

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



**Diurnální změny frakcí fosforu ve vertikálním profilu
mikrobiálního nárostu: vliv kyslíku a pH**

Magisterská diplomová práce

Petra Mošnerová

2009

Vedoucí práce: RNDr. Jakub Borovec, Ph.D.

MOŠNEROVÁ P., DIURNÁLNÍ ZMĚNY FRAKCI FOSFORU VE VERTIKÁLNÍM PROFILU MIKROBIÁLNÍHO NÁROSTU: VLIV KYSLÍKU A PH (DIURNAL CHANGES OF PHOSPHORUS FRACTIONS IN THE VERTICAL PROFILE OF A MICROBIAL MAT: THE EFFECT OF OXYGEN AND PH) 47 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The aim of this work was to verify sediment phosphorus (P) fractionation methodology for application in microbial mats. Laboratory cultivation of microorganisms was used to test initial doubt about the use of the method. Mats sampled in freshwater marshes in Belize form significant ecosystems endangered by eutrophication and subsequent macrophyte constraint, where P is a driving force. Determination of diurnal changes in fractions of phosphorus was based on measurements of different distribution of phosphorus fractions in the vertical profile of day and night samples of microbial mats.

Čestně prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

.....
V Českých Budějovicích, 29. dubna 2009

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat Jakubu Borovcovi za vynaložené úsilí při přípravě a zavádění nových metod a za precizní přístup k získaným výsledkům. Děkuji Dagmarě Sirové za náměty z odlišného úhlu pohledu. Dále děkuji svým rodičům a ostatním váženým příbuzným za neocenitelnou pomoc při studiu, svému příteli Vášovi Kotilovi za nekonečnou optimistickou náladu a všem ostatním, kteří ke vzniku této práce jakkoli přispěli.

Práce vznikla při řešení grantových projektů: AVOZ 60170517, GA ČR 206/09/1764, NAZV QH81012, MSM 60076658/01, MSM 6007665801

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	2
2.1 Mikrobiální nárosty	2
2.2 Sinicové nárosty	2
2.3 Základní složky sinicových nárostů	3
2.3.1 Autotrofní složka	3
2.3.2 Heterotrofní složka	3
2.3.3 Neživá složka	4
2.4 Fyzikálně-chemické gradienty v mikrobiálních nárostech	7
2.4.1 Světlo	7
2.4.2 Rozpuštěný kyslík (DO)	8
2.4.3 pH	8
2.5 Prostorové uspořádání a cykly prvků v nárostu	8
2.5.1 Prostorové uspořádání a interakce organismů v CBM	9
2.5.2 Limitující faktory	10
2.5.3 Cykly prvků v nárostu	10
2.6 Možnosti rozdělení P a princip frakcionace P	13
3. Cíle předkládané diplomové práce	15
4. Metodika	16
4.1 Ověření analytických metod	16
4.2 Zavedení metody frakcionace P v biomase mikroorganismů	17
4.2.1 Pěstování pokusných kultur	17
4.2.2 Promývání biomasy mikroorganismů	18
4.2.3 Výběr koncentrace $MgCl_2$ a přídavek Ca	18
4.2.4 Kinetika frakcionace P	19
4.3 Odběr a zpracování vzorků mikrobiálních nárostů	19
4.3.1 Popis lokality	19
4.3.2 Zpracování vzorků po odběru	20
4.4 Vybrané schéma frakcionace P a jeho modifikace	20
4.5 Chemické analýzy	22
5. Výsledky	23
5.1 Ověření analytických metod	23
5.2 Zavedení metody frakcionace P v biomase mikroorganismů	23
5.2.1 Stechiometrie růstu kultur	23
5.2.2 Promývání biomasy mikroorganismů	24
5.2.3 Kinetika frakcionace P	24
5.2.4 Frakcionace P v biomase pokusných kultur	25
5.3 Souhrnné charakteristiky sinicových nárostů	27
5.3.1 Koncentrace DO, pH a teplota	27
5.3.2 Obsah NL, ZŽ a celkové obsahy vybraných prvků	28
5.3.3 Obsah sacharidů v EPS	30
5.4 Frakcionace P v sinicových nárostech	30
5.4.1 Obsah VRP, NRP, RRP	30
6. Diskuze	33
6.1 Ověření analytických metod	33
6.2 Zavedení metody frakcionace P v biomase mikroorganismů	33
6.2.1 Stechiometrie růstu kultur	33
6.2.2 Promývání biomasy mikroorganismů	34
6.2.3 Kinetika frakcionace P	34
6.2.4 Frakcionace P v biomase pokusných kultur	35
6.3 Srovnatelnost vzorků nárostů	36
6.4 Frakcionace P v sinicových nárostech	36
6.5 Srovnání výsledků pro nárosty se sedimenty	38
7. Závěr	41
8. Seznam použité literatury	42
9. Přílohy	47

1. Úvod

Pojmy „microbial biofilm“ (v češtině mikrobiální biofilm) a „microbial mat“ (bude označován jako „mikrobiální nárost“ (MM)) by neměly být zaměňovány. Biofilm je strukturované společenstvo mikroorganismů obklopené vlastními extracelulárními polymerními produkty, které přisedá k živému nebo inertnímu podkladu. Mikrobiální nárost je užší pojem pro makroskopicky viditelné mnohvrstevné bentické společenstvo mikroorganismů (Stal & Caumette, 1994).

Mikroorganismy tvořící nárosty mohou zřejmě osidlovat většinu ekosystémů na Zemi, ale pro vytvoření MM musí mít možnost shlukování a dostatečné akumulace biomasy, které v normálním prostředí většinou brání tlak spásání (Stal, 1995). Proto se mohou MM vyvíjet zejména v nehostinných podmínkách, kde je růst a přežití mezo- a makrofauny omezen (Jørgensen et al., 1983). Další tlak na MM vytvářejí vyšší rostliny, které je mohou z ekosystému vykompetovat limitací světlem (Thomas et al., 2006).

Proto jsou dnes MM rozšířené v mnoha ekosystémech, které jsou považovány za extrémní, např. pobřežní přílivové sedimenty, zasolená jezera, termální vývěry, suché pouštní oblasti a antarktická jezera (Stal, 1995). Mikrobiální nárosty byly 1. doloženými ekosystémy na počátku vývoje Země, a proto jsou studovány jako modelové systémy pro pochopení strukturních a funkčních adaptací na extrémní podmínky a dokonce se zvažuje možnost jejich přežití na jiných planetách (Paerl et al., 2000).

Studované MM tvoří v severním Belize významnou složku oligotrofních mokřadních ekosystémů a představují významné zdroje biologické diverzity s vysokým stupněm endemizmu (Rejmánková et al., 2004). Stále se rozvíjející hospodářství a eutrofizace dané oblasti bohužel způsobuje jejich úbytek (King et al., 1992), a proto je nutné zavést patřičný management ochrany území, zjistit vztahy mezi organizmy a jejich limitace (Rejmánková et al., 2004). Jako hlavní faktor určující dominanci určité skupiny primárních producentů je ve studované oblasti fosfor (P) a jeho nadbytečný přísun do systému by mohl způsobit kompetitivní vyloučení MM buď hustým společenstvem makrofyt nebo fytoplanktonu (Rejmánková & Komárková, 2000). Je proto důležité zjistit podrobnosti o množství P, distribuci, přeměnách a dostupnosti jednotlivých forem P pro organizmy (Noe & Childers, 2007).

2. Literární přehled

2.1 Mikrobiální nárosty

Mikrobiální nárosty jsou pozoruhodně samostatné ekosystémy v milimetrovém měřítku, a přesto významně ovlivnily environmentální procesy v celoplanetárním měřítku (Des Marais, 2003). Tyto nárosty jsou přímými potomky nejstarších biologických společenstev, u kterých se pravděpodobně vyvinula první oxygenní fotosyntéza a pomáhají nám porozumět důvodům sdružování mikroorganismů za účelem regulace dynamických biogeochemických gradientů (Des Marais, 2003).

Životu na Zemi dominují mikroorganismy celkovou biomasou, aktivitou, využitím území a délkou přítomnosti na Zemi. Mikroorganismy jsou nezbytné pro regeneraci energie a prvků v uzavřených systémech a spíše než izolovaně žijí ve složitých společenstvech, jakými jsou i MM (Paerl & Pickney, 1996).

Mikrobiální nárosty lze rozlišit na několik typů podle dominantních mikroorganismů. Heterotrofní nárosty jsou dominovány houbami nebo bakteriemi zatímco v autotrofních nárostech převládají rozsivky nebo sinice. Všechny MM mají širokou taxonomickou a fyziologickou diverzitu ovlivněnou vertikálními biogeochemickými gradienty (Paerl et al., 2000).

2.2 Sinicové nárosty

Sinicové nárosty (přesněji „cyanobacterial mats“ (CBM)) jsou sdružená bentická společenstva prokaryotních organismů, ve kterých tvoří sinice hlavní stavební složku (Jørgensen et al., 1983). Tyto společenstva reprezentují první a často jediné organismy žijící v daných extrémních biotopech a z důvodu výrazné diverzity prostředí se vlastnosti a druhové složení jednotlivých CBM také velmi liší (Paerl et al., 2000).

Odlíšná společenstva mikroorganismů se často v CBM vyskytují vertikálně stratifikovaná a jednotlivé vrstvy se liší svým zbarvením díky různým pigmentům přítomných mikroorganismů. Další typ pozorovatelné vertikální stratifikace CBM může být způsoben různými růstovými nebo sezónními výkyvy, protože aktivní CBM váží částice sedimentu nebo srážejí přítomný uhličitán vápenatý (CaCO_3) (Stal, 1995).

Mnoho studií bylo věnováno CBM v NP Everglades (Florida, USA) (např. Vymazal et al., 1994; McCormic & O'Dell, 1996; McCormick & Scinto, 1999; Noe & Childers, 2007), které se svými vlastnostmi velmi blíží studovaným nárostům z mokřadů Belize. Ve

zkoumaných vápenatých oblastech NP Everglades byla zjištěna velmi nízká koncentrace dostupného P způsobená zřejmě jeho koprecipitací a adsorpcí na přítomný CaCO₃ (Scinto & Reddy, 2003). Mezi dominantní rody sinic v tomto systému patřily *Scytonema* a *Schizothrix* (McCormick et al., 1996).

Sinicovým nárostům v mokřadech severního Belize bylo věnováno méně pozornosti (Rejmánková & Komárková, 2000; Rejmánková et al., 2004; Sirová et al., 2006). Studované CBM se nacházejí ve vápencových oblastech severního Belize, kde život organismů limituje extrémní hydrologie, dostupnost živin a salinita. Nízký tlak spásání umožňující rozvoj CBM v tomto prostředí může být způsoben nízkou koncentrací dostupných živin (Rejmánková & Komárková, 2000). Rejmánková & Komárková (2000) dále mikroskopicky zjišťovaly taxonomické složení nárostů odebraných ve zkoumané oblasti Belize. Výsledkem je zastoupení pěti skupin sinic: (1) *Leptolyngbya spp.*, (2) *Phormidium spp.*, (3) *Oscillatoria spp.*, (4) *Chroococales* a (5) *Nostocales* a *Stigonematales*. Dále vzorky obsahovaly několik druhů rozsivek, ale jejich početnost byla zanedbatelná.

2.3 Základní složky sinicových nárostů

V komplexních ekosystémech CBM utváří několik různých skupin organismů strukturní a funkční jednotky (Stal, 2001). Základními složkami CBM jsou autotrofní a heterotrofní organizmy a neživá authigenní a allogenní hmota (apatity, uhličitany, „extracellular polymeric substances“ (EPS)).

2.3.1 Autotrofní složka

Sinice jsou jako primární producenti ve většině CBM základem mikrobiálních potravních sítí. Mají typicky prokaryotní morfologii buněk, ale jako jediné prokaryotické organizmy provozují oxygenní fotosyntézu podobnou rostlinné se dvěma propojenými fotosystémy (Stal, 1995). V CBM s extrémními výkyvy environmentálních podmínek mohou sinice plně využívat své metabolické a adaptační možnosti (Cohen & Rosenberg, 1989).

Významnou výhodou sinic je jejich pozoruhodně všestranný metabolismus. Z nejčastější oxygenní fotosyntézy mohou některé druhy sinic změnit metabolismus na typicky bakteriální anoxygenní fotosyntézu, při které využívají sírany jako donory elektronů (Stal, 1995). Některé druhy sinic mohou žít heterotrofně a jiné jsou dokonce schopné provádět anoxickou fermentaci. Sinice jsou úspěšné v široké škále různých biotopů také díky odolnosti proti vysušení a toleranci vysoké salinity vody (Stal, 1995).

V CBM mohou být v menší míře zastoupeny i eukaryotické řasy.

2.3.2 Heterotrofní složka

Přestože fotosyntetizující mikroorganismy mohou v CBM dominovat svou biomasou a produktivitou, mnohé vlastnosti společenstva bývají způsobeny aktivitou doprovodných nefotosyntetizujících mikroorganismů (Des Marais, 2003). Významnou složkou studovaných CBM jsou heterotrofní bakterie (D. Sirová, ústní sdělení).

Aktivita sinic a aerobních heterotrofních bakterií způsobuje, že jsou horní vrstvy CBM biologicky neaktivnější prostředí v cyklu uhlíku (C). Ve dne jsou tyto vrstvy přesyceny kyslíkem zatímco v noci zde převažují anoxické podmínky kvůli oxidaci fermentativních produktů sinic heterotrofními bakteriemi a produkci sulfidů. Heterotrofní bakterie dále zpracovávají komplexní uhlíkaté sloučeniny z odumřelých buněk sinic (Stal, 1995).

Mikroorganismy schopny heterotrofního příjmu částic mohou požírat jiné mikroorganismy nebo jejich extracelulární produkty. Decho et al. (2005) zjistil, že velká část (40 – 60 %) nově produkovaných extracelulárních produktů je velmi rychle (do 12 h) rozložena přítomnými heterotrofními mikroorganismy. Spásání CBM mnohobuněčnými živočichy mění primární produktivitu, strukturu a biomasu nárostů a dále může snižovat diverzitu a početnost mikroorganismů v nárostu (Farmer, 1992). Intenzivní spásání CBM bezobratlými živočichy většími než několik milimetrů může v daném prostředí zabránit jejich vzniku (Des Marais, 2003).

2.3.3 Neživá složka

Hlavní součástí matrixu CBM je voda, která může někdy tvořit až 97 % jeho hmotnosti (Zhang et al., 1998). Mikroorganismy v CBM jsou obklopeny produkty buněčných procesů (EPS, enzymy, atd.), částicemi nepřímo vzniklými působením jejich metabolismu (authigenní uhličitany) a allogenními látkami pocházejícími z okolní vody, atmosféry nebo sedimentů (Dupraz & Visscher, 2005).

Authigenní uhličitany

Ve vápencových oblastech Karibiku utváří fotosyntetická aktivita CBM a vysoký obsah rozpuštěných anorganických látek ve vodě příznivé podmínky (vysoké pH, nízký parciální tlak CO₂) pro srážení CaCO₃ (Gleason & Spackman, 1974). Chemické změny v CBM vyvolané měnicemi se metabolickými reakcemi mění alkalinitu prostředí a podporují

tedy buď srážení nebo rozpouštění uhličitanů. Při hodnocení role metabolismu mikroorganismů na srážení uhličitanů musí být zvažena produkce a/nebo spotřeba DIC mikroorganismy a změna pH při různých metabolických reakcích (Visscher & Stolz, 2005).

Srážení CaCO_3 by mělo být chápáno jako výsledek rovnováhy jeho rozpouštění a srážení, která je propojená s rovnováhou mezi fotosyntézou a respirací (Pickney & Reid, 1997). Složení a krystalová struktura sraženin uhličitanů utvořených CBM je ovlivněna podmínkami prostředí a druhovým složením nárostu (Dupraz & Visscher, 2005).

Extracelulární polymerní látky

Extracelulární polymerní látky (EPS), tedy směs polysacharidů vylučovaná přítomnými mikroorganismy, může tvořit 50 až 90 % obsahu celkového organického uhlíku v CBM (Flemming et al., 2000). Většina sinic se obklopuje vnějšími vrstvami polymerních látek v podobě slizu, schránek a pouzder (Weckesser & Jürgens, 1988), avšak pouze schránky a slizy jsou přítomny ve velkém množství (De Philippis et al., 2001).

Zvýšená tvorba EPS může být odpovědí na určité stresové podněty (Sutherland, 2001a). Množství syntetizovaného EPS je závislé na dostupnosti uhlíkatého substrátu a jiných limitujících živin. Nadměrné množství dostupného uhlíkatého substrátu za současné limitace živinami (jako je P a N) podporuje syntézu EPS (Sutherland, 2001a). Decho et al. (2005) zjistil, že v MM s vysokou fotosyntetickou produkcí stoupá i produkce EPS. Jednotlivé vrstvy MM se významně liší v množství a rychlosti rozkladu a produkce EPS (Decho et al., 2005). Největší produkce EPS během dne odpovídá období největší intenzity fotosyntézy, ale nadměrné ozáření povrchových vrstev pravděpodobně působí fotoinhibičně (Leverenz et al., 1990).

Složení EPS se dynamicky mění v závislosti na vnitřních i vnějších faktorech. Vnitřní faktory vychází z genetického profilu přítomných mikroorganismů. Vnější faktory zahrnují fyzikálně-chemické vlastnosti okolního prostředí, které jsou nevyhnutelně ovlivněny transportem rozpuštěných látek a jejich difúzními gradienty (Sutherland, 2001a). Typické EPS z nárostů je složeno z polysacharidů, lipidů, proteinů a heteropolymerů jako jsou lipopolysacharidy a glykoproteiny (Decho, 1990). Watanabe et al. (2006) zjistil pomocí polysacharidové analýzy extracelulárního obalu zelené řasy *Chlorella sorokiniana* zastoupení sacharózy (největší podíl), galakturonové kyseliny, xylitolu, inositolu, ribózy, manózy, galaktózy, arabinózy, rhamnózy a fruktózy. Složení a struktura polysacharidů určuje primární konformaci EPS a některé polysacharidy mohou podporovat přilnavost buněk (Sutherland,

2001a). Z kovů, které určují viskozitu extracelulárního obalu, byla zjištěna přítomnost kationtů Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} a Mn^{2+} (Watanabe et al., 2006). Role proteinů v EPS není zcela objasněna, ale Emerson & Ghiorse (1993) uvádí, že propojování bílkovinných vláken může pomáhat udržet spojitou strukturu EPS.

Makromolekuly v EPS jsou neutrální, ale většina EPS má záporný náboj díky přítomnosti uronových kyselin (největší podíl mají kyseliny glukuronová, galakturonová a manurová) a pyruvátu (Sutherland, 2001a). De Philippis et al. (2001) zjistil, že až 90 % polymerů ve studovaném EPS obsahovalo uronové kyseliny kromě dalších nabitých skupin (jako jsou sírany a zbytky pyruvátu), což způsobovalo vysokou hustotu záporného náboje na makromolekulách.

Polymery v EPS mohou tvořit strukturní součásti buněk nebo jsou k buňce připojeny tak slabě, že difundují do okolí a mohou sloužit jako zdroj potravy pro jiné organizmy (Stal, 1995). K povrchu buněk je EPS vázáno pomocí vodíkových můstků, hydrofobních a elektrostatických interakcí a fosfolipidy jsou ukotveny do buněčné stěny kovalentní vazbou (Wingender et al., 1999). Komplexní makromolekuly obklopující buňky jsou zesíťované hlavně pomocí elektrostatických interakcí a vodíkových můstků, zatímco iontové interakce umožňují jemnější propojování řetězců (Sutherland, 2001a). Strukturu EPS ovlivňují vzájemné interakce polysacharidů a jejich interakce s vícevalnými kationty a odlišnými molekulami jako jsou proteiny a glykoproteiny (Sutherland, 2001b).

V MM tvoří EPS hlavní pojivo buněk a jejich produktů (Sutherland, 2001a). Extracelulární obal hraje důležitou roli při komunikaci mezi buňkami v symbiotických interakcích (Viret et al., 1994). Dále může EPS usnadňovat pohyblivost buněk nebo jejich přichycení k podkladu (Klock et al., 2007). Díky převládajícímu zápornému náboji mohou charakteristické skupiny v EPS vázat kationty a zajistit tím zásobu některých nezbytných prvků (Sutherland, 2001a). EPS také může sloužit jako zásobní zdroj uhlíku a energie. Přestože mikroorganismy normálně nejsou schopny zpracovávat vlastní syntetizované EPS, mohou využívat EPS vytvořené jinými přítomnými druhy mikroorganismů (Sutherland, 2001b). EPS představuje prostředí chemické ochrany přítomných buněk (Decho et al., 2005) a chrání buňky před nežádoucími látkami zamezením přístupu daných sloučenin nebo dokonce efektivním snižováním jejich koncentrace (Sutherland, 2001a). Vysoká hydratace EPS chrání buňky před diurnálním kolísáním vlhkosti a může zabránit smrtelnému vysušení buněk, protože oschnutím a ztvrdnutím svrchní vrstvy EPS se vytvoří ochranná blána proti dalšímu vysušování (Sutherland, 2001a).

Cloete & Oosthuizen (2001) studovali roli EPS při zvýšeném biologickém odstraňování fosforečnanů z odpadní vody v procesu aktivace. Mikrobiální vločky složené z heterotrofních buněk a EPS průměrně obsahovaly 58 % P, zatímco samotné EPS obsahovalo 28 % P. Je tedy zřejmé, že EPS má určitou vazebnou schopnost i pro fosforečnany a v konsorciích buněk představuje velmi významný rezervoár P.

2.4 Fyzikálně-chemické gradienty v CBM

Velká hustota biomasy v CBM způsobuje rychlý úbytek světla s hloubkou, a proto může oxýgenční fotosyntéza probíhat pouze ve svrchní fotické vrstvě nárostu (Des Marais, 2003). Výsledkem gradientu světla je silná vertikální zonace koncentrace kyslíku, pH a redoxního potenciálu, což dále ovlivňuje zastoupení různých funkčních skupin mikroorganismů.

2.4.1 Světlo

Převládající způsob růstu sinic je fototrofní, a proto je jejich závislost na světle velmi silná (Stal, 1995). Mikroorganismy v CBM musí čelit příkrému vertikálnímu gradientu intenzity světla, který během denního cyklu výrazně kolísá. Vysoká hustota fotosyntetizujících mikroorganismů, polymerních látek a anorganických částic v CBM způsobuje, že je světlo výrazně rozptylováno a absorbováno především světlosběrnými pigmenty sinic, protože minima ve světelném spektru odpovídají absorpčním maximům fotosyntetických pigmentů sinic (Des Marais, 1995).

V hlubších anoxických vrstvách, které potenciálně mohou být osvětlené, provozují purpurové bakterie anoxygenní fotosyntézu (Jørgensen & Des Marais, 1988).

Vzájemné samozastínění sinic může způsobit smrt těch buněk, které se dlouhodobě nacházejí v prostředí s nedostatečným ozářením a vyčerpají své zásoby energie (Stal, 1995). Přímé zastínění celého profilu nárostu je způsobeno makrofyty porostlými epifytonem a plovoucími nárosty odtrženými od substrátu (Grimshaw et al., 1997). S rostoucím zastíněním makrofyty v NP Everglades výrazně klesala relativní čistá primární produkce CBM (Grimshaw et al., 1997). Thomas et al. (2006) však v NP Everglades experimentálně zjistil velkou schopnost CBM přizpůsobit se zastínění, protože se společenstva rozvíjela při zastínění 0 – 80 % a v menším rozsahu i při 90 % zastínění. Biomasa CBM začala ubývat až při zastínění > 98 %, kdy už byla energetická potřeba na vyvážení efektu zastínění příliš velká.

2.4.2 Rozpuštěný kyslík (DO)

Horní vrstvy CBM jsou během dne místa intenzivní oxygenní fotosyntézy, a proto bývají často supersatureovány kyslíkem, spodní vrstvy CBM jsou naopak permanentně anoxické. Des Marais (1995) zjistil zanedbatelnou produkci kyslíku ve dne už v hloubce 0,55 mm kvůli limitaci fytyosyntézy světlem. V noci je koncentrace kyslíku snižována v celém vertikálním profilu CBM aerobní respirací a chemickou spotřebou (Bebout et al., 1987). Měření odhalila výrazné inhibiční působení oxygenní fotosyntézy na redukční procesy v systému, a proto je doba, kdy probíhá fotosyntéza, časově oddělena od doby maximální fixace N_2 , denitrifikace a redukce síranů (Paerl & Pinckney, 1996).

Po západu slunce kyslík z oxické vrstvy mizí a hranice oxie-anoxie vystoupí až k povrchu CBM (Canfield & Des Marais, 1993). Oxické zóny jsou udržovány dynamickou rovnováhou mezi fotosyntetickou produkcí kyslíku a jeho konzumací přítomnými sulfát-redukujícími a heterotrofními bakteriemi (Des Marais, 1995).

2.4.3 pH

Hodnotu pH vody mohou výrazně ovlivnit některé chemické a biologické pochody v ní probíhající: jde buď přímo o uvolňování nebo spotřebu H^+ , resp. OH^- , nebo nepřímo o uvolňování nebo spotřebu volného CO_2 (Pitter, 1999).

Během dne se ve svrchní vrstvě CBM zvyšuje hodnota pH fixací CO_2 při fotosyntéze, zatímco nižší hodnota pH v hlubších vrstvách je způsobena respirací, oxidací sulfidů a fermentací (Wieland et al., 2005). Před rozedněním je pH i ve svrchních vrstvách CBM neutrální nebo nižší a po východu slunce se s počátkem fotosyntézy začne ve svrchních fotických vrstvách opět zvyšovat (Wieland et al., 2005).

Hodnota pH významně ovlivňuje chemické i biochemické procesy v CBM, a proto zde má mimořádnou důležitost. Vyšší pH (>8) např. umožňuje srážení $CaCO_3$ (a jeho spolusrážení s anionty) (Diaz et al., 1994), zatímco při nižším pH by např. měla být vyšší adsorpce aniontů na povrch oxyhydroxidů Fe a Al (Pitter, 1999).

2.5 Prostorové uspořádání a cykly prvků v nárostu

Prostorové uspořádání základních složek CBM je určeno fyzikálně-chemickými gradienty, které dále ovlivňují zastoupení jednotlivých forem prvků v nárostu (Stal, 1995).

2.5.1 Prostorové uspořádání a interakce organizmů v CBM

Vertikální biogeochemickou zonaci způsobují souběžné procesy, kterými je vyráběn a spotřebováván kyslík. Laminární struktura CBM a přítomnost pórové vody snižuje difúzi kyslíku a způsobuje tím vznik anoxických mikrozón. Tyto kyslíkové gradienty umožňují souběžný rozvoj mikroorganismů, které pro svůj růst vyžadují naprosto odlišné podmínky (Paerl & Pinckney, 1996). Prokaryotní organizmy s jednoduchými a malými buňkami diverzifikovali své funkce podél biogeochemických gradientů, čímž umožnily koexistenci aerobního, mikroaerobního i anaerobního metabolismu (Paerl et al., 2000).

Mikroorganismy vykazují nenáhodné uspořádání v prostoru. Jeden ze vzorů nenáhodného uspořádání jsou shluky o větší početnosti buněk, např. mozaikovitý vzor je utvořen soustředěním několika shluků na relativně homogenním pozadí. Výsledkem je mikroskopická „shlukovitost“, kde je velikost a vzdálenost jednotlivých shluků určena interakcemi mezi organizmy a biogeochemickými cykly (Paerl & Pinckney, 1996).

Zástupci různých skupin mikroorganismů se vyskytují v CBM vertikálně stratifikovaní (Stal, 1995). Sinice okupují svrchní vrstvy CBM, kde je dostatek světla pro fotosyntézu a jako ochranu proti nadměrnému ozáření často v buněčných pouzdrech produkují pigment scytonemin (Stal, 1995). Ve studovaných CBM se v další vrstvě nacházejí purpurové sirmé i nesirmé bakterie a hlouběji je různě silná vrstva vápenatých sedimentů pokrývající jílovité nebo rašelinné podloží (D. Sirová, ústní sdělení).

V sezónním měřítku se mění složení společenstva a fyziologické vlastnosti CBM, což má vliv na charakteristický průběh procesů během dne (Paerl & Pinckney, 1996). Zkoumané CBM z Belizských mokřadů se začínají vyvíjet na počátku období dešťů po zaplavení vyschlého území, kdy začnou růst epipelické nárosty, které se mohou vlastní tvorbou plynů odtrhávat ode dna a plout po hladině (metafyton) (Rejmánková & Komárková, 2000). Největší nárůst biomasy nastává na konci období dešťů, kdy se tvoří silné nárosty perifytonu na ponořených stoncích makrofyt a plovoucí metafyton pokrývá rozsáhlé oblasti mokřadů (Rejmánková & Komárková, 2000).

CBM přežívají v extrémních ekosystémech díky různým strukturním a funkčním adaptacím a místa jejich výskytu se stávají místy intenzivních biochemických a ekologických interakcí (Villbrandt et al., 1991). Metabolické produkty jedné skupiny organizmů mohou pozitivně i negativně ovlivnit jiné skupiny (Des Marais, 2003). Metabolity produkované v protichůdných procesech jsou často vzájemně inhibující, a proto musí být mikroorganismy v nárostech schopné dokončovat cykly prvků v potenciálně nepřátelských podmínkách (Paerl

et al., 2000). Různé metabolické požadavky organismů přesto mohou být slučitelné, protože biogeochemické a environmentální gradienty umožňují výskyt velice rozdílných nik v těsné blízkosti (Revsbech & Jørgensen, 1986).

2.5.2 Limitující faktory

Podle teorie kompetitivního vyloučení nemůže počet druhů na jedné trofické hladině překročit počet limitujících zdrojů. Tato teorie platí pouze pro prostředí s extrémně nízkým obsahem živin. V běžném oligotrofním prostředí (pouze s nízkým obsahem živin) může být taxonomická diverzita vysoká díky komplexním potravním vztahům zajišťujícím stálý tok materiálu a energie ekosystémem (Dignum, 2003). Pro vody obývané CBM je typický nedostatek základních zdrojů, a přesto patří CBM mezi nejproduktivnější vodní ekosystémy na Zemi. Tento paradox může být vysvětlen velmi účinnou recyklací klíčových živin v ekosystému (Des Marais, 1995).

Živiny jako faktory limitující primární produkci jsou studovány spíše v mírném podnebném pásu, i když jejich omezená dostupnost je významější v tropech, protože teplota a světlo zde organizmy většinou nelimituje (Rejmánková & Komárková, 2000). Obecně je v tropických vodách živinou limitující primární produkci N (Melack & Fisher, 1990), ale ve vápencových oblastech limituje organizmy spíše nízká dostupnost P, protože je z vody odstraňován srážením s CaCO_3 a fixace N_2 sinicemi navíc prohlubuje limitaci P zvyšováním poměru N:P (Litter & Litter, 1990).

Mikroorganismy si vytvořily několik růstových strategií jako adaptace na podmínky dočasného nedostatku RRP. Buňky mohou rozšířit rozpětí využitelných forem P, jiné organizmy aktivují systém příjmu, který účinně využije i velmi nízké koncentrace anorganického P (Dignum, 2003). Další strategií je nadbytečný příjem P v době jeho dostatku a následné skladování P v buňce, což způsobí, že rychlost růstu buněk není závislá na vnější koncentraci P, ale na jeho obsahu v buňce (Dignum, 2003).

2.5.3 Cykly prvků v nárůstu

Transformace a přesuny forem jednotlivých prvků mezi hlavními složkami CBM závisejí na specifických hodnotách redoxního potenciálu, pH, ozáření a energie a koncentraci rozpuštěného kyslíku a substrátu (Canfield & Des Marais, 1993).

Uhlík (C)

V cyklu uhlíku jsou reduktivní procesy (methanogeneze, fermentace organického materiálu, anaerobní mineralizace a respirace) a oxidativní procesy (oxidace methanu, aerobní mineralizace a respirace) přesně vymezeny gradienty v obsahu kyslíku (Paerl & Pinckney, 1996). Rozpuštěný anorganický uhlík (DIC) je ve dne spotřebováván oxygenní fotosyntézou sinic a anoxygenní fotosyntézou bakterií a zpět je dodáván respirací mikroorganismů a difúzí (Des Marais, 1995). V noci je DIC vyprodukovaný oxygenní respirací a redukcí síranů částečně spotřebováván chemoautotrofní fixací C při oxidaci sulfidů některými bakteriemi, ale většina difunduje do okolí (Des Marais, 1995).

Dusík (N)

Potenciální zdroje N pro primární producenty jsou: fixace N_2 , příjem rozpuštěného organického a anorganického N a recyklace N vytvořeného ve fotické vrstvě (Bebout et al., 1987). V CBM je důležitá schopnost sinic fixovat N_2 , ale kvůli inhibici enzymu nitrogenázy kyslíkem musí být tento proces místně nebo časově oddělen od oxygenní fotosyntézy, což vede k paradoxní situaci, protože energie potřebná na fixaci N_2 je dodávána oxygenní fotosyntézou (Bebout et al., 1987).

Fixací N_2 je produkován amoniak (NH_3)/amonné ionty (NH_4^+) (Henriksen, 1980) a spolu s redukováným N vzniklým anaerobní dekompozicí organického materiálu je nitrifikován chemoautotrofními bakteriemi v přítomnosti kyslíku (Paerl & Pinckney, 1996). Nitrifikace redukováného N probíhá ve 2 krocích: nejdříve je oxidován na dusitany (NO_2^-) např. bakteriemi rodu *Nitromonas* a poté je NO_2^- oxidován na dusičnany (NO_3^-) bakteriemi rodu *Nitrobacter*. Nitrifikační bakterie využívají difundovaný O_2 a NH_4^+ z okolí, a proto probíhá nitrifikace často nejintenzivněji na rozhraní oxických a anoxických vrstev (Paerl & Pinckney, 1996).

Nitrifikace většinou ovládá proces denitrifikace pokud do prostředí nevstupují NO_3^- z vnějších zdrojů. Pomocí denitrifikace je difundovaný NO_3^- redukován na N_2 např. bakteriemi rodu *Pseudomonas* v mikroanoxických zónách nárostu. Tyto kontrastní procesy v koloběhu N jsou závislé na těsném propojení a účinné výměně metabolitů N (Paerl & Pinckney, 1996).

Síra (S)

V oxickém prostředí jsou dominantní formou anorganické síry sírany (SO_4^{2-}). Mnoho mikroorganismů je uvnitř buněk schopno redukovat SO_4^{2-} na sulfidy (S^{2-}), které poté využívají na syntézu siřných aminokyselin (Paerl & Pinckney, 1996). Sulfát-redukující bakterie jsou důležití konzumenti organického materiálu a vyprodukované sulfidy jsou navíc zdrojem pro mnoho foto- a chemotrofních bakterií v CBM (Des Marais, 1995). Biochemicky důležitější je však redukce síranů v anoxických podmínkách. Mikrozóny v CBM také poskytují prostředí pro bakterie zpětně oxidující sulfidy na elementární síru, thiosulfáty nebo sírany (Paerl & Pinckney, 1996).

Fosfor (P)

Procesy v koloběhu P v CBM dosud nebyly dostatečně popsány a v dostupné literatuře zatím nejsou využitelné informace o zastoupení různých forem P ve složkách CBM ve vertikálním profilu a jejich změny v čase.

Společenstva v CBM mají velkou afinitu k P a jejich význam jako důležitých rezervoárů P se pravděpodobně zvyšuje se snižující se koncentrací rozpuštěného reaktivního fosforu (RRP) ve vodním sloupci (Hwang et al., 1998).

Noe & Childers (2007) zjišťovali zásobu P ve složkách celých mokřadních ekosystémů pro jejich vzájemné porovnání. Byly zjištěny toky P mezi složkami ekosystému ve vodním sloupci a v sedimentu a mikroorganismy zde mohly mít významnou roli.

Gaiser et al. (2004) ukázal, že měření VP v biomase CBM poskytuje spolehlivější odhad přísunu P pro odhalení eutrofizace ekosystému než zjištění jeho obsahu ve vodním sloupci. CBM, které volně plavou, porůstají dno nebo rostliny přijímají P různou rychlostí, ale všechny mohou udržovat nízkou koncentraci P ve vodě. Experimentálně přídáný P do systému byl odstraněn hlavně biotickým příjmem, abiotická adsorpce tvořila pouze 14 % úbytku P (Scinto & Reddy, 2003). Podobně, Rejmánková & Komárková (2005) zkoumaly rozdíl ve změně obsahu P v biomase CBM podle různě velkého experimentálního přídávku P do ekosystému. Při velkém zatížení systému P byl obsah P v biomase nárůstu průměrně 20x vyšší než při nízkém zatížení P a byla zjištěna významná pozitivní korelace mezi přídávkem P do systému a obsahem P v CBM.

Sirová et al. (2006) zjistila, že po přídávku P do ekosystému CBM klesá aktivita alkalické fosfatázy. Společenstva tedy byla P-limitovaná a vylučováním volné fosfatázy vyrovnávala nedostupnost substrátu způsobenou vazbou P na CaCO_3 .

Breitbart et al. (2009) měřil metagenom CBM v mexických mokřadech s velmi nízkým obsahem P a zjistil zvýšený obsah genů pro metabolismus a příjem fosforečnanů, polyfosfátů a alkylfosfátů, protože mikroorganismy extrémně limitované P musí být obzvláště přizpůsobeny pro zpracování alternativních zdrojů P.

Shrneme-li informace z předchozích odstavců, zjistíme, že z hlediska koloběhu P, byly CBM většinou sledovány jako dílčí složky mokřadních ekosystémů, bez detailního popisu přeměn uvnitř nárostu. Pro CBM chybí informace o zastoupení P v různých složkách ve vertikálním profilu a jeho přesuny v průběhu času, jaké jsou např. známé z výzkumů sladkovodních sedimentů. V tab. 1 jsou znázorněny důležité rozdíly CBM a sedimentů ve vztahu k P.

Tab. 1: Srovnání rozdílů mezi sladkovodními sedimenty a CBM ve vztahu k P.

	sedimenty	CBM
vstup P		
vnější přísun	velký	malý
zastoupení P ve složkách		
autotrofní	?	?
heterotrofní	malé	?
neživá (uhlíčitany)	velké x malé	?
neživá (Fe, Al)	velké	?
neživá (EPS)	?	?
vliv řídicích mechanismů		
O ₂	velký	?
pH	malý	?
přesuny P		
v profilu sedimentu	malé	?
uvolňování P	velké x malé	? malé

V tabulce 1 jsou uvedeno srovnání vybraných skutečností týkajících se poznání koloběhu P ve svrchních vrstvách sedimentů a v CBM. Hlavním cílem této práce bude objasnění alespoň některých skutečností týkajících se koloběhu P v CBM.

2.6 Možnosti rozdělení P a princip frakcionace P

Rezervoáry P v pevné fázi se obtížně separují a kvantifikují z důvodu nízké koncentrace P a zrnitosti materiálu, a proto byly zavedeny nepřímé metody stanovení obsahu různých forem P. Pro přibližný odhad zastoupení forem P v pevném vzorku je možné použít

korelaci mezi obsahem VP a obsahem jiných základních prvků, fyzikální separaci podle velikosti zrn, profily pórové vody a metodu postupné extrakce (frakcionace P) (Ruttenberg, 1992). Ke zjištění dostupnosti a mobility P v sedimentech se používá rozbor řas, aniontová a izotopová výměna, elektrodiálýza a chemická frakcionace P (Pardo et al., 1998).

Už před zavedením postupné extrakce P z půdy a sedimentů pomocí několika po sobě jdoucích činidel v 70. letech 20. století byla extrakce v jediném kroku chápána jako užitečnější výsledek než pouhé stanovení celkové koncentrace P (Quevauviller, 2003). Standardním postupem zjišťování koncentrace P ve vodním sloupci nelze odhalit eutrofizaci systému dokud nejsou jeho biologické složky P saturovány a v té době už je většinou struktura a funkce ekosystémů nevratně změněna. Proto je stanovení obsahu P v biomase CBM výhodnější než jeho stanovení ve vodě (Gaiser et al., 2004).

Metody postupné extrakce jsou vždy pracovně definované podle reaktivity různých pevných fází s daným extrakčním činidlem a výsledky závisí na experimentálních podmínkách (Pardo et al., 1998). Pro správnost výsledků je nutné znát účinnost extrakčních činidel a jejich selektivitu k daným fázím. Zkoumaný pevný materiál je postupně extrahován řadou extrakčních činidel, z nichž každé selektivně rozpouští jednu fázi nebo skupinu fází s podobnými chemickými vlastnostmi (Ruttenberg, 1992). Dané extrakční činidlo by mělo kompletně rozpustit konkrétní fázi ve vzorku a při tom neovlivnit jiné přítomné fáze. Nejreaktivnější fáze jsou odstraněny nejdříve a síla po sobě jdoucích extrakčních činidel se postupně zvyšuje (Ruttenberg, 1992).

Chang & Jackson (1958) navrhli první frakcionaci P pro půdní vzorek a později byla tato metoda uzpůsobena pro analýzu sedimentů (Williams et al., 1967), pro které bylo dále vyvinuto a modifikováno mnoho dalších extrakčních schémat (Pardo et al., 1998). Obecně použitelné metody pro popis forem P v sedimentech dosud nebyly schváleny, protože složení sedimentů je natolik variabilní, že žádné schéma nemůže být prohlášeno za univerzální (Pettersson et al., 1988).

Různé postupy frakcionace P se zaměřují na různé požadované výsledky a odlišné vlastnosti zpracovávaného materiálu včetně prostředí, odkud vzorek pochází. Frakcionace P byla dosud prováděna v různých typech půdy (Chang & Jackson, 1958; Tiyapongpattana et al., 2004; Zhang, 1998) a sedimentů (Williams et al., 1967; Hieltjes & Lijklema, 1980; Psenner & Puscko, 1988; Ruttenberg, 1992, Jensen et al., 1998; Ruban et al., 1999; Pardo et al., 2004, Fytianos & Kotzakioti, 2005). CBM je zvláštní a dosud nepoužitý materiál pro

frakcionaci P jako směs mnoha druhů mikroorganismů, organických (detrit, EPS, enzymy, atd.) a anorganických látek (jíl, minerály, vysrážený CaCO_3 , atd.).

Pro frakcionaci P v CBM byl upraven postup frakcionace P podle Ruttenberg (1992) modifikovaný podle Jensen et al. (1998), který pracuje s vápenatými sedimenty tropických pobřežních vod. Hlavní mechanismus snižování koncentrace P v tomto prostředí představuje zachycování rozpuštěného anorganického P adsorpcí na částice CaCO_3 (Jensen et al., 1998). Předpokládá se, že tento hlavní rezervoár P není dostupný pro potřebu primárních producentů a limituje tak přítomná společenstva organismů (Short et al., 1990). Jensen et al. (1998) ale zjistil, že rezervoár P v CaCO_3 může sloužit jako dlouhodobý zdroj P pro mořskou vegetaci, která je schopna uvolňovat P vázaný na uhličitany snížením pH prostřednictvím jejich metabolické aktivity nebo přímo vylučováním organických kyselin.

Materiál je postupně extrahován 6-ti extrakčními činidly, které působí danou dobu za předepsaných podmínek. Extrakce probíhá chloridem hořečnatým (MgCl_2), dithioničitanem sodným (BD), slabým hydroxidem sodným (0,1 M NaOH), octanem sodným (Na-Ac), kyselinou chlorovodíkovou (HCl) a silným hydroxidem sodným (1 M NaOH). Podrobný popis frakcí P je uveden v příloze I.

3. Cíle předkládané magisterské práce

Hlavním cílem předkládané magisterské práce je doplnit neznámé informace o P v CBM uvedené výše v tab. 1. Zaměřím se na zjištění zastoupení P v souhrnné biotické složce a ve sloučeninách Fe, uhličitanech a EPS jako abiotických složkách nárostu. Dále se pokusím zjistit podíl řídicích mechanismů, které ovlivňují zastoupení P mezi složkami CBM a jeho přesuny, které jsou také dosud neznámé. Cíle této práce lze shrnout do bodů:

- Upravit metodiku frakcionace P k použití v CBM se zaměřením na slabě vázaný P
- Zjistit zastoupení frakcí P v biotické a abiotických složkách vertikálního profilu CBM
- Zhodnotit změny mezi denním a nočním zastoupením frakcí P (vliv pH a obsahu DO)

4. Metodika

4.1 Ověření analytických metod

Analytické metody nejčastěji používané v hydrobiologii bývají optimalizované pro vodnou matrici. Při frakcionaci P se používají extrakční činidla obsahující vysoké koncentrace kyselin, zásad nebo solí, které mohou rušit stanovení, a proto musí být jejich obsah v měřeném vzorku co nejnižší. Z důvodu nízkého obsahu sledovaných analytů ve vzorcích CBM bylo však nutné dávkovat co nejvyšší objem vzorku. Cílem ověřování kalibračních křivek v jednotlivých matricích bylo najít optimální koncentraci extrakčních činidel, tedy zachovat citlivost metody a současně zjistit maximální použitelnou koncentraci vzorku.

Podle metodiky stanovení P (Kopáček & Hejzlar, 1995) ruší signál každé snížení koncentrace H^+ iontů, které může být způsobeno např. $KNK_{4,5}$, chloridy nebo organickými látkami. Matrice jako $MgCl_2$ a $NaOH$ koncentraci H^+ iontů ve vzorku snižovaly zatímco matrice $Na-Ac$ a HCl zvyšovaly. Pro eliminaci těchto rušivých vlivů byl upraven přídavek 3,2 M $HClO_4$ do vzorku (která je připravena z 28 ml 70 % $HClO_4$ a 72 ml destilované vody). Teoreticky vypočtený přídavek $HClO_4$ na eliminaci rušivých vlivů (tab. 2) a doba potřebná pro vybarvení barevného komplexu byla ověřována laboratorními pokusy.

Pro sestrojení kalibračních křivek bylo do každého extrakčního činidla o různé koncentraci (tab. 2) přidáno vždy takové množství standardního roztoku P a Fe, aby jejich výsledná koncentrace ve vzorku byla 0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 a 400 $\mu g\ l^{-1}$ P (0, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 a 2000 $\mu g\ l^{-1}$ Fe). Přijatelné kalibrační křivky by měly mít co největší sklon s nízkými absorbancemi blanků. Všechny kalibrační křivky jsou zobrazeny v příloze II. Ze získaných výsledků byla určena nejvyšší možná koncentrace extrakčních činidel ve vzorku, která neruší signál při stanovení P a Fe.

Tab. 2: Koncentrace extrakčních činidel použitých na sestrojení kalibračních křivek a přidaný objem 3,2 M $HClO_4$ do 5 ml měřených vzorků

$MgCl_2$	$HClO_4$	BD	$HClO_4$	$Na-Ac$	$HClO_4$	HCl	$HClO_4$	$NaOH$	$HClO_4$
$mol\ l^{-1}$	ml	$mol\ l^{-1}$	ml	$mol\ l^{-1}$	ml	$mol\ l^{-1}$	ml	$mol\ l^{-1}$	ml
0.1	0.375	0.005	0.25	0.05	0.56	0.005	0.25	0.0005	0.5
0.2	0.43	0.01	0.25	0.1	0.62	0.01	0.54	0.001	0.55
0.5	0.875	0.05	0.25	0.5	1.1	0.05	0.68	0.01	0.68

4.2 Zavedení metody frakcionace P v biomase mikroorganismů

V celém postupu frakcionace P byla nejistá interpretace výsledků pouze u první frakce extrahované pomocí $MgCl_2$, který by měl uvolnit P z EPS a P sorbovaný na různé povrchy, ale neměl by narušit buněčné stěny a rozpustit P z buněčné biomasy. Na 4 vypěstovaných čistých kulturách mikroorganismů byla testována optimální koncentrace $MgCl_2$ a možnost přidavku vápníku (+Ca) o koncentraci $0,01 \text{ mol l}^{-1}$, který by měl stabilizovat buněčné membrány (Grattan and Grieve, 1999).⁴⁴

4.2.1 Pěstování pokusných kultur

Pro počáteční zjišťování nejistot v metodě frakcionace P v biomase mikroorganismů byla pěstována kultura zelené řasy (*Chlorella*) a pro ověřování metodiky další 4 kultury mikroorganismů: bakterie (*Rhodocista*), zelená řasa (*Monoraphidium*), sinice bez slizového obalu (*Cuspidothrix*) a sinice tvořící slizový obal (*Chroococcus*). Operace provedené při pěstování kultur jsou chronologicky seřazené v bloku 1.

Blok 1: Postup při pěstování kultur mikroorganismů:

- příprava sterilního živného média: pro bakterii „102“, pro řasu „Z“ a pro sinice „BG11“ (jejich složení je uvedeno v příloze III.)
- naočkování 5 ml čisté kultury *Rhodocista* a po 2 ml inokula *Chroococcus*, *Cuspidothrix* a *Monoraphidium*
- růst kultur v 5 l média přibližně 6 měsíců, kultivační nádoby uzavřeny vatovou zátkou snižující možnost kontaminace ze vzduchu, pomalé míchání pro zachování homogenity rozmístění živin a buněk, bakterie *Rhodocista* pěstována anaerobně (kultivační nádoba uzavřena plastovou zátkou)
- v intervalu asi 2 měsíců výměna starých médií za nově připravená média (po usazení buněk mikroorganismů byla stará média odlita)
- zjištění obsahu nerozpuštěných látek (NL) a jejich ztráty žiháním (ZŽ), centrifugace ($1100 \text{ g} / 20 \text{ min}$), promytí destilovanou vodou, zahuštění
- přenesení biomasy mikroorganismů do růstových médií připravených bez P
- růst 7 dní ve 2 l média bez P při umělém osvětlení a provzdušňování pomocí skleněné trubičky vedené vatovou zátkou pro snížení limitace CO_2 a spotřebování zbylého P z média a povrchu buněk
- zjištění NL a ZŽ, změření pH, centrifugace, zahuštění, 4x promytí kultur nově připraveným médiem bez obsahu P, rozmíchání v 0,5 l médií
- frakcionace P: do centrifugačních zkumavek převeden takový objem biomasy, aby byl poměr NL ve zkumavce (mg) a objem extrakčního činidla při frakcionaci (ml) vždy přibližně stejný (1,9)
- lyofilizace zbylé biomasy pro zjištění celkových obsahů některých prvků ve vzorku

Ze zjištěných dat o obsahu P v médiu před a po kultivaci mikroorganismů a z obsahů NL a ZŽ byla vypočtena stechiometrie růstu kultur, přibývání biomasy a spotřeba P.

4.2.2 Promývání biomasy kultur

Růstová média obsahovala poměrně velké množství P (v médiu „Z“ 1,6 mg l⁻¹ P, v „BG11“ 1,3 mg l⁻¹ P a v „102“ dokonce 17,1 mg l⁻¹ P) (viz příloha III.), a proto bylo nutné před samotnou frakcionací P odstranit P pocházející z média, povrchu buněk a mezibuněčného prostoru pomocí opakovaného promývání biomasy mikroorganismů. Na kultuře *Chlorella* bylo testováno promývání biomasy destilovanou vodou a nově připraveným růstovým médiem bez obsahu P. Po každém promytí kultury byl vzorek zcentrifugován a po přefiltrování supernatantu přes skleněný filtr se schopností zachytit částice > 0,4 μm (MN GF-5, Machrey-Nagel) v něm byl zjišťován obsah P. Podle výsledků byl stanoven potřebný počet proplachování, po kterém se už obsah P více nesnižoval.

4.2.3 Výběr koncentrace MgCl₂ a přídavek Ca

V každé kultuře byla provedena částečná frakcionace P pomocí prvních třech extrakčních činidel (MgCl₂, BD a NaOH) se čtyřmi různými variantami první frakce (tab. 3), přičemž každá tato varianta byla měřena ve třech opakováních. Biomasa mikroorganismů byla vždy rozmíchána ve 20 ml extrakčního činidla, které působilo po stanovenou dobu na třepačce. Po uplynutí doby působení byl obsah zkumavek zcentrifugován (1100 g / 20 min) a supernatant byl odlit do připravených kádinek. S extrahovaným materiálem bylo znovu promícháno 20 ml extrakčního činidla kvůli uvolnění zpětně adsorbovaných látek. Po centrifugaci (1100 g / 20 min) byl druhý supernatant přidán do kádinky k příslušnému supernatantu z hlavní extrakce. Po přefiltrování roztoků přes skleněný filtr se schopností zadržet částice > 0,4 μm (MN GF-5, Machrey-Nagel) byly vzorky uchovávány v lednici na chemická stanovení (RRP, VRP). Získaná data byla statisticky vyhodnocena pomocí jednocestné ANOVy a Tukeyho testu s použitím programu Statistica 8.

Zbýlý materiál ve zkumavce byl rozpuštěn v 0,2 M HClO₄ (připravené z 14 ml 70 % HClO₄ a 986 ml dest. vody) a po mineralizaci v něm byl stanoven obsah zbylého P nerozpuštěného v prvních 3 krocích frakcionace P. Zbytek biomasy pokusných kultur, která nebyla použita na frakcionaci P byla lyofilizována a použita na zjištění celkového obsahu P. Součet množství P extrahovaného pomocí MgCl₂, BD a NaOH spolu s obsahem P ve zbylém materiálu v centrifugační zkumavce po frakcionaci P by měl odpovídat celkovému obsahu P v biomase kultur po její lyofilizaci.

Tab. 3: Rozpis 4 variant postupů při částečné frakcionaci P v biomase pokusných kultur mikroorganismů. Množství P extrahovaného v prvních 3 krocích frakcionace P spolu se zbylým P ve zkumavce bylo porovnáváno s celkovým obsahem P v lyofilizované biomase mikroorganismů.

krok extrakce	varianta 1	varianta 2	varianta 3	varianta 4
I	1M MgCl ₂	0.1M MgCl ₂	1M MgCl ₂ +Ca	0.1M MgCl ₂ +Ca
II	-----		0.1M BD	-----
III	-----		0.1M NaOH	-----
po extrakci:	-----		zbytek ve zkumavce	-----
celkový obsah P	-----		lyofilizovaná biomasa	-----

4.2.4 Kinetika frakcionace P

Pro zjištění optimální doby působení extrakčních činidel byla provedena kinetika frakcionace P na pokusné kultuře *Chlorella*. Zjišťovala se závislost množství extrahovaného P na době působení u prvních třech extrakčních činidel (MgCl₂, BD a NaOH), která byla testována zvlášť v časech: 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 12 a 24 h.

4.3 Odběr a zpracování vzorků CBM

4.3.1 Popis lokality

Lokalita, kde byly odebírány vzorky CBM, se nachází ve střední Americe, v severní části státu Belize. Studovanou část poloostrova Yukatán tvoří 2 – 3 km silná vyzdvižená oceánská deska složená z vápence, dolomitu, anhydridu a sádrovce z doby druhohor (období křída) a třetihor (Weidie, 1985). Podzemní vody jsou téměř nasyceny uhličitany a sírany z rozpouštěných hornin v podloží (Rejmánková et al., 2004). Hydrologie území je řízena hlavně množstvím srážek a evapotranspirací (Sirová et al., 2006).

Oblast leží v tropickém podnebném pásu a klima je ovlivněno severovýchodními pasáty. Teplota vzduchu je poměrně stálá v denním i sezónním měřítku, rozsah ročního minima a maxima je 22,8° – 30,2°C (Belize Department of Meterology, nepublikovaná data). Rok se rozděluje na období dešťů (květen – listopad) a sucha (prosinec – duben) a roční úhrn srážek se pohybuje v rozsahu 1300 - 1500 mm se značnou variabilitou mezi jednotlivými roky (King et al., 1992).

Mezi hlavní primární producenty v těchto ekosystémech patří emerzní makrofyta (*Eleocharis cellulosa*, *E. interstincta*, *Cladium jamaicense* a *Typha domingensis*) a druhově bohatá společenstva mikrofyt, ve kterých většinou dominují sinice (Rejmánková et al., 1996).

Do první poloviny 19. století bylo zemědělství v Belize téměř bezvýznamné (King et al., 1992). Cukrová třtina začala být pěstována až v 50. letech 19. století, ale největší rozmach zaznamenala v posledních 30-ti letech a její význam se stále zvyšuje (Rejmánková et al., 2004). Odtok hnojiv z polí cukrové třtiny a dalších plodin jakož i zvyšující se hustota obyvatel přispívá k eutrofizaci vod. S rychlým rozvojem hospodářství je nutné současně zavést patřičný management ochrany ohroženého nebo už poškozeného území pro zachování cenných ekosystémů (Rejmánková et al., 2004).

Ve dnech 19. – 20.1.2007 od 17:40 do 5:40 v intervalu 2 h byly v místě odběru vzorků měřeny hodnoty pH a koncentrace DO pomocí motorizovaného mikromanipulátoru, v kroku 1 mm, se zběračem dat. Pro měření kyslíku byla použita mikrosonda Klarkova typu o průměru špičky 0,5 mm, stejný rozměr měla i pH elektroda (obě fa Unisense, Dánsko).

4.3.2 Zpracování vzorků po odběru

„Denní“ (17:00) a „noční“ (6:00) vzorky byly odebrány ve dnech 19. a 20.1.2007 pomocí plexisklové trubice, průměr každého kóru byl 7 cm a výška přibližně 6 cm. Vzorky nebyly záměrně odebírány uprostřed dne a uprostřed noci, ale na jejich konci, protože procesy typické pro danou část dne probíhaly dlouhou dobu až do odběru a dané změny a pozorovatelné charakteristiky prostředí se mohly plně vyvinout. Vzorky byly vyfotografovány, zmrazeny a do zpracování byly uchovávány při teplotě -18°C.

Ve zmraženém stavu byl váleček CBM nakrájen nožem na 12 vrstev o šířce 4 mm. Podle barvy a pravděpodobně tedy i přítomnosti určitých skupin mikroorganismů bylo 12 vrstev CBM pracově označeno: 1.-3. vrstva = „žlutá“, 4. = „přechodná“, 5.-7. = „zelená“, 8.-9. = „přechodná“ a 10.-12. = „červená“ vrstva. Každá z 12-ti vrstev byla převedena do centrifugační zkumavky, kde byl po rozmrznutí obsah jemně homogenizován skleněnou tyčinkou a malé množství materiálu bylo použito na zjištění obsahu NL a ZŽ. Dále byla centrifugací (1100 g / 20 min) oddělena pórová voda a zbylý pelet byl použit na frakcionaci P a na zjištění obsahu NL a ZŽ. Zbytek peletu byl poté lyofilizován pro změření celkových obsahů vybraných prvků.

4.4 Vybrané schéma frakcionace P a jeho modifikace

Pro frakcionaci P v CBM byl upraven postup frakcionace P podle Ruttenberg (1992) modifikovaný podle Jensen et al. (1998). Změny se týkaly V. kroku, kdy byla prodloužena doba působení 0,5 M HCl na 18 h a VI. kroku, kdy byl reziduální organický P rozkládán

nejméně 20 h v 1 M NaOH při teplotě 85°C místo působení vysokých teplot v peci a vyluhování v 1 M HCl (tab. 4).

Tab. 4: Postupy frakcionace P podle Ruttenberg (1992), Jensen et al. (1998) a modifikovaný postup použitý v této práci. V jednotlivých krocích extrakce se liší způsob extrakce (je zobrazen název použitého extrakčního činidla, jeho koncentrace, doba působení, pH a teplota).

	Ruttenberg (1992)				Jensen et al. (1998)				náš postup						
		c	čas	pH	t		c	čas	pH	t		c	čas	pH	t
		mol l ⁻¹	h		°C		mol l ⁻¹	h		°C		mol l ⁻¹	h		°C
I	MgCl ₂	1	2	8	25	MgCl ₂	1	1	8	25	MgCl ₂	1	1	8	25
II	CBD	0.3	8	7.6	25	BD	0.1	1	7.2	25	BD	0.1	1	7.2	25
III						NaOH	0.1	18		25	NaOH	0.1	18		25
IV	Na-Ac	1	6	4	25	Na-Ac	1	3	4	25	Na-Ac	1	3	4	25
V	HCl	1	16		25	HCl	0.5	1		25	HCl	0.5	18		25
VI	HCl	1	16		25	HCl	1	0.17		var	NaOH	1	20		85

Kompletní frakcionace vzorků CBM byla provedena 23.8.2008 („denní“ vzorek) a 17.9.2008 („noční“ vzorek). K extrahovanému materiálu (o přesné navážce okolo 0,1 mg dw.) bylo vždy přidáno 20 ml extrakčního činidla a po stanovenou dobu byly cetrifugační zkumavky míchány na třepačce (nebo v termostatu v případě působení 1 M NaOH o teplotě 85°C). Po uplynutí doby působení byl obsah zkumavek zcentrifugován (1100 g / 20 min) a supernatant byl odlit do připravených kádinek. S extrahovaným materiálem bylo znovu promícháno 20 ml extrakčního činidla kvůli uvolnění zpětně adsorbovaných látek. Po centrifugaci (1100 g / 20 min) byl druhý supernatant přidán do kádinky k příslušnému supernatantu z hlavní extrakce. Po přefiltrování roztoků přes skleněný filtr se schopností zadržet částice > 0,4 µm (MN GF-5, Machrey-Nagel) byly vzorky uchovávány v lednici na chemická stanovení (RRP, VRP, VRFe, VRCa).

Ze suspence získané v 1. kroku frakcionace P byl analyzován také obsah EPS modifikovanou metodou podle Klock et al. (2007). Vzorek byl ihned analyzován pro vyloučení možného zpracování látek ve vzorku přítomnými bakteriemi. Protože bývá EPS v CBM zastoupeno hlavně různými sacharidy, bylo na obsah EPS v jednotlivých vrstvách „denního“ a „nočního“ vzorku usuzováno podle obsahu cukrů zjištěného jejich souhrnným stanovením fenol-sírovou kolorimetrickou metodou podle Dubois et al. (1956). Absorbance vzorků byla měřena při 480 nm při použití standardu glukózy, výsledné obsahy všech sacharidů jsou tedy udávány v ekvivalentech glukózy.

4.5 Chemické analýzy

Vzorky byly analyzovány v laboratoři BC AVČR, HBÚ. Metody stanovení jednotlivých parametrů jsou uvedeny v tab. 5.

Obsah NRP byl vypočten jako rozdíl obsahu VRP a RRP.

Tab. 5: Výčet použitých analytických metod pro stanovení obsahu vybraných parametrů ve vzorcích CBM.

<u>analyzovaná složka</u>	<u>zkratka</u>	<u>metoda</u>	<u>citace</u>
nerozpuštěné látky	NL	sušení při 105 °C	Horáková et al., 1986
ztráta žiháním	ZŽ	žihání při 550 °C	Horáková et al., 1986
rozpuštěný reaktivní P	RRP	filtrace 0,4 μm	Murphy & Riley, 1962
veškerý rozpuštěný P	VRP	mineralizace HClO ₄	Kopáček & Hejzlar, 1995
veškeré rozpuštěné železo	VRF _e	mineralizace HClO ₄	Hejzlar & Kopáček, 1998

5. Výsledky

5.1 Ověření analytických metod

Z důvodu rušivého vlivu extrakčních činidel na stanovení P a Fe bylo nutné vzorek co nejvíce ředit, ale kvůli nízkému obsahu měřených analytů v CBM bylo naopak nutné měřit vzorek co nejvíce koncentrovaný. Optimální koncentrace měřených vzorků byly ověřovány kalibračními křivkami pro všechna extrakční činidla (viz příloha II.).

Největší koncentrace H^+ iontů v měřených vzorcích v této práci byla 2 mol l^{-1} (u vzorků v matrici 1 M MgCl_2) a také zde byla zjištěna potřeba delší doby působení činidla pro vyvinutí barevných komplexů (alespoň 30 min).

Nejvyšší možné koncentrace extrakčních činidel ve vzorku, pro které byly sestrojeny přijatelné kalibrační křivky pro stanovení RRP, VRP a VRFe byly: $0,2 \text{ M MgCl}_2$; $0,05 \text{ M BD}$; $0,1 \text{ M Na-Ac}$; $0,01 \text{ M HCl}$ a $0,01 \text{ M NaOH}$.

5.2 Zavedení metody frakcionace P v biomase mikroorganismů

5.2.1 Stechiometrie růstu kultur

Tab. 6. zobrazuje stechiometrii růstu pokusných kultur mikroorganismů. Po šesti měsících kultivace v růstovém médiu s P (t_0) byla biomasa pěstovaných kultur *Chroococcus*, *Cuspidothrix*, *Monoraphidium* a *Rhodocista* převedena do nového média bez P, kde rostly dalších 7 dní (t_7). Nárůst obsahu NL (t_7-t_0) teoreticky odpovídá přibývání biomasy mikroorganismů, z čehož lze usoudit, že všechny kultury mikroorganismů byly ve fázi růstu, nutné pro laboratorní pokusy. Úbytek obsahu P v médiu by měl teoreticky odpovídat obsahu P v sušiny narostlé biomasy.

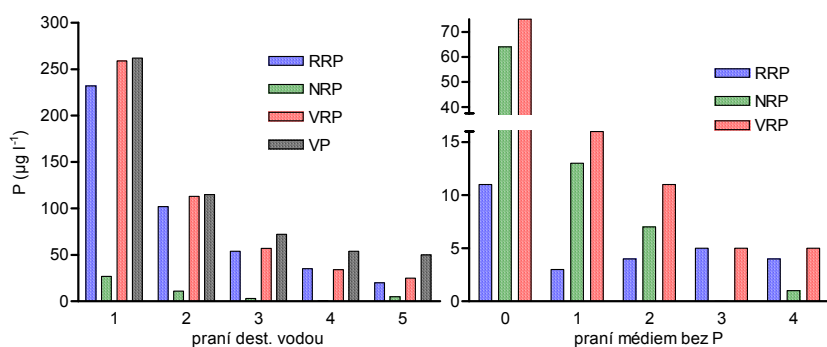
Tab. 6: Kultivace 4 kultur mikroorganismů: zvýšení obsahu NL v médiu a úbytek P po sedmi dnech růstu v médiu bez přísady P, obsah P v NL po 7 dnech růstu a teoretická potřeba P (vypočtená jako součin nárůstu NL a obsahu P v každém g sušiny).

	NL (mg)			P v médiu (mg)			P v NL (mg g ⁻¹)	potřeba P (mg)
	t_0	t_7	nárůst	t_0	t_7	úbytek	t_7	teoreticky
<i>Chroococcus</i>	720	846	126	2.3	1.3	1	14	1.7
<i>Cuspidothrix</i>	360	414	54	2.3	0.4	1.9	4	0.2
<i>Monoraphidium</i>	553	629	77	2.7	1.1	1.6	22	1.7
<i>Rhodocista</i>	3008	4832	1824	27	34	-7.1	8	15

5.2.2 Promývání biomasy mikroorganismů

Bylo zjištěno, že pro správnost výsledků je nutné před samotnou extrakcí promývat biomasu mikroorganismů, aby došlo k odstranění P obsaženého v růstovém médiu, P z povrchu buněk a mezibuněčného prostoru. Nejdříve bylo testováno promývání biomasy mikroorganismů destilovanou vodou. Před extrakcí byla kultura *Chlorella* 5x promyta destilovanou vodou a ve slitých roztocích bylo změřeno RRP, VRP a VP (obr. 1). Obsah P v roztocích po promývání biomasy kultur se postupně snižoval a po 4. propláchnutí už obsah všech forem P více neklesal. V roztoku z prvního promývání tvořil RRP téměř 100 % VRP i VP a s počtem mytí se jeho podíl snižoval.

Při promývání kultury *Chlorella* čistým médiem bez P byly obsahy forem P v mycích roztocích více než o řád nižší než při promývání destilovanou vodou (obr. 4). V suspensi po 3. mytí byl stanoven téměř stejný obsah P jako ve 4. mytí, ale s ohledem na možnou variabilitu mezi kulturami mikroorganismů bylo přijato čtyřnásobné propláchnutí kultury vlastním médiem bez P jako nezbytné pro odstranění P pocházejícího z růstového média, povrchu buněk a mezibuněčného prostoru.



Obr. 1: Koncentrace různých forem P v roztocích slitých po promývání biomasy kultury *Chlorella*. V prvním grafu je znázorněno 5-krát opakované promývání kultury destilovanou vodou. Ve druhém grafu je 4-násobné promývání kultury médiem bez P, kde 0 na ose x označuje obsah P v odlitém růstovém médiu po 1. centrifugaci před 1. praním.

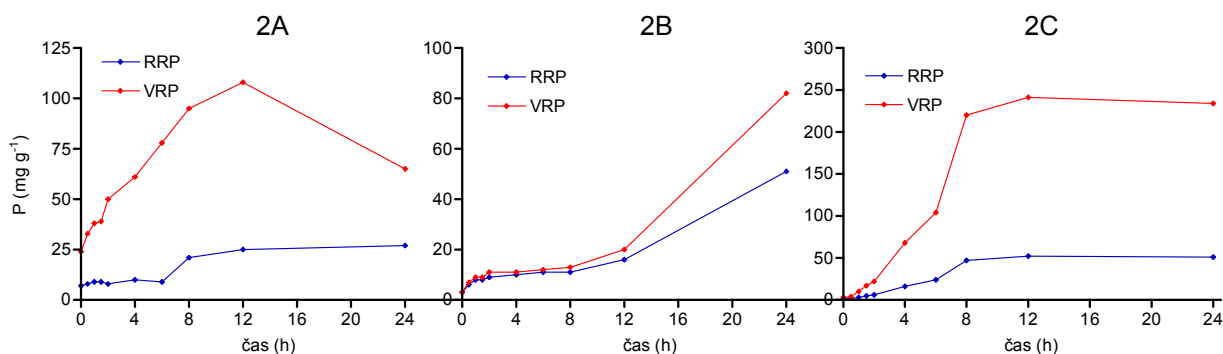
5.2.3 Kinetika frakcionace

Při extrakci P z biomasy mikroorganismů se s dobou působení zvyšovala extrahovaná koncentrace RRP i VRP (Obr. 2).

Při extrakci pomocí 1 M $MgCl_2$ se s dobou působení koncentrace extrahovaného RRP pomalu zvyšovala (ze 7 na 10 $mg\ g^{-1}$), po 6-ti hodinách nastal náhlý vzrůst na 21 $mg\ g^{-1}$ a dále už se příliš extrahované množství RRP nezvyšovalo. Extrakční činidlo BD extrahovalo

zpočátku méně P než MgCl_2 ($3 - 8 \text{ mg g}^{-1}$), nárůst byl velmi pozvolný až k velkému zvýšení koncentrace extrahovaného P po 24 h na 51 mg g^{-1} . Koncentrace RRP extrahovaného pomocí NaOH se exponenciálně zvyšovala do času 8 h (od 2 do 47 mg g^{-1}) a dále už se koncentrace RRP zvýšila pouze nepatrně (na 51 mg g^{-1}).

Množství extrahovaného VRP mělo v čase výraznější průběh než RRP. Obsah VRP extrahovaného pomocí MgCl_2 se v čase stále zvyšoval (z 24 na 108 mg g^{-1}) a v čase 24 h jeho množství náhle pokleslo na 65 mg g^{-1} . Koncentrace VRP extrahovaná činidlem BD měla v čase podobný průběh jako RRP, ale podíl RRP na VRP se s přibývajícím časem snižoval. Obsah VRP extrahovaného pomocí NaOH prudce narůstal až do 8 h (ze 3 na 220 mg g^{-1}) a dále už se zvyšoval pouze nepatrně. Průměrný podíl RRP na VRP se v jednotlivých extrakčních činidlech lišil (23 % v MgCl_2 , 84 % v BD a 31 % v NaOH).



Obr. 2: Koncentrace extrahovaného VRP a RRP pomocí 1 M MgCl_2 (3A), 0,1 M BD (3B) a 0,1 M NaOH (3C) z kultury *Chlorella* při různé době působení extrakčních činidel.

5.2.4 Frakcionace P v pokusných kulturách

Byly zjištěny rozdíly v extrahované koncentraci P při extrakci pomocí činidla MgCl_2 o koncentraci $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ a 1 mol l^{-1} s přidavkem a bez přidavku Ca (příloha IV.). Množství extrahovaného P z biomasy 4 pokusných kultur vždy přibližně odpovídalo srovnání: $1 \text{ M MgCl}_2 > 1 \text{ M MgCl}_2 + \text{Ca} > 0,1 \text{ M MgCl}_2 > 0,1 \text{ M MgCl}_2 + \text{Ca}$.

U většiny kultur byl průkazně vyšší obsah VRP i RRP extrahovaného v prvním kroku extrakce pomocí 1 M MgCl_2 než 0,1 M MgCl_2 a 1 M $\text{MgCl}_2 + \text{Ca}$ než 0,1 M $\text{MgCl}_2 + \text{Ca}$ (tab. 7). Z toho vyplývá, že 0,1 M MgCl_2 extrahoval vždy méně P než 1 M MgCl_2 a extrakce P tímto činidlem by tedy byla podhodnocená.

Množství RRP i VRP extrahovaného pomocí činidla BD bylo ve většině případů průkazně vyšší u variant 0,1 M MgCl_2 než 1 M MgCl_2 s/bez přidavku Ca (tab. 7). Z těchto výsledků lze usoudit, že rozdíly v množství extrahovaného P v 1. kroku frakcionace byly

přibližně vyrovnány v 2. kroku při extrakci pomocí činidla BD. Je tedy možné předpokládat, že P, který byl k buňce poután tak silně, že nemohl být rozpuštěn slabým 0,1 M MgCl₂, byl uvolněn až pomocí dalšího extrakčního činidla BD. Na množství P extrahovaného ve třetím kroku extrakce (pomocí NaOH) ani na celkové množství extrahovaného P ve většině případů neměla koncentrace MgCl₂ průkazný vliv (tab. 7).

Pomocí variant v 1. kroku extrakce s přidavkem Ca bylo extrahováno ve většině případů průkazně méně RRP i VRP než pomocí variant bez Ca (tab. 7). Tento výsledek nevyvrací teorii stabilizace buněčných membrán přidavkem Ca. Podle nízkého podílu formy NRP na VRP ve všech variantách MgCl₂ pravděpodobně extrahovaný P nepocházel z buněčné biomasy, varianty bez Ca zřejmě pouze účinněji desorbovaly P z povrchu buněk. Přídavek Ca tedy pravděpodobně stabilizoval některé vnější struktury buněk a chránil je proti rozpuštění MgCl₂. Na extrakci P v dalších krocích a celkové množství extrahovaného P přídavek Ca většinou neměl průkazný vliv.

Tab. 7: Výsledky statistických testů nulových hypotéz: „extrahované množství P se neliší při použití různé koncentrace MgCl₂“ a „extrahované množství P se neliší ve variantách s přidavkem a bez přidavku Ca“. Hvězdičky označují hladinu významnosti, na které byla nulová hypotéza zamítnuta při analýze variance a použití Tukeyho testu (***) $\alpha << 0,01$; ** $\alpha = 0,01$; * $\alpha = 0,05$), v tab. 6A je obsah extrahovaného RRP a v tab. 6B obsah VRP.

7A		1. frakce	BD	NaOH	MgCl ₂ +BD	MgCl ₂ +BD+NaOH
<i>Chroococcus</i>						
koncentrace	MgCl ₂	1M > 0.1M***	0.1M > 1M***	0.1M > 1M***	neliší se	0.1M > 1M***
	MgCl ₂ +Ca	1M > 0.1M***	neliší se	neliší se	1M > 0.1M***	neliší se
přídavek Ca	1M MgCl ₂	- Ca > + Ca***	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se
	0.1M MgCl ₂	- Ca > + Ca***	- Ca > + Ca***	neliší se	- Ca > + Ca***	- Ca > + Ca***
<i>Cuspidothrix</i>						
koncentrace	MgCl ₂	1M > 0.1M***	0.1M > 1M***	neliší se	neliší se	0.1M > 1M*
	MgCl ₂ +Ca	neliší se	0.1M > 1M*	0.1M > 1M*	0.1M > 1M***	0.1M > 1M***
přídavek Ca	1M MgCl ₂	- Ca > + Ca***	+ Ca > - Ca*	neliší se	neliší se	neliší se
	0.1M MgCl ₂	neliší se	neliší se	neliší se	+ Ca > - Ca*	+ Ca > - Ca*
<i>Monoraphidium</i>						
koncentrace	MgCl ₂	1M > 0.1M***	0.1M > 1M***	neliší se	neliší se	neliší se
	MgCl ₂ +Ca	1M > 0.1M***	0.1M > 1M*	neliší se	neliší se	neliší se
přídavek Ca	1M MgCl ₂	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se
	0.1M MgCl ₂	- Ca > + Ca*	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se
<i>Rhodocista</i>						
koncentrace	MgCl ₂	1M > 0.1M***	neliší se	0.1M > 1M***	1M > 0.1M***	1M > 0.1M*
	MgCl ₂ +Ca	1M > 0.1M***	neliší se	0.1M > 1M***	1M > 0.1M***	1M > 0.1M***
přídavek Ca	1M MgCl ₂	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se
	0.1M MgCl ₂	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se

		1. frakce	BD	NaOH	MgCl ₂ +BD	MgCl ₂ +BD+NaOH
<i>Chroococcus</i>						
koncentrace	MgCl ₂	1M > 0.1M***	0.1M > 1M*	neliší se	1M > 0.1M***	neliší se
	MgCl ₂ +Ca	1M > 0.1M***	neliší se	neliší se	1M > 0.1M***	neliší se
přídavek Ca	1M MgCl ₂	- Ca > + Ca***	neliší se	neliší se	- Ca > + Ca***	neliší se
	0.1M MgCl ₂	- Ca > + Ca***	neliší se	neliší se	- Ca > + Ca***	- Ca > + Ca*
<i>Cuspidothrix</i>						
koncentrace	MgCl ₂	1M > 0.1M***	neliší se	0.1M > 1M***	1M > 0.1M**	neliší se
	MgCl ₂ +Ca	neliší se	0.1M > 1M*	neliší se	neliší se	neliší se
přídavek Ca	1M MgCl ₂	- Ca > + Ca***	- Ca > + Ca***	+ Ca > - Ca***	- Ca > + Ca***	- Ca > + Ca**
	0.1M MgCl ₂	- Ca > + Ca***	+ Ca > - Ca***	- Ca > + Ca*	neliší se	neliší se
<i>Monoraphidium</i>						
koncentrace	MgCl ₂	1M > 0.1M***	0.1M > 1M***	neliší se	neliší se	neliší se
	MgCl ₂ +Ca	1M > 0.1M***	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se
přídavek Ca	1M MgCl ₂	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se
	0.1M MgCl ₂	- Ca > + Ca***	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se
<i>Rhodocista</i>						
koncentrace	MgCl ₂	1M > 0.1M***	neliší se	0.1M > 1M*	1M > 0.1M*	neliší se
	MgCl ₂ +Ca	1M > 0.1M***	neliší se	0.1M > 1M***	1M > 0.1M***	neliší se
přídavek Ca	1M MgCl ₂	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se
	0.1M MgCl ₂	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se	neliší se

5.3 Souhrnné charakteristiky sinicových nárostů

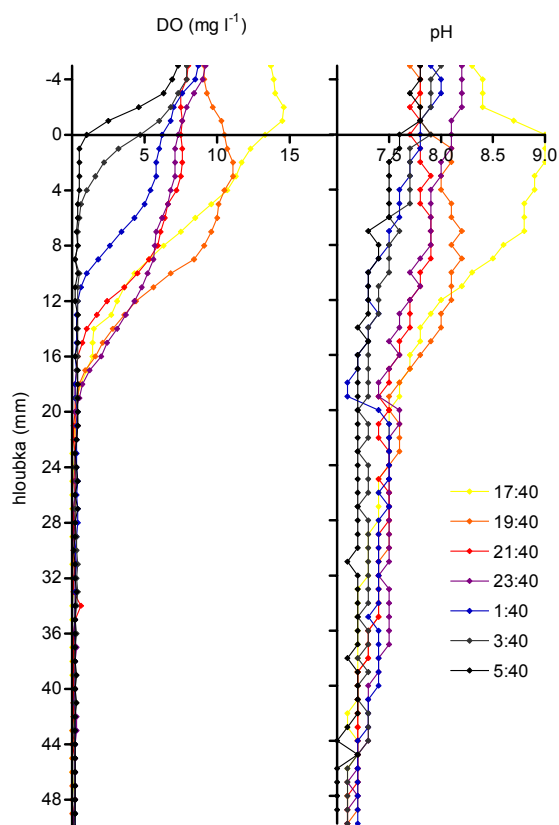
5.3.1 Koncentrace DO, pH a teplota

Vertikální profily koncentrace DO a pH ve studovaném CBM během dne jsou znázorněny na obr. 3.

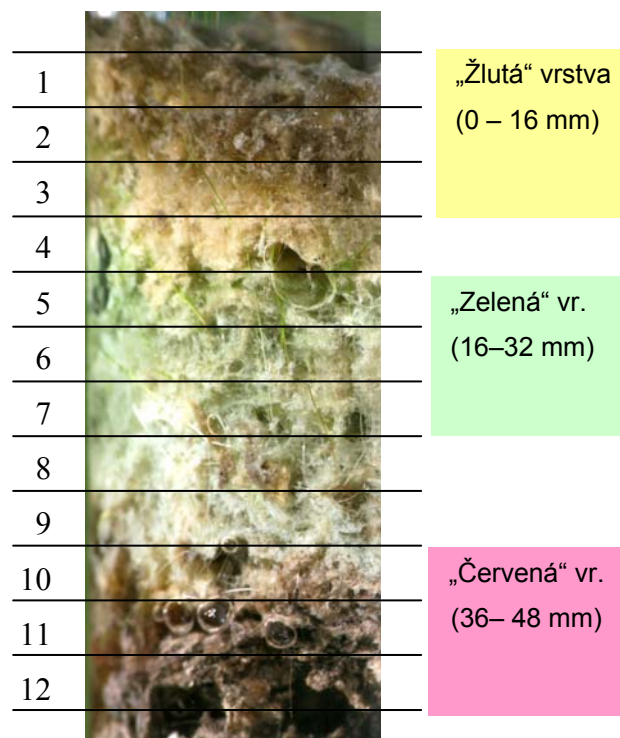
Zbytkový obsah koncentrace DO se během dne měnil pouze ve „žluté“ a částečně i v „zelené“ vrstvě (obr. 4). V 17:40 bylo na povrchu CBM (hloubka 0 mm) asi 15 mg l⁻¹ DO, dále se s přibývajícím hloubkou jeho obsah snižoval až k nule (přibližně v hloubce 24 mm). S ubývajícím světlem a snižující se intenzitou fotosyntézy obsah DO postupně klesal i ve svrchních vrstvách. O půlnoci bylo na povrchu jen 7 mg l⁻¹, ve 3:40 asi 5 mg l⁻¹ a v 5:40 už byl celý profil CBM téměř anoxický.

Hodnota pH se během dne očekávaně měnila podle intenzity probíhajících procesů, především fotosyntézy, ve „žluté“ a „zelené“ vrstvě (obr. 4). V 17:40 bylo na povrchu CBM pH 9 a s přibývajícím hloubkou se snižovalo až na pH 7,5 (přibližně v hloubce 24 mm), dále už klesalo jen velmi mírně na hodnotu 7 v hloubce 70 mm. Po setmění byla přerušena fotosyntéza a pH rychle pokleslo i ve svrchních vrstvách přibližně na hodnotu 8. Ráno bylo pH v celém profilu přibližně 7 – 7,5.

V průběhu dne se teploty vody nad nárostem pohybovaly v rozmezí 25 – 26 °C.



Obr. 3: Koncentrace DO a pH ve vertikálním profilu CBM. Barevně odlišené křivky znázorňují časy měření během dne a noci.



Obr. 4: Příčný řez odebraným CBM a schématické znázornění jeho rozdělení na 12 vrstev zařazených do 3 částí podle barev.

5.3.2 Obsah NL, ZŽ a celkové obsahy vybraných prvků

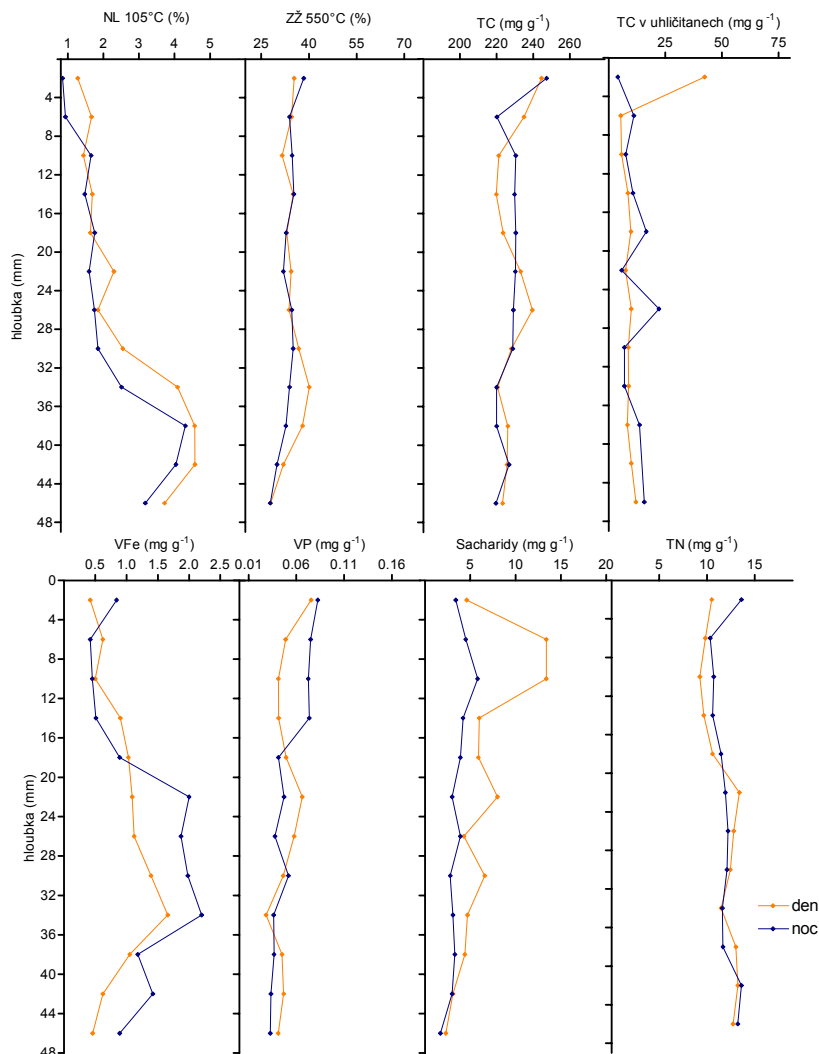
U obou vzorků CBM se procentuální obsah NL s hloubkou zvyšoval (obr. 5). Ve „žluté“ a „zelené“ vrstvě (hloubka 0 – 28 mm) byl obsah NL v „denním“ a „nočním“ vzorku stejný (pohyboval se kolem 1,5 %). V „červené“ vrstvě obou vzorku byl obsah NL vyšší, nejvyšší hodnota byla zjištěna v 10. vrstvě (4,4 %) a v poslední vrstvě (48 mm) se opět snížila na 3,1 % (v „nočním“) a 3,7 % (v „denním“ vzorku).

Hodnota ZŽ při 550°C se v „denním“ i „nočním“ vzorku pohybovala v celém profilu mezi 30 a 40 % (obr. 5).

Celkový obsah uhlíku (TC) ve vzorcích CBM se pohyboval mezi 220 a 240 mg g⁻¹, ve svrchních vrstvách obou vzorků dosahoval jeho obsah maxima. Samotné uhličitany potom obsahovaly 5 – 20 mg g⁻¹ TC, pouze v horní vrstvě „denního“ vzorku byl jejich obsah vyšší (42 mg g⁻¹).

Celkový obsah P byl u obou vzorků nejvyšší v 1. vrstvě ($0,07 \text{ mg g}^{-1}$ v „denním“ a $0,1 \text{ mg g}^{-1}$ v „nočním“ vzorku). Ve zbylých vrstvách se v obou vzorcích obsah P pohyboval mezi $0,04$ a $0,06 \text{ mg g}^{-1}$, ale ve vrstvách 7.-9. byl jeho obsah v „nočním“ vzorku mírně vyšší (obr. 5).

Celkový obsah Fe se u „nočního“ a „denního“ vzorku lišil více než obsah P. V 1. vrstvě byl v „nočním“ vzorku 2x větší obsah Fe než v „denním“ vzorku ($0,84$ a $0,42 \text{ mg g}^{-1}$), a v dalších vrstvách (2. – 5.) byl naopak vyšší obsah Fe v „denním“ vzorku. V ostatních hlubších vrstvách byl zase vyšší obsah Fe v „nočním“ vzorku (někdy až dvojnásobně). Maxima dosahovalo množství Fe v 9. vrstvě (u „denního“ vzorku $1,66 \text{ mg g}^{-1}$ a u „nočního“ $2,20 \text{ mg g}^{-1}$) (obr. 5).



Obr. 5: Procentuální obsah NL, hodnoty ZŽ při 550°C , celkový obsah TC, TC v uhlíčitanech, VFe, VP a TN ve vertikálním profilu „denního“ (den) a „nočního“ (noc) vzorku po lyofilizaci materiálu a obsah sacharidů v ekvivalentech glukózy po extrakci EPS z jednotlivých vrstev „denního“ (den) a „nočního“ (noc) vzorku CBM.

5.3.3 Obsah sacharidů v EPS

Obsah sacharidů v EPS se lišil v jednotlivých vrstvách „denního“ a „nočního“ vzorku (obr.5). V celém profilu byl zjištěn vyšší obsah sacharidů v „denním“ vzorku s největšími rozdíly ve „žluté“ vrstvě (kolem 5 mg g⁻¹ ekv.glu. v „nočním“ a 13 mg g⁻¹ ekv.glu. v „denním“ vzorku). Ve 3. vrstvě bylo u obou vzorků změřeno maximum a s hloubkou nárůstu se vždy obsah sacharidů snižoval.

5.4 Frakcionace P v sinicových nárůstech

Pomocí frakcionace P v CBM byly zjištěny rozdíly v zastoupení jednotlivých forem P ve vertikálním profilu „denního“ a „nočního“ vzorku. Obsah různých forem P extrahovaných ze vzorků jednotlivými extrakčními činidly: 1 M MgCl₂; 0,1 M BD; 0,1 M NaOH; 1 M Na-Ac; 0,5 M HCl; a 1 M NaOH₈₅ je zobrazen na obr. 6.

5.4.1 Obsah VRP, NRP a RRP

Ve frakcionaci P bylo celkem extrahováno 0,59 mg g⁻¹ VRP z „denního“ a 0,62 mg g⁻¹ VRP z „nočního“ vzorku CBM. Lišilo se však zastoupení jednotlivých frakcí P a průběh jejich hodnot ve vertikálním profilu. V bloku 2 jsou popsány typické hodnoty zastoupení forem VRP, RRP a NRP ve jednotlivých frakcích a jejich rozdíly mezi vrstvami v „denním“ vzorku (blok 2A) a „nočním“ vzorku (blok 2B). V bloku 2C jsou potom zdůrazněny vzájemné rozdíly a podobnosti mezi „denním“ a „nočním“ vzorkem. Na obr. 6 je zastoupení forem VRP a RRP ve frakcích vertikálních profilů obou vzorků.

Blok 2: Zastoupení P v jednotlivých frakcích ve vertikálním profilu „denního“ (2A) a „nočního“ (2B) vzorku CBM a jejich srovnání (2C).

2A: „Denní“ vzorek:

- MgCl₂: - obsah extrahovaného VRP má v 1. vrstvě jedno maximum (0,033 mg g⁻¹), dále pokles na 0,014 mg g⁻¹, v 6. vrstvě další maximum, v hlubších vrstvách pokles až na minimum v 9. vrstvě (0,005 mg g⁻¹) a opět mírný nárůst ve spodních vrstvách
 - stejný průběh i RRP a NRP, obsah NRP přibližně poloviční oproti RRP
- BD: - všechny formy P stejný průběh jako v 1. frakci, ale hodnoty nižší (VRP 0,002 – 0,01 mg g⁻¹)
- NaOH: - extrahovaný VRP mezi 0,007 a 0,009 mg g⁻¹, pouze v 1.vrstvě více (0,025 mg g⁻¹)
 - téměř veškerý VRP zastoupen formou NRP
- Na-Ac: - extrahováno mezi 0,01 – 0,015 mg g⁻¹ VRP
 - téměř veškerý VRP tvořila forma RRP
- HCl: - obsah VRP nízký (0,001 – 0,003 mg g⁻¹), vyšší obsah pouze v 1. a 4. vrstvě (0,009 mg g⁻¹)

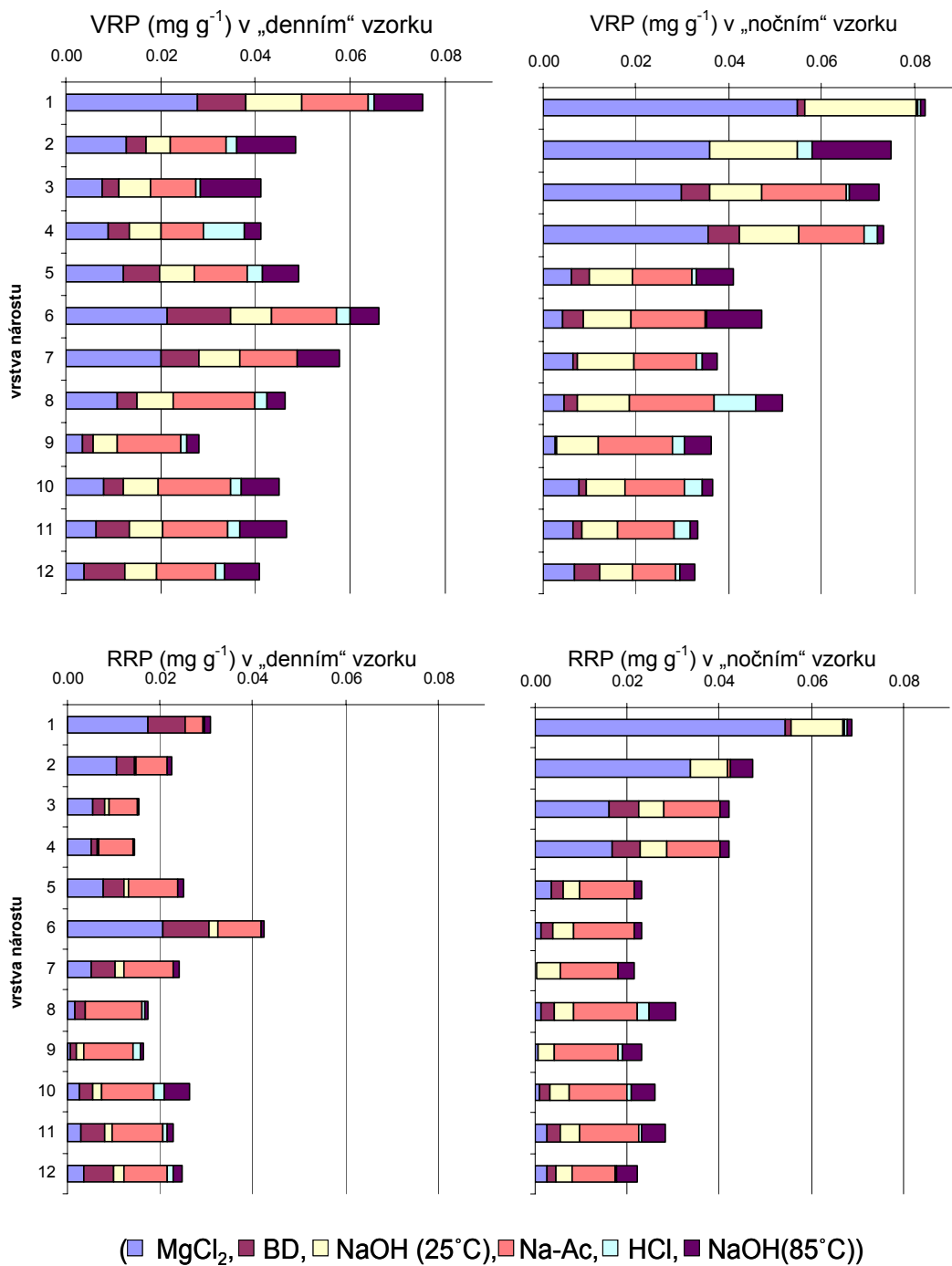
- téměř celé extrahované množství VRP ve formě NRP
- NaOH_{85} : - VRP mezi $0,015 - 0,02 \text{ mg g}^{-1}$, vyšší hodnota v 1.vrstvě ($0,038 \text{ mg g}^{-1}$)
 - tvořen téměř výhradně NRP

2B: „Noční“ vzorek:

- MgCl_2 : - extrahovaný VRP mnohem vyšší v 1. – 4.vrstvě ($0,055 \text{ mg g}^{-1}$ v 1. a přibližně $0,035 \text{ mg g}^{-1}$ v 2. – 4. vrstvě), v hlubších vrstvách kolem $0,006 \text{ mg g}^{-1}$
 - RRP tvořil většinu VRP v 1. a 2. vrstvě, hlouběji zastoupení forem RRP a NRP přibližně rovnocenné
- BD: - obsah VRP velmi nízký, vyšší ve 3. – 6., 11. a 12. vrstvě (kolem $0,005 \text{ mg g}^{-1}$)
 - VRP tvořila výhradně forma RRP
- NaOH: - extrahovaný VRP kolem $0,01 \text{ mg g}^{-1}$, z 1.vrstvy extrahováno více ($0,024 \text{ mg g}^{-1}$)
 - téměř veškerý VRP zastoupen formou NRP
- Na-Ac: - téměř žádný VRP z 1. a 2. vrstvy, v ostatních vrstvách kolem $0,018 \text{ mg g}^{-1}$, ve spodních mírný pokles
 - ve všech vrstvách tvořila více než $\frac{3}{4}$ VRP forma RRP
- HCl: - obsah VRP nízký, patrný pouze ve vrstvách 8.-11. (kolem $0,003 \text{ mg g}^{-1}$)
 - větší část VRP zastupovala forma NRP
- NaOH_{85} : - extrahovaný VRP vyšší ve vrstvách 2., 5. a 6. (kolem $0,01 \text{ mg g}^{-1}$), v ostatních $0,001 - 0,006 \text{ mg g}^{-1}$

2C: Srovnání obsahu P v „denním“ a „nočním“ vzorku

- v „denním“ vzorku obecně vyšší podíl NRP na celkovém obsahu VRP
- MgCl_2 : - „denní“ vzorek: maximum VRP v 6. vrstvě
 - „noční“ vzorek: maximum v 1. – 4. vrstvě
- BD: - NRP i RRP mnohem vyšší v „nočním“ vzorku
- NaOH: - NRP podobný průběh i velikost
 - obsah RRP v „nočním“ vzorku větší ve všech vrstvách
- Na-Ac: - RRP i NRP podobný průběh i velikost, ale v „nočním“ vzorku nezjištěn v 1. vrstvě
- HCl: - RRP zanedbatelný ve všech vrstvách „denního“ i „nočního“ vzorku
 - obsah NRP také nízký: v „nočním“ vzorku maximum v 8.vrstvě, v „denním“ maxima v 1. a 4. vrstvě
- NaOH_{85} : - RRP extrahovaný v „denním“ vzorku velmi nízký s maximem v 10. vrstvě, v „nočním“ hodnoty RRP vyšší v celém profilu kromě 3.-6. vrstvy
 - NRP vyšší v „denním“ vzorku, v „nočním“ se mu hodnoty blíží pouze v maximech v 2. a 6. vrstvě zatímco „denní“ maxima jsou ještě větší



Obr. 6: Zastoupení frakcí VRP a RRP ve vertikálním profilu „denního“ a „nočního“ vzorku CBM.

6. Diskuze

6.1 Ověření analytických metod

Pardo et al. (1998) uvádí, že spektrofotometrické stanovení P metodou molybdenanové modře ruší EDTA, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ a $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ a pro snížení interferenčních vlivů je nutné používat nízké koncentrace vzorků v těchto matricích. Podle metodiky stanovení P (Kopáček & Hejzlar, 1995) ruší signál každé snížení koncentrace H^+ iontů. Po vypočtení úbytku H^+ iontů v matricích MgCl_2 , BD a NaOH byl stanoven potřebný přídavek 3,2 M HClO_4 nutný na vyrovnání koncentrace H^+ iontů ve vzorcích. Typ a koncentrace přidané kyseliny hraje důležitou roli pro vyvinutí a stabilitu barevných komplexů a při použití kyseliny chloristé by měla být koncentrace H^+ iontů nižší než $0,6 \text{ mol l}^{-1}$ (Pardo et al., 1998).

Podářilo se najít optimální podmínky, které zahrnovaly přídavek HClO_4 , dobu dobarvování a stability barevných komplexů (Kopáček & Hejzlar, 1993).

6.2 Zavedení metody frakcionace P v biomase mikroorganismů

6.2.1 Stechiometrie růstu kultur

Pro laboratorní pokusy bylo nutné používat mikroorganismy, které se nacházejí v určitém stádiu růstu, což bylo testováno pomocí zjištění nárůstu obsahu NL, příjmu P z média a zvýšení hodnoty pH média.

Po šesti měsících kultivace v růstovém médiu s P (t_0) rostla biomasa pěstovaných kultur mikroorganismů v novém médiu bez P ještě 7 dní (t_7). Nárůst obsahu NL (t_7-t_0) by měl odpovídat přibývání biomasy mikroorganismů. Úbytek obsahu P v médiu by měl teoreticky odpovídat obsahu P v sušině narostlé biomasy, ale v praxi lze teoretickou spotřebu P srovnávat s úbytkem P pouze u kultur *Monoraphidium* a *Chroococcus*. Kultura *Cuspidothrix* teoreticky potřebovala méně P než do biomasy ve skutečnosti zabudovala a kultura *Rhodocista* byla velmi hustá, podle výpočtu potřebovala nejvíce P, ale v praxi naopak ještě P do média uvolňovala.

Dále bylo na růst mikroorganismů usuzováno podle změřeného pH v čase t_7 . Zvýšení pH bylo zřejmě způsobeno posunem uhličitanové rovnováhy kvůli spotřebě CO_2 fotosyntézou a lze tedy předpokládat, že obě sinice (*Chroococcus* i *Cuspidothrix*) rostly velmi dobře zatímco řasa *Monoraphidium* zřejmě nebyla schopna intenzivní fotosyntézy působením

stresových podmínek kultivace, i když P z média spotřebovávala. Pro mírné zvýšení pH v kultuře heterotrofní bakterie *Rhodocista* není známa příčina.

6.2.2 Promývání biomasy mikroorganismů

Před frakcionací P bylo nutné odstranit P obsažený v růstovém médiu. Velký podíl RRP v pracích roztocích mohl být způsoben jeho vypouštěním z buněk, které pravděpodobně následovalo po výrazném snížení iontové síly v prostředí, jež obklopovalo buňky mikroorganismů (převedení biomasy z růstového média do destilované vody). Proto bylo pro další promývání biomasy mikroorganismů používáno jejich růstové médium připravené bez obsahu P.

6.2.3 Kinetika frakcionace P

Z výsledků závislosti množství extrahovaného P na době působení extrakčních činidel jsou částečně zřejmé důvody pro zvolení dané doby jejich působení ve schématu frakcionace P. Doba působení by teoreticky měla být zvolena v takovém časovém intervalu, ve kterém se množství extrahovaného P příliš nemění (křivka je konstantní).

U činidla $MgCl_2$ se však množství extrahovaného VRP v čase 0 až 12 h stále prudce zvyšovalo, i když jeho doba působení ve frakcionačních postupech pro extrakci sedimentů je pouze 1 h (Ruttenberg, 1992; Jensen et al., 1998). Je možné se domnívat, že při práci s mikroorganismy dochází při delší době působení velké koncentrace solí k rozrušení buněk a přestupu organického P do roztoku. Tato úvaha je podpořena i množstvím extrahovaného RRP, které je od 0 do 6 h konstantní. Klock et al. (2007) extrahoval EPS ze CBM pomocí 10 % NaCl při teplotě 40°C po dobu 15 min. V této práci působilo místo 15 min extrakční činidlo 1 M $MgCl_2$ (tedy 10 % roztok) po dobu 60 min při teplotě 20°C, což lze považovat za srovnatelné, neboť dle Arrheniovy rovnice klesá s každým snížením teploty o 10° rychlost reakce 2x až 4x.

Při extrakci P pomocí činidla BD bylo množství extrahovaného P v intervalu působení 1-8 h téměř konstantní a pak se začalo prudce zvyšovat. Správná doba působení by teda měla ležet mezi 1 a 8 h a pro úsporu času v celé proceduře byla zvolena doba 1 h.

Činidlo NaOH extrahovalo od 0 do 8 h stále vyšší množství P, ale s delší dobou působení už se jeho obsah příliš nezvyšoval. Proto bylo vhodné zvolit dobu působení vyšší než 8 h a pro frakcionační schéma bylo zvoleno 18 h.

6.2.4 Frakcionace P v biomase pokusných kultur

Byla zjišťována možnost vzniku sraženin P s 1 M $MgCl_2$ pomocí výpočtu srážecích konstant (Ks) pro sloučeniny P s Mg a Ca o různém stechiometrickém složení. Po přefiltrování extrahovaného roztoku přes filtr se schopností zachytit částice $> 0,4 \mu m$ by se mohly vzniklé sraženiny zachytit na filtru a skutečně extrahovaný P by tedy nebyl stanoven v měřeném RRP ani VRP. Porovnání vypočtených Ks pro dané koncentrace iontů v roztoku s tabelovanými Ks, při kterých už je sloučenina přítomna v pevné fázi, ukázalo, že za daných podmínek není vznik zkoumaných sraženin umožněn.

Z výsledného množství extrahovaného NRP je patrné, že ani 1M $MgCl_2$ neextrahoval buněčný P. Není tedy nutné používat přídavek Ca, protože se membrány buněk nemusí stabilizovat proti narušení extrakčním činidlem $MgCl_2$. Buňky mikroorganismů nebyly narušeny, pouze byly rozpuštěny neživé struktury na jejich povrchu (EPS). Klock et al. (2007) pro svou studii složení EPS ze CBM označil jako nejvhodnější metodu extrakce EPS extrakci pomocí 10 % NaCl, což odpovídá koncentraci 1M $MgCl_2$. Nižší koncentrace $MgCl_2$ by extrahovala tento významný rezervoár neúplně, což se také projevilo ve vyrovnání rozdílů v obsahu extrahovaného P pomocí různých variant koncentrace $MgCl_2$ a přídavku Ca v BD frakci.

Na rozdíly ve výsledném množství extrahovaného P u 4 pokusných kultur by mohlo mít vliv různé složení jejich kultivačních médií. Při přechodu buněk mezi různými prostředími může hrát velkou roli iontová síla prostředí a osmotický tlak. Nejmenší iontovou sílu má médium „Z“ pro řasy, pak „BG11“ pro sinice a největší iontovou sílu (jako iontová síla extrakčního činidla 0,1M NaOH) má médium „102“ pro bakterie, které se od ostatních médií liší i v obsahu jednotlivých prvků (příloha III.). Obsahuje velké množství chloridů, draslíku a P, ale neobsahuje zase žádné Fe. Je tedy možné předpokládat, že buňky kultury *Rhodocista* jsou zvyklé na vysoký osmotický tlak ve svém kultivačním médiu a při přenesení do velkého osmotického tlaku v extrakčním činidle 1 M $MgCl_2$ nenastane osmotický šok buněk. Tato úvaha by mohla vysvětlovat fakt, že z kultury *Rhodocista* bylo celkově vyextrahováno nejméně P.

6.3 Srovnatelnost vzorků nárostů

Předpokládáme, že plošná heterogenita sinicových nárostů ve studované oblasti byla velmi nízká, na což lze usoudit ze srovnání souhrnných charakteristik nárostů (NL, ZŽ (550 °C), TC, TN, VFe) zejména ve „žluté“ a „zelené“ vrstvě. Odlišné vertikální profily v „denním“ a „nočním“ vzorku byly zjištěny pro koncentrace VP, kdy v horních 16 mm v „nočním“ vzorku došlo k jejich nárůstu, což je v souladu s výsledky analýzy frakčního složení P. Přestože se nárosty na studované lokalitě nevyskytují po celý rok, zjištěné hodnoty shora uvedených parametrů odpovídají výsledkům analýz provedených na vzorcích odebraných v předchozích letech (Sirová, ústní sdělení).

6.4 Frakcionace P v sinicových nárostech

Součet množství VRP extrahovaného všemi extrakčními činidly v celém profilu „denního“ vzorku ($0,59 \text{ mg g}^{-1}$) je srovnatelný (5 % odlišnost) s obdobným součtem pro „noční“ vzorek ($0,62 \text{ mg g}^{-1}$). Z toho vyplývá, že celkový obsah VRP se v CBM v denním cyklu nemění.

Mění se však zastoupení obsahu VRP extrahovaného v jednotlivých frakcích (především v prvních 3) v horní polovině vertikálního profilu nárostu. Ze „žluté“ vrstvy bylo pomocí činidla MgCl_2 extrahováno mnohem více VRP v „nočním“ vzorku. Obr. 7 znázorňuje frakce „denního“ vzorku, ze kterých se VRP pravděpodobně přesunul do MgCl_2 frakce ve „žluté“ vrstvě „nočního“ vzorku. Srovnávány jsou rozdíly v obsahu VRP extrahovaným činidly MgCl_2 , BD a Na-Ac ve „žluté“ a částečně i v „zelené“ vrstvě obou vzorků a $\delta(P)$ je vypočtena jako rozdíl koncentrace P v dané frakci v „denním“ vzorku a koncentrace P ve stejné frakci „nočního vzorku“. Možné procesy způsobující přesuny RRP mezi „denním“ a „nočním“ vzorkem jsou v obr.7 zobrazeny písmeny A-E a v následném textu jsou pak popsány potenciální příčiny probíhajících procesů.

VRP (mg g ⁻¹)			
frakce	„denní“v.	δ (P)	„noční“ v.
MgCl ₂	0.06	-0.10	0.16
BD	0.02	0.01	0.01
Na-Ac	0.03	0.03	0.00
MgCl ₂	0.05	0.04	0.02
BD	0.03	0.02	0.01
Na-Ac	0.04		0.04
MgCl ₂	0.02		0.02
BD	0.02		0.01
Na-Ac	0.04		0.03
celkem	0.59		0.62

Obr. 7: Srovnání obsahu VRP extrahovaného ve frakcích MgCl₂, BD a Na-Ac ve žluté, zelené a červené vrstvě „denního“ a „nočního“ vzorku CBM. Zakroužkované hodnoty znázorňují přesuny VRP mezi jednotlivými frakcemi během dne a hodnoty v hranatých rámečcích jsou jejich rozdíly vypočteny podle rovnice: $\delta(P) = (c(P)_{\text{frakce, vrstva den}}) - (c(P)_{\text{frakce, vrstva noc}})$. Písmena A-E označují možné mechanismy přesunů VRP a jsou popsány v následujícím textu.

A) Přesun P v MgCl₂ frakci do žluté vrstvy „nočního“ vzorku vlivem změny pH

Ve „žluté“ vrstvě bylo ve frakci MgCl₂ extrahováno více VRP v „nočním“ vzorku, protože při nižší hodnotě pH má EPS lepší vazebné schopnosti díky změně náboje (protonizaci) $-\text{NH}_3^+$ skupin obsažených na povrchu EPS (Plette et al., 1995).

Plette et al. (1995) zkoumal závislost náboje stěn gram-pozitivních bakterií na pH. V buněčné stěně byl hojně zastoupen peptidoglykan s reaktivními karboxylovými a amino skupinami. Se zvyšujícím se pH tyto funkční skupiny deprotonují a tvoří na buněčných stěnách záporný náboj. Logaritmická hodnota protonizační konstanty ($\log K_H$) pro skupinu $-\text{COOH}/-\text{COO}^-$ je 4,8 a pro $-\text{NH}_3^+/-\text{NH}_2$ 9,7 (Martell & Smith, 1974). Při hodnotě pH nižší než tyto konstanty jsou převážným dílem zastoupeny protonizované formy $-\text{COOH}$ a $-\text{NH}_3^+$, ale tyto formy se v prostředí vyskytují v nedominantním množství i při vyšším pH.

MacLean et al. (2004) ve své studii potvrzuje, že při nižším pH jsou prostřednictvím protonace amino skupin v peptidoglykanu nebo strukturních bílkovinách generována pozitivně nabitá místa, na která se mohou anionty asociovat. V noci při pH 7 je tedy pravděpodobně vyšší podíl amino skupin v protonizované formě, což umožňuje navázání více P než při pH 9 ve dne.

B, E) Přesun P v BD frakci do „denního“ vzorku vlivem změny obsahu DO

Obsah VRP extrahovaného pomocí činidla BD byl ve „žluté“ i „zelené“ vrstvě v „denním“ vzorku vyšší než v „nočním“. Redox-labilní P je při frakcionaci P uvolněn z pevné fáze po redukcí dithioničitanem sodným. Tento P je totiž adsorbován na povrch nebo tvoří fosforečnany s oxyhydroxidy Fe a Al, které se při snížení redoxního potenciálu rozpuštějí a uvolní tím i navázaný P (Pitter, 1999). Ve dne je v CBM vyšší koncentrace DO (obr.3) a tedy je zde i vyšší redoxní potenciál, který umožňuje výskyt oxyhydroxidů Fe a Al s navázaným P v nerozpuštěné formě.

C) Přesun P v Na-Ac frakci do žluté vrstvy „denního“ vzorku vlivem změny pH

V Na-Ac frakci je extrahován VRP vysrážený přítomnými authigenními uhličitany. Hydroxylapatit a další tuhé fáze vznikající při srážení fosforečnanů vápenatými solemi mají nejnižší rozpustnost ve slabě alkalické oblasti pH (Pitter, 1999). Podle hodnot pH ve vertikálním profilu CBM je v jeho horních vrstvách ve dne pH kolem 9 a v noci pouze kolem 7 (obr. 3), a proto je větší množství sraženin P s CaCO_3 v pevné fázi přítomno v „denním“ vzorku. K rozpouštění uhličitánů však v „denním“ vzorku docházelo pouze ve svrchních 2 vrstvách (0 – 8 mm) (obr.6).

Otsuki & Wetzel (1972) zjistili, že při vyšším pH (9,5 – 10) bylo více než 74 % RRP ve vodě vápencového jezera odstraněno koprecipitací nebo adsorpcí na přítomný CaCO_3 . Rejmánková & Komárková (2000) měřily obsah forem P ve vodě v mokřadech Belize, kde 48 – 72 % vysráženého P bylo odstraněno abiotickou adsorpcí, zatímco v práci Scinto & Reddy (2003) byl vyšší podíl (83 %) P odstraněn z vody biotickou cestou.

D) Přesun P v MgCl_2 frakci do zelené vrstvy „denního“ vzorku vlivem změny obsahu EPS

Z výsledků analýzy sacharidů v EPS (obr. 5) je patrné, že množství EPS bylo v „denním“ vzorku výrazně vyšší hlavně ve vrstvách 4 – 32 mm, což souhlasí s tvrzením, že tvorba EPS bývá nejvyšší v místech s nejvyšší fotosyntetickou aktivitou (Decho et al., 2005). Obsah VRP extrahovaného činidlem MgCl_2 byl vyšší v „zelené“ vrstvě v „denním“ vzorku, protože se zde nacházelo větší množství EPS, na jehož skupiny mohl být P navázaný.

Chubar et al. (2008) zjistila, že bakteriální buňky jsou potenciální sorpční místa pro záporně nabitě kontaminanty a sinicové buňky a jejich EPS by pravděpodobně mohly poskytovat podobné funkční skupiny pro vazbu PO_4^{3-} . Sorpční místa mohou být rovněž

potenciálně asociována s přítomnými proteiny, fosfolipidy a polysacharidy (Rheinheimer, 2004).

Sorpce aniontů (jako je PO_4^{3-}) na povrch EPS může být umožněna v přítomnosti vícemocných kationtů, které tvoří můstky mezi skupinou $-\text{COO}^-$ na povrchu EPS a sorbovaným aniontem (Wightman & Fein, 2001). Sutherland (2001a) také potvrzuje možnost specifické reakce některých iontů s karboxylovými skupinami nacházejícími se na povrchu EPS za vzniku makromolekulárních sítí.

6.5 Srovnání výsledků pro nárosty se sedimenty

Přestože se sladkovodní sedimenty a CBM svými vlastnostmi velmi liší, bylo možné použít pro doplnění informací o P v CBM metody studia P ve vertikálním profilu sedimentů.

Vstupy i výstupy P ze systému do okolí bývají v sedimentech mnohem vyšší než v CBM, kde naopak probíhají významné diurnální přesuny P ve vertikálním profilu. Velký přísun P do sedimentů pochází z usazených erodovaných částic a z odumřelých organismů a často také při změně podmínek dochází k jeho zpětnému uvolňování ze sedimentů do vody. Celý ekosystém CBM je naopak limitovaný P a ve vodním prostředí je jeho koncentrace velmi malá. Mikroorganismy využívají četné metabolické adaptace k jeho získání, a proto také z CBM do vnějšího prostředí odchází jen zanedbatelné množství P.

Z jednotlivých složek P je v CBM mnohem dominantnější autotrofní složka a významější její primární produkce než v sedimentech, kde se tato složka většinou nevyskytuje. V zastoupení frakcí P v sedimentech a překvapivě i v CBM představuje buněčný P pouze minoritní složku. V sedimentech je obvykle významně zastoupen P ve sloučeninách Fe a Al, ale v CBM tato složka nebyla příliš velká. Stejně jako ve vápenatých sedimentech bylo v CBM z vápencové oblasti očekáváno dominantní zastoupení P v uhličitanech, ale tato hypotéza potvrzena nebyla. Obsah P v uhličitanech byl srovnatelný se složkou P v EPS, o které zatím nejsou dostupné informace pro sedimenty ani pro CBM. Její úloha je pravděpodobně větší v materiálu CBM, protože se zde nachází i větší podíl mikroorganismů, které mohou EPS produkovat. Význam složky EPS narůstá při posuzování diurnálních přesunů P ve vertikálním profilu CBM. Z důvodu menšího zastoupení této složky P v sedimentech zde zřejmě probíhají i méně výrazné přesuny P.

Podíl jednotlivých mechanismů, které řídí přesuny P v CBM se od sedimentů velmi liší. V CBM vznikají díky metabolismu autotrofní složky mnohem výraznější vertikální gradienty v obsahu DO a hodnotě pH. V sedimentech pH se ve vertikálním profilu obvykle

mění pouze nepatrně, a proto příliš neovlivňuje probíhající procesy. Koncentrace DO však s hloubkou sedimentů prudce klesá, a proto zde také představuje hlavní řídicí mechanismus přesunů P, zejména redox-labilního P. V materiálu CBM má redox-labilní P nevýznamné zastoupení (dáno o více než jeden řád nižšími koncentracemi Fe ve srovnání se sedimenty), a proto obsah DO v celkovém měřítku nepředstavuje hlavní řídicí sílu pro přesuny P. Naopak přesuny P ze složky EPS a z uhličitanů jsou ovlivněny změnami pH a jejich dominantní zastoupení způsobí i z faktoru pH dominantní mechanismus přesunů P.

7. Závěr

Přestože jsou CBM důležitými modelovými systémy pro studium mikrobiální ekologie a výzkumu biogeochemických procesů s nimi spojených bylo věnováno značné úsilí, téměř zcela chybí informace týkající se koloběhu P. Tato magisterská práce předkládá několik nových poznatků o speciaci vybraných forem P ve vertikální struktuře CBM a jejich diurnálních změnách.

Z frakcionace P je patrné, že největšími rezervoáry P v tomto CBM představovaly EPS a uhličitany. I přes nízký obsah Fe v nárostu bylo nezanedbatelné množství P ve sloučeninách Fe obsaženo. Diurnální přesuny P mezi jednotlivými frakcemi a vrstvami byly řízeny zejména změnami pH (ovlivnily 65 % přesunů P), dále změnami v obsahu EPS (20 %) a změnami v obsahu DO (15 %). K rozpouštění uhličitánů docházelo pouze ve svrchní vrstvě nárostu. V rámci daných změn pH byl tedy P vázaný na uhličitany nemobilní frakcí, hlavní mobilní forma P byla v EPS. Z těchto výsledků vyplývá důležitost EPS jakožto zásobníku labilního P, pravděpodobně lehce dostupného pro mikroorganismy, což je v rozporu s v literatuře doposud uváděnou hypotézou o zásadní úloze uhličitánů (Scinto & Reddy, 2003).

CBM jsou považovány za uzavřený systém s velmi omezenou výměnou látek jak s vodním sloupcem, tak s podložím (Stal & Caumette, 1994). S největší pravděpodobností je tedy mikrobiální konsorcium CBM „soběstačné“ a P dočasně zpřístupněný během noci v rámci horních vrstev je dostačující k zajištění primární produkce a na ní vázané mikrobiální procesy během dne. Malé množství P, nejpravděpodobněji původem v sestonu vodního sloupce, pak může doplňovat P „pohřbený“ v CBM. Spodní vrstvy CBM, kde bylo nalezeno velké množství klidových stadií mikroorganismů (Sirová, nepublikované výsledky), nevykazovaly téměř žádné vertikální ani diurnální změny ve frakcích P ani v jiných sledovaných parametrech. Je pravděpodobné, že mikrobiální společenstvo má v této části značně zredukovaný metabolismus a díky nepříznivým podmínkám, ke kterým zřejmě patří i nedostatek dostupného P, byl v CBM růst mikrobiálních populací omezen pouze na nejsvrchnější vrstvy. Tato domněnka je v souladu s široce přijímanou hypotézou, že většina mikroorganismů se v přírodě vyskytuje ve stacionární fázi růstu (Kolter at al., 1993).

8. Seznam použité literatury

- Bebout, B., H. Paerl, K. Crocker & L. Prufert (1987): Diel interactions of oxygenic photosynthesis and N₂ fixation (acytelene reduction) in a marine microbial mat community. *Appl Environ Microbiol* 53:2353-2362
- Breitbart, M., A. Hoare, A. Nitti, J. Siefert, M. Haynes, E. Dinsdale, R. Edwards, V. Souza, F. Rohwer & D. Hollander (2009): Metagenomic and stable isotopic analyses of modern freshwater microbialites in Cuatro Ciénegas, Mexico. *Environ Microbiol* 11:16-34
- Canfield, D. E. & D. J. Des Marais (1993): Biogeochemical cycles of carbon, sulphur, and free oxygen in microbial mat. *Geochim Cosmochim Acta* 57:3971-3984
- Cloete, T. E. & D. J. Oosthuizen (2001): The role of extracellular exopolymers in the removal of phosphorus from activated sludge. *Wat Res* 35:3595-3598
- Cohen Y. & E. Rosenberg (1989): *Microbial mats. Physiological ecology of benthic microbial communities.* Washington: ASM
- Decho, A. W. (1990): Microbial exopolymer secretions in ocean environments: Their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 28:73-154
- Decho, A. W., P. T. Visscher & R. P. Reid (2005): Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite. *Paleogeog Paleoclimat Paleocol* 219:71-86
- De Philippis, R., C. Sili, R. Paperi & M. Vincenzini (2001): Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review. *J App Phycol* 13:293-299
- Des Marais, D. J. (1995): The biogeochemistry of hypersaline microbial mat. In: G. Jones (ed.): *Advances in microbial ecology* Vol. 14. Plenum Press, New York
- Des Marais, D. J. (2003): Biogeochemistry of hypersaline microbial mats illustrates the dynamics of modern microbial ecosystems and the early evolution of the biosphere. *Biol Bull* 204:160-167
- Diaz, O.A., K.R. Reddy & P.A. Moore Jr. (1994): Solubility of inorganic phosphorus in stream water as influenced by pH and calcium concentration. *Water Res* 28, 1755–1763
- Dignum, M. (2003): Phosphate uptake proteins as markers for the nutrient status of freshwater cyanobacteria. Ph.D. Dissertation, Universiteit van Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands, pp. 7-23
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers & F. Smith (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Dupraz, Ch. & P. T. Visscher (2005): Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats. *Trends in Microbiol* 13:429-438
- Emerson, D. & W. C. Ghiorse (1993): Ultrastructure and chemical composition of the sheath of *Leptothrix discophora* SP-6. *J Bacteriol* 175:7819-7827
- Flemming, H.-C., J. Wingender & C. Mayer (2000): Physico-chemical properties of biofilms. In: Evans, L. V., editor. *Biofilms: recent advances in their study and control.* Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p.19-34
- Fytianos, K. & A. Kotzakioti (2005): Sequential fractionation of phosphorus in lake sediments of northern Greece. *Environ Monit Assess* 100:191-200
- Gaiser, E. E., L. J. Scinto, J. H. Richards, K. Jayachandran, D. L. Childers, J. C. Trexler & R. D. Jones (2004): Phosphorus in periphyton mats provides the best metric for detecting low-level P enrichment in an oligotrophic wetland. *Wat Res* 38:507-516

Gleason, P. J. & W. Spackman (1974): Calcareous periphyton and water chemistry in the Everglades. In: Gleason, P. J. (Ed.), *Environments of South Florida: Present and Past*. Miami Geological Society Memoir No. 2, Coral Gable, FL, USA, pp.146-181

Grattan, S. R. & C. M. Grieve (1999): Salinity mineral nutrient relations in horticultural crops. *Sci Horticulturae* 78:127-157

Grimshaw, H. J., R. G. Wetzel, M. Brandenburg, K. Segerblom, L. J. Wenkert, G. A. Marsh, W. Charnetzky, J. E. Haky & C. Carraher (1997): Shading of periphyton communities by wetland emergent macrophytes: decoupling of algal photosynthesis from microbial nutrient retention. *Arch Hydrobiol* 139:17-27

Hejzlar J. & Kopáček J. (1998): Zkumavkové metody pro stanovení celkového manganu a celkového železa ve vodách. Sborník semináře Hydrochémia '98, Bratislava 21-22. 5. 1998, Pobočka SVHS ZSVTS pri VÚVH Bratislava, 69-77

Hieltjes, A. H. M. & L. Lijklema (1980): Fractionation of inorganic phosphates in calcareous sediments. *J Environ Qual* 9:405-407

Horáková, M., P. Lischke & A. Grünwald (1986): *Chemické a fyzikální metody analýzy vod*. SNTL, Praha

Hwang, S. J., K. E. Havens & A. D. Steinman (1998): Phosphorus kinetics of planktonic and benthic assemblages in a shallow subtropical lake. *Freshwater Biol* 40:729-45

Chang, S. C. & M. L. Jackson (1958): Soil phosphorus fractions in some representative soils. *J Soil Sci* 9:109-119

Chubar, N., T. Behrends & P. Van Cappellen (2008): Biosorption of metals (Cu^{2+} , Zn^{2+}) and anions (F^- , H_2PO_4^-) by viable and autoclaved cells of the gram-negative bacterium *Shewanella putrefaciens*. *Coll Surf B: Biointerfaces* 65:126-133

Jensen, H. S., K. J. McGlathery, R. Marino & R. W. Howarth (1998): Forms and availability of sediment phosphorus in carbonate sand of Bermuda seagrass beds. *Limnol Oceanogr* 43:799-810

Jørgensen, B. B., N. P. Revsbech & Y. Cohen (1983): Photosynthesis and structure of benthic microbial mats: microelectrode and SEM studies of four cyanobacterial communities. *Limnol Oceanogr* 28:1075-1093

Jørgensen, B. B. & D. Des Marais (1988): Optical properties of benthic photosynthetic communities: fiber optic studies of cyanobacterial mats. *Limnol Oceanogr* 33:99-113

King, R. B., I. C. Baillie, T. M. B. Abell, Dunsmore a 5 dalších autorů (1992): Land resources assessment of northern Belize. *Nat Resour Ins Bull* 43: pp. 513

Klock, J.-H., A. Wieland, R. Seifert & W. Michaelis (2007): Extracellular polymeric substances (EPS) from cyanobacterial mats: characterisation and isolation method optimisation. *Mar Biol* 152:1077-1085

Kolter, R., D. A. Siegele & A. Tormo (1993): The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annual Rev Microbiol* 47:855-874

Kopáček, J. & J. Hejzlar (1993): Semi-micro determination of total phosphorus in fresh waters with perchloric acid digestion. *Intern J Environ Anal Chem* 53:173-183

Kopáček, J. & J. Hejzlar (1995): Semi-micro determination of total phosphorus in soils, sediments, and organic materials: a simplified perchloric acid digestion procedure. *Commun Soil Sci Plant Anal* 26: 1935-1946

Leverenz, J. W., S. Falk, C.-M. Pilstrom & G. Samuelson (1990): The effects of photoinhibition on the photosynthetic light-response curve of green plant cells (*Chlamydomonas reinhardtii*). *Planta* 182:161-168

Litter, M. M. & D. S. Litter (1990): Productivity and nutrient relationships in psammophytic versus epilithic forms of Bryopsidales (Chlorophyta): Comparison based on a short-term physiological assay. *Hydrobiologia* 204/205:49-55

Martell, A. E. & R. M. Smith (1974): *Critical Stability Constants, Vol. 1: Amino Acids*, pp. 469, Plenum, New York.

Melack, J. M. & T. R. Fisher (1990): Comparative limnology of tropical floodplain lakes with emphasis on the central Amazon. *Acta Limnol Brazil* 3:1-48

McCormic, P. V. & M. D. O'Dell (1996): Quantifying periphyton responses to phosphorus in the Florida Everglades: a synoptic-experimental approach. *J Nor Am Benth Soc* 15:450-468

McCormick, P.V., P.S. Rawlik, K. Lurding, E.P. Smith & F.H. Sklar (1996): Periphyton–water quality relationships along a nutrient gradient in the northern Florida Everglades. *J New Am Benthol Soc* 15: 433–449

McCormick, P. V. & L. J. Scinto (1999): Influence of phosphorus loading on wetlands periphyton assemblages: a case study from Everglades. In: Reddy, K.R., G. A. O'Connor, C. L. Schelske (Eds.), *Phosphorus Biogeochemistry in Subtropical Ecosystems*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 707

Murphy, J. & Riley, J. P., (1962): A modified single-solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal Chim Acta* 27: 31-36

Noe, G. B. & C. D. L. Childers (2007): Phosphorus budgets in Everglades wetland ecosystems: the effects of hydrology and nutrient enrichment. *Wetlands Ecol Manage* 15:189-205

Otsuki, A. & R. G. Wetzel (1972): Coprecipitation of phosphate with carbonates in a marl lake. *Limnol Oceanogr* 17, 763–767.

Paerl, H. W. & J. L. Pinckney (1996): A mini-review of microbial consortia: their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. *Microb Ecol* 31:225-247

Paerl H. W., J. L. Pinckney & T. F. Stepe (2000): Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environ Microb* 2:11-26

Pardo, P., J. F. López-Sánchez & G. Rauret (1998): Characterization, validation and comparison of three methods for the extraction of phosphate from sediments. *Anal Chim Acta* 376:183-195

Pardo, P., G. Rauret & J. F. López-Sánchez (2004): Shortened screening method for phosphorus fractionation in sediments. A complementary approach to the standards, measurements and testing harmonised protocol. *Anal Chim Acta* 508:201-206

Petterson, K., B. Boström & O.-S. Jacobsen (1988): Phosphorus in sediments – speciation and analysis. *Hydrobiologia* 170:91-101

Pickney, J. L. & R. P. Reid (1997): Productivity and community composition of stromatolitic microbial mats in the Exuma Cays, Bahamas. *Facies* 36:204-207

Pitter, P. (1999): *Hydrochemie*. Vydavatelství VŠCHT, Praha

Plette, A. C. C., W. H. van Riemsdijk, M. F. Benedetti & A. van Der Wal (1995): pH dependent charging behavior of isolated cell walls of a gram-positive soil bacterium. *J Colloid Interface Sci* 173:354-363

Psenner, R. & R. Puscko (1988): Phosphorus fractionation: advantages and limits of the method for the study of sediment P origins and interactions. *Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol* 30:43-49

Quevauviller (ed.) (2003): Book review: *Methodologies for soil and sediment fractionation studies*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2002. *Sci Tot Environ* 303:263-264

- Rejmánková, E. & J. Komárková (2000): A function of cyanobacterial mats in phosphorus-limited tropical wetlands. *Hydrobiologia* 431:135-153
- Rejmánková, E., J. Komárek & J. Komárková (2004): Cyanobacteria – a neglected component of biodiversity: patterns of species diversity in inland marshes of northern Belize (Central America). *Diversity Distrib* 10:189-199
- Rejmánková, E., K. O. Pope, R. Post & E. Maltby (1996): Herbaceous wetlands of the Yucatan peninsula: communities at extreme ends of environmental gradients. *Intern Rev Gesamten Hydrobiologie* 81:223-252
- Revsbech, N. P. & B. B. Jørgensen (1986): Microelectrodes: their use in microbial ecology. *Adv Microb Ecol* 9:273-352
- Rheinheimer, G. (2004): *Aquatic microbiology*, 4th ed., John Wiley & Sons, West Sussex, UK
- Ruban, V., J. F. López-Sánchez, P. Pardo, G. Rauret, H. Muntau & Ph. Quevauviller (1999): Selection and evaluation of sequential extraction procedures for the determination of phosphorus forms in lake sediment. *J Environ Monit* 1:51-56
- Ruttenberg, K. C. (1992): Development of a sequential extraction method for different forms of phosphorus in marine sediments. *Limnol Oceanogr* 37:1460-1482
- Scinto, L. J., & K. R. Reddy (2003): Biotic and abiotic uptake of phosphorus by periphyton in a subtropical freshwater wetland. *Aq Botany* 77:203-222
- Short, F. T., W. C. Dennison & D. G. Capone (1990): Phosphorus-limited growth of the tropical seagrass *Syringodium filiforme* in carbonate sediments. *Mar Ecol Prog Ser* 62:169-174
- Sirová, D., J. Vrba & E. Rejmánková (2006): Extracellular enzyme activities in benthic cyanobacterial mats: comparison between nutrient-enriched and control sites in marshes of northern Belize. *Aqua Microb Ecol* 44:11-20
- Stal, L.J. & P. Caumette (Eds.)(1994): *Microbial Mats: Structure, Development, and Environmental Significance*, Springer Verlag, pp.463
- Stal, L.J. (1995): Tansley Review No.84. Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytol* 131:1-32
- Stal, L. J. (2001): Coastal microbial mats: the physiology of a small-scale ecosystem. *S Afr J Bot* 67:399–410
- Sutherland, I. W. (2001a): Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147:3-9
- Sutherland, I. W. (2001b): The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiol* 9:222-227
- Tiyapongpattana, W., P. Pongsakul, J. Shiowatana & D. Nacapricha (2004): Sequential extraction of phosphorus in soil and sediment using a continuous-flow system. *Talanta* 62:765-771
- Thomas, S., E. E. Gaiser & F. A. Tobias (2006): Effects of shading on calcareous benthic periphyton in a short-hydroperiod oligotrophic wetland (Everglades, FL, USA). *Hydrobiologia* 569:209-221
- Villbrandt, M., W. E. Krumbein & L. J. Stal (1991): Diurnal and seasonal variations of nitrogen fixation and photosynthesis in cyanobacterial mats. *Plant Soil* 137:13-16
- Viret, O., L. Toti, I. H. Chapela & O. Petrini (1994): The role of the extracellular sheath in recognition and attachment of conidia of *Discula umbrinella* (Berk. & Br.) Morelet to the host surface. *New Phytol* 127:123-131
- Visscher, P. T. & J. F. Stolz (2005): Microbial mats as bioreactors: populations, processes and products. *Paleogeogr Paleoclimatol Paleocol* 219:87-100

- Vymazal, J., C. B. Craft & C. J. Richardson (1994): Periphyton response to nitrogen and phosphorus additions in Florida Everglades. *Algol Stud* 73:75-79
- Watenabe, K., M. Imase, K. Sasaki, N. Ohmure, H. Saiki & H. Tanaka (2006): Composition of the sheath produced by the green alga *Chlorella sorokiniana*. *Let Appl Microbiol* 42:538-543
- Weckesser, J. & U. J. Jürgens (1988): Cell-walls and external layers. *Meth Enzym* 167:173-188
- Weidie, A. E. (1985): Geology of the yucatan platform. In: W. C. Ward, A. E. Weidie & W. Back (eds.), *Geology and hydrology of the Yucatan and Quarternary geology of north-eastern Yucatan peninsula*. New Orleans Geological Society, pp. 1-19
- Wieland A., J. Zopfi, M. Benthien & M. Kühl (2005): Biogeochemistry of an Iron-Rich Hypersaline Microbial Mat (Camargue, France). *Microb Ecol* 49: 34-49
- Wightman, P. G. & J. B. Fein (2001): Ternary interactions in a humic acid-Cd-bacteria system. *Chem Geol* 180:55-65
- Williams, J. D., J. K. Syers & T. W. Walker (1967): Fractionation of soil inorganic phosphate by a modification of Chang and Jackson procedure. *Soil Sci Soc Amer Proc* 31:736-739
- Wingender, J., T. R. Neu & H. C. Flemming (eds) (1999): *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer, Berlin
- Zhang, X. Q., P. L. Bishop & M. J. Kupferle (1998): Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Sci Technol* 37:345-348

9. Přílohy

PŘÍLOHA I.

Následující text popisuje jednotlivé frakce P extrahované v každém kroku frakcionace P.

I. MgCl_2 (1 mol l^{-1})

Frakce je často nazývána labilní, slabě vázaný nebo adsorbovaný P a přibližně odpovídá okamžitě dostupnému P (Fytianos & Kotzakioti, 2005). Je odstraněn slabě adsorbovaný anorganický P, ale i malá část organického P (Jensen et al., 1998).

II. BD ($0,1 \text{ mol l}^{-1}$)

Dithioničitan sodný redukuje oxidované formy Fe a Mn a zvýšením jejich rozpustnosti se uvolní i asociovaný P (Jensen et al., 1998). V tomto kroku je extrahován redox-labilní P hlavně z povrchů hydroxidů kovů (Fytianos & Kotzakioti, 2005). Jensen et al. (1998) zjistil, že BD extrahuje část P z povrchu CaCO_3 bez současného uvolnění Ca a F, takže se vzrůstajícím obsahem CaCO_3 klesá specifita činidla BD k formě Fe-P.

III. NaOH ($0,1 \text{ mol l}^{-1}$)

Reaktivní NaOH-P reprezentuje fosforečnany adsorbované na oxidy kovů (např. Al_2O_3) a jiné povrchy s vyměnitelnými OH^- skupinami a dále sloučeniny P rozpustné v zásadách (Fytianos & Kotzakioti, 2005). Extrahován je také anorganický P asociovaný s huminovými látkami, který se po okyselení může vysrážet (Paludan & Jensen, 1995).

IV. Na-Ac (1 mol l^{-1})

Pufrační roztok octanu sodného o pH 4 je předřazen 0,5 M HCl, aby rozpustil biogenní uhličitany s fluoroapatity a odlišil tak authigenní a detritový rezervoár apatitového P (Ruttenberg, 1992).

V. HCl ($0,5 \text{ mol l}^{-1}$)

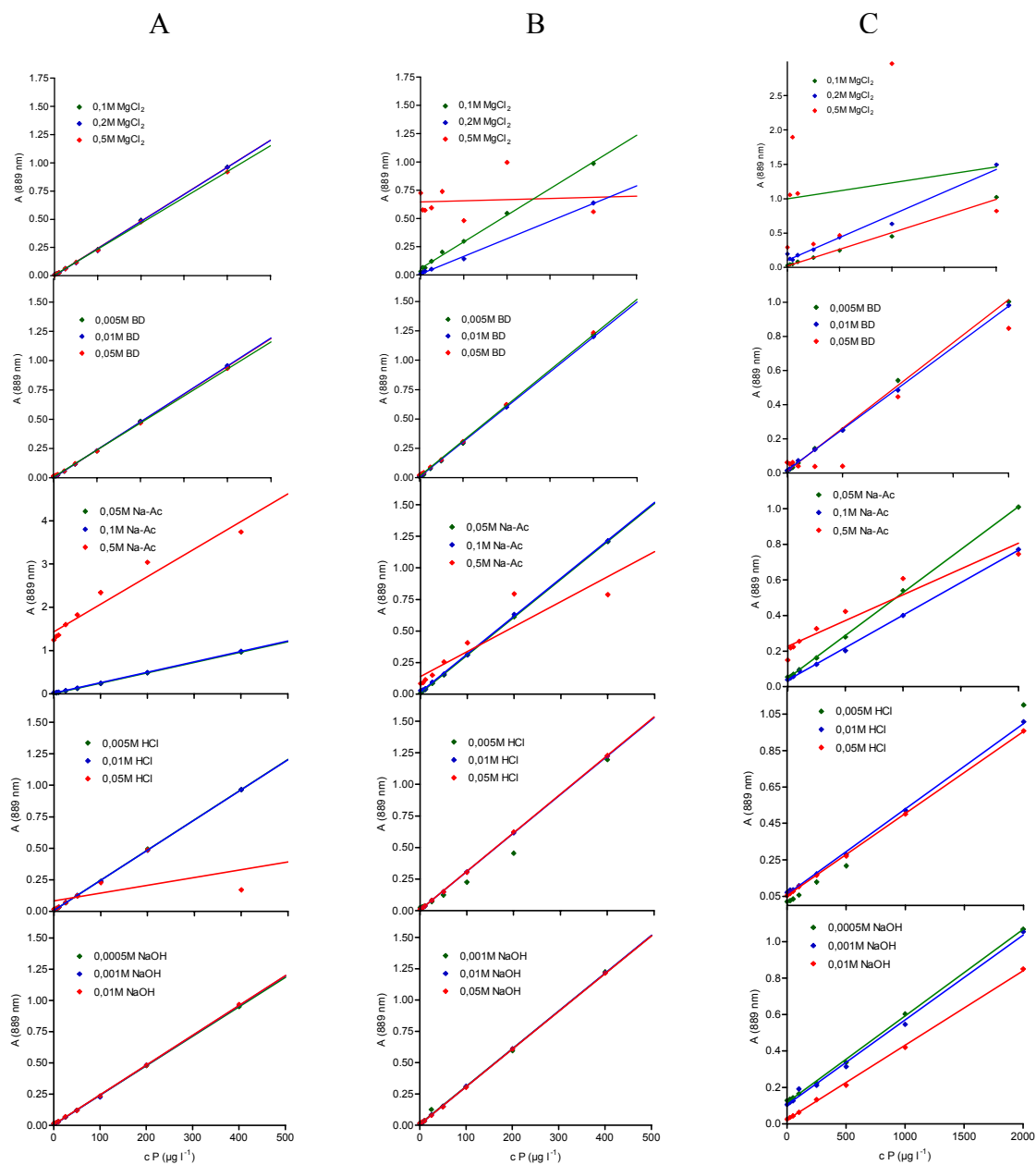
V tomto kroku je rozpuštěn P vázaný na detritální krystalické uhličitany a P z oxidů kovů (ne adsorbovaný na povrch) (Jensen et al., 1998). Frakce může obsahovat stopy hydrolyzovaného organického P (Fytianos & Kotzakioti, 2005).

VI. Spálení rezidua / NaOH (1 mol l^{-1})

V posledním kroku je rozpuštěn a hydrolyzován reziduální těžko rozložitelný organický P (Jensen et al., 1998).

PŘÍLOHA II.

Grafy zobrazují kalibrační křivky pro různé koncentrace extrakčních činidel MgCl_2 , BD, Na-Ac, HCl a NaOH při měření RRP (A), VRP (B) a VRFe (C).



PŘÍLOHA III.

Tabulky udávají složení kultivačních médií pro mikroorganismy *Chroococcus*, *Cuspidothrix*, *Monoraphidium* a *Rhodocista*: hmotnost, látkové množství a iontovou sílu jednotlivých přidaných sloučenin a celkovou iontovou sílu média. V poslední tabulce je zobrazena příprava extrakčních činidel a jejich iontová síla.

Médium „Z“ (na 1 l)				celková iontová síla: I = 0.0074 mol l ⁻¹				(pro Monoraphidium)			
sloučenina	hmotnost g	látkové mn. mol	iontová síla mol l ⁻¹	sloučenina	hmotnost g	látkové mn. mol	iontová síla mol l ⁻¹	sloučenina	hmotnost g	látkové mn. mol	iontová síla mol l ⁻¹
NaNO ₃	0.4670	0.0055	0.0055	Na ₂ CO ₃	0.0210	0.0002	0.0005				
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.0590	0.0002	0.0006	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.0036	0.00001	0.0001				
KH ₂ PO ₄	0.0310	0.0002	0.0002	Na ₂ EDTA	0.0037	0.00001	0.00002				
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.0250	0.0001	0.0004	HCl (ml)	0.0021	0.0001	0.0001				

Médium „BG11“ (na 1 l)				celková iontová síla: I = 0.0204 mol l ⁻¹				(pro Chroococcus, Cuspidothrix)			
sloučenina	hmotnost g	látkové mn. mol	iontová síla mol l ⁻¹	sloučenina	hmotnost g	látkové mn. mol	iontová síla mol l ⁻¹	sloučenina	hmotnost g	látkové mn. mol	iontová síla mol l ⁻¹
NaNO ₃	1.5	0.0177	0.0177	citronan železnato- amonný	0.006	0.00003	0.0002				
KH ₂ PO ₄ ·3H ₂ O	0.048	0.0003	0.0003	Na ₂ EDTA	0.001	0.000003	0.00001				
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075	0.0003	0.0012	Na ₂ CO ₃	0.02	0.0002	0.0005				
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036	0.0002	0.0006								
kys.citrónová	0.006	0.00003	0.00003								

Médium „102“ (na 1 l)				celková iontová síla: I = 0.0826 mol l ⁻¹				(pro Rhodocista)			
sloučenina	hmotnost g	látkové mn. mol	iontová síla mol l ⁻¹	sloučenina	hmotnost g	látkové mn. mol	iontová síla mol l ⁻¹	sloučenina	hmotnost g	látkové mn. mol	iontová síla mol l ⁻¹
kys. jantarová	2	0.0169	0.0169	NaCl	0.33	0.0056	0.0056				
yeast extrakt	1.02			NH ₄ Cl	0.5	0.0093	0.0514				
KH ₂ PO ₄	0.33	0.0024	0.0024	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.05	0.0003	0.0009				
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.33	0.0013	0.0054								

Extrakční činidla (na 1 l)

název	sloučenina	hmotnost g	látkové množství mol	celková iontová síla mol l ⁻¹
MgCl ₂	1M MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.31	1.00	2.50
	0.1M MgCl ₂ ·6H ₂ O	20.33	0.10	0.25
MgCl ₂ +Ca	1M MgCl ₂	203.31	1.00	2.51
	přídavek 0.01M CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.74	0.01	
	0.1M MgCl ₂	20.33	0.10	0.26
	přídavek 0.01M CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.74	0.01	
BD	0.1M BD - Na ₂ S ₂ O ₄	17.41	0.10	0.20
	přídavek NaHCO ₃	8.40	0.10	
NaOH	0.1M NaOH	4.00	0.10	0.10
Na-Ac	1M Na-Ac - CH ₃ COONa	82.00	1.00	3.62
	přídavek CH ₃ COOH	157.50	2.62	
HCl	0.5M HCl	49.56	0.50	0.50
NaOH	1M NaOH	40.00	1.00	1.00

PŘÍLOHA IV.

Tabulky zobrazují výsledky částečné frakcionace P extrakčními činidly MgCl₂ (2 varianty koncentrace s / bez přidavku Ca), BD a NaOH ve 4 kulturách mikroorganismů (*Chroococcus*, *Cuspidothrix*, *Monoraphidium* a *Rhodocista*). Hodnoty vyjadřují aritmetický průměr obsahu RRP (tab. III.A) / VRP (tab. III.B) v mg g⁻¹ sušiny (dw.) a procenta relativní směrodatnou odchylku ze třech paralelních opakování.

IV.A

	MgCl ₂		BD		NaOH		MgCl ₂ + BD		MgCl ₂ + BD + NaOH	
<i>Chroococcus</i>										
1M MgCl ₂	0.55	5%	0.32	6%	1.39	12%	0.87	5%	2.26	8%
0,1M MgCl ₂	0.25	9%	0.66	12%	1.96	8%	0.91	11%	2.87	4%
1M MgCl ₂ +Ca	0.39	6%	0.45	9%	1.54	5%	0.84	6%	2.38	1%
0,1M MgCl ₂ +Ca	0.15	19%	0.43	11%	1.58	11%	0.58	13%	2.16	9%
<i>Cuspidothrix</i>										
1M MgCl ₂	0.67	9%	2.10	6%	0.09	27%	2.77	4%	2.86	4%
0,1M MgCl ₂	0.28	6%	2.78	3%	0.12	3%	3.06	3%	3.17	3%
1M MgCl ₂ +Ca	0.40	5%	2.62	4%	0.07	14%	3.02	3%	3.09	3%
0,1M MgCl ₂ +Ca	0.34	37%	3.10	7%	0.11	4%	3.43	4%	3.54	4%
<i>Monoraphidium</i>										
1M MgCl ₂	0.36	18%	0.07	41%	0.01	48%	0.44	19%	0.45	19%
0,1M MgCl ₂	0.01	29%	0.15	12%	0.05	10%	0.16	13%	0.21	11%
1M MgCl ₂ +Ca	0.42	23%	0.09	58%	0.01	87%	0.51	18%	0.52	19%
0,1M MgCl ₂ +Ca	0.01	37%	0.09	63%	0.06	19%	0.10	60%	0.16	32%
<i>Rhodocista</i>										
1M MgCl ₂	1.10	12%	0.68	36%	0.71	29%	1.77	20%	2.48	23%
0,1M MgCl ₂	0.37	49%	1.29	14%	0.58	9%	1.66	16%	2.24	14%
1M MgCl ₂ +Ca	0.95	11%	0.96	5%	0.66	11%	1.91	8%	2.58	9%
0,1M MgCl ₂ +Ca	0.02	27%	1.47	6%	0.58	6%	1.49	5%	2.06	5%

IV.B

	MgCl ₂		BD		NaOH		MgCl ₂ + BD		MgCl ₂ + BD + NaOH	
<i>Chroococcus</i>										
1M MgCl ₂	0.72	1%	0.68	4%	11.37	5%	1.40	2%	12.76	4%
0,1M MgCl ₂	0.36	15%	0.87	8%	12.03	4%	1.23	4%	13.26	4%
1M MgCl ₂ +Ca	0.50	14%	0.73	7%	11.58	6%	1.23	5%	12.81	6%
0,1M MgCl ₂ +Ca	0.10	17%	0.65	7%	10.21	11%	0.75	7%	10.97	11%
<i>Cuspidothrix</i>										
1M MgCl ₂	1.37	5%	3.13	2%	1.16	14%	4.50	1%	5.65	2%
0,1M MgCl ₂	0.57	4%	3.16	5%	1.82	3%	3.74	5%	5.55	4%
1M MgCl ₂ +Ca	0.50	14%	2.97	2%	1.31	5%	3.47	4%	4.77	3%
0,1M MgCl ₂ +Ca	0.38	10%	3.41	7%	1.38	5%	3.79	7%	5.17	6%
<i>Monoraphidium</i>										
1M MgCl ₂	0.40	24%	0.31	2%	2.04	10%	0.71	14%	2.75	8%
0,1M MgCl ₂	0.08	57%	0.29	5%	3.44	5%	0.37	10%	3.81	5%
1M MgCl ₂ +Ca	0.58	23%	0.28	33%	1.76	46%	0.87	26%	2.63	39%
0,1M MgCl ₂ +Ca	0.04	16%	0.19	9%	3.47	4%	0.23	7%	3.70	4%
<i>Rhodocista</i>										
1M MgCl ₂	0.67	14%	1.02	28%	8.52	12%	1.69	22%	10.21	14%
0,1M MgCl ₂	0.37	14%	1.77	12%	8.84	7%	2.14	12%	10.98	8%
1M MgCl ₂ +Ca	0.62	5%	1.44	6%	8.88	7%	2.07	5%	10.95	7%
0,1M MgCl ₂ +Ca	0.03	125%	1.87	4%	8.94	3%	1.90	3%	10.84	3%