

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Složení a sezónní variabilita bakterioplanktonu
v jihočeských rybnících sloužících pro intenzivní chov ryb**

Diplomová práce

Bc. Lenka Kosová

Vedoucí práce

RNDr. Jitka Jezberová, Ph.D.

Biologické centrum AV ČR, v. v. i., Hydrobiologický ústav

České Budějovice 2019

Kosová, L., 2018: Složení a sezónní variabilita bakterioplanktonu v jihočeských rybnících sloužících pro intenzivní chov ryb. [Bacterioplankton composition and diversity of hypertrophic fishponds. Master thesis, in Czech] – 78 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Little is known about the microbial community of eutrophic shallow lakes. Freshwaters of South Bohemia, which are commonly used for intensive breeding of fish, were practically never studied for microbial diversity in detail. Hypertrophic conditions may reveal niches for interesting microbial communities composition, therefore determination of the main groups was performed. Characterization of the seasonal microbiological composition of bacterioplankton in ten selected fishponds was done by the CARD-FISH hybridization method. The task was to determine main groups of bacteria and assess how abundantly they are represented in the samples. Moreover, their seasonal dynamics, comparison of the fishponds based on original fish stock and detailed study of two fishponds Dehtář and Rod were done. Bacterial composition results were processed together with chemistry, composition of phytoplankton and zooplankton data from individual localities.

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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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.

České Budějovice, 12.4. 2019

Lenka Kosová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Jitce Jezberové, Ph.D za to, že mi věnovala svůj čas, byla vždy pozitivně naladěná a ke mně vstřícná a trpělivá. Také bych chtěla velmi poděkovat panu prof. RNDr. Jaroslavovi Vrbovi, Ph.D za jeho velkou podporu, ochotu a pozitivní přístup. Mgr. Vojtovi Kasalickému, Ph.D. děkuji za moře času, který mi věnoval a hlavně za potřebný nadhled, který vnesl svými věcnými poznámkami a zkušenostmi do mé práce. Děkuji také za čas, který mi věnovala Tanja Shabarová, Ph.D., u které si nadevše vážím cenných rad a přínosného kritického pohledu. Děkuji Mgr. Anně Matoušů, Ph.D. za pomoc s metanotrofy a panu RNDr. Jiřímu Nedomovi, Ph.D za ochotu zodpovědět mi dotazy ohledně praktických informací o odběrech a výpočtech fyzikálně-chemických parametrů. Děkuji mockrát za takřka rodinné zázemí v laboratoři u Ing. Radky Malé. Děkuji za příležitost vytvořit svou magisterskou práci právě na pracovišti HBÚ Biologické centrum AV ČR, v. v. i., a děkuji všem lidem, které jsem zde měla možnost poznat.

Obsah

1	Literární přehled.....	1
1.1	Rybníky jižních Čech	1
1.2	Prostředí hypertrofních rybníčních ekosystémů	1
1.3	Sladkovodní bakterie	4
2	Cíle práce	10
3	Hypotézy	10
4	Materiál a metody.....	11
4.1	Zkoumané lokality	11
4.2	Vzorkování a příprava vzorků	12
4.3	CARD-FISH.....	14
4.3.1	Příprava filtrů	14
4.3.2	Permeabilizace a inaktivace endogenních peroxidáz s HCl.....	14
4.3.3	Genetické oligonukleotidové sondy	15
4.3.4	Hybridizace	16
4.4	Determinace abundance bakterií	16
4.5	Statistika	17
5	Výsledky	17
5.1	Celkové výsledky o bakteriích	18
5.2	Sezonalita <i>Archaea</i> a hlavních skupin <i>Bacteria</i>	24
5.3	Skupina <i>Betaproteobacteriales</i>	25
5.4	Přítomnost metanotrofů v rybnících	29
5.5	Porovnání Dehtáře a Rodu.....	33
5.6	Porovnání korelační maticí a mnohorozměrnou analýzou dat	37
6	Diskuze.....	40
6.1	Charakteristika mikrobiálního společenstva v hypertrofních vodách	40
6.2	Sezónní model distribuce planktonu (PEG-model) v hypertrofním prostředí.....	42
6.2.1	Odlišnosti mezi rybníky Rodem a Dehtářem	44
6.3	Chování jednotlivých skupin bakterioplanktonu v hypertrofním prostředí	47
6.4	Oxidace metanu	52
6.5	Metodické problémy	53
7	Závěr	56
8	Použitá literatura	57
9	Přílohy	68

1 Literární přehled

1.1 Rybníky jižních Čech

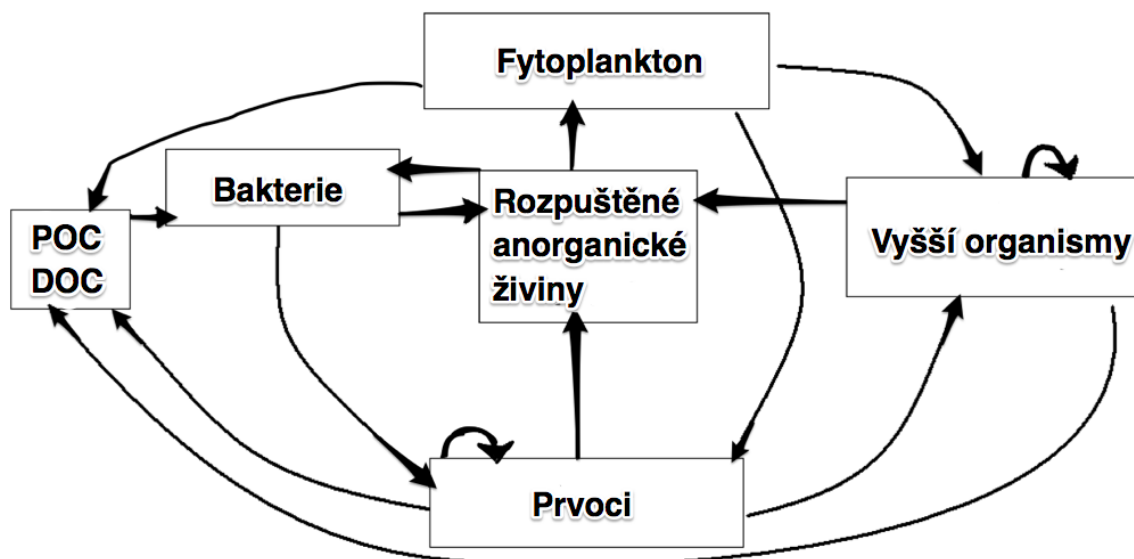
Rybníkářství a tradiční lokální chov ryb existuje v jižních Čechách již od 16. století. Od té doby se rybníkářství stalo úspěšnou ekonomickou aktivitou a za účelem chovu ryb vzniklo mnoho mělkých člověkem vytvořených nádrží. Díky tomu jsou dnes jižní Čechy a potažmo Třeboňsko výjimečné svým unikátním rybníčním systémem, který díky své jedinečnosti spadá dokonce pod UNESCO jako Biosférická rezervace.

Historicky zásadní osobou v oblasti studia rybníčních ekosystémů je Josef Šusta, který zkoumal rybníční biocenózu v 19. století a jeho pozornost náležela hlavně studiu nejvhodnějších podmínek pro chov kapra obecného (Hule, 2000). Jeho hlavní objevy vytvořily ustálené postupy k provádění managementu rybníků a měly tak pomoci zvýšit výnosy kaprů při výloveh (Šusta, 1997). Postupy byly okamžitě aplikovány v praxi a na tehdejších rybníčních ekosystémech fungovaly velmi dobře (Potužák a Duras, 2014). Používal se hnůj, kejda, vápno a odstraňovaly se litorály, čímž se dařilo vytvořit vodní prostředí zásobené živinami, které zajišťovalo produkci slušného množství ryb. Tyto postupy jsou aplikovány dodnes (Potužák et al., 2007). Nicméně, rybníky určené pro chov ryb za tu dobu razantně změnilu svou podobu i své chování (Duras a Potužák, 2016). Rybníky jsou stálým managementem, který ještě více zvyšuje živinové zatížení, už natolik poznamenané, že zaběhnuté postupy nadále neplní stejnou funkci. Produkce ryb se nezvyšuje skokově, jako bylo pravidlem v minulosti. Ukázkové příklady nárůstu produkce ryb při aplikaci starých zaběhnutých postupů tak jako za Šusty, bychom tedy v dnešních rybnících hledali jen těžko (Potužák et al., 2007).

1.2 Prostředí hypertrofních rybníčních ekosystémů

Biologické procesy v rybnících jsou na první pohled zcela odlišné od situace v dimiktických nádržích, kde platí klasický PEG model sezónního vývoje planktonu (Sommer et al., 1986). Klasický PEG model je založený na sezónním rozvoji fytoplanktonu (primárních producentů) přes něž se dostává organický uhlík trofickými úrovněmi do vyšších organismů.

V dimiktických nádržích se před létem pravidelně objevuje tzv. fáze čiré vody, kdy dochází k dovršení ideálních podmínek zapříčiňujících rozvoj perlooček (tj. vhodná teplota a dostatek fytoplanktonu - potravy pro perloočky). Proto je v této fázi množství fytoplanktonu eliminováno až na minimum a voda díky perloočkám čirá. Stav přetrvává do doby, než jsou perloočky vyfiltrovány rybami, čímž vzniká opět prostor pro rozvoj fytoplanktonu (Sommer et al., 1986). Revidovaný PEG model přidává ke klasickému modelu mikrobiální smyčce (Sommer et al., 2012). Schéma mikrobiální smyčky je vidět na Obrázku 1. Mikrobiální smyčka popisuje vztahy mezi jednobuněčnými organismy a značně zvyšuje zdroje pro zooplankton i ryby (Kalf, 2002). Autotrofní fytoplankton, který zastává společně s vyššími rostlinami funkci primárního producenta je zdrojem partikulovaného organického uhlíku (POC) a zároveň i rozpuštěného organického uhlíku (DOC) pro heterotrofní bakterie (Sherr a Sherr, 1988). Heterotrofní bakterie jsou jediné organismy ve vodách, které intenzivně využívají rozpuštěné organické látky a přeměňují DOC na POC, a tím činí tyto látky dostupné pro další články potravního řetězce (Moss, 2018). Prvoci a heterotrofní bičíkovci regenerují P a zvyšují obrát DOC. Pokud je primární produkce nízká, jsou zdrojem POC a energie, a zvyšují tak produktivitu ekosystému (Sommer et al., 2012). Mixotrofní bičíkovci jsou také zdroji POC a energie (Reynolds, 2006). Hlavním konzumentem bakterií je heterotrofní mikroplankton – heterotrofní či mixotrofní bičíkovci a nálevníci, a poté zooplankton, což jsou převážně perloočky, naupliová stádia klanonožců (buchanek a vznášivek) a vířníci (Jürgens a Matz, 2002; Salcher et al., 2005). Potravou perlooček (*Cladocera*) a klanonožců (*Copepoda*), jsou často i přímo heterotrofní bičíkovci (Jumars et al., 1989). Celkově přes zooplankton se uhlík a další živiny dostávají do ryb (Sommer et al., 2012). V procesech dekompozice se minerální živiny navracejí zpět k autotrofům. Autotrofní řasy regenerují substrát (DOC) pro bakterie, a tak je část rozpuštěného organického uhlíku (DOC) zabudována do bakteriálních buněk (Tranvik, 1992).



Obrázek 1. Mikrobiální smyčka

Rybníky jižních Čech, ač původně v minulosti nádrže mezotrofní až eutrofní, staly se hypertrofními ekosystémy. To znamená, že jsou charakteristické vysokým obsahem živin: P až 1 mg/l, N 1-4 mg/l. Hypertrofie se s intenzivním hospodařením, krměním a hnojením praktikovaném pro zvýšení výnosů na rybnících každým rokem prohlubuje (Duras a Marcel, 2015). Faktorem působícím negativně na kvalitu vody je hned za živinovým zatížením typ obsádky, kterou tvoří u běžných rybníků planktivorní ryby, především ryby kaprovité. Množství nasazovaných ryb neumožní rozvoj zooplanktonu, který by působil na kvalitu vody příznivě (Duras a Potužák, 2016). Ve srovnání s procesy v hlubokých oligotrofních jezerech, by se daly přirovnat procesy v mělkých hypertrofních, člověkem vybudovaných nádržích více k procesům probíhajícím v čističkách odpadních vod (Šimek et al., 2019; Zhang et al., 2009a). V živinově bohatém prostředí probíhají samočistící procesy, zejména fyzikální a chemické procesy, a rovněž procesy biologické (Moss, 2018). V rybnících obsahujících hodně organické hmoty jsou biologické procesy umocněné, představují mikrobiální mineralizaci organického materiálu. Běžné procesy zprostředkované bakteriemi jsou fixace dusíku, denitrifikace, nitrifikace, metanogeneze a oxidace metanu (Gwynfryn Jones a Simon, 1985; Hatzenpichler, 2012; Vrba et al., 2018; Zhang et al., 2009b).

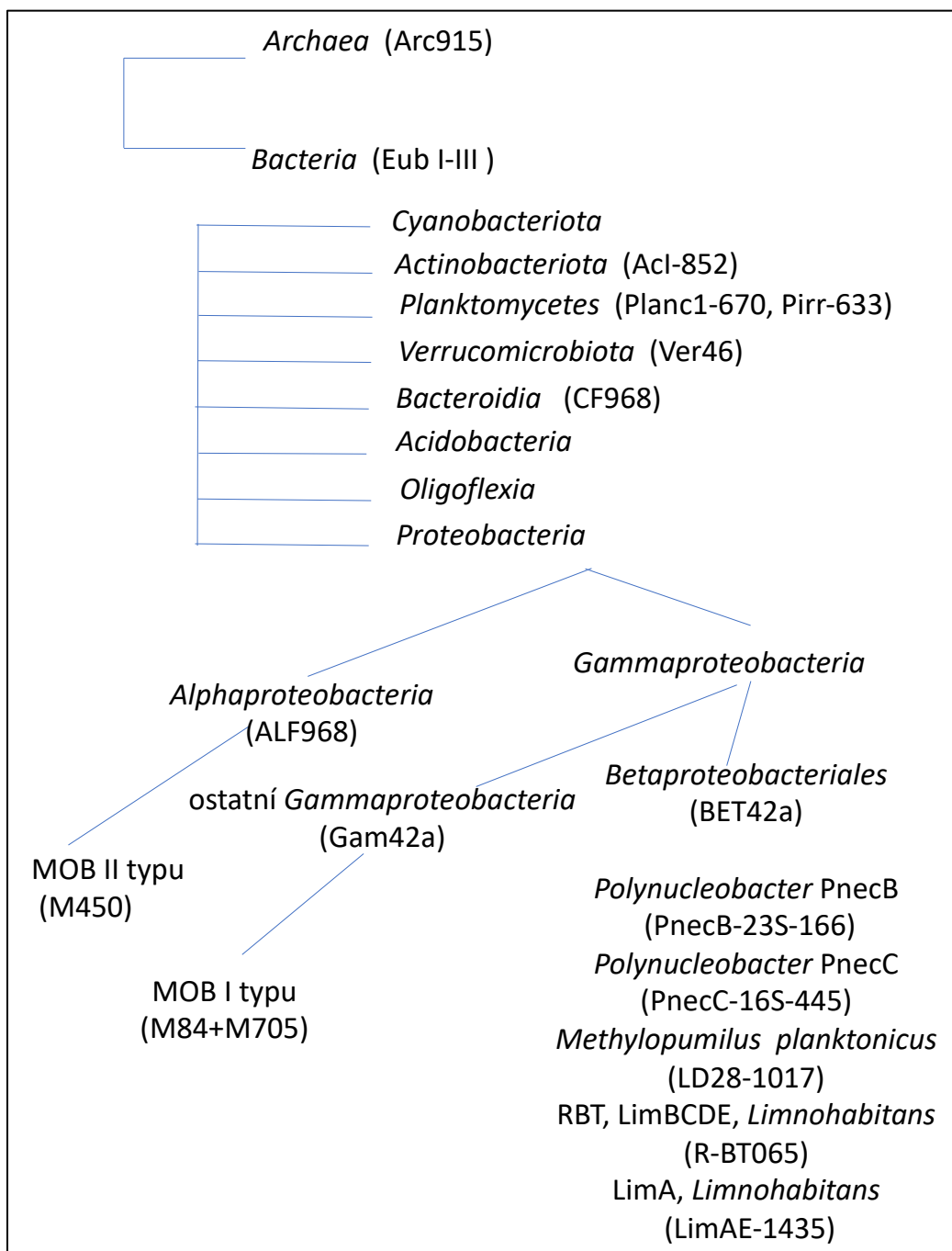
Jelikož intenzivní chov ryb má na svědomí snížení množství, velikosti a druhové bohatosti zooplanktonu (hlavně perlooček a klanonožců ze skupiny korýšů) (Šimek et al., 2001a), prostředí uvnitř rybníku směřuje k tomu být nestabilní a bez fáze čiré vody (Sommer

et al., 2012). Živinné zatížení se pak v rybnících projevuje v teplých měsících jako zelený zákal způsobený nárůstem velkého množství fytoplanktonu, většinou sinic (Watson et al., 1997). Tento turbidní stav rybníků je nehostinný pro organismy závislé na kyslíku, protože mohou vzniknout anoxické podmínky a vést až k úhynu ryb (Znachor et al., 2018). Není tomu tak však vždy, a proto u některých rybníků bude stav stabilní. To závisí do jisté míry na rybí obsádce, přítomnosti perlooček, a zdali přetrvají (Reynolds, 2006). Jestliže perloočky přetrvají do nástupu léta, dopomůžou k tomu, aby rybník zůstal stabilní. Pokud násada vyfiltruje všechny perloočky brzy, nenastane fáze čiré vody a stav rybníka se přehoupne do turbidního (Ptacnik et al., 2010; Sommer et al., 2012). Příkladem ekosystému, kde se uskutečňují zmíněné jevy může být mělké hypertrofní jezero Søbygård nacházející se v Dánsku. Probíhají zde výrazné změny mikrobiálních komunit v krátkém časovém měřítku. Byl v něm zkoumán vliv zooplanktonu (vířníci, perloočky, heterotrofní bičíkovci) na ekosystém. Studie ukazuje, že vliv zooplanktonu je jeden ze zásadních (Jurgens, 2002; Jürgens et al., 1999).

Takové extrémní prostředí jaké nalzáme v rybnících je svým způsobem jedinečné a poskytuje nové niky pro rozmanitá mikrobiální společenstva (Ptacnik et al., 2010). Role mikrobů menších než $< 10 \mu\text{m}$ je zásadní, mohou představovat až 60-90% celkové respirace. Podmínky srovnatelné s podmínkami čističek odpadních vod poskytují příležitost pro enormní diverzitu mikrobů (Weisse et al., 1990).

1.3 Sladkovodní bakterie

Jen pár taxonomických linií je početně nejvíce dominantních ve sladkovodních mikrobiálních komunitách (Pedrós-Alió, 2012). Sladkovodnímu bakterioplanktonu obvykle dominují kmeny *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Planctomycetes*, *Verucomicrobia* a *Bacteroidetes* (Salcher, 2014). *Proteobacteria* je nejlépe prostudovaným kmenem sladkovodních bakterií, z nichž jsou pro tuto práci zásadní skupiny *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* a *Gammaproteobacteria*, nejpočetněji z nich bývají obvykle zastoupené *Betaproteobacteria* (Salcher, 2014). Na Obrázku 2 je zjednodušené schéma sladkovodního bakterioplanktonu, kde jsou v závorkách uvedeny u jednotlivých skupin prokaryot oligonukleotidové sondy, které se používají k jejich detekci. Schéma vychází z fylogenetického klasifikačního systému.



Obrázek 2. Zjednodušené schéma sladkovodního bakterioplanktonu společně s vyznačenými oligonukleotidovými sondami, které se v rámci skupin používají k detekci.

Fylogenetický klasifikační systém je založen na srovnání genetických informací, které se nacházejí v makromolekulách organismů - v nukleových kyselinách a proteinech (Olsen et al., 1994). Pokud jsou dva organismy úzce příbuzné, očekáváme že sekvence individuálních jednotek v makromolekule bude na rozdíl od nepříbuzných organismů shodná nebo velmi podobná (Sogin et al., 1971). Sekundární struktura rRNA v ribozomech je nepostradatelná pro funkci žijících buněk a pro proteinovou syntézu (Ochman a Wilson, 1987). Z toho důvodu se

změny v základní sekvenci rRNA objevují během evoluce velmi pomalu, a tak jsou některé úseky rRNA vysoce konzervovány (Haas, 2002). Porovnáním jejich sekvencí můžeme určit, že jsou si určité organismy příbuzné (Tischer et al., 2012). Porovnávání rRNA je standartním markerem pro mikrobiální taxonomii, fylogenezi a vysvětlení druhové evoluce (Sogin et al., 1971). V případě bakteriální buňky je široce používán markerový gen v malé podjednotce rRNA genu (16S rDNA). Tento standartní marker se využívá pro tvorbu oligonukleotidových sond (Amann et al., 1992; Sekar et al., 2003; Tischer et al., 2012).

Srovnání rozdílů na malé podjednotce 16S rRNA říká, že celulární život na Zemi se rozběhl ve třech hlavních liniích, nazývaných domény. Dvě z nich jsou výlučně mikrobiální a jejich zástupci mají prokaryotické buňky (*Bacteria* a *Archaea*) (Sogin et al., 1971; Woese a Bleyman, 1972). Třetí doménou je *Eukarya*. *Archaea* je rozdělována z fylogenetického hlediska na 2 říše – *Crenarchaeota* a *Euryarchaeota*. Nejběžnějšími detekovanými druhy sladkovodních *Crenarchaeota* bývá skupina I.1a, nacházející se běžně ve volné vodě i v sedimentu (Bomberg et al., 2008). Pro sladké hypertrofní vody jsou ale zásadní *Euryarchaeota* (Nagaoka et al., 2002) zahrnující metanogenní taxony *Methanosaeta* a *Methanomicrobiales*, nacházející se hlavně v sedimentu (Borrel et al., 2012). *Methanosaeta* dominuje ve svrchních vrstvách sedimentu, které jsou ovlivněny sedimentací organického materiálu. *Methanomicrobiales*, který obsahuje klastry *Methanospirillum* a WCHD jsou dominantní hlavně v hlubších vrstvách sedimentu.

Sekvence ribozomálních RNA genů v rámci domény *Bacteria* nalézáných v přirozených ekosystémech, ukazují přibližně 80 fylogenetických kmenů (linií). Navzdory některým liniím, které charakterizuje dostatek fenotypických vlastností, většina majoritních skupin bakterií má nedostatek fenotypové koheze. Dobrým příkladem je největší skupina *Proteobacteria*, která oplývá všemi známými formami mikrobiální fyziologie. Zástupci používají rozmanité mechanismy produkce energie a podobnou diverzitu je možné najít i v jejich vztahu ke kyslíku. Detailnější studium 16S rRNA sekvence rozdělila *Proteobacteria* do 6 tříd – *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* a *Zetaproteobacteria* (Newton et al., 2011b), z nichž poslední tři třídy nejsou zastoupeny ve sladkých vodách.

Betaproteobacteria je velmi významnou a s oblibou zkoumanou skupinou sladkovodních bakterií. Podle nejnovějších taxonomických analýz založených na sekvencích genomů (Genome Taxonomy Database, <http://gtdb.ecogenomic.org>) bylo taxonomické zařazení skupiny *Betaproteobacteria* přehodnoceno a posunuto z dosavadní třídy taxonomicky níž.

Betaproteobacteriales je nyní podskupinou *Gammaproteobacterií* (Obr. 2), což komplikuje stávající analýzy bakteriálních společenstev a taxonomické zařazení genetických sond pro ně běžně používaných. *Betaproteobacteriales* jsou známy hlavně dvěma nejpočetnějšími monofyletickými klastry v rámci rodu - *Polynucleobacter* sp. a linie R-BT065 (Šimek *et al.*, 2001; Hahn *et al.*, 2010; Kasalický *et al.*, 2010, 2013). Nejprostudovanější sladkovodní podskupiny rodu *Polynucleobacter* jsou *Polynucleobacter* PnecB (*P. acidiphobus*, *P. difficilis*) a *Polynucleobacter* PnecC (11 popsáných druhů) (Hahn *et al.*, 2018). Také řadíme do *Betaproteobacteriales* další dobře prostudované bakterie rodu *Limnohabitans* (A,B,C,D) a rovněž metylotrofní bakterie *Methylopumilus* (Salcher *et al.*, 2015).

Methylotrofní bakterie využívají různé látky s metylovou skupinou (např. metylaminy a metanol) a řadíme do nich zástupce čeledi *Methylophilaceae* (náležící také pod *Proteobacteria* – *Betaproteobacteriales*), která zahrnuje zejména popsané rody *Methylopumilus*, *Methylovorus*, *Methylobacillus* a *Methylotenera* (Chistoserdova *et al.*, 2007). Nejvíce distribuované ve vodním prostředí bývají druhové linie LD28 (*Methylopumilus planktonicus*) a PRD01a001B (*Methylopumilus turicensis*) (Newton *et al.*, 2011b; Salcher *et al.*, 2015).

Fyziologicky relativně velmi dobře definovanou skupinou jsou **metan oxidující bakterie (MOB)**, které jsou speciální skupinou metylotrofních bakterií a používají metan jako jediný zdroj energie (Wu *et al.*, 2007). Také jsou nazýváni jako metanofilové, metyloxidující bakterie nebo metanotrofové. Mohou růst aerobně nebo anaerobně a vyžadují k přežití sloučeniny s jedním uhlíkem (Knief, 2015). Pokud nepočítáme malý podíl od nitrifikačních bakterií, tak MOB jsou jedinou známou skupinou organismů, kteří spotřebovávají metan za aerobních podmínek. Dokonce tak, že MOB oxidují metan převážně jen v přítomnosti molekulárního kyslíku. Nejznámější MOB patří ke skupině gram-negativních bakterií a spadají pod *Proteobacteria* (do tříd *Gammaproteobacteria* a *Alphaproteobacteria*) (Kojima *et al.*, 2014). Rozlišujeme metanotrofy I a II typu, kteří se kromě příslušnosti k odlišným skupinám liší v uspořádání vnitřních membrán, mechanismy fixace uhlíku a převahou určitých mastných kyselin (Hanson a Hanson, 1996).

Skupina MOB náležící k *Gammaproteobacteria* je skupinou metanotrofů I. typu (M84+705). Jsou to r- strategové, význační rychlým růstem za pro ně optimálních a krátce přetrvávajících podmínek. Do skupiny patří: *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylosoma*, *Methylomicrobium*, *Methylothermus*, *Methylobilus*, *Methylosarcina* a *Methylosphaea* (Knief, 2015).

Metanotrofové II. typu (MOB typ II M450) patřící do skupiny *Alphaproteobacteria* jsou K-stratégové, s pomalým kontinuálním růstem a dlouhou životností (Whittenbury and Dalton, 2013). Jsou početné v sedimentech a obsahují druhy jako například *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylocella*, a *Methylocapsa* (Knief, 2015).

Třída *Alphaproteobacteria* je sama o sobě ekologicky velmi různorodá skupina. Kromě toho má speciální roli v evoluci a mikrobiologii z důvodu, že eukaryotická mitochondrie pochází pravděpodobně z alfabroteobakteriálního symbionta (Andersson et al., 1998). Ve sladkých vodách jsou významné primárně linie *Alphaproteobacteria* alfIII, alfIV a linie malých bakterií LD12 (Crump et al., 2003; Lindström et al., 2005; Newton et al., 2011b), jež je sesterskou skupinou k nejpočetnějším mořským bakteriím SAR11 (Logares et al., 2009).

Třída *Gammaproteobacteria* (bez *Betaproteobacteriales*) je zastoupena více v moři (Biers et al., 2009) (obdobně jako třída *Alphaproteobacteria*), zatímco ve sladkovodních ekosystémech je minoritní (Zwart et al., 2002). Zástupci jsou obvykle špatně zařaditelní podle sekvencí se záznamy genových knihoven. Nejlépe dobře identifikovatelné jsou dva klastry gamma I (*Methylobacter psychrophilus*) (Zwart et al., 2002) a klastr LiUU-3-334 (Eiler a Bertilsson, 2004). Kromě nich jsou ve sladkých vodách obvykle přítomní různí zástupci čeledí *Enterobacteriaceae* a *Xanthomonadaceae*, a také řádů *Pseudomonadales* a *Legionellales*, které jsou v rámci třídy *Gammaproteobacteria* dobře vymezené.

Dominantní, neopomenutelnou a početně významnou skupinou bakterií ve sladkých vodách je kmen *Actinobacteria* (Denisova et al., 1999; Hiorns et al., 1997). Zástupci této skupiny jsou velmi malého rozměru (<0,1 μm^2) (Glockner et al., 2000; Posch et al., 2009; Zwart et al., 2002) a jsou diversifikovány do 9 fylogenetických sladkovodních linií (acI, acTH1, acSTL, Luna1, acIII, Luna3, acTH2, acIV, and acV) a více než 40 rodů (Warnecke et al., 2004). Nejvíce prostudovanou čeledí je linie *Actinobacteria* ac1. (Rappe et al., 1999). *Actinobacteria* jsou významné tou měrou, že mohou svým součtem představovat dokonce více než 50 % všech pelagických mikrobů ve sladkých vodách (Warnecke et al., 2005).

Skupina *Bacteroidetes* (starší název *Cytophaga – Flavobacteria subclade – CF*) se skládá ze tří velkých skupin gram-negativních, anaerobních nebo aerobních bakterií, které jsou široce rozšířeny v životním prostředí, zahrnující i ekosystémy sladkých vod. V rámci *Bacteroidetes* jsou tu tři odlišné třídy – konkrétně *Bacteroidales*, *Flavobacteriales*, a *Sphingobacteriales* (Newton et al., 2011a; Schauer et al., 2005). Dominantními skupinami ve sladkovodních sekvencích v rámci *Bacteroidetes* bývá třída *Flavobacteria* a monofyletický

klastr SOL – kosmopolitní zástupce pelagických vod vyskytující se od oligotrofních po hypertrofní vody (Schauer et al., 2006; Zwart et al., 2002).

Skupina *Verrucomicrobia* se vyskytuje globálně v mnoha rozdílných typech ekosystémů. V řádu *Verrucomicrobiales* byly popsány jen dva rody, které se podařilo kultivovat: *Verrucomicrobium* a *Prostheco bacter*. Uvnitř skupiny se nacházejí tzv. metanotrofové III typu, které je možné objevit spíše v extrémních biotopech (Op den Camp et al., 2009). Navzdory tomu, že se *Verrucomicrobia* často a dost početně vyskytují ve sladkovodních ekosystémech, je o nich známo velmi málo (Zwart et al., 1998). Studie Cabello-Yeves et al. (2017) izolovala nové druhy *Verrucomicrobia*, dokonce objevila klastr, který fixuje dusík a nikdy předtím nebyl u sladkovodních volně žijících *Verrucomicrobia* popsán (Cabello-Yeves et al., 2017).

Na závěr je tu pár dalších důležitých bakteriálních skupin, které mají minoritní avšak také nezastupitelnou roli ve sladkovodních ekosystémech. Jsou to *Acidobacteria*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Spirochaetes* a málo charakterizované linie *SRI* a *TM7*. *Acidobacteria* a *Firmicutes* jsou běžně nacházeny ve sladkovodních sedimentech. Zástupci skupiny *Chloroflexi* (zelené nesírné bakterie) a *Chlorobi* (zelené sírné bakterie) jsou běžně přítomny v metalimniu nebo hypolimniu hlubších jezer. *Fibrobacteres* jsou společně s *Chlorobi* příbuzné skupině *Bacteroidetes* (Newton et al., 2011a).

2 Cíle práce

Cílem práce bylo determinovat složení mikrobiální komunity v rybníčních ekosystémech a určit hojnost jednotlivých skupin. Dalším důležitým bodem práce bylo srovnání rybníků mezi sebou, sledování sezónních trendů ve výskytu a abundancích vybraných bakteriálních skupin a podrobnější srovnání dvou naprosto od sebe odlišných rybníků Rod a Dehtář. Výsledky byly korelovány se získanými chemicko-fyzikálními a biologickými parametry.

3 Hypotézy

1. Rybníky jsou složením bakteriálního společenstva podobné hypertrofním ekosystémům mělkých jezer a jsou odlišné od hlubokých dimiktických nádrží. Rybníky mají výraznější zastoupení mikroorganismů ze skupiny *Archaea*, což jsou organismy nacházející se běžně převážně v sedimentu, protože vyžadují anoxické podmínky. *Archaea* nejsou příliš zastoupené ve volné vodě velkých hlubokých jezer, zatímco v rybnících ano, jelikož se pro ně otevírají nové niky jednak díky neustálému míchání a také kvůli tomu, že může docházet vlivem vodního květu k anoxii.
2. Zkoumané lokality třeboňské rybníční soustavy se budou lišit od českobudějovické vzhledem k odlišnostem některých fyzikálně-chemických parametrů. Třeboňská rybníční soustava obsahuje více huminového organického uhlíku a má výrazně nižší vodivost.
3. V rybníce Rodu bude jiná dynamika jednotlivých mikrobiálních skupin bakterií než v rybníce Dehtář. Rod se liší v rybí obsádce a v přítomnosti, množství a velikosti zooplanktonu, jejichž vlivem je potlačen rozvoj fytoplanktonu, takže v Rodu před létem probíhá fáze čiré vody.
4. V turbidním Dehtáři budou rozdílná zastoupení metanotrofů než v Rodu, kde probíhá fáze čiré vody, neboť turbidní ekosystém by měl obsahovat více substrátu pro metanotrofy.
5. Zastoupení sledovaných skupin bakteriálního společenstva se může během sezóny měnit a je možné najít společné sezónní trendy.
6. Rybníky s podobnými vlastnostmi a podobným uspořádáním potravních sítí jsou v zastoupení jednotlivých bakteriálních skupin podobné.

4 Materiál a metody

4.1 Zkoumané lokality

Studie mikrobiální diversity byla provedena na deseti vybraných rybnících o rozloze v rozmezí 2 – 228 ha. Sedm rybníků se vyskytuje v českobudějovické pánvi (DH, BR, KV, PV, PM, RK, ZB) a tři v třeboňské pánvi (RD, KL, PT). Všechny studované lokality měly téměř identickou nadmořskou výšku mezi 407 až 428 m.n.m. Více detailů o lokalitách naleznete v Tabulce 1.

Tabulka 1. Geografická charakteristika rybníků a typ rybí obsádky. Hlavní obsádka: K0–K2 – násada kapra; K2–KV a K3–KV – tržní kapr; Š0–Š1 – násada štiky; Ca-gen – generační candát; u rybníku určeného pro sportovní rybolov je složení obsádky neznámé. Z_{max} – maximální hloubka (Vrba et al., 2018).

Rybník	Zkratka	GPS	Rozloha (ha)	Z _{max}	Obsádka
Beranov	BR	48.980N, 14.321E	13.3	2.5	K0-K2
Dehtář	DH	49.006N, 14.294E	228	4.0	K2-KV
Kvítkovický	KV	48.963N, 14.337E	24	3.0	K3-KV
Podvražský	PV	48.976N, 14.330E	6.1	2.1	Sportovní rybolov
Posměch	PM	48.996N, 14.295E	36.6	3.2	K2-KV
Roubíček	RK	48.981N, 14.261E	4.4	1.4	K0-K2
Zběhov	ZB	48.992N, 14.305E	2.0	1.1	Š0-Š1 + plotice
Klec	KL	49.090N, 14.767E	64	2.0	K3-KV
Potěšil	PT	49.079N, 14.766E	64	2.6	K3-KV
Rod	RD	49.121N, 14.745E	22	1.3	K2-K3 + Ca-gen

4.2 Vzorkování a příprava vzorků

Vzorkování se uskutečnilo na většině lokalit třikrát v roce 2017 (duben, červen, srpen) v ranních hodinách od 8 do 10 hodin (SELČ). V dubnu roku 2017 byly dva rybníky (BR a RK) vypuštěny a nebylo možné provést odběr. Dehtář (DH) a Rod (RD) byly jako jediné odebírány v sezóně častěji – po měsíci. Teplota, pH, konduktivita a koncentrace kyslíku byly měřeny na každé lokalitě v místě největší hloubky na vertikálním profilu - multiparametrem probe Exo2 (YSI, Incorporated Sonde, Yellow Springs, USA). Průhlednost vody byla zjištěna Secchiho deskou a světelný profil změřen měřákem Licor probe (LICOR LI 1400, dataloger se sférickým/kulovitým kvantovým podvodním senzorem 4193 SA - Licor, Lincoln, NE, USA). Směsný vzorek vodního sloupce (0–1 m) byl vytvořen ze sedmi míst na transektu kolmo na nejhlubší místo v rybníce. Voda byla odebrána van Dornovým vzorkovačem* (1 m; 6,4 l) ze sedmi odlišných odběrných bodů a smíchána v plastovém barelu (Vrba et al., 2018).

Celkový objem smíchaného vzorku byl 45 l a byly z něj odebrány za stálého míchání vzorky pro konkrétní analýzy (izolaci DNA a molekulární analýzy). Ty byly ihned přefiltrovány přes 200 μm síťku. Dále byl odebrán objem vzorku 3-5 l pro chemické analýzy vody a sestonu. Tyto vzorky byly uchovány v chladu a urychleně převezeny do laboratoře. Další tři nefiltrované vzorky o objemu 100 ml byly odebrány pro analýzy fytoplanktonu (fixované lugolem), nálevníků a mikrobiálního složení (bakterie, pikosinice, protozoa) (fixované formolem do 2% finální koncentrace). Pro analýzy zooplanktonu bylo odebráno 30 l z barelu a zakoncentrováno planktonní sítkou 200 μm a dále 5-15 l zakoncentrováno 20 μm sítkou (frakce 20-200 μm) a fixováno formaldehydem. Voda pro izolaci DNA a molekulární analýzy byla následně v laboratoři přefiltrována přes 0,2 μm polykarbonátové filtry a zamrazena v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další analýzy.

Všechny chemické analýzy byly provedeny standartními metodami v akreditované laboratoři ENKI, o.p.s. Základní srovnání fyzikálně-chemických parametrů rybníků je znázorněno v Tabulce 2: celkový dusík (TN), celkový fosfor (TP), rozpuštěný organický uhlík

* Van Dornův vzorkovač - Toto náčiní bylo navrženo člověkem jménem Fridtjof Nansen v roce 1894 pro získávání mořské vody ve specifické hloubce. Náčiní bylo od té doby značně vylepšeno a nyní je používáno i pro odebírání vzorků blízko dna jezer nebo jiných stratifikovaných vodních těles. Vzorkovač je spuštěn kabelem do požadované hloubky společně s mosaznou váhou. Náraz nakloní láhev vzhůru nohama, což na konci zaklapne pružinový ventil. Toto zachytí vzorek vody uvnitř a poté se celé náčiní vytáhne kabelem z vody (Pinet, 2014; Tomczak a Godfrey, 1994).

(DOC), chlorofyl *a* (Chl_a). Koncentrace metanu byly determinovány plynovou chromatografií a obrát metanu přidáním radiem značeného metanu. Další planktonní analýzy, včetně determinace nebo speciálních mikrobiálních metod, byly uskutečnĚny v adekvátnĚ vybavených laboratořích HBÚ BC nebo PŘF.

Tabulka 2. Fyzikální a chemické parametry deseti studovaných rybníků (Vrba et al., 2018). PrůmĚrnĚ hodnoty ze 3 až 5 odbĚrů v rŮzných mĚsících roku 2017, rozpĚtí (min–max), RD_j – Rod jaro, RD_l – Rod lĚto.

Zkratka rybníku	PrŮhlednost (cm)	Vodivost (μS/cm)	TN (mg/l)	TP (mg/l)	DOC (mg/l)	Chl _a (μg/l)
BR	55 (40–70)	345 (329–361)	2,0 (1,6–2,4)	0,16 (0,14–0,19)	17,3 (16,4–18,3)	43,8 (18,5–69,2)
DH	49 (30–60)	308 (288–322)	2,9 (2,1–4,4)	0,19 (0,13–0,31)	12,8 (4,9–17,3)	104 (41,6–253)
KV	35 (20–55)	311 (303–319)	2,7 (2,1–3,5)	0,28 (0,14–0,43)	14,0 (11,9–15,2)	87,3 (86,9–87,5)
PV	33 (30–40)	292 (282–309)	3,0 (2,2–4,4)	0,29 (0,13–0,44)	17,4 (13,9–21,4)	134 (50,6–202)
PM	35 (25–40)	305 (300–310)	2,5 (1,9–2,9)	0,41 (0,21–0,78)	15,3 (15,1–15,8)	135 (85,7–182)
RK	45 (20–70)	256 (254–257)	3,3 (3–3,7)	0,17 (0,16–0,18)	17,2 (13,4–21)	88,8 (68,7–109)
ZB	25 (20–30)	346 (338–353)	2,5 (2–2,8)	0,25 (0,19–0,31)	17,1 (16,5–18,3)	51,8 (33,3–76,3)
KL	47 (20–80)	197 (196–199)	3,4 (1,7–6,8)	0,23 (0,09–0,40)	15,4 (10,2–19,9)	148 (19,9–387)
PT	40 (20–60)	196 (193–198)	4,0 (1,7–7,5)	0,26 (0,1–0,52)	15,0 (10,7–19,0)	200 (53,7–489)
RD _j	>130	158	1,4 (1,1–1,7)	0,11 (0,09–0,14)	16,2 (14,7–17,7)	0,8 (0,4–1,1)
RD _l	47 (20–90)	207 (193–212)	4,0 (2,0–5,9)	0,29 (0,26–0,34)	21,6 (16,2–24,7)	140 (7,0–326)

4.3 CARD-FISH

CARD-FISH (Catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization) je metoda pro determinaci bakteriálních skupin, která využívá komplementarity oligonukleotidové sondy s úsekem nukleotidů na ribozomálních podjednotkách 23S a 5S rRNA a malých podjednotkách 16S rRNA (Glöckner et al., 1996; Sekar et al., 2003). Na oligonukleotidové sondy, které jsou specifické pro zaměření konkrétních bakteriálních skupin, není navázána samostatná fluorescenční barvička, tak jako je to u klasické FISH. Je na ně navázán enzym křenová peroxidáza (ang. horseradish peroxidase – HRP), která je poměrně dobře známým enzymem získávaným z rostlinných zdrojů (Azevedo et al., 2003). Aktivitou této peroxidázy se fluorescenčně značené tyramidy (značené barvičkou FITC) naváží na proteiny v buňce. Tím dochází ke zvýraznění buňky, která ukáže v mikroskopu fluorescenci (Ghiran, 2011; Stockert and Blazquez-Castro, 2017)

4.3.1 Příprava filtrů

Vzorky odebrané z rybníků byly přefiltrovány přes membránové filtry (0,2 μm , GTTP, Millipore). Roztok agarózy byl připraven a do něho ponořeny filtry. Pak byly filtry z agarózy vyjmuty a umístěny správnou stranou (na které jsou zachyceny bakterie) vzhůru a vysušeny v troubě (35 °C, cca 10-30 min). Poté byly zbaveny zbylé přebytečné vody v 96% etanolu při pokojové teplotě po dobu 1 minuty a ponechány k úplnému doschnutí na vzduchu.

4.3.2 Permeabilizace a inaktivace endogenních peroxidáz s HCl

Permeabilizace byla dělána pro celé filtry najednou. Permeabilizace se provádí proto, aby se enzymy rozrušila buněčná stěna prokaryot a sonda mohla proniknout dovnitř buňky. Filtry byly inkubovány v čerstvě připraveném roztoku lysozymu (37 °C, 60 minut). Roztok lysozymu obsahuje 20 mg lysozymu smíchaného s 200 μl 0,5M EDTA, 200 μl 1M Tris-HCl a 1600 μl MQ vody (Mili-Q ultra čistá voda typu I, vyráběna postupnou filtrací a deionizací). Po použití MQ vody jsou filtry opláchnuty s PBS a poté MQ vodou při pokojové teplotě po dobu 1 minuty. Filtry byly inkubovány v čerstvě připraveném roztoku achromopeptidázy při 37 °C po dobu pouze 25 minut a opláchnuty PBS po inkubaci a MQ vodou po dobu 1 minuty při pokojové teplotě. Poté filtry byly inkubovány v 0,01M HCl po dobu 10 minut při pokojové teplotě a pečlivě opláchnuty MQ vodou a poté 96% etanolem. Filtry byly ponechány k dosušení na vzduchu a rozřezané žiletkou na kousky, které byly označené čísly (Sekar et al., 2003).

4.3.3 Genetické oligonukleotidové sondy

CARD-FISH byla provedena podle protokolu Shabarova *et al.* (2017), Pernthaler *et al.* (2002) a Sekar *et al.* (2003). Použité CARD-FISH genetické oligonukleotidové sondy (dále v textu jen sondy) a jejich specifity jsou vypsány v Tabulce 3.

Tabulka 3. CARD-FISH genetické oligonukleotidové sondy a jejich cílová skupina organismů použitá v diplomové práci. Pro každou sondu jsou uvedeny koncentrace formamidu a příslušné množství NaCl v hybridizačním pufru. Sekvence všech oligonukleotidových sond jsou uvedeny v příloze Tabulka S1.

Sonda	Specifita	Reference	Formamid (%vol/vol)	NaCl (μl)
Arc915	<i>Archaea</i>	(Stahl and Amann, 1991)	35%	420
Eub I II III	<i>Eubacteria</i>	(Daims et al., 1999)	55%	30
R-BT065	<i>Limnohabitans</i> RBT, LimBCDE – <i>L. parvus</i> , <i>L. planktonicus</i>	(Šimek <i>et al.</i> , 2001)	55%	30
PnecC-16S-445	<i>Polynucleobacter</i> PnecC – 11 popsaných druhů	(Hahn et al., 2005)	55%	30
PnecB-23S-166	<i>Polynucleobacter</i> PnecB – <i>P. acidiphobus</i> , <i>P. difficilis</i>	(Wu and Hahn, 2006)	60%	0
ALF968	<i>Alphaproteobacteria</i>	(Neef, 1997)	55%	30
Bet42a	<i>Betaproteobacteriales</i>	(Manz et al., 1992)	55%	30
Gam42a	<i>Gammaproteobacteria</i> (bez <i>Betaproteobacteriales</i>)	(Manz et al., 1992)	55%	30
M84+M705	metanotrofové I. typu (MOB I)	(Eller et al., 2001)	20%	1350
M450	metanotrofové II. typu (MOB II)	(Eller et al., 2001)	20%	1350
CF968	<i>Bacteroidetes</i>	(Acinas et al., 2015)	55%	30
Ver46	<i>Verrucomicrobia</i>	Salcher (nepublikováno)	40%	270
LD28-1017	<i>Methylophilus planktonicus</i>	(Salcher <i>et al.</i> , 2011)	45%	160
Acl852	Ac1, <i>Actinobacteria</i>	(Warnecke et al., 2005)	55%	30
LimAE-1435	<i>Limnohabitans</i> LimA – <i>L. australis</i> , <i>L. curvus</i>	(Shabarova et al., 2017)	65%	0
Planc1-670	<i>Planctomycetes</i> – <i>Vodnikaceae</i>	Salcher (nepublikováno)	35%	420
Pirr-633	<i>Planctomycetes</i> – <i>Pirellula</i>	Salcher (nepublikováno)	60%	0

4.3.4 Hybridizace

Hybridizace danou sondou byla provedena najednou pro celý set vzorků. Při hybridizaci bylo použito 1,5 ml hybridizačního pufru a přidáno 10 μ l specifické sondy podle Tabulky 3. Filtry byly inkubovány v roztoku sondy s hybridizačním pufrem 2 hodiny při 35 °C. Byl namíchan prací pufr (prací pufr – množství NaCl dle koncentrace formamidu v hybridizačním pufre + Tris 1000 μ l + EDTA 500 μ l + SDS 25 μ l + MQ voda doplnit do 50 ml) a umístěn samostatně do inkubátoru s teplotou 37 °C pro ohřátí. Po dvou hodinách působení roztoku s hybridizačním pufrem, byly vzorky přendány do pracího pufru k propláchnutí. Vzorky byly takto ponechány při teplotě 37 °C na 30 minut v inkubátoru. Po uplynutí této doby byly filtry inkubovány opět při stejné teplotě, ale tentokrát v roztoku 1x PBS s tritonem po dobu 45 minut. Po této době se přistoupilo k barvení (bakterií na filtrech) barvičkou ponořením do roztoku s amplifikačním pufrem obsahujícím barvičku, který byl namíchan z 1 ml amplifikačního pufru (0,4 ml 10% blokujícího činidla - blocking reagent, 2 ml PBS, 16 ml 5M NaCl a 5 g dextran sulfátu do 40 ml MQ vody - pro desetiprocentní blokující činidlo je blocking reagent rozpuštěn v kyselině maleinové do finální koncentrace 10% w/v.), 10 μ l roztoku H₂O₂ a 1,25 μ l barvičky FITC s tyramidem. V tomto roztoku byly vzorky inkubovány 30 minut. Poté byly vzorky ponechány v PBS s Tritonem pro opláchnutí po dobu 15 minut při pokojové teplotě (zastíněné v temnu, aby barvy nedegradovaly). Následně byly vzorky opláchnuté v MQ vodě po dobu 1 minuty a poté hned v etanolu (96%) po dobu 1 minuty, obojí při pokojové teplotě. Filtry byly zanechány při pokojové teplotě k doschnutí na vzduchu zhruba 20 minut, potom umístěny na podložní sklíčko s olejem o třech složkách (Vectashield + Citifluor + DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole). Barvička DAPI se váže nespecificky na nukleové kyseliny a umožňuje detekci všech mikroorganismů. Sklíčka se vzorky byly zamraženy (-20 °C) do doby mikroskopické analýzy (Amann et al., 1992; Sekar et al., 2003; Shabarova et al., 2017).

4.4 Determinace abundance bakterií

Abundance jednotlivých cílových bakteriálních skupin byla určena jako poměr buněk označených specifickou sondou a všech prokaryotních buněk. Buňky byly manuálně spočítány s použitím epifluorescenčního mikroskopu (BX53, Olympus; Optical Co., Tokyo, Japan). Celkové množství prokaryotních buněk (obarvené DAPI) jsem počítala pod UV excitačním zářením (excitační maximum 360 nm, emisní maximum 460 nm, fluorescenční set U-FBN). Pro zjištění počtu cílených buněk (označených FITC) jsem využila fluorescenční set

U-FBW (excitační maximum 460 nm, emisní maximum 540 nm). V jednom vzorku bylo spočítáno alespoň 400 DAPI bakteriálních buněk. Při nezachycení žádných hybridizovaných buněk bylo počítáno minimálně 900 DAPI bakteriálních buněk k tomu, aby byla uznána nulová hodnota. Mikroorganismy na mikroskopickém poli byly nejdříve spočítány pod UV (DAPI). Poté bylo mikroskopické pole přepnuto na kanál s FITC a mikroorganismy spočítány tam.

Kvantifikace všech prokaryotních buněk (počet bakterií na ml) proběhla předem, nezávisle na metodě CARD-FISH. Vzorky (fixované 2% formaldehydem) byly zakoncentrovány na černý filtr s porozitou 0,2 μm , obarveny DAPI a manuálně spočítány (min. 400 buněk na vzorek, min. 10 polí). Abundance byla vypočítána jako průměrné množství buněk na jedno pole, vynásobené inverzním poměrem velikosti tohoto pole k celkové ploše filtru, na kterou byl filtrován vzorek, a vydělené objemem vzorku.

4.5 Statistika

Korelační matice (Pearsonův korelační koeficient) byla vytvořena v programu Excel (Microsoft Office; funkce PEARSON). Silné korelace byly vypočítány v programu SIGMAPlot. Mnohorozměrné analýzy byly provedeny v programu CANOCO (Braak and Smilauer, 1998). Ordinační analýza RDA (Redundancy analysis) byla vypočítána po předchozím centrování a standardizaci podle druhu. Průkazné vysvětlující proměnné byly vybrány pomocí metody Forward selection. Byly zahrnuté proměnné, které měly $p < 0.05$ v Monte Carlo permutačním testu. Výsledky CANOCO byly zobrazeny v CanoDraw pro Windows (ter Braak a Smilauer, 2002).

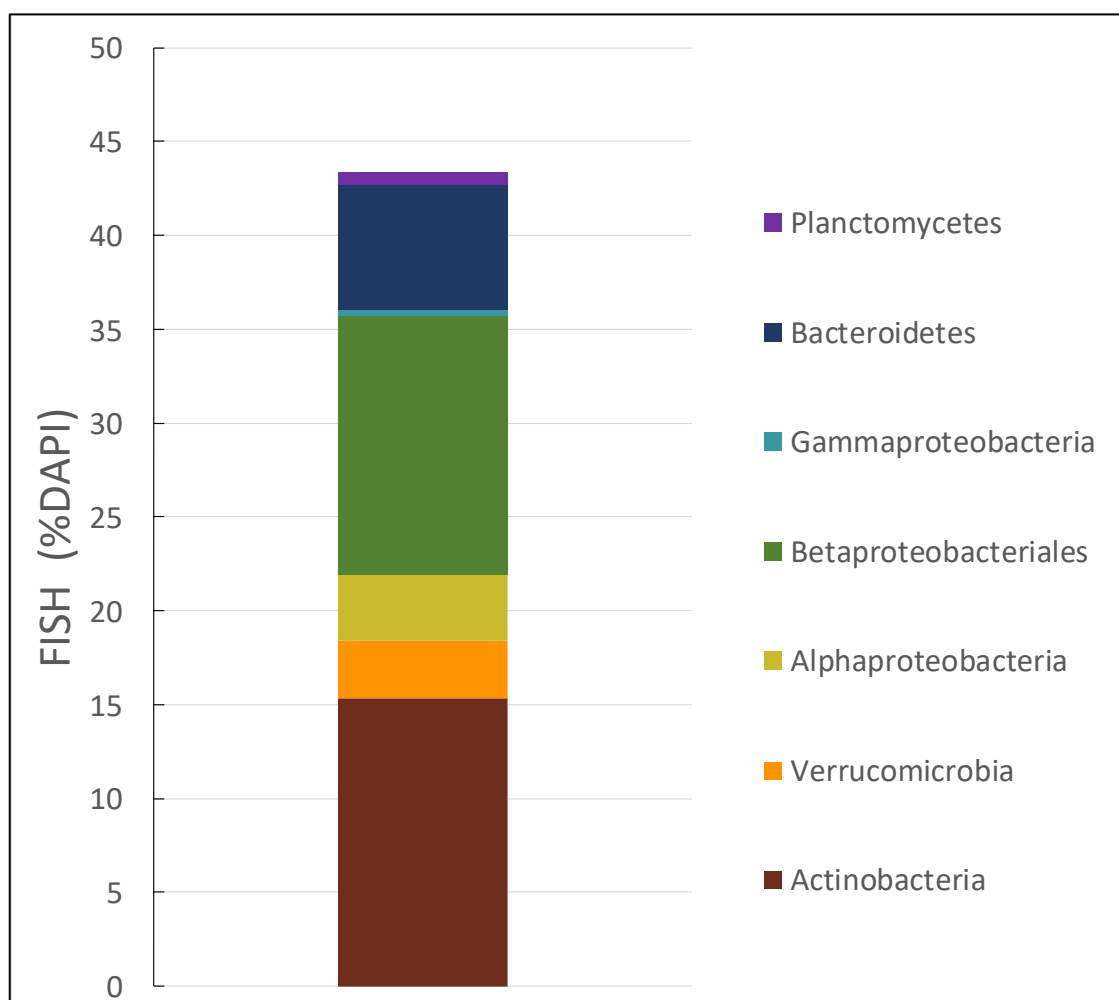
5 Výsledky

Během diplomové práce jsem určila zastoupení významných sladkovodních mikrobiálních skupin v 38 vzorcích odebraných z 10 rybníků během roku 2017 a také 6 vzorcích odebraných z rybníku Dehtář a Rod v roce 2016. Všechny vzorky byly postupně hybridizovány metodou CARD-FISH se 17 specifickými sondami (Tab. 3) a mikroskopicky spočítány. Grafická interpretace byla vytvořena v programu SIGMAPlot a Excel (Microsoft Office). Jelikož moje diplomová práce je součástí většího projektu s názvem *Rybníky jako modely pro výzkum planktonní diverzity a dynamiky mělkých hypertrofních nádrží* (Grant č.

17-09310S, hl. řešitel Jaroslav Vrba), analyzovala jsem trendy ve složení mikrobiálních společenstev v kontextu s daty (chemismus, zooplankton, fytoplankton, apod.) získanými dalšími členy týmu.

5.1 Celkové výsledky o bakteriích

Výsledky obecného mikrobiálního složení skupin bakterií v rybnících jsou vidět na Obrázku 3. V grafu jsou znázorněny relativní abundance vybraných skupin *Bacteria*. Uvedené hodnoty představují průměry ze všech získaných dat na všech lokalitách od dubna do listopadu.



Obrázek 3. Obecné mikrobiální složení všech rybníků stanovené metodou CARD-FISH vypočítané ze všech získaných dat (duben-listopad) z 10 rybníků. Byly použity sondy pro kmeny z říše *Bacteria*: Ac1852 (*Actinobacteria*), Ver46 (*Verrucomicrobia*), ALF968 (*Alphaproteobacteria*), Bet42a (*Betaproteobacteriales*), Gam42a (*Gammaproteobacteria*), CF968 (*Bacteroidetes*), Planc1-670 a Pirr-633 (*Planctomycetes*) (podrobnosti v Tabulce 3). Na ose x je sloupečkový graf průměrných hodnot abundancí ze všech odebraných vzorků.

Mezi nejpočetnější bakterie ve studovaných rybnících obecně patřil kmen *Actinobacteria* (průměr 15,2 %, SD = 10,9), řád *Betaproteobacteriales* (průměr 13,8 %, SD = 6,1) a řád *Bacteroidetes* (průměr 6,7 %, SD = 5,2). Nižší zastoupení patří *Aphaproteobacteria* (průměr 3,5 %, SD = 2,9) a *Verrucomicrobia* (průměr 2,9 %, SD = 2,4), *Planctomycetes* (průměr 0,7 %, SD = 0,5) a *Gammaproteobacteria* (0,2 %, SD = 0,3) (Obrázek 3).

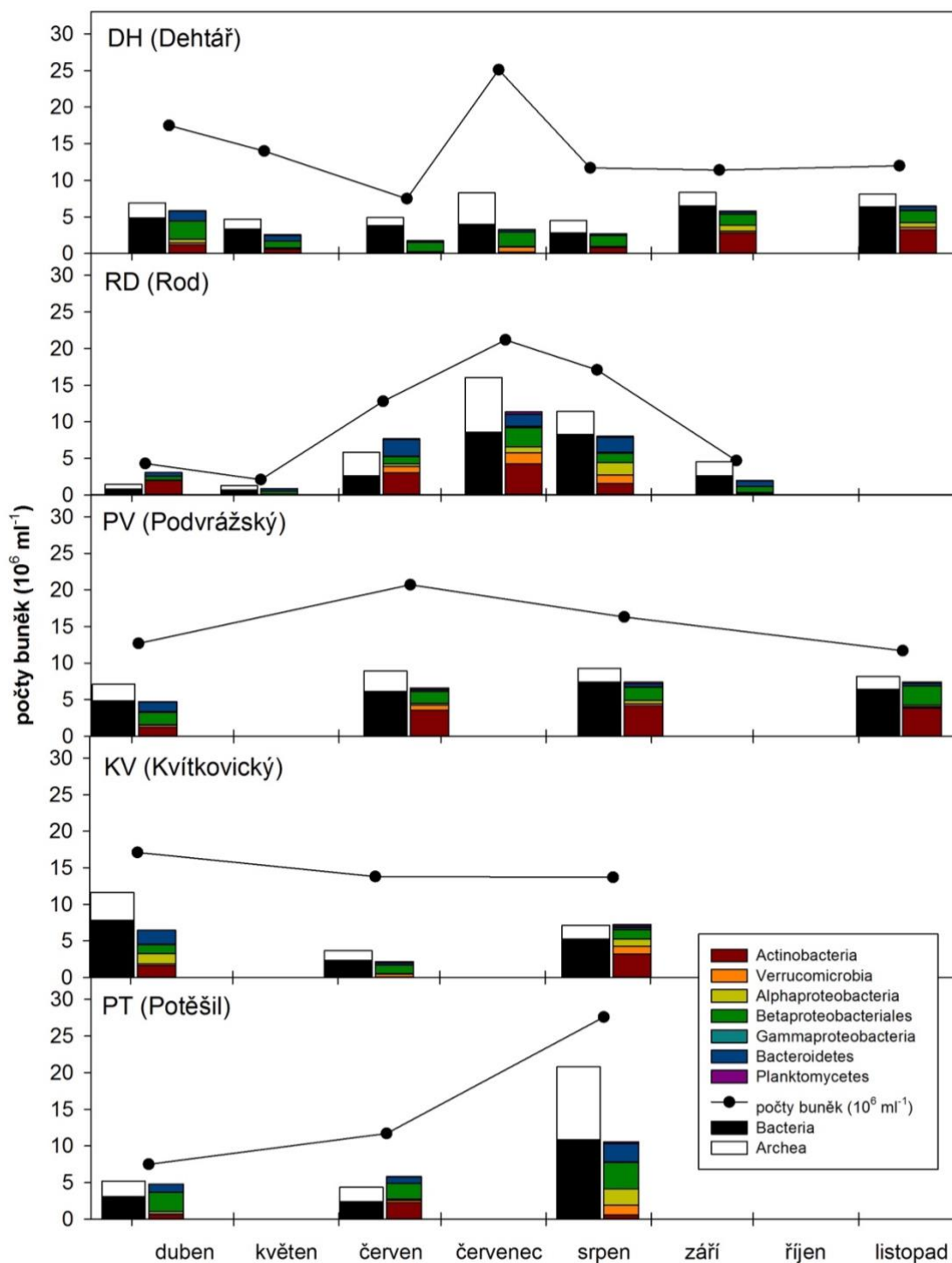
Celkové počty prokaryot a posléze zastoupení jednotlivých skupin – *Archaea* a bakteriálních skupin v jednotlivých vzorcích vykazuje určité odlišnosti (Obr. 4 a 5). Vysoké počty prokaryot ($>25 \times 10^6$ buněk ml⁻¹) byly zaznamenány v rybnících Dehtář, Potěšil a Klec (konkrétní počty ve vzorcích: $25,1 \times 10^6$ buněk ml⁻¹ červencový DH; $26,4 \times 10^6$ buněk ml⁻¹, srpnový PT a $27,6 \times 10^6$ buněk ml⁻¹ srpnový KL), nízké počty měl Rod - nejméně to bylo konkrétně $2,1 \times 10^6$ buněk ml⁻¹ v květnovém odběru.

Abundance *Archaea* během sezóny (odběr od odběru) dosahovala 3×10^6 buněk ml⁻¹, s maximem až $9,9 \times 10^6$ buněk ml⁻¹. Jejich počty převyšovaly počty *Bacteria* v červencovém DH, kde jejich poměr byl až 3:2 ve prospěch *Archaea*. Počty pak byly prakticky vyrovnané v červnovém RD a srpnovém PT a zářijovém RD, zatímco ve všech ostatních vzorcích byl počet *Archaea* vždy nižší.

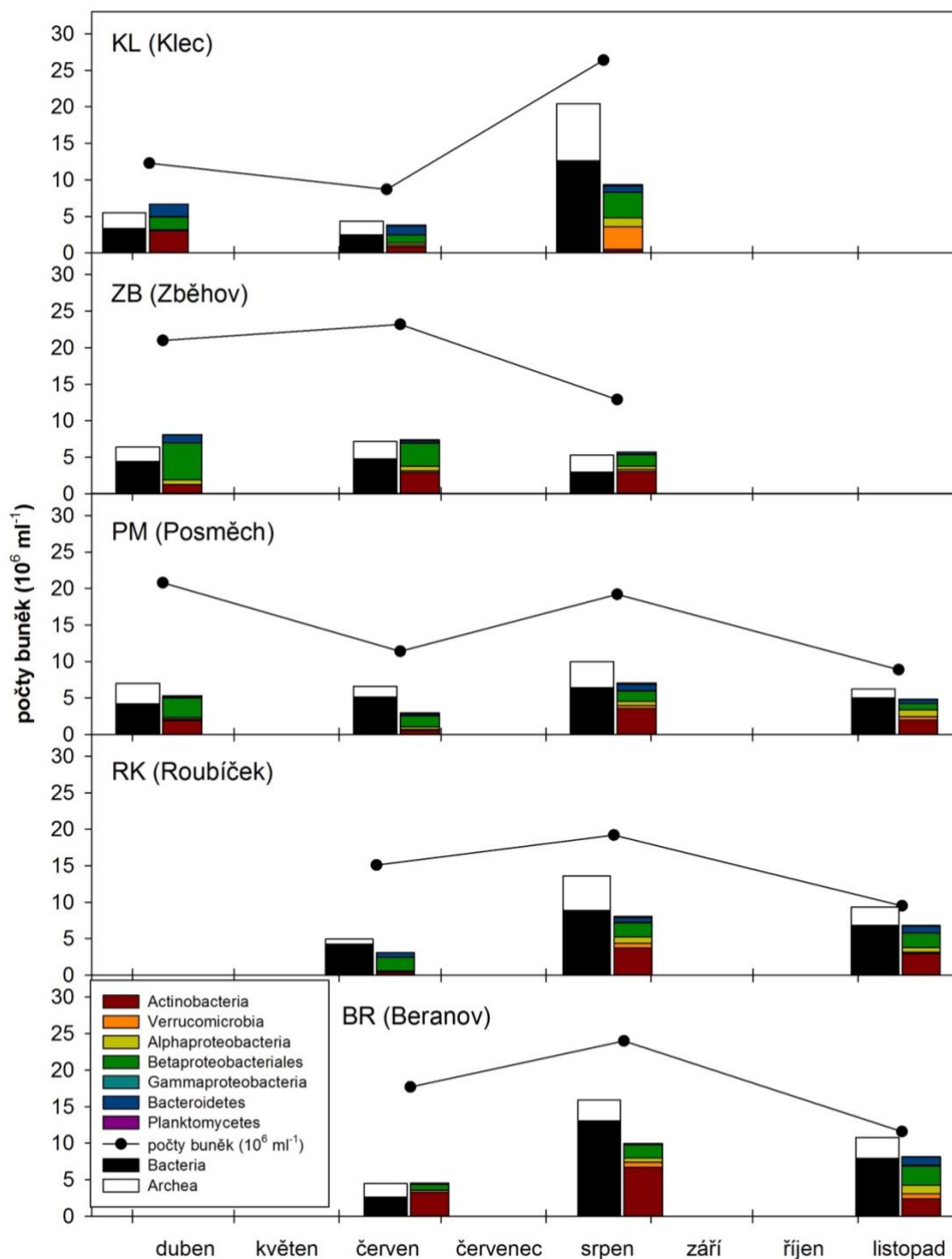
Bakteriální složení srovnávaných rybníků je podobné, ale v několika případech se liší (Obr. 4 a 5). Nejvíce zastoupenými skupinami jsou *Actinobacteria*, *Betaproteobacteriales* a *Bacteroidetes*. Zástupci kmenu *Actinobacteria* byly dominantní ve velké části vzorků (v 17 vzorcích). Průměrně dosahovaly počtů $2,1 \times 10^6$ buněk ml⁻¹ (SD = 1,5). V maximech *Actinobacteria* dosahovali počtů až $6,6 \times 10^6$ buněk ml⁻¹. Minimální počty *Actinobacteria* přibližně v rozmezí $4 - 240 \times 10^3$ buněk ml⁻¹ byly ve dvou odebraných vzorcích každého z rybníků RD a DH. To bylo v RD na jaře a na podzim, a v DH přes léto. Zástupci *Betaproteobacteriales* tvořily dominantu celkem v 14 vzorcích. Průměrně *Betaproteobacteriales* dosahovaly $1,8 \times 10^6$ buněk ml⁻¹ (SD = 0,9). Posléze významnou skupinou byly rovněž *Bacteroidetes*. *Bacteroidetes* byli první nejpočetnější v 2 vzorcích (duben KV, srpen RD) a druhou nejpočetnější skupinou v 4 vzorcích (červen RD, duben DH, srpen PT, červen KL). *Bacteroidetes* průměrně dosahovali $0,8 \times 10^6$ buněk ml⁻¹ (SD = 0,6). V Obrázku 3 je možné pozorovat také skupiny *Verrucomicrobia* (průměr $0,4 \times 10^6$ buněk ml⁻¹, SD = 0,5) a *Gammaproteobacteria* (průměr $0,04 \times 10^6$ buněk ml⁻¹, SD = 0,05).

Verrucomicrobia byla druhou nejpočetnější skupinou v 1 vzorku (srpnový KL) a třetí nejpočetnější v 1 vzorku (červencový DH). Další skupiny již minoritně zastoupené jsou

Alphaproteobacteria (průměr $0,5 \times 10^6$ buněk ml⁻¹, SD = 0,5), *Gammaproteobacteria* (průměr $0,04 \times 10^6$ buněk ml⁻¹, SD = 0,05) a *Planctomycetes* (průměr $0,1 \times 10^6$ buněk ml⁻¹, SD = 0,08). *Alphaproteobacteria* mají jeden významnější výkyv v 1 odběru (srpnový PT) a díky tomu jsou v daném odběru třetí nejpočetnější skupinou. *Alphaproteobacteria*, *Planctomycetes* a *Gammaproteobacteria* jsou zastoupeny v malém nebo žádném množství s občasnými výkyvy. *Planctomycetes* zahrnují dvě determinované nejběžnější podskupiny – *Vodnikaceae* (Planc1-670) a *Pirellula* (Pirr-663), je uveden jejich součet. Pro větší srovnání všech skupin je v Tabulce 4 vypsán průměr, minimum a maximum každé skupiny a pro každý rybník.



Obrázek 4. Abundance vybraných bakteriálních skupin stanovených metodou CARD-FISH v porovnání s celkovým počtem bakterií. Byly použity obecné sondy CARD-FISH: Eub I II III (*Eubacteria*), Arc 915 (*Archaea*), a specifické sondy pro kmeny z říše *Eubacteria*: Ac1852 (*Actinobacteria*), Ver46 (*Verrucomicrobia*), ALF968 (*Alphaproteobacteria*), Bet42a (*Betaproteobacteriales*), Gam42a (*Gammaproteobacteria*), CF968 (*Bacteroidetes*), Planc1-670 a Pirr-633 (*Planctomycetes*) (podrobnosti v Tabulce 3). Celkové počty buněk byly stanoveny mikroskopicky s použitím fluorescenční barvičky DAPI. Sloupečkové grafy jsou rozmístěny na ose x dle data odběru vzorků v roce 2017. Data z rybníků: Dehtář, Rod, Podvrážský, Kvítkovický a Potěšil.



Obrázek 5. Abundance vybraných bakteriálních skupin stanovených metodou CARD-FISH v porovnání s celkovým počtem bakterií. Byly použity obecné sondy CARD-FISH: Eub I II III (*Eubacteria*), Arc 915 (*Archaea*), a specifické sondy pro kmeny z říše *Eubacteria*: Act1852 (*Actinobacteria*), Ver46 (*Verrucomicrobia*), ALF968 (*Alphaproteobacteria*), Bet42a (*Betaproteobacteriales*), Gam42a (*Gammaproteobacteria*), CF968 (*Bacteroidetes*), Planc1-670 a Pirr-633 (*Planctomycetes*) (podrobnosti v Tabulce 3). Celkové počty buněk byly stanoveny mikroskopicky s použitím fluorescenční barvičky DAPI. Sloupečkové grafy jsou rozmístěny na ose x dle data odběru vzorků v roce 2017. Data z rybníků: Klec, Zběhov, Posměch, Roubíček, Beranov.

Tabulka 4. Ukazuje ke každému rybníku průměr, minimum a maximum jednotlivých CARD-FISH sond pro celková data z roku 2017.

Zkratka rybníku	Eub (10 ⁶ ml ⁻¹)	Arch (10 ⁶ ml ⁻¹)	Act (10 ⁶ ml ⁻¹)	Verr (10 ⁶ ml ⁻¹)	Alpha (10 ⁶ ml ⁻¹)	Beta (10 ⁶ ml ⁻¹)	Gamma (10 ⁶ ml ⁻¹)	Bacteroide (10 ⁶ ml ⁻¹)	Planc (10 ⁶ ml ⁻¹)
BR	7,8 (2,6-13)	2,5 (1,8-2,8)	4,1 (2,3-6,6)	0,5 (0,3-0,6)	0,6 (0-1,19)	1,7 (0,8-2,6)	0,07 (0-0,11)	0,4 (0,04-1,14)	0,04 (0,02-0,04)
DH	4,5 (2,8-6,5)	2 (1,1-4,2)	1,2 (0,04-3,2)	0,2 (0,06-0,7)	0,3 (0,04-0,8)	1,6 (0,9-2,5)	0,016 (0-0,08)	0,5 (0,09-1,4)	0,07 (0-0,13)
KV	5,1 (2,3-7,8)	2,3 (1,3-3,8)	1,6 (0,08-3,2)	0,6 (0,2-1,1)	0,8 (0,05-1,4)	1,2 (1,1-1,3)	0,08 (0-0,2)	0,8 (0,2-1,9)	0,15 (0,01-0,2)
PV	6,2 (4,8-7,3)	2,2 (1,7-2,8)	3,1 (1,2-4,1)	0,4 (0,2-0,7)	0,3 (0,06-0,5)	1,9 (1,68-2,6)	0,04 (0-0,06)	0,6 (0,2-1,3)	0,16 (0,02-0,27)
PM	5,2 (4,1-6,4)	2,3 (1,3-3,6)	2 (0,6-3,6)	0,2 (0,09-0,4)	0,5 (0,25-0,95)	1,6 (0,87-2,7)	0,02 (0-0,05)	0,4 (0,14-0,9)	0,12 (0,08-0,17)
RK	6,7 (4,2-8,8)	2,6 (0,6-4,75)	2,4 (0,4-3,7)	0,3 (0,07-0,6)	0,51 (0,07-0,88)	1,9 (1,91-1,98)	0,02 (0-0,03)	0,6 (0,6-0,95)	0,09 (0,01-0,17)
ZB	4,1 (2,9-4,7)	2,2 (1,9-2,4)	2,4 (1,3-3)	0,2 (0,04-0,3)	0,6 (0,5-0,6)	3,3 (1,5-5)	0,04 (0,02-0,06)	0,5 (0,3-1,04)	0,05 (0,02-0,09)
KL	6,1 (2,4-12,6)	3,9 (1,8-7,77)	1,5 (0,5-3,1)	1,1 (0,06-3,1)	0,5 (0,09-1,2)	2,1 (1,1-3,5)	0,03 (0,01-0,05)	1,3 (0,9-1,7)	0,1 (0-0,18)
PT	5,4 (2,3-10,8)	4,7 (1,9-9,9)	1,2 (0,6-2,3)	0,6 (0,07-1,3)	0,9 (0,17-2,2)	2,8 (2,1-3,6)	0,02 (0-0,05)	1,4 (0,9-2,5)	0,1 (0-0,25)
RD	3,9 (0,7-8,6)	2,8 (0,5-7,4)	1,8 (0,004-4,2)	0,6 (0,004-1,5)	0,5 (0,002-1,7)	1,1 (0,5-2,6)	0,06 (0-0,2)	1,3 (0,3-2,3)	0,11 (0-0,36)

5.2 Sezonalita *Archaea* a hlavních skupin *Bacteria*

Archaea se zdají být významné svou abundancí během léta (Obr. 4 a 5) Na jaře jsou jejich počty v pěti sledovaných rybnících nižší než v létě (až o polovinu). Výjimku tvoří několik rybníků – DH, KV a KL s malým zastoupením během léta a vyšším na jaře a na podzim, ZB se srovnatelným počtem po celou sezonu, a PT, který má zásadně vyšší počet buněk *Archaea* v podzimním odběru.

Ze skupiny *Bacteria* na jaře (i s měsícem červen) ve většině rybníků převažují skupiny *Betaproteobacteriales* (PV, PT, ZB, PM, DH), v dalších pak *Actinobacteria* (RD, KL), *Bacteroidetes* (KV). *Actinobacteria* jsou ve vzorcích často nejpočetnější na v létě (v 7 vzorcích). Výjimky, co se týče skupiny *Actinobacteria* a jejich zastoupení v letních měsících tvoří DH, KL a PM, kdy je v tomto ročním období možné pozorovat nízké počty ve srovnání se všemi ostatními rybníky, v nichž tvoří *Actinobacteria* v letních měsících převahu (Obr. 4 a 5). V létě se stávají na většině rybníků početnějšími i jiné skupiny bakterioplanktonu, hlavně *Verrucomicrobia*, *Alphaproteobacteria* a v některých odběrech také *Bacteroidetes*. KL má v srpnovém odběru ojedinělou abundanci skupiny *Verrucomicrobia* $3,1 \times 10^6$ buněk ml⁻¹. Na podzim u 4 rybníků (KV, PT, KL, ZB) neproběhly odběry. V ostatních rybnících v tomto období převládají buď *Actinobacteria* (PM, RK, DH, PV) nebo *Betaproteobacteriales* (BR). V RD (zářijový vzorek) je na podzim zajímavé, že skupina *Betaproteobacteriales* má srovnatelnou největší abundanci společně s *Bacteroidetes*.

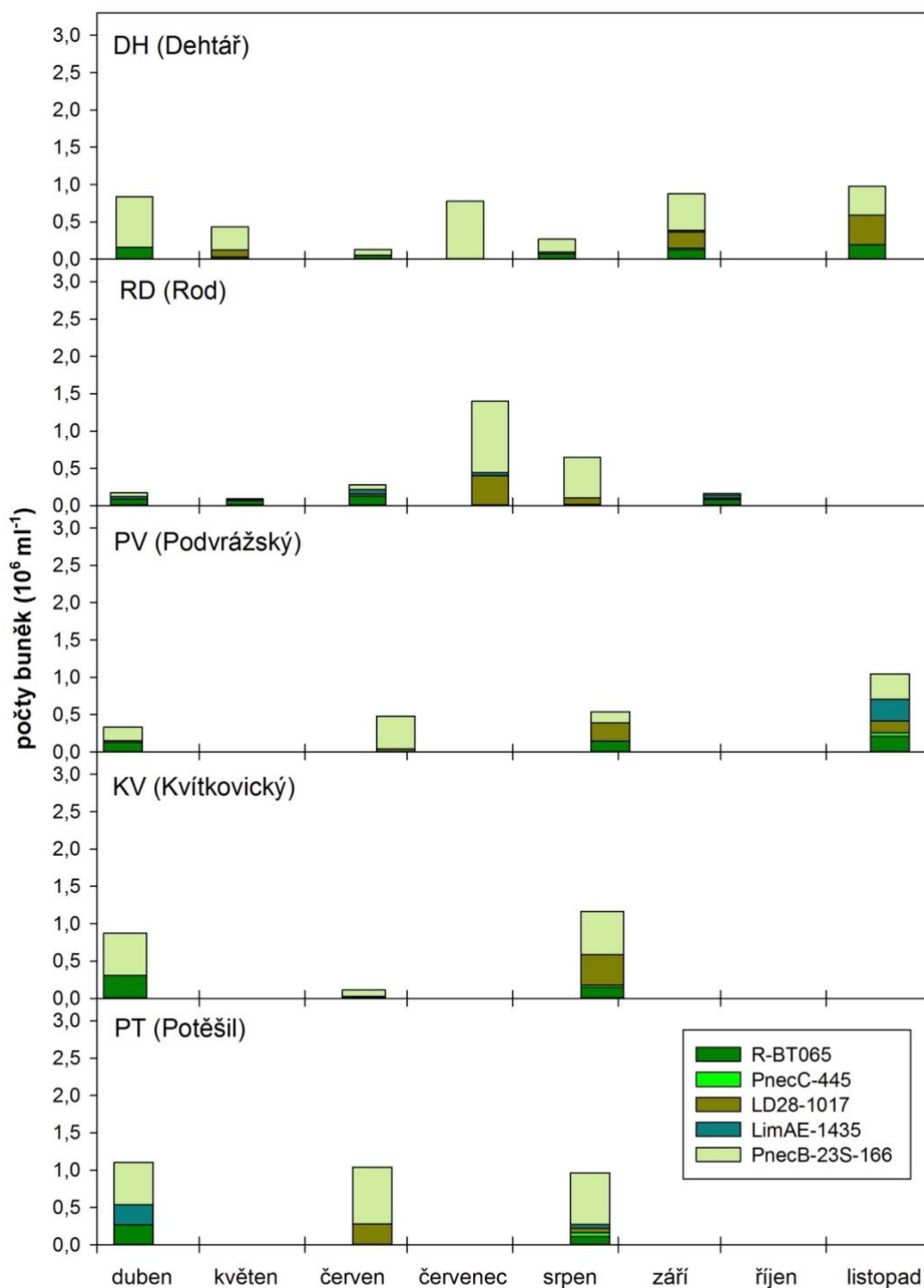
I přes obecnou podobnost mají rybníky v podrobnějším pohledu mezi sebou i sezóně určitou variabilitu (Obr.4 a 5). V DH, KV, KL, PM a RK červnu až v červenci byla v těchto konkrétních rybnících zachycena skupina *Actinobacteria* v malém nebo žádném množství. Dehtář je charakteristický obecně nízkým zastoupením bakterií *Actinobacteria* v letních měsících, zatímco většina rybníků jich má buď podobná množství po celou sezónu a nebo převahu hlavně právě v letních měsících. Specifita konkrétní lokality je patrná například u KL, kde se v létě vyskytují *Actinobacteria* s podobným zastoupením jako i jiné skupiny a žádná výrazně nepřevažuje, zatímco v podzimních vzorcích KL mají výrazný podíl překvapivě *Verrucomicrobia*, i když jsou až druhé nejpočetnější za *Betaproteobacteriales*. Také je tu značný nárůst skupiny *Alphaproteobacteria*. Odlišné poměry zářijového vzorku KL ukazují poměrně jasně na nárůst méně obvyklých skupin bakterioplanktonu a ústup těch, které jinak na ostatních rybnících po celý rok převažují. U ostatních výše jmenovaných rybníků jsou ve většině případů v létě nahrazeny *Actinobacteria* skupinou *Betaproteobacteriales*, které

v nich dosahují počtů až 4×10^6 buněk ml⁻¹. Toto číslo je sice ve srovnání s podzimními nebo jarními maximy *Betaproteobacteriales* v jiných rybnících až dvojnásobně nižší, ovšem relativně významné vzhledem k jejich procentuální převaze proti ostatním skupinám bakterií. Květnový a zářijový odběr RD, je zajímavý kromě toho, že má malou abundanci bakteriálních buněk, i v tom že z hlavních skupin má malé zastoupení také právě skupina *Actinobacteria*, což jinak v dalších odběrech RD během celého roku nemá obdoby. Rod je zajímavý prakticky neměnným a významným zastoupením *Bacteroidetes* od června do srpna. Některé rybníky vykazují podobně vyšší nárůst skupiny *Bacteroidetes* v některých odběrech. Jedná se o vzorky dubnového PV, KV, KL a srpnového PT. *Alphaproteobacteria* má kromě většího zastoupení v srpnovém vzorku rybníku KL, větší zastoupení v letních měsících RD, v listopadovém PM a BR, dubnovém KV a srpnovém PT, RK a KV. Překvapením byla skupina *Planctomycetes*, která měla pár zajímavých maxim - v červencovém RD, červnovém a srpnovém PV, srpnovém KV a PT (Obr. 4 a 5).

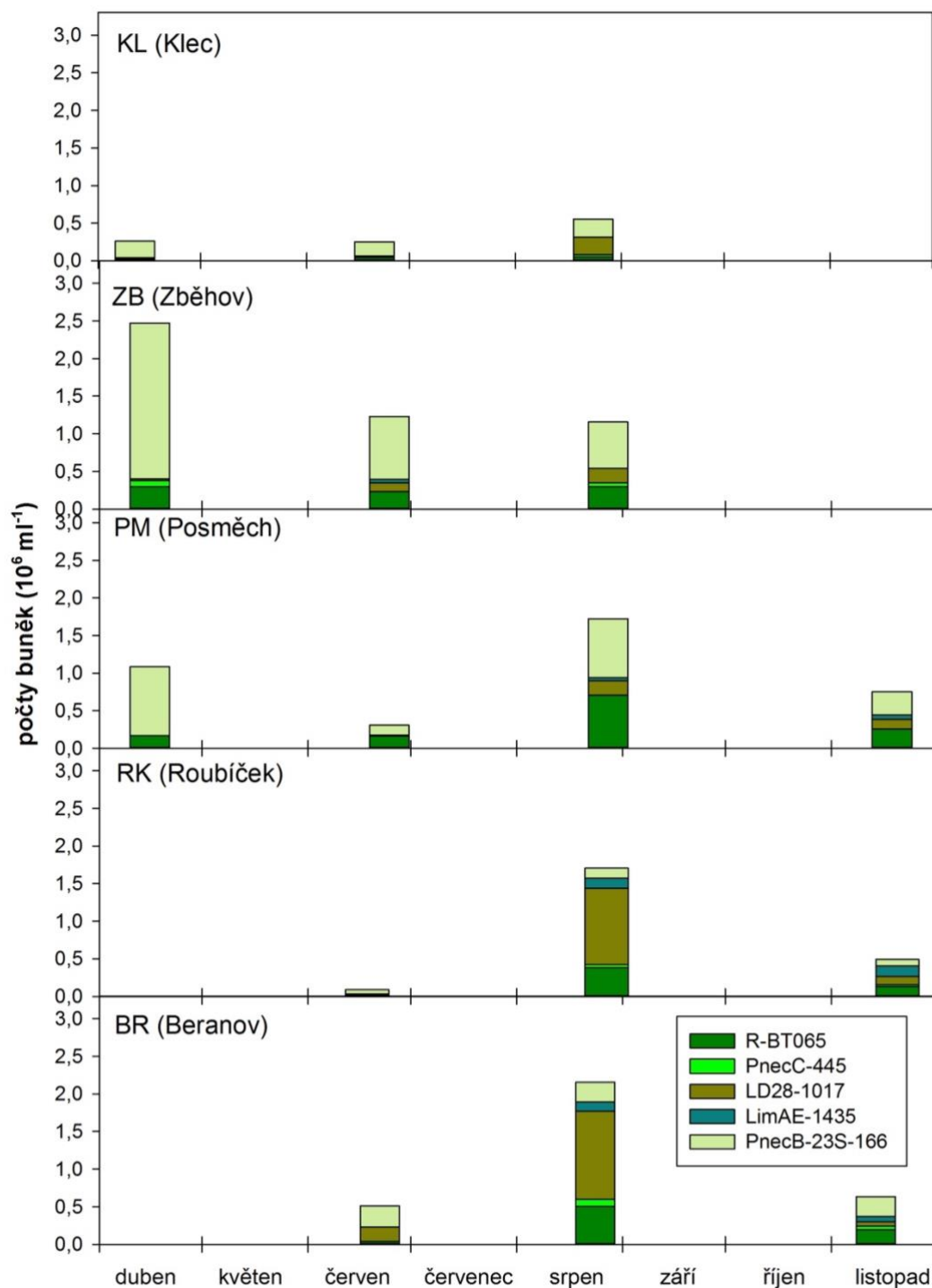
5.3 Skupina *Betaproteobacteriales*

V rámci *Betaproteobacteriales* jsem se zaměřila detailněji na jednotlivé podskupiny. Vzorky byly hybridizovány sondami pro konkrétní specifické betaproteobakteriální skupiny: *Methylophilus planktonicus* (LD28), *Polynucleobacter PnecB* (PnecB-23S-166), *Polynucleobacter PnecC* (PnecC-445) a druhy rodu *Limnohabitans* - R-BT a LimA. Specifické druhy *Betaproteobacteriales* v absolutních počtech buněk na ml jsou zobrazeny graficky na Obrázku 6 a 7. Grafy jsou porovnatelné s grafy téhož v příloze (Obr. S3 a S4) ukazující relativní hodnoty. V Tabulce 5 je uveden průměr, maximum a minimum skupin pro každý rybník.

V rybnících je patrný nárůst *M. planktonicus* hybridizovaného sondou LD-28-1017 ve vzorcích některých rybníků odebraných na konci léta a začátkem podzimu. Nejpatrnější je tento nárůst u RK a BR, rovněž také KV a DH. V RD se objevuje nárůst této skupiny již v červenci. V relativně velkých abundancích se po celou sezónu vyskytuje *Polynucleobacter PnecB* (PnecB-23S-166; Obr. 6 a 7). *Polynucleobacter PnecB* má v RD na jaře a na podzim velmi nízké počty jednak vlivem celkově nízkého počtu všech bakterií, a také větším významem skupiny RBT. Podobná situace nízkého počtu buněk zachycených *Betaproteobacteriales* je v červnovém DH, KV a RK.



Obrázek 6. Abundance vybraných bakteriálních skupin *Betaproteobacteria* stanovených metodou CARD-FISH. Byly použity specifické sondy pro jednotlivé skupiny: R-BT065 (*Limnohabitans* linie LimB, LimC, LimD, LimE), PnecC-445 (*Polynucleobacter* PnecC), LD28-1017 (*Methylopusillus planktonicus*), LimAE-1435 (*Limnohabitans* LimA), PnecB-23S-166 (*Polynucleobacter* PnecB) (podrobnosti v Tabulce 3). Celkové počty buněk byly stanoveny mikroskopicky s použitím fluorescenční barvičky DAPI. Sloupečkové grafy jsou rozmístěny na ose x dle data odběrů vzorků v roce 2017. Data z rybníků: Dehtář, Rod, Podvrážský, Kvítkovický a Potěšil.



Obrázek 7. Abundance vybraných bakteriálních skupin *Betaproteobacteria* stanovených metodou CARD-FISH. Byly použity specifické sondy pro jednotlivé skupiny: R-BT065 (*Limnohabitans* linie LimB, LimC, LimD, LimE), PnecC-445 (*Polynucleobacter* PnecC), LD28-1017 (*Methylopusillus planktonicus*), LimAE-1435 (*Limnohabitans* LimA), PnecB-23S-166 (*Polynucleobacter* PnecB) (podrobnosti v Tabulce 3). Celkové počty buněk byly stanoveny mikroskopicky s použitím fluorescenční barvičky DAPI. Sloupečkové grafy jsou rozmístěny na ose x dle data odběrů vzorků v roce 2017. Data z rybníků: Klec, Zběhov, Posměch, Roubíček, Beranov.

Tabulka 5. Ukazuje ke každému rybníku průměr, minimum a maximum jednotlivých CARD-FISH sond vybraných podskupin *Betaproteobacteriales*.

Zkratka rybníka	R-BT065 (10 ⁶ ml ⁻¹)	PnecC-445 (10 ⁶ ml ⁻¹)	LD28-1017 (10 ⁶ ml ⁻¹)	PnecB-23S-166 (10 ⁶ ml ⁻¹)	LimAE-1435 (10 ⁶ ml ⁻¹)
BR	0,245 (0,03-0,5)	0,047 (0-0,09)	0,476 (0,57-1,17)	0,271 (0,26-0,28)	0,063 (0-0,120)
DH	0,089 (0-0,19)	0,003 (0-0,02)	0,104 (0-0,39)	0,413 (0,07-0,78)	0,003 (0-0,023)
KV	0,153 (0-0,3)	0,009 (0-0,02)	0,137 (0-0,41)	0,408 (0,08-0,57)	0,009 (0-0,028)
PV	0,121 (0-0,21)	0,012 (0-0,05)	0,116 (0,03-0,25)	0,275 (0,15-0,44)	0,073 (0-0,29)
PM	0,323 (0,15-0,7)	0 (0-0)	0,081 (0-0,19)	0,536 (0,14-0,91)	0,025 (0-0,062)
RK	0,172 (0-0,38)	0,019 (0-0,03)	0,381 (0,01-1,01)	0,093 (0,06-0,13)	0,097 (0,015-0,14)
ZB	0,273 (0,23-0,29)	0,045 (0-0,08)	0,110 (0,02-0,19)	1,177 (0,62-2,08)	0,015 (0-0,04)
KL	0,040 (0,02-0,05)	0,008 (0-0,03)	0,084 (0-0,24)	0,217 (0,19-0,24)	0,004 (0-0,012)
PT	0,126 (0-0,26)	0,018 (0-0,06)	0,112 (0-0,28)	0,671 (0,57-0,75)	0,107 (0-0,26)
RD	0,063 (0-0,13)	0,003 (0-0,009)	0,087 (0-0,40)	0,274 (0,008-0,95)	0,031 (0-0,064)

Skupina R-BT je v jarních odběrech významná jako druhá za *Polynucleobacter PnecB* (Obr. 6 a 7). RBT jsou početnější ve čtyřech srpnových odběrech (ZB, PM, RK a BR). *Polynucleobacter PnecC* (PnecC-445; Obr. 6 a 7) se vyskytoval ve všech rybnících alespoň v některém odběru, kromě PM, kde jsem ho v žádném vzorku nezaznamenala. Celkově tvoří *Polynucleobacter PnecC* malé počty, překvapivá je vyšší abundance v listopadovém PV a dubnovém PT, ostatní odběry mají pouze průměrně okolo $0,01 \times 10^6$ buněk ml⁻¹. V červnovém PT, RK a PV, květnovém DH a srpnovém RD nebyly zachyceny jiné skupiny *Betaproteobacteriales* kromě *Polynucleobacter PnecB* a *Methylopumilus planktonicus*. V červencovém DH (Obr. 6) byla významně zachycena pouze skupina *Polynucleobacter PnecB*.

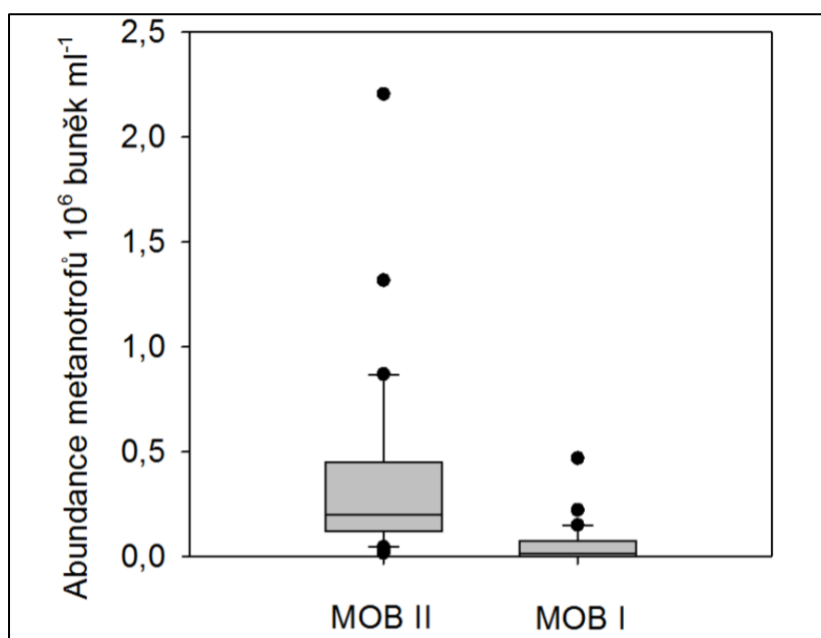
Limnohabitans LimA (Obr. 6 a 7) byl výrazný pouze ve třech odběrech – PV v listopadu, PT v dubnu a RK v listopadu. V RK je v listopadovém odběru významný hlavně svým relativním zastoupením. Oproti ostatním skupinám zde tvoří více než čtvrtinu. Červnový RD má celkově málo buněk na ml, ale i tam byl relativní počet *Limnohabitans* LimA významný.

Srpnový RK a BR má rovněž větší abundanci *Limnohabitans* LimA, avšak v relativních počtech jde o skupinu, která zde má druhé nejmenší počty hned po *Polynucleobacter* PnecC.

5.4 Přítomnost metanotrofů v rybnících

Dalším cílem práce bylo zaměřením se na sladkovodní metanotrofy - MOB I náležící k *Gammaproteobacteria* (M84+705) a MOB II náležící k *Alphaproteobacteria* (M450). Na obrázcích 9 a 10 jsou jednotlivé rybníky a na ose x k nim sezónně rozložené počty metanotrofů I a II typu. Počty jsou uvedeny v relativních % DAPI. V Tabulce 6 je potom uveden průměr, minimum a maximum pro každý rybník v absolutních počtech buněk ml⁻¹. Ve studovaných rybnících dominovala skupina MOB II (průměr $2,484 \times 10^6$ buněk ml⁻¹, SD = 1,691) nad skupinou MOB I (průměr 309×10^3 buněk ml⁻¹, SD = 421) (Obrázek 8).

Nárůst metanotrofů se zdá být zásadní na přelomu léta a podzimu a na podzim. Nárůst je přítomný v listopadových vzorcích RK a BR. Rybníky RD, PV, PT, RK a KL mají větší výskyt metanotrofů II typu (MOB II) také v srpnových odběrech, zatímco u dalších rybníků např. BR a RK je tento nárůst zaznamenán později v podzimních vzorcích (Obr. 9 a 10).

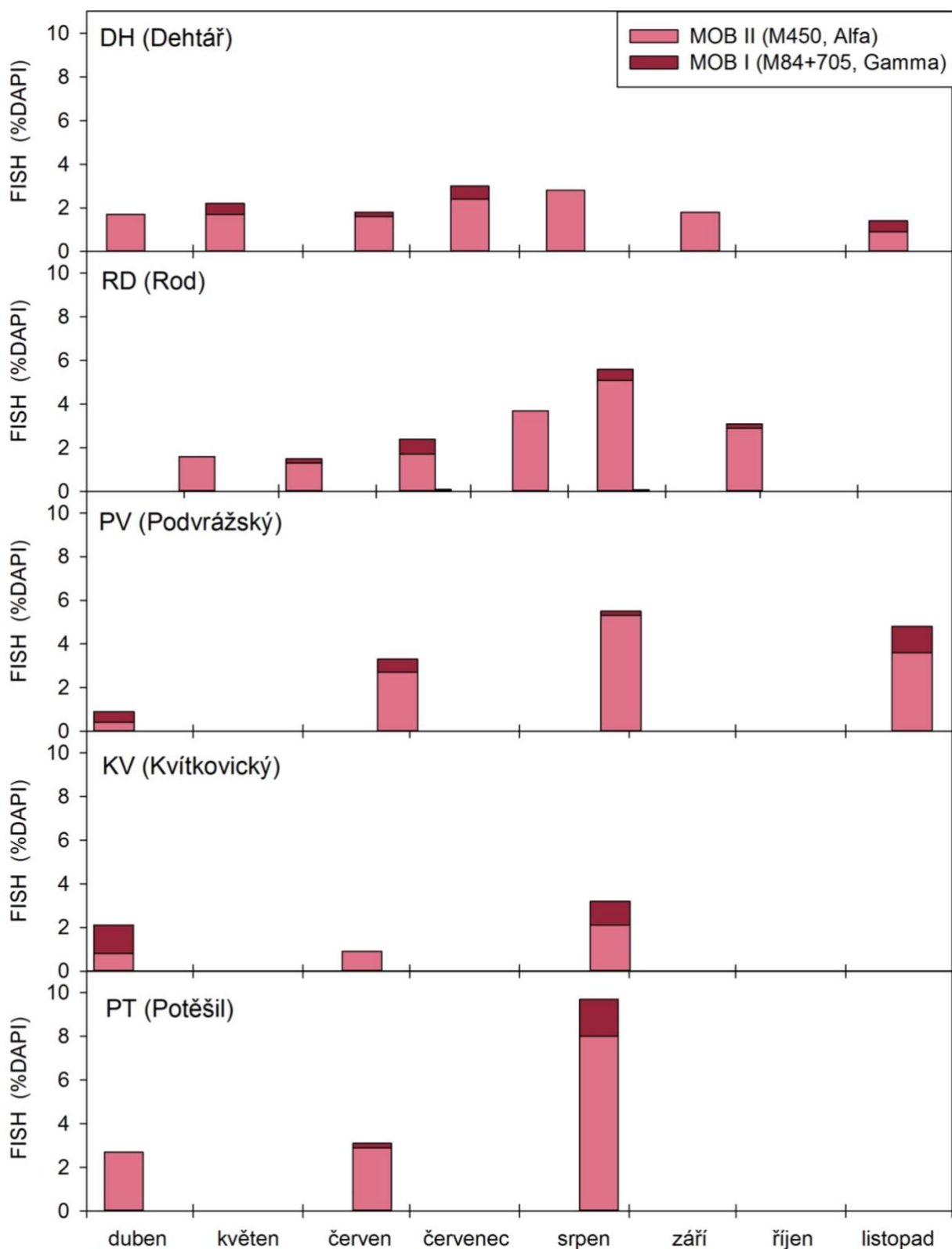


Obrázek 8. Abundance metanotrofů I (MOB I) a II typu (MOB II) stanovená metodou CARD-FISH. Byla použita sonda M450 pro MOB II a kombinace dvou sond M84+705 pro MOB I. Boxy mají 75% a 25% kvartily. Chybové úsečky představují 10 % a 90% percentily (kvantily). Čára uvnitř boxu představuje střední hodnotu (medián). Body (outliers) jsou hodnoty, které leží mimo 90% kvantil. Data pochází z 33 vzorků.

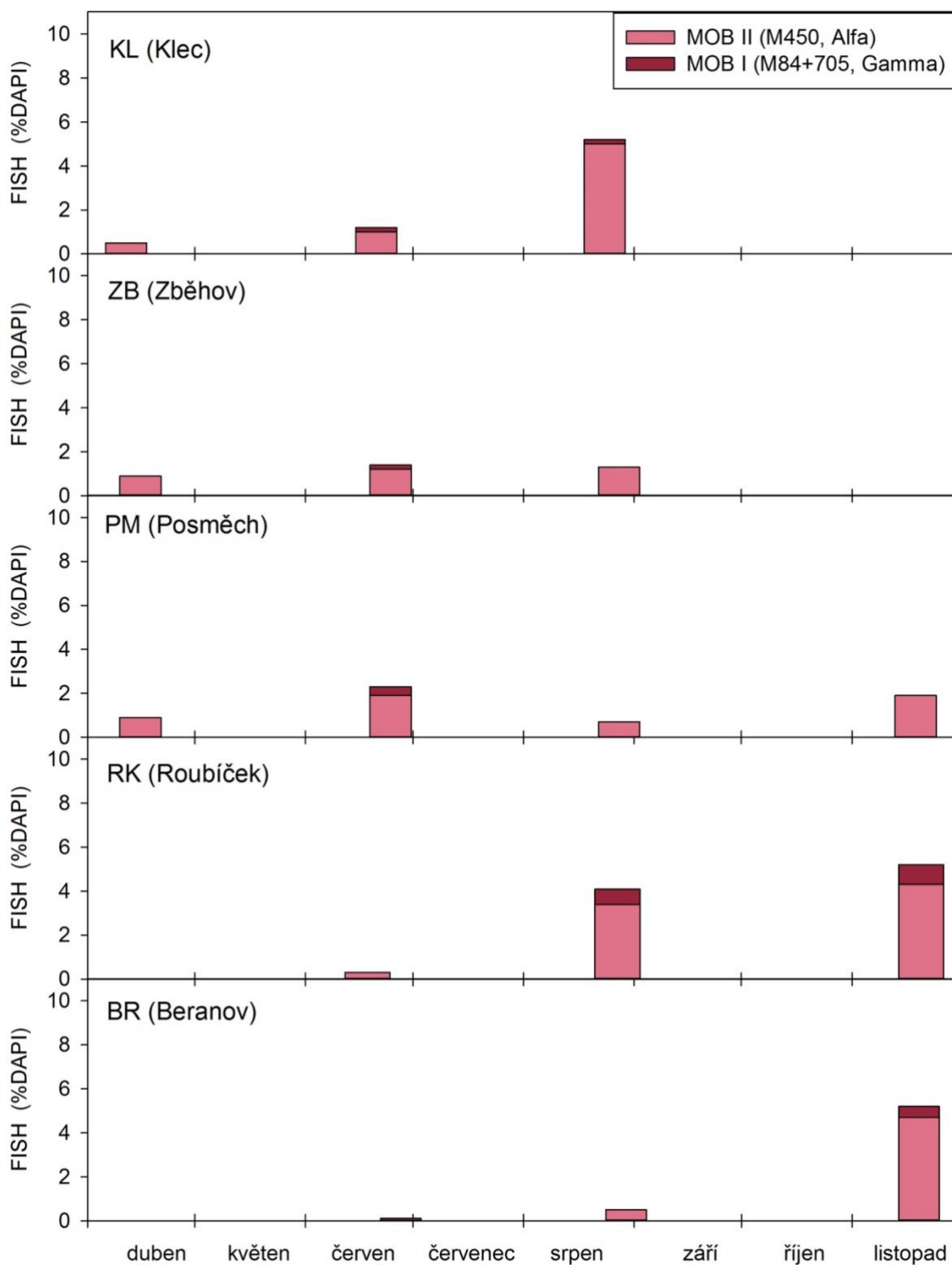
MOB I mají obecně podstatně nižší abundance, ale v odběru z dubnového KV jsou poměrem k MOB II významné a svým zastoupením větší o dvě třetiny (součet 2 % DAPI). V dubnovém PV jsou v relativních počtech obě skupiny MOB víceméně na stejné úrovni kolem 0,5 % DAPI. Významné hodnoty dále měly MOB I v srpnových vzorcích KV a PT a listopadovém PV. Nejméně byly napočítány metanotrofové v DH, PM a ZB.

Tabulka 6. Ukazuje ke každému rybníku průměr, minimum a maximum jednotlivých CARD-FISH sond MOB I a MOB II přepočítané na počty buněk ml⁻¹.

Zkratka rybníka	MOB I (M84+705) (10 ³ ml ⁻¹)	MOB II (M450) (10 ³ ml ⁻¹)
BR	19,3 (0-57,91)	227,32 (17,68-544,42)
DH	42,25 (0-150,69)	271,32 (108,29-602,77)
KV	124,42 (0-222,93)	182,87 (124,41-287,00)
PV	90,37 (32,6-140,89)	474,90 (50,74-866,04)
PM	11,41 (0-45,65)	176,66 (134,08-216,86)
RK	73,07 (0-134,14)	367,71 (45,19-651,56)
ZB	15,49 (0-0,29)	211,61 (167,32-0,08)
KL	23,38 (0-52,71)	488,89 (61,74 - 1 317,85)
PT	164,04 (0-468,73)	915,33 (201,24 - 2 205,80)
RD	31,4 (0-89,68)	350,49 (27,20-869,60)

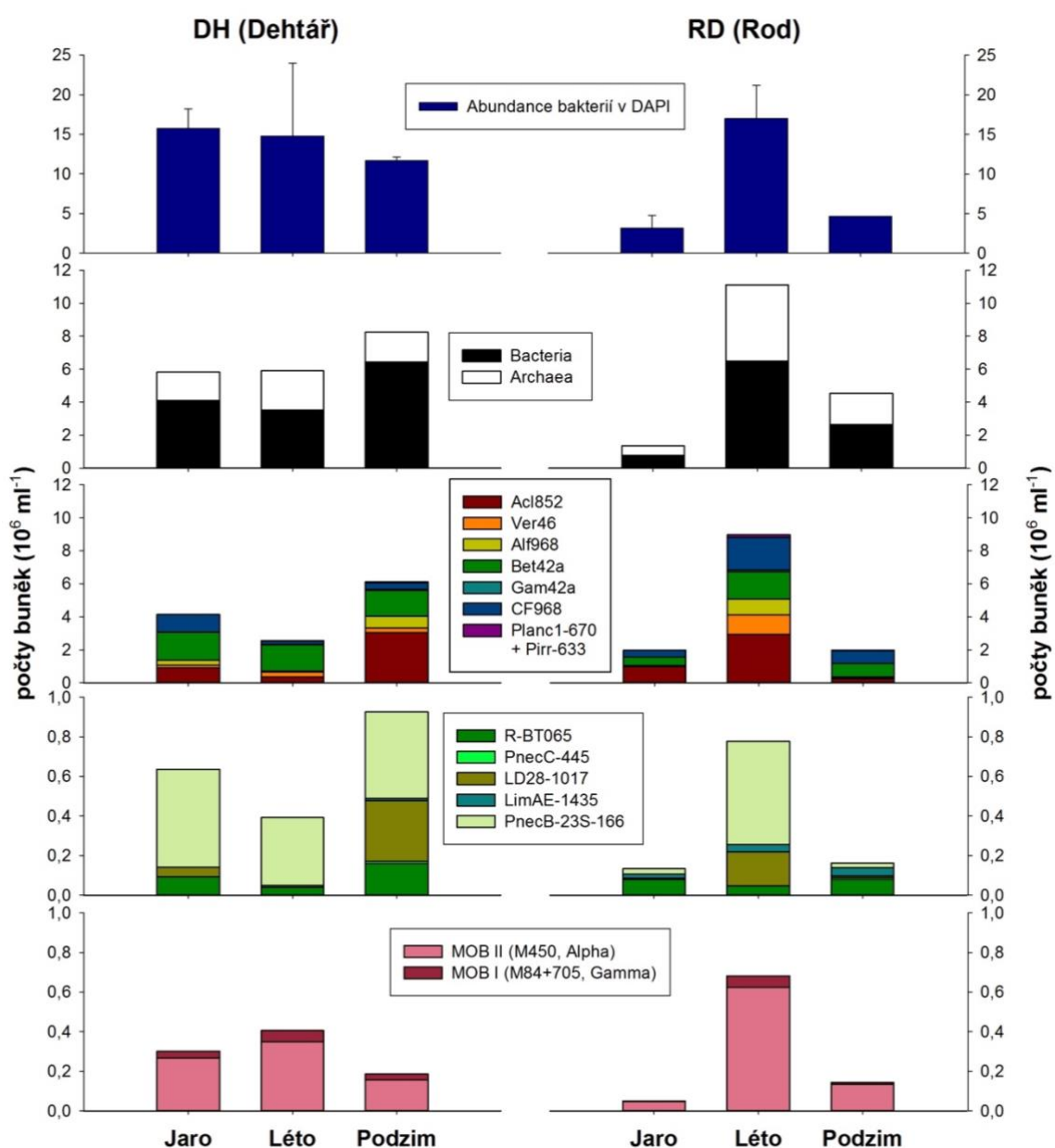


Obrázek 9. Abundance bakteriálních skupin metanotrofů (MOB) stanovených metodou CARD-FISH. Byly použity specifické sondy M84+705 (MOB I) ze skupiny *Gammaproteobacteria* a M450 (MOB II) ze skupiny *Alphaproteobacteria* (podrobnosti v Tabulce 3). Sloupečkové grafy jsou rozmístěny na ose x dle data odběrů vzorků v roce 2017. Data z rybníků: Dehtář, Rod, Podvrážský, Kvítkovický, Potěšil.



Obrázek 10. Abundance bakteriálních skupin metanotrofů (MOB) stanovených metodou CARD-FISH. Byly použity specifické sondy M84+705 (MOB I) ze skupiny *Gammaproteobacteria* a M450 (MOB II) ze skupiny *Alphaproteobacteria* (podrobnosti v Tabulce 3). Sloupečkové grafy jsou rozmístěny na ose x dle data odběrů vzorků v roce 2017. Data z rybníků: Klec, Zběhov, Posměch, Roubíček, Beranov.

5.5 Porovnání Dehtáře a Rodu



Obrázek 11. Srovnání abundancí všech vybraných bakteriálních skupin stanovených metodou CARD-FISH na dvou rybnících Dehtáři a Rodu. Celkové počty buněk byly stanoveny mikroskopicky s použitím fluorescenční barvičky DAPI. Byly použity specifické sondy pro jednotlivé skupiny: Eub I-III (*Bacteria*), Arc915 (*Archaea*), a specifické sondy pro kmeny z říše *Bacteria*: Acl852 (*Actinobacteria*), Ver46 (*Verrucomicrobia*), ALF968 (*Alphaproteobacteria*), Bet42a (*Betaproteobacteriales*), Gam42a (*Gammaproteobacteria*), CF968 (*Bacteroidetes*), Planc1-670 a Pirr-633 (*Planctomycetes*) R-BT065 (*Limnolobus* linie LimB, LimC, LimD, LimE), PnecC-445 (*Polynucleobacter PnecC*), LD28-1017 (*Methylopusillus planktonicus*), LimAE-1435 (*Limnolobus* LimA), PnecB-23S-166 (*Polynucleobacter PnecB*), M84+705 (MOB I), M450 (MOB II). Sloupečkové grafy jsou rozmístěné na ose x dle dat ze tří ročních období v roce 2017.

Na Obrázku 11. je Dehtář, kde neprobíhá fáze čiré vody, tudíž je monotónní a turbidní, ve srovnání s dynamickým Rodem, ve kterém fáze čiré vody probíhá na jaře a na podzim. Oba rybníky byly odebírány v měsíčních časových intervalech tzn. častěji než zbylých 8 rybníků. (Obr.11 a 9).

Při porovnání grafů celkového počtu buněk DAPI a počtů skupin hybridizovaných obecnými sondami *Bacteria* a *Archaea* (Obr. 11) je patrné, že DH má po celý rok přibližně stejně prokaryot ve vodním sloupci, zatímco RD má velké rozdíly mezi jednotlivými ročními obdobími. Na jaře a na podzim probíhá v RD fáze čiré vody, kdy na eliminaci prokaryotních organismů v tomto období má výrazný vliv výskyt velkých perlooček.

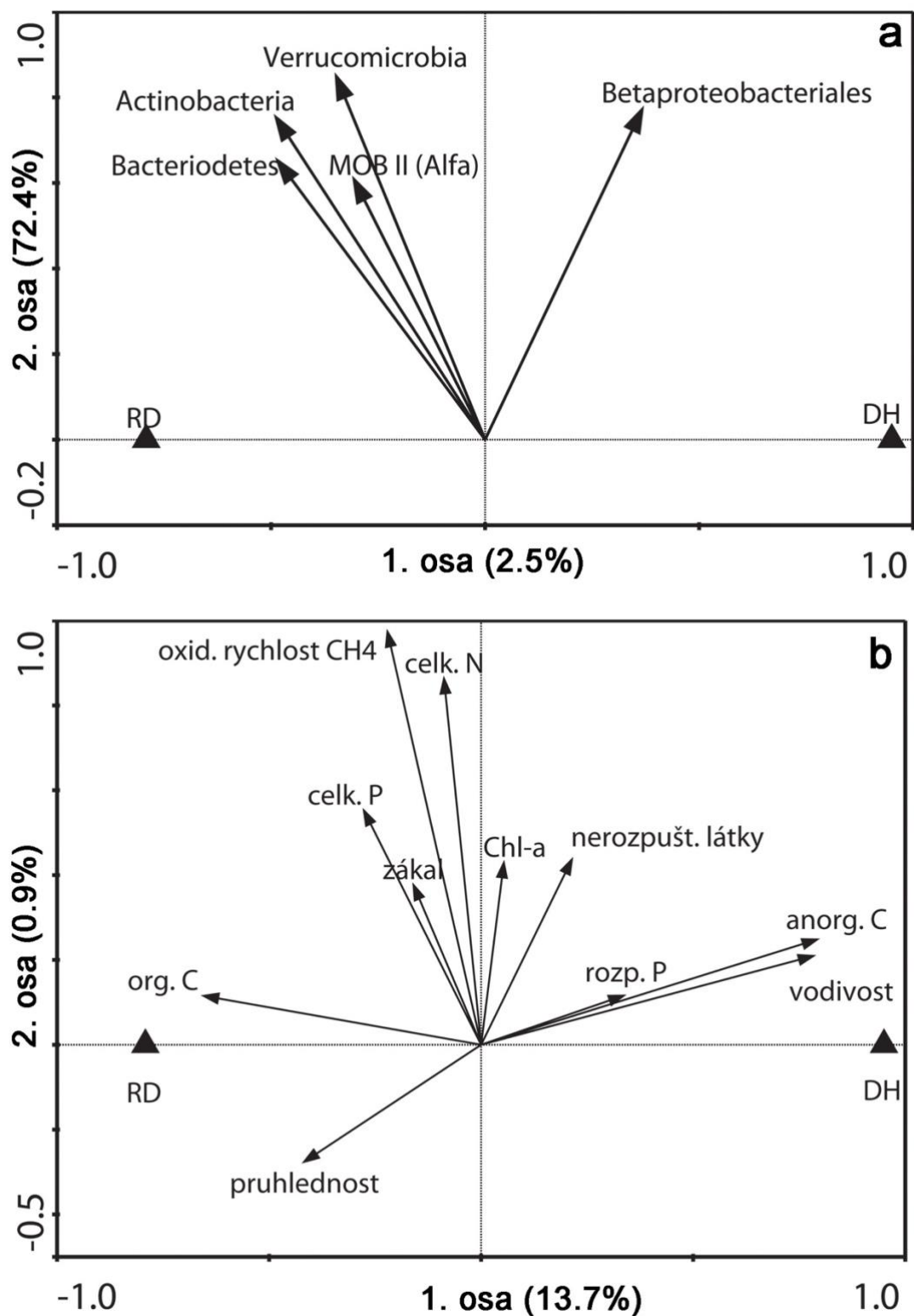
Snížení počtů bakteriálních buněk během jara a podzimu v RD je také patrné na jednotlivých specifických skupinách *Bacteria*. Jsou tu navíc rozdíly v poměrech jednotlivých skupin. V RD bylo zachyceno výrazněji více buněk jednotlivých bakteriálních skupin přes léto. V tomto období jsou v RD zaznamenány velké hodnoty pro skupiny *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, a *Betaproteobacteriales*, a také relativně menší, ale stále výrazné hodnoty rovněž pro *Alphaproteobacteria* a *Verrucomicrobia*. Skupina *Verrucomicrobia* se vyskytuje v obou rybnících během letních měsíců (Obr. 11) v případě DH se jedná o pouze červenec ve kterém vidíme nárůst této skupiny, v RD vidíme nárůst skupiny od června do srpna (Obr. 4). Překvapením je také relativně velké (i když v grafu znatelně nejmenší) zastoupení skupiny *Planctomyces* v letních měsících RD. V DH škála hlavních početně převažujících skupin není tak pestrá a bylo zachyceno mnohem méně bakteriálních buněk během letních měsíců než v RD. Tento fakt je výraznější na Obrázku 4. V Dehtáři si povšimneme pouze převahy skupiny *Betaproteobacteriales*. *Actinobacteria* jsou v letních měsících na minimálních hodnotách, avšak ještě patrné. Tady je významný rozdíl v porovnání s RD, jelikož tam *Actinobacteria* v létě převažují, zatímco na jaře a na podzim je jich méně (Obr. 4).

Podíváme-li se na skupinu *Betaproteobacteriales* (Obr. 11 – na sloupečkových grafech v zelených odstínech), vidíme několik zásadních rozdílů. Za prvé DH má zastoupení *Polynucleobacter PnecB* poměrně stejné přes tři roční období, zatímco v RD je na jaře a podzim této skupiny výrazně méně a má maximum během letních měsíců. Další rozdíl je patrný u skupiny *Methylopumilus planktonicus*, která u DH začíná být výrazný na podzim, zatímco v RD je výrazný již přes léto a na podzim i na jaře naopak má tato skupina zanedbatelné hodnoty. RD kromě toho vykazuje celý rok přítomnost *Limnohabitans LimA*, zatímco v DH ho prakticky nevidíme, pouze téměř nezatelně na podzim. V tomto období má

navíc DH podobné zastoupení skupiny *Polynucleobacter* PnecC. RBT v obou rybnících má stejný průběh, neboť u obou má větší zaznamenané hodnoty na jaře a na podzim.

V zastoupení i poměrech MOB I a MOB II se oba rybníky také liší odlišným sezónním průběhem. V letních měsících je početnost MOB II v Rodu (RD) téměř dvojnásobně vyšší v porovnání s Dehtářem (DH) a poukazuje na to, že v RD byly v tomto období metanotrofové pravděpodobně mnohem více aktivní (Obr.11). V DH bylo zachyceno v létě také znatelně více buněk než zbylá období, čímž je Obrázek 11 s metanotrofy znatelně ovlivněn. DH má na rozdíl od RD stabilnější počty buněk po celou sezónu.

Dehtář a Rod při porovnání na základě fyzikálně-chemických parametrů mnohorozměrnou analýzou dat ukázaly v několika parametrech odlišnost – ohledně obsahu organického uhlíku, průhlednosti, vodivosti, rozpuštěného fosforu a obsahu chlorofylu (Obr.12 – b). Vzhledem k procentům vysvětlené variability se od sebe tyto dva rybníky ale tolik neliší. Na základě bakteriálního složení mnohorozměrná analýza ukázala velké rozdíly mezi DH a RD u několika skupin bakterií s vysokým procentem vysvětlené variability (Obr.12 – a).



Obrázek 12. Výsledky ordinační analýzy (RDA) ukazující odlišnosti mezi rybníky Rod (RD) a Dehtář (DH). (a) v bakteriálním složení (b) v chemickém složení. Procenta vysvětlené variability v datech jsou uvedena u každé osy.

5.6 Porovnání korelační maticí a mnohorozměrnou analýzou dat

Korelační analýza ukázala, že počty buněk detekovaných prokaryot a naměřené chemicko-fyzikální a biologické parametry mohou mít souvislost. Korelace byly provedeny jak pro % DAPI, tak pro počty buněk, jelikož někdy ukáže každá z těchto dvou informací něco jiného. Nejsilnější korelační koeficienty a detaily jsou v příloze Tab. S2.

Dle výsledků korelací v příloze v Tabulce S2 s nárůstem heterotrofních bičíkovců (TGR-HNF/d) přibývá procentuální zastoupení a abundance skupiny *Alphaproteobacteria* (ALF968) – (korelační koeficient $\rho = 0,596$, $p < 0,001$). Významnější jsou ale v rybnících nálevníci. Čím větší predace od nálevníků je, tím více je bakteriálních buněk skupin *Actinobacteria* (Acl852) – ($\rho = 0,582$, $p < 0,001$) a *Methylopusillus planktonicus* (LD28-1017) – ($\rho = 0,471$, $p = 0,005$), a tím nižší je procentuální zastoupení skupiny *Betaproteobacteriales* (Bet42a) – ($\rho = -0,458$, $p = 0,007$) a *Bacteroidetes* (CF968) – ($\rho = -0,447$, $p = 0,009$) (Tab. S2). *Polynucleobacter* PnecB koreloval pozitivně s počtem pikosiníc ($\rho = 0,532$, $p < 0,01$ – % DAPI PnecB) buňky ($\rho = 0,667$, $p < 0,001$ – počty buněk PnecB).

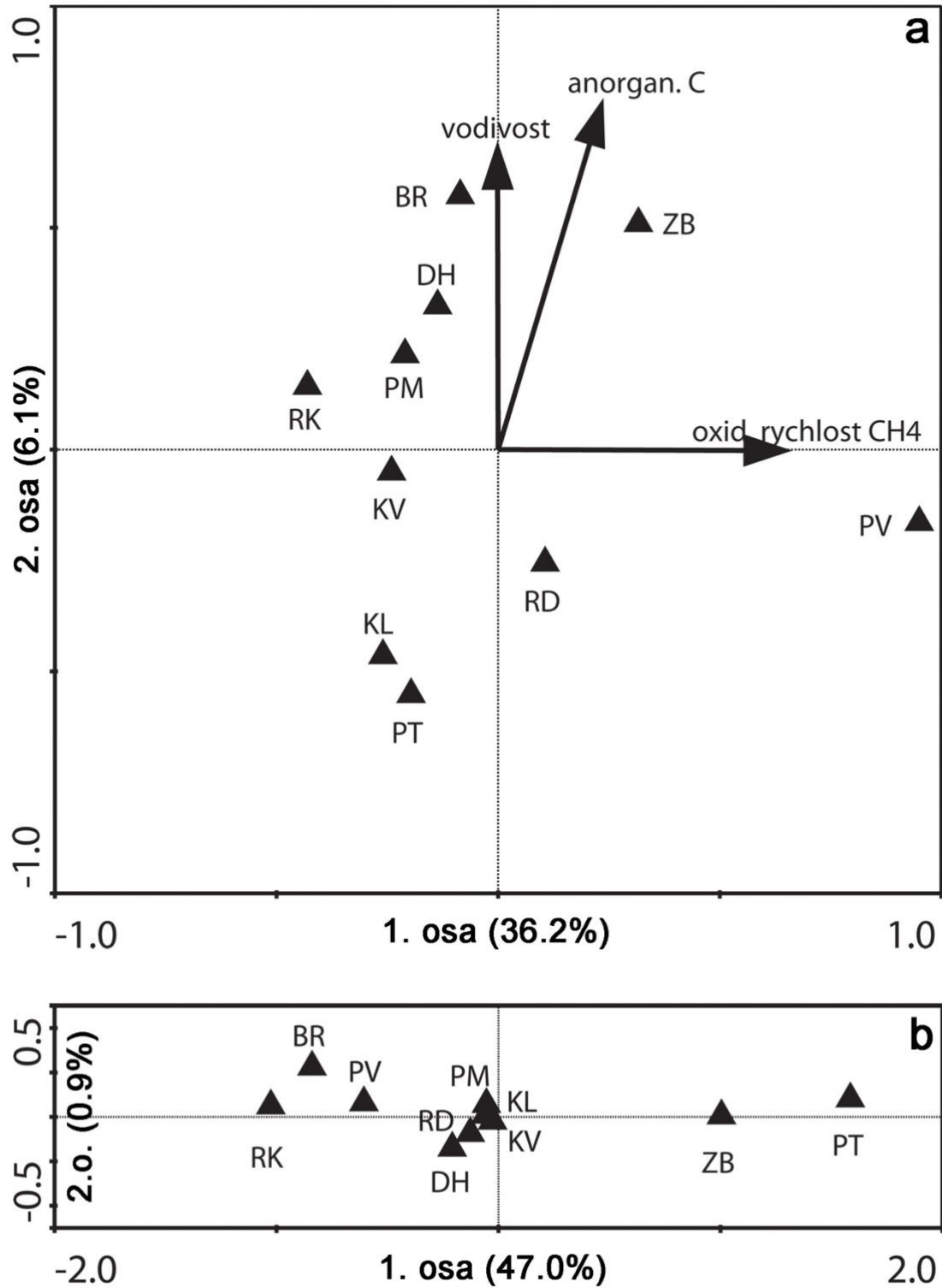
Vychází pozitivní korelace bakteriálních abundancí a fytoplanktonu, konkrétně sinic (biomasa *Cyanobacteria* – Cyano mg/l) a v menší míře zelených řas (*Volvocales* mg/l). To se týká hlavně % DAPI *Archaea* (Arc915) – (Pearson $\rho = 0,546$, $p < 0,001$) a % DAPI MOB II typu (M450) – (Pearson $\rho = 0,832$, $p < 0,001$). Obdobné výsledky ukázaly přepočty na počet buněk MOB II typu (M450) – (Pearson $\rho = 0,768$, $p < 0,001$). Se sinicemi korelovaly počty buněk *Verucomicrobia* (Ver46) – (Pearson $\rho = 0,422$, $p = 0,014$) a *Alphaproteobacteria* (ALF968) – (Pearson $\rho = 0,586$, $p < 0,001$). Jeden poddruh *Planctomycetes* - *Pirellula* (Pirr-633) početně stoupá se stoupajícím počtem zelených řas *Chlorococcales* (Pearson $\rho = 0,748$, $p < 0,001$ – % DAPI Pirr-633), (Pearson $\rho = 0,623$, $p < 0,001$ počty buněk I Pirr-633). Stejný výsledek je vidět na Chla, kdy relativní počty *Archaea* i *Bacteria* stoupají s přibývajícím chlorofylem (Pearson $\rho = 0,744$, $p < 0,001$; $\rho = 0,659$, $p < 0,001$) (Tab. S2). Prokazatelně patrné je to hlavně také na počtech *Verrucomicrobia*, *Alphaproteobacteria* a MOB II (Pearson $\rho = 0,573$; $\rho = 0,557$, $\rho = 0,804$; všechny $p < 0,001$).

Pozitivní korelace s měřítkem zákalu vody (k10 – extinkční koeficient viz. Tabulka S2) vychází u mnoha skupin bakterií – % DAPI *Verrucomicrobia* (Ver46) – (Pearson $\rho = 0,672$, $p < 0,001$), % DAPI *Alphaproteobacteria* (ALF968) – (Pearson $\rho = 0,638$, $p < 0,001$), % DAPI

MOB II (M450) – (Pearson $\rho=0,661$, $p<0,001$), počet buněk *Archaea* (Arc915) – (Pearson $\rho=0,677$, $p<0,001$), počet buněk *Verrucomicrobia* (Ver46) – (Pearson $\rho=0,734$, $p<0,001$), počet buněk *Alphaproteobacteria* (ALF968) – (Pearson $\rho=0,764$, $p<0,001$), počet buněk MOB II (M450) – (Pearson $\rho=0,766$, $p<0,001$). Stejná kladná korelace vychází i pro celkové počty buněk *Bacteria* (Eub I-III) – (Pearson $\rho=0,614$, $p<0,001$). Se stoupající průhledností naopak skupina *Bacteria* (hybridizovaná obecnou sondou Eub I-III) klesá (Pearson $\rho= -0,582$, $p<0,001$), detaily Tab.S2.

Byly rovněž nalezeny průkazné negativní korelace hloubky eufotické vrstvy, kam dopadá 1% (Zeu) záření se skupinami *Archaea*, *Bacteria*, *Verrucomicrobia*, *Alphaproteobacteria* a MOB II (podrobnosti Tab. S2). Čím menší průhlednost tím více všech bakterií. Skupina *Bacteroidetes* roste s menší vodivostí daných lokalit. Na druhou stranu s vyšším KNK 4,5 (kyselinová neutralizační kapacita při hodnotě pH 4,5) % DAPI *Bacteroidetes* klesají (Pearson $\rho= -0,693$ $p<0,001$)

Mnohorozměrná analýza porovnála všechny rybníky na základě podobnosti. Výsledek ordinační analýzy (RDA) ukázal, že podle fyzikálně-chemických parametrů jsou nejvýraznějšími činiteli, co je odlišuje vodivost a obsah anorganického uhlíku (anorgan. C). Podvrážský (PV) se navíc lišil výrazně od ostatních rybníků oxidační rychlostí metanu (Obr. 13 a). Při porovnání rybníků na základě bakteriálního složení vyšlo v ordinační analýze (RDA), že se od ostatních rybníků zásadně lišil bakteriálním složením ZB a PT. Charakteristické složení mikrobiálních komunit byly mnohorozměrnou analýzou prokázány také u rybníky RK, BR a PV (Obr. 13 b).



Obrázek 13. Výsledky ordinační analýzy (RDA) ukazující odlišnost mezi rybníky založenou (a) pouze na fyzikálně-chemických parametrech a (b) na základě bakteriálního složení. Vysvětlená variabilita v datech je uvedena u ubou os.

6 Diskuze

6.1 Charakteristika mikrobiálního společenstva v hypertrofních vodách

Dřívější názor a teorie „všechno je všude“, tvrdila, že vyšší diverzita mikrobiálních společenstev je dána pouze tím, čím více odběrů provedeme, protože tím více mikroorganismů zachytíme (de Wit a Bouvier, 2006). Teorie pracovala s předpokladem, že mikrobiální společenstva obecně snadněji překonávají ekosystémové bariéry a proto se vyskytují všude. Ale ukázalo se, že i bakterie vyžadují různá ekologická specifika pro dané prostředí (Newton et al., 2011b; Pernthaler, 2017; Pernthaler et al., 1998; Salcher, 2014; Van Der Gucht et al., 2005).

Proto bylo cílem mé práce zjistit konkrétní složení mikrobiálního společenstva rybníků, zda se mezi sebou rybníky liší a čím jsou případné rozdíly určené. Na základě literatury (Newton et al., 2011b; Salcher, 2014) byly vybrány hlavní nejpočetnější skupiny bakterií, které byly následně hybridizovány sondami uvedenými v Tabulce 3. Seznam sond uvedených v Tabulce 3 byl doplněn o další skupiny (*Polynucleobacter* PnecB, *Methylopumilus planktonicus*, *Verrucomicrobia*, *Vodnikaceae*, *Pirerula*), které byly vybrány na základě genových sekvencí 16S rRNA (ILUMINA sekvenování nové generace – NGS) provedených z totožných vzorků rybníků. Tato práce je pravděpodobně první, která pracovala v hypertrofních ekosystémech metodou CARD-FISH s méně vyzkoušenými sondami Ver46 (*Verucomicrobia*) a podskupin *Planctomycetes* – *Pirellula* (Pirr-663) a nově zavedenou skupinou *Vodnikaceae* (Planc1-670). Bakterie byly metodou CARD-FISH postupně detekovány v 10 rybnících v několika jednotlivých odběrech v roce 2017 a 2016.

Pokud je mi známo, toto je také první práce, která kvalitativně a kvantitativně analyzuje dynamiku populací nejvýznamnějších bakteriálních skupin metodou CARD-FISH **v rybnících**. Dosud malá míra zájmu vědecké komunity o bližší výzkum hypertrofních mělkých nádrží způsobila, že informace o složení mikrobiálních společenstev v rybnících jsou velmi limitované. Několik prací uvádí složení mikrobiálních komunit v hypertrofních mělkých jezerech (Llirós et al., 2014; Van Der Gucht et al., 2005), eutrofních jezerech (Bell et al., 2018; Kawasaki et al., 2013; Newton et al., 2011b; Xing a Kong, 2007) nebo sedimentu eutrofních vod (Bai et al., 2012; Wang et al., 2019). Lze nalézt práce, které se zabývají

bakteriálními komunitami v čističkách odpadních vod (Daims et al., 2001; Harms et al., 2003; Wagner a Loy, 2002), které zmiňují jelikož se dají považovat za podobné vzhledem k míře trofie. Daims et al. (2001) a Harms et al. (2003) řeší bakterie typu *Nitrospira*, která se nacházela v aktivovaných kalech a patří mezi bakterie provádějící nitrifikaci. V rybnících by mohla být za turbidního stavu v některých obdobích nitrifikace významná v podobné míře jako v čističkách odpadních vod.

Složení mikrobiálních komunit se v eutrofních vodách v minulosti studovalo hlavně pomocí mikrobiálních technik, jako jsou kultivační metody a molekulární metody (založené na PCR) – 16S rRNA klonové knihovny, DGGE (De Figueiredo et al., 2007; Van Der Gucht et al., 2005), kvantitativní PCR (Harms et al., 2003; Qin et al., 2016; Tamaki et al., 2005) a ILLUMINA sekvenováním nové generace (NGS) (Qin et al., 2016; Wang et al., 2012).

Van Der Gucht et al. (2005) ukazuje na výzkumu 4 mělkých eutrofních jezer, že každé jezero má svoje vlastní složení bakteriálních komunit. V mých výsledcích jsem našla shodu, protože několik rybníků má výrazná specifika. V mnohorozměrné analýze se na základě všech bakteriálních skupin ukázaly nejodlišnější ZB a PT. Porovnáváním rybníků na Obrázku 4 a 5 jsem u skupin na úrovni řádu vyzorovala, že velmi specifické jsou proměnou bakteriálních skupin DH, RD a KL. Každý z těchto tří rybníků se chová na první pohled jinak než zbylých sedm rybníků, ale i mezi ostatními rybníky můžeme pozorovat drobné rozdíly. Van Der Gucht et al. (2005) ukazuje klasické složení mikrobiálních komunit v hypertrofních/eutrofních vodách na předních místech s *Betaproteobacteriales*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Alphaproteobacteria*, a dále s minoritní přítomností dalších skupin jako jsou *Gammaproteobacteria* a *Planctomycetes*. To také potvrzují další studie například studie Zwart et al., (2002). Nicméně obecná prevalence hlavních 4 skupin odpovídá nejen mikrobiálnímu složení hypertrofních vod, ale i běžným vodám různé alkality a trofie (Llirós et al., 2014). De Figueiredo et al. (2007) detekoval větší množství organismů spadajících do skupin *Bacteroidetes* a *Alphaproteobacteria* v prostředí nejvyššího pH. *Actinobacteria* byly přítomné ve všech vzorcích (De Figueiredo et al., 2007). Ve studii Qin et al. (2016) týkající se mikrobiálního složení v rybníku s kapry detekovali sekvenováním skupinu *Proteobacteria* (*Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-*proteobacteria*), která převažovala, dále značné množství sinic a opět skupiny *Bacteroidetes* a *Actinobacteria*. Při snaze o generalizaci je z mých výsledků zřejmé, že rybníky lze podle převahy té které skupiny v daných vzorcích rozdělit do tří skupin. První skupina rybníků s převahou *Actinobacteria*, druhá s převahou *Betaproteobacteriales*, a třetí skupina, jež nemá významnou převahu žádné ze skupin bakterií (Obr. 4 a 5). Do první

skupiny by se dalo zařadit hned 6 rybníků, kde víceméně po celou sezónu převažovala skupina *Actinobacteria*. Tři z rybníků lze zařadit do druhé skupiny, kde převažovala skupina *Betaproteobacteriales*. Třetí skupina bez zjevné převahy by obsahovala pouze jeden rybník - KL. U tohoto rybníku není možné žádnou ze skupin obecně považovat za převažující. Ve studii (Van Der Gucht et al., 2005) dominovaly ve dvou mělkých jezerech *Betaproteobacteriales* a v jednom *Actinobacteria*.

Co se týče prokaryot ze skupiny *Archaea* bývá její abundance v různých prostředích obecně nižší než abundance *Bacteria* (Bomberg et al., 2008). Nicméně ve vodním sloupci sladkovodních hlubokých jezer mohou dosáhnout abundance až 37 % ($4,1 \times 10^5$ buněk ml⁻¹) mikrobiálních buněk (Auguet and Casamayor, 2008; Urbach et al., 2007). Výsledky ukázaly, že ve třech odebraných vzorcích rybníků jich bylo srovnatelně nebo téměř srovnatelně s *Bacteria*, v jednom vzorku (červenec DH) jich bylo zachyceno dokonce více. V jiném rybníku jsem zachytila výjimečné maximum *Archaea* $9,9 \times 10^6$ buněk ml⁻¹ (srpen PT). Průměrně dosahovaly $2,6 \times 10^6$ buněk ml⁻¹ $\pm 1,9$.

6.2 Sezónní model distribuce planktonu (PEG-model) v hypertrofním prostředí

Dva typy ekosystémů - hluboké jezero (nebo nádrž) a mělká živinově bohatá nádrž (rybník) mají každý naprosto odlišný PEG model. Sezonalita je v temperátních podmínkách důležitým faktorem ovlivňující poměry ve sladkých vodách. Odlišné sladkovodní ekosystémy se chovají v průběhu sezóny jinak. Rybníky jsou si na úrovni hypertrofních ekosystémů podobné, zatímco v porovnání s hlubokými dimiktickými jezery a nádržemi se zásadně liší. Kvůli evidentnímu rozdílu byl publikován revidovaný PEG model, který uvažuje i jiné specifické podmínky, než které nastávají v hlubokých jezerech, například velké živinové zatížení (Sommer et al., 2012).

Mělké hypertrofni nádrže jsou většinou po celý rok turbidní a bez výskytu fáze čiré vody (Sommer et al., 2012), zatímco v hlubokých jezerech a nádržích proběhne fáze čiré vody vždy. V polymiktických rybnících se má zooplankton problém udržet do letních měsíců a jejich počet většinou ke konci jara klesá kvůli nasazenému plůdku planktivorních ryb, který roste a jejichž potravou se stávají. Pokud perloočky v rybníku vydrží, proběhne fáze čiré vody jako například v RD (17.4. počet perlooček – 233,7 individuí l⁻¹, 17.9. počet perlooček –

247,1 individuí l⁻¹). RD je průběhem fáze čiré vody specifický a podobný ekosystémům, kde fáze čiré vody probíhá pravidelně, na rozdíl od většiny rybníků, které jsou turbidní.

Rovněž se dá dimiktická hluboká nádrž od mělké polymiktické odlišit nižším celkových počtem bakteriálních buněk. V Římově, který slouží jako nádrž na pitnou vodu a je ukázkou hluboké dimiktické nádrže, jsou buňky běžně v rozmezí 1-7 × 10⁶ buněk ml⁻¹ (Šimek et al., 2014), zatímco v případě hypertrofních rybníků může jít až o 20 × 10⁶ buněk ml⁻¹ - jako je to v případě RD; a 15 × 10⁶ buněk ml⁻¹ - v případě DH.

V jezerech převažují ve velké míře heterotrofní bičíkovci, zatímco v rybnících jsou to nálevníci. Heterotrofní bičíkovci dosahují například v Římově během jarního květu v maxima až 7 × 10³ individuí ml⁻¹ (Šimek et al., 2014). Počty heterotrofních bičíkovců mohou zásadně měnit mikrobiální komunity a proto jim byla také věnována v předchozích studiích značná pozornost (Jürgens a Stolpe, 1995; Nakano et al., 1998; Šimek et al., 2001a, 2013). Ovšem v rybnících úlohu heterotrofních bičíkovců přebírají primárně nálevníci (Carrias et al., 1996; Pace and Orcutt, 1981; Šimek et al., 2019; Zingel et al., 2007). Role nálevníků obecně roste s trofickým gradientem (Beaver and Crisman, 1989; Nakano et al., 1998; Šimek et al., 2000, 2019). Společenstva nálevníků poté ovlivňují výrazně bakteriální komunity (Šimek et al., 2019).

Pro bakterie jsou hlavními limitujícími faktory predační tlak od těchto prvoků (Nakano et al., 1998) a velkých perlooček (Jurgens, 2002), a rovněž dostupnost/nedostupnost živin v závislosti na ročních obdobích (Ptacnik et al., 2010). Tyto faktory se podílejí na velikosti a rozmanitosti společenstev bakterií (Beaver a Crisman, 1989; Carrias et al., 1996; Nakano et al., 1998; Pace a Orcutt, 1981; Posch et al., 2015; Salcher et al., 2007; Šimek et al., 2000, 2001b, 2005, 2019; Zingel et al., 2007). Trend nárůstu diverzity bakterioplanktonu proměnlivě přes sezónu v hypertrofních rybnících byl zdokumentován v Ptacnik a Moorthi, (2010). Autoři se zajímali primárně o to, jak se složení bakteriální komunity měnilo dle revidovaného PEG-modelu, který uvažuje podmínky rozsáhle eutrofizovaných vod způsobené zvýšeným množstvím živin. Studie nastiňuje vhodnější podmínky v hypertrofních rybnících pro různorodé mikroby díky dostupnosti rozmanitého substrátu.

Rybníky jsou dle mých výsledků unikátní ve složení bakterioplanktonu. Jsou skupiny bakterií, jako např. *Archaea* a metanotrofové, které nejsou v dimiktických jezerních ekosystémech významné, ale v rybnících se dostávají do popředí, protože pro ně představuje živinově bohatý a často vířený sediment vítanou expanzi jejich habitatu (Yang et al., 2019).

Hustoty mikrobiálních komunit a složení se během sezony mění. V Rakouském horském jezeře Gossenköllesee byly *Archaea* pozorovány, že tvoří maxima v září a listopadu (krátce předtím než se vytvoří pokryv ledu). Minima byla zaznamenána v červenci, srpnu a lednu (Pernthaler et al., 1998). Ve výsledcích této práce byly maxima *Archaea* zaznamenána v srpnu (v 3 rybnících) a v červenci (v 2 rybnících – RD, DH). I v dalších odběrech všech rybníků tvoří *Archaea* svým zastoupením velké abundance poměrem k *Bacteria*. Kromě *Archaea* jsou překvapivě unikátní svým větším výskytem a zastoupením *Polynucleobacter* PnecB. Výskyt této podskupiny *Betaproteobacteriales* nebyl v míře, v jaké jsem ho pozorovala já dosud zaznamenaný v jiných pracích. Jelikož zatímco v jezeře Mondsee tato skupina (zahrnující dnes dva druhy) tvořila maximálně $0,171 \times 10^6$ buněk⁻¹ nebo 6,4 % ze všech buněk obarvených DAPI (Wu a Hahn, 2006), v rybnících byla maxima $2,1 \times 10^6$ buněk⁻¹ (ZB, 10.4. 2017) a 11,8% (RD, 24.10.2016). To je pravděpodobně způsobeno faktem, že dosud byly v hypertrofních vodách přehlíženy a tudíž neexistují publikované práce, které by se zaměřily podrobněji na výzkum *Polynucleobacter* PnecB v hypertrofních vodách, kde se dle mých výsledků ukázal významným.

Výběr rybníků v této práci byl původně uzpůsoben k teoretickému rozdělení rybníků do dvou kategorií, jejichž rozdělení se prakticky nepotvrdilo – rybníky, v nichž proběhne fáze čiré vody, a rybníky s turbidním stavem. Výběr se řídil primárně složením rybí obsádky. Při tomto výběru představuje RD modelový rybník pro fázi čiré vody a pro turbidní stav DH. U nich byl rozdíl pravděpodobný a splnil očekávání. Reálná obsádka dalších rybníků byla u některých z nich ve skutečnosti odlišná od plánované (uvedené v Tabulce 1). Proto téměř všechny vybrané rybníky byly hustě obsazeny planktivorními rybami a v závěru jsou si velmi podobné. Všechny rybníky jsou živinově bohaté s velkým množstvím organiky (DOC) a byl na nich po většinu sezóny přítomen vodní květ.

6.2.1 Odlišnosti mezi rybníky Rodem a Dehtářem

Rozdíly ve složení a dynamice bakteriální společenstev dvou různých rybníčních ekosystémů byly testovány mezi Rodem s fází čiré vody a turbidním Dehtářem. Rod se výrazně lišil v rybí obsádce a přítomnosti, množství a velikosti zooplanktonu, jejichž vlivem je potlačen rozvoj fytoplanktonu a tudíž probíhá fáze čiré vody, zatímco v Dehtáři tomu tak není.

Částečné odlišnosti mohou být dány tím, že každý z těchto dvou rybníků je v jiné rybníční soustavě. Rybníky v Třeboňské rybníční soustavě jsou charakteristické více huminovými zdroji DOC a menší vodivostí v porovnání s Českobudějovickem (DH) s vyšší vodivostí. *Bacterioidetes* dosahovaly vyšších hodnot na Třeboňsku (RD). Vyšla negativní korelace skupiny *Bacterioidetes* (Tab. S2), která říká, že je jich tím více, čím menší je vodivost. To od sebe průkazně odlišuje rybníky na základě vodivosti (Obr. 12 – b)

Podle našich výsledků se fáze čiré vody objevuje v Rodu nejen na jaře, ale i na podzim a hraje při srovnávání s DH zásadní roli v obou těchto ročních obdobích. Během nich se v RD podílejí velké perloočky na významné redukci veškerého bakterioplanktonu. Probíhá velkou část roku fáze čiré vody. Důkazem je průkazně vyšší průhlednost RD oproti DH (Obr. 12 – b). V grafech počet buněk bakterií v RD při fázích čiré vody výrazně klesá (Obr. 4 a 11), což podporuje předpoklad uvedený v Sommer et al. (2012).

V DH ve srovnání s RD během léta početně klesla skupina *Actinobacteria* a po celou sezónu byla podobně významná skupina *Betaproteobacteriales*, zatímco v Rodu byly naopak velké abundance *Actinobacteria* (Obr. 4). V obou ročních obdobích, kdy probíhá fáze čiré vody, podle mých výsledků rapidně klesají v RD počty bakterií, zatímco v DH přetrvává podobný stav po celou sezónu a byly zaznamenány víceméně podobné hodnoty celkového počtu bakterií i jejich zastoupení (Obr. 4). Pokud perloočky vše včetně bakterií odfiltrují, zůstanou pouze rezistentní nejmenší typy bakterií (Corno et al., 2008). Tento jev je vidět na Obrázku 4, kdy v RD převažují *Actinobacteria* ztelně po fázi čiré vody, zatímco v DH jsou v malém zastoupení a jsou zde ve stejné míře anebo v naprostém minimu na rozdíl od jiných skupin bakterií. Malý počet *Actinobacteria* v DH značí, že je tato skupina potlačována pravděpodobně svými konkurenty (Salcher, 2014). Výzkum na oligomezotrofním alpínském jezeře v Salcher et al. (2010) ukazoval maxima *Actinobacteria* na jaře ve spojení s heterotrofními bičíkovci a dále při podzimním vodním květu. Další odlišností v těchto dvou rybnících je výskyt *Alphaproteobacteria*. V RD byla zachycena tato skupina přes léto v relativně velkých abundancích (červenec – 805×10^3 buněk ml^{-1} , srpen – $1\,706 \times 10^3$ buněk ml^{-1}) zatímco v DH byla zachycena významněji na jaře a na podzim a pouze v rozmezí $507\text{--}798 \times 10^3$ buněk ml^{-1} (Obr. 4).

Nicméně přes velké odlišnosti DH i RD, je mezi nimi na první pohled patrná shoda ohledně skupiny *Verrucomicrobia*, která se objevuje během letních měsíců, jak je patrné na Obrázku 4 a 11. V jarních a podzimních měsících nebyl zaznamenán ztelný výskyt této

skupiny ani v jednom z těchto dvou rybníků. Jejich spojení s letními vodními květy je popsáno v Eiler and Bertilsson (2004). Podobná přítomnost *Verrucomicrobia* byla pozorována v nádržích Tous a Amadorio ve Španělsku (Cabello-Yeves et al., 2017). Na druhou stranu *Verrucomicrobia* byly detekovány ve všech ročních obdobích a pomocí FISH v huminovém jezeře ve studii Arnds et al. (2010). Procentuální zastoupení se lišily se v závislosti na více či méně huminovém podloží v různých místech jezera a také během ročních období, avšak byly stabilní v prokysličených, sezónně anoxických vodách. Definice sezónně anoxických vod se dá vztáhnout na rybníky. V De Figueiredo et al. (2007) měla skupina *Verrucomicrobia* zase spojení s oligotrofními nádržemi a nízkým pH.

6.3 Chování jednotlivých skupin bakterioplanktonu v hypertrofním prostředí

Je známo, že určité bakterie umí čelit vysokému predančnímu tlaku (Hahn et al., 1999). Strategie, které jim to umožňují jsou například morfologické adaptace díky kterým uniknou rozmanitým predátorům – to zahrnuje jejich morfologické změny směrem k menším nebo větším velikostem buněk, formaci agregátů a mikrokolonií (Jürgens a Matz, 2002; Salcher et al., 2005).

V rybnících je možné pozorovat sezónní distribuci linie *Actinobacteria* Ac1 (Obr. 4 a 5), jako je zmíněno v Salcher, (2014). Tato skupina má opakující se sezónní vzorec chování s populačním maximem na jaře nebo na podzim. Jarní maximum se vyskytuje krátce po vymizení vodního květu fytoplanktonu (Allgaier a Grossart, 2006; Salcher et al., 2010). *Actinobacteria* jsou obecně známí specialisté na obranu. Mají speciální adaptace na zvýšený predanční tlak, například to, že jsou velmi malé (Salcher, 2014). I pokud jsou heterotrofními bičíkovci sežrány, nemusí být stráveny, jelikož mají odolnou gram-pozitivní buněčnou stěnu (Tarao et al., 2009). Kromě toho profitují ze zdrojů uhlíků, které jsou uvolňovány od jejich nerezistentních kompetitorů (Beier a Bertilsson, 2011; Eckert et al., 2013). Jejich nárůst je díky tomu možné spojit s velkým predančním tlakem. V návaznosti na fakt, že v rybnících hrají důležitější roli nálevníci (Šimek et al., 2019), moje data ukázaly pozitivní korelaci *Actinobacteria* (Ac1852) s predací nálevníky (Grazing-CIL) – $\rho = 0,582$ ($p < 0,001$); detaily v příloze Tabulka S2. Čím je tento tlak větší, tím více je procentuálního zastoupení skupiny *Actinobacteria* Ac1, podobně jako v Hahn et al. (1999).

Některé bakterie používají jako účinnou strategii proti bičíkovcům tvar a velikost jejich těla (například podobu vláken) (Pernthaler, 2005). Tuto vlastnost mají zejména někteří zástupci ze skupiny *Proteobacteria* a *Bacteroidetes* (Salcher, 2014). Díky tomuto zvýhodnění někteří zástupci profitují v době největší predace heterotrofními bičíkovci a nálevníky podobně jako *Actinobacteria* (Eckert et al., 2012; Jürgens and Stolpe, 1995). Mohou i přímo profitovat z recyklovaného materiálu uvolňovaného jinými mikroby a z exudátů řas (např. karbohydráty) (Schauer et al., 2006). *Bacteroidetes* jsou podle literatury významní zástupci během vodních květů, a zástupci mohou být specializovaní na rozdílné exudáty (Newton et al., 2011b). Ve studii Salcher et al. (2010) z alpského oligomezotrofního jezera zástupci *Bacteroidetes* preferovali anoxické zóny hypolimnia. To může být dalším vysvětlením jejich spojení s vodními květy právě kvůli anoxii, jež v takových podmínkách vzniká (Reynolds,

2006). U třech rybníků byly zaznamenané zvýšené počty *Bacteroidetes* během letních květů, jedná se o rybníky RD, KL a PT. Jedná se právě o rybníky ve stejné rybníční soustavě – třeboňské. Jejich zvýšený výskyt je pravděpodobně spojen s tím, že se jedná o odlišnou rybníční soustavu a nedá spojovat pouze se samotným výskytem vodního květu, což podporuje i fakt, že u dalších 7 rybníků není možné prokázat výrazně vyšší výskyt společně s vodními květy. *Bacteroidetes* se v nich vyskytovali v malých nepatrných množstvích anebo v odběrech mimo sezónu vodního květu. Ve zmíněných rybnících se ale *Bacteroidetes* vyskytovaly přes léto (s výjimkou KL, tam byl stabilní počet *Bacteroidetes* všechny 3 odběry v sezóně) a ve zbylých ročních obdobích razantně méně, anebo vůbec. Vzhledem k výsledkům korelací (Tab. S2) je jedním vysvětlením, které se nabízí u třeboňských rybníků menší vodivost. Ta jim pravděpodobně vyhovuje, zatímco na Českokobudějovicku jejich vyšší výskyt (jarní KV, jarní PV) ovlivňují jiné faktory.

Skupina *Alphaproteobacteria* představuje ve výsledcích v několika málo odběrech jednu z výraznějších skupin. Sonda, která byla použita pro detekci zahrnuje několik ekologicky odlišných typů. Zachycuje rychle rostoucí oportunisty, zároveň drobné *Alphaproteobacteria* například linii LD12 a metanotrofy. Metanotrofové ze skupiny *Alphaproteobacteria* byly detekovány ale posléze i specifickou sondou určenou pouze pro ně. Výsledky ukázaly korelaci ($\rho = 0,645$, $p < 0,001$; detaily v příloze Tab. S2) heterotrofních bičíkovců s % DAPI *Alphaproteobacteria*. Kvantitativní práce založené na FISH shodně ukázaly, že *Alphaproteobacteria* alespoň na úrovni třídy jsou rezistentní k predaci (Jürgens, 2002; Salcher et al., 2005; Šimek et al., 1999). Takže jejich abundance jako důsledek predace heterotrofními bičíkovci mohou stoupat (Comte et al., 2006; Langenheder a Jürgens, 2001). Podskupina drobných *Alphaproteobacteria* LD12 podle Salcher et al. (2011 a 2014) mívají maxima v létě, pokud není příliš výrazná biomasa fytoplanktonu a zároveň jsou dostupné živiny. LD12 může tvořit v mých vzorcích výraznější část zachycených *Alphaproteobacteria*, protože jsou běžnými zástupci sladkých vod (Heinrich et al., 2013). LD12 přijímají účinně aminokyseliny při nízkých zdrojích, takže svým životním stylem by se daly přirovnat k mikrobům, které jsou adaptovány rovněž na oligotrofní podmínky (Salcher et al., 2011). Zrovna jejich výskyt ale podle literárních zdrojů není pravděpodobně paralelní s výskytem heterotrofních bičíkovců (Newton et al., 2011b; Salcher, 2014).

Třída *Gammaproteobacteria* je běžnou skupinou vyskytující se ve sladkých vodách v malých abundancích (Newton et al., 2011a). Vyšší zastoupení *Gammaproteobacteria* bylo zaznamenáno v odborných článcích většinou pouze když byla celková biomasa fytoplanktonu

nižší (Newton et al., 2011a; Peura et al., 2012). Tento jev indikuje, že jejich růst je spouštěn recyklovanými nebo alochtonními zdroji rozpuštěného organického uhlíku (DOC) (Newton et al., 2011b). V mých výsledcích se vyskytují v případech všech rybníků v malých nebo žádných množstvích s dvěma největšími maximy okolo $0,2 \times 10^6$ buněk ml^{-1} (červencový RD a srpnový KV) a také okolo $0,1 \times 10^6$ buněk ml^{-1} (v srpnovém RD a listopadovém BR), s průměrnou hodnotou $0,04 \times 10^6$ buněk ml^{-1} . Červencový RD a srpnový KV v němž má tato skupina maxima, má v tomto období vodní květ fytoplanktonu, a naopak ve fázi čiré vody nebyly zaznamenány. RD například měl nulovou hodnotu *Gamaproteobacteria* v květnu a pouze 9×10^3 buněk ml^{-1} v září ($0,009 \times 10^6$ buněk ml^{-1}), kdy probíhala fáze čiré vody.

Velmi zajímavou skupinu tvoří tzv. oportunistické bakterie (neboli konkurenční specialisté), což jsou ve většině případů různí zástupci větší skupiny *Betaproteobacteriales*. Mnoho zástupců *Betaproteobacteriales* jsou oblíbenou potravou heterotrofních bičíkoviců (Hahn et al., 2012). Negativní korelace této skupiny s heterotrofními bičíkovci byla zaznamenána například ve výzkumu oligomezotrofního alpínského jezera Piburger See v Salcher et al (2010). Podle mých výsledků v rybnících jsou oblíbenou potravou nálevníků a potvrzuje to negativní korelace *Betaproteobacteriales* (Beta42a) s predací nálevníky (Grazing-CIL) – $\rho = -0,453$ ($p = 0,007$); detaily v příloze Tabulka S2. Jinak obecně v mých vzorcích byla tato skupina jednou z výraznějších a proto jsem se také zaměřila na specifické podskupiny.

Limnohabitans spp. jsou druhy spadající pod *Betaproteobacteriales* a mají v temperátních podmínkách roční opakovaně objevující se maxima během jarního maxima fytoplanktonu (Eckert et al., 2012; Šimek et al., 2008). To je vidět na mých výsledcích, nejvýrazněji při pohledu skupinu RBT, kdy je znatelný nárůst na jaře, ale také na podzim (Obr. 6 a 7). *Limnohabitans* jsou asi nejznámější oportunistické bakterie. O oportunistických bakteriích s vysokými rychlostí růstu je také známo, že dosahují vysokých koncentrací i když jsou zároveň rapidně odežírány (Salcher et al., 2007).

Ve vzorcích byl zjišťován *Limnohabitans* LimA. *Limnohabitans* LimA má rozdílné preference a tak není příliš očekáván v eutrofních rybnících (Shabarova et al., 2017). Preferuje na rozdíl od ostatních druhů *Limnohabitans* allochtonní organické látky (Shabarova et al., 2017). Typickým stanovištěm jsou průtočné tůň/přehradý (Shabarova et al., 2017). Proto také v pracích z hypetrofního prostředí na něj nebyla zaměřena pozornost. Já jsem na něj ale pozornost zaměřila a zajímal mě jeho výskyt. Předpokladem bylo, že skupina nebude

majoritní, ale spíše minoritní. To se také potvrdilo. V mých vzorcích se vyskytoval *Limnohabitans* LimA v rozmezích $0-120 \times 10^3$ buněk ml^{-1} ; (průměr 38×10^3 buněk ml^{-1} , SD = 67) (detaily Tab. 5). Má několik zajímavých maxim v dubnovém odběru PT, srpnovém RK a BR, v listopadovém PV, RK a BR (Obr. 6 a 7). Ve studii Shabarova et al. (2017) byl pozorován v rozmezí $0-1480 \times 10^3$ buněk ml^{-1} . Výskyt v Římově a jezeře Zurich byl výrazně menšího rozsahu – v Římově v rozmezí $0-110 \times 10^3$ buněk ml^{-1} a v jezeře Zurich v rozmezí $0-360 \times 10^3$ buněk ml^{-1} (Shabarova et al., 2017).

Polynucleobacter PnecC patří mezi drobné bakterie, které se vyskytují běžně ve vodním sloupci sladkovodních habitatů (Wu and Hahn, 2006). Někteří zástupci *Polynucleobacter* PnecC se relativně pomalu množí, jsou více pasivní a s oblibou spásány heterotrofními bičíkovci (Newton et al., 2011b). To, že jsou atraktivní jako potrava pro heterotrofní bičíkovce mají podobné s *Polynucleobacter* PnecB (Hahn et al., 2012). Podle výsledků této práce nemá výskyt *Polynucleobacter* PnecC spojení s vodními květy, zdá se být spíše náhodný a zcela určitě závislý na specifických a mně neznámých faktorech. I v literatuře není spojován s vodními květy a pravděpodobně vůbec nevyužívá exudáty z dalších mikrobů (Hahn et al., 2012). V mých výsledcích (Obr. 6 a 7) se objevoval v létě a na podzim některých rybníků – srpnový PT, BR a ZB, listopadový PV. Jeho výskyt byl významný ale i v dubnovém odběru ZB. Studie (Jezbera et al., 2011) zkoumala tento taxon podrobně a zjistila, že ekologicky je velmi variabilní a jeho niky velmi rozrůzněné. Jeho preferencí může být rozdílné pH, vodivost, rozpuštěný organický uhlík (DOC) i koncentrace kyslíku ve vodě (Jezbera et al., 2011).

Hahn a jeho kolegové zkoumali populace *Polynucleobacter* velmi podrobně ve sladkovodním rybníku (Hahn et al., 2005). Došli k závěru, že populace *Polynucleobacter* měly extrémně nízkou vnitrodruhovou diverzitou a nerovnoměrně dominovali v komunitě bakterioplanktonu na zkoumaném stanovišti (Hahn et al., 2005). Tato nízká vnitrodruhová diverzita je v silném kontrastu s vysokými vnitrodruhovými diverzitami v populacích mořských bakterií (Hahn et al., 2016). Co se týče poznatků studie, je možné se ztotožnit s výrokem, že klast *Polynucleobacter* nerovnoměrně dominoval ve sladkovodní komunitě skupiny *Betaproteobacteriales* (to se týká hlavně *Polynucleobacter* PnecB). Druh bakterií *Polynucleobacter* PnecB dosahoval úctyhodných zastoupení (průměr = 418×10^3 buněk ml^{-1} , SD=383) (Obr. 6 a 7) ve všech odběrech, i v těch, kde bylo celkově zjištěno málo všech bakteriálních buněk ve vodním sloupci.

Podskupina *Methylopumilus* (*Methylophilaceae* - *Betaproteobacteriales*) je svou životní strategií potravní specialista (metylotrof). Zástupci této skupiny se vyskytují v hypolimniu, kde jsou zdroje jednoduhlíkatých látek (metylaminy, metanol...) (Salcher et al., 2015). Většinou jsou tedy detekovány až za zónou primárních producentů, spíše v sedimentu a jen ojediněle ve vodním sloupci (Salcher et al., 2011a). V rybnících je situace jiná, jelikož se jedná o polymiktické nádrže, které jsou neustále promíchávány. V Tabulce S2 je patrná ne příliš silná pozitivní korelace predace nálevníků (Grazing-CIL) s *Methylopumilus planktonicus* (LD28) – ($\rho = 0,471$, $p < 0,01$). *M. planktonicus* se zdá být z mých výsledků obecně početnější na přelomu léta a podzimu, nebo na podzim. Stejně tak literatura říká, že je pro ně nejvhodnější podzim (ale i zima), kdy dosahují svých maxim, protože využívají zdrojů objevujících se v těchto obdobích díky lepšímu promíchávání. Kromě toho jsou dobře adaptovány na chlad (Eiler et al., 2012). Podzimní maxima obvykle poukazují na to, že je přítomen listový opad, protože *M. planktonicus* obecně preferuje pro svůj růst rozkládající se biomasu obsahující hodně pektinu a ligninu (Halsey et al., 2012; Salcher et al., 2015). V mých výsledcích není možné spojit výskyt *M. planktonicus* s rozkladem listového opadu. V podzimních odběrech je sice výskyt *M. planktonicus* kolem $0,2 \times 10^6$ buněk ml^{-1} v několika rybnících, ale významnější drtivou převahu mají letní srpnové odběry BR ($1,3 \times 10^6$ buněk ml^{-1}), RK (1×10^6 buněk ml^{-1}) a KV ($0,5 \times 10^6$ buněk ml^{-1}) (konkrétně konec srpna - Obr. 6 a 7). Listový opad na většině rybníků není významný (až na RD a RK) v takové míře, aby společenstva významně ovlivňoval. Podle vzhledu lokality DH, která je rozlehlá a kde opad nehraje prakticky žádnou roli, přesto dosahuje *M. planktonicus* relativně vysoké hodnoty 5×10^6 buněk ml^{-1} . Naopak víme, že listový opad je v podzimních měsících významný u lesního rybníku RK, kde je kolem spousty topolů a to by se mělo projevit také na odběru, kde žádný významný nárůst patrný není. Výsledek mohlo ale ovlivnit, že při tomto konkrétním odběru, šlo o čerstvě napuštěný RK. Rovněž na rybníku RD je mohutný podzimní listový opad a přitom není v podzimním vzorku *M. planktonicus* v prakticky žádném zastoupení. Protože spojení s listovým opadem zdá se být velmi sporné, hledala jsem jiné možné vysvětlení vysokého nárůstu této skupiny metylotrófních bakterií. Přišla jsem na to, že nárůst je pravděpodobně výsledkem odumřelé biomasy vodního květu. Jednoduhlíkaté látky mohou být uvolňovány primárními producenty anebo mohou být výsledkem bakteriálního rozkladu karbohydrátů z řas (Milne et al., 1995; Sieburth and Keller, 1989). V rybnících BR, RK a KV ve kterých *M. planktonicus* dosahoval velkých abundancí se ve stejné době vyskytoval vodní květ sinice *Microcystis aeruginosa*. Podle Mou et al., (2013) jsou metylotrófní bakterie rodu

M. planktonicus zainteresované v rozkladu toxinu microcystinu, který je uvolňovaný těmito sinicemi tvořící vodní květy. To je s největší pravděpodobností také příčinou velkých maxim *M. planktonicus* v těchto odběrech společně v kombinaci s vhodnými podmínkami začínajícího podzimu. Nárůst je u většiny rybníků pravděpodobně spojený až s odumíráním vodního květu, jelikož v letních odběrech se nárůsty neobjevují i přes přítomný vodní květ *Microcystis aeruginosa*. Ovšem RD má relativně velké hodnoty *M. planktonicus* ($0,4 \times 10^6$ buněk ml⁻¹) v červencovém odběru, kdy zrovna byl přítomný vodní květ *Dolichospermum sp.* a *Microcystis aeruginosa* pouze v krajních v hodnotách.

6.4 Oxidace metanu

Rybníky jsou potenciaální významný zdroj metanu. Tato myšlenka pochází z předpokladu, že producenty metanu (metanogeny) bude zvýhodňovat mohutný sediment a v něm vyskytující se anoxie (Hanson a Hanson, 1996). Metan, následně uvolňovaný ze sedimentu, pak může být přímo ve vodním sloupci odbouráván (oxidován) metanotrofy, a tím se tak mohou snižovat jeho emise do atmosféry. Metanotrofové jsou běžnou součástí eutrofních ekosystémů a dle (Yang et al., 2019) hrají velmi důležitou roli právě v hypertrofních ekosystémech. Eutrofizace vede k velké nabídce substrátů právě pro metanotrofy, kdy kromě uhlíku ve formě metanu se mohou ve vodě vyskytovat i v dalších formách, uvolňovanými fytoplanktonem, nebo mohou být výsledkem bakteriálního rozkladu uhlohydrátů řas (Milne et al., 1995; Sieburth a Keller). Metanotrofové tak mohou vykazovat vyšší aktivitu (tj. oxidaci metanu) za situace, kdy je pro ně metan snadno dostupný, na což patrně poukazuje zjištěná pozitivní korelace s vodním květem (Cyano mg/l): $\rho = 0,794$, $p < 0,001$ (podrobnosti v příloze Tab. S2). Svou roli zde samozřejmě hraje vedle vodních květů i míra trofie, která je s výskytem vodního květu úzce spojena.

Velká abundance metanotrofů byla zaznamenána v obou jezerech ze studie Yang et al., (2019), kde jedno mělké jezero bylo eutrofní a druhé mezotrofní. V obou byly nalezeny skupiny I. a II. typu metanotrofů, ale v eutrofním jezeře byla převaha metanotrofů II typu (MOB II), jež se řadí do skupiny *Alphaproteobacteria*. Metanotrofové I. a II. typu se liší v ekologické strategii, kdy metanotrofové II. typu (*Alphaproteobacteria*) jsou K-stratégové, zatímco *Gammaproteobacteria* (typ I) jsou r-stratégové, tedy specialisté, kteří upřednostňují podmínky při kterých se ve vodním sloupci vyskytuje nižší koncentrace metanu, což je jejich

strategickou výhodou oproti MOB II (Madigan a Brock, 2012). Tato fakta opisuje i situace zjištěná v mých vzorcích, jelikož K-stratégové s dlouhou životností a pomalým růstem jsou zastoupeny více než ty, které odpovídají na konkrétní výkyvy, rychle narostou a přetrvávají pouze krátkou dobu (Knief, 2015). Abundance metanotrofů II. typu se kromě toho podle mých výsledků zvětšuje s tím, jak postupuje sezóna.

6.5 Metodické problémy

Použití metody CARD-FISH má své výhody ale také své nevýhody a problémy, se kterými se můžeme potýkat při jejím použití (Bouvier a Del Giorgio, 2003). Nejběžnějším problémem je neúplné pokrytí obecných skupin bakterií sondou pro ně určenou, a naopak širší rozsah sond, jak obecných tak více specifických než je rozsah bakteriální skupiny, pro kterou je použita. Specifické sondy se vlivem širšího rozsahu mohou překrývat. Tento fakt může ve výsledcích působit určité nesrovnalosti. Úzké zaměření sond může být zase důvodem zachycení menšího počtu buněk, než jaký bychom očekávali.

Podle literatury (Bouvier a Del Giorgio, 2003; DeLong et al., 1989; Moter a Göbel, 2000) součet domén *Bacteria* (hybridizovanou sondou Eub I-III) a *Archaea* (hybridizovanou sondou Arc915) by se měl blížit 100 %. Přesto výsledky některých prací tomuto přesvědčení úplně neodpovídají jako například v Coci et al. (2015), Pernthaler et al. (2002b) a Wilhartitz et al. (2007). *Bacteria* bývají ve studiích zachycovány metodou FISH v širokém rozmezí 1 % - 100 % celkového DAPI (Allgaier a Grossart, 2006; Bouvier a Del Giorgio, 2003).

Zásadou je rovněž, že relativní hodnoty obecné skupiny *Bacteria* (hybridizovanou sondou Eub I-III) představující doménu, by měl být vždy vyšší než skupin hybridizovaných sondami detekující na úrovni kmenů (např. součet Bet42a, Ver46, ALF068 a CF968) jako například ve výsledcích Šimek et al. (2014). Stejně tak hodnoty konkrétních klastrů (například klastr RBT hybridizovaný sondou R-BT065), by měl tvořit pouze nějaké procento větší skupiny *Betaproteobacteriales* (Šimek et al., 2014), a součet všech detekovaných nejběžnějších klastrů by se měl pro úplnost a důslednost blížit opět hodnotám 100 % celku *Betaproteobacteriales*.

V kulturách existuje jasné spojení rychlosti růstu buněk a jejich kondice vzhledem k následnému obsahu rRNA, které může být poté zachyceno oligonukleotidovou sondou a proto mohou být zachycené počty někdy nižší v závislosti na prostředí ve kterém jsou druhově totožné organismy detekovány (DeLong et al., 1989; Moter a Göbel, 2000). Spojitost

detekce pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace s bakteriální aktivitou, poukazuje na to, že mohou být bakterie zachycovány sondami pro ně určenými odlišně v ekosystémech s rozdílnou trofií a složením komunit, vzhledem k aktivitě/neaktivitě buněk (Karner a Fuhrman, 1997). Ve studii Bouvier a Del Giorgio (2003) vycházel opakovaně malý počet hybridizovaných buněk sondou Eub I-III v sedimentech sladkovodních ekosystémů v rozsahu 0-49% a 50% pak ve sladkých vodách. Mým problémem bylo, že relativní čísla výsledků *Bacteria* (hybridizovanou sondou Eub I-III) a skupiny *Archaea* (hybridizovanou sondou Arc915) se jen v pár případech alespoň blížil 100 % celkového DAPI. Navíc *Bacteria* (hybridizované sondou Eub I-III) nedosahovaly v mnoha vzorcích ani 50 % celkového DAPI, a domnívala jsem se, že zbytek by měl být *Archaea*, což se po následné hybridizaci sondou Arc915 nepotvrdilo – i když jejich počty byly výrazně vyšší ve srovnání s hlubokými oligotrofními ekosystémy (Coci et al., 2015; Tischer et al., 2012; Wilhartitz et al., 2007). Nicméně hledáním v literatuře jsem zjistila, že podobným způsobem s průměrem okolo 50 % DAPI vycházely proporčně *Bacteria* (zachycené sondou Eub I-III) v dalších studiích (Bouvier and Del Giorgio, 2003; Glöckner et al., 1996). Z toho důvodu se zdají být nízké počty hybridizovaných buněk v rybnících (kolem 40-50% DAPI) pravděpodobně na místě. Vlivem častého víření mohutných rybníčních sedimentů se může ekosystém rybníku podobat typům bakteriálních společenstev sedimentů zmíněných ve studii Bouvier a Del Giorgio (2003). Za malým zachycením buněk *Bacteria* (sondou Eub I-III) může stát nízká hybridizovatelnost buněk. Bakteriální buňky zachycené sondami na úrovni kmenů vykazovaly mnohem vyšší míru hybridizovatelnosti. Ve 13 vzorcích proto nastala situace kdy součet nahybridizovaných skupin kmenů byl vyšší než celkový počet buněk zachycených obecnou sondou Eub I-III (Obr. 4 a 5). Jiným vysvětlením, které se ještě nabízí je to, že nízký počet hybridizovaných bakterií v poměru k celku DAPI byl způsoben započítáním velkého množství virových částic do % DAPI.

Ani některé specifické skupiny bakterií zjišťované v této práci metodou CARD-FISH se neobešly v determinaci bez určitých odchylek od standartu. Linie ac1 z kmenu *Actinobacteria* může představovat více než 50 % mikrobů ve vodním sloupci (Salcher, 2014). V mých výsledcích jsou počty nižší, obdobně jako například v Allgaier and Grossart (2006). Důvodem může být ale kromě jejich absence rovněž nízká hybridizovatelnost sondou pro ac1 *Actinobacteria* (Glöckner et al., 2000) – patrná hlavně u KV a DH (Obr. 4) v letních odběrech. Dalším důvodem může být, jak je zmíněno výše, rovněž to, že sonda nemá dost široký rozsah. Kromě toho vyšší výsledky v DAPI způsobující odlišný poměr mohou být

způsobeny také započítáním velkého množství virových částic. Navíc malé *Actinobacteria*, protože bývají početně významné naznačují zde svou možnou špatnou zachytitelností, že mohou být právě tím důvodem, proč jsou i zachycená procenta všech *Bacteria* menší.

U skupiny *Betaproteobacteriales* se podařilo zachytit velkou část populací jednotlivých podskupin. Stále ale není kompletní. Na obrázcích S3 a S4 v příloze jsou vidět zachycená procenta vybraných podskupin *Betaproteobacteriales* společně s informací o jejich procentuálním zastoupení získaným hybridizací sondou Bet42a uvedenou v % nad každým sloupcem (Ta pro nás představuje 100 % *Betaproteobacteriales*). Malá míra hybridizace skupiny bakterií *Betaproteobacteriales* (Obr. S3 a S4) může být způsobena nekultivovanými druhy ze širší skupiny *Burkholderiaceae*, které jsou mimo determinaci. Ve studii Qin et al. (2016) týkající se mikrobiálního složení v rybníku s kapry se také potýkali se zastoupením neklasifikovanými *Comamonadaceae* (tj. starší pojmenování pro *Burkholderiaceae*) zjištěného sekvenacemi.

7 Závěr

Hypertrofní rybníky jsou složením a dynamikou bakteriálních společenstev unikátními ekosystémy částečně přirovnatelnými k ekosystémům hypertrofních mělkých jezer.

Přestože se obecně stejné druhy prokaryot vyskytují běžně ve vodách různé trofie, hypertrofní rybníky se od oligotrofních až eutrofních jezer/nádrží liší primárně větší významností některých skupin bakterií: *Archaea*, *Methylopumilus*, *Verrucomicrobia*, *Polynucleobacter* PnecB a metanotrofy I a II typu.

V detailu se zkoumané lokality lišily mezi sebou proměnami (změny početnosti, množství) jednotlivých skupin bakterioplanktonu během sezóny, avšak bylo možné pozorovat sezónní trendy.

Výrazné rozdíly ve složení a dynamice bakteriálních společenstev byly mezi Rodem s fází čiré vody a turbidním Dehtářem. V Rodu probíhá fáze čiré vody nejen na jaře, ale i na podzim, což se projevovalo snížením celkového počtu bakteriálních buněk.

Dehtář má v sezóně stabilní počty MOB, zatímco Rod díky velkým perloočkám vykazuje velké výkyvy k nízkým hodnotám na jaře a na podzim, ale s výrazně vyšším výskytem MOB v letních měsících.

Odlišnost dvou rybníčních soustav třeboňské a českobudějovické při uvažování všech rybníků ukázaly výrazné rozdíly v dynamice a početnosti skupiny *Bacteroidetes*. Rybníky v třeboňské rybníční soustavě s nižší vodivostí měly výrazně větší početnosti této skupiny.

Jedna z hlavních charakteristik mikrobiálního společenstva mělkých hypertrofních nádrží je poměrně velká abundance skupiny *Archaea*. Proto v budoucích pracích by bylo dobré identifikovat jednotlivé skupiny *Archaea*, které se vyskytují v hypertrofních vodách. Stejnou pozornost do budoucna by vyžadovaly i skupiny metanotrofů, kteří mají v rybnících zásadní místo. Rovněž by se budoucí studie mohly zaměřit na podrobnější determinaci, zmapování výskytu a odůvodnění výskytu skupiny *Verrucomicrobia*.

8 Použitá literatura

- Acinas, S. G., Ferrera, I., Sarmiento, H., Díez-Vives, C., Forn, I., Ruiz-González, C., et al. (2015).** Validation of a new catalysed reporter deposition- fluorescence in situ hybridization probe for the accurate quantification of marine Bacteroidetes populations. *Environ. Microbiol.* 17, 3557–3569
- Allgaier, M., and Grossart, H. P. (2006).** Diversity and seasonal dynamics of Actinobacteria populations in four lakes in Northeastern Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3489–3497
- Amann, R. I., Zarda, B., Stahl, D. A., and Schleifer, K. H. (1992).** Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3007–11
- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., et al. (1998).** The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396
- Arnds, J., Knittel, K., Buck, U., Winkel, M., and Amann, R. (2010).** Development of a 16S rRNA-targeted probe set for Verrucomicrobia and its application for fluorescence in situ hybridization in a humic lake. *Syst. Appl. Microbiol.* 33, 139–148
- Auguet, J.-C., and Casamayor, E. O. (2008).** A hotspot for cold crenarchaeota in the neuston of high mountain lakes. *Environ. Microbiol.* 10, 1080–1086
- Azevedo, A. M., Martins, V. C., Prazeres, D. M., Vojinović, V., Cabral, J. M., and Fonseca, L. P. (2003).** Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.* 9, 199–247
- Bai, Y., Shi, Q., Wen, D., Li, Z., Jefferson, W. A., Feng, C., et al. (2012).** Bacterial communities in the sediments of Dianchi lake, a partitioned eutrophic waterbody in China. *PLoS One* 7, e37796
- Beaver, J. R., and Crisman, T. L. (1989).** The role of ciliated protozoa in pelagic freshwater ecosystems. *Microb. Ecol.* 17, 111–136
- Beier, S., and Bertilsson, S. (2011).** Uncoupling of chitinase activity and uptake of hydrolysis products in freshwater bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.* 56, 1179–1188
- Bell, T. A. S., Sen-Kilic, E., Felföldi, T., Vasas, G., Fields, M. W., and Peyton, B. M. (2018).** Microbial community changes during a toxic cyanobacterial bloom in an alkaline Hungarian lake. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 111, 2425–2440
- Biers, E. J., Sun, S., and Howard, E. C. (2009).** Prokaryotic genomes and diversity in surface ocean waters: Interrogating the global ocean sampling metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2221–2229
- Bomberg, M., Montonen, L., Münster, U., and Jurgens, G. (2008).** Diversity and function of archaea in freshwater habitats. *Curr. Trends Microbiol.* 4, 1–89
- Borrel, G., Lehours, A. C., Crouzet, O., Jézéquel, D., Rockne, K., Kulczak, A., et al. (2012).** Stratification of Archaea in the deep sediments of a freshwater meromictic lake: Vertical shift from methanogenic to uncultured Archaeal lineages. *PLoS One* 7, e43346

- Bouvier, T., and Del Giorgio, P. A. (2003).** Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 3–15
- Braak, T., and Smilauer, P. (1998).** CANOCO Release 4. Reference Manual and Users Guide to CANOCO for Windows: Software for Canonical Community Ordination
- Cabello-Yeves, P. J., Ghai, R., Mehrshad, M., Picazo, A., Camacho, A., and Rodriguez-Valera, F. (2017).** Reconstruction of diverse verrucomicrobial genomes from metagenome datasets of freshwater reservoirs. *Front. Microbiol.* 8, 2131
- Carrias, J. F., Amblard, C., and Bourdier, G. (1996).** Protistan bacterivory in an oligomesotrophic lake: Importance of attached ciliates and flagellates. *Microb. Ecol.* 31, 249–268.
- Coci, M., Odermatt, N., Salcher, M. M., Pernthaler, J., and Corno, G. (2015).** Ecology and distribution of Thaumarchaea in the deep hypolimnion of Lake Maggiore. *Archaea* 2015, 1–11
- Comte, J., Jacquet, S., Viboud, S., Fontvieille, D., Millery, A., Paolini, G., et al. (2006).** Microbial community structure and dynamics in the largest natural French lake (Lake Bourget). *Microb. Ecol.* 52, 72–89. doi:10.1007/s00248-004-0230-4
- Corno, G., Caravati, E., Callieri, C., and Bertoni, R. (2008).** Effects of predation pressure on bacterial abundance, diversity, and size-structure distribution in an oligotrophic system. *J. Limnol.* 67, 107–119
- Crump, B. C., Kling, G. W., Bahr, M., and Hobbie, J. E. (2003).** Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2253–68
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., and Wagner, M. (1999).** The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 434–444
- Daims, H., Nielsen, J. L., Nielsen, P. H., Schleifer, K. H., and Wagner, M. (2001).** In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5273–84
- De Figueiredo, D. R., Pereira, M. J., Moura, A., Silva, L., Bárrios, S., Fonseca, F., et al. (2007).** Bacterial community composition over a dry winter in meso- and eutrophic Portuguese water bodies. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59, 638–650
- de Wit, R., and Bouvier, T. (2006).** “Everything is everywhere, but the environment selects”; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environ. Microbiol.* 8, 755–8
- DeLong, E. F., Wickham, G. S., and Pace, N. R. (1989).** Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243, 1360–3
- Denisova, L. Y., Bel’kova, N. L., Tulokhonov, I. I., and Zaichikov, E. F. (1999).** Diversity of bacteria at various depths in the southern part of lake Baikal as detected by 16S rRNA sequencing. *Mikrobiologiya* 68, 547–556
- Duras, J., and Marcel (2015).** Rybníky a jakost vody, Sborník příspěvků odborné konference: Rybníky – naše dědictví i bohatství pro budoucnost (ČVUT v Praze), 76–89

- Duras, J., and Potužák, J. (2016).** Fishponds as heavily modified water bodies (HMWB): How to evaluate their ecological potential? in (Dresden), 157–158
- Eckert, E. M., Baumgartner, M., Huber, I. M., and Pernthaler, J. (2013).** Grazing resistant freshwater bacteria profit from chitin and cell-wall-derived organic carbon. *Environ. Microbiol.* 15, 2019–2030
- Eckert, E. M., Salcher, M. M., Posch, T., Eugster, B., and Pernthaler, J. (2012).** Rapid successions affect microbial N-acetyl-glucosamine uptake patterns during a lacustrine spring phytoplankton bloom. *Environ. Microbiol.* 14, 794–806
- Eiler, A., and Bertilsson, S. (2004).** Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environ. Microbiol.* 6, 1228–1243
- Eiler, A., Heinrich, F., and Bertilsson, S. (2012).** Coherent dynamics and association networks among lake bacterioplankton taxa. *ISME J.* 6, 330–342
- Eller, G., Stubner, S., and Frenzel, P. (2001).** Group-specific 16S rRNA targeted probes for the detection of type I and type II methanotrophs by fluorescence in situ hybridisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 198, 91–97
- Ghiran, I. C. (2011).** “Chapter 1: Introduction to fluorescence microscopy.” In: *Principles of fluorescence spectroscopy*, 1–26
- Glöckner, F. O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, J., Psenner, R., Trebesius, K., et al. (1996).** An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 403–406
- Glockner, F. O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denissova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A., et al. (2000).** Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5053–5065
- Gwynfryn Jones, J., and Simon, B. M. (1985).** Interaction of acetogens and methanogens in anaerobic freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 944–948
- Haas, E. (2002).** Structure and evolution of ribonuclease P RNA in Gram-positive bacteria. *Nucleic Acids Res.* 24, 4775–4782
- Hahn, M. W., Jezberová, J., Koll, U., Saueressig-Beck, T., and Schmidt, J. (2016).** Complete ecological isolation and cryptic diversity in Polynucleobacter bacteria not resolved by 16S rRNA gene sequences. *ISME J.* 10, 1642–1655
- Hahn, M. W., Kasalicky, V., Jezbera, J., Brandt, U., Jezberova, J., and Šimek, K. (2010).** *Limnohabitans curvus* gen. nov., sp. nov., a planktonic bacterium isolated from a freshwater lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 1358–1365
- Hahn, M. W., Koll, U., Schmidt, J., Huymann, L. R., Karbon, G., and Lang, E. (2018).** *Polynucleobacter hirudinilacticola* sp. Nov. and *polynucleobacter campilacus* sp. nov., both isolated from freshwater systems. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 2593–2601
- Hahn, M. W., Moore, E. R., and Höfle, M. G. (1999).** Bacterial filament formation, a defense mechanism against flagellate grazing, is growth rate controlled in bacteria of different phyla. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 25–35

- Hahn, M. W., Pöckl, M., and Wu, Q. L. (2005).** Low intraspecific diversity in a Polynucleobacter subcluster population numerically dominating bacterioplankton of a freshwater pond. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4539–4547
- Hahn, M. W., Scheuerl, T., Jezberová, J., Koll, U., Jezbera, J., Šimek, K., et al. (2012).** The passive yet successful way of planktonic life: Genomic and experimental analysis of the ecology of a free-living polynucleobacter population. *PLoS One* 7, e32772
- Halsey, K. H., Carter, A. E., and Giovannoni, S. J. (2012).** Synergistic metabolism of a broad range of C1 compounds in the marine methylotrophic bacterium HTCC2181. *Environ. Microbiol.* 14, 630–640
- Hanson, R. S., and Hanson, T. E. (1996).** Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* 60, 439–71
- Harms, G., Layton, A. C., Dionisi, H. M., Gregory, I. R., Garrett, V. M., Hawkins, S. A., et al. (2003).** Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 37, 343–351
- Hatzenpichler, R. (2012).** Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7501–7510
- Heinrich, F., Eiler, A., and Bertilsson, S. (2013).** Seasonality and environmental control of freshwater SAR11 (LD12) in a temperate lake (Lake Erken, Sweden). *Aquat. Microb. Ecol.* 70, 33–44
- Hiorns, W. D., Methé, B. A., Nierzwicki-Bauer, S. A., and Zehr, J. P. (1997).** Bacterial diversity in Adirondack Mountain lakes as revealed by 16s rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2957–2960
- Hule, M. (2000).** *Rybníkářství na Třeboňsku: historický průvodce*. Carpio, Třeboň, 250p
- Chistoserdova, L., Lapidus, A., Han, C., Goodwin, L., Saunders, L., Brettin, T., et al. (2007).** Genome of *Methylobacillus flagellatus*, molecular basis for obligate methylotrophy, and polyphyletic origin of methylotrophy. *J. Bacteriol.* 189, 4020–4027
- Jezbera, J., Jezberová, J., Brandt, U., and Hahn, M. W. (2011).** Ubiquity of *Polynucleobacter necessarius* subspecies *asymbioticus* results from ecological diversification. *Environ. Microbiol.* 13, 922–931
- Jurgens, K. (2002).** The impact of metazooplankton on the structure of the microbial food web in a shallow, hypertrophic lake. *J. Plankton Res.* 22, 1047–1070
- Jürgens, K., and Matz, C. (2002).** Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 81, 413–434.
- Jürgens, K., Skibbe, O., and Jeppesen, E. (1999).** Impact of metazooplankton on the composition and population dynamics of planktonic ciliates in a shallow, hypertrophic lake. *Aquat. Microb. Ecol.* 17, 61–75
- Jürgens, K., and Stolpe, G. (1995).** Seasonal dynamics of crustacean zooplankton, heterotrophic nanoflagellates and bacteria in a shallow, eutrophic lake. *Freshw. Biol.* 33, 27–38

- Kalff, J. (2002).** *Limnology: inland water ecosystems*. Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall, 592p
- Karner, M., and Fuhrman, J. A. (1997).** Determination of active marine bacterioplankton: A comparison of universal 16S rRNA probes, autoradiography, and nucleoid staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1208–1213
- Kasalický, V., Jezbera, J., Hahn, M. W., and Šimek, K. (2013).** The Diversity of the Limnohabitans Genus, an Important Group of Freshwater Bacterioplankton, by Characterization of 35 Isolated Strains. *PLoS One* 8, e58209
- Kasalický, V., Jezbera, J., Šimek, K., and Hahn, M. W. (2010).** Limnohabitans planktonicus sp. nov. and Limnohabitans parvus sp. nov., planktonic betaproteobacteria isolated from a freshwater reservoir, and emended description of the genus Limnohabitans. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2710–2714
- Kawasaki, N., Komatsu, K., Kohzu, A., Tomioka, N., Shinohara, R., Satou, T., et al. (2013).** Bacterial contribution to dissolved organic matter in eutrophic Lake Kasumigaura, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7160–8
- Knief, C. (2015).** Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on pmoA as molecular marker. *Front. Microbiol.* 6: 1346-1346
- Kojima, H., Tokizawa, R., Kogure, K., Kobayashi, Y., Itoh, M., Shiah, F. K., et al. (2014).** Community structure of planktonic methane-oxidizing bacteria in a subtropical reservoir characterized by dominance of phylotype closely related to nitrite reducer. *Sci. Rep.* 4, 5728
- Langenheder, S., and Jürgens, K. (2001).** Regulation of bacterial biomass and community structure by metazoan and protozoan predation. *Limnol. Oceanogr.* 46, 121–134
- Lindström, E. S., Kamst-Van Agterveld, M. P., and Zwart, G. (2005).** Distribution of typical freshwater bacterial groups is associated with pH, temperature, and lake water retention time. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8201–8206
- Llirós, M., Inceoğlu, Ö., García-Armisen, T., Anzil, A., Leporcq, B., Pigneur, L. M., et al. (2014).** Bacterial community composition in three freshwater reservoirs of different alkalinity and trophic status. *PLoS One* 9, 1–27
- Logares, R., Bråte, J., Bertilsson, S., Clasen, J. L., Shalchian-Tabrizi, K., and Rengefors, K. (2009).** Infrequent marine-freshwater transitions in the microbial world. *Trends Microbiol.* 17, 414–422
- Madigan, M. T., and Brock, T. D. (2012).** *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River, NJ : Pearson Prentice Hall, 10th ed, 1019p
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., and Schleifer, K. H. (1992).** Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 593–600
- Milne, P. J., Riemer, D. D., Zika, R. G., and Brand, L. E. (1995).** Measurement of vertical distribution of isoprene in surface seawater, its chemical fate, and its emission from several phytoplankton monocultures. *Mar. Chem.* 48, 237–244

- Moss, B. (2018).** *Ecology of Freshwaters: Man and Medium, Past to Future*. Blackwell Science, Oxford, 560p
- Moter, A., and Göbel, U. B. (2000).** Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 41, 85–112
- Mou, X., Lu, X., Jacob, J., Sun, S., and Heath, R. (2013).** Metagenomic Identification of Bacterioplankton Taxa and Pathways Involved in Microcystin Degradation in Lake Erie. *PLoS One* 8, e61890
- Nagaoka, S., Hamasaki, Y., Ishihara, S. I., Nagata, M., Iio, K., Nagasawa, C., et al. (2002).** Preparation of carbon/TiO₂ microsphere composites from cellulose/TiO₂ microsphere composites and their evaluation. *J. Mol. Catal. A Chem.* 177, 255–263
- Nakano, S. I., Ishii, N., Manage, P. M., and Kawabata, Z. (1998).** Trophic roles of heterotrophic nanoflagellates and ciliates among planktonic organisms in a hypereutrophic pond. *Aquat. Microb. Ecol.* 16, 153–161
- Neef, A. (1997).** Anwendung der in situ Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen. Ph.D. thesis. Technische Universität München, Munich, Germany
- Newton, R. J., Jones, S. E., Eiler, A., McMahon, K. D., and Bertilsson, S. (2011a).** A Guide to the Natural History of Freshwater *Lake Bacteria*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75:14–49
- Newton, R. J., Jones, S. E., Eiler, A., McMahon, K. D., and Bertilsson, S. (2011b).** Seasonal differences in bacterial community composition following nutrient additions in a eutrophic lake. *Environ. Microbiol.* 13, 887–899
- Ochman, H., and Wilson, A. C. (1987).** Evolution in bacteria: Evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J. Mol. Evol.* 26, 74–86
- Olsen, G. J., Woese, C. R., and Overbeek, R. (1994).** The winds of (evolutionary) change: Breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* 176, 1–6
- Op den Camp, H. J. M. M., Islam, T., Stott, M. B., Harhangi, H. R., Hynes, A., Schouten, S., et al. (2009).** Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia. *Environ. Microbiol. Rep.* 293–306
- Pace, M. L., and Orcutt, J. D. (1981).** The relative importance of protozoans, rotifers, and crustaceans in a freshwater zooplankton community. *Limnol. Oceanogr.* 26, 822–830
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., and Amann, R. (2002a).** Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3094–101
- Pernthaler, A., Preston, C. M., Pernthaler, J., DeLong, E. F., and Amann, R. (2002b).** Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 661–7
- Pernthaler, J. (2005).** Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 537–546

- Pernthaler, J. (2017).** Competition and niche separation of pelagic bacteria in freshwater habitats. *Environ. Microbiol.* 19, 2133–2150
- Pernthaler, J., Glöckner, F. O., Unterholzner, S., Alfreider, A., Psenner, R., and Amann, R. (1998).** Seasonal community and population dynamics of pelagic bacteria and archaea in a high mountain lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4299–4306
- Peura, S., Eiler, A., Hiltunen, M., Nykänen, H., Tirola, M., and Jones, R. I. (2012).** Bacterial and phytoplankton responses to nutrient amendments in a Boreal lake differ according to season and to taxonomic resolution. *PLoS One* 7, e38552
- Pinet, P. R. (2014).** *Essential invitation to oceanography*. 1 st ed. , eds. R. Isaacs and M. Bradbury Burlington, MA 01803: Jones & Bartlett Learning, LLC, an Ascend learning Company. 481p
- Posch, T., Eugster, B., Pomati, F., Pernthaler, J., Pitsch, G., and Eckert, E. M. (2015).** Network of interactions between ciliates and phytoplankton during spring. *Front. Microbiol.* 6, 1289
- Posch, T., Franzoi, J., Prader, M., and Salcher, M. M. (2009).** New image analysis tool to study biomass and morphotypes of three major bacterioplankton groups in an alpine lake. *Aquat. Microb. Ecol.* 54, 113–126
- Potužák, J., and Duras, J. (2014).** Influence of fishery management of fish ponds on eutrophication of a drainage basin – the role of nutrient retention in ponds. in *Books of Abstracts 8th Shallow Lakes Conference– Shallow Lakes in a Fast-Changing World* Antalya 12- 17 Oct. 2014, Conference Turecko
- Potužák, J., Hůda, J., and Pechar, L. (2007).** Changes in fish production effectivity in eutrophic fishponds - Impact of zooplankton structure. *Aquac. Int.* 15, 201–210
- Ptacnik, R., Moorthi, S. D., and Hillebrand, H. (2010).** *Hutchinson Reversed , or Why There Need to Be So Many Species*. In Guy Woodward, editor: *Advances in Ecological Research*, Vol. 43, Burlington: Academic Press, 2010, 1-43
- Qin, Y., Hou, J., Deng, M., Liu, Q., Wu, C., Ji, Y., et al. (2016).** Bacterial abundance and diversity in pond water supplied with different feeds. *Sci. Rep.* 6, 35232
- Rappe, M. S., Gordon, D. A., Vergin, K. L., and Giovannoni, S. J. (1999).** Phylogeny of actinobacteria small subunit (SSU) rRNA gene clones recovered from marine bacterioplankton. *Syst. Appl. Microbiol.* 22:106-112
- Reynolds, C. S. (2006).** *The ecology of phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press, 1 edition, 552p
- Salcher, M. M. (2014).** Same same but different: Ecological niche partitioning of planktonic freshwater prokaryotes. *J. Limnol.* 73, 74–87
- Salcher, M. M., Hofer, J., Horňák, K., Jezbera, J., Sonntag, B., Vrba, J., et al. (2007).** Modulation of microbial predator-prey dynamics by phosphorus availability: Growth patterns and survival strategies of bacterial phylogenetic clades. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 40–50
- Salcher, M. M., Neuenschwander, S. M., Posch, T., and Pernthaler, J. (2015).** The ecology of pelagic freshwater methylotrophs assessed by a high-resolution monitoring and isolation campaign. *ISME J.* 9, 2442–2453

- Salcher, M. M., Pernthaler, J., Frater, N., and Posch, T. (2011a).** Vertical and longitudinal distribution patterns of different bacterioplankton populations in a canyon-shaped, deep prealpine lake. *Limnol. Oceanogr.* 56, 2027–2039
- Salcher, M. M., Pernthaler, J., and Posch, T. (2010).** Spatiotemporal distribution and activity patterns of bacteria from three phylogenetic groups in an oligomesotrophic lake. *Limnol. Oceanogr.* 55, 846–856
- Salcher, M. M., Pernthaler, J., and Posch, T. (2011b).** Seasonal bloom dynamics and ecophysiology of the freshwater sister clade of SAR11 bacteria that rule the waves (LD12). *ISME J.* 5, 1242–1252
- Salcher, M. M., Pernthaler, J., Psenner, R., and Posch, T. (2005).** Succession of bacterial grazing defense mechanisms against protistan predators in an experimental microbial community. *Aquat. Microb. Ecol.* 38, 215–229
- Sekar, R., Pernthaler, A., Pernthaler, J., Posch, T., Amann, R. I., and Warnecke, F. (2003).** An Improved Protocol for Quantification of Freshwater Actinobacteria by Fluorescence In Situ Hybridization An Improved Protocol for Quantification of Freshwater Actinobacteria by Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2928–2935
- Shabarova, T., Kasalický, V., Šimek, K., Nedoma, J., Znachor, P., Posch, T., et al. (2017).** Distribution and ecological preferences of the freshwater lineage LimA (genus *Limnohabitans*) revealed by a new double hybridization approach. *Environ. Microbiol.* 19, 1296–1309
- Sherr, E., and Sherr, B. (1988).** Role of microbes in pelagic food webs: A revised concept. *Limnol. Oceanogr.* 33, 1225–1227
- Schauer, M., Jiang, J., and Hahn, M. W. (2006).** Recurrent seasonal variations in abundance and composition of filamentous SOL cluster bacteria (Saprospiraceae, Bacteroidetes) in oligomesotrophic Lake Mondsee (Austria). *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4704–4712
- Schauer, M., Kamenik, C., and Hahn, M. W. (2005).** Ecological differentiation within a cosmopolitan group of planktonic freshwater bacteria (SOL cluster, Saprospiraceae, Bacteroidetes). *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5900–5907
- Sieburth, J. M., and Keller, M. D. (1989).** Methylaminotrophic Bacteria in Xenic Nanoalgal Cultures: Incidence, Significance, and Role of Methylated Algal Osmoprotectants. 6, 383–395
- Sogin, M., Pace, B., Pace, N. R., and Woese, C. R. (1971).** Primary structural relationship of p16 to m16 ribosomal RNA. *Nat. New Biol.* 232, 48–49
- Sommer, U., Adrian, R., De Senerpont Domis, L., Elser, J. J., Gaedke, U., Ibelings, B., et al. (2012).** Beyond the Plankton Ecology Group (PEG) Model: Mechanisms Driving Plankton Succession. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43, 429–448
- Sommer, U., Gliwicz, Z., Lampert, W., and Duncan, A. (1986).** The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Arch. für Hydrobiol.* 4, 433–471

- Stahl, D. A., and Amann, R. I. (1991).** “Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics,” in *Sequencing and hybridization techniques in bacterial systematics*, eds. E. Stackebrandt and M. Goodfellow (Chichester, England: John Wiley and Sons), 205–248
- Stockert, J. C., and Blazquez-Castro, A. (2017).** *Fluorescence Microscopy in Life Sciences*. Bentham Science Publishers, 751p
- Šimek, K., Armengol, J., Comerma, M., Garcia, J. C., Kojecka, P., Nedoma, J., et al. (2001a).** Changes in the epilimnetic bacterial community composition, production, and protist-induced mortality along the longitudinal axis of a highly eutrophic reservoir. *Microb. Ecol.* 42, 359–371
- Šimek, K., Grujčić, V., Nedoma, J., Jezberová, J., Šorf, M., Matoušů, A., et al. (2019).** Microbial food webs in hypertrophic fishponds: omnivorous ciliate taxa are major protistan bacterivores. *Limnol. Oceanogr.* [In prep.]
- Šimek, K., Horňák, K., Jezbera, J., Mašín, M., Nedoma, J., Gasol, J. M., et al. (2005).** Influence of top-down and bottom-up manipulations on the R-BT065 subcluster of β -proteobacteria, an abundant group in bacterioplankton of a freshwater reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2381–2390
- Šimek, K., Horňák, K., Jezbera, J., Nedoma, J., Znachor, P., Hejzlar, J., et al. (2008).** Spatio-temporal patterns of bacterioplankton production and community composition related to phytoplankton composition and protistan bacterivory in a dam reservoir. *Aquat. Microb. Ecol.* 51, 249–262
- Šimek, K., Jürgens, K., Nedoma, J., Comerma, M., and Armengol, J. (2000).** Ecological role and bacterial grazing of Halteria spp.: Small freshwater oligotrichs as dominant pelagic ciliate bacterivores. *Aquat. Microb. Ecol.* 22, 43–56
- Šimek, K., Kasalický, V., Jezbera, J., Horňák, K., Nedoma, J., Hahn, M. W., et al. (2013).** Differential freshwater flagellate community response to bacterial food quality with a focus on Limnohabitans bacteria. *ISME J.* 7, 1519–1530
- Šimek, K., Kojecká, P., Nedoma, J., Hartman, P., Vrba, J., and Dolan, J. R. (1999).** Shifts in bacterial community composition associated with different microzooplankton size fractions in a eutrophic reservoir. *Limnol. Oceanogr.* 44, 1634–1644
- Šimek, K., Nedoma, J., Znachor, P., Kasalický, V., Jezbera, J., Hornňák, K., et al. (2014).** A finely tuned symphony of factors modulates the microbial food web of a freshwater reservoir in spring. *Limnol. Oceanogr.* 59, 1477–1492
- Šimek, K., Pernthaler, J., Weinbauer, M. G., Hornák, K., Dolan, J. R., Nedoma, J., et al. (2001b).** Changes in bacterial community composition and dynamics and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2723–33
- Šusta, J. (1997).** *Výživa kapra a jeho družiny rybníčné*. Carpio Třeboň, 180p
- Tamaki, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Nakamura, K., Nomura, N., Matsumura, M., et al. (2005).** Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2162–2169

- Tarao, M., Jezbera, J., and Hahn, M. W. (2009).** Involvement of cell surface structures in size-independent grazing resistance of freshwater Actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4720–6
- ter Braak, C. J. F., and Smilauer, P. (2002).** CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (Version 4.5). *Sect. Permut. Methods. Microcomput. Power*, 10
- Tischer, K., Zeder, M., Klug, R., Pernthaler, J., Schattenhofer, M., Harms, H., et al. (2012).** Fluorescence in situ hybridization (CARD-FISH) of microorganisms in hydrocarbon contaminated aquifer sediment samples. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 526–532
- Tomczak, M., and Godfrey, J. S. (1994).** *Regional Oceanography : An Introduction (2nd Edition)*. Tasmania, Australia: Pergamon, 401p
- Tranvik, L. J. (1992).** Allochthonous dissolved organic matter as an energy source for pelagic bacteria and the concept of the microbial loop. *Hydrobiologia* 229, 107–114
- Urbach, E., Vergin, K. L., Larson, G. L., and Giovannoni, S. J. (2007).** Bacterioplankton communities of Crater Lake, OR: dynamic changes with euphotic zone food web structure and stable deep water populations. *Hydrobiologia* 574, 161–177
- Van Der Gucht, K., Vandekerckhove, T., Vloemans, N., Cousin, S., Muylaert, K., Sabbe, K., et al. (2005).** Characterization of bacterial communities in four freshwater lakes differing in nutrient load and food web structure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53, 205–220
- Vrba, J., Benedová, Z., Jezberová, J., Matoušů, A., Musil, M., Nedoma, J., et al. (2018).** You cannot step into the same fishpond twice – an evolution of fishpond ecosystems to hypertrophy. in *Rybníky 2018*, 1–10
- Wagner, M., and Loy, A. (2002).** Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 218–227
- Wang, W., Liu, W., Wu, D., Wang, X., and Zhu, G. (2019).** Differentiation of nitrogen and microbial community in the littoral and limnetic sediments of a large shallow eutrophic lake (Chaohu Lake, China). *J. Soils Sediments* 19, 1005–1016
- Wang, Y., Sheng, H.-F., He, Y., Wu, J.-Y., Jiang, Y.-X., Tam, N. F.-Y., et al. (2012).** Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater, intertidal wetland, and marine sediments by using millions of illumina tags. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8264–71
- Warnecke, F., Amann, R., and Pernthaler, J. (2004).** Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environ. Microbiol.* 6, 242–53
- Warnecke, F., Sommaruga, R., Sekar, R., Hofer, J. S., and Pernthaler, J. (2005).** Abundances, identity, and growth state of actinobacteria in mountain lakes of different UV transparency. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5551–5559
- Watson, S. B., McCauley, E., and Downing, J. A. (1997).** Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. *Limnol. Oceanogr.* 42, 487–495

- Weisse, T., Müller, H., Pinto-Coelho, R. M., Schweizer, A., Springmann, D., and Baldringer, G. (1990).** Response of the microbial loop to the phytoplankton spring bloom in a large prealpine lake. *Limnol. Oceanogr.* 35, 781–794
- Whittenbury, R., and Dalton, H. (2013).** “The Methylophilic Bacteria,” in *The Prokaryotes* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 894–902
- Wilhartitz, I., Mach, R. L., Teira, E., Reinthaler, T., Herndl, G. J., and Farnleitner, A. H. (2007).** Prokaryotic community analysis with CARD-FISH in comparison with FISH in ultra-oligotrophic ground- and drinking water. *J. Appl. Microbiol.* 103, 871–81
- Woese, C. R., and Bleyman, M. A. (1972).** Genetic code limit organisms - do they exist? *J. Mol. Evol.* 1, 223–229
- Wu, Q. L., and Hahn, M. W. (2006).** Differences in structure and dynamics of Polynucleobacter communities in a temperate and a subtropical lake, revealed at three phylogenetic levels. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57, 67–79
- Wu, X., Xi, W., Ye, W., and Yang, H. (2007).** Bacterial community composition of a shallow hypertrophic freshwater lake in China, revealed by 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61, 85–96
- Xing, P., and Kong, F. (2007).** Intra-habitat heterogeneity of environmental factors regulating bacterioplankton community composition in Lake Taihu, China. *Aquat. Microb. Ecol.* 48, 113–122
- Yang, Y., Chen, J., Tong, T., Li, B., He, T., Liu, Y., et al. (2019).** Eutrophication influences methanotrophic activity, abundance and community structure in freshwater lakes. *Sci. Total Environ.* 662, 863–872
- Zhang, T., Jin, T., Yan, Q., Shao, M., Wells, G., Criddle, C., et al. (2009a).** Occurrence of ammonia-oxidizing Archaea in activated sludges of a laboratory scale reactor and two wastewater treatment plants. *J. Appl. Microbiol.* 107, 970–977
- Zhang, Y., Love, N., and Edwards, M. (2009b).** Nitrification in drinking water systems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 39, 153–208
- Zingel, P., Agasild, H., Nõges, T., and Kisand, V. (2007).** Ciliates are the dominant grazers on pico- and nanoplankton in a shallow, naturally highly eutrophic lake. *Microb. Ecol.* 53, 134–142
- Znavor, P., Hejzlar, J., Vrba, J., Nedoma, J., Sed'a, J., Šimek, K., et al. (2018).** *Brief history of long-term ecological research into aquatic ecosystems and their catchments in the Czech Republic. Part I, Manmade reservoirs.* Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, v.v.i, Institute of Hydrobiology, 80p
- Zwart, G., Crump, B. C. B., Kamst-van Agterveld, M. M. P., Hagen, F., Han, S. S. K., Hagen, F., et al. (2002).** Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* 28, 141–155
- Zwart, G., Huismans, R., Van Agterveld, M. P., Van de Peer, Y., De Rijk, P., Eenhoorn, H., et al. (1998).** Divergent members of the bacterial division Verrucomicrobiales in a temperate freshwater lake. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25, 159–169

9 Přílohy

Seznam příloh

Tabulka S1. Sekvence oligonukleotidových sond společně se sekvencemi všech použitých Competitorů (C) a Helperů (H1-H4).

Obrázek S1. Relativní abundance vybraných bakteriálních skupin stanovených metodou CARD-FISH v porovnání s celkovým počtem bakterií. Data z rybníků: Dehtář, Rod, Podvrážský, Kvítkovický a Potěšil.

Obrázek S2. Relativní abundance vybraných bakteriálních skupin stanovených metodou CARD-FISH v porovnání s celkovým počtem bakterií. Data z rybníků: Klec, Zběhov, Posměch, Roubíček, Beranov.

Obrázek S3. Relativní abundance vybraných bakteriálních skupin *Betaproteobacteria* stanovených metodou CARD-FISH. Data z rybníků: Dehtář, Rod, Podvrážský, Kvítkovický a Potěšil.

Obrázek S4. Relativní abundance vybraných bakteriálních skupin *Betaproteobacteria* stanovených metodou CARD-FISH. Data z rybníků: Klec, Zběhov, Posměch, Roubíček, Beranov.

Tabulka S2. Korelační koeficienty fyzikálně-chemických a biologických parametrů a počtů bakterií stanovených metodou CARD-FISH. Negativní

Tabulka S3. Vysvětlení zkratk fyzikálně-chemických a biologických parametrů

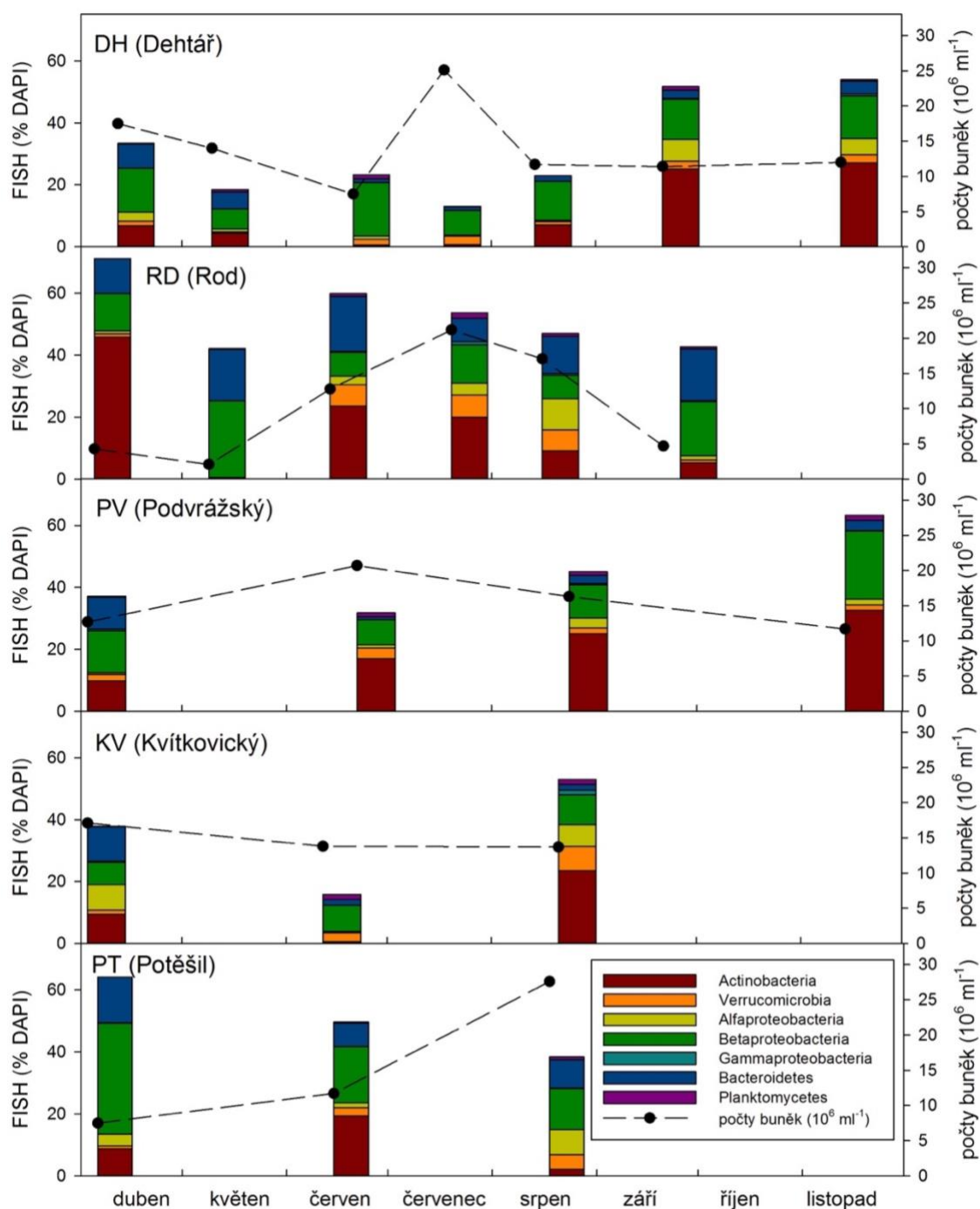
Obrázek S5. Abundance % DAPI všech metanotrofů (MOB I + MOB II) stanovená metodou CARD-FISH.

Obrázek S6. Abundance metanotrofů I a II typu stanovené metodou CARD-FISH uvedené v počtech buněk na ml⁻¹.

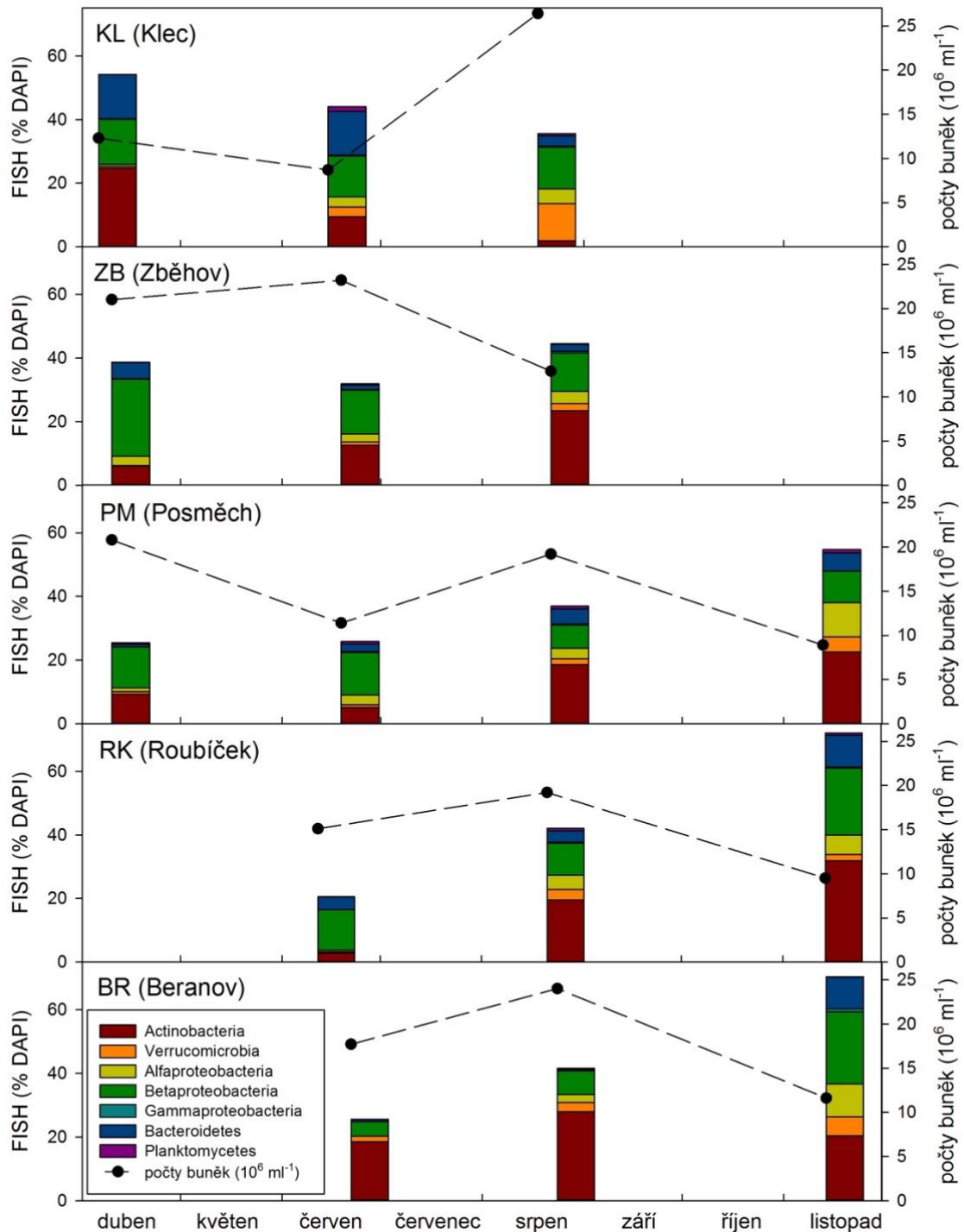
Obrázek S7. Ordinační metoda (RDA) ukazující závislost mezi genotypy bakterií a zástupci sinicového vodního květu ve všech sledovaných rybnících v sezóně 2017.

Tabulka S1. Sekvence oligonukleotidových sond společně se sekvencemi všech použitých Competitorů (C) a Helperů (H1-H4).

Sonda	Sekvence (5'→3')	Reference
Arc915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	(Stahl and Amann, 1991)
Eub I II III	GCWGCCWCCCGTAGGWGT	(Daims et al., 1999)
R-BT065	GTTGCCCCCTCTACCGTT	(Šimek <i>et al.</i> , 2001)
PnecC-16S-445	GAGCCGGTGTTCCTTCCC	(Hahn et al., 2005)
PnecB-23S-166	GTTGCTCCACACACCT	(Wu and Hahn, 2006)
ALF968	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	(Neef, 1997)
Bet42a	GCCTTCCACTTCGTTT C: GCCTTCCCACATCGTTT	(Manz et al., 1992)
Gam42a	GCCTTCCCACATCGTTT C: GCCTTCCACTTCGTTT	(Manz et al., 1992)
M84	AGCCCGCGACTGCTCACC	(Eller et al., 2001)
M705	CTAGACTTCCTTGTGGTC	(Eller et al., 2001)
M450	CTATTACTGCCATGGACCTA	(Eller et al., 2001)
CF968	GGTAAGGTTCCCTCGCGTA	(Acinas et al., 2015)
Ver46	CGACTTGCATGTCTTATCCA H: CGCCGCCAGCGTTCRRT	Salcher (nepublikováno)
LD28-1017	TCTCTTTCGAGCACTTGAACA C: TCTCTTTCGAACACTTTCACA H1: TCTCTGCTCAATTCGGTA H2: CAGCACCTGTGTTACCGT H4: GAGCTGACGACAGCCATG H5: CCCAACATCTCACGACAC	(Salcher et al., 2011a)
Acl852	AATGCGTTAGCTGCGTCGCA H1: AAACCGTGGAAGGTYCSCACAACCTAG H2: TCCCCAGGCGGGGCRCTT H3: TGCACAAACCGTGGAAG	(Warnecke et al., 2005)
LimAE-1435	TCCAACAGTCTGCTGAGCTAACC C1: TCCAACAGTTGGCTGAGCTAACC C2: TCCAACAGTCTGCTAACCTAACC	(Shabarova et al., 2017)
Planc1-670	CTCCACCYTGAGTTCCGCT	Salcher (nepublikováno)
Pirr-633	CATCTGTTCCGCITACCCCT	Salcher (nepublikováno)

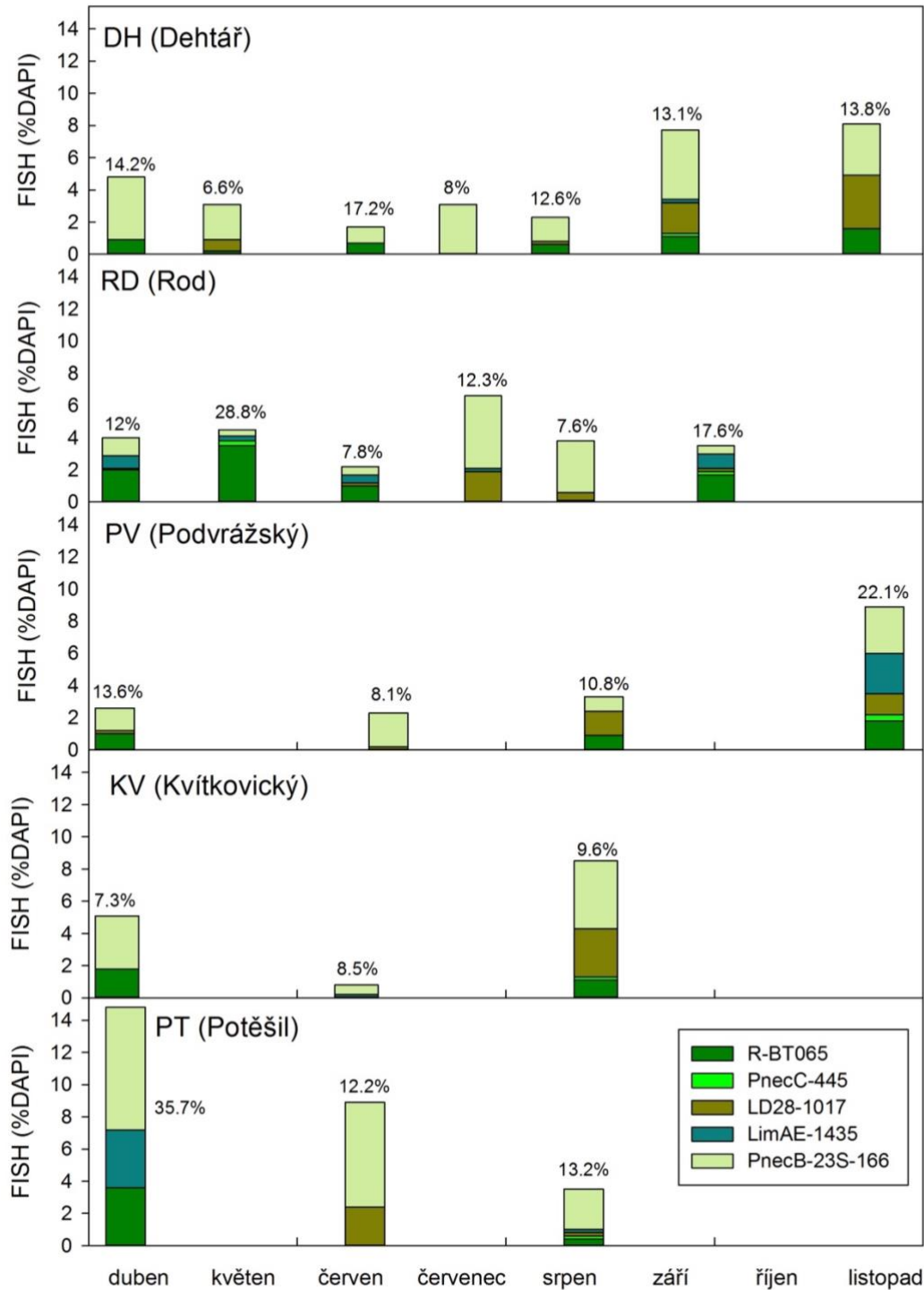


Obrázek S1. Relativní abundance vybraných bakteriálních skupin stanovených metodou CARD-FISH v porovnání s celkovým počtem bakterií. Byly použity obecné sondy CARD-FISH: Eub I II III (*Eubacteria*), Arc 915 (*Archaea*), a specifické sondy pro kmeny z říše *Eubacteria*: Acl852 (*Actinobacteria*), Ver46 (*Verrucomicrobia*), ALF968 (*Alphaproteobacteria*), Bet42a (*Betaproteobacteriales*), Gam42a (*Gammaproteobacteria*), CF968 (*Bacteroidetes*), Planc1-670 a Pirr-633 (*Planctomycetes*) (podrobnosti v Tabulce 3). Celkové počty buněk byly stanoveny mikroskopicky s použitím fluorescenční barvičky DAPI. Sloupečkové grafy jsou rozmístěny na ose x dle data odběru vzorků v roce 2017. Data z rybníků: Dehtář, Rod, Podvrážský, Kvítkovický a Potěšil.



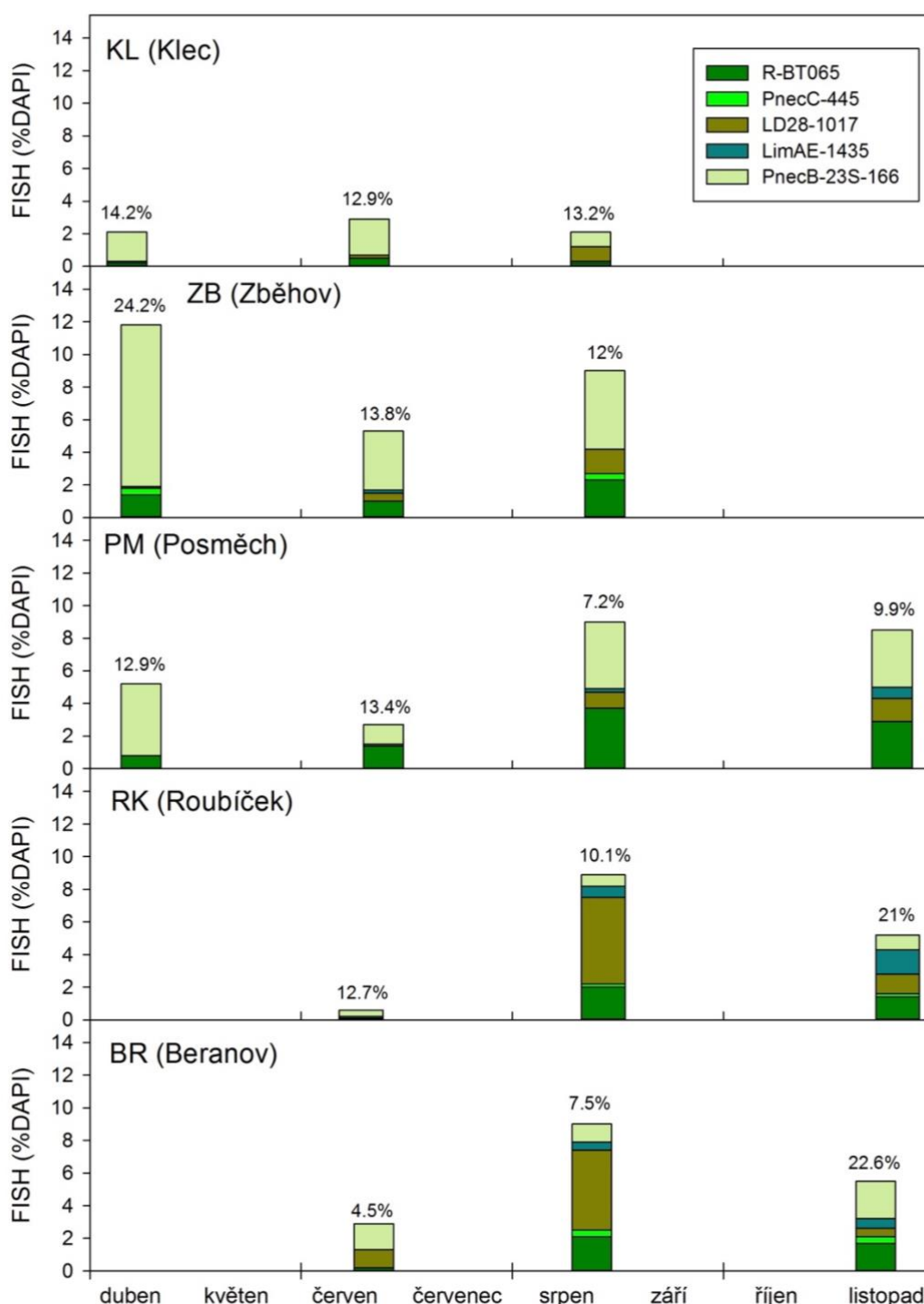
Obrázek S2. Relativní abundance vybraných bakteriálních skupin stanovených metodou CARD-FISH v porovnání s celkovým počtem bakterií. Byly použity obecné sondy CARD-FISH: Eub I-III (*Eubacteria*), Arc 915 (*Archaea*), a specifické sondy pro kmeny z říše *Eubacteria*: Acl852 (*Actinobacteria*), Ver46 (*Verrucomicrobia*), ALF968 (*Alfaproteobacteria*), Bet42a (*Betaproteobacteriales*), Gam42a (*Gammaproteobacteria*), CF968 (*Bacteroidetes*), Planc1-670 a Pirr-633 (*Planctomycetes*) (podrobnosti v Tabulce 3). Celkové počty buněk byly stanoveny mikroskopicky s použitím fluorescenční barvičky DAPI. Sloupečkové grafy jsou rozmístěny na ose x dle data odběrů vzorků v roce 2017. Data z rybníků: Klec, Zběhov, Posměch, Roubíček, Beranov.

% nad sloupečky vyjadřují množství buněk hybridizovaných probou Bet42a



Obrázek S3. Relativní abundance vybraných bakteriálních skupin *Betaproteobacteria* stanovených metodou CARD-FISH. Byly použity specifické sondy pro jednotlivé skupiny: R-BT065 (*Limnohabitans* linie LimB, LimC, LimD, LimE), PnecC-445 (*Polynucleobacter PnecC*), LD28-1017 (*Methylopusillus planktonicus*), LimAE-1435 (*Limnohabitans* LimA), PnecB-23S-166 (*Polynucleobacter PnecB*) (podrobnosti v Tabulce 3). Celkové počty buněk byly stanoveny mikroskopicky s použitím fluorescenční barvičky DAPI. Sloupečkové grafy jsou rozmístěny na ose x dle data odběru vzorků v roce 2017. Data z rybníků: Dehtář, Rod, Podvrážský, Kvítkovický a Potěšil.

% nad sloupečky vyjadřují množství buněk hybridizovaných probou Bet42a



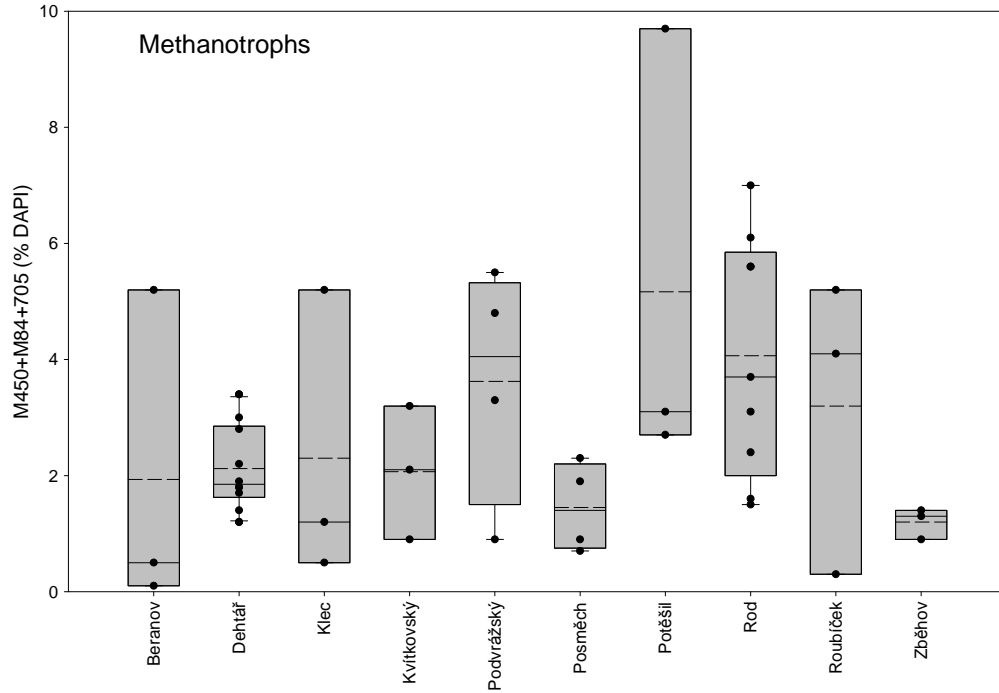
Obrázek S4. Relativní abundance vybraných bakteriálních skupin *Betaproteobacteria* stanovených metodou CARD-FISH. Byly použity specifické sondy pro jednotlivé skupiny: R-BT065 (*Limnohabitans* linie LimB, LimC, LimD, LimE), PnecC-445 (*Polynucleobacter PnecC*), LD28-1017 (*Methylopusillus planktonicus*), LimAE-1435 (*Limnohabitans* LimA), PnecB-23S-166 (*Polynucleobacter PnecB*) (podrobnosti v Tabulce 3). Celkové počty buněk byly stanoveny mikroskopicky s použitím fluorescenční barvičky DAPI. Sloupečkové grafy jsou rozmístěny na ose x dle data odběrů vzorků v roce 2017. Data z rybníků: Klec, Zběhov, Posměch, Roubíček a Beranov.

Tabulka S2. Korelační koeficienty fyzikálně-chemických a biologických parametrů a počtů bakterií stanovených metodou CARD-FISH. Negativní korelace modře, pozitivní korelace zeleně. Hladina významnosti vyznačena řezem písma: $p < 0,05$ (normální), $p < 0,01$ (kurzívou), $p < 0,001$ (tučně). Byly vybrány pouze hodnoty s korelačním koeficientem větším než 0,3 a menším než -0,3. Eub I-III (*Bacteria*), Arc915 (*Archaea*), Acl852 (*Actinobacteria*), Verr46 (*Verrucomicrobia*), ALF968 (*Alphaproteobacteria*), Bet42a (*Betaproteobacteriales*), CF968 (*Bacteroidetes*), Pirr-633 (*Planctomycetes-Pirelula*) LD28-1017 (*Methylopusillus planktonicus*), LimAE-1435 (*Limnohabitans* LimA), PnecB-23S-166 (*Polynucleobacter* PnecB), M84+705 (MOB I), M450 (MOB II).

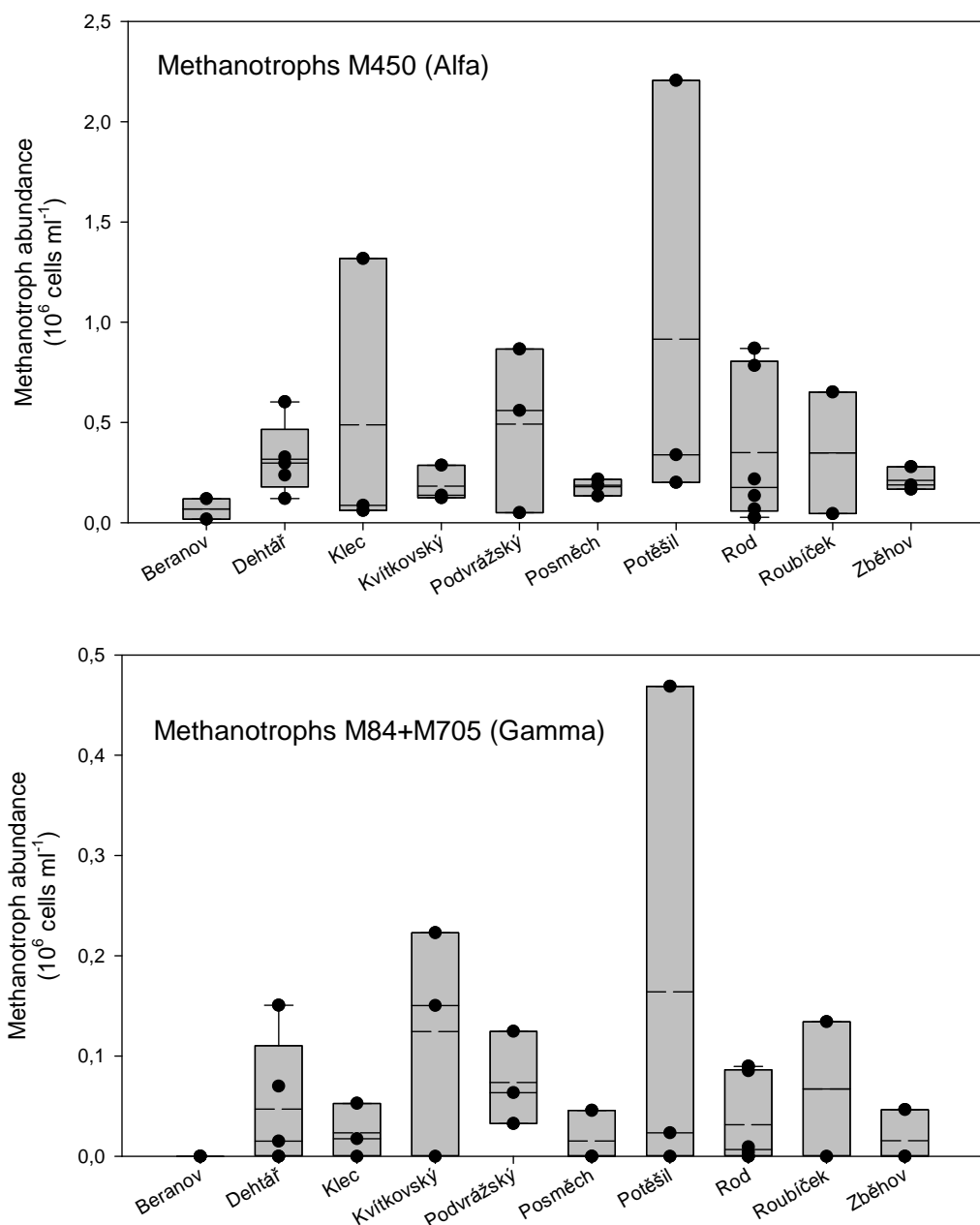
	FISH (%DAPI)									Počty buněk [$10^6/m$]											
	CF968	Ver46	ALF968	Beta42a	M450	M84+705	LimAE-1435	PnecB-23S-1	Pirr-633	Arc 915	Eub I - III	Acl852	CF968	PnecB-23S-	Ver46	ALF968	Beta42a	Pirr-633	M450	M84+705	LD28 -1017
k10		0,672	0,638		0,661	0,383				0,677	0,614				0,734	0,764	0,506	0,418	0,766	0,487	
BP-tot [10^6 bact/ml/d]		0,472	0,334		0,596					0,521	0,683	0,4			0,56	0,503			0,65		0,42
BP-free(<1um) [10^6 bact/ml/d]	-0,423									0,521	0,635										0,574
BP-part(>1um) [10^6 bact/ml/d]		0,659	0,503		0,742					0,665	0,609	0,331			0,754	0,66	0,379		0,787	0,351	
BP-C [μ gC/l/d]		0,464	0,372		0,718					0,601	0,614				0,564	0,569			0,767	0,405	
BCD [μ gC/l/d]		0,464	0,372		0,718					0,601	0,614				0,564	0,569			0,767	0,405	
Prokaryota [10^6 buněk/ml]	-0,526	0,391	0,315	-0,408	0,306		-0,305			0,69	0,733		0,493	0,565	0,547	0,632			0,583	0,427	
Bac-C [μ gC/l]		0,396	0,437		0,506	0,429				0,791	0,696	0,3	0,412	0,578	0,69	0,63			0,751	0,611	
HNF [10^3 buněk/ml]			0,645			0,369		0,378		0,503	0,523		0,556	0,493	0,309	0,694	0,504		0,353	0,397	
TGR-CL/d [10^6 bact/day]				-0,416							0,321	0,65									0,379
Vodivost [mS/cm]	-0,71			-0,344			-0,416		0,3				-0,508					0,309			
KNK 4.5 [meq/l]	-0,693			-0,446	-0,337		-0,345						-0,561								
TN #200 [mg/l]		0,522	0,577		0,82	0,387				0,654	0,608		0,349		0,622	0,707	0,353		0,816	0,503	
ICGF/C [mg/l]	-0,677			-0,471	-0,314		-0,366						-0,511								
IC #200 [mg/l]	-0,686			-0,468	-0,327		-0,367						-0,512								
NL 105 [mg/l]	-0,43	0,477	0,588		0,43	0,384		0,354	0,412	0,409	0,476		0,473	0,455	0,632	0,454	0,521	0,527	0,428		
Chla KOR [mg/l]		0,573	0,557		0,804	0,401				0,744	0,659	0,335		0,689	0,732	0,368			0,88	0,556	
TSI-Chla	-0,438	0,456	0,455		0,447					0,547	0,616			0,493	0,523	0,418	0,329	0,55	0,364		
Chlorococcales [mg/l]		0,449								0,619				0,427			0,541				
Cyano [mg/l]		0,526	0,491		0,794	0,399				0,757	0,564	0,404		0,67	0,7	0,423			0,888	0,585	
Volvocales [mg/l]		0,448			0,333					0,556	0,456			0,601	0,365	0,334			0,49		
Chlorococcales [%]	-0,464									0,748		-0,384					0,623				
Cyanobacteria [%]		0,357	0,465		0,832					0,546	0,426		0,362	0,422	0,586				0,768	0,375	
Zeu [cm]	-0,526	-0,563		-0,51				-0,346	-0,558	-0,582				-0,413	-0,561	-0,639	-0,514	-0,471	-0,596	-0,356	
Picocycano [10^6 buněk/ml]			0,457					0,532					0,497	0,667	0,347	0,495	0,561		0,352		
CH4 ox rate [nmol/l/d]		0,379										0,655									0,589
Bac-cell-Vol [μ m ³ /cell]					0,366	0,318						-0,484							0,362	0,393	
Grazing-CL [Bact/Cil*h]	-0,447			-0,458								0,582									0,471
TGR-HNF/d [10^6 bact/day]		0,334	0,595	-0,358		0,325					0,474		0,442		0,327	0,58			0,301		
Clad-evenness			0,358		0,497	0,45				0,426	0,339				0,402	0,439			0,552	0,54	

Tabulka S3. Vysvětlení zkratk fyzikálně-chemických a biologických parametrů

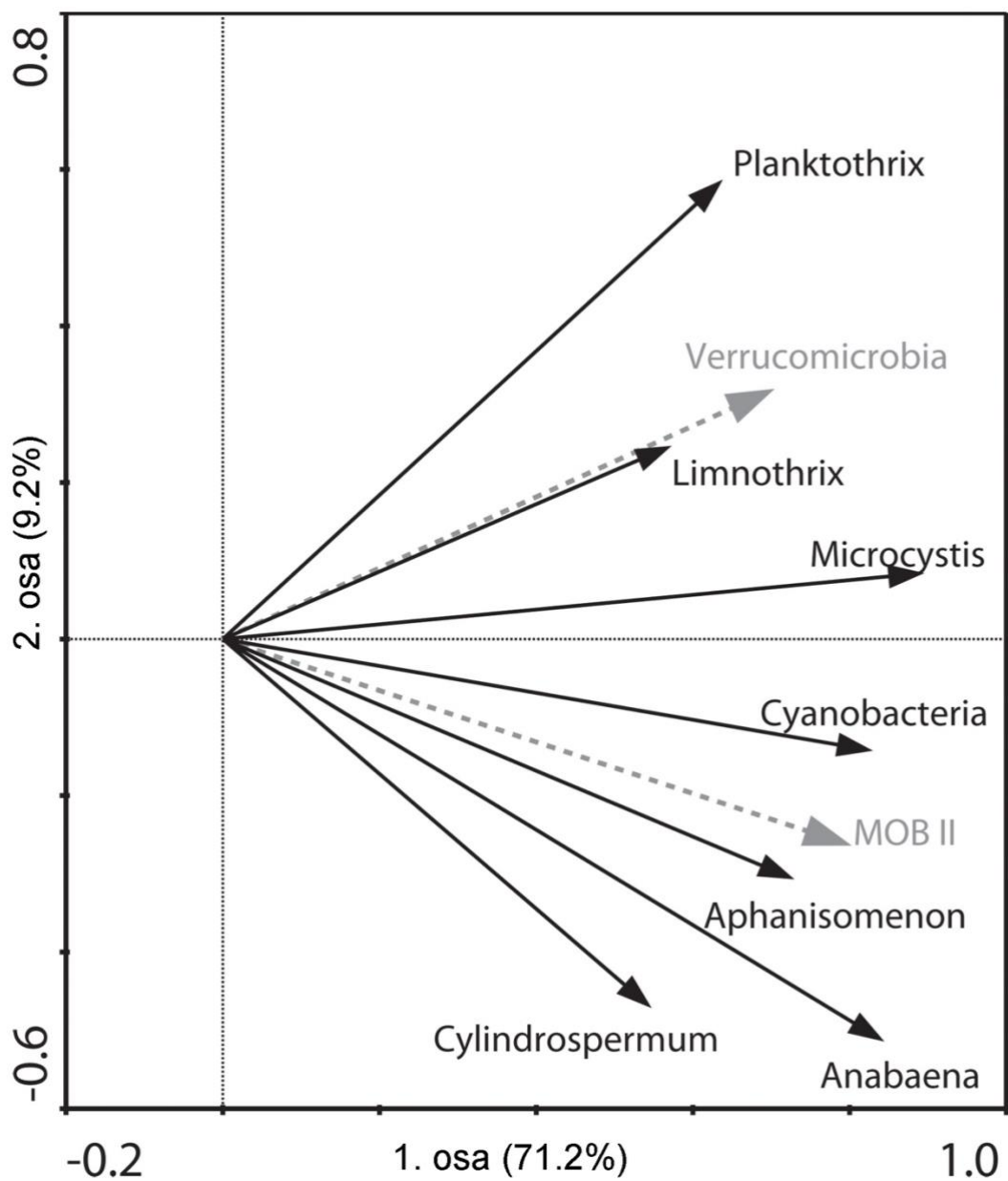
Zkratka	Vysvětlení parametru
k10	extinkční koeficient, měřítko zákalu vody, průhlednosti (=jak rychle ubývá světlo do hloubky), počítá se z regrese: (světlo v hloubce) = (světlo na hladině) * 10 [^] (-k10*hloubka)
BP-tot [10[^]6 bact/ml/d]	celková bakteriální produkce, vyjádřená v milionech vzniklých bakterií na ml za hodinu
BP-free(<1µm) [10[^]6 bact/ml/d]	bakteriální produkce ve frakci <1µm (odhad pro volně žijící bakterie), vyjádřená v milionech vzniklých bakterií na ml za hodinu
BP-part(>1µm) [10[^]6 bact/ml/d]	bakteriální produkce ve frakci >1µm (odhad pro bakterie přisedlé na partikulích, + spadá do toho i větší část vláken), vyjádřená v milionech vzniklých bakterií na ml za hodinu
BP-C [µgC/l/d]	celková bakteriální produkce vyjádřená v µg uhlíku na litr za den
BCD [µgC/l/d]	„bacterial carbon demand“, množství DOC v µg uhlíku na litr za den) potřebného k růstu bakterií za předpokladu 40-% účinnosti růstu (= 40% se zabuduje do biomasy a zbytek se prodýchá, tj. použije k získání energie)
TGR-CIL/d [10[^]6 bact/day]	„total grazing rate – ciliates“ celková žrací rychlost nálevníků, vyjádřená v milionech bakterií pozřených na litr za den
ICGF/C [mg/l]	„inorganic carbon“ koncentrace anorganického uhlíku stanovená ve vodě filtrované přes GF/C filtr
IC #200 [mg/l]	„inorganic carbon“ koncentrace anorganického uhlíku stanovená ve vodě filtrované přes síto 200 µm
NL 105 [mg/l]	nerozpuštěné látky, stanovené vysušením vzorku při 105°C
TSI-Chla	trophic state index, vypočtený na základě koncentrace chlorofylu dle Carlsona (Limnology and Oceanography 22:361, 1977), viz též např. https://en.wikipedia.org/wiki/Trophic_state_index
CH4 ox rate [nmol/l/d]	rychlost oxidace metanu v nmolech na litr za hodinu
Bac-cell-Vol [µm[^]3/cell]	„bacterial cell volume“, průměrný objem bakterií v daném vzorku
TGR-HNF/d [10[^]6 bact/day]	„total grazing rate – heterotrophic nanoflagellates“ celková žrací rychlost bezbarvých bičíkoců, vyjádřená v milionech bakterií pozřených na litr za den
Clad-evenness	jeden z indexů diverzity perlooček (Cladocera), viz např. https://en.wikipedia.org/wiki/Species_evenness



Obrázek S5. Abundance % DAPI všech metanotrofů (MOB I + MOB II) stanovená metodou CARD-FISH. Byla použita sonda M450 pro MOB II a kombinace dvou sond M84+705 pro MOB I. Boxy mají 75% a 25% kvartily. Chybové úsečky představují 10 % a 90% percentily (kvantily). Čára uvnitř boxu představuje střední hodnotu (medián). Body jsou jednotlivé vyznačené hodnoty součtu dvou skupin metanotrofů. Data pochází z 33 vzorků.



Obrázek S6. Abundance metanotrofů I a II typu stanovené metodou CARD-FISH uvedená v počtech buněk na ml⁻¹. Byla použita sonda M450 pro MOB II a kombinace dvou sond M84+705 pro MOB I. Boxy mají 75% a 25% kvartily. Chybové úsečky představují 10 % a 90% percentily (kvantily). Čára uvnitř boxu představuje střední hodnotu (medián). Body jsou vyznačené jednotlivé hodnoty. Data pochází z 33 vzorků.



Obrázek S7. Ordinační metoda (RDA) ukazující závislost mezi genotypy bakterií a zástupci sinicového vodního květu ve všech sledovaných rybnících v sezóně 2017.