofizace a její důsledky	14
1.4.3. Změna fungování mikrobiální smyčky	15
1.4.4. Řasy a sinice v procesech eutrofizace	16
1.4.5. Interakce sinice/řasy a bakterie	17
1.5. Řešení antropogenní eutrofizace	18
1.5.1. Dlouhodobé řešení	18
1.5.2. Krátkodobá řešení projevů/dopadů	19
1.5.3. Aplikace biologických přístupů	19
1.6. Bakteriální rod <i>Limnohabitans</i> a jeho důležité ekofyziologické vlastnosti	20
2. Význam a uspořádání experimentu	22
2.1. Význam experimentu pro studium procesů v životním prostředí	22
2.2. Cíle a uspořádání experimentu	22
2.3. Předběžné výsledky	22
3. Cíle a hypotézy testované experimentem	25
4. Design experimentu a použité metody	26
4.1. Design experimentu	26

4.1.1. Design	26
4.1.2. Časový harmonogram experimentu	27
4.1.3. Finanční náročnost experimentu	27
4.2. Použité metody	28
4.2.1. Metody použité k chemické analýze vzorků	28
4.2.2. Metody použité k zjištění chemických a fyzikálních vlastností vzorků	28
4.2.3. Metody použité k mikrobiálnímu rozboru vzorků	28
4.3. Řešitelé a jejich kompetence	29
5. Dostupné vybavení	29
6. Shrnutí	30
7. Použitá literatura	31

Název projektu:

Faktory ovlivňující početnost a chování bakteriální skupiny *Limnohabitans sp.* v eutrofizovaném prostředí

1. Shrnutí současných znalostí v kontextu s plánovaným pokusem

1.1. Sladkovodní planktonní bakterie

Sladkovodní bakterie jsou velmi různorodou skupinou prokaryotních organismů lišících se morfologií, fyziologií či ekologickými nároky (Sigeo 2005). Planktonní bakterie hrají v našich vodách důležitou roli. Tvoří nejpočetnější skupinu organismů s krátkou generační dobou a rychlým obratem biomasy. Spolu s prvky, fytoplanktonem a zooplanktonem biochemicky transformují rozpuštěné látky do organických částic a vytváří tak základ dynamiky koloběhu živin a toku energie ve vodním ekosystému - mikrobiální smyčku (Azam a kol. 1983). Důležitou roli mají bakterie i při samočisticích procesech vody, kdy mineralizují organické látky ve vodě obsažené (Hartman a kol. 1998).

Studium sladkovodních bakterií je výrazně omezeno jejich velikostí. Průměrná velikost bakterií v planktonu je 0,2 – 0,6 μm , objem 0,06 – 0,4 μm^3 (Kalff 2002), což je téměř na hranici využitelnosti světelné mikroskopie. Nejčastěji používanou metodou je proto epifluorescenční mikroskopie, která je klasickým řešením při zjišťování základních informací o bakteriálním společenstvu (Wetzel 1983). Modernější metodou pro stanovení počtu bakterií je průtoková cytometrie (Gasol a kol. 2000). Tato metoda umožňuje navíc roztřídit bakterie podle velikosti či autofluorescence, která se týká především sinic. Obě tyto metody jsou vhodné především pro stanovení celkového počtu bakterií nebo stanovení jejich aktivity. Další možností studia buněk bakterií je použití ESEM (environmental scanning elektron microscope), který umožňuje vidět buňky v jejich přirozeném stavu (Sigeo 2005). V dnešní mikrobiální ekologii patří mezi nejvýznamnější přístupy molekulární biologie – DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Šimek a kol. 2001), T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism) (Eiler a Bertilsson 2007) a Reverse-LineBlot Hybridization (Zwart a kol. 2003). Tyto metody umožňují porovnat vliv experimentálního zásahu na změnu složení mikrobiálního společenstva.

Donedávna byly znalosti o bakteriích, které obývají sladkovodní ekosystémy, omezené pouze na kultivovatelné organismy. S výjimkou sinic (*Cyanobacteria*) se jednalo o velmi omezený výběr, méně než 25 % ze všech sladkovodních bakterií (Zwart a kol. 2002). Zavedením technik

molekulární biologie, hlavně polymerázové řetězcové reakce (PCR), bylo možné obejít tento problém a otevřel se prostor ke skutečnému poznání mikrobiální diverzity (Rappé a Giovannoni 2003). Dnes již víme, že sladkovodní bakterie tvoří unikátní společenstvo odlišné od mořských či půdních bakterií. Běžnými obyvateli vod jsou bakterie ze skupin *Actinobacteria*, *Proteobacteria* (alfa i beta), *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* a *Verrucomicrobia* (Zwart a kol. 2002).

Teprve zavedení metody fluorescenční *in situ* hybridizace – FISH (Amann a kol. 1997) či CARD-FISH (Sekar a kol. 2003) umožnilo určit podíl geneticky příbuzných skupin bakterií v bakterioplanktonu. Překvapivě největší početnost bakterií ve sladkých vodách mají „na svědomí“ malé geneticky úzce příbuzné skupiny (clustery) (Zwart a kol. 2002), které mohou tvořit až 70 % všech bakterií (Hahn 2006). V současné době existuje velké množství prób zahrnující velké skupiny jako Eubacteria, Archaea, *Betaproteobacteria* (Manz a kol. 1992) apod. či početně významné clustery jako na příklad R-BT065 cluster (Šimek a kol. 2001) a *Polynucleobacter* genotyp C cluster (Hahn a kol. 2005). Právě studium interakcí bakterií z těchto clusterů v rámci mikrobiální smyčky se zdá být velmi významné pro porozumění mechanismů koloběhu živin a ekologie vodního prostředí (Hahn 2006).

1.2. Živiny a vlastnosti sladkých vod ovlivňující dynamiku bakterioplanktonu

Množství bakteriální biomasy je ovlivňováno především produktivitou celého vodního ekosystému (Tabulka č.1). Heterotrofní bakterie jsou závislé především na dostupných formách fosforu, dusíku a organického uhlíku. Dále je jejich výskyt výrazně ovlivněn fyzikálními faktory jako je teplota a pH (Sigeo 2005).

Úroveň trofie	Průměrné množství bakterií (10^6 ml^{-1})	Biomasa (g m^{-3})
Oligotrofní	0,50	0,15
Mesotrofní	1,00	0,70
Eutrofní	3,70	2,30

Tabulka č.1. Průměrné hodnoty počtu bakterií a jejich biomasa v různě úživných vodách (převzato z Wetzel 1983).

Nejvyšší koncentrace bakterií byly zjištěny v tropických slaných jezerech a eutrofních nádržích. Naopak velmi nízké koncentrace byly pozorovány v kyselých dystrofních jezerech s vysokým obsahem huminových látek (Wetzel 1983). Zcela přirozené změny v růstu a biomase bakterií můžeme rovněž pozorovat během celého roku, neboť jsou výrazně vázány na teplotu a dostupnost substrátu. Lze také pozorovat pozitivní korelaci mezi růstem bakterií a produktivitou fytoplanktonu (Wetzel 1983). V hlubokých stratifikovaných jezerech či nádržích se velikost bakteriální biomasy mění podél celého vodního sloupce. Bakteriální biomasa je největší v epilimniu, poté klesá na minimum v metalimniu a vrchním hypolimniu, s větším množstvím bakterií se pak můžeme zase setkat ve spodním hypolimniu (Wetzel 1983).

1.2.1. Uhlík, fosfor a dusík

Uhlík je nejdůležitějším biogenním prvkem. Organický zahrnuje rozpuštěný organický uhlík - DOC a nerozpuštěný organický uhlík - POC. Poměr těchto dvou je od 6:1 až k 10:1. Koncentrace DOC je prakticky celoročně konstantní a sezónní výkyvy ostatních parametrů ji příliš nemění (Wetzel 1983). Koncentrace rozpuštěného organického uhlíku však ještě nemusí znamenat jeho dostupnost pro vodní organismy. Vysoké koncentrace DOC jsou ku příkladu v huminových vodách, kde je uhlík vázán ve složitých organických sloučeninách, a je tak bakteriím hůře nedostupný (Sigeo 2005). Naproti tomu řasy a sinice díky své autotrofii nedostatkem uhlíku v zásadě netrpí. Největší objem uhlíku ve sladkovodních ekosystémech zahrnuje uhlík anorganický, především různé produkty kyseliny uhličitě (Pitter 1999). Základní cyklus anorganického uhlíku zahrnuje spotřeba fotosyntetickými reakcemi a přísun živočišným dýcháním. Tento obrat však zároveň ovlivňuje pH vody (viz 1.2.3 pH).

Fosfor je jedním z esenciálních makroprvků pro všechny organismy ve vodách, neboť je součástí důležitých organických molekul jako ATP, DNA, RNA či fosfolipidy (Hejzlar 2003). Fosfor lze dělit na rozpuštěný, většinou ve formě orthofosforečnanů tedy tzv. RRP – rozpuštěný reaktivní fosfor (Pitter 1999) a nerozpuštěný fosfor ve vodních organismech. Nejčastěji se však fosfor ve vodách vyskytuje ve formě fosforečnanového aniontu (Hejzlar 2003). Bakteriím je snadno přístupný výše zmíněný RRP (Šimek a kol. 2006), z organických sloučenin nebo komplexů jej získávají např. pomocí tzv. exoenzymů (Vrba a kol. 1992).

A právě koncentrace rozpuštěného reaktivního fosforu může ovlivňovat složení bakteriálního společenstva a regulovat růst jednotlivých bakteriálních skupin (Currie 1990, Šimek a kol. 2006). Nedostatek fosforu může být pro růst heterotrofního bakterioplanktonu limitující (Šimek a kol. 2006). Ohledně kompetice o fosfor je bakterioplankton významným konkurentem

fytoplanktonu (Straškrabová a kol. 1996), neboť spotřeba fosforu bakteriemi je v průměru až třikrát vyšší než spotřeba fytoplanktonem (Tezuka 1990).

Dusík je hlavní živinou, která přispívá k produktivitě sladkých vod a spolu s uhlíkem a fosforem je jednou z hlavních složek buněčné protoplazmy organismů (Wetzel 1983). Hlavní formy, ve kterých se dusík ve sladkovodních ekosystémech vyskytuje, zahrnují dusičnany, dusitany a amoniový iont NH_4^+ (Sigeo 2005). Organický dusík můžeme ve vodách najít ve formě rozpuštěné tzv. DON, který zahrnuje polypeptidy či aminokyseliny, druhým typem organického dusíku je dusík partikulovaný PON. Poměr těchto dvou složek celkového organického dusíku je v rozmezí od 5:1 po 10:1. Pokud dochází k eutrofizaci, poměr DON:PON klesá. Je to tím, že se do vody z povodí dostává více PON (Wetzel 1983).

Za zmínku stojí dva z hlavních mikrobiálních procesů. Denitrifikace, jakožto proces při kterém denitrifikační bakterie získávají energii oxidací organických sloučenin (akceptorem vodíku je zde právě dusík). A naproti tomu nitrifikace, kdy dochází k přeměně redukovaných forem dusíku na dusitany a dusičnany bakteriemi nitrifikačními (Straškrabová a kol. 1996). Dalším významným mikrobiálním procesem odehrávajícím se v našich vodách je fixace vzdušného dusíku sinicemi (viz 1.4.4. Řasy, sinice a tvorba vodního květu).

1.2.2. Ekologická stechiometrie bakterií a řas ve vodách

Stechiometrií základních prvků se začal zabývat už Alfred C. Redfield v první polovině 20. století. Jeho práce byla založena na principu neměnného poměru C:N:P ve světových oceánech a tento překvapivý objev byl později podnětem pro rozšíření jeho závěrů na celé biochemické cykly. Poměr C:N:P se dnes nazývá poměr Redfieldův a v oceánech je jeho hodnota 106:16:1. Už z tohoto poměru vyplývá, že prvkem, který ovlivňuje produktivitu oceánů, je fosfor (Sterner a Elser 2002). I pro naše vody je třeba k tvorbě biomasy poměr 106:16:1, kde pro N:P je kritická hodnota 16. Pokud je poměr větší, dochází k limitaci fosforem, pokud je poměr menší, limitujícím prvkem se stává dusík. Poměr N:P většiny nádrží v České republice výrazně přesahuje kritickou hodnotu 16, a tak se fosfor stává klíčovým prvkem eutrofizace (Pitter 1999).

Vzhledem k tomu, že se řasy a bakterie vyskytují ve stejném prostředí, sdílejí spolu i stejné zdroje a mohou být jimi i limitovány (Sterner a Elser 2002). Jejich nároky na nutrienty se však liší. Zatímco poměr C:N:P řas odpovídá Redfieldově poměru, bakterie mají v biomase více fosforu v poměru 70:7:1 (Sterner a Elser 2002). Avšak Tezuka a kol. (1990) tvrdí, že poměr fosforu a uhlíku není ani u bakterií ani u řas konstantní a může se měnit vzhledem k dostupnosti

různých typů substrátů. Tezuka a kol. (1990) dokázal ve svých pokusech na jezerních bakteriích měnit poměr C:P v neuvěřitelném rozmezí od 31:1 až po 515:1. Pokud byl poměr těchto dvou prvků v substrátu vyšší jak 60 zůstával fosfor vázán v bakteriální biomase a nebyl již zpětně regenerován na orthofosforečnan.

1.2.3. Teplota a pH

Jedním z nejvýznamnějších fyzikálních vlastností vod našich nádrží je **pH**. Tento parametr je determinován jako záporný logaritmus vodíkových iontů a lze jej také odvodit z relativní acidity a alkality. **Alkalita** našich vod je udávána množstvím uhličitnanového iontu, hydrogenuhličitnanového iontu a oxidu uhličitého a je definována jako množství miliekvivalentů kyseliny nezbytné k neutralizaci výše zmíněných iontů v jednom litru vody (Wetzel 1983). **Acidita** je pak neméně důležitá pro vodní ekosystémy, neboť ovlivňuje chemismus vody (Kopáček a kol. 2001). Poměr těchto je jedním ze způsobů jak určit aktuální pH a pufrovací kapacitu vody. Ta je schopna vyrovnávat pH v rozmezí od 4,5 do 9,5 a je velmi důležitá pro život ve vodě. Nízké pH může způsobovat nedostupnost fosforu jako živiny či určovat toxicitu kovů. V kyselých vodách totiž dochází k jejich uvolňování ze sedimentů a tyto pak mohou být zdraví člověka škodlivé, zvláště pokud se dostanou do zásobníků pitné vody. Například koncentrace mědi či rtuti jsou velmi závislé na pH a ve vodních ekosystémech jsou tyto kovy vysoce toxické. Ať už je to toxicita mědi pro vodní rostliny či rtuti, která je již nebezpečná i nám lidem (Kalač a Tříška 1998). Výrazné výkyvy pH lze pozorovat i v období eutrofizace, kdy během noci dochází k výraznému zvýšení CO₂ a pH se tak snižuje (Kočí a kol. 2000).

Bakterie jsou schopné jako skupina přežít v podstatě jakékoli pH. Acidofilní bakterie jako například *Bacillus acidocalcaricus* se vyskytují i ve vodách o pH 1, zatímco alkalofilní bakterie jako *Bacillus firmus* můžeme najít ve vodách s pH kolem 11,5. Není však zcela jasné, zda tyto podmínky preferují, či je pouze tolerují k eliminaci konkurence (Straškrabová a kol. 1996). Percent (2008) zjistil, že diverzita a bohatost bakteriálního společenstva jezer v Adirondack Parku (stát New York v USA) je pozitivně korelována s pH. Nejsilnější a nejprůkaznější vliv byl prokázán u třídy bakterií *Alphaproteobacteria*. Podle Znachora a kol. (2005) ovlivňuje zvýšení pH byť o jeden, dva stupně abundanci heterotrofních bakterií. Ve své práci na Šumavských acidifikovaných jezerech poukázali na fakt, že jednobuněčné bakterie vykazují pozitivní reakci na zvýšení pH již v červnu a poté v srpnu, zatímco na vláknité formy působí pH kladně pouze v srpnu.

Stejně jako jsou bakterie schopny přežít extrémní podmínky pH jsou stejně tak schopny přežít extrémní okolní **teploty**. Ty bakterie, které preferují nízké teploty, se nazývají psychrofilní, druhý extrém jsou bakterie termofilní. Psychrofilní bakterie rostou při teplotách pod 20°C. Vyskytují se v hlubokých jezerech či studených pramenech, kde rozkládají organické látky klesající ke dnu. Bakterie termofilní mohou být striktně termofilní (stenotermofilní), nerostou pod 30 °C a fakultativně termofilní (eurytermofilní) s optimem růstu 45 – 55 °C. Mezi těmito skupinami jsou bakterie mezofilní s optimem růstu mezi 20 – 40 °C (Straškrabová 1996).

Teplota vody se mění během celého roku a její výkyvy sledují bakterie velmi přesně. V zimě je bakteriální biomasa výrazně nižší než v létě. Důvodem je rychlejší a efektivnější zpracování substrátu za vyšší teploty. Teplé vody jsou tedy většinou bohaté na živiny a jsou velmi produktivní. Naopak menší počet bakterií lze pozorovat ve studených oligotrofních jezerech (Wetzel 1983).

1.3. Role mikrobiální smyčky v přenosu živin

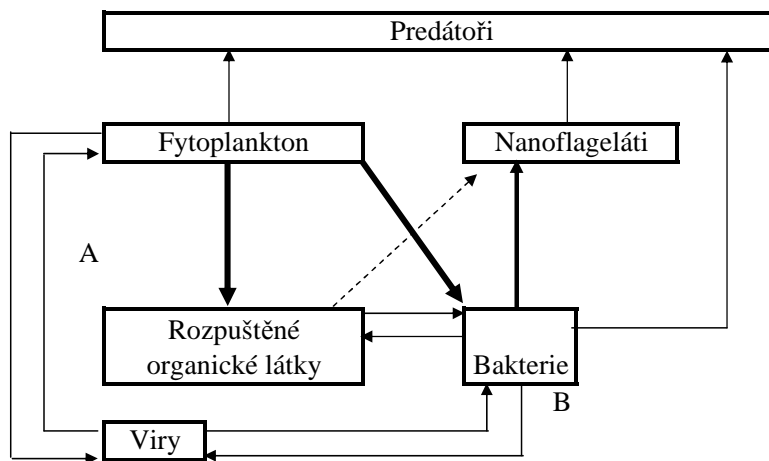
Mikrobiální smyčka hraje zásadní a primární roli v obratu živin ve vodním prostředí (Azam a kol. 1983, Straškrabová a kol. 1996). Významný podíl mají zejména její nejmenší složky, a to díky rychlému obratu (< 24 hod). Bakterie využívají rozpuštěné látky a přenášejí je do vyšších trofických úrovní – prvoci, mikrozooplankton, makrozooplankton. V modelovém systému jsou dostupné živiny efektivně „odstraněny“ z rozpuštěné formy a převedeny do biomasy a výše (Obrázek č.1).

Hlavní procesy ovlivňující koloběh živin, množství a složení vodního mikrobiálního společenstva jsou regulace predací „top-down“ a regulace zdroji „bottom-up“ řízení (Kalff 2002). První vysvětluje vztahy mezi trofickými úrovněmi pomocí predančního tlaku vyšších trofických úrovní na nižší. Druhé řízení naopak závisí na dostupnosti živin v prostředí. Obecně platí, že „top-down“ řízení má výraznější dopad na složení mikrobiálního společenstva než „bottom-up“ (Weisse 1991).

Nejčastějšími predátory bakterií jsou prvoci (Šimek a kol. 1990). V planktonu početně dominují heterotrofní bičíkovci (2-8 µm) a nálevníci (druhy < 20 µm) (Šimek a Straškrabová 1992, Šimek a kol. 1995). Obě skupiny jsou schopné v přirozených podmínkách zkonsumovat více než 90 % bakteriální produkce (~ 70 % bičíkovci, ~ 20 % nálevníci) (Šimek a kol. 1997). V experimentech s filtrátem < 5 µm byli bičíkovci krátkodobě zodpovědní za mortalitu až 200 % bakteriální produkce (Šimek a kol. 2001). Predace prvoky je nejen velikostně selektivní

záležitost (Šimek a Chrzanowski 1992), ale ovlivňuje i diverzitu bakteriálního společenstva, neboť prvoci pohlcují zejména aktivní buňky (Šimek a kol. 2006), sinice nevyjímaje (Šimek a kol 1997).

Také viry jsou nyní zařazovány do současných schémat mikrobiálního potravního řetězce, neboť obsahují značné množství fosforu a významnou mírou se podílejí na mortalitě bakterií (Wommack a Colwell 2000). Mortalita bakterií způsobená viry se odhaduje na 17 – 60 % celkové bakteriální mortality (Wommack a Colwell 2000, Šimek a kol. 2001). Viry navozená mortalita bakterií a její dopad na složení (nejen) bakteriálního společenstva lze charakterizovat pomocí tzv. modelu „zabij vítěze!“ („Kill-the-winner“), podle kterého je nejrychleji rostoucí druh výrazně omezen virovou lyzí (Thingstad a Lignell 1997).



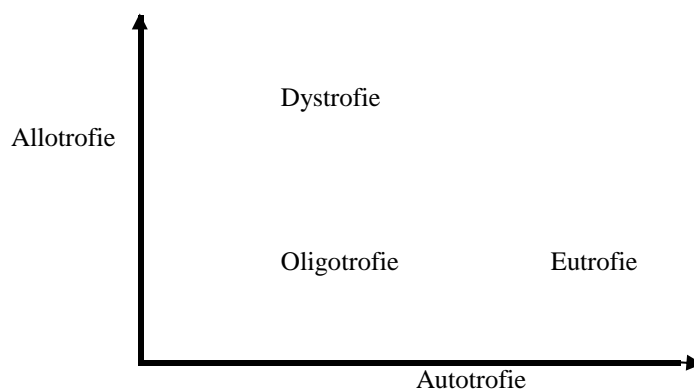
Obrázek č.1 Znárodnující mikrobiální smyčku. Šipky mezi jednotlivými organismy či DOC znázorňují toky uhlíku. „A“ představuje virovou infekci řas a „B“ virovou infekci bakterií. Po jejich lyzi (odumření) se pak uvolňují rozpuštěné organické látky a fragmenty buněk. Růst malých bičíkoců (nanoflagelátů) je ovlivněn zejména množstvím bakterií a jejich dostupností. Produktivita bičíkoců, řas a bakterií určuje toky uhlíku k predátorům (převzato z Sigeo 2005).

1.4. Eutrofizace našich vod

1.4.1. Rozdělení vod podle množství a původu živin (trofie)

Trofie neboli česky úživnost jezer, nádrží či rybníků je dle Wetzela (1983) definována jako poměr organické hmoty dodávané jezerem či do jezera za jednotku času. Přísun organických látek může být allochtonní (nepůvodní jezeru) – pocházející z povodí a různých mokřadů, či

autochtonní (jezerem vyprodukovaný) – nejčastěji odvozován od primární produkce řas. Dle vzájemného poměru těchto dvou zdrojů lze jezera dělit na několik typů (Graf 1).



Graf 1. Typy vod dělené dle zdroje organických látek (převzato z Wetzel 1983)

Každý typ je pak charakterizován množstvím živin, především koncentrací fosforu (Wetzel 1983), jak ukazuje tabulka č.2. Fosfor se do vodního prostředí dostává z atmosférické depozice a odtoku z povodí, a to především díky antropogenním vlivům. Další zdroj představuje uvolňování ze sedimentů. Koncentrace se pak liší v závislosti na typu vodního ekosystému, geologických a klimatických podmínkách. Nízké koncentrace jsou především v horských oblastech s krystalinickým podložím, oproti tomu vysoké lze najít v dolních částech toků a v oblastech se sedimentárními horninami. V nekontaminovaných přírodních systémech je koncentrace fosforu v rozmezí od 10 – 50 $\mu\text{g l}^{-1}$, existují však i extrémy s hodnotou vyšší jak 200 $\mu\text{g l}^{-1}$ a to v alpských jezerech s dlouhou dobou zdržení (Hejzlar 2003).

Typ	Celkový fosfor ($\mu\text{g l}^{-1}$)
Ultra-oligotrofní	< 5
Oligo-mesotrofní	5 - 10
Meso-eutrofní	10 – 30
Eutrofní	30 – 100
hypertrofní	> 100

Tabulka č.2. Charakteristické hodnoty fosforu pro jednotlivé typy trofie vod (Wetzel 1983).

Podle Kočího a kol. (2000) se hodnoty mírně liší, nejde však o žádný zásadní rozdíl.

Jednotlivé typy sladkovodních systémů se liší také složením mikrobiálního společenstva. Zastoupení různých druhů řas a sinic v našich vodách se liší dle úživnosti vodních těles

(Tabulka č.3). Z řas se nejčastěji ve znečištěných vodách můžeme setkat se zástupci oddělení *Euglenophyta* (Wetzel 1983).

1.4.2. Lidskou činností navozená eutrofizace a její důsledky

V dnešní době dochází k zvýšenému přísunu živin do vod především z komunálních odpadních vod, fosfátů z hnojiv a polyfosforečnanů z pracích prášků. Žádný z těchto zdrojů není přírodě vlastní, jedná se o allochtonní zdroj, a tak lze hovořit o umělé eutrofizaci vod (Kočí a kol. 2000). Ani limitace dusíkem není nijak výrazná díky vysokým koncentracím dusičnanů, které v našich vodách stále stoupají (Straškraba 1998). Tento nadměrný přísun živin zcela mění poměr základních složek vod. Klasický Redfieldův poměr je zde posunut ve prospěch fosforu, což přispívá k výraznému zvýšení růstu řas a především sinic. Tento jev lze často pozorovat u hospodářsky využívaných rybníků, kdy je poměr měněn záměrně pro získání větší výtěžnosti rybníků (Kočí a kol. 2000).

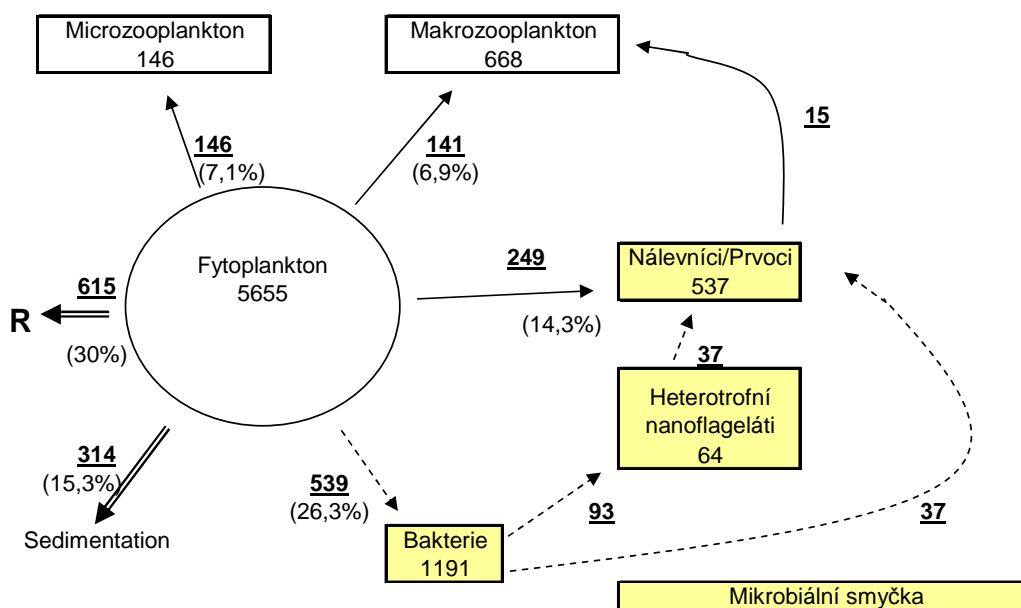
Trofie	Vlastnosti vody	Dominantní řasy
Oligotrofní	mírně kyselé, velmi nízká salinita	Krásivky <i>Staurodesmus</i> , <i>Staurostrum</i>
	neutrální až mírně zásadité, chudé na živiny	Rozsivky, <i>Cyclotella</i> a <i>Tabelaria</i>
	neutrální až mírně zásadité, chudé na živiny či více produktivní v období snížení dostupnosti živin	Zlativky, <i>Dinobryon</i> , některé <i>Mallomonas</i>
	neutrální až mírně zásadité, chudé na živiny	Chlorokální řasy, <i>Oocystis</i> či <i>Chrysophyceae</i> , <i>Botryococcus</i>
	neutrální až mírně zásadité, obecně chudé na živiny, často mělká Artická jezera	Obrněnky, zvláště <i>Peridinium</i> a <i>Ceratium spp.</i>
Mesotrofní či eutrofní	neutrální až mírně zásadité, celoročně dominantní, v eutrofních vodách v určitém období	Obrněnky, některé <i>Peridinium</i> a <i>Ceratium spp.</i>
Eutrofní	zásadité, obvykle bohaté na živiny	Rozsivky převážná část roku, zvláště <i>Asterionella spp.</i> , <i>Fragilaria crotonensis</i> , <i>Synedra</i> , <i>Stephanodiscus</i> a <i>Melosira granulata</i>
	zásadité, obvykle bohaté na živiny, časté v teplých dobách temperátní zóny či stále v živinami obohacených vodách tropů	Sinice, zvláště <i>Anacystis (Microcystis)</i> , <i>Aphanizomenon</i> , <i>Anabaena</i>

Tabulka č.3. Zastoupení různých skupin řas v různě úživných vodách (převzato z Wetzel 1983)

Změna Redfieldova poměru přináší s sebou změnu celého vodního ekosystému. Nárůst řas a sinic způsobuje výkyvy kyslíkového režimu den/noc. V noci velké množství řas „prodýchá“ velké množství kyslíku, což mnohdy vede až k anoxickým podmínkám (Kočí a kol. 2000). Koncentrace CO₂ v noci tedy stoupá, čímž klesá pH. Ve dne jsou podmínky opačné a pH může opět prudce stoupnout, což napomáhá sinicím, které na rozdíl od ostatního fytoplanktonu takové pH snesou (Sigeo 2005). Ekosystém se tak stává sice produktivní, ale druhově chudý (Begon a kol. 1997). Ve stádiu pokročilé eutrofizace se tak ve vodě hromadí mrtvá hmota. V noci dokonce může při snížení koncentrace kyslíku dojít i k úhynu ryb. Rozklad mrtvých těl potřebuje další kyslík a podmínky se zhoršují, v tomto stádiu převažují procesy hnilobné (Kočí a kol. 2000).

Eutrofizace přispívá k výraznému zhoršení kvality vody ať už hnilobnými procesy nebo výskytem toxinů produkovaných sinicemi (Kočí a kol. 2000). Takto zasažená vodní tělesa neplní svou funkci zásoby pitné vody ani funkci rekreační, neboť cyanotoxiny způsobují závažná onemocnění jater, trávicího traktu, různé alergie a dermatitidy (Pitter 1999). Následkem velké koncentrace řas a sinic dochází také k sekundárním problémům, jako je ucpávání filtrů ve vodárenských provozech, zhoršení organoleptických vlastností upravené vody, vzniku sekundárního mikrobiálního znečištění při rozkladu organismů v rozvodné síti či k uvolňování hygienicky nepřijatelných látek do vody (Kočí a kol 2000).

1.4.3. Změna fungování mikrobiální smyčky



Obr.č.2 *Pelagiální potravní řetězec během vodního květu. Hlavní proudy uhlíku jsou znázorněny šipkami. Pelagiální potravní řetězec má dvě hlavní komponenty - klasický potravní řetězec (šipky plné) a mikrobiální smyčku (šipky přerušované). Celková biomasa (mg C m^{-2}) je vepsána u daných skupin v jejich rámečku a pod šipkou ukazující směr proudu uhlíku je přeměna biomasy ($\text{C m}^{-2} \text{ d}^{-1}$). Velké R představuje respiraci. Jak můžeme vidět největší přeměna biomasy je právě ve směru fytoplankton – bakterie, přičemž tyto mají hned po fytoplanktonu i největší biomasu. Vzhledem k velkému růstovému potenciálu bakterií můžeme tedy předpokládat jejich důležitou roli v ekosystému (převzato z Sigea 2005).*

Vodní květ v anglické literatuře zmiňovaný jako „Algal bloom“ se objevuje v našich podmínkách v létě, díky zvýšenému přísunu světla a tepla. Tyto podmínky umožňují vyšší růst řas, především jednobuněčných s průměrem okolo $0,9 \mu\text{m}$, a sinic (Sigea 2005). Řasy mohou být však napadeny parazity, kterými jsou nejčastěji bakterie, fykomyceční houby a viry. Tento parazitizmus bývá významnější v eutrofních vodách, ale zatím o tom není mnoho známo (Wetzel 1983). Růst řas a sinic je závislý nejen na míře parazitizmu výše zmíněných organismů ale i na rozpuštěném fosforu a dusíku. Pokud se poměr N:P zvýší dochází k limitaci fosforem a rychlému úbytku biomasy řas a sinic. V této poslední fázi je největší rozvoj heterotrofních bakterií (Wetzel 1983).

Většina uhlíku během „kvetení vody“ prochází tzv. mikrobiální smyčkou. Bakteriální biomasa hraje při tomto významnou roli. Její množství odpovídá až 20% biomasy řas, roste však rychleji než biomasa řas a je tak největší biomasou heterotrofních organismů (Sigea 2005), jak můžeme vidět na obrázku č.2.

1.4.4. Řasy a sinice v procesech eutrofizace

Za standardních podmínek je růst řas následován růstem zooplanktonu a nakonec i růstem ryb. Pokud dochází k eutrofizaci, řasy a sinice se shlukují do kolonií, které jsou pro zooplankton již nepohltitelné. Také dochází ke snížení průhlednosti, což způsobuje snížení schopnosti piscivorních ryb ulovit kořist. Profitují tak ryby živící se zooplanktonem. Zooplankton je v eutrofních vodách potlačen a dochází tak k většímu nárůstu biomasy řas a sinic a posunu v jejich složení. Sinice navíc produkují toxiny výrazně inhibující zooplankton. Pokud je přísun živin stále zvýšený, růst řas a sinic se stává nekontrolovatelný (Sigea 2005).

V této fázi hraje významnou roli poměr dusíku a fosforu (N:P), jak naznačuje tabulka č.4. Pokud dojde ke snížení molárního N:P pod 16, je růst řas limitován dusíkem a začnou převládat sinice, na základě jejich jedinečné schopnosti fixovat plynný dusík (Kalff 2002). Pomocí

enzymu nitrogenáza a svých speciálně adaptovaných buněk zvaných heterocyty zajišťují vodnímu ekosystému 1% z celkového přísunu dusíku do vody (Kaštovský a kol. 2003). Fixace dusíku sinicemi je podmíněna schopností fotosyntézy, která zajišťuje dostatek energie pro tento proces. To znamená, že fixace je závislá na světle a tudíž se mění s hloubkou jezera (Wetzel 1983).

Úroveň trofie	inorg N	celkový N	celkový P	TN:TP	chlorofyl a
Oligotrofní	< 200	< 350	< 10	< 27	< 3,5
Mesotrofní	200-400	350-650	10-30	~ 25	3,5-9
Eutrofní	300-650	650-1200	30-100	~17	9-25

Tabulka č. 4 Koncentrace fosforu, dusíku, poměr TN:TP a koncentrace chlorofylu a v různých úživných systémech. Hodnoty jsou udávány v $\mu\text{g l}^{-1}$, TN:TP (mol mol^{-1}) (převzato z Kalff 2002).

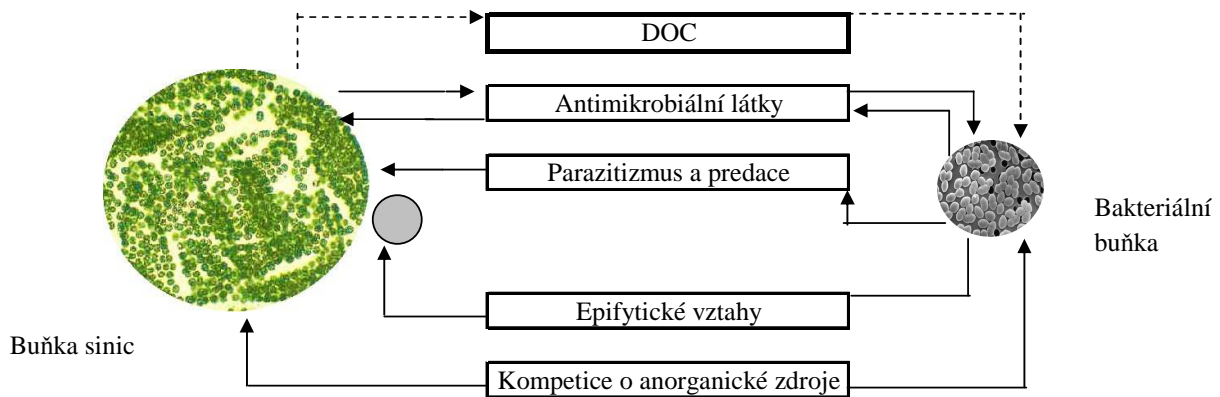
1.4.5. Interakce sinice/řasy a bakterie

Vzájemná interakce sinic a bakterií může být různá. K negativním vztahům patří predace, kompetice, parazitizmus či bakteriální produkce antimikrobiálních látek inhibujících růst sinic (Sigeo 2005). Zvláštní případ je jakási vzájemná „přidruženost“, kterou zmiňuje Salomon a kol. (2003). Tímto jevem se zabýval i Brunberg (1999), který upozorňuje na stejnou dynamiku sinic a bakterií k nim přidružených s tím, že bakterie přidružené k sinicím však vykazují menší aktivitu než bakterie v období bez sinicového květu (Horňák a kol. 2008).

Některé bakteriální rody produkující antimikrobiální látky mohou způsobit i lýzu sinic (Sigeo 2005). Antimikrobiálními látkami působícími negativně na růst sinic se zabýval i Yamamoto a kol. (1993), který mimo jiné přišel na účinky látek produkovaných skupinou Betaproteobacteria, konkrétně *Alcaligenes*, způsobujících lýzu sinic rodu *Microcystis*. Vztahy mezi sinicemi obecně a bakteriemi jsou znázorněny na obrázku č.3.

Dále byla také pozorována kompetice mezi bakteriemi a řasami především o fosfor. Bylo dokázáno, že přítomnost řas napomáhá růstu bakterií (Peréz a Sommaruga 2006), neboť pro bakterie je limitace DOC, který jim řasy poskytují, podstatnější jak limitace fosforem. Ovšem přítomnost bakterií limituje růst řas, zvláště v případě limitace fosforem. Pokud je dostatek světla, řasy v experimentu dominují (Sterner a Elser 2002). Sigeo (2005) tvrdí, že při limitaci fosforem a v prostředí chudém na živiny jsou kompetičně schopnější bakterie. Currie (1990) rozvíjí tuto myšlenku též a poukazuje tak na vzájemnou kontrolu fytoplanktonu a bakterií.

Bakterie a sinice se však mohou vzájemně stimulovat i k růstu. Například je dokázáno, že vyšší nitrogenázová aktivita sinic je podmíněna výskytem bakterií kolem heterocyt (Wetzel 1983). Princip je založen na určité protichůdnosti fyziologických pochodů sinic. Fixace a fotosyntéza jsou v podstatě dva neslučitelné děje, neboť uvolňovaný kyslík z fotosyntézy je toxický pro enzym nitrogenáza umožňující fixaci dusíku (Kaštovský a kol. 2003). Bakterie přichycené u heterocyt spotřebovávají kyslík produkovaný řasami, a tím vytváří mikro-anoxické podmínky na povrchu heterocyt, čímž zvyšují aktivitu nitrogenázy.



Obr.č.3 Znáznornění vztahů mezi buňkou sinic a bakterií (převzato z Sige 2005)

1.5. Řešení antropogenní eutrofizace

1.5.1. Dlouhodobé řešení

Jediným opravdu dlouhodobým řešením, je zamezit přísunu látek způsobujících umělou eutrofizaci do povodí. Tyto látky jsou vždy antropogenního původu a do celého ekosystému se dostávají například z hnojení polí či používání pracích prášků a jiných detergentů (Kočí a kol. 2000). Další možností je využití moderních technologií při čištění odpadních vod před jejich vypouštěním do životního prostředí (např. zavedení terciárního čištění odpadních vod) (US-EPA – United states-Environmental protection agency). Využití této metody je dnes již v praxi možné, avšak pouze na velkých čističkách (Kočí a kol. 2000). Takovéto odstraňování limitujících nutrientů je možné u tzv. externího přísunu, který můžeme ovlivnit technologickými zásahy nebo změnou hospodaření v povodí. Nicméně i kdybychom toto dokázali, fosfor bude v nádrži zůstat i po následující desetiletí, což je způsobeno interním cyklem fosforu v nádrži, kdy se fosfor nashromážděný v sedimentech zpětně uvolňuje do vody (Klouček a Vaverová 2005).

1.5.2. Krátkodobá řešení projevů/dopadů

Na řešení postupující eutrofizace existuje několik možných přístupů. Patří mezi ně například australský postup s názvem „PhosLock“, který je již dnes komerčně dostupný (Kočí a kol. 2000). Tento přípravek pracuje na principu přeměny fosfátu na nerozpustný apatit. Běžně se též používají polymerní iontoměniče, které ovšem mají svá omezení. Jedním z nich je rozsah pH, ve kterém lze přípravek aplikovat (Blaney a kol. 2007). Chemických možností je mnoho, je jimi ku příkladu využívání železitých či hlinitých solí, sedimentující vločky však ovlivňují plankton (Klouček a Vaverová 2005).

Existují ovšem i mechanické metody, kterak zlepšit kvalitu vody v eutrofizované nádrži. Jedním takovýmto přístupem je provzdušňování neboli aerace hypolimnia. Slouží především k destratifikaci, čímž se řasy a sinice dostávají do větších hloubek, kde již pro ně není dostatek světla a hynou, nebo výrazně zpomalí svůj růst. Existují různá provzdušňovací zařízení, ale většinou mají buď vysoké náklady nebo nedostačující výkonnost (US-EPA – United states-Environmental protection agency). Jiným řešením je odstranění sedimentu obsahující fosfor. Většinou se však odstraní celá vrstva sedimentu i s aktivní vrstvičkou a navíc těžká technika naruší okolí nádrže. Metoda odstranění makrofyt, ať už kosením nebo zvýšením počtu herbivorních ryb má také svá úskalí. První přístup je časově náročný, druhý představuje výrazný zásah do vodního ekosystému. Mezi efektivní metody patří použití algicidů ovšem pouze v případě, že ošetřujeme vodní plochu, která není využívána rekreačně ani jako zdroj pitné vody (US-EPA – United states-Environmental protection agency).

1.5.3. Aplikace biologických přístupů

Přírodě blízké jsou metody využívající biologické manipulace, které lze použít pouze v závislosti na chemických, fyzikálních a biologických faktorech vody (Sigeo a kol. 1999). Nejčastěji používanou metodou je snížení biomasy ryb živících se planktonem, čímž docílíme zvýšení biomasy zooplanktonu a snížení biomasy fytoplanktonu. Ovšem i toto je nemalý zásah do vodního ekosystému. Budoucnost řešení eutrofizace je v biomanipulacích na mikrobiální úrovni. Velmi nadějným se jeví výzkum založený na cyanofágických virech, které zcela specificky vyloučí sinice ve vodním květu. Těchto virů je však objeveno velmi málo a navíc prakticky žádný není specificky zaměřený na sinice tvořící vodní květ (Sigeo 2005). Lze použít i bakterie, které vylučují lytické enzymy způsobující rozpad sinic a řas. Jedná se například o rody *Bacillus* či *Flexibacter*, které způsobují zcela nespecifickou lýzu fytoplanktonických buněk. Potenciál řešení eutrofizace bakteriemi tak doposud skýtá skupina *Myxococcus*, která je

schopna rychle vyhledat kořist, rychle ji strávit, rychle vytvořit biomasu a přežít i za nedostatku potravy (Sigeo 2005).

1.6. Bakteriální rod *Limnohabitans* a jeho důležité ekofyziologické vlastnosti

Jak již bylo zmíněno, kontrola vodního květu bakteriemi skýtá velký potenciál, avšak dosavadní bakteriální kontrola spočívala převážně v predaci. Možností však zůstává i využití silné kompetice s růstově velmi kompetitivními bakteriemi. Právě takový je rod *Limnohabitans* (Kasalický a kol. 2009). Jedná se o novou sladkovodní skupinu, která představuje nové možnosti v regulaci rozvoje sinic. Rod *Limnohabitans* vykazuje vysokou rychlost příjmu organických i anorganických substrátů a rychle reaguje na změny podmínek, jako je například přísun fosforu (Šimek a kol. 2006). Tyto vlastnosti se samozřejmě ukazují jako efektivní konkurenční výhoda, neboť i své ztráty při přirozené predaci či umělé manipulaci nahrazuje velmi rychle (Šimek a kol. 2005).

Limnohabitans byl izolován z mezo-eutrofní vodárenské nádrže Římov v Jihočeském kraji, Česká republika. Ve starších článcích byl označován jako člen klastru R-BT065 (bakterií detekovatelných stejnojmennou oligonukleotidovou próbou). Životní strategie této skupiny spočívá ve využívání aerobního metabolismu, je však schopna příležitostně slabě růst i v podmínkách anaerobních, což tedy znamená, že se jedná o fakultativního anaeroba (Kasalický a kol. 2009). Ekologická valence teploty *Limnohabitans sp.* se pohybuje v rozmezí od 4 – 34 °C (Kasalický a kol. 2009), jedná se tedy o mezofilní bakterie. Buňky *Limnohabitans sp.* jsou gram negativní, většinou malé až střední velikosti. Jejich tvar se různí od klasických koků přes drobná vibria různého zakřivení až po nepřilíš dlouhé tyčinky. Jsou nepigmentované, nepohyblivé a vždy bez přítomnosti bičíků (Kasalický a kol. 2009).

Rod *Limnohabitans* představuje velmi důležitou skupinu, jakožto jedna z klíčových komponent určující dynamiku bakterioplanktonu nádrže (Šimek a kol. 2005). V pokusech provedených Šimkem a kol. (2006) byl tento rod z *Betaproteobacteria* nejčastější kořistí prvoků, což se zkoumalo pomocí hybridizace in situ potravních vakuol prvoků. Je to pravděpodobně vázáno na fakt, že nemá žádné obranné mechanismy proti predaci prvoků (Šimek a kol. 2005). Ztráty však nahrazuje mimořádně rychle, neboť reaguje na jakékoli manipulace v krátkém čase (Šimek a kol. 2005). Další výzkum, který se zabýval vztahem řas a bakterií, provedli Péréz a Sommaruga (2006), kteří poukázali na fakt, že produkce heterotrofních bakterií stoupá

s rozpadem řas. Nejúspěšnější skupinou v tomto experimentu byla právě skupina R-BT065, která po třech dnech pokusu byla dominantní (Peréz a Sommaruga 2006).

Tento rod je zajímavý při úvahách o indikaci změn dostupnosti substrátů v ekosystému, což by mohlo být v budoucnu využito i při indikaci procesů eutrofizace vod. Navíc naše laboratoř vlastní unikátní izoláty rodu *Limnohabitans* z eutrofních i mezo-eutrofních vod. Naše předběžné výsledky naznačují, že pH má pozitivní vliv na bakterie hybridizované proubou R-BT065.

2. Význam a uspořádání experimentu

2.1. Význam experimentu pro studium procesů v životním prostředí

Eutrofizace a výskyt vodního květu je velmi aktuálním problémem, který má výrazné hospodářské a ekonomické důsledky a může ohrožovat i lidské zdraví (Kočí a kol. 2000). Plánované pokusy jsou postaveny tak, aby přinesly informace o chování studované skupiny *Limnohabitans sp.* v eutrofních systémech a o možných vztazích této skupiny s toxickými sinicemi. V budoucnu tyto poznatky mohou přinést nové možnosti kontroly kvality vod. V případě pozitivních výsledků bude bakteriální rod *Limnohabitans* zajímavým studijním objektem díky jeho předpokládané významné kompetiční schopnosti, která by mohla snížit zřejmou úspěšnost sinic „roztočením mikrobiální smyčky“ a následnou změnou poměru C:N:P, kdy dojde ke zvýšení limitace fosforu pro sinice.

2.2. Cíle a uspořádání experimentů

Navržené experimenty přinesou detailnější znalosti o chování sladkovodních bakterií rodu *Limnohabitans* v eutrofních vodách. Budeme sledovat tuto významnou skupinu v laboratorních i přirozených podmínkách na úrovni izolátů. Vycházíme z potvrzené hypotézy o vlivu pH z terénní studie a budeme zkoumat jeho další vliv na růstovou rychlost studované bakteriální skupiny. Dále nás bude zajímat vztah studovaného bakteriálního rodu a sinice *Microcystis*, který by dle předpokladu měl být antagonistický. Tento laboratorní pokus bude následován terénním, který navíc přinese zajímavé informace o diurnální dynamice rodu *Limnohabitans* v eutrofních vodách, kde dochází k výrazným rozdílům v chemických i fyzikálních podmínkách mezi dnem a nocí. K získání exaktních výsledků celého plánovaného experimentu budou použity moderní metody molekulární biologie v kombinaci s metodami klasickými.

2.3. Předběžné výsledky

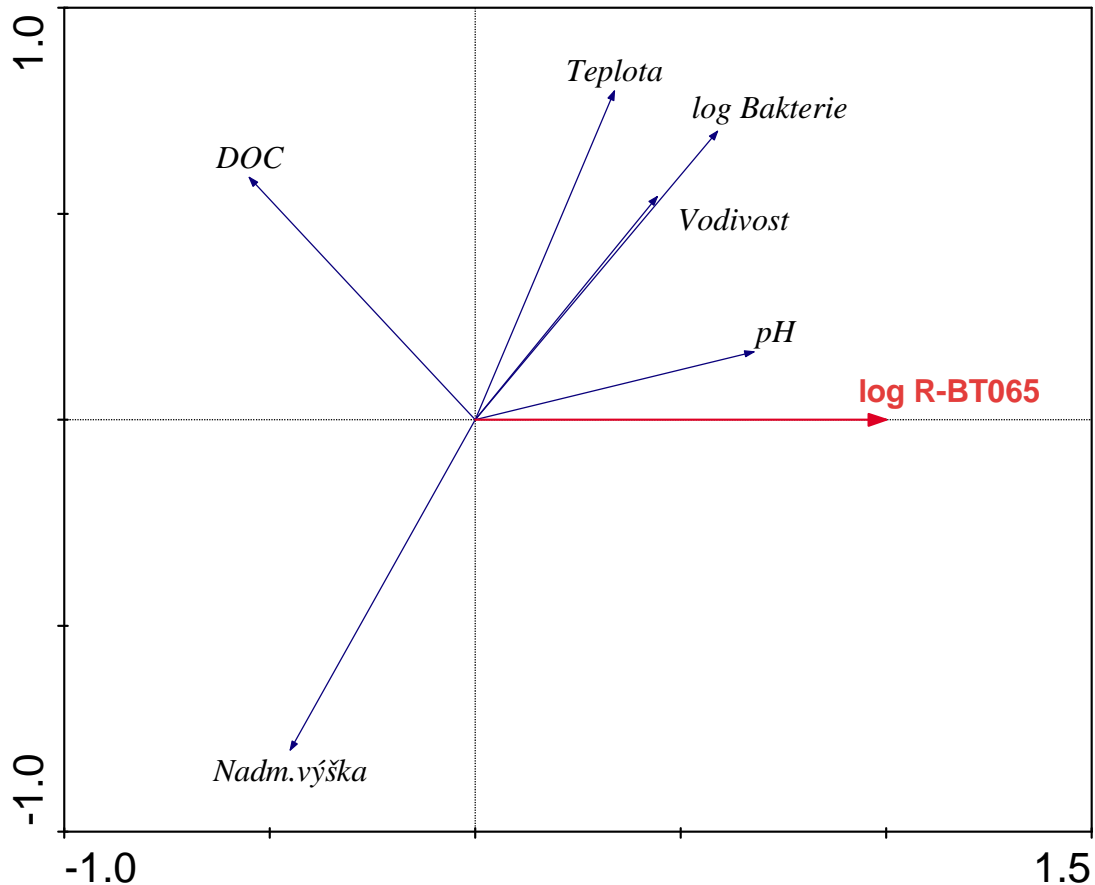
Predběžné výsledky vycházejí z práce o rozšíření bakterií klastru R-BT065 ve sladkovodních ekosystémech (Šimek a kol. nepublikovaná data). Během šesti měsíců od 15.4. do 17.10. 2008 byla sbírána data o fyzikálních, chemických faktorech a abundanci rodu *Limnohabitans* z 34 lokalit. Lokality byly vybírány tak, aby se jednalo o nehnojené vodní plochy, které nejsou intenzivně obhospodařovány, které jsou typově podobné, přesto dostatečně heterogenní pro získání široké stupnice hodnot a koncentrací daných fyzikální, chemických i mikrobiálních faktorů.

Studované faktory byly testovány jednoduchou lineární regresí, jejíž výsledky zobrazuje tabulka č.5. Data obsahující početnost bakterií z klastru R-BT065 (rod *Limnohabitans*) byla zlogaritmována, neboť hodnoty se různily o dva až tři řády. Stejná transformace byla provedena i pro tzv. log Bakterie, který představuje počet heterotrofních bakterií po odečtení počtu bakterií rodu *Limnohabitans*.

Faktor	p-hodnota	R ²
pH	<0.001	0.460
Log Bakterie	<0.001	0.335
DOC	<0.001	0.302
Nadm.vyska	0.008	0.202
Vodivost	0.009	0.196
Teplota	0.050	0.115
C/P	0.133	0.069
NO ₃ ⁻	0.193	0.053
Průhlednost	0.256	0.040
NH ₄ ⁺	0.531	0.011
Kyslík (mg/l)	0.753	0.003
RRP	0.810	0.002
Chlorofyl a	0.819	0.002

Tabulka č.5 Výsledky lineární regrese log-početnosti rodu *Limnohabitans* s fyzikálními, chemickými a mikrobiologickými parametry lokalit. Průkazné výsledky jsou vyznačeny zeleně. NH₄⁺ (amoniový iont), NO₃⁻ (dusičnany), RRP (reaktivní rozpuštěný fosfor), chlorofyl-a, kyslík, průhlednost ani C/P (poměr uhlíku ku fosforu) pro mnohorozměrnou analýzu dat použity nebyly. Počet lokalit je 34.

Průkazné výsledky (5% hladina významnosti) z lineární regrese jsem dále zpracovala mnohorozměrnou analýzou dat v programu CANOCO, neboť jeho vizuální výstupy jsou velmi názorné (Graf č.2). Jako „species data“ pro program CANOCO byly zadány chemické, fyzikální a mikrobiální faktory naměřené na vybraných lokalitách. Jako „environmental data“ pro program CANOCO byla zadána množství bakterií rodu *Limnohabitans*. Data byla zpracována přímou lineární metodou RDA, kdy jsem centrovala i standardizovala přes „druhy“, neboť jednotlivé faktory jsou v různých jednotkách a měřítkách. Monte-Carlo permutační test byl proveden se 499 permutacemi a jeho p-values vyšla rovna 0,0020, F- ratio pak bylo 11,86. První (v podstatě také jediná) kanonická osa vysvětlila 27 % variability.



Graf č.2 Výsledek pokusu vlivu různých faktorů na abundanci rodu *Limnohabitans* v programu CANODraw ($n = 34$).

Hodnota pH je opravdu pozitivně korelována s abundancí rodu R-BT065, což potvrzuje základní předpoklad o jejich úzkém vztahu. Tento vztah je dokonce ze všech sledovaných vlivů nejužší, neboť úhel svírající šipky rodu *Limnohabitans* a pH je nejmenší v celém grafu. Zda pH neutrální či jeho zvýšené hodnoty vyhovují přímo skupině R-BT065, či je ovlivňuje pH prostřednictvím složení DOC (Šimek a kol. nepublikovaná data), je potřeba ještě prozkoumat. Velmi nízké hodnoty pH mohou také ovlivnit růst prvoků jakožto predátorů R-BT065 a tudíž i složení bakterioplanktonu a potom i fungování celé mikrobiální smyčky.

3. Cíle a hypotézy testované experimentem

(I) Sledování změn růstové rychlosti a maximální dosažené biomasy izolátů rodu *Limnohabitans* v závislosti na počátečním pH v laboratorních podmínkách.

Hypotéza 1: pH v rozmezí 4 – 10 pozitivně ovlivňuje rychlost růstu a abundanci rodu *Limnohabitans*. Předběžné výsledky ukazují, že se početnost studovaného rodu v přirozeném systému mění s hodnotou pH. Při nízkém pH okolo 4 dosahovalo množství buněk *Limnohabitans* v předběžných experimentech hodnot $0,17 \cdot 10^3$ buněk ml^{-1} , zatímco při vyšším pH 8,9 byla početnost studovaného rodu až $14,8 \cdot 10^3$ buněk ml^{-1} .

(II) Sledování změn růstové rychlosti a maximální dosažené biomasy izolátů rodu *Limnohabitans* v závislosti na množství sinic rodu *Microcystis*.

Hypotéza 2: Vztah mezi bakteriemi rodu *Limnohabitans* a sinicemi rodu *Microcystis* je antagonistický. Výsledky terénního pokusu Horňáka a kol. (2008) poukazují na nižší početnost a aktivitu této bakteriální skupiny v souvislosti s výskytem vodního květu *Microcystis aeruginosa*.

(III) Sledování diurnální dynamiky rodu *Limnohabitans* v eutrofním systému

Hypotéza 3: Přítomnost extracelulárních látek produkovaných fytoplanktonem a diurnální změny pH ovlivňují abundanci rodu *Limnohabitans*. Studovaný rod vykazuje pozitivní reakce na přítomnost exudátů řas (Šimek a kol. nepublikovaná data) a na zvýšené hodnoty pH (Předběžné výsledky).

4. Design pokusů a použité metody

4.1. Design experimentu

4.1.1. Design

- Společné rysy navrhovaných experimentů

Pro laboratorní pokusy použijeme kultury planktonních bakterií rodu *Limnohabitans* a sinice rodu *Microcystis* izolované z eutrofních a mezo-eutrofních systémů. Růstová odpověď bakteriálních izolátů studované skupiny bude studována v triplikátech pro pokusy laboratorní (1), (2) i pro pokus v terénních podmínkách (3). Změny v abundanci studovaných bakterií a sinic budou monitorovány 4-5 dní v 8 hodinových intervalech, zatímco pro růstovou odpověď na různé pH budou odběry častější. Pokusy budou probíhat jako vsádková kultivace. Terénní pokus se uskuteční během 24 hodin v dialyzačních pytlíkách, které umožňují zásobení živinami, ale zamezují průniku organismu z okolí. Odběr bude probíhat každých šest hodin.

(1) Růstová odpověď izolátů z rodu *Limnohabitans* na gradient počátečního pH

Plánovaný pokus ukáže, jak se mění růstová rychlost rodu *Limnohabitans* v závislosti na počátečním pH. V erlenmayerových baňkách s běžně používaným kultivačním médiem NSY (3 g/l organických látek) (Hahn a kol. 2004) bude připraven gradient pH od 4 do 10 po 0,5 bodu pH. Počáteční pH bude sledováno po celou dobu pokusu. Do každé baňky bude převeden stejný počet buněk skupiny *Limnohabitans*.

(2) Vztah rodu *Limnohabitans* a sinic rodu *Microcystis*

Pokus se zabývá studiem vzájemné interakce bakteriální skupiny *Limnohabitans sp.* a kultur toxických sinic *Microcystis*. Kultivace proběhne v uměle vytvořených podmínkách eutrofizace. Do vysterilizované vody z vybraného eutrofního rybníka bude převedeno dané množství studovaných bakterií i přečištěné kultury sinic. Zatímco množství bakterií bude v každém pokusu stejné, odpovídající eutrofnímu systému, množství sinic se bude lišit. Takto připravené kultivační láhve se ponechají při laboratorní teplotě s přístupem dostatku denního světla a budou třikrát za den zamíchány.

(3) Diurnální dynamika skupiny *Limnohabitans* v eutrofních vodách

Plánovaný terénní pokus napomůže objasnit situaci ohledně diurnálních změn v početnosti rodu *Limnohabitans* v přírodním eutrofním systému, kde ve dne díky intenzivní fotosyntéze dochází ke zvýšení pH a v noci díky dýchání pH opět klesá. K tomuto účelu bude vybrán jeden

z intenzivně obhospodařovaných rybníků, kde dochází k eutrofizaci záměrně. Na začátku a na konci experimentu bude zjištěno složení mikrobiálního společenstva (zooplankton, fytoplankton, bakterioplankton). Triplikáty dialyzačních pytlíků obsahující buňky *Limnohabitans* budou nasazovány postupně po šesti hodinách s tím, že předchozí bude vyjmut. Každý pytlík tak bude ve vodě 6 hodin. Při každém novém nasazení pytlíku bude měřeno pH, teplota a množství kyslíku ve vodě. Zároveň budou odebrány vzorky pro chemickou analýzu.

4.1.2. Časový harmonogram experimentu

Pracovní plán činností pro roky 2009 - 2011	mírná aktivita		vysoká aktivita	
	2009	2010	2011	
Úloha a načasování				
Izolace a kultivace				
Příprava a realizace pokusu vliv gradientu pH				
Vyhodnocování pokusu vliv gradientu pH				
Příprava a realizace pokusu <i>Limnohabitans</i> x <i>Microcystis</i>				
Vyhodnocování pokusu <i>Limnohabitans</i> x <i>Microcystis</i>				
Příprava a realizace pokusu denní dynamika <i>Limnoh.</i>				
Vyhodnocování pokusu denní dynamika <i>Limnoh.</i>				
Zpracování výsledků				
Příprava manuskriptu				

4.1.3. Finanční náročnost experimentu

	Náklady (tis. Kč)
Spotřební materiál	130
Oligonucleotidové próby (CARD-FISH)	30
SYBR Green I (průtoková cytometrie)	15
MicroBeads (průtokovou cytometrie)	10
Dialyzační membrány	30
Filtry 0.2 µm (Durapore)	25
Kultivační media a chemikálie	10
Drobný spotřební materiál	10
Služby (chemický rozbor vody)	8
Cestovné (ČR)	2
Mzdy a odměny	10
Celkem	150

4.2. Použité metody

4.2.1. Metody použité k mikrobiálnímu rozboru vzorků

- CARD-FISH - Catalyzed Reporter Deposition- Fluorescence In Situ Hybridization pro detekci rodu *Limnohabitans* v přírodních vzorcích (Sekar a kol. 2003)
- Epifluorescenční mikroskopie k zjišťování abundance bakterií (např. Šimek a kol. 2001)
- Průtoková cytometrie k zjištění abundance bakterií (Gasol a kol. 2000)
- Přímé počítání v mikroskopu ke zjištění složení zooplanktonu (McCauley 1984)
- Technika počítání buněk v Utermöhlově sedimentační komůrce pro zjištění složení fytoplanktonu (Javornický 1958)

4.2.2. Metody použité k zjištění chemických a fyzikálních vlastností vody

- Potenciometrické měření pH sondou WTW
- Ampérometrické měření kyslíku sondou WTW
- Manometrické stanovení BSK přístrojem WTW
- Spektrofotometrické stanovení celkového fosforu – TP, rozpuštěného reaktivního – RRP (Kopáček a Hejzlar 1993)
- Stanovení celkového uhlíku – TC, rozpuštěného organického uhlíku – DOC analyzátozem Shimadzu TOC-5000A
- Speotrofotometrické stanovení dusičnanů (Yang a kol. 1998)
- Stanovení celkového dusíku poloautomatizovanou kolorimetrií (O'Dell 1993)
- Spektrofotometrické stanovení chlorofylu a (Holm-Hansen a Reimann 1978)

4.2.3. Metody ke zpracování výsledků

- program statistica - dvoucestná ANOVA (Beranová 2008)
- program CANOCO – přímé metody (Ter Braak a Šmilauer 1998)

4.3.Řešitelé a jejich kompetence

Kateřina Pěchotová (hlavní řešitelka) – bakteriální kultivace, fluorescenční mikroskopie, statistické metody, zpracování výsledků, příprava manuskriptu, 50 % pracovní náplně

Mgr. Vojtěch Kasalický – mikrobiální kultivace, fotosyntéza řas a sinic, fluorescenční mikroskopie, CARD-FISH, 30 % pracovní náplně

RNDr. Karel Horňák, Ph.D – CARD-FISH, průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie, 20 % pracovní náplně

5. Dostupné vybavení

Na Hydrobiologickém ústavu AVČR jsou čtyři dobře vybavené laboratoře. Jedna pro práci s radioizotopy, další pro molekulární techniky, třetí pro izolaci a kultivaci bakterií a čtvrtá pro kultivaci a analýzy fytoplanktonu.

Přístroje: fluorescenční mikroskopy – BX-60, dva polo či plně automatizované – AX-70 PROVIS, & Nikon-90i), dva systémy pro analýzu obrazu LUCIA D a LUCIA G/F, hybridizační a kultivační boxy, základní vybavení pro techniky DGGE, PCR atd., průtokový cytometr FACSCalibur BD, FLUOROMAX-3 spektrofluorometr dostupný

6. Shrnutí

Navrhovaný projekt se zabývá tematikou vlivu pH a eutrofizace na abundanci nově objevené bakteriálního rodu *Limnohabitans*. Tato skupina je zcela výjimečná svými růstovými schopnostmi, které ji činí velice kompetičně schopnou. Jak ukazují dosavadní studie, jedná se především o schopnost rychlé reakce na změnu podmínek a rychlá tvorba biomasy, což jí dává velmi významnou roli v mikrobiální smyčce. Nesmíme opomenout ani vliv organických látek produkovaných fytoplanktonem na početnost této skupiny. Naplánované pokusy vycházejí z předběžných výsledků, které potvrzují hypotézu o pozitivním vlivu pH na početnost rodu *Limnohabitans* v přirozených systémech. Experimenty jsou postaveny tak, aby přinesly podrobnější informace o růstové rychlosti izolovaných bakterií ze studované skupiny v závislosti na změně pH, o její interakci s toxickými sinicemi z eutrofních systémů a též o diurnální dynamice rodu *Limnohabitans* přímo v reálném systému eutrofizovaného rybníka. Použitím moderních molekulárních metod, se kterými má naše laboratoř dlouholeté zkušenosti, budeme schopni sledovat nejdůležitější studované parametry rodu *Limnohabitans*.

Naším cílem je zjistit základní informace o vztahu růstu rodu *Limnohabitans* ve vysoce eutrofních systémech s častým výskytem toxických sinic, což je dnes velmi aktuální téma. Tyto znalosti v budoucnu mohou přispět k přirozenému řešení problémů našich eutrofních vod, kde studovaná skupina může hrát klíčovou roli v kompetici o živiny se sinicemi.

7. Citovaná literatura

- Amann, R., Glöckner, F., O., Neef, A.** (1997) Modern methods in subsurface microbiology: in situ identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiol Rev* 20: 191–200.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, G., J., Gray, J., S., Meyer-Reil, L., A., Thingstad, F.** (1983) The ecological role of water column microbes in the sea. *Mar Ecol Prog Ser* 10:257 - 263.
- Begon, M., Harper, J., L., Townsend, C., R.** (1997) *Ekologie : jedinci, populace a společenstva*, Vydavatelství Univerzity Palackého, 949 pp.
- Beranová Petra** (2008) *Stručný manuál k ovládání programu STATISTICA*, StatSoft CR s.r.o., 16 pp.
- Blaney, L., M., Cinar, S., SenGupta, A., K.** (2007) Hybrid anion exchanger for trace phosphate removal from water and wastewater. *Water research* 41:1603 - 1613.
- Brunberg, A., K.** (1999) Contribution of bacteria in the mucilage of *Microcystis* spp. (Cyanobacteria) to benthic and pelagic bacterial production in a hypereutrophic lake. *FEMS Microbiol Ecol* 29: 13 - 22.
- Currie D.J.** (1990) Large-scale variability and interactions among phytoplankton, bacterioplankton and phosphorus. *Limnol Oceanogr* 35: 1437 - 1455.
- Eiler, A., Bertilsson, S.** (2007) Flavobacteria blooms in four eutrophic lakes: Linking population dynamics of freshwater bacterioplankton to resource availability. *Appl Environ Microbiol* 73:3511 - 3518.
- Gasol, J.M. a Del Giorgio, P.A.** (2000) Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Sci Mar* 64: 197 - 224.
- Hahn, M., W., Stadler, P., , L., W., Pöckl, M.** (2004) The filtration – acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. *J Microbiol Meth* 57: 379 - 390.
- Hahn, M., W., Pöckl, M., Wu, Q., L.,** (2005) Low intraspecific diversity in a *Polynucleobacter* subcluster population numerically dominating bacterioplankton of a freshwater pond. *Appl Environ Microbiol* 71: 4539 - 4547.
- Hahn, M., W.** (2006) The microbial diversity of inland waters. *Curr Opin Biotechnol* 17: 256-261.
- Hartman, P., Příkryl, I., Štědranský, E.** (1998) *Hydrobiologie*, Praha : Informatorium, 335 pp.
- Hejzlar, J.** (2003) *Koloběh fosforu v nádržovém ekosystému*, České Budějovice, 23 pp.
- Holm – Hansen, O., Reimann, B.** (1978) Chlorophyll a determination: improvements in methodology. *Oikos* 30: 438 - 447.
- Hornák, K., Jezbera J., Šimek, K.** (2008) Effects of a *Microcystis aeruginosa* bloom and bacterivory on bacterial abundance and activity in a eutrophic reservoir. *Aquat. Microb. Ecol.* 52 (2): 107 - 117.
- Javornický, P.** (1958) *Revise některých metod pro zjišťování kvantity fytoplanktonu (Revision of some methods for the phytoplankton quantity estimation)*. Scientific Paper 2, Faculty of Technology of Fuel and Water, Institute of Chemical Technology, Prague, 283–367 pp.

- Kalač, P., Tříška, J. (1998)** Chemie životního prostředí, České Budějovice : Zemědělská fakulta Jihočeské univerzity, 147 pp.
- Kalff, J. (2002)** Limnology. Prentice-Hall, Inc., USA, 592 pp.
- Kasalický, V., Jezbera J., Šimek, K., Hahn, M.W.** (submitted IJSEM 2009) *Limnohabitans planktonicus* gen. nov., sp. nov., and *Limnohabitans parvus* sp. nov., two novel planktonic Betaproteobacteria isolated from freshwater reservoir.
- Kaštovský, J., Hauer, T., Lukavský, J. (2003 – 2009)**
<http://www.sinicearasy.cz/134/Cyanobacteria> .
- Klouček, V., Vaverová, I. (2005)** Lake restoration. Rekultivace eutrofizovaných nádrží metodou srážení fosforu hlinitými solemi. Vodní Hospodářství 4: 97 - 98.
- Kočí, V., Burkhard, J., Maršálek, B. (2000)** Eutrofizace na přelomu tisíciletí. Eutrofizace 2000, Praha, 3-13.
- Kopáček, J., Hejzlar, J. (1993)** Semi-micro determination of total phosphorus in fresh waters with perchloric acid digestion. Intern J Environ Anal Chem 53: 173 - 183
- Kopáček, J., Hejzlar, J., Kaňa, J., Porcal P. (2001)** Faktory ovlivňující chemismus šumavských jezer. Aktuality šumavského výzkumu 63 - 66.
- Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M. & Schleifer K.-H. (1992)** Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. Syst Appl Microbiol 15: 593 - 600.
- McCauley, E. (1984)** The estimation of abundance and biomass of zooplankton in samples . In: Downing, J., A., Rigler, F., H. (eds) A manual on methods for assessment of secondary productivity in fresh waters, Blackwell, Oxford, 228 - 266 pp.
- O'Dell, J., W. (1993)** Determination of total Kjeldahl nitrogen by semiautomated kolorimetry, National Environmental Methods Index, <http://www.nemi.gov>.
- Percent, S., F., Fischer, M., E., Vescio, P., A., Duffy, E., B., Milano, V., McLellan, M., Stevens, B., M., Boylen, Ch., W., Nierzwicki – Bauer, S., A. (2008)** Bacterial community structure of acid – impacted lakes: What controls diversity? Appl Environ Microbiol 3: 1856 - 1868.
- Peréz, M., T., Sommaruga, R. (2006)** Differential effect of algal- and soil-derived dissolved organic matter on alpine lake bacterial community composition and activity. Limnol Oceanogr 51: 2527–2537.
- Pitter, P. (1999)** Hydrochemie, Praha : Vydavatelství VŠCHT, 568 pp.
- Rappe, M., S., Giovannoni, S., J. (2003)** The Uncultured Microbial Majority. Annu Rev Microbiol 57: 369 - 394.
- Salomon, P., S., Janson, S., Granuli, E. (2003)** Molecular identification of bacteria associated with filaments of *Nodularia spumigena* and their effect on the cyanobacterial growth. Harmful Algae 2: 261 - 272.
- Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Warnecke, F., Posch, T., and Amann, R. (2003)** An improved protocol for quantification of freshwater Actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. Appl Environ Microbiol 69: 2928 - 2935.

- Sigee, D., C., Glenn, R., Andrews, M., J., Bellinger, E., G., Butler, R., D., Epton, H., A., S., Hendry, R., D.** (1999) Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities. *Hydrobiol* 396: 161-172.
- Sigee, D., C.** (2005) *Freshwater microbiology : biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment*, Chichester : Wiley, 524 pp.
- Sterner, R., W., Elser, J., J.** (2002) *Ecological stoichiometry : the biology of elements from molecules to the biosphere*, Princeton : Princeton University Press, 439 pp.
- Straškraba, M.** (1998) *Obecná limnologie*, České Budějovice : Biologická fakulta Jihočeské univerzity, 81 pp.
- Straškrabová, V. a kolektiv autorů** (1996) *Mikrobiální ekologie vody*, Praha : Ministerstvo životního prostředí ČR, 119 pp.
- Šimek, K., Macek, M., Sed'a, J., Vyhnálek, V.** (1990). Possible food chain relationships between bacterioplankton, protozoans, and cladocerans in a reservoir. *Int Rev Gesamten Hydrobiol* 75: 583 - 596.
- Šimek, K., Chrzanowski, T., H.** (1992) Direct and indirect evidence of size-selective grazing on pelagic bacteria by freshwater nanoflagellates. *Appl Environ Microbiol* 58: 15 - 3720.
- Šimek, K., Straškrabová, V.** (1992) Bacterioplankton production and protozoan bacterivory in a mesotrophic reservoir. *J Plankton Res* 14:773 - 787.
- Šimek, K., Bobková, J., Macek, M., Nedoma, J., Psenner, R.** (1995) Ciliate grazing on icoplankton in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton maximum: a study at the species and community level. *Limnol Oceanogr* 40: 1077 - 1090.
- Šimek, K., Hartman, P., Nedoma, J., Pernthaler, J., Vrba J, Springmann, D., Psenner, R.** (1997) Community structure, picoplankton grazing and zooplankton control of heterotrophic nanoflagellates in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton maximum. *Aquat Microb Ecol* 12: 49 - 63.
- Šimek, K., Pernthaler, J., Weinbauer, M., G., Horňák, K., Dolan, J., R., Nedoma, J., Mašín, M., Amann, R.** (2001) Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Appl Environ Microbiol* 6: 2723 - 2733.
- Šimek, K., Horňák, K., Jezbera, J., Mašín, M., Nedoma, J., Gasol, J.M., Schauer, M.** (2005) Influence of top-down and bottom-up manipulations on the R-BT065 subcluster of β -proteobacteria, an abundant group in bacterioplankton of a freshwater reservoir. *Appl Environ Microbiol* 71: 2381 - 2390.
- Šimek, K., Horňák, K., Jezbera, J., Nedoma, J., Vrba, J., Straškrabová, V., Macek, M., Dolan, J.R., Hahn, M.W.** (2006) Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environ Microbiol* 8: 1613 - 1624.
- Ter Braak C., J., F., Šmilauer, P.** (1998) *CANOCO Reference manual and user's guide to Canoco for windows*, Microcomputernpower Ithaca, USA, 352 pp.
- Tezuka, Y.** (1990) Bacterial regeneration of ammonium and phosphate as affected by the carbon:nitrogen:phosphorus ratio of organic substrates. *FEMS Microbiol Ecol* 19:227 - 238.
- Thingstad, T., F., Lignell, R.** (1997) Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *Aquat Microb Ecol* 13, 19 - 27.

- US-EPA**, The Lake and Reservoir Restoration Guidance Manual, EPA-440/4-90-006.
- Vrba, J.** (1992) Seasonal extracellular enzyme activities in decomposition of polymeric organic matter in a reservoir. *Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol* 37: 33 - 42.
- Weisse, T.** (1991) The annual cycle of heterotrophic freshwater nanoflagellates: role of bottom-up and top-down control. *J Plankton Res* 13:167-185.
- Wetzel, R., G.** (1983) *Limnology*, Forth Worth : Saunders College Publishing, 767 pp.
- Wommack, K., E., Colwell, R., R.** (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 69 - 114.
- Yamamoto, Y., Niizuma, S., Kurda, N., Sakamoto, M.** (1993) Occurrence of heterotrophic bacteria causing lysis of cyanobacteria in a eutrophic lake. *Jpn J Phycol* 41: 215 - 220.
- Yang, J., E., Kim, J.,J., Skogley, O., E., Schaff, B., E.** (1998) A simple spectrophotometric determination of nitrate in water, resin and soil extracts. *Soil Sci Soc Am J* 62:1108 - 1115.
- Znachor, P., Vrba, J., Nedoma, J., Kopáček, J.** (2005) Bacterial and phytoplankton responses to nutrient and pH changes during short term in situ experiments in two acidified lakes. *Algological Studies* 115: 79 - 99.
- Zwart, G., Crump, B.,C., Kamst – van Agterveld, M., Hagen, F., Han S.** (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microb Ecol* 28: 141 - 155.
- Zwart, G., van Hannen, E. J., Kamst-van Agterveld, M. P., Van der Gucht, K., Lindström, E. S., Van Wichelen, J., Lauridsen, T., Crump, B. C., Han, S.-K., Declerck, S.** (2003) Rapid screening for freshwater bacterial groups by using reverse line blot hybridization. *Appl Environ Microbiol* 69: 5875 - 5883.