

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Přírodovědecká fakulta



**Složení společenstva bakterioplanktonu v závislosti na kompozici
fytoplanktonu v období jeho jarního vrcholu**
Diplomová práce

Vypracovala: Bc. Tereza Havlišová

Školitel: Prof. RNDr. Karel Šimek CSc., HBÚ AVČR

České Budějovice
2011

Havlišová, T., 2011: Složení společenstva bakterioplanktonu v závislosti na kompozici fytoplanktonu v období jeho jarního vrcholu. [Relating bacterioplankton composition to shifts in phytoplankton community dynamics during its spring bloom period. Mgr. Thesis, in Czech.] – 52 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Over the period of the spring phytoplankton bloom (March-May 2009), an intensive sampling program was conducted at 2 sampling depths (0.5 m and 1% PAR) located at lacustrine zone of the canyon-shaped, meso-eutrophic Římov reservoir (Czech Republic). Changes in the production and community dynamics of epilimnetic bacterioplankton, studied by means of group-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes, were related to shifts in composition and activity of phytoplankton, and to remarkable changes in total protistan bacterivory. It was documented that particular groups of bacterioplankton responded differently to: (i) major shifts in phytoplankton composition and its activity and to (ii) changes in overall protozoan grazing pressure.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum: 1. 1. 2011

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé práce, Karlovi Šimkovi, za pomoc a cenné rady k této práci, a také za jeho trpělivost a ochotu. Děkuji i všem dalším zaměstnancům HBÚ, zejména pak Honzovi Jezberovi a Karlovi Horňákovi za jejich podporu a smysl pro humor, dále děkuji Radce Malé a Aleně Hartmanové za jejich lidský přístup. V neposlední řadě patří můj dík příteli a mé rodině za jejich povzbuzení a trpělivost ve chvílích, kdy jsem se věnovala této práci.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	3
2.1	Význam bakterií a mikrobiálních potravních řetězců ve vodních ekosystémech.....	3
2.2	Faktory ovlivňující složení a dynamiku bakterioplanktonu	4
2.2.1	Fytoplankton a jeho role v potravním řetězci	5
2.2.2	Predace bakterií prvoky a zooplanktonem	6
2.3	Zastoupení jednotlivých fylogenetických skupin bakterií v sladkovodních ekosystémech.....	7
2.4	Metoda <i>in situ</i> hybridizace	9
3	Cíle práce.....	11
4	Materiál a metody.....	12
4.1	Charakteristika lokality.....	12
4.2	Odběr vzorků	12
4.3	Bakteriální počty a biomasa.....	13
4.4	Bakteriální produkce.....	13
4.5	Zastoupení fylogenetických skupin v bakterioplanktonu a <i>In situ</i> hybridizace	14
4.6	Chemismus vody	18
4.7	Primární a extracelulární produkce.....	18
4.8	Složení a objem fytoplanktonu a chlorofyl <i>a</i>	19
4.9	Zooplankton.....	19
4.10	Početnost heterotrofních bičíkovců a nálevníku a jejich predace na bakteriích.....	20
4.11	Statistické vyhodnocení	20
5	Výsledky.....	21
5.1	Faktory regulující mikrobiální společenstvo	21
5.2	Bakteriální početnost a dynamika.....	25
5.3	Bakteriální produkce, predace prvoků pohlcujících bakterie a početnost zooplanktonu	26
5.4	Fylogenetická struktura bakteriálního společenstva	29
5.5	Posuny v genetickém složení bakterioplanktonu	30
6	Diskuze	37
6.1	Faktory regulující dynamiku bakterioplanktonu.....	37
6.1.1	Primární a extracelulární produkce fytoplanktonu.....	37
6.1.2	Vliv dynamiky fytoplanktonu na bakteriální společenstvo	38
6.1.3	Vliv predace a trofické struktury na bakteriální společenstvo.....	40
7	Závěr.....	43
8	Literatura	45
9	Anotace	52

1 Úvod

Řada vodních ekosystémů je vytvořena člověkem, mezi nejvýznamnější patří předhradní nádrže, které mají často multifunkční využití: od zásobování pitnou vodou, výroby elektrické energie, ochrany před povodněmi až po rekreaci (STRAŠKRABA, 1998; ŠIMEK ET AL., 2008). Přestože připomínají na první pohled přírodní jezera, mají zejména údolní nádrže mnoho odlišných charakteristik. Mezi nejvýznamnější patří kaňonovitý tvar nádrže, krátká doba zdržení vody a výrazná prostorová heterogenita (THORTON ET AL., 1990). Přehradní nádrže reprezentují přechodné systémy mezi řekami (zejména přítoková část nádrže) a přírodními jezery (jezerní část poblíž hráze).

Procesy zprostředkované mikroorganismy jsou v nádržích mnohem méně studovány, v porovnání s fytoplanktonem a zooplanktonem (např. RIEMANN & SONDERGARD, 1986; BERNIRGER ET AL., 1991). Mikrobiální procesy přitom hrají klíčovou roli v transformaci organické hmoty a v koloběhu živin ve vodních ekosystémech (ŠIMEK ET AL., 2008).

Fyzikální, chemické a biologické charakteristiky v hluboké jezerní části nádrže se podobají poměrům v přírodních jezerech. Mým úkolem bylo studovat dynamiku a složení bakterioplanktonu (v jarním období roku 2009), v blízkosti hráze přehradní nádrže Římov, kde se také nacházelo odběrové místo.

Vedle přísunu organických látek a anorganických živin způsobených člověkem, mají autochtonní organické látky produkované fytoplanktonem zásadní význam pro bakterioplankton (COLE, 1982). Jelikož dolní části kaňonovitých nádrží jsou často velmi hluboké, fytoplankton tudíž může mít v různých hloubkách odlišnou

dynamiku. Proto jsem se ve své práci zaměřila právě na odlišnosti složení a dynamiky bakterioplanktonu ve dvou hloubkách. Hloubka 0,5 m reprezentovala vrstvu, která není limitována světlem a hloubka 1% PAR (photosynthetically active radiation) reprezentovala vrstvu tzv. kompenzačního bodu, ve kterém se produkce fytoplanktonu rovná jeho respiraci.

2 Literární přehled

2.1 Význam bakterií a mikrobiálních potravních řetězců ve vodních ekosystémech

Planktonní bakterie hrají klíčovou roli v cyklu živin, dekompozici organické hmoty a formování biomasy ve vodních systémech a reprezentují tak důležitý článek v pelagickém mikrobiálním potravním řetězci (např. AZAM, 1983; HORŇÁK ET AL., 2004). Do konce osmdesátých let však neexistoval ucelený koncept o roli mikroorganismů ve vodních ekosystémech. Klasická představa o potravních řetězcích v pelagiálu jezer byla významně pozměněna (AZAM, 1983). Přispělo k tomu zjištění početného výskytu malých bakterivorních bičíkovců a nálevníků v planktonu mesotrofních a oligotrofních jezer. Do té doby se soudilo, že prvoci mohou žít pouze ve vysokých koncentracích bakterií, jako jsou odpadní vody, hypertrofií tůňe, rybníky apod. (STRAŠKRABOVÁ ET AL., 1996). Zásadní a primární role byla přisuzována hlavně klasickému potravnímu řetězci, tj. toku uhlíku od primárních producentů (řasy a sinice) přes zooplankton k rybám. Scházela především kvantifikace role mikrobiálních procesů v globálním měřítku, tedy i možnost odpovědět na otázku, jaký je jejich podíl na transformaci nebo koloběhu látek a limitujících nutrietů.

Obecně tak byla mikroorganismům, tj. bakteriím a prvokům, přisuzována pouze okrajová role ve fungování ekosystémů. V současné době je zřejmé, že vedle klasického potravního řetězce existuje kvantitativně často dokonce významnější potravní řetězec, složený především z heterotrofních mikroorganismů (< 20 μm), tzv. nanoplanktonu (POMEROY, 1974). Díky rozvoji metodik fixace vzorků s prvoky a kvantifikace mikroorganismů pomocí epifluorescenční mikroskopie bylo objasněno,

že prvoci, heterotrofní a autotrofní bakterie (sinice) mohou sehrát za určitých okolností rozhodující roli v celém mikrobiálním společenstvu.

V roce 1983 (AZAMM ET AL.) byl zaveden pojem „mikrobiální smyčka“, který charakterizuje vzájemné vztahy mezi prvoky a bakteriemi a drobným fytoplanktonem. Podle této teorie je fotosynteticky produkovaná organická hmota rozkládána bakteriemi. Bakterie a drobné řasy či sinice jsou následně konzumovány zejména heterotrofními prvoky, kteří v procesu trávení potravy uvolňují živiny využívané opět fototrofními organismy. Za těchto podmínek značná část primární produkce prochází mikrobiální smyčkou, a do určité míry tak omezuje přísun živin do vyšších trofických hladin. Mikrobiální smyčka je nejlépe rozvinuta v případech, kdy je málo početný filtrující zooplankton, který je nejenom schopen efektivně odfiltrovat fytoplankton, ale i prvoky a větší bakterie. Filtrující zooplankton je omezen zejména v oligotrofních vodách, acidifikovaných jezerech, arktických jezerech a ve vodách s vysokou biomasou planktonožravých ryb. (STRAŠKRABOVÁ ET AL., 1996).

V posledních letech byly také viry zařazeny do schémat mikrobiální smyčky, protože jsou hostitelsky specifictí „parazit“ nebo „predátoři“ bakterií, prvoků a řas, a tak významně ovlivňují složení společenstev. Podle recentních odhadů viry eliminují cca 20% bakteriální produkce. Navíc virová lyze způsobuje uvolňování velkého množství organických látek a fragmentů buněk do prostředí, a tak významně přispívá ke koloběhu uhlíku a fosforu (SUTTLE, 1994).

2.2 Faktory ovlivňující složení a dynamiku bakterioplanktonu

Aktivita a růst bakterií jsou ovlivňovány zejména teplotou, množstvím dostupných organických a anorganických živin (tzv. bottom-up control), predací prvoků a zooplanktonu (tj. kontrola predátory) a virovou lyzí (FUHRMAN ET AL.,

1995; PACE ET AL., 1996). SANDERS ET AL. (1992) uvádějí, že v oligotrofních systémech nejvýznamněji reguluje složení a početnost bakterií dostupnost živin (bottom-up control), a naopak v eutrofních vodách hraje větší roli predace na bakteriích (top-down kontrol). Bakteriální růst není limitován pouze zdrojem uhlíku autochtonního původu, který je produkován fytoplanktonem, ale také dostupností fosforu a dusíku (FELIP ET AL., 1996). Bakterie také využívají rozpuštěnou organickou hmotu (DOM) alochtonního původu pocházející z terestrických ekosystémů a tudíž množství DOM významně ovlivňuje jejich růstovou rychlost (TRANVIK, 1990). Různé skupiny bakterioplanktonu se významně liší ve schopnostech, jak efektivně reagovat na změny v dostupnosti živin a struktuře potravního řetězce (FISHER ET AL., 2000).

2.2.1 Fytoplankton a jeho role v potravním řetězci

Obecně je růst bakterií v planktonním prostředí limitován dostupností snadno rozložitelných organických látek produkovaných fytoplanktonem, tj. exudáty (EPP-extracelulární produkce) sinic a řas (COLE ET AL., 1982). EPP je považována za významný zdroj živin pro bakterie (např. SUNDH, 1992; GIROLDO ET AL., 2007), i když stále ještě není přesně známo, které skupiny řas jsou hlavními producenty EPP. Podle JENSENA (1984) bylo také dokázáno, že nedostatek živin má za následek zvýšenou EPP, která tím přímo ovlivňuje dynamiku a početnost bakterií.

Kromě exudace se jako další autochtonní zdroj uplatňuje také rozkládající se fytoplankton a nespotřebované zbytky fytoplanktonu z exkrementů zooplanktonu. Proto také počty bakterií ve stojatých vodách korelují s biomasou fytoplanktonu, jak ukazuje analýza dat založená na sezonních průměrech (STRAŠKRABOVÁ ET AL., 1996).

ŠIMEK ET AL. (2006) uvádějí, že dynamiku a růst bakterioplanktonu také významně ovlivňuje dostupnost fosforu. Jelikož jsou heterotrofní bakterie významnými konkurenty fytoplanktonu v soutěži o fosfor (zejména v oligotrofních pelagických ekosystémech), mohou významně ovlivnit rychlost růstu fytoplanktonu (COTNER & BIDDANDA, 2002). Některé strategie bakterií (např. *Acetivibrio*), projevující se zvýšenou schopností příjmu fosforu (tzv. luxury uptake), jsou dokonce používány v technologiích zvýšeného odstraňování fosforu v čistírnách odpadních vod.

2.2.2 Predace bakterií prvoky a zooplanktonem

Za významné predátory bakterií jsou považováni především heterotrofní bičíkovci (HNF) a nálevníci (CIL) (PACE, 1988). Predační tlak způsobený prvoky a zooplanktonem vyvolává změny v početnosti, velikosti, aktivitě a složení bakterioplanktonu (ŠIMEK ET AL., 1997). Složení a růst bakterioplanktonu ovlivňují tím, že přijímají selektivně určitou kořist: např. větší buňky (CHRZANOWSKI & ŠIMEK, 1990), vybrané skupiny bakterií (PERTHALER ET AL., 2001) nebo rychle rostoucí buňky bakterií (DEL GIORGIO ET AL., 1996). Z řady prací jasně vyplývá (např. ŠIMEK ET AL., 1999; JÜRGENS ET AL., 1999), že selektivní predace prvoků je jedním z hlavních faktorů regulujících složení bakteriálního společenstva (BCC) v přírodních sladkovodních ekosystémech.

Vzájemné působení selektivní a neselektivní predace je velmi komplexní a změny ve složení skupin predátorů mohou mít různé účinky na BCC. PERTHALER ET AL. (2001) zjistili, že různé druhy prvoků pohlcujících bakterie mohou dokonce zcela potlačit nebo naopak podpořit růst konkrétních skupin bakterií. Navíc predace metazooplanktonu na prvocích může významně pozměnit složení a velikost

společenstev prvoků (např. PACE, 1990), což naznačuje, že změny ve struktuře trofického řetězce přímo nebo nepřímo ovlivňuje BCC.

Predační tlak je také dáván do souvislosti se vznikem vůči predaci odolných forem bakterií, zejména vláken a vloček (JÜRGENS ET AL., 1994).

2.3 Zastoupení jednotlivých fylogenetických skupin bakterií v sladkovodních ekosystémech

Ještě relativně nedávno byly naše znalosti o složení bakteriálního společenstva ve sladkých vodách velmi omezené, jelikož neexistovali vhodné metody k jejich identifikaci (více v kapitole 2.4). S nástupem nových technik molekulární biologie jako je PCR (polymerase chain reaction) nebo fluorescenční hybridizace *in situ*, se mnozí (např. ALFREIDER ET AL., 1996; ZWART ET AL., 2002) pokoušeli zjistit rozšíření hlavních fylogenetických skupin bakterií v různých typech vod. V těchto studiích srovnávali úseky bakteriální rRNA získané z podobných prostředí a hledali mezi nimi určité podobnosti, s cílem dozvědět se více o bakteriálním rozšíření, požadavcích na specifičnosti jejich prostředí, jejich charakteristickou fyziologii apod.

Nejrozšířenějšími skupinami bakterií, které patří pod doménu *Eubacteria* a vyskytují se v sladkovodních ekosystémech, jsou *Proteobacteria* (podskupiny alfa, beta a gama), *Cytophaga- Flavobacterium* (CF) a *Actinobacteria*. Rozšíření jednotlivých fylogenetických skupin bakterií ve sladkovodních ekosystémech se značně odlišuje od bakteriálních společenstev žijících v oceánech, mořích a půdách (ZWART ET AL., 2002). α -*Proteobacteria* jsou významnou bakteriální složkou prakticky ve všech typech prostředí: ve sladké i mořské vodě, v sedimentu, i v půdách (GLÖCKNER ET AL., 2000). Naopak skupina β - *Proteobacteria* je sice hojně zastoupena v sladkovodních ekosystémech, ale v moři a půdách téměř zcela

chybí. Tato skupina se nalézají také v podzemní vodě a zaujímá podstatnou část bakterií na specifických částicích tvořících v planktonu tzv. "lake snow" a ve vločkách v odpadních vodách. Skupina β - *Proteobacteria* má několik podskupin, z nichž nejvýznamnější jsou klastry *Polynucleobacter* a R-BT065. Zástupci posledně jmenovaných podskupin dosahují velké početnosti (mohou dosahovat až 50% z celkového počtu bakterií) a byly již prokázány v mnoha jezerech Evropy a Severní Ameriky. Buňky klastru R-BT065 mají většinou tyčinkovitý nebo rohlíčkovitý tvar, poměrně uniformní velikost a v prostředí s vyšším počtem predátorů dosahují vysokou růstovou rychlost (ŠIMEK ET AL., 2010). Mezi další významné zástupce skupiny β -*Proteobacteria* patří klastr *Polynucleobacter*, který byl objeven v horském jezeru Adirondack v USA (HIRONS ET AL., 1997). Tato skupina nebyla nalezena v sedimentech, moři nebo půdě (HAHN, 2003).

Zástupci skupiny *Cytophaga-Flavobacterium* jsou široce zastoupeni jak v moři, tak i ve sladkých vodách, v určité míře také na specifických částicích, tzv. "lake snow" (GROSSART & SIMON, 1998) a v odpadních vodách.

Zástupci skupiny *Actinobacteria* se nacházejí ve velkém množství nejenom v půdách, ale také v sladkovodních ekosystémech (oligotrofní, mesotrofní a huminová jezera), kde dosahují značný podíl bakteriálních počtů. Jedná se většinou o druhy bakterií s velmi malým buněčným obsahem. Skupina *Actinobacteria* je široce zastoupena také v horských jezerech, které jsou charakteristické vysokým množstvím dopadajícího UV záření, které je škodlivé pro mnoho jiných organismů. UV záření poškozuje zejména organismy s vysokým obsahem A+T v DNA a jelikož tyto gram-pozitivní bakterie mají naopak vysoký obsah

G+C v DNA jsou proti ostatním bakteriím pravděpodobně zvýhodněny (WARNECKE ET AL., 2005).

2.4 Metoda *in situ* hybridizace

Metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) byla poprvé aplikována před více než dvaceti lety (GIOVANNONI ET AL., 1988; DELONG ET AL., 1990; AMANN ET AL., 1990) a je považovaná za průlomový metodický objev v mikrobiální ekologii. Tato hybridizační metoda se používá k identifikaci bakterií (bez předchozí kultivace) v přírodních vzorcích vody. Zpočátku se vědci setkávali s problémy aplikovat tuto metodu na vzorky, které pocházely z oligotrofních systémů, zejména díky malé aktivitě zde přítomných bakterií, které měly nízký počet ribozómů. Většina bakterií je vystavena suboptimálním substrátovým podmínkám, dosahují tak malé velikosti buněk a nízké růstové rychlosti (např. STRAŠKRABOVÁ ET AL., 1996). Proto byla často intenzita fluorescenčního signálu velmi nízká a hybridizované buňky nebylo možno odlišit od fluoreskujícího pozadí preparátu. V posledních letech se vědcům podařilo zvýšit citlivost této metody, například použitím jasnějších fluorochromů (ALFREIDER ET AL., 1996; GLÖCKER ET AL., 1996), fluorescenčně značených skupinově specifických rRNA sond anebo pomocí tyramidové amplifikace signálu (LEBARON ET AL., 1997; SCHÖNHUBER ET AL., 1997, SEKAR ET AL., 2002).

Metoda vychází z předpokladu, že během vývoje mikroorganismů, se tyto postupně rozrůžňovaly, což bylo doprovázeno změnami v jejich struktuře DNA a RNA. Prokaryotické organismy se takto rozrůžňují 1,5- 3 miliardy let (ROZSYPAL, 1981). Na základě porovnání změn v konzervativních úsecích genomu je možné uvažovat o příbuznosti jednotlivých mikroorganismů a do minulosti odhadnout jejich

společné vývojové linie. Takovéto konzervativní úseky se nacházejí zejména v primární struktuře molekul rRNA, kde se střídají s fylogeneticky mladšími úseky, navíc se tyto molekuly v buňce vyskytují ve velkém množství, a proto jsou vhodným objektem pro fylogenetickou klasifikaci (MAŠÍN, 2003). Pro tuto klasifikaci se používají zejména 16S rRNA podjednotky ribozomu o délce zhruba 1500 nukleotidů (COLWELL ET AL., 1989).

Genetické sondy jsou uměle syntetizované oligonukleotidy komplementární ke specifickým sekvencím rRNA. Pomocí nich můžeme klasifikovat podtřídy, rody nebo druhy bakterií. Již řadu let jsou také používány pro přímou identifikaci bakterií v jejich přírodních smíšených společenstvech (AMANN ET AL., 1992).

3 Cíle práce

Hlavním cílem předkládané práce bylo rozšířit znalosti o složení a dynamice bakterioplanktonu v návaznosti na rozvoj fytoplanktonu kaňonovité přehradní nádrže Římov pomocí aplikace metody fluorescenční *in situ* hybridizace. Hlavní část terénních pokusných prací probíhala v jarním období roku 2009, kdy byl ve spolupráci s kolegy z HBÚ prováděn komplexní experiment studující dynamiku celého planktonního společenstva. Na Římově jsem analyzovala početnost a složení bakterioplanktonu v 23 odběrových dnech ve dvou hloubkách. Mým cílem bylo zodpovědět následující otázky:

- Jak se vyvíjí složení a dynamika bakterioplanktonu během jarního období? Jak se na společenstvu bakterioplanktonu projeví posun ve složení společenstva fytoplanktonu?
- Liší se složení a dynamika bakterioplanktonu v hloubce 0,5 m a v hloubce 1% PAR významně? Lze případné rozdíly vztahovat k rozvoji a složení fytoplanktonu?
- Jak ovlivňují početnost a složení bakterioplanktonu prvoci pohlcující bakterie?

K vyhodnocení mé práce mi poskytl data tito zaměstnanci HBÚ AVČR:

- primární a extracelulární produkce - RNDr. Jiří Nedoma CSc.
- početnost a složení prvoků - Prof. RNDr. Karel Šimek, CSc., RNDr. Jan Jezbera Ph.D.
- početnost a složení zooplanktonu - RNDr. Jaromír Sedľa, CSc.
- chemismus vody - Doc. Ing. Josef Hejzlar, CSc.
- složení fytoplanktonu, chlorofyl-*a* - Eliška Zapomělová Ph.D., Petr Znachor Ph.D.

4 Materiál a metody

4.1 Charakteristika lokality

Přehradní nádrž Římov byla dokončena v roce 1978 na řece Malši (48°50'N; 14°30'E) pro vodárenské a vodohospodářské účely. Od roku 1981 zásobuje pitnou vodou České Budějovice a většinu jihočeského regionu (HEJZLAR, 1998). Nádrž má typický kaňonovitý tvar a leží v nadmořské výšce 470 m. Její celkový objem je $34,5 \cdot 10^6 \text{ m}^3$, plocha $2,06 \text{ km}^2$ a délka 13,5 km. Průměrná hloubka je 26,2 m, maximální hloubka je 43 m. Průměrná doba zdržení vody v celé nádrži je přibližně 100 dnů. Nádrž je dimiktická s klasickým jarním a podzimním mícháním. Obsahem živin se řadí mezi nádrže mesoeutrofní.

4.2 Odběr vzorků

Vzorky vody byly odebírány od 23. března do 28. května 2009 a to nejdříve v týdenních, a posléze ve dvou až tří denních intervalech (23., 30. březen; 3., 6., 8., 10., 13., 15., 17., 20., 22., 24., 27., 29. duben; 1., 4., 6., 8., 11., 14., 18., 22. květen). Poslední odběr byl situován do období "čiré vody" (28. květen). Vzorky byly odebírány z lodě na stálém odběrovém místě ve dvou hloubkách v jezerní části nádrže pomocí Friedingrova odběrového zařízení (cca 2 l objem). Vždy byla odebrána voda z hloubky 0,5 m a posléze v hloubce 1% PAR, jejíž výběr závisel na aktuální stratifikaci nádrže. V obou hloubkách bylo odebráno 7 "odběráků", přelito do 20 litrové plastové nádoby, ze které byly po promíchání odebírány vzorky vody pro měření jednotlivých parametrů. Vzorky vody určené pro stanovení extracelulární, primární a bakteriální produkce byly okamžitě odebrány a posléze k nim byly přidány radioaktivně značené substráty pro zjištění míry rychlosti jejich příjmu. Radioaktivně značené vzorky byly následně inkubovány *in situ* v teplotě nádrže.

4.3 Bakteriální počty a biomasa

Vzorky byly fixovány formaldehydem (2% konečná koncentrace), obarveny fluorochromem DAPI (2-Diamidino-4-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid, 5 $\mu\text{l ml}^{-1}$; 0,2% konečná koncentrace) a početnost bakterií vyhodnocena v epifluorescenčním mikroskopu (Olympus BX-60 nebo AX-70). V každém vzorku bylo spočteno alespoň 500 bakterií. K vyhodnocení bakteriální biomasy byla využita analogová CCD kamera (Cohu Inc., San Diego, USA) připojená na mikroskop, mikroskopické obrazy byly přenášeny do počítače a vyhodnoceny programem pro analýzu obrazu LUCIA D (Lucia 3.52, rozlišení 750 x 520 pixelů, 256 odstínů šedi, Laboratory Imaging, Praha, ČR, detaily viz POSH ET AL., 1997). Hodnoty bakteriální biomasy byly počítány podle alometrického vztahu mezi buněčným objemem a obsahem uhlíku (VIZ NORLAND, 1999).

4.4 Bakteriální produkce

Bakteriální produkce byla měřena pomocí thymidinové metody. Principem metody je měření rychlosti inkorporace radioaktivně značeného [methyl- ^3H] thymidinu do DNA bakterií (RIEMANN & SONDERGAARD, 1986). Předpokládá se, že tato rychlost je úměrná přírůstku bakteriálních buněk, protože thymidin je jednou ze základních strukturních jednotek DNA (FUHRMAN & AZAM, 1982; detaily metody viz STRAŠKRABOVÁ ET AL., 1996).

Dva paralelní vzorky o objemu 5 ml byly inkubovány po dobu 30 min v *in situ* teplotě s radioaktivně značeným thymidinem, který byl v nadbytku (10 nmol l^{-1}), aby se zabránilo vnitrobuněčné *de novo* syntéze thymidinu. Následně byly vzorky fixovány formaldehydem (2% konečná koncentrace) a zfiltrány přes membránové filtry o porozitě 0,2 μm , průměr 25 mm (Poretics, OSMONICS Inc., 12 Livermore, Calif., USA). Filtry byly dále promyty 5% ledovou kyselinou octovou (10 x 1 ml).

Metoda vychází z předpokladu, že radioaktivita zachycená na filtru odpovídá thymidinu zabudovanému do DNA bakterií. Pro přepočet na počet bakteriálních buněk byl použit empiricky stanovený přepočítávací faktor (viz ŠIMEK ET AL., 1999).

4.5 Zastoupení fylogenetických skupin v bakterioplanktonu a *In situ* hybridizace

Pro analýzu bakteriálního společenstva jsem použila metodu CARD-FISH (Catalysed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization), fluorescenční *in situ* hybridizaci s využitím ribozomální RNA jako cílové sekvence, dle práce SEKAR ET AL. (2003). Podstatou metody je skupinově specifické navázání mezi genetickou sondou, což je krátký, asi 20 bazí dlouhý úsek DNA, a bakteriálními 16S a 23S rRNA podjednotkami na základě komplementarity bazí a charakteristické prostorové struktury rRNA.

Pro terénní pokusy jsem použila 8 různých genetických sond dodávaných firmou ThermoFischer Scientific, Německo (www.thermohybrid.de) specifických pro konkrétní fylogenetické skupiny. Seznam bakteriálních fylogenetických skupin, jejich zkratky a kódy sond jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1. Seznam použitých sond pro jednotlivé fylogenetické skupiny a použité zkratky.

Bakteriální skupina	Použitá zkratka	Kód sondy
<i>Eubacteria</i>	EUB	EUB338-I-III
<i>β-proteobacteria</i>	BET	BET42a
<i>R-BT065</i>	R-BT	R-BT065
<i>Polynucleobacter</i> _{ABCD}	PNEC _{ABCD}	PnecABCD-445
<i>Polynucleobacter</i> _C	PNEC _C	PnecC-16S-445
<i>Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes</i>	CF	CF319a
<i>Actinobacteria</i>	AC	HGC69a
<i>Acl cluster</i>	AC _I	Acl-852

Ze směsného vzorku každé hloubky byly odebrány dva paralelní vzorky, které byly nafixovány paraformaldehydem (konečná koncentrace 2%). Objem filtrovaných vzorků se lišil v závislosti na početnosti bakterií, která byla předem stanovena metodou fluorescenční mikroskopie. Po pěti až sedmi hodinách při laboratorní teplotě (nebo přes noc ve 4°C) byly vzorky zfiltrány přes bílé polykarbonátové membránové filtry s porozitou 0,2 μm o průměru 47 mm (Poretics) a dvakrát promyty 10 ml 1xPBS a 10 ml MQ vody. Během cca 10 minut byly filtry usušeny na vzduchu a posléze uskladněny v Petriho miskách při -20°C v mrazicím boxu až do dalšího zpracování (PERNHALER ET AL., 2002; SEKAR ET AL., 2003).

Metoda CARD-FISH se skládá ze 4 hlavních kroků:

- Fixace bakteriálních buněk na povrch membránových filtrů pomocí agarózy: Filtry byly nejdříve ponořeny do sterilní agarózy^I (0,2% 35-40 °C) v Petriho misce a poté sušeny na Parafilmu (35 °C, 30-40 minut). Po usušení byly filtry dehydratovány 96% etanolem (T_{lab}, 1 min.). Následně byly filtry označeny kódem a rozděleny na malé výseče trojúhelníkového tvaru. Tyto výseče byly poté zvlášť zpracovány za použití různých oligonukleotidových sond (viz Tab. 1).
- Permeabilizace a inaktivace endogenní peroxidázy: Filtry byly inkubovány v čerstvě připraveném roztoku lysozymu^{II} (37 °C, 60 min.), dále promyté MQ vodou (T_{lab}, 1 min.) a poté inkubovány v roztoku achromopeptidázy^{III} (37 °C, 30 min.). Filtry byly opět promyty MQ vodou (T_{lab}, 1 min.) a následně inkubovány v 0,01 M HCl (T_{lab}, 10 min.). Nakonec byly promyty MQ vodou (T_{lab}, 1 min.) a dehydratovány v 96% etanolu.
- Hybridizace: Filtry byly ponořeny do roztoku (1 ml hybridizačního pufru^{IV} smíchaného s 10 µl specifické genetické sondy a 10µl kompetitivní sondy (pouze pro BET) v 1,5 ml eppendorfce) a inkubovány po dobu dvou hodin při 35 °C v termostatu. Eppendorfky. byly připevněny k otáčivému rotoru v termostatu (pomalé otáčení). Potom byly filtry přemístěny do předehřátého pracího pufru^V a inkubovány při 37 °C po dobu 10 min.
- Zesílení tyramidového signálu: Po odstranění přebytečné tekutiny byly filtry inkubovány v 10 ml 1x PBS (T_{lab}, 15 min.) a posléze v amplifikačním pufru^{VI} (37 °C, 10 min.) Poté byly filtry opět inkubovány v 10 ml 1x PBS

(T_{lab} , 15 min.), promyty v 10 ml MQ vody (T_{lab} , 1 min.) a dehydratovány v 10 ml 96% etanolu. Nakonec byly filtry vysušeny na filtračním papíru a uskladněny v mrazicím boxu (-20 °C) do dalšího zpracování. Použité chemikálie metody CARD-FISH jsou uvedeny v tab. 2.

Po provedení výše uvedených 4 kroků metody CARD-FISH byly filtry položeny na podložní sklíčko s kapkou fluorochromu 2-Diamidino-4-Phenyl-Indol-Dihydrochlorid (DAPI) ve směsi imerzních olejů Vectashield a Citifluor v poměru 3:1 a následně přikryté krycím sklíčkem, na jehož povrch byla přidána kapka imerzního oleje (Immersion oil for microscopy, Olympus, Made in Japan). Takto připravené preparáty jsem vyhodnocovala metodou epifluorescenční mikroskopie (Olympus, AX-70 nebo BX-60) při zvětšení 1000x, nejprve v excitačním světle (450-480 nm) pro fluorochrom FITC, který umožňuje detekci hybridizovaných buněk. Následně byl stanoven celkový počet bakterií na pole při excitačním UV světle v rozsahu 330-385 nm pro fluorochrom DAPI, kdy vzniká emisní záření > 420 nm. Výsledné počty byly vyjádřeny jako procentuální zastoupení hybridizovaných buněk jednotlivých fylogenetických skupin v celkovém počtu bakterií označených fluorochromem DAPI. Každý vzorek byl spočítán duplicitně při minimálním počtu 400 buněk obarvených DAPI.

Tab. 2. Seznam chemikálií použitých v metodě CARD-FISH.

I. Agaróza	0,1 g agarózy (QA Agarose TM, Molecular Biology Grade); 50 ml MQ vody
II. Roztok lysozymu	500 mg Lysozymu; 5 ml 0,5M EDTA; 5 ml 1M Tris-HCl (pH 7,5); 40 ml MQ vody
III. Roztok achromopeptidázy (AP)	100 µl roztoku AP (30 000 U/ml); 100 µl 5M NaCl; 500 µl 1M Tris-HCl (pH 7,5); doplněné MQ vodou na 50 ml
IV. Hybridizační pufr	3,6 ml 5M NaCl; 0,4 ml 1M Tris-HCl (pH 7,5); 2 g sulfátu dextranu; 11 ml formamidu; 3 ml MQ vody; 2 ml "Blocking reagent" (Roche, France)
V. Prací pufr	30 µl 5M NaCl; 1000 µl 1M Tris-HCl (pH 7,5); 500 µl 0,5M EDTA; 25 µl 20% SDS
VI. Amplifikační pufr	1000 µl amplifikačního roztoku; 10 µl 100x H ₂ O ₂ ; 2 µl fluorochromu FITC

4.6 Chemismus vody

Koncentrace rozpuštěného organického uhlíku byly stanoveny pomocí analyzátoru TOC-5000A (Shimadzu).

4.7 Primární a extracelulární produkce

Primární a extracelulární produkce byly měřeny metodou inkorporace ¹⁴C (STRAŠKRABOVÁ ET AL., 1999). Vzorky (2 tmavé a 2 průhledné lahve) byly inkubovány *in situ* v hloubce 0,5 m po dobu 4 hodin. Do každé lahve (objem 120 ml) byl přidán ¹⁴C-hydrogenuhlíčan na finální koncentraci 10 µg C l⁻¹. Vzorky s asimilovaným ¹⁴C byly rozděleny pomocí filtrace na velikostní frakce, které reprezentují: (<0,2 mm = DOC; 0,2- 2 mm = prokaryota a nevláknité bakterie; >2 mm

= řasy a vláknité bakterie). Rozpuštěný anorganický uhlík byl určen z výpočtu alkalinity a pH prostřednictvím Granovy titrace (korekce na tmavou lahev a inkubační čas). Více detailů v metodice (STRAŠKRABOVÁ ET AL., 1999).

4.8 Složení a objem fytoplanktonu a chlorofyl a

Vzorky určené pro stanovení abundance fytoplanktonu byly ihned fixovány Lugolovým roztokem. Biomasa fytoplanktonu byla určována počítáním a proměřením buněk v Utermöhlových sedimentačních komůrkách pomocí obráceného mikroskopu Olympus IMT-2 (LUND ET AL., 1958). Průměrný rozměr buňky řas byl vypočítán pomocí aproximace morfologie buňky na standardní geometrický tvar a ten byl převeden na biomasu (za předpokladu, že $\rho_{\text{vody}} = 1 \text{ g. dm}^{-3}$ a $\rho_{\text{vody}} = \rho_{\text{řasy}}$). Skupiny dosahující alespoň 10% z celkové biomasy byly pokládány za dominantní a byly rozděleny do funkčních skupin dle REYNOLDSE ET AL. (2002). Biomasy těchto významných skupin pak byly využity pro korelační statistické analýzy.

Vzorky pro stanovení koncentrace chlorofylu-*a* byly zfiltrvány přes skleněné filtry Whatman GF/C. Filtry spolu s koncentrovaným sestonem byly homogenizovány a extrahovány v 90% acetonu. Obsah Chl-*a* v extraktu byl spektrofotometricky změřen metodou podle LORENZENA (1967).

4.9 Zooplankton

Vzorky korýšů byly získány pomocí vertikálních tahů Apstienovy planktonní sítě (velikost ok 200 μm) ve vodním sloupci. V epilimniu bývá naakumulováno 90 % všech korýšů (SEĎA ET AL., 2007), a proto byly tahy sítě prováděny z hloubky 4m (reprezentuje epilimnion) směrem k hladině.

Vířníci byli také odebíráni z vodního sloupce (0-4 m) pomocí plastového dutého válce o definované délce a objemu. Přesný objem (40 l) byl následně filtrován

přes síť (velikost ok 35 μm). Vzorky zooplanktonu byly uchovány v 4% formaldehydu a následně byla mikroskopicky zjištěna abundance hlavních skupin (McCAULEY, 1984).

4.10 Početnost heterotrofních bičíkovců a nálevníku a jejich predace na bakteriích

Rychlost eliminace bakterií prvoky byla měřena metodou fluorescenčně značených bakterií (FLB). FLB byly připraveny z bakterioplanktonu koncentrovaného ze vzorků odebraných z přehrady Římov. Abundance heterotrofních bičíkovců a nálevníků byla stanovena metodou fluorescenční mikroskopie. Predace těchto skupin prvoků byla stanovena pomocí krátkého inkubačního pokusu s přidavkem FLB, který je detailně popsán v metodice ŠIMEK ET AL. (2001).

4.11 Statistické vyhodnocení

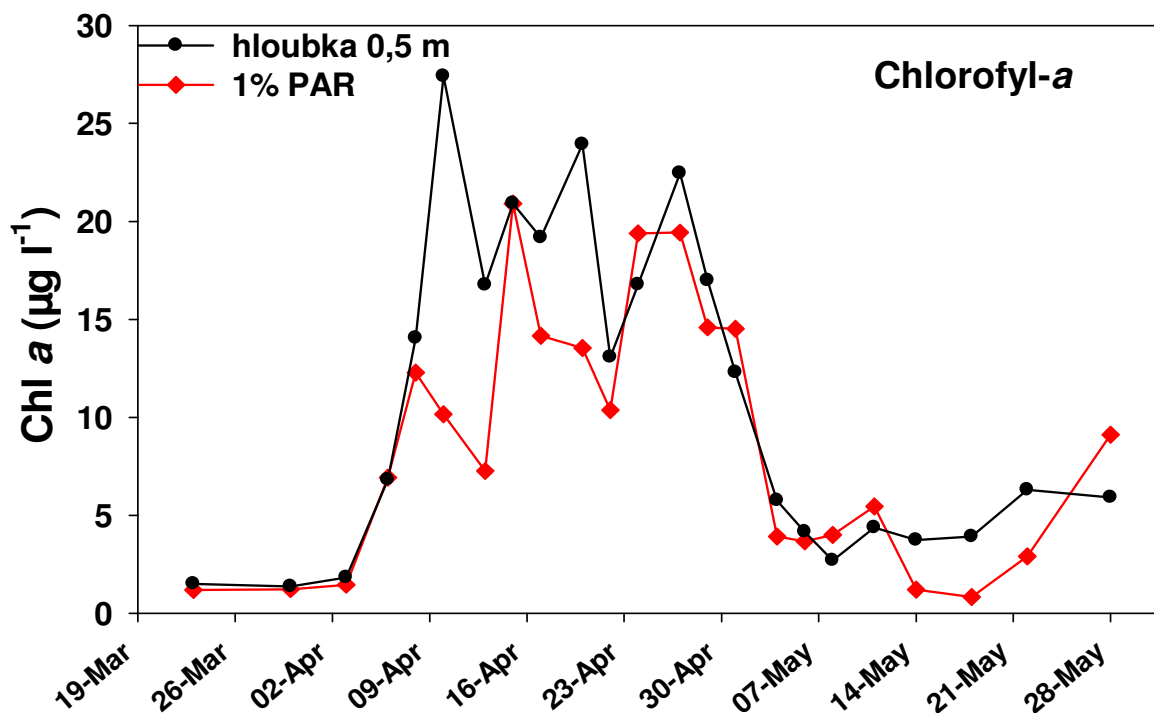
Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí programu programu PRISM v. 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). Míra korelace různých veličin byla zjišťována pomocí korelační analýzy- Spearmanova korelačního koeficientu. Početnost bakterií ve dvou rozdílných odběrových hloubkách byla testována pomocí párového T-testu (SigmaPlot v. 11.0).

5 Výsledky

5.1 Faktory regulující mikrobiální společenstvo

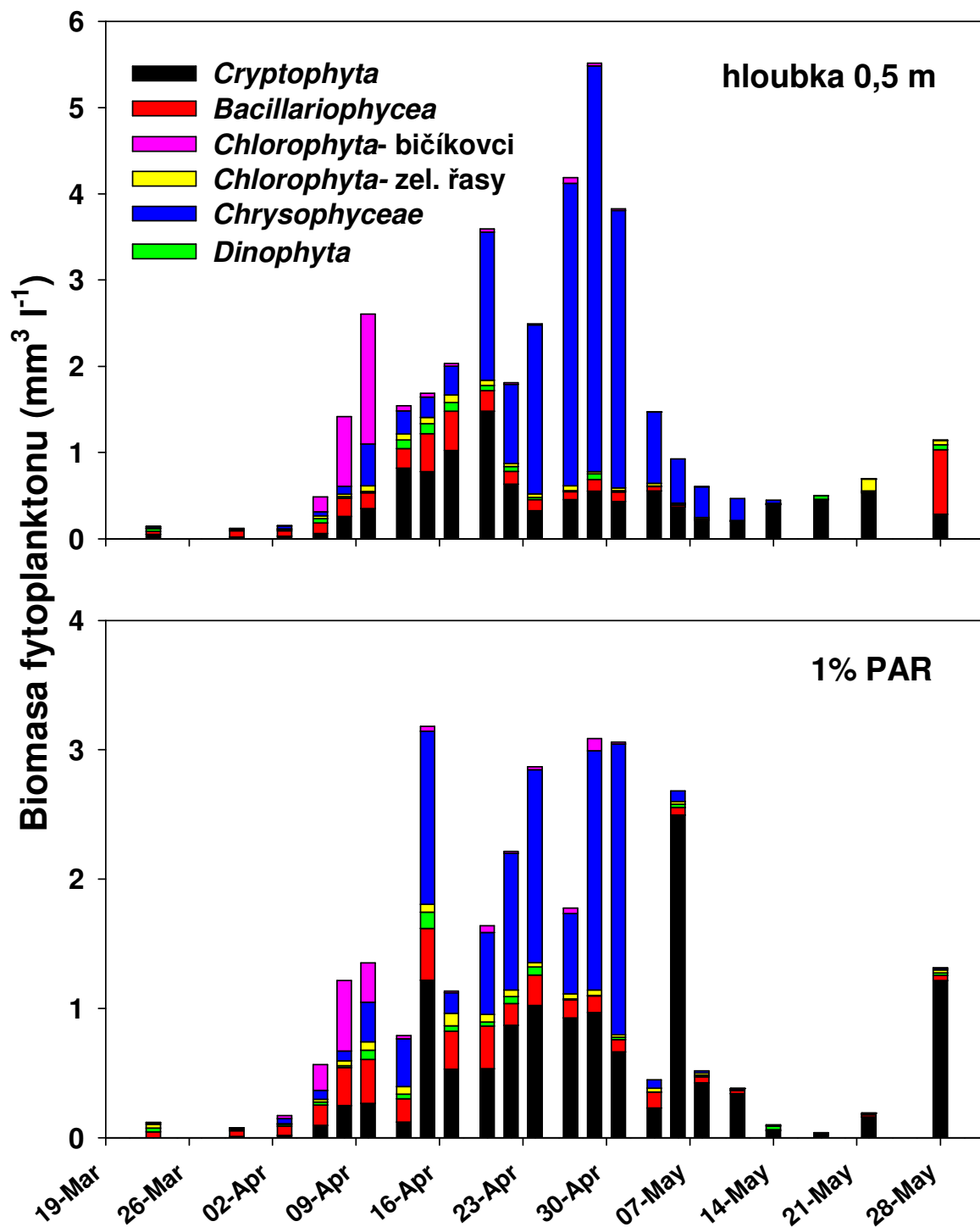
První tři odběry v nádrži Římov byly provedeny koncem března ještě před jarním nástupem fytoplanktonu. Na začátku dubna byl v nádrži zjištěn významný nárůst biomasy fytoplanktonu měřený jako chlorofylu *a* (obr. 1). V hloubce 0,5 m a v hloubce 1% PAR měl rozvoj fytoplanktonu podobný průběh, i když koncentrace chlorofylu-*a* dosahovala větších hodnot u hladiny (kromě začátku května). Vzhledem k tomu, že odběry probíhaly v intervalech 2-3 dnů, jsme byli schopni zachytit tři jarní maxima fytoplanktonu. Na začátku května došlo s rozvojem zooplanktonu k významnému poklesu chlorofylu-*a*. Z odběrů od druhé poloviny května, ve které byla zjištěna malá koncentrace chlorofylu-*a*, můžeme usuzovat vliv filtrujícího zooplanktonu na společenstvo fytoplanktonu. Perloočky dosahovaly 19. května početnosti až cca 145 ind. l⁻¹. V nádrži došlo v tomto období k tzv. fázi čiré vody, která je charakteristická nízkou početností fytoplanktonu, z důvodu jeho intenzivní filtrace zooplanktonem.

V jarním období bylo společenstvo fytoplanktonu tvořeno zejména skupinami *Cryptophyta* (Skrytěnky) a *Chrysophyceae* (Zlativky), a v menší míře byly také zastoupeny skupiny *Bacillariophyceae* (Rozsivky) a *Chlorophyta* – flagellata (tzv. zelení bičíkovci). Skupiny *Dinophyta* (Obrněnky), a *Chlorophyta*- algae ebulum flagellata (tzv. nebičíkaté zelené řasy) se ve fytoplanktonu vyskytovaly pouze v malém množství (obr. 2). Na konci března se začaly rozvíjet skupiny *Bacillariophyceae* a *Dinophyta*.



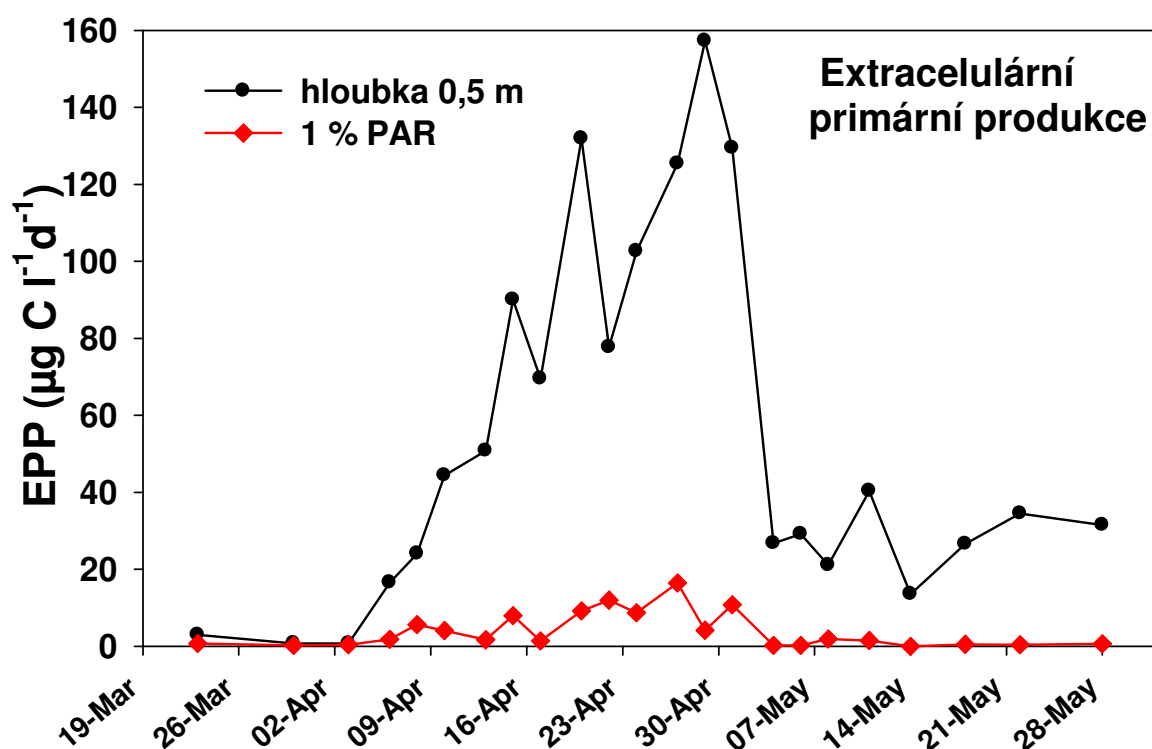
Obr. 1. Sezónní změny koncentrace chlorofylu-a ve dvou odběrových hloubkách v návaznosti na jarní rozvoj fytoplanktonu v nádrži Římov.

Začátkem dubna tvořili velkou část biomasy tzv. zelení bičíkovci a v polovině dubna už podstatnou částí biomasy fytoplanktonu byla *Cryptophyta* a *Chrysophyceae*. Zatímco koncem dubna v hloubce 0,5 m tvořila podstatnou část biomasy skupina *Chrysophyceae*, v hloubce 1% PAR postupně docházelo k rozvoji skupiny *Cryptophyta*, která od května v této hloubce výrazně dominovala. V předposledním odběru (22. 5.) byl v hloubce 0,5 m zjištěn výrazný nárůst podílu skupiny tzv. nebičíkatých zelených řas a v posledním odběru převážila skupina *Bacillariophyceae*. V hloubce 1% PAR je na závěr patrný opětovný rozvoj skupiny *Cryptophyta*.



Obr. 2. Sezonní změny hlavních taxonomických skupin fytoplanktonu ve dvou odběrových hloubkách v jarním období.

Jedním z dalších měřených parametrů byla extracelulární primární produkce (EPP, obr. 3). Z grafu je patrné, že v hloubce 1% PAR tato EPP dosahovala malých hodnot. Naopak u hladiny mohla být EPP významným zdrojem uhlíku pro určité skupiny bakterií. V hloubce 0,5 m EPP těsně korelovala (Spearman, $r^2 = 0,861$; $P < 0,001$) s rozvojem fytoplanktonu a také dosáhla tří maxim.



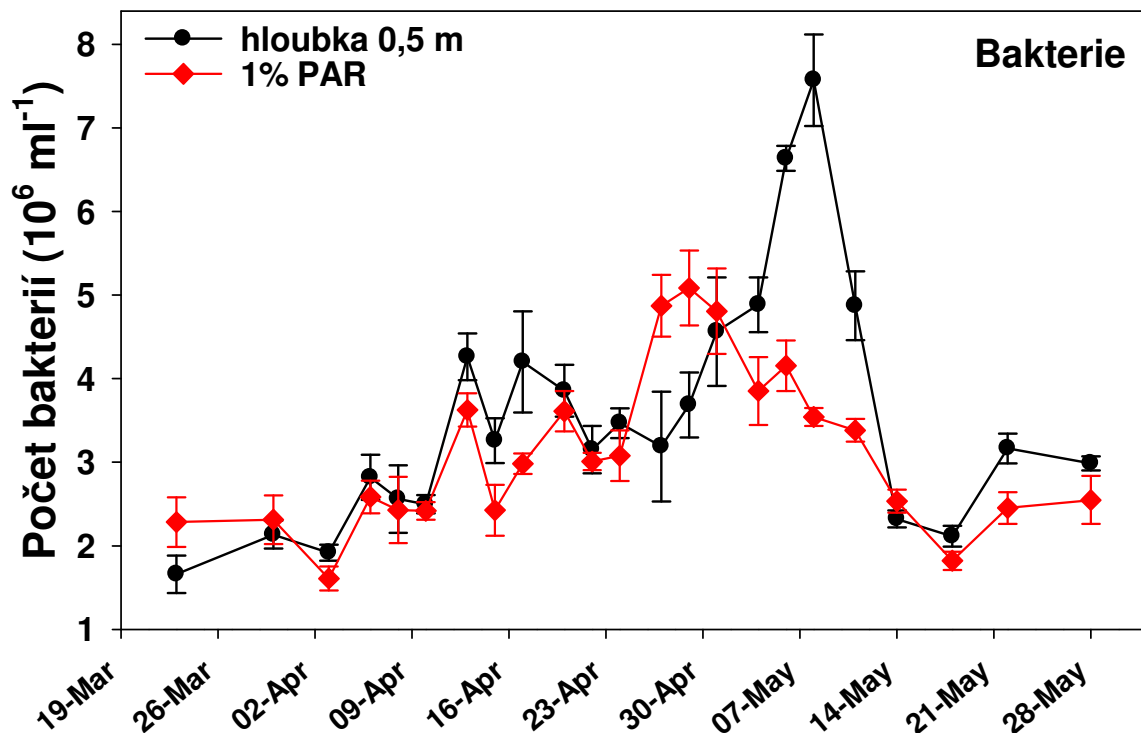
Obr. 3. Sezónní změny extracelulární primární produkce ve dvou odběrových hloubkách v jarním období nádrže Římov.

Za EPP v hloubce 0,5 m byly odpovědné zejména dominantní skupiny *Chrysophyceae* (Spearman, $r^2 = 0,539$; $P < 0,001$) a *Cryptophyta* (Spearman, $r^2 = 0,498$; $P < 0,001$), ale také méně početná skupina, tzv. zelení bičíkovci, korelovala významně s EPP (Spearman, $r^2 = 0,208$; $P < 0,05$). Ve spodní vrstvě korelovali s EPP biomasy skupiny *Bacillariophyceae* (Spearman, $r^2 = 0,403$; $P < 0,01$), tzv.

zelení bičíkovci ($r^2 = 0,435$; $P < 0,001$) a *Chrysophyceae* (Spearman, $r^2 = 0,615$; $P < 0,001$).

5.2 Bakteriální početnost a dynamika

Vývoj bakterioplanktonu v jarním období úzce navazoval na vývoj fytoplanktonu. Od začátku dubna se počet bakterií postupně zvyšoval v obou vrstvách (obr. 4).



Obr. 4. Celkové počty bakterií ve dvou odběrových hloubkách v jarním období. Uvedeny jsou průměry dvou měření \pm směrodatná odchylka.

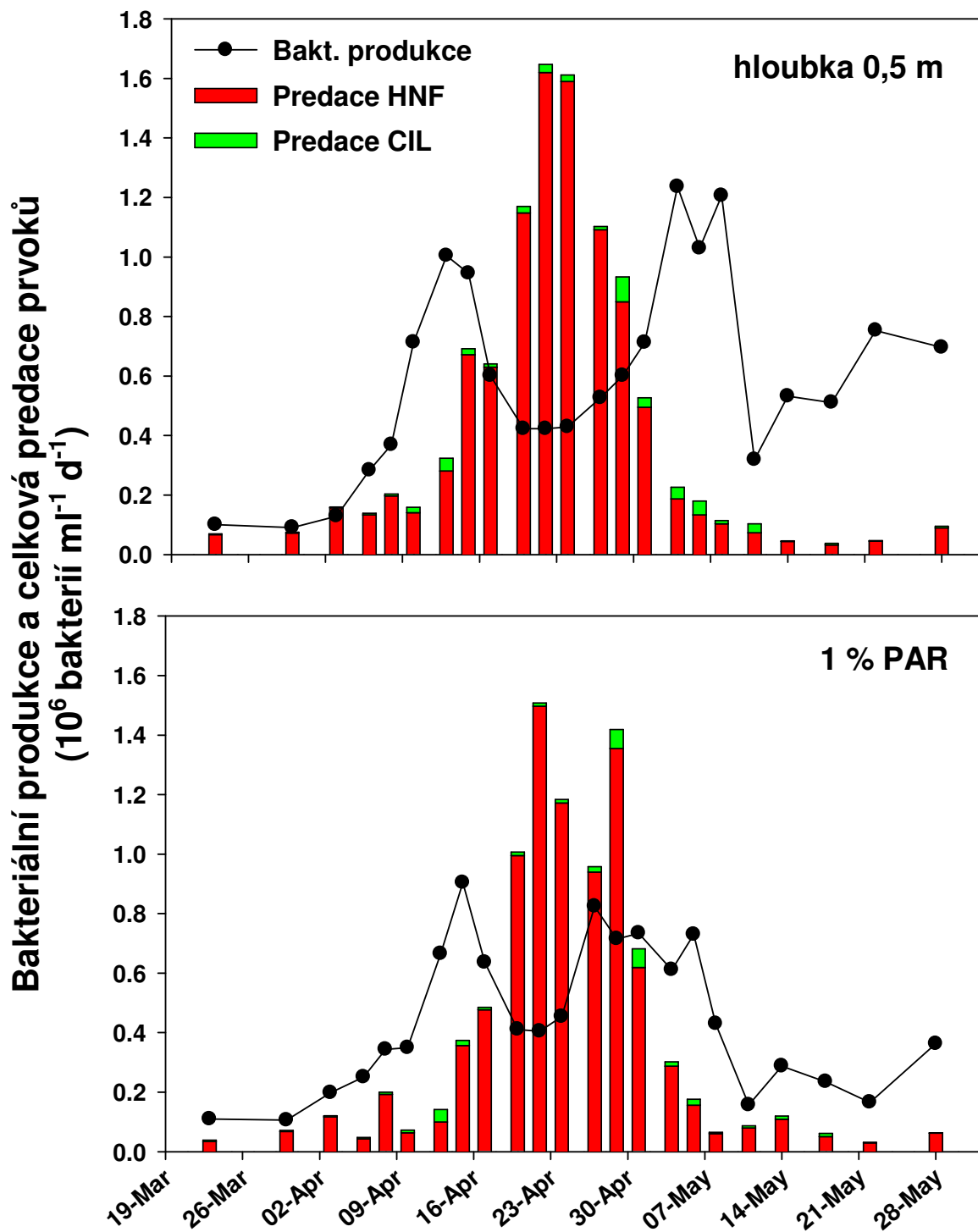
Obě hloubky vykazují podobný průběh, až na data získaná od konce dubna do poloviny května. V tomto období byla početnost bakterií mnohem vyšší ve vrchní vrstvě než v hloubce 1 % PAR. I když v tomto období díky filtrujícímu zooplanktonu docházelo k poklesu fytoplanktonu, početnost bakterioplanktonu ve vrchní vrstvě vzrůstala až do 8. května. Následující rozvoj zooplanktonu (obr. 6) a pokles fytoplanktonu se už naplno projevil v obou vrstvách. Obecně nebyl prokázán

signifikantní rozdíl mezi početností bakterií v hloubce 0, 5 m a v hloubce 1% PAR (T-test, $P = 0,08$)

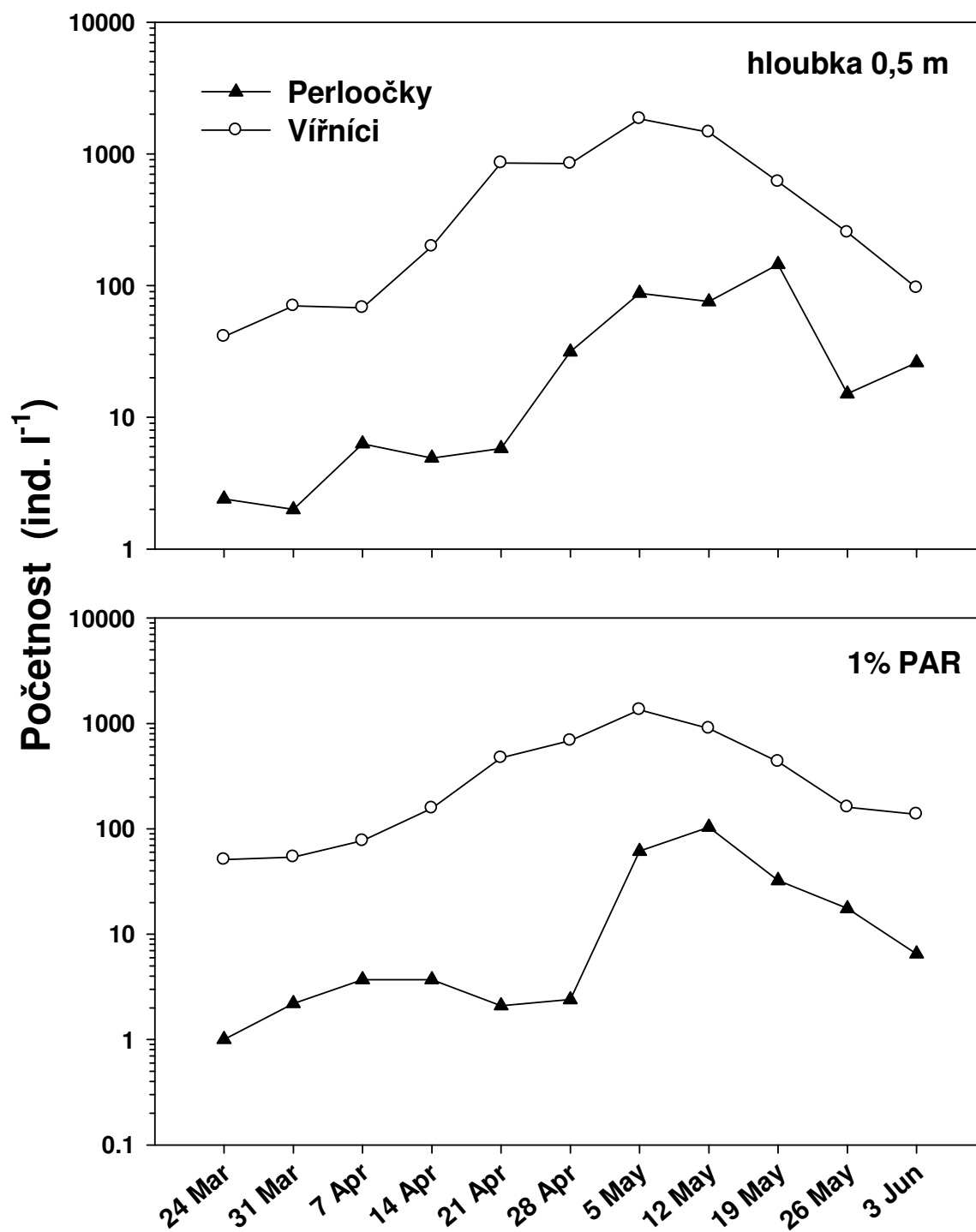
5.3 Bakteriální produkce, predace prvoků pohlcujících bakterie a početnost zooplanktonu

Od začátku dubna docházelo k postupnému navyšování bakteriální produkce (BP), která měla podobný průběh v obou vrstvách (obr. 5). Predace prvoků na bakteriích byla způsobena zejména heterotrofními bičíkovci (HNF), zatímco role nálevníků (CIL) byla většinou zanedbatelná. Vrchol celkového predačního tlaku (TGR HNF + CIL) byl zjištěn v druhé polovině dubna (odběr 22. 4.) a dosahoval hodnot $1,64 \cdot 10^6$ bakterií $d^{-1} ml^{-1}$ v hloubce 0,5 m a $1,5 \cdot 10^6$ bakterií $d^{-1} ml^{-1}$ v 1 % PAR. V této době byl také zaznamenán významný propad v BP (tab. 3). Celková predace prvoků pozitivně korelovala jak s BP (Spearman, $r^2 = 0,166$; $P < 0,001$) tak i s početností bakterií (Spearman, $r^2 = 0,271$; $P < 0,001$). Z obr. 5 (hloubka 0,5 m) je patrné, že po snížení predačního tlaku prvoků došlo opět ke zvýšení BP, tento trend se zachoval až do 11. 5., kdy následoval prudký pokles. V tomto období byl zjištěn úbytek fytoplanktonu v důsledku rozvoje filtrujícího zooplanktonu (obr. 6).

Bakteriální početnost (BA) a produkci (BP) jsem porovnávala s dalšími parametry uvedenými v tab. 3. Z výsledků vyplývá, že rozvoj bakterioplanktonu úzce souvisí s rozvojem fytoplanktonu. S BA koreluje jak celková primární produkce fytoplanktonu, tak EPP a chlorofyl-*a*. BA a biomasa fytoplanktonu vykazují relativně těsný pozitivní vztah, který indikuje, že cca 37 % variability početnosti bakterií je vysvětleno změnami biomasy fytoplanktonu (Spearman, $r^2 = 0,373$; $P < 0,001$). Početnost vířníků (*Rotatoria*) pozitivně korelovala pouze s BP, ne však již s BA.



Obr. 5. Sezónní změny bakteriální produkce a predace heterotrofních bičíkovců (HNF) a nálevníků (CIL) v obou odběrových hloubkách.



Obr. 6. Sezónní změny v početnosti vířníku a perlooček v obou odběrových hloubkách.

Tab. 3. Korelační analýzy studovaných parametrů pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Data byla sjednocena pro obě odběrové hloubky. Hodnoty uvedené v tabulce reprezentují koeficient determinace r^2 pro porovnávané korelační parametry. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS: nesignifikantní výsledek. (n = 46) Negativní korelace nebyla zaznamenána.

	Bakteriální produkce ($\mu\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Počet bakterií (10^6 ml^{-1})
Extracelulární primární produkce ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{d}^{-1}$)	0,239 **	0,211 ***
Primární produkce celková ($\mu\text{g Cl}^{-1} \text{h}^{-1}$)	0,195 **	0,150 **
Chlorofyl a ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0,247 **	0,168 ***
Fytoplankton biomasa ($\text{mm}^3 \text{l}^{-1}$)	0,316 ***	0,373 ***
Predace HNF+CIL ($10^6 \text{ bakt. d}^{-1}$)	0,166 **	0,271 **
<i>Rotatoria</i> (ind l^{-1})	0,266 ***	NS

5.4 Fylogenetická struktura bakteriálního společenstva

Nejpočetnější skupinou z domény Eubacteria byla *β -Proteobacteria* (tab. 4). Z jejich podskupin byla nejvýznamnější R-BT065. Podskupina *Polynucleobacter*_{abcd} byla většinou málo významná, tj. < 5% celkové BA. Do výsledků jsem zařadila pouze klastr AC₁ ze skupiny *Actinobacteria*, jelikož použitá próba určená pro *Actinobacteria* (HGC69a) nepokrývá všechny bakterie patřící do této skupiny, a tak významně podhodnocuje výsledky. Všechny fylogenetické skupiny bakterií dosahovali podobných hodnot v obou měřených hloubkách (tab. 4).

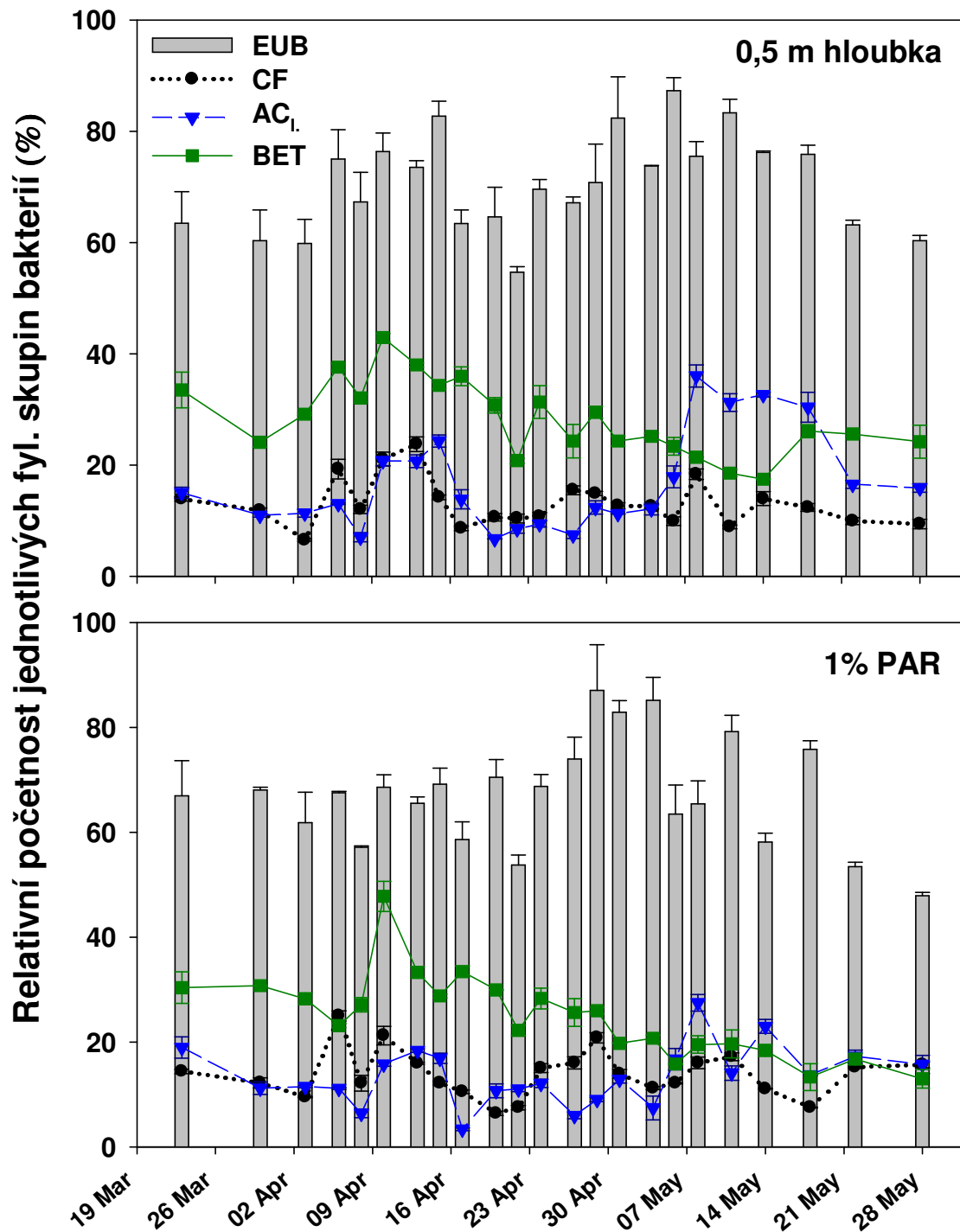
Tab. 4. Hybridizovatelnost studovaných fylogenetických skupin bakterií ve dvou odběrových hloubkách se směrodatnou odchylkou (\pm SD). Data pro jednotlivé fylogenetické skupiny reprezentují průměr ze dvou replikátů. Hodnoty uvádějí procenta (%) ve vztahu k celkové BA zjištěné po nabarvení buněk fluorochromem DAPI.

Próba	Průměrná hybridizovatelnost v hloubce 0,5 m \pm SD	Průměrná hybridizovatelnost v 1 % PAR \pm SD
EUB	70,7 \pm 8,7	67,4 \pm 10,2
BET	28,3 \pm 6,7	24,9 \pm 7,9
R-BT	10,6 \pm 3,4	8,7 \pm 2,6
PNEC_{abcd}	4,9 \pm 2,4	3,6 \pm 2,2
CF	13,1 \pm 4,2	13,9 \pm 4,5
AC_I	16,7 \pm 8,7	13,5 \pm 5,6

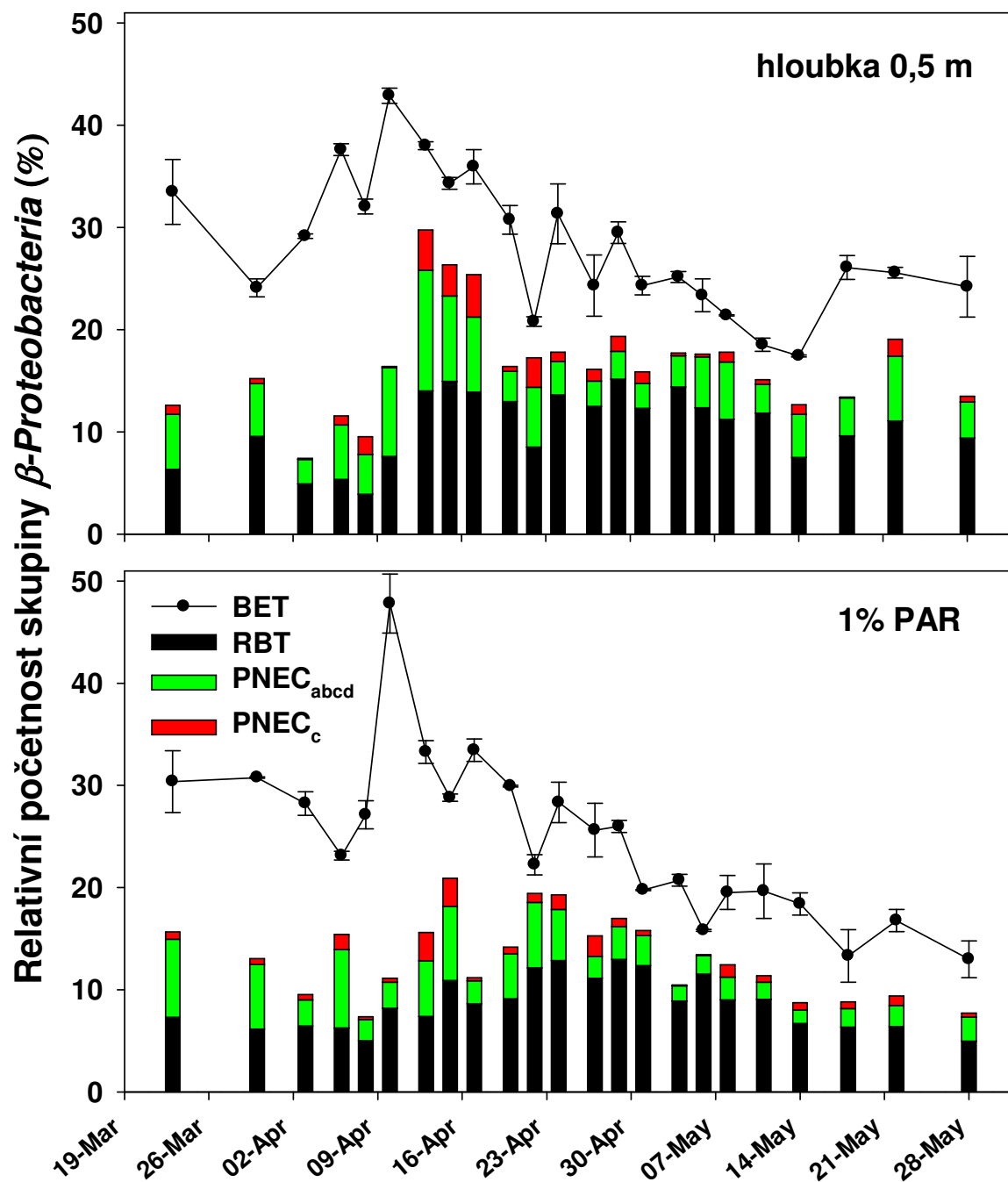
5.5 Posuny v genetickém složení bakterioplanktonu

V rámci Eubacteria do začátku května převažovala v obou hloubkách skupina *β -Proteobacteria* (BET, obr. 7). Tato skupina dosáhla 10. dubna maxima současně s vrcholem skupiny tzv. zelených bičíkovců. Do začátku května si BET udržovaly početnost kolem 25-30 %. Početnost této skupiny postupně klesala, podobně jako biomasa fytoplanktonu. Od začátku května se zvyšovala jak relativní, tak i absolutní početnost klastru AC_I, a z odběru provedeného 8. května bylo zjištěno jeho maximum (29-38 % z celkové BA). Skupina *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes* (CF) měla v obou hloubkách podobný průběh a její podíl v bakterioplanktonu se pohyboval kolem 13 %. Také nejevila žádné konkrétní návaznosti na fytoplankton.

V první polovině odběrové sezóny, kdy BET dosahovaly maxima, nebylo zřejmé, které hlavní podskupiny BET s těmito vrcholy BET početně korespondovaly (obr. 8). Až v druhé polovině odběrové sezóny byla zřejmá návaznost dynamiky těchto zkoumaných podskupin s početností BET. Početnost podskupin RB-T065 (RBT) a *Polynucleobacter*_{abcd} ($PNEC_{abcd}$) patřících do skupiny BET byla v první polovině studovaného období velmi podobná. V druhé polovině jarního období se RBT staly nejpočetnější skupinou BET. $PNEC_{abcd}$ byl zastoupen ve větším množství v odběrové hloubce 0,5 m. Podskupina *Polynucleobacter*_c ($PNEC_c$) patřících do skupiny $PNEC_{abcd}$ dosahovala svých maxim okolo 16. dubna. V obou odběrových hloubkách se zásadně nelišil celkový vývoj všech podskupin BET.



Obř. 7. Sezónní změny v zastoupení jednotlivých fylogenetických skupin bakterií ve dvou odběrových hloubkách. Jednotlivé fylogenetické skupiny byly počítány ve dvou replikátech. Počty bakterií patřících do jednotlivých fylogenetických skupin jsou vyjádřeny v procentech vypočítaných z celkového počtu buněk nabarvených fluorochromem DAPI. Chyba měření indikuje rozpětí dvou paralelních hodnot. (n = 46)



Obr. 8. Změny v zastoupení jednotlivých klastrů skupiny β - *Proteobacteria* ve dvou odběrových hloubkách. Jednotlivé fylogenetické skupiny byly počítány ve dvou replikátech. Počty bakterií patřících do jednotlivých fylogenetických skupin jsou vyjádřeny v procentech vypočítaných z celkového počtu buněk nabarvených DAPI. Chybové úsečky představují rozpětí hodnot dvou paralelních měření. (n = 46)

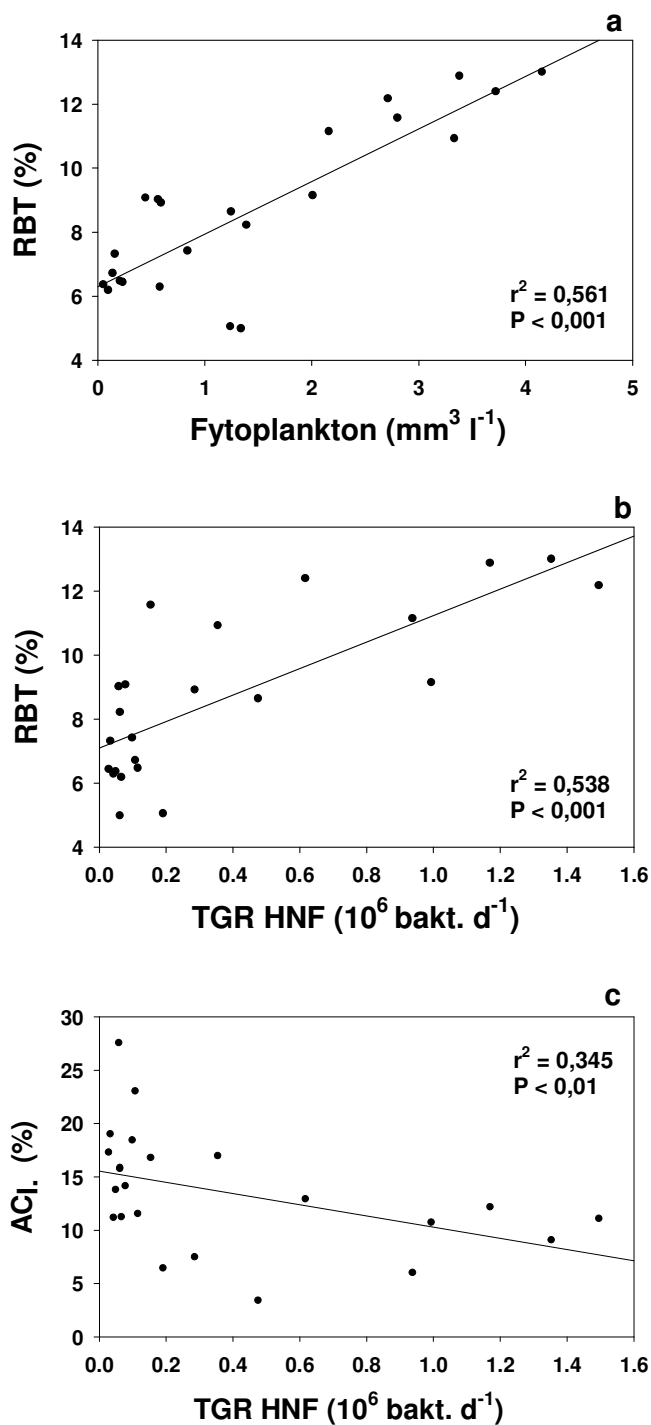
Pro hlubší analýzu vybraných parametrů jsem použila skupinu BET, jejich podskupiny PNEC_{abcd} a RBT a dále skupinu AC_I. Skupinu CF a klastr PNEC_c jsem v dalších statistických výsledcích neuváděla z důvodu nejasných trendů, a tudíž i nedostatku signifikantních výsledků.

Ze statistických výsledků vyplývá (tab. 5), že skupina BET a její podskupiny se chovají konzistentně a mají pozitivní vazbu na PP a EPP fytoplanktonu. Klastr RBT vykazuje nejtěsnější vazbu na fytoplankton (obr. 9a) a koreluje s hlavními skupinami fytoplanktonu v nádrži (*Cryptophytes*, *Chrysophytes*), které z velké části odpovídají za EPP. Z toho můžeme předpokládat, že bakterie klastru RBT jsou schopny využívat tyto produkty fytoplanktonu. BET má těsnou vazbu také na další skupiny fytoplanktonu (*Diatoms*, *Dinophyta*, tzv. zelení bičíkovci, tzv. zelené nebičíkaté řasy). Podskupina PNEC_{abcd} nemá významný vztah k dominantním skupinám fytoplanktonu, ale naopak k méně početným skupinám jako jsou *Dinophyta* a tzv. nebičíkaté zelené řasy. Bakterie z klastru AC_I mají zřejmě jiné substrátové preference a tudíž i spíše negativní korelace k vybraným charakteristikám fytoplanktonu.

Klastru RBT významně koreluje s intenzitou predace prvoků (heterotrofní bičíkovci- HNF a nálevníci- CIL na bakteriích) (obr. 9b). Z toho můžeme usuzovat, že tento klastr je poměrně náchylný k predaci. Naopak klastr AC_I vykazuje negativní vazbu na predaci HNF (obr. 9c), tudíž se můžeme domnívat, že je odolnější vůči predaci těmito prvoky.

Tab. 5. Výsledky statistické analýzy dat pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Data byla sjednocena pro obě odběrové hloubky. Data pro fylogenetické podskupiny bakterioplanktonu reprezentují procento z BA. Hodnoty uvedené v tabulce reprezentují koeficient determinace r^2 pro porovnávané korelační parametry. V případě klastru AC₁ r^2 představuje signifikantní negativní vazbu, zvýrazněno žlutě * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; NS: nesignifikantní výsledek. (n = 46)

	BET	RBT	PNEC _{abcd}	AC ₁
Primární produkce celková ($\mu\text{g C l}^{-1}\text{h}^{-1}$) atd	0,141 *	0,316 ***	0,162 **	NS
Extracelulární produkce fytopl. ($\mu\text{g C l}^{-1}\text{d}^{-1}$)	0,103 *	0,393***	0,148 **	NS
Fytoplankton biomasa ($\text{mm}^3 \text{l}^{-1}$)	NS	0,447 ***	NS	0,096 *
<i>Cryptophytes</i> ($\text{mm}^3 \text{l}^{-1}$)	NS	0,406 ***	NS	NS
<i>Chrysophytes</i> ($\text{mm}^3 \text{l}^{-1}$)	NS	0,405 ***	NS	0,127*
<i>Bacillariophyceae</i> ($\text{mm}^3 \text{l}^{-1}$)	0,352 ***	NS	NS	0,172**
<i>Dinophyta</i> ($\text{mm}^3 \text{l}^{-1}$)	0,332***	NS	0,282**	NS
<i>Chlorophyta</i> – bičíkovci ($\text{mm}^3 \text{l}^{-1}$)	0,382***	NS	NS	0,152**
<i>Chlorophyta</i> - ostatní ($\text{mm}^3 \text{l}^{-1}$)	0,306***	0,145**	0,356**	NS
Predace HNF (10^6 bakt. d^{-1})	NS	0,310 ***	NS	0,329***
Predace CIL (10^6 bakt. d^{-1})	NS	0,461 ***	NS	NS



Obr. 9. Hladinová vrstva - korelační vztah mezi: početností bakterií hybridizovaných sondou R-BT065 a biomasou fytoplanktonu (**a**); Početností bakterií hybridizovaných se sondou R-BT065 a predací heterotrofních bičíkovců -HNF (**b**); Početností bakterií hybridizovaných se sondou Acl-852 a predací HNF (**c**). Data jsou proložena přímkou pro lineární regresi, r^2 = koeficient determinace mezi 2 parametry. ($n = 23$) TGR HNF je celková rychlost predace společenstvem bičíkovců.

6 Diskuze

6.1 Faktory regulující dynamiku bakterioplanktonu

6.1.1 Primární a extracelulární produkce fytoplanktonu

Jedním z cílů této diplomové práce bylo prokázat, že dynamika bakteriálního společenstva nádrže Římov je výrazně kontrolována zdroji. Vzorky byly odebírány v 2-3 denních intervalech, což poskytlo vysoké časové rozlišení dynamiky fytoplanktonu a zároveň dynamiky bakterioplanktonu, jelikož doba zdvojení bakterií se pohybuje v rozmezí 1-2 dnů (ŠIMEK ET AL., 1997). Z výsledků vyplývá (tab. 3), že EPP a PP fytoplanktonu má na společenství bakterioplanktonu značný vliv. Oba faktory se významně lišily ve dvou odběrových hloubkách. Zatímco v hloubce 0,5 m dosahovala PP a EPP fytoplanktonu vysokých hodnot (EPP: $160 \mu\text{g C l}^{-1}\text{d}^{-1}$) v hloubce 1% PAR byla produkce fytoplanktonu desetkrát nižší. Nicméně početnost bakterií se v obou hloubkách významně neměnila, a je tedy pravděpodobné, že mícháním eufotické vrstvy docházelo k zpřístupnění substrátu i pro spodní vrstvu.

V souladu s literaturou tato práce (COLE ET AL., 1982; FUKAMI ET AL., 1990) indikuje, že extracelulární produkty fotosyntézy jsou důležitým zdrojem substrátu pro vodní bakteriální společenstvo, jejíž značnou část (20–48 %, obr. 7) tvoří podskupina *β -Proteobacteria*. (ŠIMEK AT AL., 2007). *β -Proteobacteria* byly zaznamenány jako dominantní podskupina i v oligo- a mesotrofních vodách, kde exudáty produkované fytoplanktonem představují hlavní zdroj substrátu pro růst bakterií (COLE ET AL., 1982). I když bylo složení exudátů zkoumáno v laboratorních i terénních výzkumech (např. SUNDH, 1992; GIROLDO ET AL., 2007), stále ještě není zcela jasné, které skupiny fytoplanktonu jsou hlavními producenty EPP. Studie

ŠIMKA ET AL. (2008) přináší nový poznatek o těsném vztahu mezi EPP a dynamikou skupiny *Cryptophyta*. Data získaná v mé práci indikují, že za EPP jsou odpovědné zejména dvě dominující skupiny jarního fytoplanktonu: *Cryptophyta* a *Chrysophyceae*. Pro první a druhý vrchol EPP (obr. 3) je ve vrchní vrstvě patrná časová koincidence se skupinou *Cryptophyta* a pro třetí vrchol se skupinou *Chrysophyceae* (obr. 2). Ve vrchní vrstvě nastal prudký pokles EPP začátkem května, kdy došlo k rozvoji filtrujícího zooplanktonu (srovnej obr. 3 a 6). To, že nedošlo v tomto období k poklesu početnosti a produkce bakterií indikuje, že významnějším alternativním zdrojem substrátu pro bakterie se mohla stát exkrece zooplanktonu bohatá na zbytky nedokonale strávených řas (např. LAMPERT, 1978).

6.1.2 Vliv dynamiky fytoplanktonu na bakteriální společenstvo

Současná literatura (např. LINDSTRÖM, 2001; GROSSART ET AL., 2005; MURRAY ET AL., 2007) a získaná data jasně dokazují, že složení fytoplanktonu má signifikantní vliv na složení bakteriálního společenstva. Přísun organických látek určuje potenciální celkovou biomasu bakterií, která může narůst - tedy celkovou BP. Pro rychlost růstu bakterií je určující rychlost přísunu organického substrátu a jeho struktura, spíše než jeho aktuální koncentrace (STRAŠKRABOVÁ ET AL., 1996).

V dubnu došlo k prudkému nárůstu společenstva fytoplanktonu a následnému rozvoji společenstva bakterioplanktonu. Získaná data potvrzují, že bakterioplankton byl v tomto období navázán na extracelulární produkty fotosyntézy (tab. 5). Ve vrchní vrstvě byla dominantní zejména skupina *Chrysophyceae* a ve vrstvě 1% PAR to byla skupina *Cryptophyta* (obr. 3). I méně početné skupiny však mohly mít určitý vliv na formování bakteriálního společenstva, ten ale nebyl statisticky průkazný.

Nejtěsnější vazby na fytoplankton byly zaznamenány pro skupinu β -*Proteobacteria* (BET) a jejího klastru R-BT065 (RBT). Recentně byl popsán rod *Limnohabitans* (HAHN ET AL. 2010), kam patří všechny prozatím popsané druhy bakterií z klastru RBT (KASALICKÝ ET AL. 2010; KASALICKÝ, nepublikované údaje). Bakterie RBT jsou často nalézanou a kosmopolitně rozšířenou podskupinou a v souladu s literaturou (např. BURKERT ET AL., 2003, ŠIMEK ET AL. 2010) a dle předběžných dat je tato podskupina schopná využívat rozpuštěný organický uhlík produkovaný fytoplanktonem (viz ŠIMEK ET AL. 2010). Nejtěsnější pozitivní vazby byly nalezeny u skupin *Cryptophyta*, *Chrysophyceae* a méně těsná vazba byla nalezena také u skupiny tzv. zelených nebičíkatých řas (tab. 5). Zatímco v první polovině odběrové sezóny představovala podskupina RBT pouze malý podíl z BET, v druhé polovině odběrové sezóny, charakteristické rychlým nárůstem fytoplanktonu, již tvořila i více než 50 % z relativního počtu BET (obr. 8). Je tedy patrné, že během vývoje jarního fytoplanktonu došlo k posunu v bakteriálním společenství. Podskupina *Polynucleobacter*_{abcd} neměla vazbu na dominantní skupiny fytoplanktonu a korelovala méně významně pouze s málo početnými skupinami, jako byly *Dinophyta* a tzv. nebičíkaté zelené řasy (tab. 5).

Actinobacteria je kosmopolitně rozšířená skupina bakterioplanktonu, patřící však mezi gram-pozitivní bakterie, které jsou fylogeneticky velmi odlišné od ostatních skupin sladkovodního mikrobiálního společenstva (např. ZUBKOV ET AL., 2001; WARNECKE ET AL., 2005). I její podskupiny, které využívají v kulturách stejný substrát, vykazují naprosto odlišné růstové charakteristiky (HAHN ET AL., 2003). Získaná data také ukazují, že podskupina Acl-852, patřící do skupiny *Actinobacteria*, vykazuje k fytoplanktonu spíše negativní vztah na rozdíl o ostatních studovaných skupin bakterioplanktonu (tab. 5). Podskupina Acl-852 vykazovala obrácený

korelační vztah k celkové biomase fytoplanktonu, k dominantní skupině *Chrysophytes* a k méně početným skupinám Bacillariophyceae a k tzv. zeleným bičíkovicům. Je tedy pravděpodobné, že tyto bakterie nevyužívají jako zdroj substrátu extracelulární produkty fotosyntézy, mohou ale využívat alochtonní zdroje substrátu (WARNECKE ET AL., 2005) či biomasu odumírajícího planktonu. Tato skupina je velmi široká, a lze tudíž očekávat poměrně širokou škálu metabolických schopností.

6.1.3 Vliv predace a trofické struktury na bakteriální společenstvo

Na základě získaných dat můžeme konstatovat, že společenství bakterií neovlivňuje pouze fytoplankton (tedy kontrola zdrojů), ale i jejich konzumenti (kontrola predátorů). Tento vliv je patrný zejména od půlky dubna, kdy se začalo významně rozvíjet společenství prvoků - zejména heterotrofních bičíkoviců (HNF, obr. 5). V tomto období (13. 4. až 4. 5.) je patrný výrazný pokles BP (obr. 5), který koinciduje s prudkým nárůstem početnosti HNF a jejich predaním tlakem, který dočasně převyšuje i BP.

Nejtěsnější vazbu na aktivitu prvoků pohlcující bakterie vykazovala podskupina RBT (tab. 5). Podle literatury má tato podskupina klíčovou roli v bakterioplanktonu v nádrži Římov a velmi citlivě reaguje jak na změny v substrátu, tak na přítomnost predátorů, zejména HNF (ŠIMEK ET AL., 2005, 2006, EMI). Tyto bakterie také dosahují poměrně větších velikostí (průměrný buněčný objem v rozmezí 0,09 až 0,22 μm^3), než je průměr pro veškerý bakterioplankton a jsou proto přednostně pohlcovány HNF. U skupiny RBT doposud nebyl zjištěn žádný efektivní mechanismus změny morfortypu, či jiného typu obrany vůči predaci, jako jsou například vlákna nebo vločky, jejichž tvorba byla popsána u jiných skupin bakterií (NAPŘ. HAHN & HÖFLE, 2001- review). Nicméně v období největšího predaním tlaku

tlaku (22. 4.) nedošlo k až tak velkému poklesu těchto bakterií, jak by se dalo očekávat (obr. 8). Předpokládá se, že díky své vysoké růstové rychlosti (zdvojení 8-9 hodin) jsou RBT bakterie schopny kompenzovat velké ztráty způsobené predací (ŠIMEK ET AL., 2005). Byl dokonce dokázán významný vztah mezi predací prvoků a zvýšenou metabolickou a fyziologickou aktivitou bakterioplanktonu vztaženou na buňku (ŠIMEK ET AL., 1990; SANDERS ET AL., 1992; PERNTHALER ET AL., 1996). Při intenzivním vyžírání prvoků je totiž koncentrace bakterií stále udržována na nízké úrovni, takže při stejné produkci se udržuje nižší biomasa, která ale má rychlejší obrat (STRAŠKRABOVÁ ET AL., 1996).

V protikladu k výše uvedenému trendu pro RBT bakterie byla nalezena obrácená korelace mezi podskupinou Acl-852 a celkovým žírem prvoků (tab. 5). Bakterie z této podskupiny jsou obecně malých rozměrů (průměrný buněčný objem v rozmezí 0,054 až 0,085 μm^3) a zdají se být velmi málo ovlivněny predáčním tlakem. Bakteriální buňky ze skupiny Acl-852 netvoří vločky ani vlákna, ale jelikož patří mezi gram-pozitivní, jsou pro prvoky pravděpodobně hůře stravitelné (HORŇÁK ET AL., 2005). Je tedy zřejmé, že tyto bakterie jsou negativně selektovány prvoky (tab. 5). Toto zjištění je v souladu s literaturou (PERNTHALER ET AL., 2001, 2005- review), která uvádí, že skupina *Actinobacteria* může z podmínek velkého predáčního tlaku vlastně významně profitovat, jelikož se snižuje početnost kompetitorů o substrát, tedy ostatních skupin v bakteriálním společenství.

Během sezóny se uplatňují, či alternují zdroje substrátu pro bakterie různým způsobem. Extracelulární produkty fotosyntézy jsou nejpodstatnější na začátku jara, kdy fytoplankton prudce narůstá a tomu odpovídá i nárůst početnosti bakterií. Po rozvoji zooplanktonu (obr. 6) se přísun substrátu od fytoplanktonu k bakteriím

dočasně i urychlí. Bakterie v tomto období využívají jako zdroj substrátu nespotřebované zbytky fytoplanktonu natrávené v exkrementech zooplanktonu (LAMPERT, 1978). V období vrcholného rozvoje zooplanktonu byla už nádrž stratifikovaná a biomasa fytoplanktonu se kumulovala především ve vrchní vrstvě. Je tedy pravděpodobné, že celkový metabolismus planktonu akceleroval právě v horní části vodního sloupce s dostatkem světla pro růst fytoplanktonu, ale i výraznou filtrační činností zooplanktonu, který tak zprostředkoval zvýšený přísun organických substrátů a živin v podobě nestrávené zbytků řas. To již vedlo k velmi odlišné dynamice bakterioplanktonu v obou srovnávaných hloubkách. V hladinové vrstvě největší vrcholy BA (obr. 4) a BP (obr. 5) byly zaznamenány právě v tomto období, kdy se snižovala biomasa fytoplanktonu (obr. 1) a docházelo k rychlému nárůstu zooplanktonu (obr. 6). Lze tedy v souhrnu konstatovat, že tyto nestrávené zbytky fytoplanktonu produkované zooplanktonem se staly významným alternativním zdrojem organického substrátu pro růst bakterioplanktonu v hladinové vrstvě (obr. 4). Tato práce naznačuje, že rozvoj trofické struktury – především většího filtrujícího zooplanktonu, který se živí fytoplanktonem, může dočasně významně akcelerovat růst bakterioplanktonu.

7 Závěr

Celkově lze konstatovat, že získaná data neukázala pro celé zkoumané období významný vliv různých hloubek na bakteriální společenstvo, přestože ve vrchní vrstvě byla zaznamenána mnohem vyšší EPP (obr. 3). V první polovině odběrové sezóny patrně docházelo k promíchávání eufotické vrstvy, a tak mohl být dominantní zdroj substrátu (EPP), dostupný pro bakterioplankton v obou hloubkách, což indikují i tam naměřené srovnatelné hodnoty BP (obr. 5). Od začátku května se nádrž začala postupně stratifikovat a docházelo k nárůstu biomasy fytoplanktonu zejména ve vrchní vrstvě. To již vedlo k velmi odlišné dynamice bakterioplanktonu v obou srovnávaných hloubkách. V hladinové vrstvě například největší vrcholy BA a BP byly zaznamenány za již snižující se biomasy fytoplanktonu a rychlého nárůstu zooplanktonu (srovnej obr. 1 a obr. 6). Souběh těchto procesů v sukcesi planktonního společenstva vedl ke zvýšení exkrece nedokonale strávených zbytků fytoplanktonu zooplanktonem, což se pravděpodobně stalo i významným alternativním zdrojem organického substrátu pro růst bakterioplanktonu v hladinové vrstvě. Tato práce indikuje, že rozvoj potravního řetězce řasy-filtrující zooplankton může dočasně významně akcelarovat růst s bakterioplanktonu.

Ze získaných dat je zřejmé, že na formování bakteriálního společenstva má významný vliv i predace prvoků pohlcujících bakterie - zejména heterotrofních bičíkovců (obr. 5). Nejtěsnější vztah k predaci vykazovala podskupina R-BT065, která je známá svým vysokým růstovým potenciálem, který překonává dopad vlivu selektivní predace na RBT bakteriích (ŠIMEK ET AL. 2005- AEM, 2006- EMI) Naopak obrácená korelace byla nalezena mezi početností bakterií z klastru Acl-852

(*Actinobacteria*) s celkovým žírem bičíkovců na bakteriích. Tato skutečnost vypovídá o tom, že tyto drobné gram-pozitivní bakterie jsou negativně selektovány prvoky a lze očekávat určitý mechanismus rezistence těchto bakterií vůči predaci (PERNTHALER 2005 -review, JEZBERA ET AL. 2005- FEMS-ME, ŠIMEK ET AL. 2005-AEM).

Nejpočetnější z bakterioplanktonu byla skupina *β -Proteobacteria* a její podskupina R-BT065, jejíž počty a sezónní dynamika korelují těsně s parametry aktivity a biomasy fytoplanktonu. Tato podskupina má těsný vztah s hlavními skupinami fytoplanktonu (*Cryptophyta* a *Chrysophyceae*) z jarního období. Tato práce tudíž přinesla i nové náhledy na možné zdroje organického substrátu, vázané na specifické skupiny fytoplanktonu, které stimulovaly růst jasně definovaných skupin bakterií detekovaných metodou FISH.

8 Literatura

- Alfreider, A., J. Pernthaler, R. I. Amann, B. Sattlar, F. O. Glöckner, A. Ville & R. Psenner, 1996.** Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelegic layers of a high mountain lake using *in situ* hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2138-2144
- Amann, R. I., L. Krumholz & D. A. Stahl, 1990.** Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, 172(2):762-70.
- Amann, R. I., B. Zarda, D. A. Stahl & K. H. Schleifer, 1992.** Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3007-3011
- Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyerreil & F. Thingstad, 1983.** The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology - Progress Series*, 10: 257-263
- Berninger, U. G., B. J. Finlay & P. Kuupo-Leinikki, 1991.** Protozoan control of bacterial abundances in freshwaters. *Limnology and Oceanography*, 36: 139-147
- Burkert, U., F. Warnecke, D. Babenzien, E. Zwirnmann & J. Pernthaler, 2003.** Members of a readily enriched β -proteobacterial clade are common in a surface waters of a humic lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 6550-6559
- Cole, J. J., G. E. Likens & D. L. Strayer, 1982.** Photosynthetically produced dissolved organic carbon: an important carbon source for planktonic bacteria. *Limnology and Oceanography*, 27: 1080-1090
- Colwell, R. R., M. T. MacDonell & D. Swartz, 1989.** Identification of an arctic endolithic microorganism by 5S rRNA sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 11: 182-186
- del Giorno, P. A., J. M. Gasol, D. Vaqué, P. Mura, S. Agustí & C. M. Duarte, 1996.** Bacterioplankton community structure: protists control net production and the proportion of active bacteria in a coastal marine community. *Limnology and Oceanography*, 41: 1169-1179
- DeLong, E. F., S. J. Giovannoni & T. M. Schmit, 1990.** Tangential flow filtration and preliminary phylogenetic analysis of marine picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2572-2575
- Felip, M., M. L. Pace & J. J. Cole, 1996.** Regulation of planktonic bacterial growth rates: The effects of temperature and resources. *Microbiology Ecology*, 31: 15-28

- Fisher, M. M., J. L. Klug, G. Lauster, M. Newton & E. W. Triplett, 2000.** Effects of resources and trophic interactions on freshwater bacterioplankton diversity. *Microbiology Ecology*, 40: 125-138
- Fuhrman, J. A., 1999.** Marine viruses and their biogeochemical effect. *Nature*, 399: 541-548
- Fuhrman, J. A. & F. Azam, 1982.** Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters – evaluation and field results. *Marine Biology*, 66: 109-120
- Fuhrman, J. A. & R. T. Noble, 1995.** Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology and Oceanography*, 40: 1236-1242
- Fukami, K., S. Ohara & Y. Ishida, 1990.** Effect of extracellular organic carbon (EOC) from phytoplankton on the community structure of oligotrophic bacteria. *Archiv für Hydrobiologie - Beiheft Ergebnisse der Limnologie*, 34: 43-47
- Giovannoni, S. J., E. DeLong, G. J. Olsen & N. R. Pace, 1988.** Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology*, 170: 720-726
- Giroldo, D., P. I. C. Ortolano & A. A. H. Vieira, 2007.** Bacteria-algae association in batch cultures of phytoplankton from a tropical reservoir: the significance of algal carbohydrates. *Freshwater Biology*, 52: 1281-1289
- Glöckner, F. O., R. Amann, A. Alfreider, J. Pernthaler, R. Psenner, K. H. Trebesius & K. H. Schleifer, 1996.** An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 19: 403-406
- Glöckner, F. O., E. Zaichikov, N. Belkova, L. Denissova & J. Pernthaler, R. Amann, 2000.** Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of *Actinobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 5053-5065
- Grossart, H. P., F. Levold, M. Allgaier, M. Simon & T. Brinkhoff, 2005.** Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 7: 860-873
- Hahn, M. H., 2003.** Isolation of strains belonging to the cosmopolitan *Polynucleobacter necessarius* cluster from freshwater habitats located in free climatic zones. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5248-5254
- Hahn, M. W. & M. G. Höfle, 2001.** Grazing of protozoa and its effect on population of aquatic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 35: 113-121
- Hahn, M. W., V. Kasalický, J. Jezbera, U. Brandt, J. Jezberová & K. Šimek, 2010.** *Limnohabitans curvus* gen. nov., sp. nov., a planktonic bacterium isolated from a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 1358–1365.

Hejzlar, J., 1998. Transportní procesy v nádrži Římov. Sborník konference Orlice '98, Orlická hydrogeologická společnost, Ústí nad Orlicí, 78-85.

Hirons, W. D., E. A. Methé, S. A. Nierzwickbauer & J. P. Zehr, 1997. Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:2957–2960.

Horňák K, M. Mašín, J Jezbera, Y. Bettarel, J. Nedoma, T. Sime-Ngando & K. Šimek, 2005. Effects of decreased resource availability, protozoan grazing and viral impact on a structure of bacterioplankton assemblage in a canyon-shaped reservoir. *Microbiology Ecology*, 52: 315-327

Chrzanowski, T. H. & K. Šimek, 1990. Prey size selection by freshwater flagellated protozoa. *Limnology and Oceanography*, 35: 1424-1436

Jensen, A., 1984. Excretion of organic carbon as function of nutrient stress in marine phytoplankton and productivity. *Symposium Proceedings Springer*, 61-72

Jezbera, J., K. Horňák & K. Šimek, 2005. Food selection by bacterivorous protists: insight from the analysis of the food vacuole content by means of fluorescence *in situ* hybridization. *FEMS Microbiology Ecology*, 52: 351-363

Jürgens, K., H. Arndt & K. O. Rotthaupt, 1994. Zooplankton-mediated changes of microbial community structure. *Microbial Ecology*, 27: 27-42

Jürgens, K. & H. Güde, 1994. The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic systems. *Marine Ecology-Progress Series*, 112: 169-188

Jürgens, K., J. Pernthaler, S. Schala & R. Amann, 1999. Morphological and compositional changes in a planktonic bacterial community in a response to enhanced protozoan grazing. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1241-1250

Kasalický, V., J. Jezbera, K. Šimek, & M. W. Hahn, 2010. *Limnohabitans planktonicus* sp. nov., and *Limnohabitans parvus* sp. nov., two novel planktonic *Betaproteobacteria* isolated from a freshwater reservoir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 2710 - 2714.

Kasalický, V. Nepublikované údaje.

Kopáček, J. & J. Hejzlar, 1992. Semimikrostanovení veškerého nerozpuštěného fosforu ve vodě. Sborník konference Hydrochémiá '92, ČSVTS VÚVH Bratislava, 85-98.

Lampert, W., 1978. Release of dissolved organic carbon by grazing zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 23: 831-834

Lebaron, P., P. Catala & C. Fajon, 1997. A new sensitive, whole-cell hybridization technique for detection of bacteria involving a biotinylated oligonucleotide probe targeting rRNA and tyramide signal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3274-3278

- Linström E. S., 2001.** Investigating influential factors on bacterioplankton community composition: results from a field study of five mesotrophic lakes. *Microbiology Ecology*, 42: 598-605
- Lorenzen, C. J. 1967.** Determination of chlorophyll and phaeopigments. Spectrophotometric equations. *Limnology and Oceanography*, 12: 343-346
- Lund, J. W. G., C. Kipling & E. D. Le Cren, 1958.** The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia* 11: 143-70
- Mašín, M., K. Šimek, J. Jezbera, J. Nedoma, V. Straškrabová & J. Hejzlar, 2003.** Changes in bacterial community composition and microbial activities along the longitudinal axis of two differently loaded canyon-shaped reservoir. *Hydrobiologia*, 504: 99-113
- McCauley, E. & 1984.** The estimation of the abundance and biomass of zooplankton samples. In: Downing, J. A., F. H. Rigler (eds) *A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters*. Blackwell Publications, Oxford, 228-265
- Murray, A. E., C. Arnosti, C. L. De La Rocha, H. P. Grossart & U. Passow, 2007.** Microbial dynamics in autotrophic and heterotrophic seawater mesocosm. II. Bacterioplankton community structure and hydrolytic enzyme activities. *Aquatic Microbial Ecology*, 49: 123-141
- Pace, M. L., 1988.** Bacterial mortality and the fate of bacterial production. *Hydrobiologia*, 159: 41-49
- Pace, M. L., G. B. McManus & S. E. G. Findlay, 1990.** Planktonic community structure determines the fate of bacterial production in a temperate lake. *Limnology and Oceanography*, 35: 796-808
- Pace, M. L. & J. J. Cole, 1996.** Regulation of bacteria by resources and predation tested in whole-lake experiments. *Limnology and Oceanography*, 41: 1448-1460
- Pernthaler, J., 2005.** Predation on prokaryotes on the water column and its ecological applications. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 537-546
- Pernthaler, A., J. Pernthaler & R. Amann, 2002.** Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3094-3101
- Pernthaler, J., T. Posh, K. Šimek, J. Vrba, U. Nübel, F. O. Glöckner, R. Psenner & R. Amann, 2001.** Predator-specific enrichment of *Actinobacteria* from a cosmopolitan freshwater clade in a mixed continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2145-2155
- Pernthaler, J., B. Sattler, K. Šimek, A. Schwarzenbacher & R. Psenner, 1996.** Top-down effects on the size-biomass distribution of a freshwater bacterioplankton community. *Aquatic Microbial Ecology*, 10: 255-263

- Posch, T., J. Pernthaler, A. Alfreider & R. Psenner, 1997.** Cell-specific respiratory activity of aquatic bacteria studied with the tetrazolium reduction method, cyto-clear slides, and images analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 867-873
- Rieman, B. & M. Sondergaard, 1986.** Regulation of bacterial secondary production in 2 eutrophic lakes and in experimental enclosures. *Journal of Plankton Research*, 8: 519-536
- Reynolds, C. S., V. L. M. Huszar, C. Kruk, L. Naselli-Flores & S. Melo, 2002.** Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research*, 24: 417-428.
- Rozsypal, S., 1981.** *Obečná bakteriologie*. SPN Praha
- Sanders, R. W., D. A. Caron & U. G. Berninger, 1992.** Relationship between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and freshwaters: an inter-ecosystem comparison. *Marine Ecology- Progress Series*, 86: 1-14
- Sed'a, J., K. Kolarova & A. Petrusek, 2007.** *Daphnia galeata* in the deep hypolimnion: spatial differentiation of a "typical epilimnetic" species. *Hydrobiologia*, 594: 47-57
- Sekar, R., K. V. K. Nair & V. N. R Rao, 2002.** Nutrient dynamics and successional changes in a lentic freshwater biofilm. *Freshwater Biology*, 47: 1893-1907
- Sekar, R., A. Pernthaler, J. Pernthaler, F. Warnecke, T. Posch & R. Aman, 2003.** An improved protocol for quantification of freshwater *Actinobacteria* by fluorescence hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 2928-2935
- Schönhuber, W., B. Fuchs & S. Juretschko, 1997.** Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3268-327
- Straškraba, M., 1998.** Limnological differences between deep valley reservoirs and deep lakes. *International Revue of Hydrobiology (Spec. Issue)*, 83: 1-12
- Straškrabová, V., C. Callieri, P. Carrillo, L. Cruz-Pizarro, J. Fott, P. Hartman, M. Macek, J. P. Medina-Sánchez, J. Nedoma & K. Šimek, 1999.** Investigation on pelagic food webs in mountain lakes – aids and methods. *Journal of Limnology*, 58: 77-87
- Straškrabová, V. a kolektiv, 1996.** *Mikrobiální ekologie vody*. MŽP ČR, BF JČU, České Budějovice, Czech Republic, 119 pp.
- Sundh, I., 1992.** Biochemical composition of dissolved organic C released from natural communities of lake phytoplankton. *Archiv für Hydrobiologie - Beiheft Ergebnisse der Limnologie*, 125: 680-689

- Šimek, K., J. Armengol, M. Comerma, J. C. Garcia, P. Kojecká, J. Nedoma & J. Hejzlar, 2001.** Changes in the epilimnetic bacterial community composition, production, and protist-induced mortality along the longitudinal axis of a highly eutrophic reservoir. *Microbial Ecology*, 42: 359-371
- Šimek, K., K. Horňák, J. Jezbera, M. Mašín, J. Nedoma, J. M. Gasol & M. Shauer, 2005.** Influence of Top-down and Bottom-up manipulations on the R-BT065 subcluster of *β-Proteobacteria*, an abundant group in bacterioplankton of a freshwater reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2381-2390
- Šimek, K., K. Horňák, J. Jezbera, J. Nedoma, J. Vrba, V. Straškrabová, M. Macek, J. R. Dolan & M. W. Hahn, 2006.** Maximum growth rates and the possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environmental Microbiology*, 8: 1613-1624
- Šimek, K., K. Horňák, J. Jezbera, J. Nedoma, P. Znachor, J. Hejzlar & J. Sed'a, 2008.** Spatio-temporal patterns of bacterioplankton and community composition related to phytoplankton composition and protistan bacterivory in a dam reservoir. *Aquatic Microbial Ecology*, 51: 249-262
- Šimek, K., V. Kasalický, J. Jezbera, J. Jezberová, J. Hejzlar & M. W. Hahn, 2010.** Broad habitat range of the phylogenetically narrow R-BT065 cluster representing a core group of the betaproteobacterial genus *Limnohabitans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 631-639.
- Šimek, K., P. Kojecká, J. Nedoma, P. Hartman, J. Vrba & J. R. Dolan, 1999.** Shifts in bacterial community composition associated with different microzooplankton size fractions in a eutrophic reservoir. *Limnology and Oceanography*, 44: 1634-1644
- Šimek, K., M. Macek, J. Sed'a & V. Vyhnálek, 1990.** Possible food chain relationship between bacterioplankton, protozoans, and cladocerans in a reservoir. *International Review of Hydrobiology*, 75: 583-596
- Šimek, K., J. Vrba, J. Pernthaler, T. Posch, P. Hartman, J. Nedoma & R. Psenner, 1997.** Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding modes. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 587-595
- Thornton, K. W., B. L. Kimmel & F. F. Payne, 1990.** *Reservoir Limnology: Ecological perspectives*. Wiley and Sons, New York, 246 pp.
- Tranvik, L. J., 1990.** Bacterioplankton growth on fractions of dissolved organic carbon of different molecular weights from humic and clear lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1672-1677
- Warnecke F., R. Sommarunga, R. Sekar, J. S. Hofer & J. Pernthaler, 2005.** Abundances, identity, and growth state of *Actinobacteria* in mountain lakes of different UV transparency. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 5551-5559

Wright, R. T., 1988. A model for short-term control of the bacterioplankton by substrate and grazing. *Hydrobiologia*, 159: 111-117

Zubkov, M. V., B. M. Fuchs, P. H. Burkill & R. Amann, 2001. Comparison of cellular and biomass specific activities of dominant bacterioplankton groups in stratified waters of the Celtic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:5210-5218

Zwart, G., B. C. Crump, M. P. Kamst-van Agterveld, F. Hagen & S. Han, 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microbial Ecology*, 28: 141-155

9 Anotace

Over the period of the spring phytoplankton bloom (March-May 2009), an intensive sampling program was conducted at 2 sampling depths (0.5 m and 1% PAR) located at lacustrine zone of the canyon-shaped, meso-eutrophic Římov reservoir (Czech Republic). Changes in the production and community dynamics of epilimnetic bacterioplankton, studied by means of group-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes, were related to shifts in composition and activity of phytoplankton, and to remarkable changes in total protistan bacterivory. It was documented that particular groups of bacterioplankton responded differently to: (i) major shifts in phytoplankton composition and its activity and to (ii) changes in overall protozoan grazing pressure.

Během jarního rozvoje fytoplanktonu (březen-květen 2009) byla prováděna studie zabývající se složením a početností epilimnetického bakterioplanktonu ve dvou odběrových hloubkách (0,5m a 1% PAR) mesotrofní přehradní nádrže Římov (jezerní část). Použitím fluorescenčně značených skupinově specifických rRNA sond byla zkoumána bakteriální početnost, dynamika a její závislost na kompozici fytoplanktonu a predaci prvoků. Jednotlivé fylogenetické skupiny bakterií reagovaly rozdílně: (i) na posun ve složení a aktivitě fytoplanktonu a (ii) na změny v predaci prvoků pohlcujících bakterie.