

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Mikrobiální společenstva arktických ledovců

Bakalářská práce

Eliška Matějovská

Školitel: Mgr. Marie Šabacká, Ph.D.
České Budějovice
2024

Matějovská E., (2024): Mikrobiální společenstva arktických ledovců. [Microbial communities of Arctic glaciers Bc. Thesis, in Czech.], 56 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This bachelor's thesis explores microorganisms living in cryoconite holes, which are miniature aquatic ecosystems found on many glaciers worldwide. These holes contain dark sediments, a mix of organic and inorganic matter, forming the habitat for a resilient and diverse microbial community. The community of these microorganisms is very diverse and there are organisms with several different trophic levels. These communities are self-sufficient thanks to the products produced there and they can even exist isolated from the outside world without needing any products from outside, but only for a certain time. Only a little is known about life in cryoconite holes. A deeper understanding of these microhabitats offers potential insights into Earth's evolutionary history and climate change, but could also provide us with new sources of material that could be used in healthcare.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích

.....

Poděkování

Nejprve bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Marii Šabacké, Ph.D. za poskytnutí vzorků a informací ohledně dané problematiky.

Dále bych chtěla poděkovat své rodině a spolužákům, kteří mi byli pevnou oporou a vždy mě ve všem podporovali.

Obsah

1	Úvod	6
1.1	Použité zkratky	7
1.2	Arktida	7
1.3	Svalbard	9
1.4	Island.....	10
1.5	Ledovce.....	11
1.6	Změny klimatu a globální oteplování	13
1.7	Kryokonit	14
1.8	Mikrobiální život na ledovcích	17
2	Cíle práce.....	20
3	Materiály a metody	21
3.1	Použité vzorky a jejich sběr	21
3.2	Izolace DNA	22
3.3	PCR.....	23
3.4	Elektroforéza.....	24
3.5	Kvantifikace	25
3.6	Sekvenování	25
3.7	Analýza dat	25
4	Výsledky	27
4.1	Elektroforéza.....	27
4.2	Kvantifikace	30
5	Analýza dat.....	32
5.1	Rarefakční křivka.....	33
5.2	Taxonomická analýza	34
5.3	Porovnání dat z ledovců podle Bray-Curtise	40
5.4	Porovnání mezi lokalitami	41

6	Diskuse	43
7	Závěr.....	49
8	Zdroje	50

1 Úvod

Mezi mikroorganismy, které se vyskytují na ledovcích, patří řasy, sinice, bakterie, viry, menší bezobratlí a výjimečně houby. Tyto mikroorganismy se nejčastěji vyskytují v přírodních nádržkách, které jsou známé pod názvem kryokonitové otvory, ty se vyskytují na velké části ledovců na Zemi. Na dně těchto nádržek se nachází tmavý sediment, který je jak organického, tak anorganického původu. Tento sediment slouží jako zdroj potravy pro mikroorganismy (Rozwalak et al. 2022).

O životě v těchto otvorech a jeho fungování víme stále relativně málo. Jeho porozumění by nám mohlo prozradit mnoho o mikroorganismech a jejich adaptacích na klima, které úplně neposkytuje vhodné podmínky pro život, a mohlo by nám to odpovědět na otázku, jak byly mikroorganismy schopné přežít během doby, kdy byla téměř celá naše planeta pokryta sněhem a ledem. Dále by nám to mohlo prozradit mnoho o naší planetě a o změnách, kterými si během svého života prošla. Navíc by nám to také mohlo poskytnout nové zdroje materiálů, které by se mohly používat i ve zdravotnictví (Anesio a Laybourn-Parry 2012). Nakonec by nám to mohlo pomoci pochopit historický vývoj a vznik rezistence na antibiotika. Můžeme zde totiž sledovat vývoj rezistence na antibiotika mimo klinické podmínky. Póly jsou na to totiž skvělým místem, jelikož to jsou místa s menší antropogenní činností. (Depta a Niedźwiedzka-Rystwej 2023).

Naneštěstí pro nás kvůli globálnímu oteplování ustupují ledovce po celé naší planetě a s nimi společně pomalu mizí i kryokonitové otvory (Constable et al. 2022). Proto je důležité tyto otvory a společenstva v nich studovat, dokud ještě máme příležitost. Může se stát, že za pár let některé tyto jedinečné útvary z některých oblastí naší planety Země zmizí a my přijdeme o důležité informace, které by pro nás jednou mohly být velmi užitečné. Navíc by se mohlo ukázat, že v ledovcích jsou uschované mikroorganismy, které jsou patogenní. Pokud by se tyto organismy dostaly z ledovců ven, mohlo by to způsobit celosvětovou epidemii.

Tato práce se zaměřuje na společenstva mikroorganismů z kryokonitových otvorů, která pocházejí z Arktidy, konkrétně z Islandu a dále ze souostroví Svalbard.

1.1 Použité zkratky

EPS Extracelulární polymerní látky

OTU operational taxonomic units

1.2 Arktida

Naše planetární póly, Arktida na severu a Antarktida na jihu, představují nejchladnější místa na Zemi. Arktida, charakterizovaná zamrzlým mořem, kontrastuje s pevninskou Antarktidou, pokrytou masivními ledovci. Oba tyto odlehlé regiony jsou charakteristické svou drsnou, ledem pokrytou krajinou. Klíčovým aspektem jejich klimatu je vysoké albedo, tj. schopnost odrazet většinu dopadajícího slunečního světla zpět do atmosféry, díky čemuž absorbují pouze malé množství tepla. Tato unikátní vlastnost přispívá k jejich extrémní chladnosti. Nicméně, paradoxně se tyto oblasti ohřívají rychleji než zbytek planety, což poukazuje na složitý vliv klimatických změn v polárních regionech. Nejnižší teplota, která byla kdy zaznamenána, byla $-89\text{ }^{\circ}\text{C}$ v Antarktidě. Pro organismy je velmi obtížné žít jak na jednom, tak na druhém pólu, nejen kvůli nízkým teplotám a krutému mrazu, ale i velmi nepříznivým povětrnostním podmínkám (Rootes 1996). Jak v Arktidě, tak v Antarktidě došlo během posledních desetiletí k velkému oteplení. Průměrné roční teploty se v Arktidě od 80. let 20. století zvýšily přibližně o 4 až $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Constable et al. 2022). Oteplila se hlavně pevnina, ale objevily se i oblasti, které se naopak ochladily, například v jižním Grónsku, Davisově průlivu a ve východní Kanadě (ACIA 2005). I když se Arktida i Antarktida v mnoha místech liší, mají přece jen několik společných rysů. A to hlavně jejich sezónnost, tedy střídání polární noci a dne. To je způsobeno sklonem osy rotace Země vzhledem k její oběžné dráze kolem Slunce. Když je právě polární noc, tak to znamená, že Slunce na minimálně jeden den nevystoupí nad obzor. Opakem polární noci je polární den. Jak dlouho Slunce nevyjde, závisí na zeměpisné šířce. Délka polární noci spolu s nízkým úhlem dopadu slunečního záření, když je Slunce nad obzorem, má za následek dlouhé zimy a krátká léta (Crawford 2014).

Severní pól se nachází na vrstvě ledu, který pokrývá hluboký Severní ledový oceán. Tento led je neustále v pohybu díky mořským proudům. Severní ledový oceán pokrývá přibližně 14 milionů km^2 . Severní ledový oceán ohraničuje na jedné straně Severní Amerika a na druhé Eurasie (Rootes 1996). Jediné spojení s Arktidou je díky průlomům v Beringově

průlivu a v severním Atlantiku (ACIA 2005). Prázdné prostory v Severním ledovém oceánu jsou téměř zaplněny ostrovy, jako jsou Grónsko a Svalbard (Rootes 1996).

Severní pól se rozprostírá přesně na 90° severní šířky. Pokud by se zde někdo nacházel, kamkoli by se podíval, pokaždé by hleděl na jih. Nejbližší pevnina od Severního pólu je ostrov Grónsko vzdálený 560 km (Rootes 1996). Z klimatického hlediska je Arktida často definována jako oblast, kde je průměrná teplota v červenci nižší než 10 °C, ale průměrné roční teploty vzduchu se značně liší v závislosti na lokalitě. Dále je také charakteristická přítomností souvislého permafrostu, i když existují výjimky (ACIA 2005). Pokud jde o fyzickou hranici, tak ta není zcela upřesněna a vědci se neshodnou, jak ji přesně určit. Nejčastěji je určena tzv. severní hranicí lesa. To je pomyslná čára, za kterou je příliš chladno na to, aby tam mohly růst stromy. Na moři se tato hranice zase udává pomocí ledového příkrovu moře. V zimě se ledová plocha rozšíří daleko do nitra Atlantského oceánu a Beringova moře (Rootes 1996). Tato hranice je znázorněna na obr. 1.



Obr. 1: Severní hranice lesa. Ilustrace Robina Green

1.3 Svalbard

Svalbard je norské souostroví v Severním ledovém oceánu. Je to skupina ostrovů roztroušených mezi 74° a 81° severní šířky a mezi 10° a 34° východní délky. Největším ostrovem souostroví je Západní Špicberk, následují Severovýchodní země a Edgeův ostrov. Celková rozloha ostrovů je 62 248 km² a z toho je pouze 59 % pokryto ledem (Liestol 1993).

Svalbard byl v červnu 1596 představen modernímu světu díky průzkumníkům Willemovi Barentsovi a Jacobu van Heemskerckovi z Nizozemska. Později až v roce 1611 se sem vypravili velrybáři z Nizozemska, Anglie a dalších států. Od roku 1800 poklesl lov velryb a ostrovy se začaly využívat k těžbě uhlí. Dnes se Svalbard využívá k těžbě a rybolovu (Britannica 2023).

Pro vědecké účely vzniklo na Svalbardu mnoho základen pro polární expedice. První průzkum provedl britský kapitán C. J. Phipps v roce 1773. Následně v 19. století v průzkumu pokračovali norští, švédští a němečtí průzkumníci. Další geologické průzkumy probíhaly v 20. století a probíhají stále (Britannica 2023).

Za poslední čtyři až pět desetiletí se teplota vzduchu na Svalbardu zvýšila o 3 až 5 °C (Hanssen-Bauer et al. 2019). Průměrná teplota během zimy je pozoruhodně vysoká, vezmeme-li v úvahu severní polohu Svalbardu. To je způsobeno teplým Severoatlantickým proudem, který dopravuje teplejší atlantskou vodu na západní pobřeží Svalbardu. Tento proud také ovlivňuje klima a udržuje moře bez ledu i během zimy. Velké teplotní výkyvy jsou pro Svalbard charakteristické a jsou způsobeny především střídavým přechodem teplé a studené fronty (Liestol 1993).

Průměrné roční srážky na Svalbardu jsou kolem 700 mm, z toho nejvíce srážek spadne na jihozápadě Svalbardu (Hanssen-Bauer et al. 2019). Na západním pobřeží Svalbardu je také mnohem vyšší teplota než na východě a severu, přibližně o 5° C. Průměrná teplota se na západě v červenci pohybuje asi kolem 5° C. Ve stejné oblasti se průměrná teplota za období únor až březen, což se považuje za nejchladnější část roku, obvykle pohybuje mezi –8 a –16 °C (Liestol 1993).

Vegetace na Svalbardu je zastoupena hlavně mechy a lišejníky, ale nalezneme zde i mnoho cévnatých rostlin. Vyskytují se zde i dřeviny, a to vrba polární a bříza zakrslá. Suchozemská zvířata jsou zde chráněná zákonem. Patří mezi ně sobi a polární lišky. Mezi mořskými živočichy zde můžeme nalézt lední medvědy, tuleně, mrože a velryby (Britannica 2023).

1.4 Island

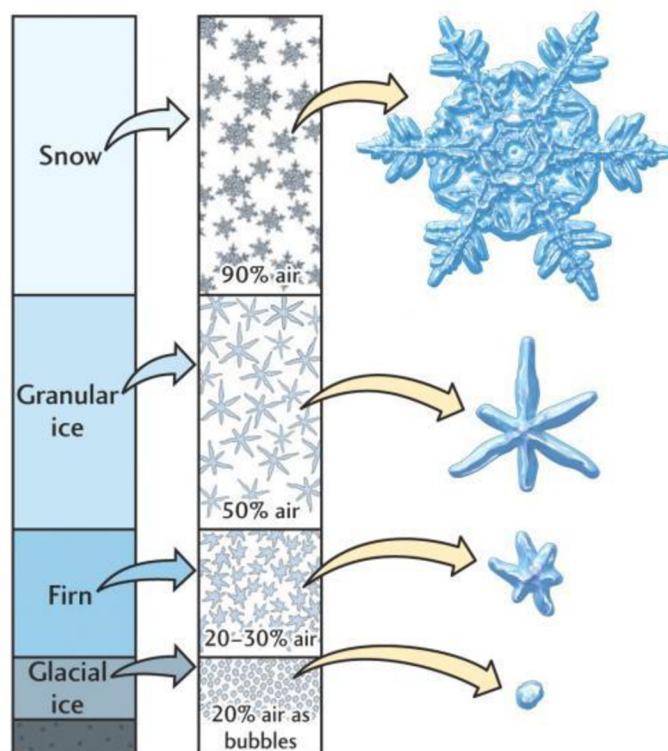
Island je ostrov, který se nachází v severním Atlantském oceánu. Je rozprostřený mezi 63° a 65° severní šířky a 13° a 24° západní délky. Celková rozloha země je 103 100 km² a z toho je pokryto pouze 11,5 % ledovci. Nejbližší evropská pevnina je Skotsko, které je vzdáleno od Islandu 800 km, ale úplně nejbliže je Grónsko, které je vzdáleno 290 km (Einarsson 1984).

I když se Island nachází na jižní hranici Severního pólu, má poměrně mírné přímořské podnebí. V červenci zde panuje teplota kolem 10–15 °C. (Thordarson a Höskuldsson 2014). Island se také nachází mezi dvěma mořskými proudy: a to teplým Gofským proudem a studeným Východním grónským proudem, a kvůli tomu zde dochází k rychlým

a drastickým změnám počasí (Einarsson 1984). Island je také znám svojí vulkanickou činností (Thordarson a Höskuldsson 2014).

1.5 Ledovce

Ledovec je obrovská masa ledu, která se formuje z nahromaděného sněhu, jež se transformuje během stovek, někdy i tisíců let (Sepehri 2007). K vytvoření ledovce kromě sněhu mohou přispívat i dešťové srážky nebo mlha. Tento proces tvorby ledovcového ledu je složitý a zdlouhavý (Paterson 1994). Čerstvě napadlý sníh se skládá z vloček oddělených vzduchovými kapsami. Když napadne další sníh, nižší vrstvy jsou stlačovány a sněhové vločky se deformují pod tlakem. Dochází také k procesu částečného tání a následnému opětovnému zamrznání, které přeměňuje sněhové částice na menší, kulatější ledové granule. Tyto granule se postupně spojují a tvoří nejprve firn, složeninu z větších zrn. Další stlačování firnu novým sněhem vede k jeho transformaci na hustý, tvrdý ledovcový led (Luhr 2004). Tento proces vzniku ledovcového ledu je ilustrován na obr. 2. Rychlost a charakter přeměny sněhu na ledovcový led závisí především na lokální teplotě a vlhkosti. Nejintenzivnější přeměna obvykle probíhá v oblastech s častým střídáním období tání a následného zamrznání roztátého sněhu (Paterson 1994).



Obr. 2: Tvorba ledovce. Ilustrace Betsy Wilkening

Velikost ledovců může být různá. Malé ledovce mohou mít velikost menší než 1 km² a ty větší mohou zaujímat rozlohu až 50 000 km² (Sepehri 2007). Největší ledovce se nazývají ledové štíty, v dnešní době máme pouze dva ledovcové štíty, a to Grónský a Antarktický. Tyto štíty nabývají rozsahu kontinentů. Ledovce představují nejen klíčový zdroj sladké vody, ale fungují také jako unikátní archivy historických informací (Luhr 2004). V jejich vrstvách je zakonzervován vzduch, který poskytuje cenné údaje o minulém klimatu a atmosféře, sahající až statisíce let do minulosti. Vedle vzduchu se zde nachází i částice jako prach, zavátý z dalekých oblastí, a vulkanický popel, který byl po erupcích sopky rozptýlen do atmosféry a následně dopraven k ledovcům větrem a srážkami. Tyto částice lze často nalézt ve spodních vrstvách ledovcového ledu (Edmaier a Jung-Hüttlová 2005).

Máme mnoho typů ledovců, většinou jsou řazeny podle jejich tvaru nebo lokace. Mezi dva nejzákladnější patří: kontinentální ledovec (také nazýván ledový štít) a horský (údolní) ledovec. Kontinentální ledovce jsou obří ledové desky, které se rozprostírají po pevninách. Můžeme je najít pouze na Jižním pólu (Sepehri 2007). Působením gravitace odtéká jejich led ven z center k okrajům, kde z nich vybíhají ledovcové proudy a výtokové ledovce. Horský ledovec je naopak plocha ledu ve vysoké nadmořské výšce. Často se označuje jako řeka ledu, která pod vlastní vahou stéká po svazích hor a do údolí. (Luhr 2004). Jak rychle se bude ledovec pohybovat záleží na tom, jak je svah příkrý. Čím příkřejší je, tím se ledovec pohybuje rychleji, ale ovlivňují to i další faktory. Když se ledovec pohybuje, obrušuje okolní skály a následně vytvořené úlomky tlačí před sebou ze svahu dolů. Ledovce takto tvoří koryta ve tvaru písmene U a z materiálu, který tlačí před sebou, vytvářejí valy, kterým se říká morény (Šlégl 2006). Horské ledovce můžou mít různé tvary, záleží hlavně na tvaru pohoří, kde se nacházejí (Luhr 2004).

Ledovce na vrcholu poslední doby ledové zabíraly přibližně 30 % povrchu Země. V dnešní době to je pouze asi 10 %. Skoro všechny ledovce se dnes vyskytují hlavně v oblasti Antarktidy a Arktidy, dále je můžeme najít v horách mírného pásu a v tropických oblastech (Paterson 1994) a vyskytují se na všech kontinentech kromě Austrálie (Sepehri 2007). Aby mohl ledovec vzniknout, musí být splněny dvě podmínky. Za prvé to je dostatek sněhových srážek a za druhé nízké teploty během léta, aby sníh přetrval (Paterson 1994).

Ačkoliv by se mohlo zdát, že ledovce neposkytují příznivé podmínky pro život kvůli svým extrémním charakteristikám, skrývají v sobě překvapivě rozmanité formy života. Většinou jsou tyto zmrzlé krajiny osídleny mikroorganismy (Zawierucha et al. 2015; Anesio et al.

2017). Aktivita těchto mikroorganismů je ovlivňována řadou faktorů (Laybourn-Parry et al. 2012). Zásadní pro jejich přežití je přítomnost kapalné vody, která je nezbytná pro jejich metabolické procesy. Na ledovcích a ledových příkrovech nalezneme různé biotopy, jako jsou sněhové vrstvy, povrchový led, kryokonitové otvory, nebo prostor mezi ledem a překrytou horninou či půdou, které poskytují dostatečné množství kapalné vody pro potřeby mikroorganismů (Anesio et al. 2017). Dalšími faktory, které ovlivňují život mikroorganismů v těchto podmínkách, jsou zdroje energie, obsah živin, teplota a pH prostředí (Garcia-Lopez a Cid 2017).

1.6 Změny klimatu a globální oteplování

Klima na naší planetě se velmi výrazně mění a tím ovlivňuje nejen přírodní ekosystémy, ale i život nás lidí (Ara et al. 2022). Změna klimatu má za následek výrazné celosvětové zvyšování teplot, rozsáhlé tání ledovců, tání permafrostu a zmenšování rozsahu mořského ledu v Severním ledovém oceánu, zvyšování hladiny moří a spousta dalších změn (ACIA 2005 a Ara et al. 2022). Tyto změny přispívají ke ztrátě anebo k porušení ekosystémů, jako jsou třeba korálové útesy, dále snižují kvalitu vody a potravin, deformují infrastrukturu, mohou se podílet na mortalitě a ovlivňovat zdraví populace, zapříčiňují migraci a vysídlování, a dokonce mohou mít vliv i na duševní zdraví (Ara et al. 2022).

Vlivem globálního oteplování došlo během několika posledních desetiletí k rapidnímu ústupu jak horských ledovců, tak ledových štítů (Diolaiuti et al. 2011). Oteplování je doprovázeno nárůstem srážek, ale poklesem délky trvání sněhové pokrývky (ACIA 2005). Oteplování je způsobeno skleníkovým efektem. Tento efekt zapříčiňují skleníkové plyny, které se nacházejí v naší atmosféře. Mezi tyto plyny patří oxid uhličitý, metan, oxidy dusíku a vodní páry. Skleníkový efekt způsobuje to, že naše Země absorbuje část tepla ze slunečního záření, a tím se ohřívá její povrch. Další část záření se odráží od povrchu a měla by opustit naši atmosféru. V atmosféře je ale absorbovaná právě skleníkovými plyny, které ji ven propouští jen v malé míře. Kvůli tomu je teplota Země výrazně vyšší, než by byla, kdyby neexistoval skleníkový efekt. Velikost skleníkového efektu záleží na množství výše zmíněných plynů v atmosféře. Pokud jich v atmosféře bude více, bude se zvedat i teplota naší Země (Kutílek 2004).

K podstatnému ústupu ledovců kvůli oteplování došlo po Malé době ledové (Houghton 1998). Malá doba ledová byla obdobím chladnějšího klimatu, které proběhlo přibližně od 14. do 19. století. Bylo to období, kdy se teploty v Evropě a Severní Americe výrazně snížily

a došlo k rozsáhlým změnám v podnebí (Wanner et al. 2022). Tání ledovců napomáhá k zvyšování hladiny oceánu (Barry 2006). Hladina moří se rychle zvyšuje a bude se zvyšovat i nadále. Do roku 2022 byl průměrný každoroční nárůst hladiny moří odhadován na přibližně 3,3 milimetrů. Mezi hlavní příčiny patří již zmíněné tání ledovců a ledových příkrovů, ale také termální roztažnost oceánů. Předpokládá se, že do roku 2050 bude více než jedna miliarda lidí, kteří obývají přímořské zóny, v ohrožení kvůli změnám klimatu (Glavovic et al. 2022). Tyto oblasti, které leží nejnižší, jsou často nejúrodnější a nejhustěji zalidněné (Houghton 1998). Ústup ledovců také ovlivňuje zdroje vody – nejen pitné, ale i vody využívané v zemědělství (Barry 2006).

1.7 Kryokonit

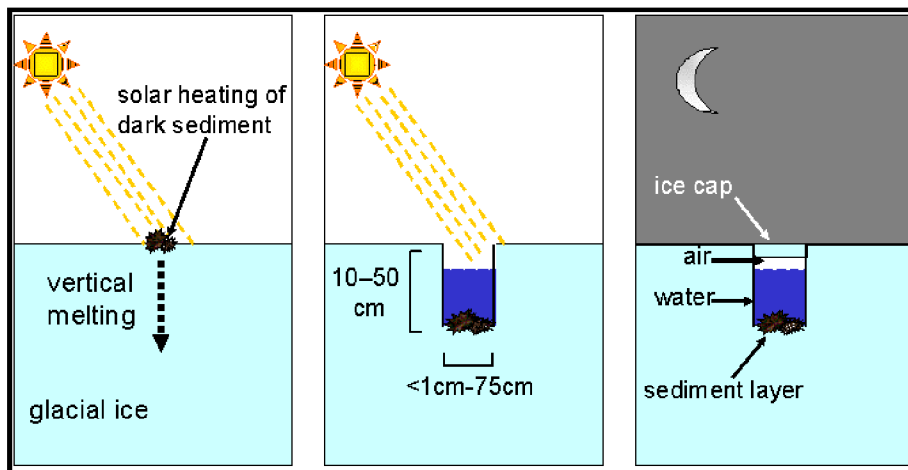
Kryokonitové otvory jsou malé nádržky, které jsou naplněné vodou, jak je vidět na obr. 3. Tyto nádržky mohou mít velikost jen několik milimetrů, ale mohou dorůst i velikosti desítek centimetrů (Anesio et al. 2017). Během velmi nízkých teplot, tedy hlavně v zimních měsících, mohou kryokonitové otvory zamrznout, zcela nebo částečně. Oproti tomu v teplých obdobích bývají otvory otevřené, ale samozřejmě existují i výjimky (Zawierucha et al. 2015). Na dně těchto otvorů se nachází tmavý sediment, který tvoří granule. Tento materiál je jak organického, tak anorganického původu a hraje důležitou roli v biogeochemických cyklech (Rozwalak et al. 2022). Organická hmota zahrnuje živé a mrtvé mikroorganismy, jejich exsudáty, produkty rozkladu, alochtonní biotickou a biogenní hmotu. V anorganické hmotě převažují minerální úlomky, často fylosilikáty, tektosilikáty a křemeny (Cook et al. 2016). Celá tato hmota se nazývá kryokonit. Termín pochází ze starověké řečtiny a v překladu to znamená doslova chladný prach (Rozwalak et al. 2022). Kryokonitové otvory můžeme nalézt pouze na ledovcích, které se nacházejí ve vysokohorských oblastech a vysokých zeměpisných šířkách (MacDonell a Fitzsimons 2008).



Obr. 3: Kryokonitové otvory. Foto Cook J. M.

Směs, která tvoří kryokonit, se na ledovce dostává z různých zdrojů. Buď může jít o materiál z místních zdrojů, jako jsou morény, stěny okolních údolí, roztátý ledovcový materiál, anebo z částic transportovaných větrem ze vzdálených pouští nebo vulkánů, z antropogenní činnosti, a dokonce i z mimozemské hmoty (Rozwalak et al. 2022). To, odkud směs pochází, může dále ovlivňovat velikost kryokonitových granúl, které se v kryokonitových otvorech vytvářejí. Ovlivňuje to také seskupení mikroorganismů, a to hlavně díky chemickému složení. Dále barva sedimentu může také ovlivnit rychlost vzniku kryokonitových otvorů. Čím tmavší sediment, tím rychleji se otvor vytvoří (Cook et al. 2016).

Otvory se tedy tvoří díky již zmíněnému navátému, tmavému organickému a anorganickému materiálu, který začne snižovat albedo ledu pod tímto materiálem. Ten začne pohlcovat sluneční záření místo toho, aby ho odrazil a kvůli absorbovanému teplu se tato část ledu začne rozpouštět a začne tvořit malé otvory naplněné roztátou vodou, jak je vidět na obr. 4. Tvorbu kryokonitových otvorů ovlivňují také mikroorganismy, které jsou na led transportovány společně s materiálem pomocí větru (Kaczmarek et al. 2016). Nejčastěji mají kryokonitové otvory tvar válce, ale můžeme nalézt i složitější tvary, záleží samozřejmě na mnoha faktorech jako je poloha, typ ledu, hydrologie a rozprostření sedimentu (Cook et al. 2016). Většinou nedokážeme určit stáří kryokonitových otvorů, ale geochemické podmínky v chladných, ledem pokrytých antarktických kryokonitových otvorech naznačují stáří izolace nejméně deset let. Dále studie sledující částice na tajících ledovcích ve Svalbardu naznačují přetrvávání déle než jednu sezónu tání (Laybourn-Parry et al. 2012).



Obr. 4: Tvorba kryokonitového otvoru. Ilustrace Kaushik Patowary

Mikroorganismy nacházející se v kryokonitových otvorech mohou pomocí látek, které produkují, změnit povahu sedimentu, a tím se vytvářejí kryokonitové granule. Tyto granule jsou směsí sedimentu a mikroorganismů a vyskytují se na dně kryokonitových otvorů (MacDonell a Fitzsimons 2008). K tvorbě granulí přispívají nejvíce extracelulární polymerní látky (EPS), které fungují jako lepidlo a drží celou směs pohromadě. EPS jsou produkovány zejména sinicemi (Anesio et al. 2017). Kryokonitové granule jsou považovány za zcela nejrozmanitější supraglaciální mikrobiální stanoviště. Obsahují společenstva mikroorganismů s několika různými trofickými stupni. Tato společenství si na určitý čas vystačí s produkty, které jsou zde produkovány, a mohou existovat i izolovaná od vnějšího světa, aniž by potřebovala nějaké produkty z vnějšku (Cook et al. 2016). Celková velikost kryokonitových granulí je různá. Velikost ovlivňuje připojení granulí pomocí vláken sinic, dále adheze částic pomocí EPS a degradace organické hmoty heterotrofy uvnitř a kolem granulí (Anesio et al. 2017). Granule bývají nejčastěji sférické, ale jejich velikost i morfologie je vysoce prostorově variabilní (Cook et al. 2016).

Kryokonitové otvory tvoří homogenní společenství mikroorganismů. To je způsobeno jejich stabilitou a odolností vůči rychlým změnám prostředí po dobu minimálně jedné nebo dvou sezón. Toto samozřejmě neplatí pro všechny otvory, záleží hlavně na typu ledovce, kde se kryokonitové otvory nacházejí. I když kryokonitové otvory tvoří homogenní společenství, neznamená to, že ve všech otvorech je seskupení mikroorganismů stejné, právě naopak. Každý kryokonitový otvor má své vlastní jedinečné seskupení mikroorganismů (Zawierucha et al. 2015). Kryokonitové otvory jsou vlastně samostatnými ekosystémy, které obsahují bohatý bakteriální život v sedimentech a kapalně vodě, a v poslední době si získaly

pozornost mikrobiálních ekologů, kteří je chtějí využít jako „přírodní mikrokosmy“ ke studiu mikrobiálních společenstev (Darcy et al. 2018).

1.8 Mikrobiální život na ledovcích

Většina mikroorganismů, které žijí na ledovcích a v polárních oblastech, je psychrotolerantní a psychrofilní. Psychrotolerantní znamená, že organismus, i když preferuje ke svému životu a růstu vyšší teploty (přibližně kolem 20 °C), může prospívat i při nižších teplotách, které sahají až k 0 °C. Oproti tomu se psychrofilním organismům nejlépe daří při teplotách 15 °C a méně (Garcia-Lopez a Cid 2017). Mikrobiální společenství v kryokonitu jsou nejvíce podobná těm, která se nacházejí ve sladkovodních sedimentech mírného pásma. Ale oproti těmto organismům jsou mikroorganismy v kryokonitových otvorech vystaveny vícenásobnému tlaku v důsledku nízkých teplot a kolísavých podmínek prostředí (Poniecka et al. 2020). Arktické mikroorganismy jsou nejen odolné vůči mrazu, ale některé mohou metabolizovat při teplotě až -39 °C (ACIA 2005). Například některé mohou produkovat nemrznoucí proteiny, které jsou funkční i při nízkých teplotách, anebo dokáží produkovat proteiny, které jsou schopné syntetizovat jiné proteiny za nízkých teplot (Garcia-Lopez a Cid 2017). Mikroorganismy odolné vůči chladu jsou obvykle také odolné vůči suchu. Dále jsou tolerantní k mechanickému narušení a UV záření (ACIA 2005). Ochranu proti UV záření jim poskytují jejich pigmenty. Většinou jsou tyto organismy tmavé barvy, ale vyskytují se zde i organismy, které jsou průhledné (Garcia-Lopez a Cid 2017). Mají také krátkou generační dobu, která může usnadnit rychlou adaptaci na nové prostředí spojené se změnou klimatu a UV zářením (ACIA 2005).

Mikrobiální aktivity na povrchu ledovců zahrnují primární a sekundární produkci uhlíku, fixaci dusíku a virovou infekčnost (Anesio et al. 2017). Převážně primární producenti způsobují to, že kryokonitové otvory jsou jednou z největších zásobáren živin v ledovcovém systému (MacDonell a Fitzsimons 2008). Potravní síť v kryokonitu je udržovaná pomocí fotoautotrofů. Tito primární producenti získávají energii ze slunečního světla a díky němu fixují atmosférický CO₂ a přetvářejí ho na organickou hmotu. Ta dále slouží jako potrava pro heterotrofy. Heterotrofové metabolizují organickou hmotu, která byla vytvořena přímo v otvoru, anebo tu, která byla transportovaná z vnějšku. Heterotrofní společenstva v kryokonitu jsou často různorodá a obvykle v nich dominuje široká škála bakterií (Cook et al. 2016).

Hlavními producenty kryokonitových otvorů jsou jednobuněčné a vláknité fotosyntetizující sinice a rosivky (Anesio et al. 2017). Jsou rozšířeny ve všech suchozemských a mělkých vodních biotopech a často vytvářejí viditelnou biomasu. V mělkých tekoucích nebo stojících vodách vytvářejí slizovité shluky, které plavou ve vodě, ale jsou přichyceny k pevnému materiálu pod ní (ACIA 2005). Sinice v kryokonitových otvorech vytvářejí proteiny, lipidy, polysacharidy a další sekundární metabolity, které poté uvolňují do prostředí. Na těchto produktech se živí ostatní mikroorganismy, které se v otvorech nacházejí. Dále vláknité sinice dopomáhají k tvorbě kryokonitových granulí pomocí svých vláken (Anesio et al. 2017). Arktická půdní a vodní mikroflóra je tvořena především druhy z čeledí *Cyanobacteria*, *Chrysophyceae*, *Charophyceae*, *Ulvophyceae* a *Zygnemaphyceae* (ACIA 2005).

Mezi bakteriemi v kryokonitových otvorech dominují hlavně heterotrofní bakterie. Vyskytují se nejvíce v sedimentech, kde je dostatek organického uhlíku, který využívají k potravě. Jejich počet se různí, záleží na oblasti a období (Laybourn-Parry et al. 2012). Heterotrofní bakterie v kryokonitových otvorech rozkládají organickou hmotu, díky čemuž dopomáhají ke koloběhu živin v tomto prostředí. Jako příklad heterotrofních bakterií můžeme zmínit *Proteobacteria*, zejména *Alpha* a *Beta-Proteobacteria*, *Bacteroidetes* a *Actinobacteria*. V každém kryokonitovém otvoru je trochu jiné složení kolonií bakterií. Složení se může lišit mezi kryokonitovými otvory na stejném ledovci, mezi sousedními ledovci a mezi polárními oblastmi (Anesio et al. 2017). Bakteriální komunity z kryokonitových otvorů jsou známé svou odolností vůči antibiotikům. Některé bakterie izolované z kryokonitových otvorů mají dokonce navíc schopnost produkovat speciální nemrznoucí proteiny (Zawierucha et al. 2015).

Viry v tomto prostředí zastávají ekologickou roli podobnou predátorům, kteří se hlavně živí na bakteriích. Jde tedy o bakteriofágy, které vniknou do bakterie a následně prostřednictvím virové lýzy svého hostitele zabijí. Díky tomu ovlivňují recyklaci a export uhlíku a živin v kryokonitových otvorech. A dále také kontrolují populaci bakterií (Cook et al. 2016).

Houby se na Arktidě vyskytují zřídka. Buď se zde nacházejí v malém množství anebo úplně chybí. Ani běžné houby, jako jsou třeba *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* a *Rhizopus*, se zde prostě nevyskytují, a dokonce i *Penicillium* je zde vzácné. Naopak vodní houby se zde vyskytují hojně, zejména *Chytridiales* a *Saprolegniales*. Ty se sem

pravděpodobně dostávají s každoroční migrací vodních ptáků na Arktidu. Nejsou tedy endemické a jsou rozšířené po celém světě (ACIA 2005).

Jedním z nejběžnějších bezobratlých, které můžeme nalézt na ledovcích po celém světě, jsou želvušky. Želvušky na ledovcích fungují hlavně jako predátoři. Mohou požírat jak bakterie, tak viry, ale můžeme zde nalézt i býložravé jedince, kteří se živí na sinicích a řasách (Zawierucha et al. 2022). Jak želvušky, tak například i vířníci, jsou organismy, které jsou dobře přizpůsobené extrémním podmínkám. Pokud by například panovaly až moc nízké teploty nebo by nebylo dostatek vody, mohou tyto organismy vstoupit do anabiózy. To je stadium, ve kterém se tyto organismy nemohou rozmnožovat a dále vyvíjet, dochází také k přerušení všech metabolických pochodů. Když se vrátí příhodné podmínky, stanou se opět aktivními a začnou se rychle rozmnožovat (Zawierucha et al. 2015).

2 Cíle práce

Hlavním cílem bakalářské práce byla izolace DNA z vybraných ledovcových biotopů a analýza dat získaných z různých částí Arktidy a zpracování rešerše zabývající se mikrobiálním společenstvem ledovců.

Dále byly stanoveny tyto dílčí cíle:

- 1) Pomocí sekvence určit taxonomické složení mikrobiálních společenstev. Porovnat, jak se tato společenstva liší mezi ledovci a určit, které taxonomické a funkční skupiny na jednotlivých ledovcích převládají.
- 2) Porovnat získaná data s daty z literatury.
- 3) Charakterizovat mikrobiální společenstva na základě jejich taxonomie i funkční role v ekosystému ledovců.

3 Materiály a metody

3.1 Použité vzorky a jejich sběr

Vzorky byly odebrány celkem z osmi ledovců. Z toho jeden pochází ze Severovýchodní země, dva ze středu Západního Špicberku, jeden ze severu Špicberku a čtyři z Islandu. Dohromady bylo pracováno s 56 vzorky. Bližší informace jsou uvedeny v tab. 1.

Odběr probíhal za sterilních podmínek pomocí sterilní pipety a za použití laboratorních rukavic, přičemž vzorky byly ukládány do Whirl-Pak® sáčků. Odběr byl proveden školitelkou této práce. Před dalším zpracováním byly vzorky zmrazeny na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uchovány v mrazáku. Cílem bylo získat reprezentativní vzorky z každého ledovce. U vzorků s vysokým počtem exemplářů se jedná o transekty. Každý vzorek zde reprezentuje jeden kryokonitový otvor. Z každého otvoru bylo odebráno přibližně 50 g materiálu. Vzorky byly sbírané v pravidelných intervalech od čela ledovce až do vzdálenosti přibližně 1 km do vnitrozemí. U zbývajících vzorků se jedná o směsné vzorky. Ty byly odebírány stejně pipetou do sáčků, akorát bylo odebráno malé množství z cca 50 kryokonitů po celé ablační zóně do jednoho až tří směsných vzorků. Cílem bylo maximální pokrytí ledovce, aby byly vzorky maximálně reprezentativní. Vzorky byly po odebrání zmrazeny a převezeny do laboratoře na Centrum polární ekologie, kde jsou uchovávány.

Tab. 1: Seznam ledovců, ze kterých byly použity vzorky a jejich lokace

Název ledovce	Počet vzorků	Lokace	Souřadnice	Datum sběru
Ebbabreen	6	Střed Západního Špicberku, Svalbard	78.70N, 16.79W	20.07.2017
Falljokull	2	Island	63.98N, 16.73W	14.09.2020
Goosbukta breen	16	Severovýchodní země, Svalbard	80.20N, 19.93E	18.07.2018
Langjokull	15	Island	64.70N, 20.14W	
Lingbreen	5	Sever Špicberku, Svalbard	79.81N, 12.24W	25.07.2018
Nordenskioldbreen	2	Střed Západního Špicberku, Svalbard	78.68N, 17.12E	3.08.2019
Skaftafelsjokull	2	Island	64.05N, 16.87W	
Solheimjokull	8	Island	63.56N, 19.30W	05.09.2020
Celkem	56			

3.2 Izolace DNA

Vzorky byly nejdříve rozmrazeny (přes noc ve tmě při teplotě +4°C) a poté byly zpracovány pomocí kitu Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit od výrobce Zymo research.

Nejdříve bylo do zkumavky ZR BashingBead™ Lysis Tube dáno přibližně 150 mg sedimentu a bylo přidáno 750 µl roztoku BashingBead™ Buffer. Takto připravená

zkumavka byla poté umístěna do přístroje pro mechanické rozrušení DNA (bead beater), nastaveného na maximální rychlost po dobu pěti minut. Dále byl tento vzorek centrifugován jednu minutu při zrychlení 10 000x g. Následně bylo 400 µl supernatantu převedeno přes filtr Zymo Spin™ III-F Filter do sběrné zkumavky a vzorek byl centrifugován jednu minutu při zrychlení 8 000x g. Do této sběrné zkumavky bylo ke vzniklému filtrátu přidáno 1 200 µl roztoku Genomic Lysis Buffer a směs byla pořádně promíchána. Poté bylo 800 µl této směsi přesunuto do Zymo-Spin™ IIC Column, který byl vložen v nové sběrné zkumavce a zkumavka se nechala centrifugovat po dobu jedné minuty při zrychlení 10 000x g. Směs byla ze zkumavky dále vylita a zbylých 800 µl směsi bylo přesunuto do stejného Zymo-Spin™ IIC Column a opět proběhla centrifugace po dobu jedné minuty při zrychlení 10 000x g. Následně byl Zymo-Spin™ IIC Column z předchozího kroku přenesen na novou sběrnou zkumavku a bylo přidáno 200 µl DNA Pre-Wash Buffer a byla provedena centrifugace po dobu jedné minuty při zrychlení 10 000x g. Dále bylo přidáno 500 µl g-DNA Wash Buffer a opět byla provedena centrifugace po dobu jedné minuty při zrychlení 10 000x g. Zymo-Spin™ IIC byl dále přesunut do 1,5 mililitrové mikrozukavky a bylo přidáno 100 µl DNA Elution Buffer a byla provedena centrifugace po dobu 30 sekund při zrychlení 10 000x g. Takto eluovaná DNA byla převedena do Zymo-Spin™ III-HRC Filter (ten musel být před tímto krokem nejdříve pročištěn, tak že byl vložen do čisté sběrné zkumavky a bylo k němu přidáno 600 µl Prep Solution a byla provedena centrifugace po dobu tří minut při zrychlení 8 000x g), který byl vložen v čisté 1,5 mililitrové mikrozukavce a byla provedena centrifugace po dobu tří minut při zrychlení 10 000x g (Zymo research). Takto připravená DNA byla uchována v mrazáku při -20 °C, než byla dále zpracována.

3.3 PCR

Pro PCR analýzu byl použit Top Bio PP Master Mix. V tomto kroku došlo k amplifikaci 16S rRNA prokaryotických genů. Pro amplifikaci byl využit forward primer BactF357, který je specifický pro V3 až V4 oblast, označenou sekvencí 5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' a reverse primer BactR805, který je specifický pro oblast V3 až V5 se sekvencí 5' - GTCTCGTGGGCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'. Pro sekvenování byla z několika důvodů vybrána oblast V3 až V4, která má přibližně 448 bp. Za prvé nám tyto oblasti poskytují dobré taxonomické rozlišení, dále tato oblast je jak konzervativní, tak

variabilní, a nakonec tato oblast je hojně využívána v mnohých studiích a publikacích, které se zaměřují právě na téma kryokonitu, což posléze usnadňuje porovnání dat.

Do 50 μl mikrozkušavky bylo v digestoři napipetováno:

12,5 μl Plain PP Master Mix (2x)
1 μl Primer 1
1 μl Primer 2
9,5 μl PCR H₂O
1 μl Vzorek DNA (mimo digestoř)

Tím byl dosažen celkový objem reakční směsi ve zkumavce 25 μl . Samotná PCR probíhala v BIORAD T100™ Thermal cycle, který používal následující program:

Iniciální denaturace 98 °C po dobu 3 min 30 cyklů:
Denaturace 98 °C po dobu 10 s
Žihání primerů55 °C po dobu 15 s
Elongace72 °C po dobu 30 s
Finální extenze72 °C po dobu 10 min

3.4 Elektroforéza

Pro vizualizaci PCR produktů byla použita agarózová gelová elektroforéza za použití Agarose SERVA for DNA electrophoresis. Vyroben byl 1,5% agarózový gel smícháním 0,75 g agarózy s 50 ml 1x TAE pufrem. Směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě, dokud nebyla zcela průhledná. Po částečném ochlazení bylo přidáno 5 μl Gelgreen Nucleic Acid Stain (10 000x koncentrace v DMSO). Ztuhlý gel byl následně umístěn do elektroforetické komory naplněné 1x TAE pufrem. Vzorky DNA, smíchané s DNA Loading Dye Buffer Double Blue, byly aplikovány do jamek v gelu. Do první jamky byl přidán GeneRuler 1 kb DNA Ladder ready-to-use (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Samotná elektroforéza probíhala při 100 V přibližně 45 minut. Po skončení elektroforézy došlo k vizualizaci výsledků pod UV zářením v NU Genius syngene.

3.5 Kvantifikace

Kvantifikace proběhla před sekvenováním pro kontrolu vzorků, jestli obsahují dostatek DNA k analýze. Ke kvantifikaci byl použit Qubit® dsDNA HS Assay Kits.

Nejprve bylo nutné vypočítat hodnotu N, která odpovídá celkovému počtu standardů a analyzovaných vzorků. Pokud byly například použity dva standardy (dva standardy se používají vždy) a bylo analyzováno 10 vzorků, byla hodnota $N = 12$ ($2+10=12$). Dále byl vytvořen pracovní roztok. Ale nejprve bylo nutné vypočítat, kolik μl Qubit Buffer bude potřeba na přípravu tohoto roztoku. Množství bylo určeno tak, že byla N hodnota vynásobena 199. Pokud tedy hodnota N byla 12, bylo nutné napipetovat do zkumavky 2 388 μl Qubit Buffer. Dále bylo do této zkumavky přidáno činidlo Qubit reagent (200x). Toto činidlo nesmělo být vystaveno přímému světlu, protože je fotosensitivní a mohlo by dojít k jeho znehodnocení. Množství přidaného Qubit reagent bylo rovno hodnotě N. Tedy pokud hodnota N byla 12, tak bylo k Qubit Buffer přidáno 12 μl Qubit reagent. Ani tato směs nesměla být vystavena přímému světlu. Před dalším krokem byla zkumavka tímto roztokem zvortexovaná přibližně na tři sekundy. Následně byly připraveny zkumavky a do každé bylo z připraveného roztoku přidáno 190 μl . Poté bylo do jedné zkumavky přidáno 10 μl Qubit HS Standart 1 (0 ng/ μl), do druhé zkumavky bylo přidáno 10 μl Qubit HS Standart 2 (10 ng/ μl) a do zbylých zkumavek byly přidány vzorky, každý také po 10 μl . Nakonec byly standardy i vzorky vloženy postupně do Qubit 3.0 Fluorometru (Thermo Fisher Scientific).

3.6 Sekvenování

Vzorky, u nichž kvantifikace potvrdila dostatečné množství DNA, byly následně zředěny na koncentraci 2-5 ng/ μl . Tyto připravené vzorky byly poté odeslány do sekvenačního centra Seqme. Zde bylo provedeno sekvenování DNA pomocí metody Illumina MiSeq pair-end sequencing: V3-V4 region.

3.7 Analýza dat

Analýza dat získaných z výzkumu ledovcových mikrobiálních společenství byla provedena pod vedením Marie Šabacké s využitím systému Qiime2 a následováním pipeline DADA2. V rámci této analýzy byly DNA sekvence z mikrobiálních vzorků importovány do formátu kompatibilního s Qiime2. Následovala kontrola kvality a filtrace dat, během které byly odstraněny chybné a nekvalitní sekvence. Tento proces zahrnoval eliminaci chybných nukleotidů a důkladnou kontrolu kvality čtení. Dalším krokem bylo sestavení ampliconů pro

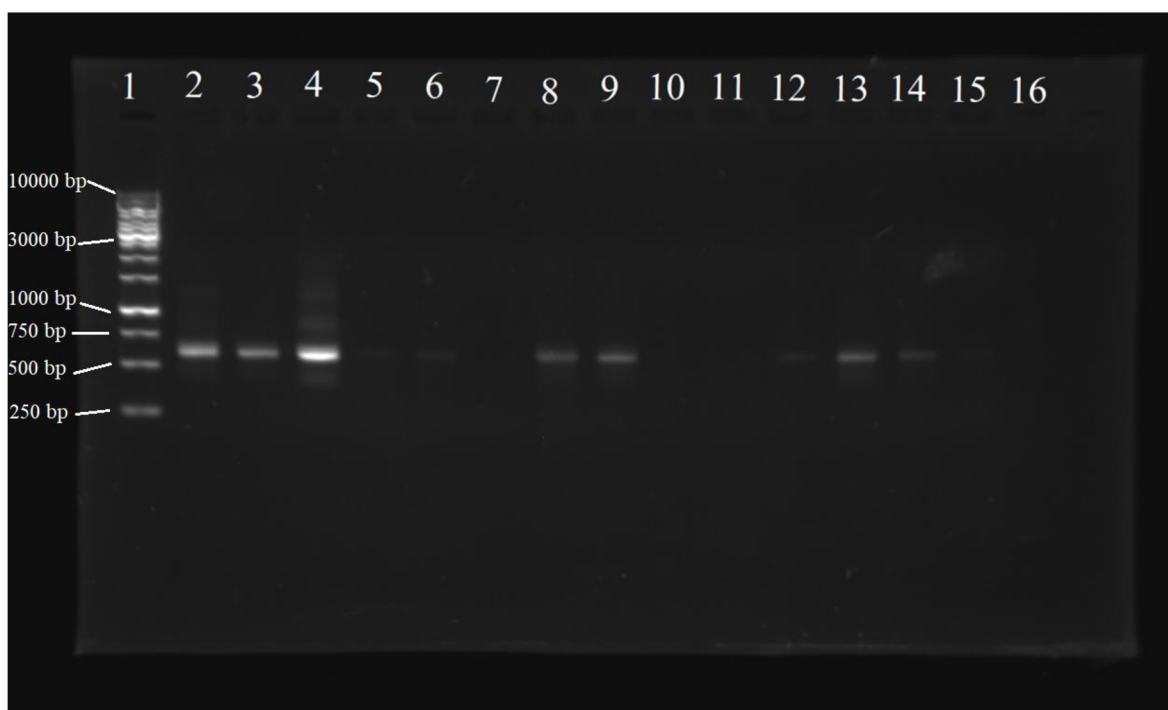
spojení kratších sekvencí do delších reprezentativních úseků a následný clustering sekvencí do operational taxonomic units (OTU), definovaných na základě 97% míry podobnosti. Pro taxonomickou klasifikaci byla využita databáze SILVA, v níž byly experimentální sekvence porovnány s referenčními sekvencemi. Výsledkem bylo vytvoření ‚feature table‘, která sumarizovala zastoupení jednotlivých mikroorganismů v rámci vzorků. Tato tabulka poskytla základ pro následné statistické analýzy dat. Systém Qiime2 byl použit pro různé metody analýzy a vizualizace dat, včetně analýz beta diverzity a tvorby taxonomických dendrogramů. Pro vizualizace a tvorbu grafů byl specificky použit QIIME2 view, což umožnilo efektivní prezentaci a interpretaci získaných výsledků (Robeson et al. 2021).

4 Výsledky

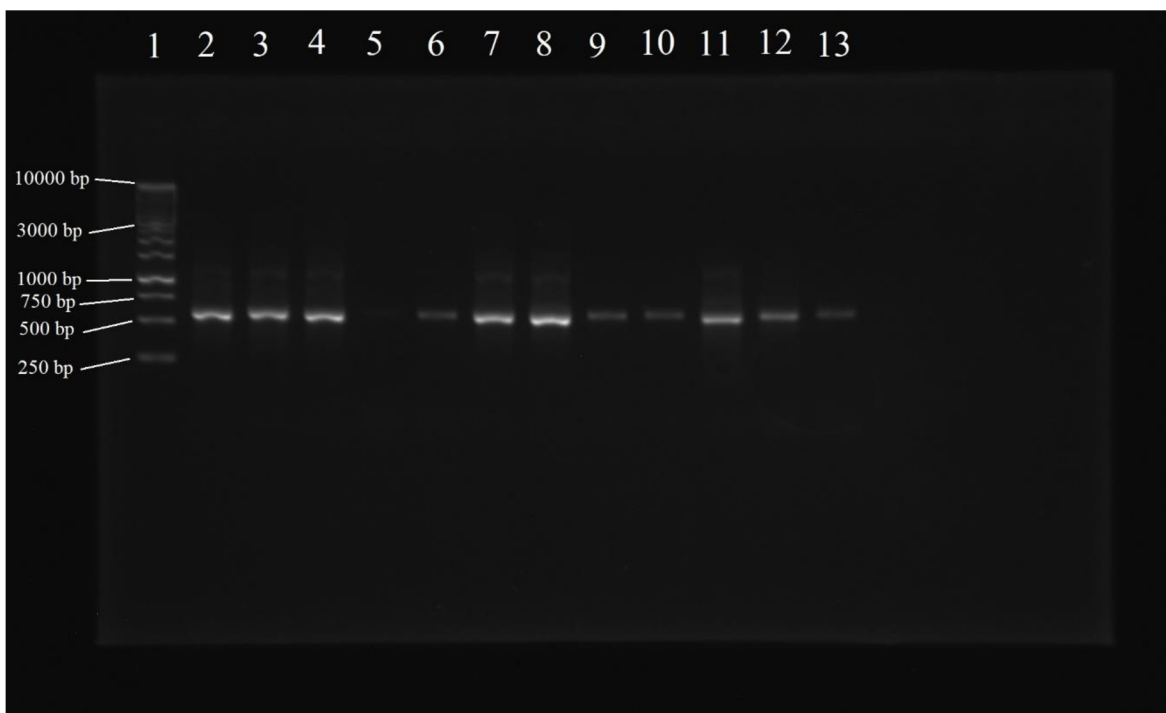
4.1 Elektroforéza

Výsledky elektroforézy jsou zobrazeny na obr. 5 až 7.

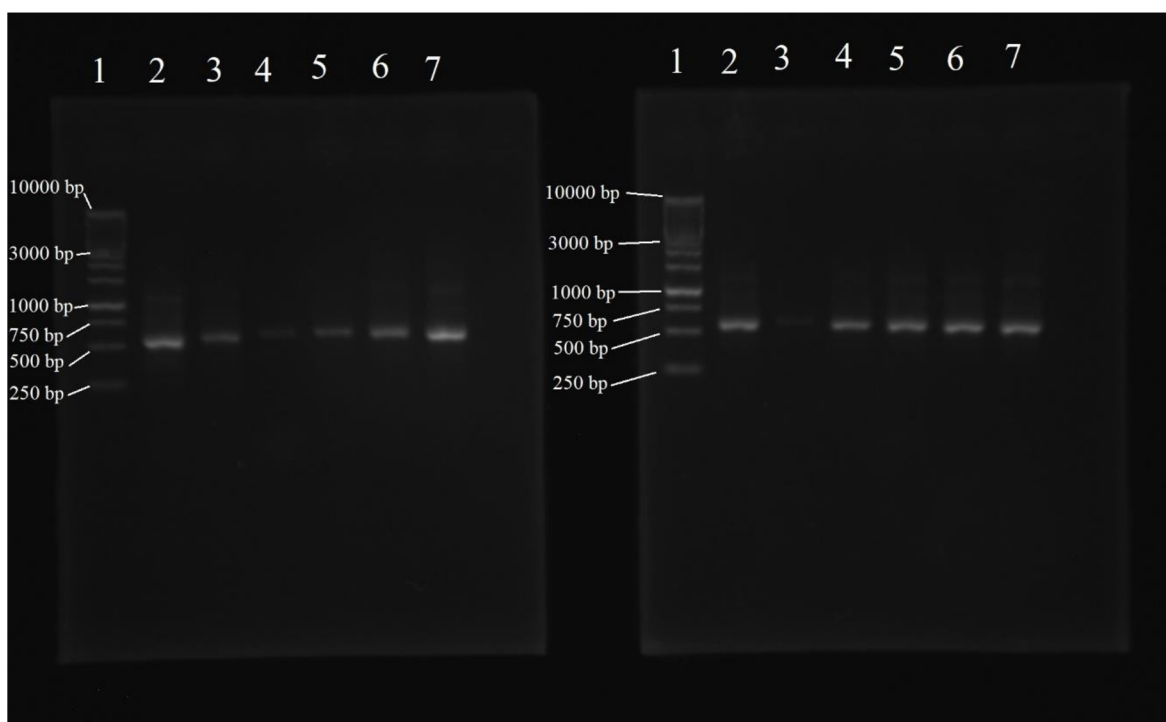
Elektroforéza prvního gelu se nezdařila. Všechny vzorky vyšly negativně. Pravděpodobně mohlo dojít k chybě při nanášení vzorků na gel. Mezi vzorky, které byly umístěny na tento gel, byly vzorky: Fall 3, Lang 1B, Lang 2B, Lang 3, Lang 4, Lang 5, Lang 6, Lang 4B, Lang 6A, Lang 1A, Lang 3A, Lang 5A, Lang 6B, Skafta 1, Solh 5A, Solh 4, Solh 2A, Solh 5B



Obr. 5: Gel s produkty PCR. Zleva doprava: 1. ladder GeneRuler 1 kb DNA Ladder ready-to-use, 2. EBBA 1, 3. EBBA 2, 4. EBBA 1A, 5. EBBA 2A, 6. Nord cry 2A, 7. Goos bukta breen 3A, 8. Goos bukta breen 4, 9. Goos bukta breen 6A, 10. Goos bukta breen 1, 11. Goos bukta breen 2A, 12. Goos bukta breen 3B, 13. Goos bukta breen 4A, 14. Goos bukta breen 5A, 15. Goos bukta breen 6B



Obr. 6: Gel s produkty PCR. Zleva doprava: 1. ladder GeneRuler 1 kb DNA Ladder ready-to-use, 2. Goose bukta breen 2, 3. Ling 3, 4. Goose bukta 8, 5. Solh 3, 6. Lang 1, 7. Ling 2, 8. Ling 10, 9. Lang 3B, 10. Lang 4A, 11. Goose bukta breen 5, 12. Goose bukta breen 9, 13. Solh 5



Obr. 7: Gely s produkty PCR. Levý gel zleva doprava: 1. ladder GeneRuler 1 kb DNA Ladder ready-to-use, 2. EBBA cryo sed dolní část, 3. Skafta 1, 4. Ling 8, 5. EBBA Breen cryo sed, 6. Goose bukta breen 3, 7. Goose bukta breen 6. Pravý gel zleva doprava: 1. ladder GeneRuler 1 kb DNA Ladder ready-to-use, 2. Nord cry 2, 3. Ling 5, 4. Solh 1, 5. Solh 2, 6. Fall, 7. Goose bukta breen 7

Na gelu na obr. 5 vyšly negativně pouze vzorky 7, 10 a 11, ostatní výsledky vyšly mezi 500–750 bp. Z toho vzorky 5, 6, 12, 14 a 15 vyšly vizuálně slabší. Všechny výsledky elektroforézy z gelu na obr. 6 vyšly mezi 500–750 bp. Z toho byly vzorky 5, 6, 9, 10 a 13 vizuálně slabší. Na gelu (levý) na obr. 7 opět všechny výsledky elektroforézy vyšly mezi 500–750 bp. Z toho byly vzorky 3, 4 a 5 vizuálně slabší. Na pravém gelu na obr. 6 opět všechny výsledky elektroforézy vyšly mezi 500–750 bp. Z toho byl pouze vzorek 3 vizuálně slabší.

4.2 Kvantifikace

Výsledky kvantifikace jsou vidět v tab. 2.

Tab. 2: Výsledky kvantifikace

Název vzorku	Název ledovce	Původní koncentrace [ng/μL]	Koncentrace Qubit tube [ng/mL]
Lang 1B	Langjokull	0,0200	1,00
Lang 2B	Langjokull	0,0172	0,86
Lang 3	Langjokull	0,0266	1,33
Lang 4	Langjokull	0,0248	1,24
Lang 5	Langjokull	0,0212	1,06
EBBA 1	Ebbabreen	0,7460	37,30
EBBA 2	Ebbabreen	0,0924	4,62
EBBA 1A	Ebbabreen	9,5400	477
EBBA 2A	Ebbabreen	2,4400	122
Nord cry 2A	Nordenskioldbreen	1,2100	60,70
Goos bukta breen 3A	Goosbukta breen	4,4400	222,00
Goos bukta breen 4	Goosbukta breen	0,2620	13,10
Goos bukta breen 6A	Goosbukta breen	3,9400	1970
Goos bukta breen 1	Goosbukta breen	2,2000	127,00
Goos bukta breen 3B	Goosbukta breen	2,5400	127,00
Goos bukta breen 5A	Goosbukta breen	9,4400	472,00
Goos bukta breen 6B	Goosbukta breen	8,4200	421,00
Nord cry 2	Nordenskioldbreen	3,7000	185,00
Ling 5	Lingbreen	1,4600	73,20
Solh 1	Solheimjokull	0,0174	0,87
Solh 2	Solheimjokull	0,0134	0,67
Fall	Falljokull	0,0732	3,81
Goose bukta breen 7	Goosbukta breen	0,4040	20,20
EBBA cryo sed dol č.	Ebbabreen	0,2880	14,40
Ling 8	Lingbreen	1,1500	57,30
EBBA Breen cryo sed	Ebbabreen	2,5400	127,00
Goose bukta breen 3	Goosbukta breen	1,4400	72,00
Goose bukta breen 6	Goosbukta breen	1,4200	71,20
Goose bukta breen 2	Goosbukta breen	0,2420	12,10
Ling 3	Lingbreen	0,0612	3,06
Goose bukta breen 8	Goosbukta breen	0,3260	16,30
Ling 2	Lingbreen	0,6300	31,50
Ling 10	Lingbreen	0,5580	27,90
Goose bukta breen 5	Goosbukta breen	0,0956	4,78

Ve vzorcích Fall 3, Lang 4B, Lang 6A, Lang 1A, Lang 3A, Lang 5A, Lang 6B, Skafta 1, Solh 5A, Solh 4, Solh 2A, Solh 5B, Goos bukta breen 2A, Goos bukta breen 4A, Skafta 1, Solh 3, Lang 1, Lang 3B, Lang 4A, Goose bukta breen 9, Solh 5 byla koncentrace příliš nízká na to, aby ji zařízení dokázalo změřit. Ostatní vzorky byly měřitelné, ale jejich hodnota DNA byla nižší, jak lze vidět v tab. 2.

5 Analýza dat

Původně bylo zpracováno 56 vzorků, ale u většiny se nepodařilo izolovat dostatečné množství, nebo neuspěly v sekvenační kvalitativní kontrole. Pro další analýzu bylo vybráno 13 vzorků: jeden vzorek pochází z Islandu, šest ze středu Západního Špicberku, tři ze Severovýchodní země a 3 ze severu Západního Špicberku. Bližší informace ke vzorkům, jako je lokace, přesné souřadnice a datum sběru, jsou vidět v tab. 3. V tab. 4 jsou dále zobrazeny počty sekvencí před a po očištění u jednotlivých vzorků.

Tab. 3: Informace o poskytnutých vzorcích (název ledovců a jejich lokace)

Název ledovce	Počet vzorků	Lokace	Souřadnice	Datum sběru
Ebbabreen	3	Střed Západního Špicberku, Svalbard	78.70N, 16.79W	20.07.2017
Falljokul	1	Island	63.98N, 16.73W	14.09.2020
Goosbukta breen	3	Severovýchodní země, Svalbard	80.20N, 19.93E	18.07.2018
Lingbreen	3	Sever Špicberku, Svalbard	79.81N, 12.24W	25.07.2018
Nordenskioldbreen	3	Střed Západního Špicberku, Svalbard	78.68N, 17.12E	03.08.2019

Tab. 4: Počty sekvencí před a po očištění

	Počet hrubé sekvence	Sekvence po očištění
EBB-X-EM	34463	22372
EBB_dol_EM	42518	28945
EBB_hor_EM	40378	32679
FALL-X	46131	26128
GBB_01_EM	38152	27078
GBB_03_EM	34841	23496
GBB_06_EM	41589	30608
LIN_02_EM	40704	24088
LIN_03_EM	39413	28816
LIN_05_EM	38787	27035
NORD_2_LH	38080	26436
NORD_3_LH	30722	20611
NORD_6_LH	35707	24301

V tab. 4 jsou zobrazeny počty hrubých sekvencí, které byly zpracovány sekvenátorem, a počet získaných sekvencí po očištění. Vzorky označené jako EBB pochází z ledovce Ebbabreen, FALL z ledovce Falljoku, GBB z ledovce Goosbukta breen, LIN z ledovce Lingbreen a NORD z ledovce Nordenskioldbreen.

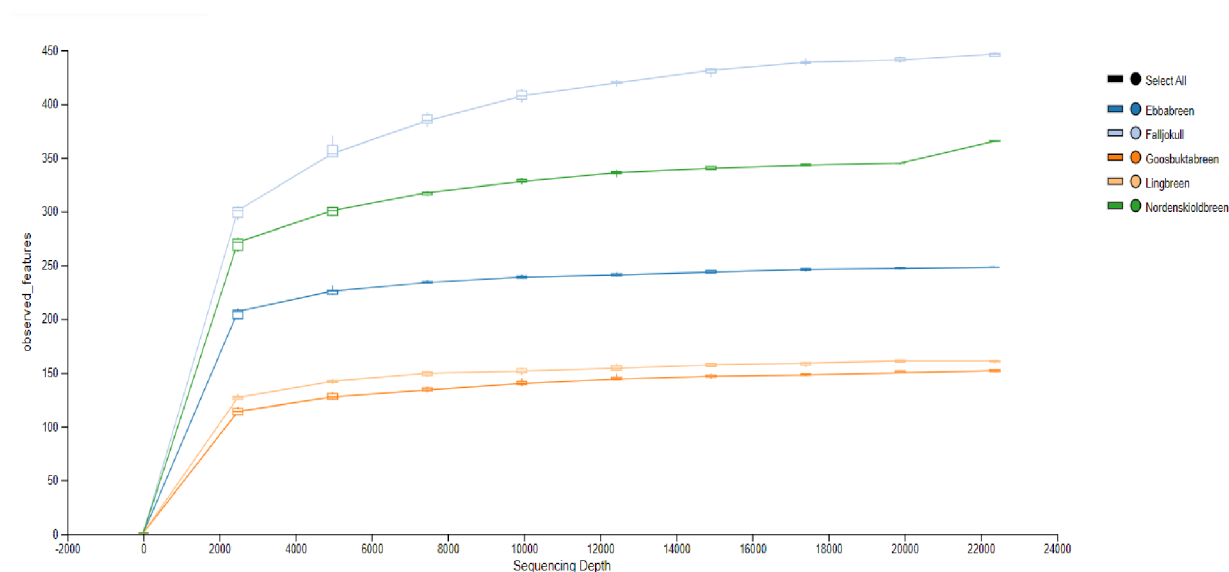
Počet hrubé sekvence se pohyboval v rozmezí od 30722 (pro vzorek NORD_3_LH z ledovce Nordenskioldbreen) do 46131 (pro vzorek FALL-X z ledovce Falljoku). Počet sekvence po očištění se pohyboval od 20611 (pro vzorek NORD_3_LH z ledovce Nordenskioldbreen) do 32679 (pro vzorek EBB_hor_EM z ledovce Ebbabreen).

5.1 Rarefakční křivka

Rarefakce je technika používaná k odhadu a porovnání druhové diverzity ve společenství. Tato metoda zohledňuje rozdíly ve velikosti vzorku tím, že redukuje počet jednotek nebo vzorků na konstantní hodnotu za účelem standardizace nebo srovnání vzorků s různými velikostmi nebo počty jednotek. Cílem je standardizovat a porovnat vzorky s různými velikostmi tak, aby bylo možné případně odhadnout celkovou diverzitu nebo porovnat diverzitu mezi vzorky. Rarefakce nám umožňuje lépe porovnávat vzorky bez toho, abychom

byli ovlivněni rozdílným počtem odebraných jednotek v každém vzorku. Rarefakční křivka je grafické znázornění této analýzy. Tato křivka nám ukazuje, jak se diverzita mění, když zkoumáme vzorky různých velikostí. Čím rychleji roste křivka, tím rychleji jsme objevili nové druhy, což může znamenat, že jsme zachytili více biologické diverzity v daném prostředí. Naopak, pokud křivka roste pomalu nebo se stabilizuje, může to indikovat, že jsme již odhalili většinu dostupné diverzity ve vzorku.

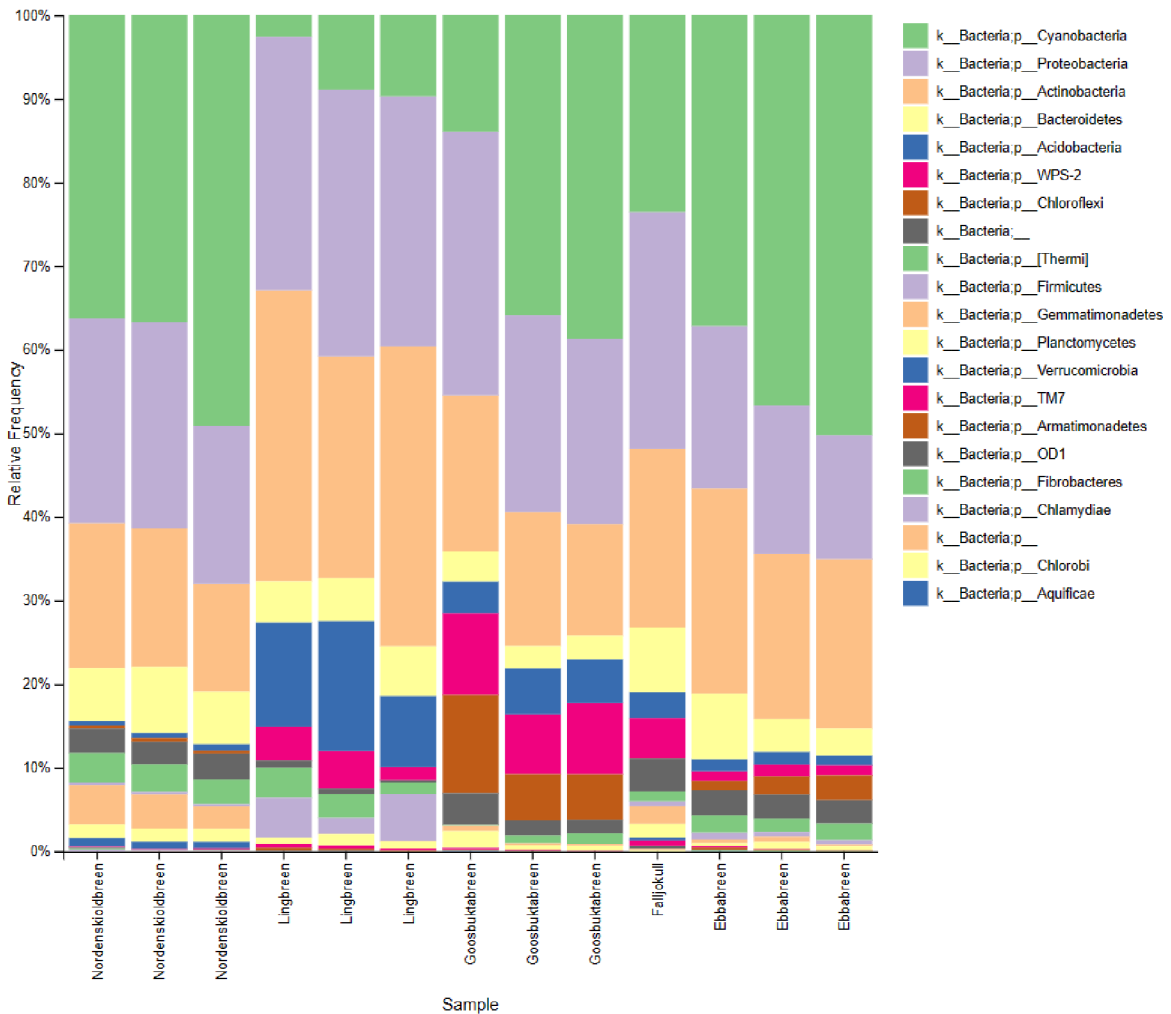
Obr. 8: Alfa rarefakční křivka analyzovaných vzorků



Na obr. 8 je zobrazena rarefakční křivka pro analyzovaná sekvenční data. Osa X zobrazuje hloubku sekvenování, což znamená počet jedinců ve vzorku. Na ose Y je zobrazen počet pozorovaných druhů. Je patrné, že při dosažení hloubky sekvenování kolem 2000 jedinců se křivka stabilizuje, což naznačuje, že vzorky byly dostatečně pokryté a sekvenční hloubka byla adekvátní.

5.2 Taxonomická analýza

Na obr. 9 je zobrazeno taxonomické porovnání na úrovni kmene bakterií.



Obr. 9: Porovnání taxonomických jednotek na úrovni kmene bakterií

V bakteriálních vzorcích z Nordenskiöldbreen dominoval kmen *Cyanobacteria* výskytem v rozmezí od 36,3 % do 49,1 %. Druhým nejčastějším byl kmen *Proteobacteria*, přítomný v četnosti od 18,9 % do 24,7 %. Třetím nejhojnějším kmenem byl *Actinobacteria*, s výskytem od 13 % do 17,3 %. Čtvrtým nejhojnějším byl kmen *Bacteroidetes*, jehož výskyt se pohyboval od 6,2 % do 7,9 %. Mezi dalšími zastoupenými kmeny byly *Gemmatimonadetes*, *Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria* a několik dalších, avšak tyto kmeny se vyskytovaly ve vzorcích s četností menší než 5 %.

V bakteriálních vzorcích z Lingbreen byl nevýrazněji zastoupen kmen *Actinobacteria*, jehož výskyt se pohyboval v rozmezí od 27 % do 35,9 %. Druhým nejčastějším byl kmen *Proteobacteria* přítomný v četnosti od 30 % do 32 %. Třetím nejhojnějším kmenem byl *Acidobacteria* s výskytem od 8,5 % do 16 %. Čtvrtým nejhojnějším byl kmen *Cyanobacteria*, jehož výskyt se pohyboval od 3 % do 10 %. Mezi dalšími zastoupenými

kmeny byly *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *WPS-2* a několik dalších, avšak tyto kmeny se vyskytovaly ve vzorcích s četností menší než 5 %.

V bakteriálních vzorcích z Goosbuktabreen byl nevýrazněji zastoupen kmen *Cyanobacteria*, jehož výskyt se pohyboval v rozmezí od 14 % do 36,7 %. Druhým nejčastějším byl kmen *Proteobacteria* přítomný v četnosti od 22,2 % do 31,5 %. Třetím nejhojnějším kmenem byl kmen *Actinobacteria* s výskytem od 13,4 % do 18,7 %. Čtvrtým nejhojnějším byl kmen *WPS-2*, jehož výskyt se pohyboval od 7,2 % do 9,8 %. Mezi dalšími zastoupenými kmeny byly *Chloroflexi* a *Acidobacteria* a několik dalších, avšak tyto kmeny se vyskytovaly ve vzorcích s četností menší než 5 %.

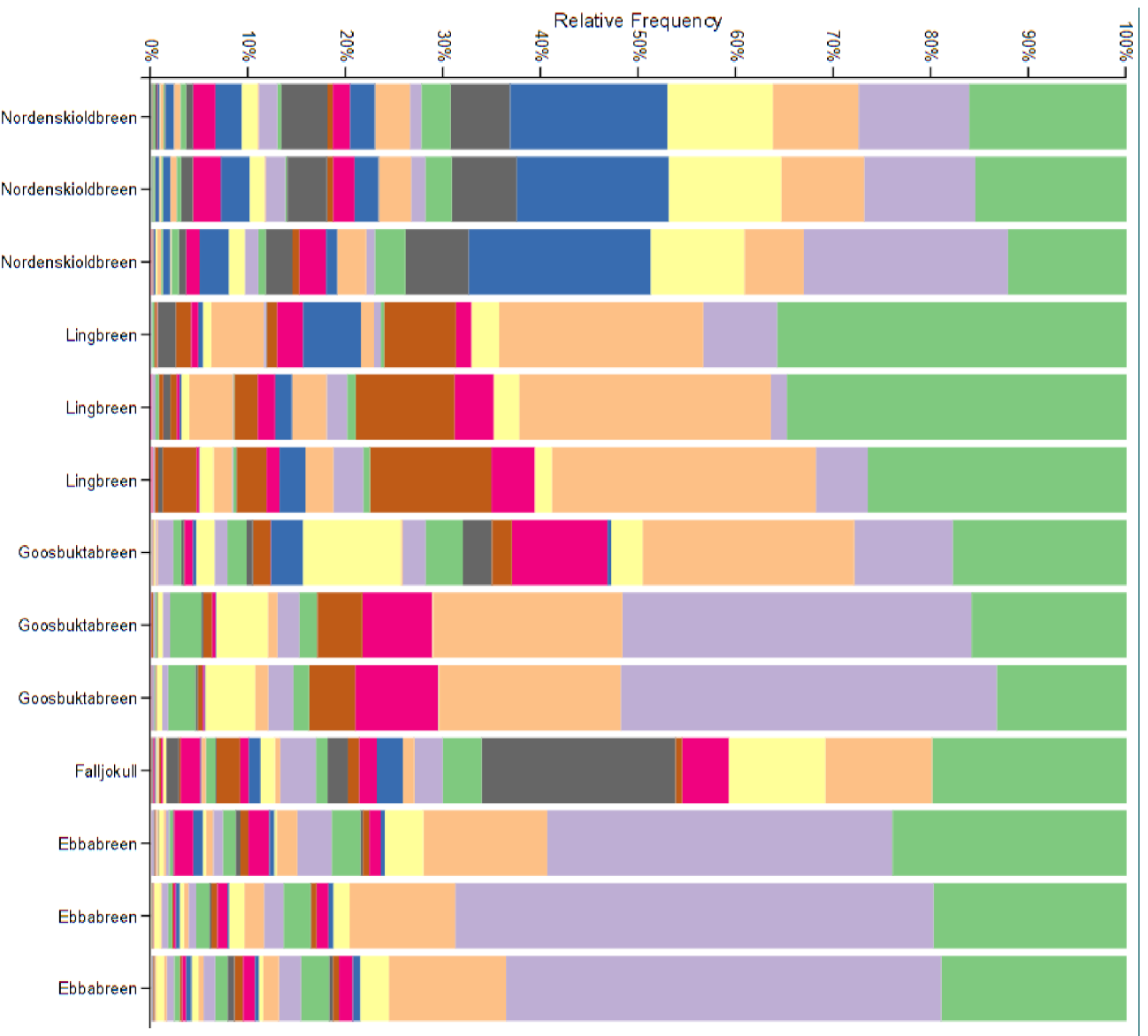
V bakteriálních vzorcích z Falljokull byl nejvýrazněji zastoupen kmen *Proteobacteria*, jehož výskyt byl 28,3 %. Druhým nejčastějším byl kmen *Cyanobacteria*, přítomný v 24 %. Třetím nejhojnějším kmenem byl *Actinobacteria* s výskytem 21,4 %. Čtvrtým nejhojnějším byl kmen *Bacteroidetes*, jehož výskyt byl 7,7 %. Ostatní kmeny se vyskytovaly v tomto vzorku s četností menší než 5 %.

V bakteriálních vzorcích z Ebbabreen byl nejvýrazněji zastoupen kmen *Cyanobacteria*, jehož výskyt se pohyboval v rozmezí od 37,2 % do 50,2 %. Druhým nejčastějším byl kmen *Actinobacteria*, přítomný v četnosti od 19,7 % do 24,5 %. Třetím nejhojnějším kmenem byl *Proteobacteria* s výskytem od 14,8 % do 19,4 %. Ostatní kmeny se vyskytovaly v tomto vzorku s četností menší než 5 %.

Vzorky ze stejného ledovce na obr. 9 jsou si velmi podobné s několika malými výjimkami. Existuje zde sice několik rozdílů, ale ty nejsou tak viditelné. Jedinou výjimku tvoří první vzorek z Goosbuktabreen, který má méně zástupců z kmene sinic v porovnání s dalšími dvěma vzorky z tohoto ledovce.

Pokud porovnáme vzorky ledovců mezi sebou na úrovni kmene, zjistíme, že nejvíce se od ostatních liší vzorky z Lingbreen, které obsahují znatelně méně sinic než ostatní vzorky. Ostatní ledovce si jsou vcelku podobné, kromě Nordenskioldbreen, který ovšem neobsahuje kmeny, jež se v ostatních vzorcích sice vyskytovaly, ale pouze ve velmi malém množství.

Na obr. 10 je zobrazeno taxonomické porovnání na úrovni třídy bakterií.



Obr. 10: Porovnání taxonomických jednotek na úrovni třídy bakterií (legenda je zobrazena na obr.11)

	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Actinobacteria		k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__[Spartobacteria]
	k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Oscillatoriothycidae		k__Bacteria;p__Planctomycetes;c__vadinHA49
	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria		k__Bacteria;p__Aquificae;c__Aquificae
	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria		k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__ML635J-21
	k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Nostocophycidae		k__Bacteria;p__Armatimonadetes;c__Chthonomonadetes
	k__Bacteria;p__WPS-2;c__		k__Bacteria;p__OD1;c__ZB2
	k__Bacteria;p__Acidobacteria;c__Acidobacteriia		k__Bacteria;p__OD1;c__
	k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Synechococophycidae		k__Bacteria;p__OD1;c__SM2F11
	k__Bacteria;p__		k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Thermoleophila
	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__		k__Bacteria;p__Planctomycetes;c__
	k__Bacteria;p__[Thermi];c__Deinococci		k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__[Rhodothermi]
	k__Bacteria;p__Chloroflexi;c__Ktedonobacteria		k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__
	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Gammaproteobacteria		k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli
	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Cytophagia		k__Bacteria;p__Chlorobi;c__Chlorobia
	k__Bacteria;p__Acidobacteria;c__Solibacteres		k__Bacteria;p__Chloroflexi;c__Thermomicrobia
	k__Bacteria;p__Gemmatimonadetes;c__Gemmatimonadetes		k__Bacteria;p__Acidobacteria;c__
	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__		
	k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Deltaproteobacteria		
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Clostridia		
	k__Bacteria;p__Planctomycetes;c__Planctomycetia		
	k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__		
	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__[Saprosirae]		
	k__Bacteria;p__Cyanobacteria;c__Chloroplast		
	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Sphingobacteriia		
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__Acidimicrobia		
	k__Bacteria;p__Chloroflexi;c__Anaerolineae		
	k__Bacteria;p__Actinobacteria;c__		
	k__Bacteria;p__Chloroflexi;c__C0119		
	k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__Verrucomicrobiae		
	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Bacteroidia		
	k__Bacteria;p__TM7;c__TM7-3		
	k__Bacteria;p__Acidobacteria;c__Holophagae		
	k__Bacteria;p__Firmicutes;c__		
	k__Bacteria;p__Armatimonadetes;c__Armatimonadia		
	k__Bacteria;p__Bacteroidetes;c__Flavobacteriia		
	k__Bacteria;p__TM7;c__TM7-1		
	k__Bacteria;p__Chloroflexi;c__Chloroflexi		
	k__Bacteria;p__OD1;c__		
	k__Bacteria;p__Planctomycetes;c__Phycisphaerae		
	k__Bacteria;p__Fibrobacteres;c__Fibrobacteriia		
	k__Bacteria;p__Chlamydiae;c__Chlamydia		
	k__Bacteria;p__Armatimonadetes;c__[Fimbriimonadia]		
	k__Bacteria;p__c__		
	k__Bacteria;p__TM7;c__SC3		
	k__Bacteria;p__Chlorobi;c__		
	k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__Opitutae		
	k__Bacteria;p__Verrucomicrobia;c__[Pedosphaerae]		

Obr. 11: Legenda k obr. 10

V bakteriálních vzorcích z Nordenskiöldbreen na obr. 10 byla nejvýrazněji zastoupena z *Cyanobacteria* třída Nostocophycidae, jejíž výskyt se pohyboval v rozmezí od 15,6 % do 18,7 %. Druhou nejčastější třídou z *Cyanobacteria* byly *Oscillatoriothycidae*, jejichž

výskyt se pohyboval v rozmezí 11,3 % až 21 %. Třetí nejčastější třídou z *Cyanobacteria* byly *Synechococcophycidae*, s výskytem v rozmezí od 6,1 % do 6,7 %. Nejčastější třídou z *Proteobacteria* byly *Betaproteobacteria*, přítomné v četnosti od 9,6 % do 11,5 %. Druhou nejčastější třídou z *Proteobacteria* byly *Alphaproteobacteria*, které byly přítomny v četnosti od 6,1 % do 8,8 %, *Gammaproteobacteria* se vyskytovaly pouze v četnosti od 1,1 % do 2,5 %. Četnost *Actinobacteria* se pohybovala od 12,2 % do 16,2 %. Z kmene *Bacteroidetes* byla nejvíce zastoupena třída *Cytophagia*, s výskytem v rozmezí 1,8 % až 2,7 %.

V bakteriálních vzorcích z Lingbreen na obr. 10 byly nevýrazněji zastoupeny *Actinobacteria* s výskytem od 26,5 % do 35,8 %. Z *Proteobacteria* byly nejvíce přítomny *Alphaproteobacteria* v četnosti od 21 % do 27 %. Druhou nejčastější třídou z *Proteobacteria* byly *Gammaproteobacteria* v četnosti od 1,7 % do 5,9 %. A třetí nejčastější třídou z *Proteobacteria* byly *Betaproteobacteria* v četnosti od 1,7 % do 2,8 %. *Acidobacteria* byly nejvíce zastoupeny s výskytem v rozmezí od 7,4 % do 12,5 %. Z kmene *Cyanobacteria* byly nejvíce zastoupeny *Oscillatoriothycidae*, jejichž výskyt se pohyboval od 1,6 % do 7,6 %.

V bakteriálních vzorcích z Goosbuktabreen na obr. 10 byly nevýrazněji z kmene *Cyanobacteria* zastoupeny *Oscillatoriothycidae*, jejichž výskyt se pohyboval v rozmezí od 10,1 % do 38,6 %. Z *Proteobacteria* byly nejvíce zastoupeny *Alphaproteobacteria*, které byly přítomny v četnosti od 18,6 % do 21,7 %. *Betaproteobacteria* se vyskytovaly pouze v jednom vzorku s četností 3,2 % a *Gammaproteobacteria* se vyskytovaly také pouze u jednoho vzorku s četností 3,3 %. *Actinobacteria* se zde vyskytovaly s četností od 13,3 % do 17,8 %. Výskyt WPS-2 se v těchto vzorcích pohyboval od 7,2 % do 9,8 %. Z *Chloroflexi* byly nejvíce zastoupeny *Ktedonobacteria*.

V bakteriálních vzorcích z Falljokull na obr. 10 byly z kmene *Proteobacteria* nejvíce zastoupeny *Alphaproteobacteria*, jejichž výskyt byl 11 %, dále *Betaproteobacteria*, jejichž výskyt byl 9,9 %, a nakonec *Gammaproteobacteria* s výskytem 2,7 %. Z *Cyanobacteria* byly nejvíce přítomny *Synechococcophycidae*, které byly přítomny v 19,9 %. *Actinobacteria* se zde vyskytovaly s četností 20 %. Z *Bacteroidetes* se zde nejvíce vyskytovaly *Bacteroidia* s výskytem 2,1 % a *Cytophagia*, jejichž výskyt byl 1,8 %.

V bakteriálních vzorcích z Ebbabreen na obr. 10 byly z kmene *Cyanobacteria* nejvíce zastoupeny *Oscillatoriothycidae*, jejichž výskyt se pohyboval v rozmezí od 35,4 % do 49 %. *Actinobacteria* zde byly přítomny v četnosti od 19 % do 24 %. Z *Proteobacteria* se zde nejvíce vyskytovaly *Alphaproteobacteria* s výskytem od 10,8 % do 12,7 %, dále se

nejvíce vyskytovaly *Betaproteobacteria* s četností od 1,6 % do 3,9 %, *Gamaproteobacteria* se vyskytovaly v četnosti od 0,4 % do 0,5 %, z toho *Gamaproteobacteria* zcela chyběla v jednom vzorku z Ebbabreen.

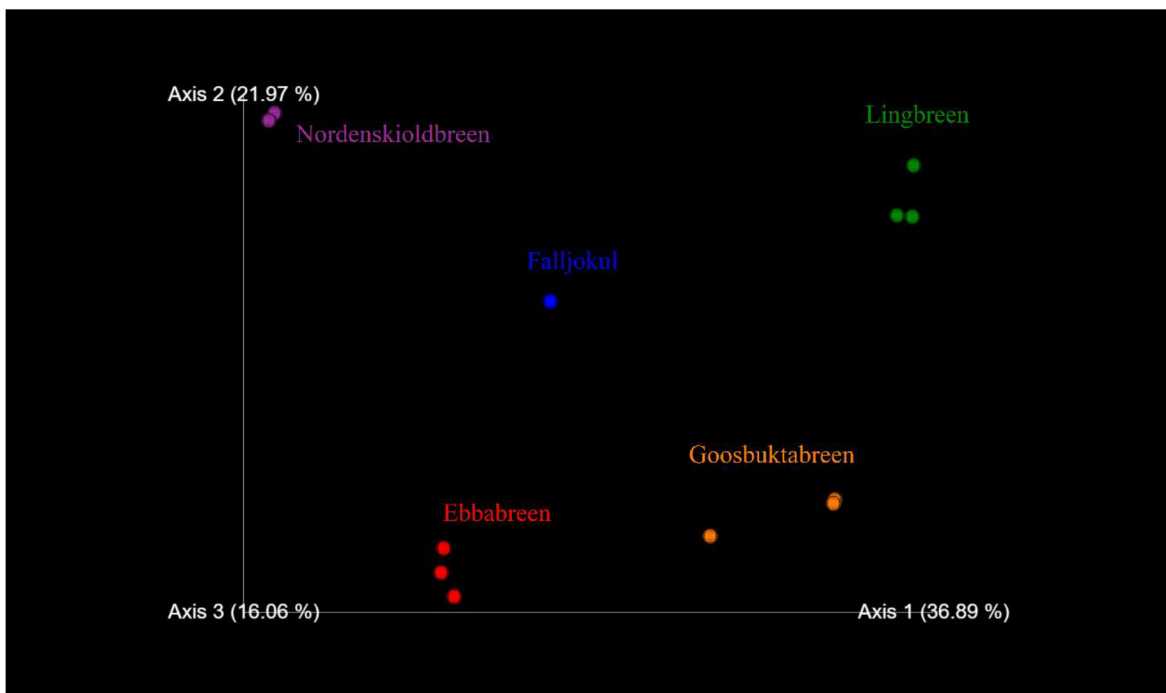
Na první pohled jsou si vzorky ze stejného ledovce na obr. 10 velmi podobné. Jedinou výjimku snad tvoří první vzorek z Goosbuktabreen, který obsahuje poměrně méně *Oscillatoriothycidea* než další dva vzorky ze stejného ledovce. Dále se na rozdíl od těchto dvou vzorků v prvním vzorku objevovaly *Betaproteobacteria*.

Pokud porovnáme vzorky ledovců mezi sebou na úrovni třídy, zjistíme, že si nejsou podobné. Pravděpodobně nejvíce se od ostatních liší vzorky z Lingbreen, které obsahují znatelně méně tříd z kmene *Cyanobacteria* než ostatní vzorky.

Je důležité zdůraznit, že přesnější taxonomické rozlišení je omezené, jelikož mnoho taxonomických jednotek nelze přiřadit konkrétnímu druhu nebo rodu.

5.3 Porovnání dat z ledovců podle Bray-Curtise

Na obr. 12 je znázorněna PCoA analýza podle Bray-Curtise. Tato metoda slouží k vizualizaci a porovnání podobnosti nebo rozdílnosti mezi různými vzorky nebo skupinami vzorků na základě jejich druhového složení.

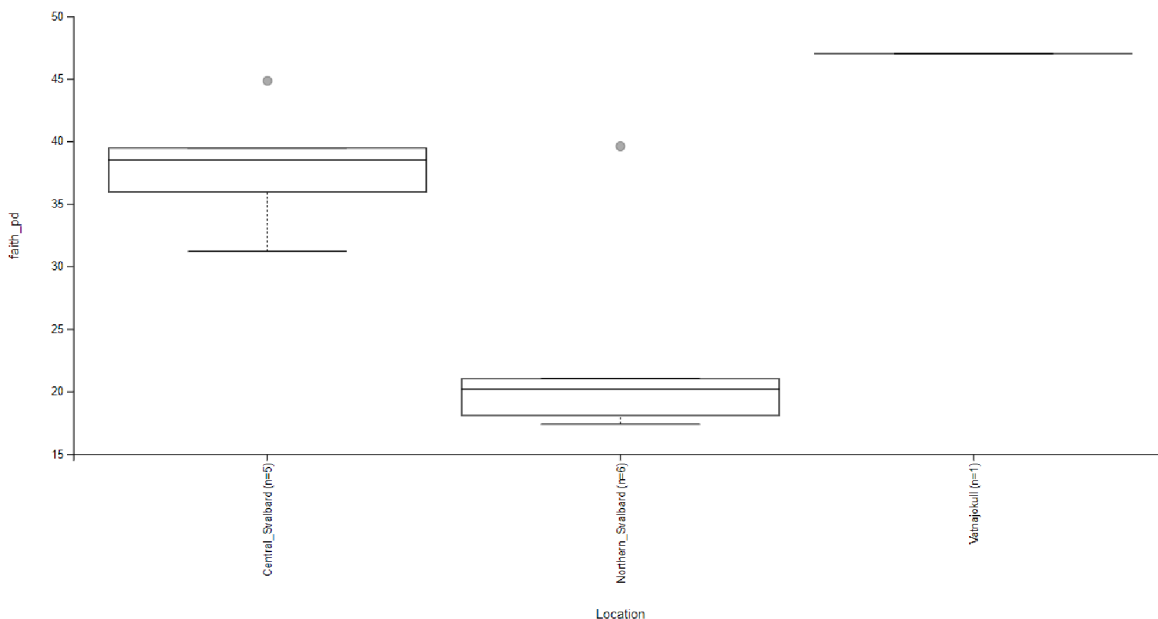


Obr. 12: Graf podle Bray-Curtise (červeně jsou znázorněny vzorky z Ebbabreen, oranžově vzorky z Goosbuktabreen, zeleně vzorky z Lingbreen, fialově vzorky z Nordenskioldbreen a modře vzorek z Falljokull)

Graf na obr. 12 nám ukazuje míru podobnosti nebo odlišnosti mezi vzorky. Je patrné, že vzorky z jednoho ledovce jsou blízko sebe, což naznačuje vysokou míru podobnosti, dokonce až shodu ve druhovém složení. Naopak složení vzorků z různých ledovců se liší. To naznačuje, že tyto vzorky pravděpodobně nemají mnoho společných druhů nebo vykazují nízkou míru sdílení ve druhovém složení, což může být způsobeno odlišnými lokalitami.

5.4 Porovnání mezi lokalitami

Boxplot byl použit k porovnání Islandu, severního a středního Svalbardu.



Obr. 13: Boxplot alfa diversity zkoumaných ledovců

Na obr. 13 je prezentován boxplot alfa diverzity zkoumaných lokalit. Málo vzorků omezuje možnosti srovnání, zejména proto, že z Islandu máme k dispozici pouze jediný vzorek. Tímto omezením je ovlivněno srovnání mezi lokalitami ze Svalbardu a z Islandu. Z grafu lze vyčíst, že jsou diverzity lokalit rozdílné. Společně s tímto grafem byl proveden i Kruskal-Wallis test, aby se ověřilo, zda jsou tyto rozdíly statisticky významné. P-hodnoty z Kruskal-Wallisova testu jsou vidět v tab. 5. P-hodnota mezi Severním a středním Svalbardem byla podle Kruskal-Wallis testu menší než 0,05, což znamená, že vzorky ze středního a severního Svalbardu prokazatelně vykazují statisticky signifikantní rozdíly. V případě srovnání Islandu se severním a následně i středním Svalbardem byla p-hodnota dle Kruskal-Wallisova testu vyšší než 0,05, což naznačuje nedostatek statisticky významných rozdílů mezi těmito vzorky. Je však třeba poznamenat, že vzhledem k tomu, že z Islandu máme k dispozici pouze jeden vzorek, může být interpretace těchto dat zkreslena.

Tab. 5: Výsledky P-hodnoty z Kruskal-Wallisova testu

Skupina 1	Skupina 2	P-hodnota
Střední Svalbard	Severní Svalbard	0,044610
Střední Svalbard	Island	0,143235
Severní Svalbard	Island	0,133614

6 Diskuse

Tato práce byla zaměřena na složení společenství mikroorganismů z kryokonitových otvorů, které pocházely z Arktidy, přesněji z Islandu, a dále ze tří oblastí Svalbardu, a to ze středu Západního Špicberku, Severu Špicberku a ze Severovýchodní země.

Dříve než se pustíme do porovnávání vzorků, bych chtěla zdůraznit, že porovnání Svalbardu s Islandem je pouze velmi orientační, jelikož disponujeme pouze jedním vzorkem z Islandu. Získané výsledky naznačují, že mikrobiální složení se liší v závislosti na lokalitě a ledovci, avšak počet analyzovaných vzorků byl relativně nízký, proto toto zjištění nemusí být průkazné, i když pro porovnání mezi ledovci by data měla být dostačující. Pro potvrzení tohoto zjištění by bylo nezbytné provést další analýzy a studia na širším počtu vzorků a lokalit.

Z výsledků bylo zjištěno, že nejvýraznější rozdíly mezi vzorky vykazují vzorky z ledovce Lingbreen, kde byl zaznamenán nižší počet tříd *Cyanobacteria* než v ostatních vzorcích. Místo toho se zde vyskytovaly více *Actinobacteria*, než bylo zaznamenáno u ostatních vzorků. Jedním z možných vysvětlení může být, že zde vyskytující se *Actinobacteria* mohly inhibovat růst a vývoj *Cyanobacteria*. Některé druhy *Actinobacteria* jsou totiž schopné produkovat sekundární metabolity, například antibiotika, která mohou být toxická pro jiné bakterie, včetně cyanobakterií. Dalším faktorem, proč by se ve vzorcích mohlo objevovat znatelně méně *Cyanobacteria*, je nedostatek slunečního záření. *Cyanobacteria* jsou totiž fotosyntetizující organismy, které potřebují k fotosyntéze sluneční záření. Omezený přístup ke slunečnímu záření mohl být způsoben zamrznutím kryokonitového otvoru vrstvou ledu, i když to se nejeví jako pravděpodobné, jelikož vzorky byly odebírány v letním období, kdy k zamrznutí většinou nedochází. Nedostatek slunečního záření by ale mohl být způsoben silnější vrstvou sedimentu, kterou by světlo nemuselo projít až k mikroorganismům (Barka et al. 2016; Cook et al. 2016). To tedy mohlo vést k menšímu zastoupení *Cyanobacteria* v porovnání s ostatními bakteriálními skupinami, jako jsou právě *Actinobacteria*. Měřením těchto parametrů se ale tato práce nezabývala.

Dalším rozdílem byly vzorky u Nordenskioldbreen, kde se narozdíl od ostatních vzorků vyskytovaly z *Proteobacteria* více *Betaproteobacteria* než *Alphaproteobacteria*. Toto by mohlo být způsobeno například odlišným pH. *Alphaproteobacteria* totiž preferují prostředí s pH větším než 5 oproti *Betaproteobacteria*, které upřednostňují prostředí, kde je pH menší

než 5. Dalším důvodem by mohla být vyšší teplota, jelikož *Betaproteobacteria* bývají většinou mezofilní, i když i psychofilní *Betaproteobacteria* nejsou výjimkou. Jiným důvodem, proč se v těchto vzorcích vyskytuje více *Betaproteobacteria*, mohl být nedostatek kyslíku. Je sice pravda, že obě třídy *Proteobacteria* jsou schopné snášet nedostatek kyslíku podobně dobře, je ale možné, že se v našich vzorcích vyskytovaly kmeny *Alphaproteobacteria*, které nedostatek kyslíku snáší znatelně hůře (Klann et al. 2016; Dworkin et al. 2006).

Dále bylo zjištěno, že kromě vzorků z Nordenskiöldbreen byly z *Cyanobacteria* nejvíce zastoupeny *Oscillatoriothycidae*, v tomto případě byly častější *Nostocophycidae*. Dále ještě bylo zjištěno, že se ve vzorku z Falljokul tyto dvě zmíněné třídy *Cyanobacteria* vůbec nevyskytují, místo toho se zde vyskytuje třída *Synechococcophycidae*. Vyšší výskyt *Nostocophycidae* než *Oscillatoriothycidae* by mohl způsoben odlišnými podmínkami v kryokonitových otvorech. Jedním z faktorů by například mohlo být, podobně jako to bylo zmíněno u vyššího výskytu *Betaproteobacteria* v těchto vzorcích, nižší pH, které by *Oscillatoriothycidae* nemuselo vyhovovat. Dalším faktorem by stejně jako u *Betaproteobacteria* mohla být vyšší teplota. Pokud jde o absenci *Nostocophycidae* a *Oscillatoriothycidae* ve vzorku z Falljokul, mohlo by to být způsobeno například narušením zdejšího ekosystému. Pokud by došlo k narušení přirozeného prostředí, například v důsledku lidské činnosti, znečištění vody nebo změn v podnebí, mohlo by to vést k úbytku nebo úplné absenci *Nostocophycidae* a *Oscillatoriothycidae*. Dále mohlo dojít k významným změnám v podmínkách prostředí, jako je změna teploty, pH, dostupnosti živin nebo osvětlení, i toto mohlo mít negativní dopad na růst a přežití těchto dvou tříd. Pokud by *Nostocophycidae* a *Oscillatoriothycidae* zmizely z těchto kryokonitových otvorů, mohlo by to být důvodem, proč se zde tak daří *Synechococcophycidae*, které se v ostatních vzorcích vyskytovaly minimálně nebo dokonce vůbec. Díky absenci konkurence by jejich počet mohl neomezeně růst (Singh et al. 2016). Samozřejmě v našem případě by nedostatek sinic u vzorku Falljokul, který pochází z Islandu, mohl být způsobený pouhou náhodou, jelikož disponujeme pouze jedním vzorkem. Mohlo by se tedy jednat o anomálii.

Rozdíly mezi Ledovcem Lingbreen a zbytkem ledovců ze Svalbardu může být způsobený faktem, že ledovec Lingbreen se na rozdíl od ostatních ledovců ze Svalbardu vyskytuje blíže moře. Pokud jde o ledovec Falljokul může rozdílné složení mikroorganismů být způsobeno faktem, že se tento ledovec nachází na Islandu oproti ostatním ledovcům, které se nacházejí na souostroví Svalbard. Jak již bylo uvedeno, srovnání s Islandem nemá velkou vypovídající

hodnotu, protože máme k dispozici pouze jeden vzorek. Tento vzorek by mohl představovat anomálii.

Další rozdíly v mikrobiálním složení mohou být způsobeny odlišným zdrojem organického materiálu, který se dostává do kryokonitových otvorů. Tento organický materiál je základem pro růst a vývoj mikroorganismů, a tak odlišnosti v těchto zdrojích mohou ovlivnit druhovou diverzitu mikrobů. Se zdrojem nejen organického materiálu souvisí i větrné podmínky, které ovlivňují transport prachu, sazí a dalších částic do kryokonitových otvorů. Různé vzdušné proudy mohou přinášet odlišné materiály do těchto jamek, což může ovlivnit složení mikroorganismů. Různé geografické a geologické podmínky různých částí Arktidy taktéž mohou mít odlišný vliv na dostupnost živin a minerálů v kryokonitových otvorech. To může následně ovlivnit složení mikroorganismů, které jsou schopny prosperovat v daném prostředí. Tato práce se na obsah organického materiálu nezaměřuje, pro potvrzení této hypotézy by bylo nutné provést nové zkoumání (Poniecka et al. 2020; Kaczmarek et al. 2016).

Dále na rozdílnost mikrobiálního společenství mohou mít vliv klimatické podmínky. Rozdíly v teplotě, slunečním záření a srážkách mohou výrazně ovlivnit podmínky v kryokonitových otvorech. Různé oblasti Arktidy mají odlišné klimatické podmínky, což může ovlivnit typy a množství mikroorganismů, které se v těchto prostředích mohou vyskytovat. Pokud se zaměříme na naše vzorky a místa, odkud pocházejí, tak zjistíme, že na Islandu bývá v létě přibližně kolem 10 °C, zatímco na Svalbardu bývá přibližně kolem 5 °C, přičemž na západním pobřeží Svalbardu je vyšší teplota než na východě a severu, přibližně o 5 °C. Tyto rozdíly v teplotách mohou způsobovat rozdílné seskupení mikroorganismů v našich vzorcích (Poniecka et al. 2020; Liestol 1993; Thordarson a Höskuldsson 2014).

Dalším cílem této práce bylo porovnat získaná data s daty z genetických databází a literatury. Ve všech vzorcích ledovců *Cyanobacteria* vystupovaly jakožto nejhojnější kmen bakterií, nebo alespoň patřily mezi nejčastější tři kmeny. Jedinou výjimku tvořil ledovec Lingbreen. Nejčastější třídou *Cyanobacteria* byly u všech vzorků Oscillatoriothycidae, kromě vzorku u ledovce Flljokull, kde se nejvíce vyskytovaly Synechococcophycidae. Tento nález se shoduje s existující literaturou, která taktéž označuje tyto dvě čeledi za nejčastěji se objevující se v kryokonitu (Rozwalak et al. 2022; Gokul et al. 2016).

Není divu, že mezi nejčastější kmeny vyskytující se v kryokonitových otvorech patří zrovna *Cyanobacteria*. Ty zde díky fotosyntéze fungují totiž jako primární producenti. Vytvářejí

organickou hmotu z anorganické za využití energie ze slunečního záření, kterou záhy uvolňují do prostředí. Na této vzniklé hmotě se živí ostatní mikroorganismy, které se v kryokonitových otvorech nacházejí. Dále jsou také *Cyanobacteria* zapojeny do biogeochemických cyklů, jako je cyklus dusíku. Některé druhy jsou schopny fixovat dusík z atmosféry, což zvyšuje dostupnost dusíku pro organismy v ekosystémech. Některé druhy cyanobakterií jsou schopny přežít v extrémních podmínkách, jako je nízká teplota, vysoké UV záření a omezená dostupnost živin. Tato schopnost přežití umožňuje sinicím kolonizovat a prosperovat v těchto extrémních prostředích. (Anesio et al. 2017; Zahra et al. 2020; Singh et al. 2016).

Jako druhý nejhojnější kmen se vyskytují *Proteobacteria*. V rámci tohoto kmene byly v našich vzorcích nejčastěji zastoupeny *Alphaproteobacteria*, následovány *Betaproteobacteria* a *Gammaproteobacteria*. Pouze u vzorku z Lingbreen převládaly *Gammaproteobacteria* nad *Betaproteobacteria*. U dvou vzorků z Goosbuktabreen a jednoho vzorku z Ebbabreen se *Gammaproteobacteria* nevyskytovaly vůbec.

Proteobacteria mají jako gramnegativní bakterie vnější membránu složenou z lipopolysacharidů, které mohou mít různé formy včetně koků, tyčinek a spirál. Mnoho druhů obou tříd může být aerobních, anaerobních nebo fakultativně anaerobních. *Alphaproteobacteria* jsou obecně spojovány s metabolicky různorodými skupinami, zatímco *Betaproteobacteria* jsou často spojovány s druhy, které jsou schopné využívat různé formy dusíku. *Alphaproteobacteria* jsou často spojovány se symbiotickými vztahy s rostlinami nebo živočichy, včetně různých druhů rhizobakterií a patogenních druhů. Na druhou stranu jsou *Betaproteobacteria* často spojovány s prostředími, jako jsou půdy, sladké vody a kontaminované prostředí, kde mohou hrát roli při cyklu dusíku a oxidaci železa. *Proteobacteria* v kryokonitu zachycují a recyklují živiny, čímž dopomáhají ke koloběhu živin, a tím udržují kolonii v kryokonitu naživu. Podle existující literatury se nejvíce v kryokonitu objevují *Betaproteobacteria* a až poté *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* se z těchto tří tříd v kryokonitu objevují nejméně často. V našich vzorcích byl poměr *Alphaproteobacteria* a *Betaproteobacteria* opačný (Gokul et al. 2016; Edwards et al. 2013; Dworkin et al. 2006).

Třetím nejhojnějším kmenem bakterií byli *Actinobacteria*. Ty jsou schopné produkovat řadu bioaktivních látek, jako jsou například antibiotika, antimykotika a antivirotika. *Actinobacteria*, i když se na rozdíl od *Cyanobacteria* nepodílejí na vytváření ekosystému

kryokonitových otvorů, jsou podobně důležité, jelikož umožňují důležité procesy a také biotické interakce, díky čemuž dále ovlivňují strukturu komunity, která se v kryokonitu nachází. Dokáží například syntetizovat řadu enzymů, jako jsou proteázy, lipázy, amylázy a chitinázy. Tyto enzymy hrají zásadní roli v procesech koloběhu živin v různých biotopech (Gokul et al. 2016; Barka et al. 2016).

Tato studie nám umožnila získat vhled do složení společenství kryokonitových otvorů. Proč ale tato společenství z ledovců vůbec zkoumat? Již v úvodu bylo zmíněno, že některé mikroorganismy z kryokonitových otvorů mají antibiotickou rezistenci. Tato schopnost mohla u mikroorganismů v polární oblasti vzniknout z více důvodů. Například mohla vzniknout pomocí genetických mutací, které poté svému majiteli poskytnou rezistenci na antibiotika, nebo může dojít k přenosu genů z mikrobiálních jedinců, kteří tuto schopnost mají na ty, které rezistencí neoplývají, aniž by byli nějak příbuzní, tomuto se říká horizontální přenos genů, dále sem mohly být rezistentní mikroorganismy zavlečeny pomocí stěhovavých ptáků anebo prostřednictvím lidského odpadu, jako například ve formě potravin nebo exkrementů (Sjölund et al. 2008). Obecně se za příčinu vzniku a šíření antibiotické rezistence považuje nadužívání a nesprávné užívání antibiotik. Dále se k faktorům řadí například špatná hygiena v chudších zemích, cestovní ruch, nedostatečný přístup k čisté vodě, změna klimatu (Depta a Niedźwiedzka-Rystwej 2023), užívání antibiotických látek v hospodářství jakožto růstových faktorů při chovu zvířat nebo pro antibiotickou léčbu hospodářských zvířat, která jsou využita k produkci potravin. Bylo prokázáno, že se i v polárních oblastech našly organismy, které jsou spjaté s člověkem (př. *Campylobacter* a *Salmonella*). *E. coli* a *K. pneumoniae* jsou schopné přenášet své geny, které nesou antibiotickou rezistenci, na jiné bakterie pomocí konjugace. Tuto vlastnost nemusí předat pouze svému druhu, ale jsou schopné ji odevzdat i úplně jinému druhu. Tyto nové bakterie, které dostanou rezistenci vůči antibiotikům, navíc obdrží také schopnost jí šířit dále. To má za následek rapidní zvýšení počtu bakteriálních druhů, které jsou vůči antibiotikům rezistentní (Hernández a González-Acuña 2016).

Je sice pravda, že některé bakterie měly rezistenci vůči antibiotikům mnohem dříve, než došlo k znečištění kvůli jejich nadměrnému používání. Například některé půdní bakterie produkují antibiotika, aby se zbavily konkurence, která by je mohla připravit o potravu. Rezistence vůči antibiotikům a těžkým kovům se přirozeně vyskytuje u antarktických psychrotrofních bakterií, ale i krilu nebo mořských ježků. Dále se geny antibiotické rezistence přirozeně vyskytují v povrchových půdách Antarktidy, které inaktivují

aminoglykosidy, chloramfenikol a β -laktamová antibiotika (Morozova et al. 2022). Studie z roku 2011 popisuje přítomnost genů, které kódují rezistenci vůči moderním antibiotikům, získaných ze sedimentu arktického sedimentu, který je starý přibližně 30 000 let (Hernández a González-Acuña 2016). Ale i přesto všechno nemůžeme přehlížet nebezpečí rozšiřování antibiotické rezistence po celém světě, dokonce i do odlehlých oblastí, jako jsou póly (Depta a Niedźwiedzka-Rystwej 2023).

Proč ale zkoumat antibiotickou rezistenci u mikroorganismů z polárních oblastí? Póly jsou totiž skvělým místem pro zkoumání genů antibiotické rezistence, jelikož to jsou místa s menší antropogenní činností, která by nám mohla poskytnout vhled do diverzity primárních genů a taktéž nám pomoci pochopit historický vývoj rezistence na antibiotika. Můžeme zde sledovat vývoj rezistence na antibiotika, což nám může pomoci porozumět původu rezistentních genů na antibiotika mimo klinické podmínky (Depta a Niedźwiedzka-Rystwej 2023). I když je dnes rezistence vůči antibiotikům u mikroorganismů velmi studovaným tématem, o rezistenci u mikroorganismů v kryosféře toho zatím moc nevíme. Je to způsobeno hlavně problematikou hodnocení citlivosti k antibiotikům. Testy, které se normálně používají, jsou přizpůsobené hlavně lidským patogenům, které ke svému růstu vyžadují jiné podmínky než ty pocházející z kryosféry. Musí tedy nejdříve dojít k úpravě těchto testů (Gattinger et al. 2023).

Dalším důležitým důvodem, proč studovat mikroorganismy z ledovců je také, že by se zde mohly vyskytovat organismy, které jsou patogenní. Některé mikroorganismy jsou schopné přežít zamrznutí v ledu nebo ledovci, kde mohou přetrvávat několik let, ale dokonce i několik tisíciletí. Pokud se ale led rozpustí, tyto mikroorganismy se začlení do současné populace a může dojít k promíchání starověkých a moderních genotypů, tomu se říká „recyklace genomu“. Tento jev může vést ke změně poměru alel v populaci, což může mít vliv na míru mutací, odolnosti, přežití, patogenity a dalších vlastností. U patogenních mikrobů, které přežijí zmrazení (např. chřipkové viry), se mohou, pokud v ledu zůstanou dostatečně dlouho, vyvinout mechanismy, které jim pomáhají překonat odolnosti svých hostitelů. V ledu se mohou uskláňovat organismy z různých časových období. Může se tedy stát, že zachytí i patogenní mikroby a později je uvolní do populace hostitelů, kteří postrádají odolnost vůči těmto patogenům, což by mohlo mít za následek celosvětovou epidemii. Led je abiotický rezervoár mikrobů, který byl při sledování lidských nemocí dosud ignorován (Rogers et al. 2004).

7 Závěr

V rámci cílů mé bakalářské práce byla vypracována rešerše o mikrobiálním společenství ledovců. Rešerše byla doplněna informacemi o kryokonitových otvorech, kde se vyskytují druhově nejbohatší společenstva mikroorganismů obývajících ledovce. Dále byly přidány informace o ledovcích a jejich ústupu v důsledku globálního oteplování, následovalo krátké shrnutí o Svalbardu a o Islandu, odkud pocházely vzorky, které byly v této práci použity. Následně bylo specifikováno, jak Arktické podmínky ovlivňují tato společenstva. Dalším cílem bylo izolovat DNA z vybraných ledovcových biotopů z různých částí Arktidy a určit jejich taxonomické složení. Byla provedena komparativní analýza, aby se posoudilo, jak se tato společenstva liší mezi ledovci. Bylo zjištěno, že dominantními kmeny ve vzorcích byly *Cyanobacteria* s 38,3%, *Actinobacteriota* s 22,5% a *Proteobacteria* s 20,1% výskytem z celkového počtu mikroorganismů. Téměř všechny ledovce měly na úrovni kmene velmi podobné složení mikroorganismů až na ledovec Falljokul z Islandu a ledovec Lingbreen. Tato odlišnost může být připsána jedinečným geografickým a environmentálním faktorům: ledovec Lingbreen se na rozdíl od ostatních ledovců ze Svalbardu vyskytuje blíže moře, zatímco rozdílné složení mikroorganismů u Falljokul může souviset s jeho umístěním na Islandu. Na úrovni třídy pak ledovce vykazovaly znatelné rozdíly.

Tato studie také porovnávala data s existující literaturou. Podařilo se potvrdit, že *Cyanobacteria* dominují kryokonitovým společenstvím na většině světových ledovců. Nejčastější třídou *Cyanobacteria* ve všech vzorcích byly *Oscillatoriothycidae* a druhou nejčastější čeledí byly *Nostocophycidae*. Druhým nejhojnějším kmenem bakterií byly *Proteobacteria*. U všech vzorků nejvíce převládala *Alphaproteobacteria* a na druhém místě byly *Betaroteobacteria*. A dále se podařilo zjistit, že třetím nejhojnějším kmenem bakterií byly *Actinobacteriota*.

Nakonec bylo v diskusi shrnuto několik důvodů, proč bychom se měli zajímat o kryokonity a jejich mikrobiální společenství. Bylo zde popsáno riziko neustále šířící se rezistence na antibiotika napříč bakteriemi po celém světě, následně bylo zmíněno nebezpečí, které v sobě mohou uschovávat ledovce ve formě patogenních mikroorganismů.

8 Zdroje

Použitá literatura:

- ACIA, 2005. Arctic Climate Impact Assessment – Scientific Report. Cambridge University Press. ISBN 0-521-86509-3
- ANESIO, Alexandre M. a Johanna LAYBOURN-PARRY, 2012. Glaciers and ice sheets as a biome [online]. 2012. ISSN 01695347. Dostupné z: doi:10.1016/j.tree.2011.09.012
- ANESIO, Alexandre M., Stefanie LUTZ, Nathan A.M. CHRISTMAS a Liane G. BENNING, 2017. The microbiome of glaciers and ice sheets [online]. 2017. ISSN 20555008. Dostupné z: doi:10.1038/s41522-017-0019-0
- ARA Begum, R., R. LEMPERT, E. Ali, T.A. BENJAMINSEN, T. BERNAUER, W. CRAMER, X. CUI, K. MACH, G. NAGY, N.C. STENSETH, R. SUKUMAR, a P. WESTER, 2022. Point of Departure and Key Concepts. In: Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Cambridge University Press, Cambridge [online]. Dostupné z: doi:10.1017/9781009325844.003.
- BARKA, Essaid Ait, Parul VATSA, Lisa SANCHEZ, Nathalie GAVEAU-VAILLANT, Cedric JACQUARD, Hans-Peter KLENK, Christophe CLÉMENT, Yder OUHDOUCH a Gilles P. VAN WEZEL, 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews [online]. 80(1). ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/mmbr.00019-15
- BARRY, Roger G., 2006. The status of research on glaciers and global glacier recession: A review [online]. 2006. ISSN 03091333. Dostupné z: doi:10.1191/0309133306pp478ra
- BRITANNICA, The Editors of Encyclopaedia, 2023. Svalbard. Encyclopedia Britannica [online]. [cit. 10.4.2023]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/place/Svalbard>
- CONSTABLE, A.J., S. HARPER, J. DAWSON, K. HOLSMAN, T. MUSTONEN, D. PIEPENBURG, a B. ROST, 2022. Cross-Chapter Paper 6: Polar Regions. In: Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Cambridge University Press, Cambridge [online]. Dostupné z: doi:10.1017/9781009325844.023.

- COOK, Joseph, Arwyn EDWARDS, Nozomu TAKEUCHI a Tristram IRVINE-FYNN, 2016. Cryoconite: The dark biological secret of the cryosphere. *Progress in Physical Geography* [online]. 40(1). ISSN 14770296. Dostupné z: doi:10.1177/0309133315616574
- CRAWFORD, R. M. M., 2014. *Tundra-taiga biology: Human, Plant, And Animal Survival In The Arctic*. Oxford University Press. ISBN 978-0-19-955940-4.
- DEPTA, Julia a Paulina NIEDŹWIEDZKA-RYSTWEJ, 2023. The Phenomenon of Antibiotic Resistance in the Polar Regions: An Overview of the Global Problem [online]. 2023. ISSN 11786973. Dostupné z: doi:10.2147/IDR.S369023
- DARCY, John L., Eli M.S. GENDRON, Pacifica SOMMERS, Dorota L. PORAZINSKA a Steven K. SCHMIDT, 2018. Island biogeography of cryoconite hole bacteria in Antarctica's Taylor Valley and around the world. *Frontiers in Ecology and Evolution* [online]. 6(NOV). ISSN 2296701X. Dostupné z: doi:10.3389/fevo.2018.00180
- DIOLAIUTI, Guglielmina Adele, Davide MARAGNO, Carlo D'AGATA, Claudio SMIRAGLIA a Daniele BOCCHIOLA, 2011. Glacier retreat and climate change: Documenting the last 50 years of alpine glacier history from area and geometry changes of dosdè piazzì glaciers (Lombardy Alps, Italy). *Progress in Physical Geography* [online]. 35(2). ISSN 03091333. Dostupné z: doi:10.1177/0309133311399494
- DWORKIN, Martin, Stanley FALKOW, Eugene ROSENBERG, Karl-Heinz SCHLEIFER a Erko STACKEBRANDT, 2006. *The Prokaryotes - Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses* Martin. ISSN 0387254943.
- EDMAIER, B. a JUNG-HÜTTLOVÁ, A., 2005. *Ledovce*. JUNIOR. ISBN 80-7267-197-9
- EDWARDS, Arwyn, Justin A. PACHEBAT, Martin SWAIN, Matt HEGARTY, Andrew J. HODSON, Tristram D.L. IRVINE-FYNN, Sara M.E. RASSNER a Birgit SATTLER, 2013. A metagenomic snapshot of taxonomic and functional diversity in an alpine glacier cryoconite ecosystem. *Environmental Research Letters* [online]. 8(3). ISSN 17489326. Dostupné z: doi:10.1088/1748-9326/8/3/035003
- EINARSSON, M. Á., 1984. Climate of iceland. *World survey of climatology*. *World Survey of Climatology*. 673-697.

- GARCIA-LOPEZ, Eva a Cristina CID, 2017. Glaciers and ice sheets as analog environments of potentially habitable icy worlds [online]. 2017. ISSN 1664302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.01407
- GATTINGER, Daniel, Katrin PICHLER, Tobias WEIL a Birgit SATTLER, 2023. A comparative approach to confirm antibiotic-resistant microbes in the cryosphere. *Frontiers in Microbiology* [online]. 14. ISSN 1664302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2023.1212378
- GLAVOVIC, B.C., R. DAWSON, W. CHOW, M. GARSCHAGEN, M. HAASNOOT, C. SINGH, a A. THOMAS, 2022. Cross-Chapter Paper 2: Cities and Settlements by the Sea. In: *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability*. Cambridge University Press [online]. Dostupné z: doi:10.1017/S0032247415000637 doi:10.1017/9781009325844.019.
- GOKUL, Jarishma K., Andrew J. HODSON, Eli R. SAETNAN, Tristram D.L. IRVINE-FYNN, Philippa J. WESTALL, Andrew P. DETHERIDGE, Nozomu TAKEUCHI, Jennifer BUSSELL, Luis A.J. MUR a Arwyn EDWARDS, 2016. Taxon interactions control the distributions of cryoconite bacteria colonizing a High Arctic ice cap. *Molecular ecology* [online]. 25(15). ISSN 1365294X. Dostupné z: doi:10.1111/mec.13715
- HANSEN-BAUER, I., FØRLAND, E. J., HISDAL, H., MAYER, S., SANDØ, A. B., a SORTEBERG, A., 2019. Climate in Svalbard 2100. A knowledge base for climate adaptation. NCCS report no.1/2019, 1. ISSN 2387-3027.
- HERNÁNDEZ, Jorge a Daniel GONZÁLEZ-ACUÑA, 2016. Anthropogenic antibiotic resistance genes mobilization to the polar regions. *Infection Ecology and Epidemiology* [online]. 6(1). ISSN 20008686. Dostupné z: doi:10.3402/IEE.V6.32112
- HOUGHTON, J. T., 1998. Globální oteplování. Academia. ISBN 80-200-0636-2.
- KACZMAREK, Łukasz, Natalia JAKUBOWSKA, Sofia CELEWICZ-GOŁDYN a Krzysztof ZAWIERUCHA, 2016. The microorganisms of cryoconite holes (algae, Archaea, bacteria, cyanobacteria, fungi, and Protista): A review [online]. 2016. ISSN 14753057. Dostupné z: doi:10.1017/S0032247415000637

- KLANN, Jane, Alexandra MCHENRY, Carin MONTELONGO a Shana K. GOFFREDI, 2016. Decomposition of plant-sourced carbon compounds by heterotrophic betaproteobacteria isolated from a tropical Costa Rican bromeliad. *MicrobiologyOpen* [online]. 5(3). ISSN 20458827. Dostupné z: doi:10.1002/mbo3.344
- KUTÍLEK, M., 2004. Globální oteplování a klimatické změny v minulosti. Metodický portál: Články [online]. ISSN 1802-4785. [cit. 24.2.2023]. Dostupný z WWW: <https://clanky.rvp.cz/clanek/140/GLOBALNI-OTEPLOVANI-A-KLIMATICKE-ZMENY-V-MINULOSTI.html>
- LAYBOURN-PARRY, Johanna, Martyn TRANTER a Andrew J. HODSON, 2013. The Ecology of Snow and Ice Environments [online]. Dostupné z: doi:10.1093/acprof:oso/9780199583072.001.0001
- LIESTØL, Olav, 1993. *Glaciers of Europe- SATELLITE IMAGE ATLAS OF GLACIERS OF THE WORLD*. Image Rochester NY. ISSN 10449612.
- LUHR, J. F., 2004. *Země: počasí, lesy, ledovce, pouště, hory, řeky, oceány, sopky*. Knižní klub. ISBN 80-242-1225-0.
- MACDONELL, Shelley a Sean FITZSIMONS, 2008. The formation and hydrological significance of cryoconite holes. *Progress in Physical Geography* [online]. 32(6). ISSN 03091333. Dostupné z: doi:10.1177/0309133308101382
- MOROZOVA, Olga V., Irina S. ANDREEVA, Vladimir Yu ZHIRAKOVSKIY, Natalya I. PECHURKINA, Larisa I. PUCHKOVA, Irina V. SARANINA, Elena K. EMELYANOVA a Tatyana P. KAMYNNINA, 2022. Antibiotic resistance and cold-adaptive enzymes of antarctic culturable bacteria from King George Island. *Polar Science* [online]. 31. ISSN 18739652. Dostupné z: doi:10.1016/j.polar.2021.100756
- PATERSON, W. S.B., 1994. *The physics of glaciers*. 3rd edition. The physics of glaciers. 3rd edition [online]. Dostupné z: doi:10.1029/95eo00203
- PONIECKA, Ewa A., Elizabeth A. BAGSHAW, Henrik SASS, Amelia SEGAR, Gordon WEBSTER, Christopher WILLIAMSON, Alexandre M. ANESIO a Martyn TRANTER, 2020. Physiological Capabilities of Cryoconite Hole Microorganisms. *Frontiers in Microbiology* [online]. 11. ISSN 1664302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.01783

- ROBESON, Michael S., Devon R. O'ROURKE, Benjamin D. KAEHLER, Michal ZIEMSKI, Matthew R. DILLON, Jeffrey T. FOSTER a Nicholas A. BOKULICH, 2021. RESCRIPT: Reproducible sequence taxonomy reference database management. *PLoS Computational Biology* [online]. **17**(11). ISSN 15537358. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pcbi.100958
- ROGERS, Scott O., William T. STARMER a John D. CASTELLO, 2004. Recycling of pathogenic microbes through survival in ice. *Medical Hypotheses* [online]. **63**(5). ISSN 03069877. Dostupné z: doi:10.1016/j.mehy.2004.04.004
- ROOTES, D., 1996. Objevování polárních krajů. INA. ISBN 80-85680-76-9.
- ROZWALAK, Piotr, Paweł PODKOWA, Jakub BUDA, Przemysław NIEDZIELSKI, Szymon KAWECKI, Roberto AMBROSINI, Roberto S. AZZONI, Giovanni BACCOLO, Jorge L. CEBALLOS, Joseph COOK, Biagio DI MAURO, Gentile Francesco FICETOLA, Andrea FRANZETTI, Dariusz IGNATIUK, Piotr KLIMASZYK, Edyta ŁOKAS, Masato ONO, Ivan PARNIKOZA, Mirosława PIETRYKA, Francesca PITTINO, Ewa PONIECKA, Dorota L. PORAZINSKA, Dorota RICHTER, Steven K. SCHMIDT, Pacifica SOMMERS, Juliana SOUZA-KASPRZYK, Marek STIBAL, Witold SZCZUCIŃSKI, Jun UETAKE, Łukasz WEJNEROWSKI, Jacob C. YDE, Nozomu TAKEUCHI a Krzysztof ZAWIERUCHA, 2022. Cryoconite – From minerals and organic matter to bioengineered sediments on glacier's surfaces. *Science of the Total Environment* [online]. 807. ISSN 18791026. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.150874
- SEPEHRI, S., 2007. *Glaciers*. Rourke Educational Medi, [online]. [cit. 2023-01-14]. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=aW1xDwAAQBAJ&pg=PA6&dq=where+to+find+glaciers&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKewi44v_Upcf8AhVI87sIHXhQAzM06AF6BAGDEAI#v=onepage&q=where%20to%20find%20glaciers&f=false
- SINGH, Jay Shankar, Arun KUMAR, Amar N. RAI a Devendra P. SINGH, 2016. Cyanobacteria: A precious bio-resource in agriculture, ecosystem, and environmental sustainability [online]. 2016. ISSN 1664302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.00529

SJÖLUND, Maria, Jonas BONNEDAHL, Jorge HERNANDEZ, Stina BENGTTSSON, Gunilla CEDERBRANT, Jarone PINHASSI, Gunnar KAHLMETER a Björn OLSEN, 2008. Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the arctic. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 14(1). ISSN 10806059. Dostupné z: doi:10.3201/eid1401.070704

ŠLÉGL, J., 2006. Přes pralesy k ledovcům: fascinující svět tropických velehor čtyř kontinentů. Baset. ISBN 80-7340-081-2

Thermo Fisher Scientific, protokol Qubit® dsDNA HS Assay Kits.

THORDARSON, Thor a HÖSKULDSSON, 2014. Ármann. Iceland. Dunedin Academic Press Ltd [online]. ISBN: 978-1-780-46-021-5. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=KV1wDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP12&dq=iceland&ots=oNt2C9Vgwz&sig=Bah1kJArhQgOL1buAw9IPImUMoM&r edir_esc=y#v=onepage&q=precipitation&f=false

WANNER, HEINZ, CHRISTIAN PFISTER A RAPHAEL NEUKOM, 2022. THE VARIABLE EUROPEAN LITTLE ICE AGE. *QUATERNARY SCIENCE REVIEWS* [ONLINE]. 287. ISSN 02773791. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.1016/J.QUASCIREV.2022.107531

ZAHRA, ZAHRA, DA HYUN CHOO, HEAYYEAN LEE A AMNA PARVEEN, 2020. CYANOBACTERIA: REVIEW OF CURRENT POTENTIALS AND APPLICATIONS [ONLINE]. 2020. ISSN 20763298. DOSTUPNÉ Z: DOI:10.3390/ENVIRONMENTS7020013

ZAWIERUCHA, K., M. KOLICKA, N. TAKEUCHI a L. KACZMAREK, 2015. What animals can live in cryoconite holes? A faunal review. *Journal of Zoology* [online]. 295(3). ISSN 14697998. Dostupné z: doi:10.1111/jzo.12195

ZAWIERUCHA, Krzysztof, Artur TRZEBNY, Jakub BUDA, Elizabeth BAGSHAW, Andrea FRANZETTI, Mirosława DABERT a Roberto AMBROSINI, 2022. Trophic and symbiotic links between obligate-glacier water bears (Tardigrada) and cryoconite microorganisms. *PLoS ONE* [online]. 17(1 January). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0262039

Zymo research, protokol Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit

Použité obrázky:

COOK, J. M., Cryoconite holes, which Nordenskiöld described as a major hazard on the Greenland ice sheet [Foto]. 2013. In: To the Poles [online]. [Cit. 1.3.2023]. Dostupné z: <https://tothepoles.co.uk/2013/10/31/the-old-boys-ahead-of-the-curve/>

GREEN, R., Ilustrace v knize bez názvu [ilustrace v knize]. 1996. In: ROOTES, D., Objevování polárních krajů. INA, 1996, s. 8. ISBN 80-85680-76-9.

PATOWARY, K., Ilustrace na webu bez názvu [ilustrace na webu]. 2014. In: Amusing Planet [online]. [Cit. 1.3.2023]. Dostupné z: <https://www.amusingplanet.com/2014/09/cryoconite-holes-on-glaciers.html>

WILKENING, B., Creating a glacier [ilustrace]. 2013. In: Polar Trec [online]. [Cit. 1.3.2023]. Dostupné z: <https://www.polartrec.com/expeditions/ocean-atmosphere-sea-ice-and-snowpack-interactions/journals/2013-09-05>