



Bakalářská práce

Nově krystalované pevné fáze s Fe(3+) a jejich spojitost se společenstvím přítomných mikroorganismů

<i>Studijní program:</i>	B0114A300075 Přírodopis se zaměřením na vzdělávání
<i>Studijní obory:</i>	Přírodopis se zaměřením na vzdělávání Chemie se zaměřením na vzdělávání
<i>Autor práce:</i>	Jaroslav Viták
<i>Vedoucí práce:</i>	Mgr. Martin Pusztai, Ph.D. Katedra biologie a ekologie
<i>Konzultant práce:</i>	RNDr. František Eichler, Ph.D. Zkušební laboratoř optické a fluorescenční mikroskopie

Liberec 2024



Zadání bakalářské práce

Nově krystalované pevné fáze s Fe(3+) a jejich spojitost se společenstvím přítomných mikroorganismů

<i>Jméno a příjmení:</i>	Jaroslav Viták
<i>Osobní číslo:</i>	P21000477
<i>Studijní program:</i>	B0114A300075 Přírodopis se zaměřením na vzdělávání
<i>Specializace:</i>	Přírodopis se zaměřením na vzdělávání Chemie se zaměřením na vzdělávání
<i>Zadávací katedra:</i>	Katedra biologie a ekologie
<i>Akademický rok:</i>	2022/2023

Zásady pro vypracování:

1. Provést rešerši literatury a shrnout publikované poznatky o mikroorganismální biodiverzitě minerálních pramenů, zvláště se zaměřit na vody bohaté na železo a vztah abiotických (fyzikálně-chemických) a biotických faktorů prostředí.
2. Popsat postup a metody standardního odběru vzorků pro chemické a mikrobiologické analýzy a in-situ měření abiotických faktorů.
3. Realizovat mikroskopickou analýzu přírodních vzorků (dominanta, druhová bohatost, zastoupení skupin) včetně fotodokumentace a determinace.
4. Provést porovnání (statistickou analýzu) zjištěných abiotických a biotických faktorů.

<i>Rozsah grafických prací:</i>	dle potřeby dokumentace
<i>Rozsah pracovní zprávy:</i>	40 až 60 normostran
<i>Forma zpracování práce:</i>	tištěná/elektronická
<i>Jazyk práce:</i>	čeština

Seznam odborné literatury:

1. POULÍČKOVÁ, Aloisie, Petr DVOŘÁK a Petr HAŠLER. Průvodce mikrosvětlem sinic a řas. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2015, 46 s. Ostatní odborné publikace. ISBN 978-80-244-4408-6.
2. POULÍČKOVÁ, Aloisie. Základy ekologie sinic a řas. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011, 91 s. ISBN 978-80-244-2751-5.
3. LELLÁK, Jan a KUBÍČEK, František, Hydrobiologie. UK, Praha, 1991. 260 s. ISBN 80-7066-530-0.
4. KAŠTOVSKÝ, Jan a kolektiv. Atlas sinic a řas ČR 1. Praha: powerprint, 2018. 384 s. ISBN 978-80-7568-071-6.
5. KAŠTOVSKÝ, Jan a kolektiv. Atlas sinic a řas ČR 2. Praha: powerprint, 2018. 480 s. ISBN 978-80-7568-125-6.
6. KALINA, Tomáš a Jiří VÁŇA. Sinice, řasy, houby, mechorostry a podobné organismy v současné biologii. Praha: Karolinum, 2005, 606 s., 32 s. obr. příl. ISBN 80-246-1036-1
7. ROSICKÝ, Vojtěch a Jaroslav KOKTA. Příručka pro určování nerostů. 2. vyd., (v nakl. ČSAV 1. vyd.). Praha: Československá akademie věd, 1961.
8. HANSEN, Lee D., William M. LITCHMAN a Guido H. DAUB. Turnbull's blue and Prussian blue: $KFe(III)[Fe(II)(CN)_6]$. Journal of Chemical Education [online]. 1969, 46(1) [cit. 2023-06-27]. ISSN 0021-9584. Dostupné z: doi:10.1021/ed046p46
9. OZEKI, Toru., Koichi. MATSUMOTO a Seiichiro. HIKIME. Photoacoustic spectra of prussian blue and photochemical reaction of ferric ferricyanide. Analytical Chemistry [online]. 1984, 56(14), 2819-2822. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00278a041
10. IZATT, Reed M., et al. Calorimetric study of Prussian blue and Turnbull's blue formation. Inorganic Chemistry [online]. 1970, 9(9), 2019-2021. ISSN 0020-1669. Dostupné z: doi:10.1021/ic50091a012

Vedoucí práce: Mgr. Martin Pusztai, Ph.D.
Katedra biologie a ekologie

Konzultant práce: RNDr. František Eichler, Ph.D.
Zkušební laboratoř optické a fluorescenční mikroskopie

Datum zadání práce: 6. května 2023
Předpokládaný termín odevzdání: 24. dubna 2024

L.S.

prof. RNDr. Jan Pícek, CSc.
děkan

RNDr. Alena Ševců, Ph.D.
garant studijního programu

Prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Jsem si vědom toho, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má bakalářská práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědom následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

Poděkování

V první řadě tímto děkuji mému školiteli Mgr. Martinu Pusztaiovi, Ph.D za jeho otevřený, konstruktivní a svěží pohled na toto téma a věcné rady při tvorbě této práce. Taktéž děkuji mému konzultantovi práce RNDr. Františku Eichlerovi, Ph.D za jeho cenné životem prověřené rady a jeho ochotu a zájem pro toto téma. Ze srdce děkuji celé rodině a zejména mým rodičům za jejich autentický přístup a nahlížení na svět, který do mě značným dílem otiskly a bez kterého bych možná nebyl teď tam, kde jsem. Rovněž se srdcem na dlani děkuji své milované kóče za její neutuchající podporu, podnětné nápady a inspiraci při tvorbě této práce i mimo ni. V poslední řadě děkuji mým spolubydlícím, kamarádům a ostříleným profíkům z buňky č. 325/326 za jejich každodenní přítomnost.

ANOTACE

Nově krystalované pevné fáze s Fe(3+) a jejich spojitost se společenstvím přítomných mikroorganismů

Tato bakalářská práce se zabývá studiem nově krystalovaných pevných fází s Fe^{III} a jejich spojitostí se společenstvím přítomných mikroorganismů. V teoretické části jsou popsány abiotické (fyzikálně-chemické) faktory prostředí, včetně přiblížení geochemie a biogeochemie železa. Dále jsou prezentovány poznatky o mikroorganismální diverzitě pramenů bohatých na železo, tedy o železo oxidujících bakteriích, sinicích a řasách. V praktické části jsou popsány postupy a metody standardního odběru vzorků pro hydrogeochemické a mikrobiologické analýzy a *in situ* měření abiotických faktorů. Dále je realizována hydrogeochemická a mikrobiologická analýza vzorků. Výsledky terénního měření a laboratorních analýz jsou vyhodnoceny a diskutovány v závěru práce.

Klíčová slova

abiotické faktory, *Leptothrix ochracea*, řasy, sinice, železo, železo oxidující bakterie

ANNOTATION

Newly crystallized solid phases with Fe(3+) and their association with the microbial community

The bachelor thesis deals with a study of newly crystallized solid phases with Fe^{III} and their association with the microbial community. In the theoretical part, abiotic (physical-chemical) environmental factors are described, including explanation of geochemistry and biogeochemistry of iron. Moreover, the findings about the microorganism diversity of iron-rich springs, i.e. iron-oxidizing bacteria, cyanobacteria and algae, are presented. In practical part, the author describes procedures and methods of standard sampling for hydrogeochemical and microbiological analysis and abiotic factors *in-situ* measuring. Hydrogeochemical and microbiological analysis of samples is realized further. The *in-situ* measuring and laboratory analysis results are evaluated and discussed in the conclusion of the work.

Keywords

abiotic factors, algae, cyanobacteria, iron, iron-oxidizing bacteria, *Leptothrix ochracea*

Obsah

Seznam symbolů a zkratk	11
Seznam jednotek	13
Úvod.....	14
1 Abiotické faktory železitých pramenů	16
1.1 pH prostředí.....	16
1.2 Oxidačně redukční potenciál.....	17
1.3 Kyslík	18
1.4 Sluneční záření a teplota	19
1.5 Koncentrace živin.....	19
1.6 Konduktivita.....	20
1.7 Geochemie železa.....	20
1.7.1 Ferrihydrit	21
1.7.2 Goethit	21
1.7.3 Hematit.....	21
.....	22
1.7.4 Geochemická oxidace železa ve vodném prostředí	22
2 Železo oxidující bakterie	24
2.1 Biogeochemická oxidace železa	26
2.1.1 Biogenní železité okry	29
2.1.2 Biogenní minerály železa.....	30
2.2 Neutrofilní aerobní železo oxidující bakterie.....	31
2.2.1 Potenciální biochemické a molekulární mechanismy oxidace železa	32
2.2.2 <i>Leptothrix ochracea</i>	33
2.3 Acidofilní aerobní železo oxidující bakterie	36
2.4 Neutrofilní anaerobní železo oxidující bakterie	36
2.5 Fototrofní anaerobní železo oxidující bakterie.....	37

3	Sinice a řasy	38
3.1	Sinice.....	38
3.2	Řasy.....	40
3.1	Sladkovodní společenstva sinic a řas	41
3.1.1	Život ve vodním sloupci	41
3.1.2	Život na substrátu.....	42
4	Cíle práce a hypotézy.....	43
5	Materiál a metody	44
5.1	Charakteristika zkoumané lokality.....	44
5.2	Vzorky.....	45
5.2.1	Odběrová místa	45
5.3	Hydrogeochemická analýza	48
5.3.1	Terénní měření.....	48
5.3.2	Odběr vzorků pro analýzu parametrů TC, TOC, TIC, TN a TP	48
5.3.3	Odběr vzorků pro geochemickou analýzu	48
5.3.4	Kvalitativní zkoušky přítomnosti Fe ^{II} a Fe ^{III}	48
5.3.5	Optická a fluorescenční mikroskopie	51
5.3.6	Elektronová mikroskopie (SEM).....	51
5.4	Mikrobiologická analýza.....	52
5.4.1	Odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu.....	52
5.4.2	Optická mikroskopie.....	52
5.4.3	Determinace vzorků	53
5.4.4	Statistické vyhodnocení	53
6	Výsledky	54
6.1	Hydrogeochemická analýza	54
6.1.1	Vyhodnocení výsledků terénního měření pH, Eh, O ₂ a ORP	54
6.1.2	Kvalitativní zkoušky přítomnosti Fe ^{II} a Fe ^{III}	56

6.1.3	Analýza parametrů TC, TOC, TIC, TN a TP.....	57
6.1.4	Optická a fluorescenční mikroskopie	59
6.1.5	Elektronová mikroskopie (SEM).....	61
6.1.6	Kvalitativní a kvantitativní stanovení zastoupení chemických prvků	63
6.2	Mikrobiologická analýza.....	66
6.2.1	Determinace vzorků	66
6.2.2	Statistické vyhodnocení	70
7	Diskuze	74
8	Závěr	81
	Seznam použité literatury	83
	Seznam příloh	93

Seznam symbolů a zkratek

AAFeOB	acidofilní aerobní železo oxidující bakterie
ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
BET	měření specifické plochy povrchu a porozity (Brunauer–Emmett–Teller)
BIOX	biogenní železité okry (Biogenic Iron Ochre)
BMFe	biogenní minerály železa
cf.	srovnat (confer)
dH ₂ O	destilovaná voda
EDX	energeticky disperzní rentgenová spektroskopie (The Energy Dispersive X-ray)
EET	extracelulární přenos elektronů (Extracellular Electron Transfer)
Eh	konduktivita
EPS	exopolymerní sekrety
FAnFeOB	fototrofní anaerobní železo oxidující bakterie
FeOB	železo oxidující bakterie (iron-oxidizing bacteria)
Fh	ferrihydrit
FMO	fotosyntetizující mikroorganismy
ΔG	Gibbsova volná energie
ICP-OES	optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem (Inductively Coupled Plasma Optical Emission spectroscopy)
LM	světelná mikroskopie (Light Microscopy)
MS	Mössbauerova spektroskopie
NAFeOB	nukleofilní aerobní železo oxidující bakterie
NMDS	nemetrické vícerozměrné škálování (Non-metric multidimensional scaling)

NMR	nukleární magnetická rezonance (Nuclear magnetic resonance spectroscopy)
NRFeOB	nukleofilní anaerobní (dusičnany redukující) železo oxidující bakterie
ORP	oxidačně redukční potenciál
PhAR	fotosynteticky aktivní radiace (Photosynthetically active radiation)
PP	primární produkce
SAED	elektronová difrakce (Selected area diffraction)
SEM	skenovací elektronová mikroskopie (Scanning electron microscopy)
sp.	druh (species)
st.	stanoviště
TC	celkové množství uhlíku (Total carbon)
TDS	celkové rozpuštěné pevné látky (Total dissolved solids)
TEM	transmisní elektronový mikroskop (Transmission electron microscopy)
TIC	celkové množství anorganického uhlíku (Total inorganic carbon)
TN	celkové množství dusíku (Total nitrogen)
TOC	celkové množství organického uhlíku (Total organic carbon)
TP	celkové množství fosforu (Total phosphorus)
WDX	vlnová disperzní rentgenová spektroskopie (Wavelength Dispersive X-ray Spectrometry)
XRD	rentgenová strukturní analýza (X-ray diffraction)
XRF	rentgenová fluorescenční spektroskopie (X-ray fluorescence)

pozn. V názvu této BP je uvedeno Fe(3+), a to z důvodu zápisu do systému STAG. V BP je dále užíváno spíše Fe^{III}, význam je však stejný.

Seznam jednotek

kJ	kilojoule
m ² /g	metr čtvereční na gram
μl	mikrolitr
μm	mikrometr
μM	mikromol
μS/cm	mikro Siemens na centimetr
mg/l	miligram na liter
ml	mililitr
mm	milimetr
μS/cm	mikro Siemens na centimetr
mV	milivolt
nm	nanometr
V	volt

Úvod

Pokud pohlédneme s určitou pokorou a nezaujatostí na vše živé na naší Planetě, uvědomíme si, že to, co všechny druhy spojuje, je neutuchající touha žít. Pro náš druh jsou jedny z klíčových faktorů přežití schopnost adaptace, resilience, vzájemná komunikace a schopnost spolupráce. Obdobně je tomu i u nejrůznějších mikroorganismů. Adaptabilita a vzájemná kooperace a soužití s okolím, ve kterém se vyskytují, jsou naprosto klíčové faktory pro jejich přežití. Jedině pokud pohlížíme na přírodu a vše s ní spjaté jako na celek je možné více se přiblížit a pochopit její podstatu. Předkládaná práce proto není pouze vytržení určité specifické problematiky z kontextu *celku*, ale je koncipována jako mezioborová analýza, která umožňuje komplexnější porozumění. Pokud by problematika, kterou se tato práce zabývá, nebyla zasazena do celkového kontextu, její obsah by neměl zcela vypovídající hodnotu. Až po propojení s *celkem* je možné pochopit její podíl jak v estetice, tak v celkové mozaice fungování tohoto světa.

Cílem práce je zjištění souvislosti mezi společenstvím mikroorganismů a nově krystalizovanou pevnou fází s Fe^{III} v konkrétním železitém prameni. Objasnit, zdali je krystalizace nové pevné fáze řízena pouze geochemickými a hydrogeochemickými přírodními procesy nebo metabolismem mikroorganismů a biochemickými procesy. Zda přítomné mikroorganismy využívají nově krystalovanou pevnou fáze pasivně (bez cíleného využívání) anebo aktivně (cílené využívání za účelem zlepšení svých životních a existenčních podmínek). Zjistit jaké jsou charakteristické trendy druhové bohatosti a struktury přítomných mikroorganismálních společenstev v kontextu abiotických faktorů.

Teoretická část je rozdělena do tří na sebe navazujících a prolínajících se kapitol. První kapitola pohlíží na problematiku železitých pramenů z pohledu chemicko-fyzikálního, tedy popisuje abiotické faktory, které ovlivňují daný mikrobiotop a zároveň slouží jako uvedení do problematiky. Následující dvě kapitoly pojednávají o diverzitě přítomných mikroorganismů a rozšiřují tak první kapitolu o biotické faktory. Mikroorganismy jsou rozděleny do dvou samostatných kapitol: železo oxidující bakterie, sinice a řasy, a to právě v tomto pořadí na základě souvislosti a návaznosti na chemicko-fyzikální faktory prostředí a evoluční i sukcesní posloupnost. U těchto dvou kapitol je uvedena charakteristika, vztah daných mikroorganismů k prostředí a jejich vliv na celkovou problematiku.

Praktická část se věnuje řešení výše popsané problematiky a dosažení definovaných cílů na základě analýzy odebraných vzorků z konkrétního železitého pramene. Tato část je rozdělena na hydrogeochemickou a mikrobiologickou analýzu. V rámci hydrogeochemické analýzy vzorků byla provedena terénní práce realizovaná k získání základních informací o vybrané lokalitě. Dále byly provedeny orientační kvalitativní terénní zkoušky přítomnosti $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$. *In situ* byly změřeny chemicko-fyzikální parametry kapalné fáze, tj. pH, Eh, ORP a O_2 . Dále byla realizována analýza SEM včetně kvalitativního a kvantitativního stanovení pevné fáze s Fe^{III} . Mikrobiologická část analyzuje přírodní vzorky. Je zde analyzována zejména druhová bohatost a struktura společenstva včetně fotodokumentace a determinace. Následně jsou provedena porovnání a korelace zjištěných abiotických a biotických faktorů a získané poznatky jsou následně vyhodnoceny a porovnány s odbornou literaturou.

1 Abiotické faktory železitých pramenů

Komplexnost vztahu abiotických a biotických faktorů ovlivňující mikrobiotop vodních toků je značná. Tato kapitola je zaměřena na jednotlivé abiotické faktory a jejich vztah a roli v problematice železitých pramenů.

Walter K. Dodds ve své rozsáhlé knize týkající se ekologie sladkovodních ekosystémů zmiňuje [1], že role řek a toků pro život jako takový je zcela zásadní. Sladkovodní toky totiž tvoří rozhraní mezi všemi ostatními vodními prostředím a souší. Stávají se tak nepostradatelným článkem v mozaice celého ekosystému. A. Pouličková popisuje [2] fenomén vody jakožto unikátní kapalinu, která se přirozeně vyskytuje při teplotách vhodných pro život. Svými pufračními schopnostmi poskytuje vyvážené prostředí pro život mnoha organismů a její viskozita je pro tyto organismy současně také nosné prostředí. Její hustota je ovlivněna teplotou, tlakem a množstvím rozpuštěných látek. Další specifikací je povrchové napětí (na rozhraní voda-vzduch), umožňující existenci neustonů¹. Voda je nedílnou součástí života a jezera, řeky a potoky jsou důležitými sladkovodními zásobárnami vody, uvádí D. Dudgeon [3]. S tím souvisí i její kvalita, u které Mahapatra S. S. podotýká [4], že je založena na fyzikálně-chemických složkách, biologické aktivitě a koncentraci těžkých kovů.

1.1 pH prostředí

James C. Blackstock ve své publikaci popisuje [5], že pH vyjadřuje $[H^+]$ vodného roztoku jako logaritmicke funkci. pH roztoku je rovno zápornému logaritmu k základu 10 jeho koncentrace vodíkových iontů, tj. $pH = -\log_{10} [H^+]$. Stupnice pH od 0 do 14 pokrývá všechny koncentrace vodíkových iontů nalezené ve zředěných vodných roztocích a biologických systémech. Čistá voda má pH 7, tedy neutrální. Pokud je $pH < 7$ je roztok kyselý a při $pH > 7$ je roztok zásaditý. Z důvodu logaritmicke funkce představuje změna o jednu jednotku pH desetinásobný rozdíl v koncentraci vodíkových iontů.

Benjamin M. Saalidong ve své studii uvádí [6], že pH je jedním z nejdůležitějších fyzikálně-chemických parametrů, ovlivňujících ostatní parametry kvality vody včetně koncentrace těžkých kovů. Dle publikovaných studií [7, 8] pH popisuje chemickou

¹ organismy žijící na nebo pod povrchovou blankou vody

aktivitu protonů, tedy klíčový faktor při redoxních reakcích, rozpustnosti a srážení minerálů, povrchové komplexaci a dalších geochemických reakcích.

Dle Petera A. Lund [9] pH prostředí též významně ovlivňuje růst a přežití přítomných mikroorganismů. Qusheng Jin ve své publikaci popisuje [10] důležitost pH ve vztahu k mikrobiálnímu metabolismu a rozebírá potenciální dopady změn pH na složení a aktivitu mikrobiálních komunit. Podle Christian L. Lauber je [11] pH indikátorem celkového prostředí, formujícím složení a aktivitu mikrobiálních společenství. Zároveň je ale nutné zmínit, že tato problematika může fungovat i naopak, jelikož určité mikroorganismy si pH prostředí mohou upravovat samy [12].

Jako optimální růstové pH se označuje pH umožňující maximální rychlost růstu [10]. Na základě tohoto kritéria lze mikroorganismy rozdělit podle publikací [10, 13, 14] na acidofilní – nejlépe rostou při $\text{pH} < 3$, neutrofilní – rostou při pH mezi 5 a 9 a alkalifilní – rostoucí nejrychleji při hodnotách pH nad 9. Snížení nebo zvýšení pH prostředí o jednu jednotku může snížit metabolickou aktivitu společenstev mikroorganismů, až o 50 % uvádí David Fernández-Calviño [15].

1.2 Oxidačně redukční potenciál

Walter K. Dodds popisuje [1], že oxidačně redukční potenciál (dále jen ORP) je jinak řečeno relativní dostupnost elektronů pro chemickou reakci. Koncept ORP je zcela klíčový faktor ve fundamentálních chemických interakcích. Je nutné si uvědomit, že elektrony volně „nepoletují“ ve vodném prostředí, nýbrž jsou v určité míře spojeny s nejrůznějšími rozpuštěnými prvky a molekulami. ORP je vlastně mírou toho, jak těsně jsou tyto elektrony spojené. Tato skutečnost určuje, které chemické reakce nastanou spontánně, na základě počtu elektronů spojených s reaktanty a produkty. Sloučenina, jež je oxidována elektron ztrácí, a naopak redukováná sloučenina elektron získává. ORP je hlavní faktor v abiotických i biotických (biogeochemických) cyklech nejrůznějších prvků. Určuje potenciální energetické požadavky a výnosy biotických a abiotických procesů přeměňujících chemické sloučeniny v prostředí.

Hlavní myšlenka [1], která propojuje ORP s biogeochemickými cykly je skutečnost, že sloučeniny mají jistou potenciální energii, pokud je jejich ORP výrazně odlišné od průměrného ORP zbylých rozpuštěných sloučenin ve vodném prostředí. Příkladně tedy bude mít sloučenina vyšší potenciální energii v situaci, kdy se jedná o sloučeninu s nízkým ORP v prostředí s vysokými hodnotami ORP nebo jde o sloučeninu s vysokým

ORP v prostředí s nízkým ORP. ORP má velký vliv na to, jaké chemické reakce budou vyžadovat energii, jaké proběhnou bez dodání energie a ve výsledku jaké produkty budou v prostředí upřednostněny. V sedimentech se jeho hodnota snižuje se zvyšující se hloubkou. Změny v ORP jsou ovlivněny průběhem času, což vede k uspořádanému sledu přednostních přeměn živin. Jedním z klíčových faktorů ovlivňujících redoxní reakce v prostředí je rozpuštěný kyslík (O_2). Tato problematika je dále diskutovaná v následující podkapitole 1.3. Přítomnost molekulárního kyslíku se běžně používá jako definiční znak „oxidačního“ prostředí. Zásoba molekulárního kyslíku z něj činí nejvyšší zdroj oxidačních ekvivalentů. Je třeba ale říci, že O_2 je v základním termodynamickém stavu poměrně slabým oxidačním činidlem a obvykle není přímo zodpovědným oxidantem za oxidační přeměny kontaminantů. Mezi tzv. aktivované formy kyslíku, vzniklé působením světla na přírodní organické látky patří např. hydroperoxylový radikál HO_2^{\bullet} a superoxid O_2^- , peroxid vodíku H_2O_2 , hydroxylový radikál OH^{\bullet} a ozon O_3 [16].

1.3 Kyslík

Kyslík se v přírodním prostředí vyskytuje v mnoha formách, a to včetně prostředí vody. Převládající formou v atmosféře je plynný kyslík O_2 , zaujímající v ní zhruba 21 %. Kyslík je též nedílnou součástí organických sloučenin a biologicky významných anorganických sloučenin [1]. Pro pochopení jeho role ve vodném prostředí je nutné objasnit několik skutečností. Pokud se zaměříme na množství rozpuštěného kyslíku ve vodě, zjistíme, že zde působí mnoho faktorů včetně rychlosti metabolických aktivit, teploty, atmosférického tlaku (nadmořské výšky) či difúze. Množství kyslíku ve vodném prostředí je možné vyjádřit několika koncentračními jednotkami jako např. mg/l, mol/l nebo jako procenta nasycení. Přítomnost kyslíku – aerobní (oxické) prostředí či absence kyslíku – anaerobní (anoxické) prostředí jsou důležité aspekty sladkých vod ve vztahu k přítomným (mikro)organismům, kteří se na tyto podmínky adaptují [1].

Koncentrace kyslíku je hlavním determinantem biogeochemických redoxních reakcí, a to na základě obrovské afinity molekul O_2 k elektronům. V přítomnosti O_2 jsou hodnoty ORP vysoké (> 200 mV). Tyto vysoké hodnoty indikují oxidační prostředí s velmi malým množstvím dostupných elektronů. Tedy bez příjmu (dodání) energie budou probíhat pouze specifické reakce, které elektrony uvolňují. Názorným příkladem této skutečnosti je ovlivnění koncentrace železa ve vodním prostředí. Koncentrace O_2 totiž reguluje ORP a potažmo koncentraci chemických látek ve vodě jako je např. železo [1]. Dále bude tato

problematika přiblížena v rámci geochemické oxidace železa ve vodném prostředí v podkapitole 1.7.4.

1.4 Sluneční záření a teplota

Interakce mezi světlem a vodou je důležitá z důvodu potřeby světla pro proces fotosyntézy, organismy s očima nebo světelnými senzory využívají světlo jako smyslový signál a v neposlední řadě je také voda elektromagnetickým zářením zahřívána a dochází tak k její stratifikaci [1]. A. Pouličková upozorňuje [2], že kromě intenzity jsou důležitými vlastnostmi světla též vlnová délka a fotoperioda. Pro proces fotosyntézy je zdrojem energie záření o vlnové délce 380–720 nm nazývané fotosynteticky aktivní radiace (PhAR). Působení PhAR na vodné prostředí je komplexní proces daný změnami během dne a změnami složení spektra s měnící se hloubkou. Rostliny pohlcují nejlépe modré a červené záření. Modré světlo proniká do vody nejhluběji a využívají jej např. ruduchy. Prosvětlená zóna (eufotická) vodního sloupce dosahuje od několika cm do zhruba 120 m. Sluneční záření bude přiblíženo v souvislosti se sinicemi a řasami v kapitole 3.

1.5 Koncentrace živin

Vedle chemických parametrů hraje ve vodném prostředí také nezastupitelnou roli koncentrace všech anorganických iontů a rozpuštěných plynů. Stejně tak důležité je celkové množství organických sloučenin a dalších specifických organických molekul. Tento chemický materiál může být rozpuštěný nebo ve formě částic. Ve vodném prostředí jsou rozpuštěné anorganické látky nezbytné pro život přítomných organismů, ale je potřeba dodat, že často největší vliv na vodní organismy mají minoritní rozpuštěné složky, uvádí Claude E. Boyd [17]. Podstatným pojmem užívaným v souvislosti s koncentrací živin a rozpuštěných látek ve vodě je celková hmotnost materiálu rozpuštěného ve vodě, tedy celkový obsah rozpuštěných látek (TDS) [1]. TDS se měří jako hmotnost zbytku, který zůstane, po odpaření měřeného objemu filtrované vody [18]. Mezi velice důležité hodnoty TDS patří hodnoty celkového (anorganického i organického) množství uhlíku ve vzorku, tedy TC. Dále také hodnoty TIC, označující celkové množství anorganického uhlíku (uhličitany, hydrogenuhlíčitany a CO₂). A současně také hodnoty TOC určující celkový organický uhlík (nejčastěji z tlející vegetace) [19]. Mezi základní živiny, které hrají důležitou roli v primární produkci, patří dusík a fosfor. S těmito živinami se bezprostředně váže i pojem eutrofizace, tedy nadměrné množství živin (dusíku a fosforu) ve vodě. Obdobně jako u uhlíku se u nich

také provádí analýza, tedy TN a TP (celkové množství dusíku a fosforu) [20]. Problematika primární produkce spojené např. s množstvím dusíku a fosforu ve vodních ekosystémech bude dále diskutována v kapitole 3.

Walter K. Dodds zmiňuje [1] v souvislosti s látkami přítomnými ve vodě také cheláty. Jsou to významné látky, a to nejenom z hlediska vztahu k železu. Cheláty mohou být jak organické (např. huminové látky, vzniklé rozkladem rostlin), tak anorganické sloučeniny. Ve vztahu k iontům železa sehrávají důležitou roli, jelikož udržují např. vyšší koncentrace železa i za oxických podmínek. Současně se také vysokými koncentracemi huminových látek, které ochotně utváří komplexy s ionty železa, stává železo pro nejrůznější mikroorganismy nedostupné.

1.6 Konduktivita

S hodnotami TDS souvisí také konduktivita. Jednoduše lze konduktivitu charakterizovat jako úměrnou relativnímu množství elektrického proudu vedeného vodou. Tedy čím více je ve vodě rozpuštěných iontů, tím vyšší je konduktivita. Zajímavé ale je, že konduktivita není na koncentracích iontů zcela závislá. V solných jezerech je konduktivita extrémně vysoká i přesto, že živin jako je dusík a fosfor je zde málo. Zároveň je nutné zmínit že TDS ne vždy koreluje s hodnotami konduktivity. Tato skutečnost se vysvětluje tím, že do hodnoty konduktivity jsou zahrnuty pouze iontové sloučeniny, přesto že i nenabitě molekuly ovlivňují hodnoty TDS. Tento příklad lze demonstrovat na iontech Fe^{2+} a Pb^{2+} , které konduktivitu ovlivňují vzhledem ke stejnému náboji stejně, avšak jejich molekulová hmotnost se liší zhruba čtyřnásobně [1].

1.7 Geochemie železa

Adam Drummond ve své obsáhlé studii popisuje [21] železo jako čtvrtý nejrozšířenější prvek zemské kůry, současně druhý nejrozšířenější kov a nejvíce hmotnostně zastoupený prvek na Zemi. Na základě jeho všudypřítomnosti je obsaženo jak v nejrůznějších geologických, tak v biologických systémech. Pokud se blíže podíváme na roli železa v abiotických (geologických) systémech, zjistíme, že se železo nejčastěji vyskytuje v minerální formě v podobě oxidů železa a poměrně často také jako sulfidy, uhličitany a křemičitany železa. Casey Bryce ve své studii [22] představuje železo jakožto nejrozšířenější redoxně aktivní kov zemské kůry. Mezi typické oxidy a oxyhydroxidy železa, jež jsou přítomné např. v aerobních a anaerobních půdách, podzemních vodách, bažinách, mokřadech, jeskyních útvarech nebo vulkanických

píscích A. Drummond řadí [21] ferrihydrit, goethit, hematit, maghemit a magnetit. Zhaoxia Jiang [23] zmiňuje ještě lepidokrocit (γ -FeOOH), feroxyhyt (δ -FeOOH) a zelené rzi.

1.7.1 Ferrihydrit

Jak zmiňuje A. Drummond [21] jedná se o špatně krystalizující metastabilní oxyhydroxid železa o přibližném složení $\text{Fe}_5\text{HO}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, který se běžně vyskytuje v přítomnosti kyslíku a vod bohatých na železo. Jedná se o minerál se specifickou mikroporézní strukturou obsahující nanokrystaly. Je stabilnější, pokud dojde k jeho spoluvysrážení s huminovými a fulvonovými kyselinami. Je klíčový pro různé způsoby vzniku a přeměny běžných oxidů železa a to např. díky jeho větší rozpustnosti než hematit (α - Fe_2O_3) a goethit (α - $\text{FeO}(\text{OH})$). V čisté formě se tak jedná o jejich prekurzor a dochází tedy k vytváření krystalicky a termodynamicky stabilnějších zmíněných minerálů. Nejčastěji se vyskytuje ve dvou formách Fh-2h a Fh-6h², které určují míru krystalinity.

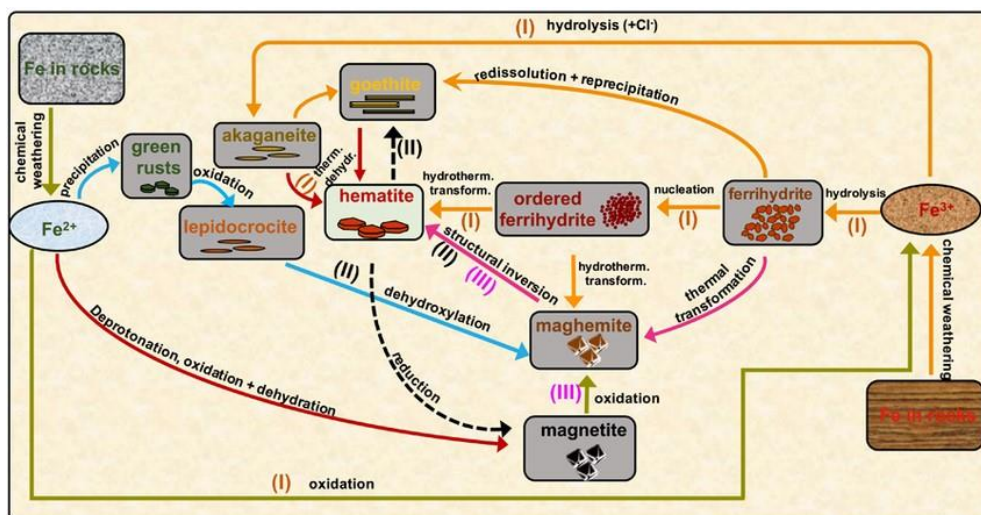
1.7.2 Goethit

A. Drummond popisuje [21] goethit jako jeden z nejvíce termodynamicky stabilních oxidů železa (α - $\text{FeO}(\text{OH})$), který je nejčastěji přítomen v sedimentech a vlhkých půdách. Krystalizuje v orthorombické (kosočtverečné) soustavě. Vzniká buď zvětráváním uhličitánů, silikátů a sulfidů železa, nebo přeměnou metastabilního ferrihydritu. Yannick Cudennec popisuje [24], že vznik goethitu potažmo jeho krystalizace je ovlivněna časem, teplotou a pH.

1.7.3 Hematit

A. Drummond píše [21] o hematitu (α - Fe_2O_3) jako jednom z nejrozšířenějších oxidů železa. Zhaoxia Jiang se svými kolegy popsali [23] tři dominantní způsoby vzniku hematitu na Zemi, které jsou společně se vznikem ostatních oxidů/oxohydroxidů železa vyobrazeny na shrnujícím schématu Obr. 1. Prvním způsobem (I) je krystalizace z roztoku, a to buď přímým vysrážením z tekutin bohatých na ionty železa (Fe^{2+} , Fe^{3+}) nebo hydrotermální přeměnou z ferrihydritu v půdách. Druhým způsobem (II) je dehydroxylace oxyhydroxidů železa za vysokých teplot. Poslední způsob (III) je oxidací magnetitu nebo jeho inverze maghemitu, a to většinou v sedimentech.

² zkratky pro 2 – line a 6 – line (označení určené na základě vykazujících difrakčních píků při použití XRD)



Obr. 1 Schematické znázornění cest vzniku a přeměny běžných oxidů a oxyhydroxidů železa. Převzato z: [23]

1.7.4 Geochemická oxidace železa ve vodném prostředí

U geochemické oxidace železa ve vodném prostředí je podstatné zaměřit se na převládající vyskytující se formu (oxidační stav) železa, tj. rozpustné ionty Fe^{2+} a nerozpustné ionty Fe^{3+} resp. Fe^{III} [1]. Ta závisí na abiotických faktorech jako je pH, ORP a koncentrace O_2 , jak popisuje Sabrina Hedrich [25]. Cyklus železa jako takový je podobný cyklům dusíku, uhlíku a síry, jelikož mu lze porozumět právě např. na základě hodnot ORP [1]. S. Hedrich zmiňuje [25], že Fe^{2+} formy železa jsou stabilní v anoxických prostředích, ale zároveň jsou náchylné k spontánním oxidacím molekulárním kyslíkem. Rychlost spontánní oxidace je závislá na teplotě, koncentraci protonů (H^+), rozpuštěném kyslíku a množství Fe^{2+} iontů. Podotýká, že pokud jsou ve vodném prostředí přítomny komplexotvorné látky v podobě chelatačních organických kyselin nebo huminových koloidů, je koncentrace rozpustného železa výrazně vyšší. Vipin Kumar Singh uvádí [26], že abiotická oxidace železa ve formě Fe^{2+} v aerobních prostředích je velice rychlá, s poločasem rozpadu < 1 min, zatímco v méně okysličených až anoxických prostředích je poločas rozpadu až 300krát vyšší. Kinetika oxidační reakce Fe^{2+} je výrazně závislá na pH a kyslíku [21, 27]

Z pohledu pH prostředí S. Hedrich uvádí [25], že v acidickém prostředí, v tomto případě při $\text{pH} = 4$ je rychlost spontánní oxidace železa nízká, ale se zvyšující se hodnotou pH se rychlost oxidace zdatelně zvyšuje. S. Hedrich popisuje [25] hodnoty ORP (jakožto dalšího významného abiotického faktoru prostředí) v souvislosti s přítomnými komplexy železnato-železitých párů ve vodném prostředí. V kyselých podmínkách, kde jsou tyto páry rozpustné je ORP nejpozitivnější (+ 1,25 V a výše). V cirkumneutrálním prostředí,

je ORP nerozpustných párů např. $\text{Fe}^{\text{II}}\text{CO}_3$ a $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{OH})_3$ mnohem méně pozitivní, tedy zhruba + 0,2 V. Důležitý je rovněž poznatek, že rozpustné komplexy $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ mají tendenci mít méně kladné ORP než volné formy iontů.

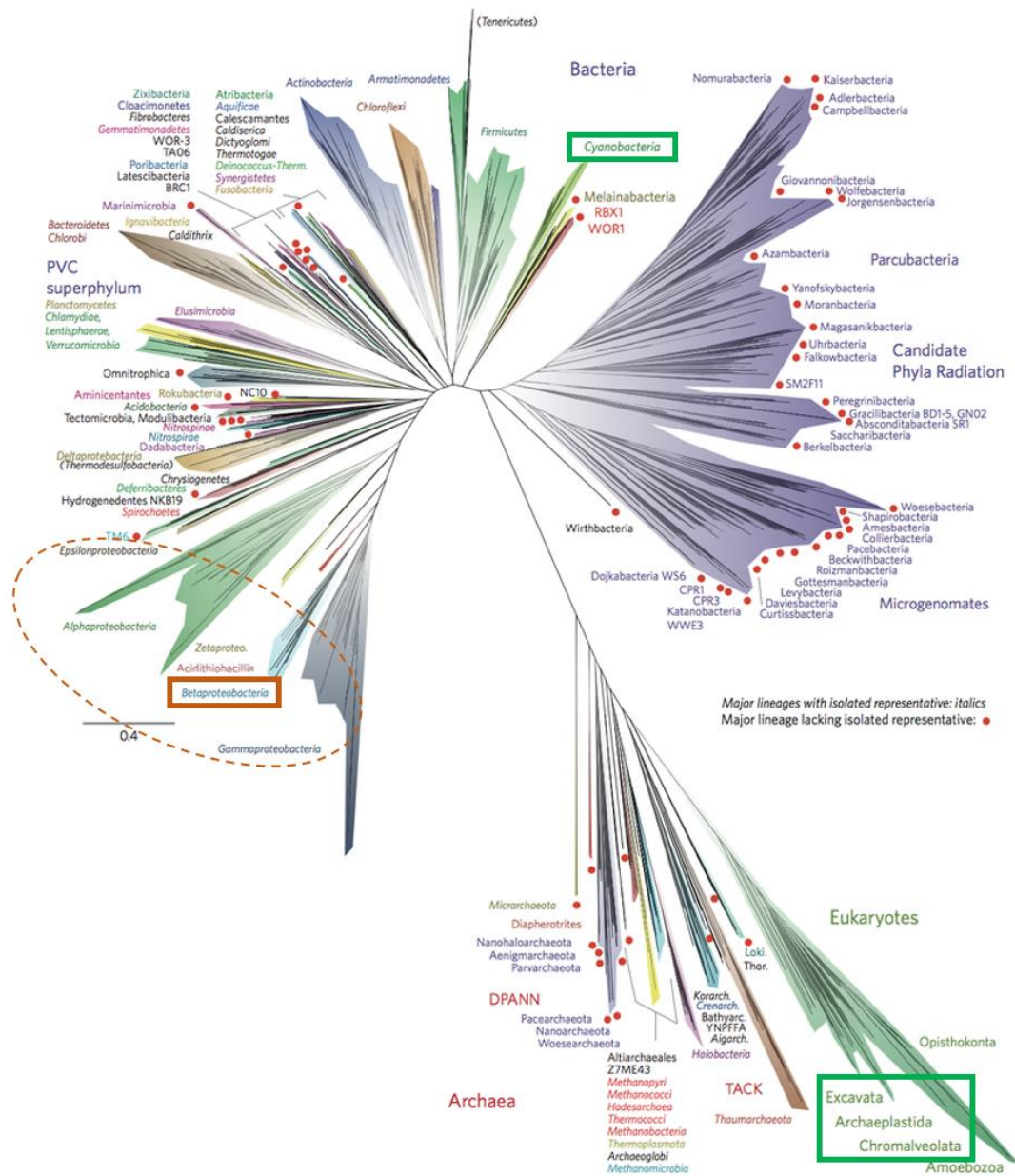
Přítomnost dané formy železa ovlivněné zmíněnými abiotickými faktory se znázorňuje pomocí Pourbaixových diagramů (aktivitní pH-Eh diagramy), popisuje A. Drummond [21].

2 Železo oxidující bakterie

V předešlé kapitole jsme se seznámily s nejrůznějšími abiotickými faktory, jež ovlivňují prostředí sladkovodních pramenů včetně pramenů bohatých na železo. Bylo zmíněno, že se železo nejběžněji vyskytuje ve formě oxidů a oxyhydroxidů železa v mocenstvích Fe^{II} a Fe^{III} jakožto součást minerálů. Obecně lze říci, že se redoxní reakce železa v přírodě sestávají z komplexní sítě biotických i abiotických reakcí, které mohou probíhat cyklicky i současně, uvádí Andreas Kappler [28]. Pokud tedy chceme pochopit roli železa v ekosystému v širším kontextu, je zapotřebí obeznámit se s organismy, kteří jsou s touto problematikou bezprostředně spjatí. Těmito organismy jsou nejrůznější železo oxidující bakterie (dále již jen FeOB). Walter K. Dodds obecně popisuje [1] bakterie jako jednobuněčné organismy bez organel či jádra a zároveň jako metabolicky nejrozmanitější skupinu organismů na světě. Dle Vaibhav Sharma a jeho týmu [29] patří většina FeOB do kmene *Proteobacteria*. Jedná se o jeden z největších a fenotypově nejrozmanitějších kmenů prokaryot, do kterého patří též všeobecně známí zástupci, jako *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* či *Neisseria meningitidis*, kteří jsou původci nejrůznějších onemocnění. Kmen *Proteobacteria* je rozdělen na třídy: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Delta-*, *Epsilon-*, *Zetaproteobacteria*, dále *Oligoflexia*, *Acidithiobacillales*, *Acinetobacteria*. Na diagramu *stromu života* [30] viz Obr. 2 jsou barevně vyznačeny třídy *Proteobakterií* včetně zvláště výrazné třídy *Betaproteobacteria*, která je pro tuto práci stěžejní, jelikož do ní patří dále diskutované neutrofilní aerobní FeOB (v podkapitole 2.2). Dále jsou zde označeny sinice (*Cyanobacteria*) a u eukaryot také příslušné taxonomické zařazení řas. Sinice a řasy jsou zde označeny pro kontext a dále budou probírány v kapitole 3.

Pro tuto práci je ale podstatnější rozřazení FeOB na základě jejich fyziologických vlastností. Tyto vlastnosti totiž přímo souvisí s jejich vztahem k abiotickým faktorům jako je míra zastoupení iontů železa, koncentrace kyslíku, pH vodného prostředí a ORP. Vipin Kumar Singh ve své práci poukazuje [26] na výraznou fyziologickou rozmanitost FeOB. Mohou být autotrofní, heterotrofní, fototrofní a chemotrofní, v závislosti na kyslíku aerobní nebo anaerobní a ve vztahu k pH prostředí acidofilní či neutrofilní. FeOB mohou být přítomny v nejrůznějších typech sladkovodních vod včetně vod podzemních, a také v mořích a oceánech [27, 29, 31]. Z důvodu obsáhlosti tohoto fyziologického rozdělení jsou dále popsány pouze čtyři nejběžnější skupiny definované vztahem FeOB k prostředí, ve kterém se vyskytují. V odborných publikacích [25, 26, 32] se nejčastěji

jedná o rozdělení na acidofilní aerobní, neutrofilní aerobní, neutrofilní anaerobní (nitratově závislé) a anaerobní fototrofní FeOB. Nejvíce bude přiblížena a popsána skupina neutrofilních aerobních FeOB (podkapitola 2.2), jelikož je pro tuto práci stěžejní. Zbylé tři skupiny budou popsány z důvodu kontextu, ale méně podrobně.



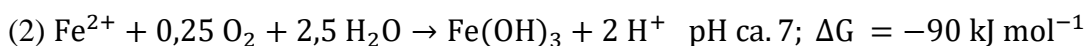
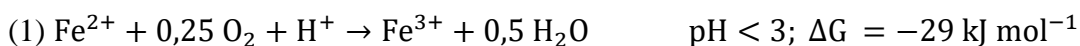
Obr. 2 Současný pohled na strom života, který zahrnuje celkovou rozmanitost zastoupenou sekvenovanými genomy. Vyznačeny jsou *Betaproteobacteria* (a ostatní třídy), *Cyanobacteria* (sinice) a *Excavata*, *Archeplastida* a *Chromalveolata* (řasy). Upraveno a převzato z: [30]

2.1 Biogeochemická oxidace železa

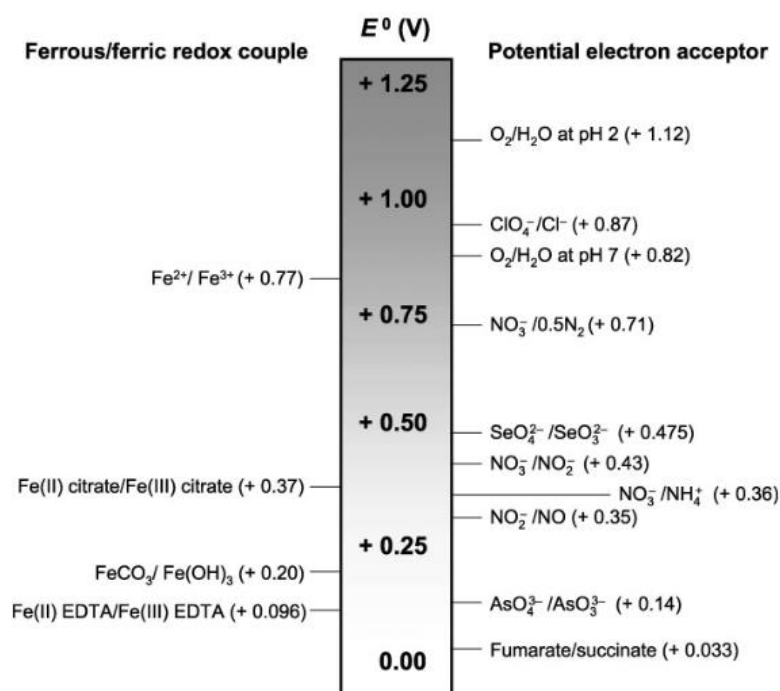
V podkapitole týkající se geochemických cyklů železa, potažmo geochemické oxidace železa ve vodném prostředí, byly nastíněny přeměny a vznik oxidů a oxyhydroxidů železa vlivem abiotických faktorů prostředí. Pro pochopení biogeochemických mechanismů oxidace železa je nutné geochemické poznatky rozšířit o roli FeOB v této problematice. Casey Bryce ve své studii přisuzuje [22] přenosu elektronu mezi dvěma nejběžnějšími oxidačními stavy železa (Fe^{II} a Fe^{III}) významnou roli, jak v již zmíněných environmentálních procesech, tak právě v biogeochemickém cyklu železa, kterého se FeOB účastní. Doplnuje, že to, že FeOB mohou využívat energii z oxidace železa ve svůj metabolický prospěch, zabudováním CO_2 umožňujícím jejich růst [1], je známo již téměř 200 let. Jak již bylo řečeno, fyziologická diverzita FeOB je značná a abiotickými faktory jsou ovlivněny i jejich mechanismy a způsoby oxidace železa, uvádí S. Hedrich [25]. Tyto mechanismy v závislosti na podmínkách prostředí jsou popsány u vybraných FeOB níže, ale nejprve jsou nastíněny základní principy biogeochemické oxidace železa ve vztahu k abiotickým faktorům.

Významným abiotickým faktorem prostředí je **koncentrace kyslíku**. Vipin Kumar Singh se svými kolegy popisuje [26], že v situaci, kdy je konverze železnatých iontů na ionty železité vysoce závislá na kyslíku je možné očekávat ionty Fe^{2+} a FeOB v anoxických prostředích jako jsou např. podzemní vody nebo vysoce kyselá prostředí. Jelikož právě za těchto podmínek, kdy je oxidace zanedbatelná nebo velmi pomalá, využívají FeOB železnatých iontů k dosažení energie potřebné pro asimilaci uhlíku. G. A. Dubinina dodává [32], že abiotická oxidace železnatých iontů dominuje nad oxidací železa zprostředkovanou FeOB v situaci, kdy je koncentrace kyslíku (O_2) nad $50 \mu\text{M}$ ($\approx 1,5 \text{ mg/l}$).

Dalším abiotickým faktorem ovlivňujícím oxidaci železa FeOB je **pH**. A. Drummond [21] a D. Emerson [27] vysvětlují tuto problematiku na oxidačních reakcích železa popisujících oxidaci Fe^{2+} iontů při $\text{pH} < 3$ tj. (1) a pH okolo 7 tj. (2) včetně odpovídajících změn Gibbsovy volné energie. Tedy v acidických (1) a cirkumneutrálních (2) prostředích.



Z hodnot Gibbsových energií lze vyvodit, že v cirkumneutrálním prostředí získávají FeOB energii snadněji než v prostředí kyselém. Významnou roli zde také sehrává stabilita železa, které je, jak A. Drummond dále píše [21] vysoce stabilní při nízkém pH z čehož vyplývá, že se oxiduje zejména biologickými procesy (FeOB). Naopak v cirkumneutrálních podmínkách je železo metastabilní a neutrofilní FeOB zde musí konkurovat abiotickým oxidačním procesům. Dodává, že ač bakteriální oxidace Fe^{2+} iontů poskytuje nejnižší Gibbsovu energii pro jejich buněčný metabolismus, jsou zároveň FeOB významnou skupinou chemolitotrofních organismů. Z čehož plyne, že aby bakterie získaly dostatečné množství energie, musí zoxidovat značné množství železa a současně tak vytvářet velké množství železitého materiálu v podobě oxidů a oxyhydroxidů železa.

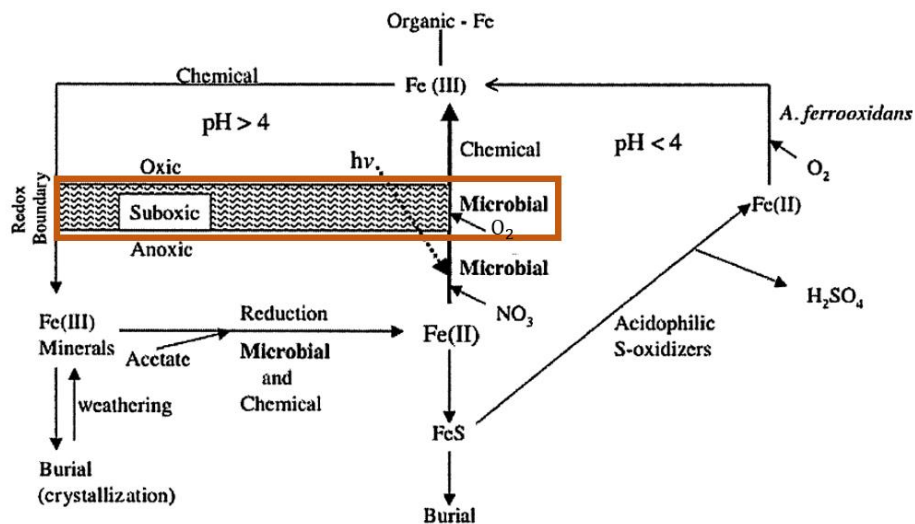


Obr. 3 Rozdílné redoxní potenciály rozpustných a nerozpustných dvojic $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ a dalších dvojic, které slouží jako akceptory elektronů pro proteobakterie oxidující železo. Převzato a upraveno z: [25]

V souvislosti s pH prostředí je zapotřebí dále rozvést již zmíněné poznatky o **ORP**. Kombinace faktorů abiotické oxidace železa, jeho rozpustnosti a ORP $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$ párů významně ovlivňuje mechanismy oxidace železa a strategie FeOB, píše S. Hedrich [25]. Důležitou roli sehrávají elektronové akceptory. Problematika a různorodost elektronových akceptorů v závislosti na pH prostředí, jsou znázorněny ve schématu na Obr. 3. Ze schématu je patrné, že při $\text{pH} = 2$ je ORP páru $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ o zhruba 300 mV pozitivnější, než při neutrálním pH z čehož vyplývá, že kyslík je pro acidofilní FeOB

energeticky výhodnějším akceptorem elektronů než pro neutrofilní FeOB. Ve skutečnosti je z důvodu zachování energie molekulární kyslík jediným akceptorem elektronů při oxidaci železa acidofily, jelikož alternativa v podobě ClO_4^- to z důvodu toxicity být nemůže, podotýká S. Hedrich [25]. Dále uvádí, že při neutrálním pH je možné jako alternativní akceptory elektronů ke kyslíku využít i dusičnany a dusitany, a to na základě dostatečně nízkého ORP páru $\text{FeCO}_3/\text{Fe}(\text{OH})_3$, který to umožňuje.

Pokud je pH prostředí neutrální, je možné, aby došlo k disimilační oxidaci železa jak za aerobních, tak anaerobních podmínek, na rozdíl od acidického prostředí, kde toto možné není. Energeticky výhodnější je oxidace železa za současné redukce kyslíku při neutrálním pH. Tento jev je ovlivněn spontánní oxidací železa, která je ale v mikroaerobních prostředích pomalejší než v prostředích výrazně oxických, a proto mají FeOB využívající tohoto prostředí potenciál maximalizovat energetický výtěžek z oxidace železa, konstatuje S. Hedrich [25].



Obr. 4 Biogeochemický cyklus železa. Upraveno a převzato z: [33]

Schéma na Obr. 4 znázorňuje možné cesty a způsoby přeměny železa, a to buď zprostředkované FeOB (viz kapitoly 2.2, 2.3, 2.4, 2.5) nebo přeměnou chemických látek. Na levé straně diagramu je cirkumneutrální prostředí na pravé straně acidické prostředí [33]. Ve schématu je barevně vyznačena oxicko-anoxická oblast, která je typickým prostředím pro neutrofilní aerobní FeOB [25], které budou podrobněji popsány v kapitole 2.2.

Bakteriemi katalyzované oxidace železa mají dle Vipin Kumar Singh [26] obrovský potenciál v podobě schopnosti minimalizovat koncentrace nebezpečných těžkých kovů,

jako je olovo, nikl, měď, chrom, kadmium a kobalt. Železo vzniklé touto biologickou aktivitou tvoří komplexy se zmíněnými těžkými kovy, které jsou přítomny v jejich okolí. Proto se FeOB využívají např. v průmyslovém biologickém loužení pro získávání nejrůznějších prvků. Jelikož jedním z hlavních globálních problémů je výrazná kontaminace prostředí těžkými kovy, používá se vedle běžných chemických a fyzikálních technik také čištění pomocí bakteriální oxidace železa. Potenciál této biologické techniky spočívá jak v její šetrnosti vůči životnímu prostředí, tak v její rychlosti, jelikož oproti chemické oxidaci oxidují FeOB železo 50×10^3 rychleji.

2.1.1 Biogenní železité okry

Pro bakterie, jež se přizpůsobily životu ve vodách bohatých na železo, je typickou adaptací vytváření extracelulárních oxidů železa. Získávají energii (neplatí pro všechny druhy) oxidací rozpustných iontů Fe^{2+} na ionty Fe^{3+} , které se vysrážejí ve formě nejrůznějších povlaků oxidů/oxyhydroxidů železa, jak uvádí U. Schwertmann [34]. A. Drummond doplňuje [21], že biogenní železité okry (dále jen BIOX) jsou husté oranžové kaly složené obvykle z převládajícího Fh-2h, dále též z amorfních oxyhydroxidů železa a huminových organických látek. Tyto BIOX mohou vznikat biotickými i abiotickými procesy. FeOB je produkovány jak ve sladkovodních, tak i mořských prostředích, a to za různých hodnot pH.

A. Drummond vyzdvihuje [21] též potenciál a význam BIOX, jakožto velmi porézního materiálu s velkým povrchem, který lze dále funkcionalizovat. Pokud by totiž byly fáze přítomných oxidů a oxyhydroxidů železa řízeny, bylo by možné ovlivňovat jejich magnetické vlastnosti. Tedy např. přeměnou BIOX tvořené Fh-2h na magnetit či maghemit, by bylo možné vytvořit magnetické mikromateriály. Otevírá se tak potenciál pro využití BIOX pro cílené podávání léčiv a biosenzoriku. Také uvádí, že BIOX produkované FeOB často zanáší potrubí a zavlažovací systémy a podílí se na biokorozi např. ocelí tankerů.

Problematika týkající se BIOX bude dále rozvedena a diskutována v následující podkapitole 2.1.2, a to z hlediska přítomných biogenních minerálů železa v BIOX a v podkapitole 2.2.2 v souvislosti s extracelulární inkrustací mikrotubulárních vláken železitými minerály typickou pro neutrofilních aerobních FeOB, jako je *Leptothrix ochracea*.

2.1.2 Biogenní minerály železa

V návaznosti na předchozí kapitulu pojednávající o BIOX a významnou provázaností této podkapitoly s kapitolami 1.7 a 2.2 je nutné rozvést vlastnosti a roli biogenních minerálů železa (dále jen BMFe) v problematice biogeochemického cyklu železa.

Pro minerály vysrážené nejrůznějšími redoxními procesy (v rámci biogeochemické oxidace železa), kterých se FeOB účastní, jsou určité vlastnosti a faktory společné:

- Z publikovaných studií vyplývá [35–37], že minerální fáze obsahující Fe^{III}, jež vznikly bakteriální oxidací Fe^{II} nezávisí na druhu či identitě bakterií, ale spíše na geochemických podmínkách, za kterých se konkrétní minerály srážejí.
- Dle Nicole R. Posth [38], je hustota částic BMFe nižší z důvodu inkorporované biomasy v těchto částicích.
- V odborných pracích je zmiňováno [37, 39], že v porovnání se systémem, který obsahuje pouze soli potřebné pro vznik minerálů železa, je množství inkorporovaných iontů z prostředí v případě BMFe značně vysoké. Právě např. uhličitany a fosforečnany, jež jsou nezbytné pro růst buněk určitým směrem, řídí nebo narušují tvorbu minerálů železa.
- Jelikož BMFe obsahují značné množství buněk a organických molekul, tvoří tzv. buněčně-minerální agregáty, uvádí studie [38, 39].

Z dosavadních studií [34–36, 39] je patrné, že pokud porovnáme chemickou syntézu minerálů železa se vznikem BMFe, ovlivněným výše popsány faktory, dojdeme k závěru, že u BMFe je krystalinita značně nižší a současně obsahují větší množství začleněných iontů. Mezi často vyskytující se BMFe patří: goethit, lepidokrocit [37, 40] a slabě krystalický ferrihydrit [41, 42]. Podstatnou skutečností je, že při cirkumneutrálním pH usměrňují uhličitany tvorbu železitých minerálů směrem ke goethitu [43]. Současně je zde ale jistý fenomén, v podobě vzniku smíšených (fází) minerálů železa např. magnetitu a zelené rzi [44] nebo goethit/nanogoethit-ferrihydritové směsi [45, 46].

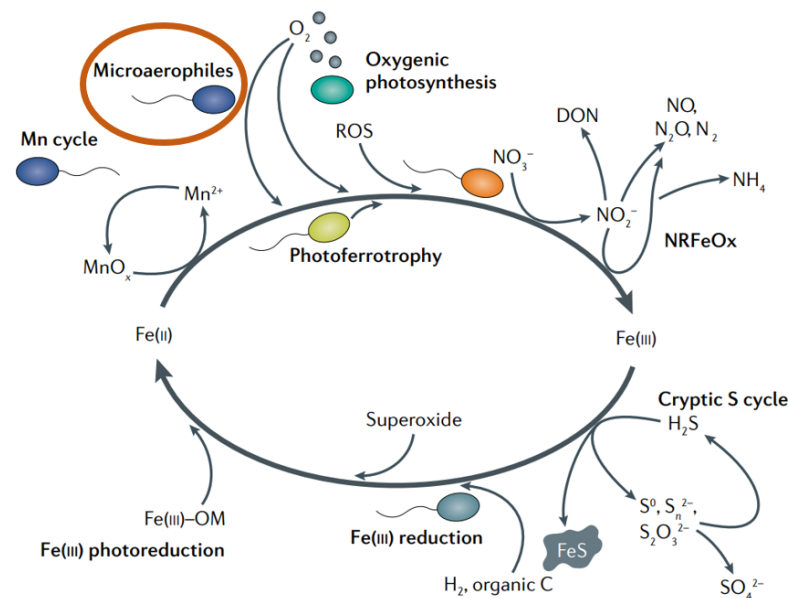
2.2 Neutrofilní aerobní železo oxidující bakterie

Neutrofilní, aerobní, chemolitoautotrofní železo oxidující bakterie (dále jen NAFeOB) vyskytující se ve sladkovodních ekosystémech jsou dle odborných publikací [25–27, 32] řazeny do třídy *Betaproteobacteria* kmene *Proteobacteria*. Podrobněji charakterizovaný bude u NAFeOB konkrétní druh rodu *Leptothrix*, tedy *L. ochracea*, jelikož je pro tuto práci zcela klíčová.

Specifická adaptace, jež si NAFeOB vytvořily, souvisí [25, 26] se skutečností, že železnaté ionty se v oxických prostředích s neutrálním pH rychle abioticky oxidují. Odborníci se shodují [25, 26, 28], že se tyto bakterie vyskytují právě na aerobním-anaerobním rozhraní s protichůdnými gradienty O_2 a Fe^{II} a jsou proto označovány jako gradientní mikroorganismy. Andreas Kappler a Casey Bryce ve své práci proto používají [28] na místo termínu aerobní přesnější označení mikroaerobní. Tyto NAFeOB při oxidaci využívají jako donor elektronů Fe^{II} a O_2 zde slouží jako elektronový akceptor. Koncentrace O_2 umožňující růst těchto NAFeOB nastává při $50 \mu M O_2$ ($\approx 1,5 \text{ mg/l}$) a méně resp. optimální koncentrací je $5\text{--}20 \mu M O_2$. Ovšem NAFeOB jsou schopné růst i při submikromolárních koncentracích O_2 .

Kontakt s kyslíkem na aerobně-anaerobním rozhraní, má [33] za následek viditelné vysrážení velkého množství BIOX tvořených především ferrihydritem. Jelikož je Fe^{III} , jakožto produkt oxidace při neutrálním pH nerozpustný, adaptovaly se na to NAFeOB strategickým extracelulárně umístěným systémem přenosu elektronů tak, aby nedocházelo k intracelulárnímu vysrážení železa, tedy inkrustaci buněk, uvádí publikace [28, 47, 48]. Na rozdíl od acidofilních FeOB nemají NAFeOB na svých membránách pH gradienty pohánějící syntézu ATP [25].

Následující schéma Obr. 5 je přehledem překrývajících se procesů, vedoucích ke kryptickému koloběhu železa (procesu, kdy je oxidované železo ihned redukováno mikroorganismy redukujícími železo) [28, 49]. Ve schéma jsou zvýrazněni mikroaerofilové (mikroaerobní FeOB), mezi které patří i NAFeOB. Dále jsou ve schéma zobrazeny dusičnany redukující a fotoferotrofní FeOB, které jsou zmíněny v podkapitolách 2.4 a 2.5.



Obr. 5 Kryptický koloběh železa. Upraveno a převzato z: [28]

2.2.1 Potenciální biochemické a molekulární mechanismy oxidace železa

Znalosti týkající se značně diskutované problematiky biochemických mechanismů oxidace Fe^{2+} a ekofyziologie těchto neutrofilních, mikroaerobních FeOB, jsou dle několika publikovaných studií [47, 50] značně omezené (s výjimkami u konkrétních druhů). Jako doposud nejpravděpodobnější faktor a klíč k pochopení biochemických mechanismů oxidace železa NAFeOB, který popisují D. Emerson, Roman A Barco a Shaomei He v jejich společné publikaci [48], se jeví extracelulární přenos elektronů (EET). Tento EET byl též studován na modelových bakteriích redukujících Fe^{3+} , a to poměrně rozsáhle. Práce byla zaměřena na hledání kandidátních genů EET v 73 neutrofilních FeOB genomech, z nichž 43 bylo kompletních nebo téměř kompletních a u zbytku se úplnost genomu pohybovala od 5 do 91 %. Velice zajímavým poznatkem je, že mnoho NAFeOB disponuje homologem Cyc2 (vnějším membránovým cytochromem *c*), který byl původně identifikovaný u acidofilní bakterie *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Další pozoruhodností jsou objevené genové shluky, které mohou potenciálně kódovat dva nové typy PCC. Jedná se o extracelulární, periplazmatický cytochrom *c* s velkým počtem hem-vazebných motivů, kódující porin, s předběžným názvem PCC3. Druhý typ s názvem PCC4 kóduje porin a tři periplazmatické multihemové cytochromy. Kromě cytochromu *c* a dvou typů PCC byly identifikovány také geny multiměďnaté oxidázy (MCO), které se na oxidaci též potenciálně podílejí.

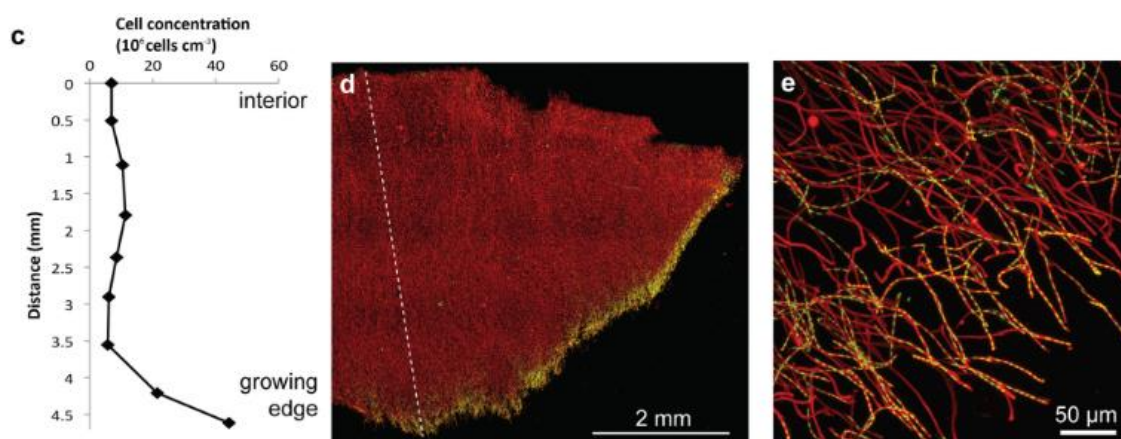
2.2.2 *Leptothrix ochracea*

V cirkumneutrálních sladkých vodách bohatých na železo (s koncentrací většinou přesahující 100 μM) mohou být dominantními NAFeOB rody *Leptothrix* nebo *Gallionella* [21]. *Leptothrix* je jedním z rodů čeledi Betaproteobakterií. Mezi nejznámější druhy tohoto rodu patří *L. ochracea*, *L. discophora*, *L. cholodnii*, *L. mobilis* [51, 52] a *L. pseudovacuoata* [53]. Tyto druhy spojuje jejich produkce extracelulárních tubulárních pouzder (pochev). Podstatnou informací je, že ačkoli jsou tyto druhy schopné akumulace železa na jejich pochvách, je *L. ochracea* jediným druhem u kterého není zjištěný přímý důkaz o jejím růstu na základě využití energie získané právě z oxidace železa [25]. Na pouzdrech ostatních zmíněných druhů rodu *Leptothrix* byla též identifikován sloučenina MnO_2 , kdežto u *L. ochracea* nikoli. Tato skutečnost napomáhá při determinaci tohoto druhu, jelikož nepřítomnost MnO_2 v pouzdru určuje, že se bude jednat právě o druh *L. ochracea* [54].

Leptothrix ochracea byla popsána jako první, jakožto nejviditelnější FeOB ve většině sladkovodních ekosystémů, popisuje D. Emerson [27]. Jedná se o neutrofilní aerobní FeOB, vyskytující se typicky ve sladkých železitých průsacích a mokřadech [31], kde přispívá již k zmíněné biogenní produkci BIOX [21]. Jelikož je tato NAFeOB naprosto klíčová pro celou práci, bude její specifická role při tvorbě BIOX, včetně extracelulární inkrustace buněk a další problematiky s tím spjaté popsána podrobněji.

Tato bakterie je morfologicky velice nápadná, a to právě na základě její produkce vláknitých pochev, z nichž překvapivě většina (více než 90 %) bývá prázdných, takže to, co se zdá být na první pohled početnou populací této NAFeOB, je reálně jen malý počet buněk [31, 33, 55]. Tento fenomén odpovídá růstu na nízko výnosném zdroji energie, který vede k produkci oxyhydroxidů železa, ale jen málo biomasy [27]. Bakterie tedy potřebují k fixaci uhlíku velké množství železa ($\sim 43\text{--}70$ molů Fe^{II} na mol C). V laboratorních podmínkách, bylo na inokulovaném médiu možné pozorovat růst a reakce populace buněk *L. ochracea* na opačné gradienty $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{2+}$ a O_2 . Zjistilo se, že mikrotubulární pouzdra se prodlužovala směrem od inokula a FeS k O_2 [55]. Poněkud překvapujícím závěrem jsou také zcela nezdařené kultivace této FeOB na typicky heterotrofních médiích podporují růst ostatních heterotrofních druhů *Leptothrix* spp. [33]. Z toho vyplývá, že skutečná fylogenetická pozice *L. ochracea* i její fyziologický status je stále zahalen mnoha nezodpovězenými otázkami vyžadující rozhršení [27].

Clara S. Chan se svým týmem [55] zkoumali na lokalitě Spruce Point, Maine BIOX (jimi nazývané jako *mats*³) vytvořené právě *L. ochracea*. Z důvodu zachování struktury rohože při odběru vzorků, bylo možné pozorovat nativní rozložení buněk. Fascinujícím zjištěním bylo, že se téměř všechna vlákna obsahující buňky *L. ochracea* nacházela na okrajích rohože. Naopak vnitřek rohože byl tvořen prázdnými pouzdry, jež byly kolonizovány jinými bakteriemi. Současně byly také konce pochev viditelně méně mineralizované než zbytek. Tyto skutečnosti jsou názorně vyobrazeny na Obr. 6, včetně grafu koncentrace buněk v příčném řezu napříč rohoží.



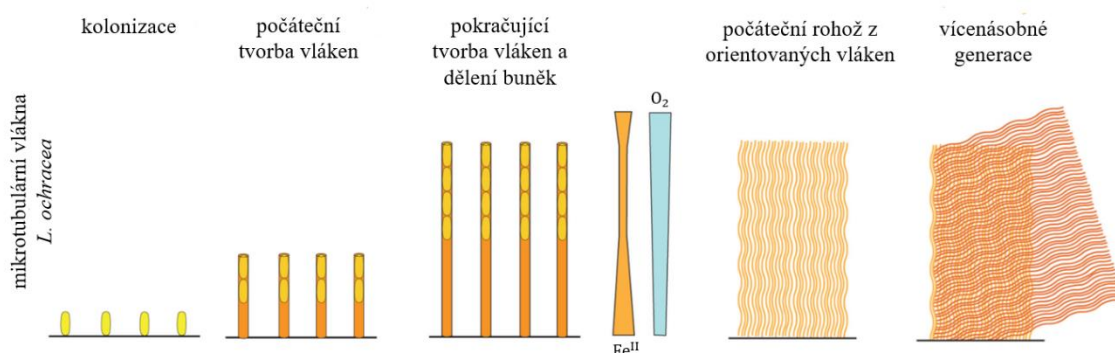
Obr. 6 Konfokální snímky rohože ze Spruce Point a údaje ukazující, že rohož byla vytvořena buňkami tvořícími pochev. (C) Koncentrace buněk v příčném řezu napříč rohoží (čárkovaná čára). (D) Přehled neporušené rohože ukazující buňky soustředěné na rostoucím okraji rohože. (E) Buňky uvnitř konců trubicových pochev na okraji rohože. Upraveno a převzato z: [55]

Jak již bylo nastíněno, vlákna *L. ochracea* jsou specifická tím, že buňky zde rostou na jednom konci a zanechávají za sebou železitými minerály inkrustovanou část tohoto vlákna. Jeden konec vlákna slouží k počátečnímu upevnění (buňky jsou však zcela ve vodné fázi, tedy nejedná se o připevnění k žádnému povrchu). K produkci vlákna (pouzdra) dochází kontinuální produkcí železitých minerálů buňkami. Stále otevřenou a nevyjasněnou otázkou je funkce těchto mikrotubulárních vláken (pouzder). Předpokládalo se, že slouží k ochraně před dehydratací, predací a škodlivým zářením, ale tento závěr není zcela dostačující, jelikož zmíněné funkce nevyžadují produkci těchto pochev v tak masivním měřítku. Velice zajímavou otázkou je pohyb těchto bakterií spojený s produkcí BMFe, jelikož se totiž zdá, že *L. ochracea* využívají biomineralizaci jako mechanismus pohybu. Tento fascinující poznatek by tak představoval nový způsob bakteriální motility. Tedy jinak řečeno *L. ochracea* by využívala odpadní produkt

³ do češtiny možné přeložit jako „rohože“

v podobě Fe^{III} k řízení své polohy v daném prostředí [55]. Na Obr. 7 je znázorněna zmíněná kolonizace, uchycení vlákna, postupný růst a tvorba vícenásobných generací *L. ochracea* tvořící rohože.

Práce Clara S. Chan ukazuje [55], že NAFeOB vytváří spíše organizované rohože než tzv. Fe flocks⁴. Výsledky této studie naznačují, že buňky tvořící rohože koordinují svůj pohyb, růst a postupují tak jednotně. Je pravděpodobné, že je tato skutečnost řízena vnějšími podněty, ale stejně tak je pravděpodobné, že uvnitř rohože probíhá komunikace mezi buňkami. Toto vysvětlení je umocněné tím, že pokud by v rohoži neexistoval podnět, ani komunikace, byly by pochvy orientovány zcela náhodně, a tudíž by nedošlo k tak významné koncentraci buněk na okrajích rohože.



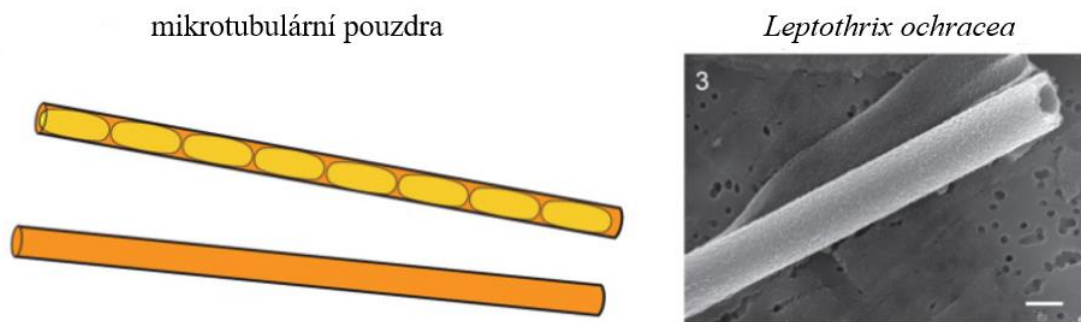
Obr. 7 Konceptuální model vývoje rohože tvořené mikrotubulárními vlákny (pochvy) *L. ochracea*. Upraveno a převzato z: [55]

Mikroskopický pohled ukazuje, že dutá mikrotubulární vlákna produkovaná *L. ochracea* [21], inkrustovaná oxyhydroxidy železa [31] jsou vysoce porézní s povrchem většinou $\sim 280 \text{ m}^2/\text{g}$, průměrem obvykle ~ 1 až $2 \text{ }\mu\text{m}$ a délkou až stovky μm . Je možné je považovat za anorganicko-organický hybrid složený z nanočástic oxidů/oxyhydroxidů železa vysrážených na organickém podkladu. Součástí extracelulárních mikrostruktur mohou být v menší míře také anorganické látky typu křemičitanů a fosforečnanů [21]. Práce H. Hashimoto a jeho týmu zjistila, že dutá mikrotubulární pouzdra *L. ochracea* jsou složena převážně z Fe a O a malého množství Si a P. Chemické složení tj. Fe, Si a P analyzované pomocí EDX bylo v poměru zhruba 80:15:5. Krystalová struktura pouzdra odpovídala Fh-2h [56]. Typickým znakem při vytváření těchto mikrostruktur NAFeOB např. diskutovanou *L. ochracea* je uvolňování exopolymerních sekretů (EPS) do prostředí. EPS jsou nejčastěji tvořeny: karboxylovými kyselinami, aminokyselinami,

⁴ možný překlad: shluky železa, sraženiny či „vločky“ železa

aldehydy, někdy i thioly resp. sulfhydrylovými funkčními skupinami ($-SH$). Ty pak chelatují vodné železo za vzniku vysrážených nerozpustných oxidů/oxyhydroxidů železa [21].

Na Obr. 8 je vyobrazen kreslený obrázek pochvy zobrazující buňky uvnitř pochvy a prázdnou pochvu, která je typičtější. Dále je zde na snímku SEM možné pozorovat prázdné inkrustované mikrotubulární pouzdro *L. ochracea* [55].



Obr. 8 Mikrotubulární pouzdra s a bez buněk. SEM snímek (3) *L. ochracea* ze sladkovodní železité rohože, Lakeside Drive, Maine. Upraveno a převzato z: [55]

2.3 Acidofilní aerobní železo oxidující bakterie

Acidofilní aerobní železo oxidující bakterie jsou od objevu prvního druhu *Acidithiobacillus ferrooxidans* před více než 80 lety předmětem mnoha výzkumů, a to především kvůli jejich významu v biotechnologiích a ve znečištění životního prostředí. Nejvíce studovanou FeOB vůbec je již zmíněná *Acidithiobacillus ferrooxidans*. U této bakterie je zajímavé, že jelikož má oxidace železa při $pH = 2$ nízkou energetickou výtěžnost ($\sim 30 \text{ kJ mol}^{-1}$), odhaduje se, že oxiduje přibližně 71 molů Fe^{2+} , aby fixovala jeden mol CO_2 [25].

2.4 Neutrofilní anaerobní železo oxidující bakterie

Oxidace Fe^{II} spojená s redukcí dusičnanů zprostředkovaná neutrofilními anaerobními bakteriemi (dále jen N RFeOB) je dle několika publikací [57–59] známa více než 20 let. Skupina N RFeOB je oproti N AFeB fylogeneticky i taxonomicky početnější a rozmanitější, neboť zahrnuje zástupce tříd *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Deltaproteobakterií*. Fenomémem této skupiny je její jediný hypertermofilní zástupce *Ferroglobus placidus* s růstovým rozsahem 65–95 °C. Zároveň se také jedná o jediného striktního anaeroba v rámci této skupiny, jelikož ostatní druhy jsou fakultativně anaerobní. Pro N RFeOB , tedy anaerobní oxidaci železa jsou terminálními akceptory elektronů dusičnany, dusitany,

oxid dusný a u některých druhů také perchloráty nebo chlorečnany, uvádí G. A. Dubinina [32]. Casey Bryce ve své studii [22] rozděluje NRFeOB dle jejich způsobu interakce s železnatými ionty do tří skupin: autotrofní NRFeOB (získávají uhlík z CO₂ a oxidují Fe^{II} enzymaticky), mixotrofní NRFeOB (organický uhlík vyžadují jako dodatečný zdroj uhlíku a oxidace Fe^{II} zde má určitou enzymatickou, někdy i abiotickou složku), chemodenitrifikátoři (vyžadují organický uhlík a nemají žádnou enzymatickou složku oxidace).

2.5 Fototrofní anaerobní železo oxidující bakterie

Bakterie zprostředkávající anaerobní oxidaci Fe²⁺ závislou na energii ze slunečního záření (dále jen FAnFeOB) byly poprvé popsány v roce 1993, při pozorování purpurové bakterie *Rhodomicrobium van niellii*. Většina popsaných fototrofních FeOB patří do čeledi *Rhodobacteriaceae* třídy *Alphaproteobacterií*. S výjimkou kmenů *Thiodictyon L7 a F4*, patřících do *Gammaproteobakterií* a jediným zástupcem zelených bakterií schopných fototrofní oxidace Fe^{II} *Chlorobium ferrooxidans*, patřícím do třídy *Chlorobia* [25, 32]. Oxidaci Fe²⁺ zprostředkovaná FAnFeOB probíhá za využití energie slunečního záření, bez přítomnosti alternativních akceptorů elektronů, za účelem produkce redukčních ekvivalentů pro fixaci CO₂ [22, 32]. Vzhledem k tomu, že množství FeOB (např. NAFeOB) produkují BIOX, dochází zde k zajímavé interakci právě s FAnFeOB. Tyto FAnFeOB jsou totiž potenciálně ohroženy, zastíněním množstvím BIOX, které by omezilo jejich přístup ke světlu, podotýká Silke Heising [60]. V důsledku této skutečnosti začali některé fototrofní FeOB jako např. *Rhodobacter capsulatus*, jakožto obranný mechanismus oxidovat železo anaerobně, píše A. J. Poulain [61].

3 Sinice a řasy

Ve sladkovodních ekosystémech jsou přítomni zástupci většiny skupin organismů na Zemi. Zcela klíčovým pojmem je tedy biodiverzita a její měřítko – bohatost (počet taxonomických jednotek na jednotku plochy). To, jaké organismy se vyskytují v nejrůznějších specifických podmínkách, je ovlivněno do jisté míry evolucí, a mnoha dalšími faktory včetně mezidruhových interakcí jako např. predací, parazitismem, konkurencí a současně také mutualismem a symbiózou, a tedy i s tím spojeným koloběh živin ve vodném prostředí. Důležitým faktorem jsou změny v biotopech, které též výrazně ovlivňují biodiverzitu, resp. to jak se biotopy vzájemně propojují je ústřední determinant biodiverzity [1].

Vzhledem k návaznosti na předešlou kapitolu 2 pojednávající o železo oxidujícími bakteriemi přítomnými např. v pramenech bohatých na železo, je zapotřebí toto téma opět rozšířit v kontextu dalších přítomných mikroorganismů v těchto sladkovodních mikrobiotopech. Mezi fotosyntetizující mikroorganismy (FMO), které v této problematice hrají významnou roli, patří dále diskutované sinice a řasy [1]. Klíčovou roli hrají samozřejmě i nejrůznější heterotrofní protistní organismy, a to zejména tím, že katalyzují koloběh uhlíku a živin v prostředí [62]. Ve spojitosti se světlem, teplotou a koncentrací živin, resp. dusíku a fosforu zmiňovaných v podkapitolách 1.4 a 1.5 je nutné dále rozebrat další klíčový pojem, a to primární produkci (PP) ve sladkovodních ekosystémech. Ta je společně s růstem a reprodukcí FMO na těchto abiotických faktorech závislá [63]. Produktem PP je biomasa získaná fotosyntetickou činností organismů. FMO využívají jako zdroj energie sluneční záření a současně je pro ně zdrojem uhlíku CO_2 . Tato vytvořená organická hmota je základem pro další produkci, výskyt organismů a současně metabolismus FMO [64]. Pokud od této hrubé primární produkce odečteme nutnou respiraci společenstva, získáme tak čistou primární produkci.

3.1 Sinice

Sinice jsou prokaryotní autotrofní fotosyntetizující skupina bakterií produkující kyslík. Nemají buněčné jádro ani organely (chloroplasty, mitochondrie atd.). Žijí jednotlivě nebo v koloniích. Rozmnožují se fragmentací vláken a buněčným dělením, píše T. Kalina [65]. Jejich taxonomické zařazení do systému je znázorněno na Obr. 2 v kapitole 2. O. Strunecký ve své publikaci popisuje [66] aktualizovanou klasifikaci řádů a čeledí sinic na základě fylogenomické a polyfázové analýzy. Popisuje, že sinice mají

pouze jednu třídu *Cyanophyceae*, která je dále rozdělena do několika řádů (z důvodu obsáhlosti nejsou vyjmenovány).

Podstatné je, že sinice jsou na naší Zemi úspěšné již miliardy let a jsou tak adaptovány na extrémní prostředí [1]. Jsou rozšířené ve vodních ekosystémech, půdě, v oblastech s vulkanickou činností a prostředích s extrémní salinitou, teplotou či pH [65]. Sinice jsou jedny z nejstarších autotrofních organismů, které značně ovlivnily globální ekosystém vznikem atmosféry obsahující kyslík. Tímto krokem tak poskytly půdu pro ostatní organismy včetně člověka [67]. Zároveň jsou jednou z hlavních složek podílející se na globálních biogeochemických cyklech [68]. Z hlediska všech fotoautotrofních mikroorganismů se také nejčastěji účastní nejrůznějších symbiotických interakcí [65]. Za zmínku stojí pigment fykobilin, jakožto funkční adaptace sinic na absorpci světla. Dokáže pohlcovat světlo v zelené oblasti, což např. chlorofyl nedokáže. Tato skutečnost jim umožňuje existovat i ve velkých hloubkách vodních ekosystémů a zůstat fotosynteticky aktivní. Sinice také produkují celou řadu toxinů. Tyto toxiny mají zejména negativní účinkům na ryby, člověka (kvalita pitné vody), plodiny a další organismy [1].

V souvislosti s železitémi prameny a návazností na předešlé kapitoly 1 a 2 je podstatné zmínit jejich vztah k železu. Je zřejmé, že se evoluce sinic prolíná s geochemickou historií železa, jelikož se vývoj kyslíkové fotosyntézy u sinic shoduje s velkými geochemickými změnami ve speciaci železa ve vodních systémech [69]. Sinice ovlivňují jeho mobilitu, reaktivitu a biologickou dostupnost ve vodních ekosystémech [41]. Zároveň jsou schopné adaptace na nedostatky železa, snížením velikosti buněk [69]. Při nedostatku železa (koncentrace železa je pod prahovou hodnotou potřebnou pro základní funkce) dochází u sinic k značné produkci Fe^{III} chelátorů v podobě sideroforů [70]. Dále se také sinice obracejí na alternativní zdroje železa v podobě koloidů a částic železa. Tato strategie je doprovázena tvorbou kolonií, spíše než jednobuněčným způsobem života [69]. Vazba kovů na buněčné stěny a exopolymerní obaly sinic je řízena protonově aktivními povrchovými funkčními skupinami, které podléhají deprotonaci a vážou ionty kovů za vzniku stabilních povrchových komplexů [71]. Ve studii Nathan Yee [72] bylo zjištěno, že při téměř neutrálním pH jsou dominantní zásobárnou iontů kovů karboxylové skupiny na buněčné stěně sinic.

3.2 Řasy

Řasy jsou heterogenní skupinou eukaryotní organismů ve většině případů schopných fotosyntézy a obsahující chlorofyl *a* [1, 73]. Vyskytují se v nejrůznějších prostředích a jedná se buď o jednotlivé buňky, společenství nebo např. mořské řasy. Řasy pozorovatelné pouze pod mikroskopem se obecně označují jako mikrořasy a ty, které je možné pozorovat i makroskopicky označujeme jako makrořasy. Je potřebné zmínit, že řasy jsou do značné míry definovány ekologickými znaky [73].

To, že sinice doslova změnili svět je zřejmé. Role řas je ale v globálním kontextu též zcela zásadní. Řasy produkují přibližně polovinu atmosférického kyslíku. Významně také ovlivňují koloběh uhlíku, dusíku, fosforu, křemíku a dalších prvků v přírodních ekosystémech. Proto jsou také využívány a zkoumány v inženýrských systémech k výrobě obnovitelných zdrojů energie a odstraňování látek znečišťující vody [73].

Na rozdíl od suchozemských rostlin žijí řasy ve větším rozpětí světelného režimu a jsou více variabilnější. Jejich adaptace na světlo spočívají např. v regulování koncentrace a složení pigmentů, změny polohy chloroplastů v buňce, schopnosti změny polohy celého organismu nebo změnou velikosti buněk a dosáhnutím tak regulace koncentrace enzymů na jednotku objemu. Řasy se odlišují svou tolerancí k teplotě, pH, konduktivitě, trofii vody aj. a to v podobě rozdílných fyziologických a ekologických optim a maxim [2]

Obdobně jako u sinic je i u řas zapotřebí zmínit jejich vztah k železu. Železo je základní živinou všech fotosyntetických organismů. Slouží jako kofaktor ve fotosyntetických a respiračních elektronových transportních řetězcích a má důležitou roli v mnoha dalších metabolických procesech [74]. Některé řasy produkují exkrety ve formě organických chelátů, jakožto komplexů s železem, díky kterým je železo k dispozici pro následné vstřebání [1]. Zástupci *Euglenales* konkrétně druhy patřící do *Trachelomonas*, mají vnější loriku (obal), který obklopuje buňku. Tento obal je důležitý, z důvodu charakteristických odlišností lorik konkrétních druhů, a tedy následné morfologické determinaci. Mezi hlavní prvky tvořící loriky patří železo a mangan. Zvýšením koncentrace železa (manganu) v prostředí může dojít ke změně mikroarchitektury lorik [75]. Loriky jsou též známy u *Chrysophyceae*, resp. rodu *Kephyrion* [76]. Ve vztahu k pramenům bohatým na železo je též nutné zmínit konkrétní druh *Pinnularia ferrophila*. Jedná se o druh rozsivky, jejíž výskyt v ČR byl doposud

nejvíce prozkoumán v oblasti CHKO Slavkovský les na několika lokalitách (tj. Farská kyselka, Slatinná kyselka) a též v několika přilehlých lokalitách okolí Mariánských lázní. Typicky se tento druh rozsivky vyskytuje v odtocích, rozlivech a odvodňovacích stružkách pod vývěry železitých kyselek, popisuje článek v časopisu Arnika [77].

3.1 Sladkovodní společenstva sinic a řas

Po taxonomickém a fyziologickém úvodu a představení sinic a řas je nutné tyto poznatky propojit a aplikovat na jejich život ve sladkovodních ekosystémech. Tato kapitola si klade za cíl popsat způsoby života sladkovodních společenstev sinic a řas a vyjmenovat typické zástupce přítomné ve sladkovodních ekosystémech.

Ve sladkovodních pramenech je druhová rozmanitost sinic a řas značná. Mezi časté řasy patří nejrozličnější rozsivky, tedy např. (*Neidium*, *Stauroneis*, *Sellaphora*, *Navicula*, *Cymatopleura*, *Eunotia* a *Pinnularia*) [78]. Typickým znakem rozsivek jsou jejich silifikované buněčné stěny. Tato schopnost rozsivek vytvářet buněčné stěny na bázi křemíku byla po staletí předmětem fascinace, jak popisuje Mark Hildebrand [79].

3.1.1 Život ve vodním sloupci

Pokud mluvíme o životě mikroorganismů spojeném s vodním sloupcem, používáme obecné označení plankton. Plankton je považován za společenstvo organismů adaptovaných na život ve vodním sloupci a podléhajícím proudům a pasivním pohybům vody. Pojem fytoplankton (*phytos* – rostlina, *planktos* – putování) [73] je myšleno fotosyntetizující společenství mikroorganismů vyznačující se morfologickou i fyziologickou plasticitou zahrnující nepohyblivé řasy, sinice i bičíkovce, obývající pelegiál hlubokých i mělkých stojatých vod a pomalu tekoucích úseků řek. Problematika fytoplanktonu je především známa kvůli jeho nadprodukcí resp. nadprodukcí sinic a vzniku vodního květu [2]. Nejdůležitějším parametrem ovlivňujícím ekologii fytoplanktonu je velikost [73]. Ta je dána mnoha faktory jako např. kompeticí, predací, či shlukováním. Zároveň se ukazuje, že by mohla být přímo řízená dostupností živin, tedy dusíkem a fosforem, popisuje A. Poulíčková [2]. Růst fytoplanktonu je spojen se spotřebou minerálních zdrojů v podobě makroživin: uhlíku, dusíku, fosforu, síry a v případě rozsivek a zlativek také křemíku. Mezi potřebné mikroživiny patří např. molybden a železo [73].

3.1.2 Život na substrátu

Zastřešujícím pojmem pro život asociovaný se substrátem je **fytoENTOS** nebo také **perifyton** (poprvé představený již v roce 1923, peri – okolo/kolem, phytos – rostlina) [73, 80–82]. Perifyton je mikroekosystém sestávající se z komplexu mukopolysacharidové matrice a společenstvím autotrofních a heterotrofních organismů jako např. zelených řas, rozsivek, bakterií, hub, protozoí a zooplanktonu [81]. Dle typu substrátu rozlišujeme mikroorganismy (sinice a řasy) na: epipelické (žijící na jemných dnových sedimentech, epilittické (rostoucí na tvrdých substrátech – kamenech), epipsamické (přichycené na písčitéch sedimentech), epizoické (žijící na živočišných) a epifytické (rostoucí na rostlinném materiálu – řasy, mechorosty a cévnaté rostliny). Tento způsob života spojený se substrátem poskytuje perifytickým mikroorganismům řadu výhod jako např. stabilitu, přístup k živinám a světlu. Světlo je zcela klíčovým faktorem pro růst FMO a úspěšné jsou jen ty druhy s vhodnou adaptací. S klesajícím osvětlením (s narůstající hloubkou v rámci vodního sloupce) klesá relativní pokryvnost perifytonu, z čehož vyplývá, že světelné podmínky ovlivňují vertikální distribuci fotoautotrofů. Současně jsou ale perifytické mikroorganismy poměrně málo tolerantní ke světlu (chápano v kontextu vzdálenosti od vodní hladiny). To vysvětluje jejich hojnější výskyt ne přímo na hladině, ale spíše v určité úrovni vodního sloupce, resp. preferují spíše zastíněné lokality, píše M. Letáková [83].

Sladkovodní epipelické řasy jsou odpovědné za řadu ekosystémových funkcí, jako jsou biostabilizace sedimentů, regulace pelagiálního a bentického koloběhu živin a primární produkce. Vzhledem k neustále vzrůstajícímu trendu využívání půdy a způsobu jakým se s půdou hospodaří, je a bude problematika epipelických řas stále aktuálnější a je žádoucí porozumět jejich nepostradatelné ekologické úloze, popisuje A. Poulíčková se svými kolegy [78].

4 Cíle práce a hypotézy

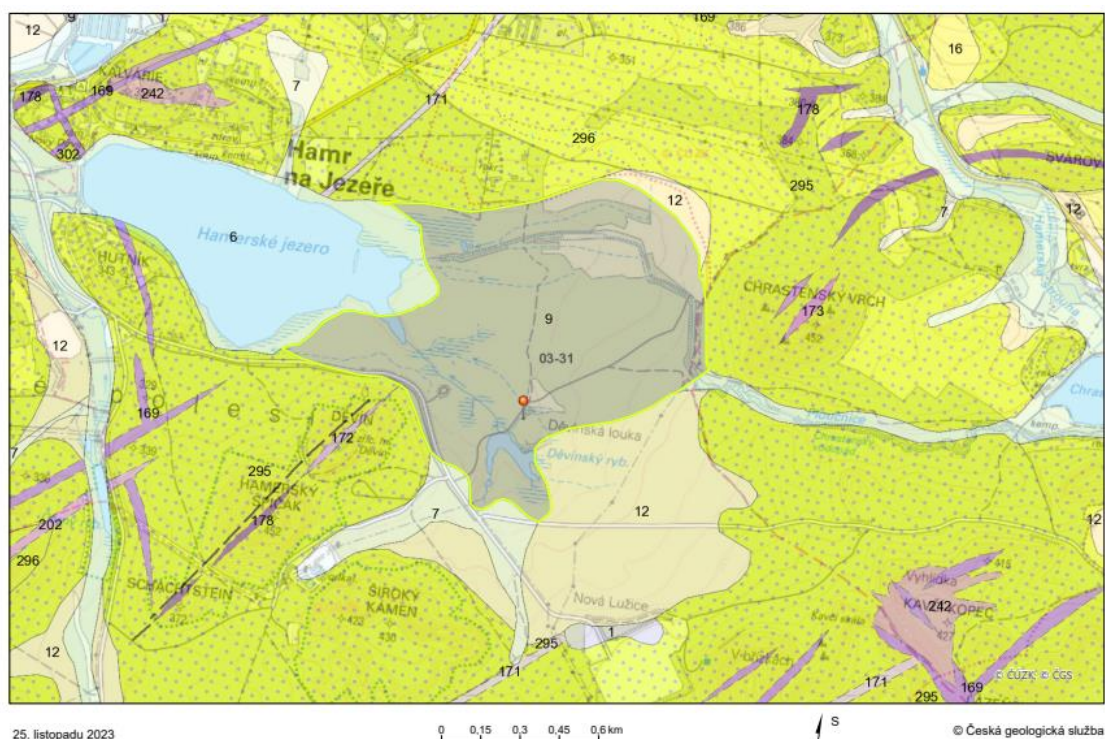
V souvislosti s výše uvedenou problematikou kapitol 1, 2 a 3 byly vybrány příslušné materiály a metody, které si kladou za cíl objasnění problematiky nově krystalované pevné fáze s Fe^{III} a její spjitosti s přítomnými mikroorganismy v konkrétním prameni bohatým na železo. Hlavní stanovené cíle a hypotézy jsou:

- Objasnit, zdali je krystalizace nové pevné fáze řízena pouze geochemickými a hydrogeochemickými přírodními procesy nebo metabolismem mikroorganismů a biochemickými procesy.
- Zda přítomné mikroorganismy využívají nově krystalovanou pevnou fáze pasivně (bez cíleného využívání) anebo aktivně (cílené využívání za účelem zlepšení svých životních a existenčních podmínek).
- Zjistit jaké jsou charakteristické trendy druhové bohatosti a struktury přítomných mikroorganismálních společenstev v kontextu abiotických faktorů.
- Jaké jsou charakteristické trendy druhové bohatosti a struktury společenstev ve vzorcích bentosu a planktonu?
- Jaká je korelace mezi přítomnými mikroorganismy v planktonu a bentosu a železo oxidující bakterií *L. ochracea*?
- Z čeho jsou tvořeny BIOX, za jakých podmínek jsou přítomny a jak s tím souvisí přítomnost mikroorganismů, zejména dominance *L. ochracea*?

5 Materiál a metody

5.1 Charakteristika zkoumané lokality

Zkoumanou oblastí o souřadnicích 50°41'40.596" N, 14°51'49.717" E je pramen bohatý na železo nacházející se u Děvinského jezera nedaleko Hamru na Jezeře. Z geovědní mapy [84] je zřejmé, že na sledované lokalitě převládá organogenní nezpevněný sediment typu slatina, rašelina či hnilokal viz Obr. 9. Je tedy možné vyvodit, že pramen bude obsahovat množství organických látek jako huminové látky, tj. fulvonové a huminové kyseliny a huminy, neboť okolní organogenní sediment je zdrojem vody. Vybrané zkoumané oblasti pramene začínají u vývěru a postupují po směru toku až do části, kde je makroskopicky zřetelné BIOX. Sledovaná lokalita včetně jednotlivých odběrových míst byla po celou dobu odběru vzorků fotografována RNDr. Františkem Eichlerem, Ph.D na fotoaparát NIKON D850.



Obr. 9 Geologické podloží sledované oblasti, ve které se nachází zkoumaný pramen bohatý na železo (označeno červeným bodem), upraveno a vytvořeno v geovědních mapách 1:50 000.

5.2 Vzorky

Dne 2. 8. 2023 bylo vymezeno 6 odběrových míst, resp. stanovišť vybraných na základě intenzity zastoupení BIOX a vzdálenosti od vývěru.

5.2.1 Odběrová místa

Všech 6 odběrových míst/stanovišť bylo zdokumentováno, viz Obr. 10 a byla zapsána jejich stručná charakteristika. Odběry vzorků na jednotlivých stanovištích jsou pro přehlednost rozřazeny podle jejich následné analýzy do podkapitol 5.3 a 5.4.

Stanoviště č. 1

První odběrové místo se nacházelo přímo u vývěru pramene, resp. v části, která byla výrazně podmáčená a byla určena jako počátek pramene. Nebyly zde patrné žádné známky železitého povlaku, tudíž bylo možné odvodit, že se potenciálně jednalo o redukční prostředí, ve kterém převažovaly rozpustné ionty Fe^{2+} na místo nerozpustných iontů Fe^{3+} . Byly zde určeny dva dominantní zástupci mechů pramenička obecná (*Fontinalis antipyretica*) a rašeliník (*Sphagnum* sp.).

Stanoviště č. 2

Druhé odběrové místo se nacházelo zhruba 3 metry od prvního a znatelně se odlišovalo. Bylo možné rozpoznat první známky BIOX. Jednotliví zástupci mechů ustoupily a nahradila je dominantnější makrofyta v podobě blíže neurčeného druhu ostřice (*Carex* sp.). Na dně pramene bylo možné pozorovat větší množství zetlelého materiálu.

Stanoviště č. 3

Na třetím odběrovém místě bylo možné již zcela jednoznačně pozorovat BIOX, kterým bylo potaženo dno a materiál opadu (listy, šišky, kůra atd.). Stanoviště bylo výrazně mělké a odebrání vzorků a měření zde bylo komplikované z důvodu znečištění vzorků tlejícím materiálem.

Stanoviště č. 4

Čtvrté odběrové místo bylo zvoleno na základě specifické výšky vodního sloupce a úplné absence BIOX (z důvodu zjištění principu takového jevu). Na dně bylo možné pozorovat značný nános tmavě zbarveného tlejícího materiálu. K prameni se na tomto místě připojovalo druhé kratší rameno. Paradoxní je, že i toto kratší rameno obsahovalo

značné stopy BIOX, ale v místě, kde se tyto dvě ramena spojila, již žádný viditelný povlak pozorovatelný nebyl.

Stanoviště č. 5

Páté odběrové místo bylo vybráno z důvodu značně velkého množství BIOX. Makroskopicky se jednalo o hutný povlak zastoupený v celém vodním sloupci, avšak při vložení měřících sond byl povlak značně rozvířen. Jedná se tedy o množství železitých sraženin, které jsou z makroskopického pohledu spíše amorfní než krystalické.

Stanoviště č. 6

Na šestém stanovišti již nebyly odebírány vzorky pro mikrobiologickou analýzu. Stanoviště sloužilo k terénnímu měření a odběru vzorků pro hydrogeochemickou analýzu. Zastoupení BIOX zde bylo velmi obdobné jako na stanovišti č. 5.



Obr. 10 Fotodokumentace stanovišť č. 1–6. (foto RNDr. F. Eichler Ph.D., upraveno autorem)

5.3 Hydrogeochemická analýza

5.3.1 Terénní měření

Na odběrových místech 1–5 bylo provedeno (*in situ*) terénní měření pH, Eh, O₂ a ORP pomocí přístroje WTW Multi 3630 IDS (WTW, Německo). Terénní měření bylo uskutečněno pomocí sond určujících pH, Eh, O₂ a ORP. Tyto sondy byly vždy (po dvojici) zapojeny do přístroje a měření probíhalo až do chvíle, kdy se příslušné hodnoty těchto abiotických faktorů ustálily. Jednotlivé sondy byly na vybraných stanovištích umístěny vždy do míst, které se jeví jako nejrelevantnější v tom slova smyslu, že nejpřesněji definovaly dané stanoviště. Výsledné hodnoty byly zapsány do tabulky a vytvořeny příslušné sloupcové grafy v programu Excel.

5.3.2 Odběr vzorků pro analýzu parametrů TC, TOC, TIC, TN a TP

Na stanovištích 1, 2, 4 a 5 byla odebrána do připravených láhví o objemu 0,5 l voda ze svrchní části vodního sloupce. Jednotlivé vzorky byly přeceděny přes sítko z důvodu toho, aby vzorek neobsahoval makroskopicky viditelné kusy nečistot (půda, listy, jehlice atd.) Lahve byly uzavřeny tak, aby ve vzorku nebyla vzduchová bublina, která by mohla potenciálně ovlivnit výsledky následné laboratorní analýzy parametrů TC, TOC, TIC, TN a TP. Vzorky byly poté uschovány v lednici. Analýza těchto parametrů byla zhotovena v Liberci dne 24. 8. 2023 v laboratoři chemických sanačních procesů vedoucí laboratoře paní Ing. L. Lacinovou, Ph.D. Parametry TC, TOC, TN byly měřeny na TOC analyzátoru a parametr TP na ICP-OES. Výsledné hodnoty byly zapsány do tabulky a vytvořeny příslušné sloupcové grafy v programu Excel.

5.3.3 Odběr vzorků pro geochemickou analýzu

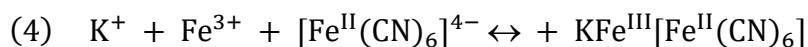
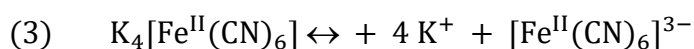
Na odběrových místech 2, 3, 5 a 6 byly odebrány vzorky obsahující výrazné stopy vysráženého železa, které byly následně použity k provedení orientačních kvalitativních terénních zkoušek přítomnosti Fe^{II} a Fe^{III} v jednotlivých vzorcích a k analýze pomocí optické a fluorescenční mikroskopie

5.3.4 Kvalitativní zkoušky přítomnosti Fe^{II} a Fe^{III}

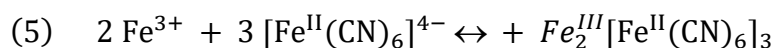
Publikace uvádějí [85, 86], že pro kvalitativní zkoušky přítomnosti Fe^{II} a Fe^{III} v pevných fázích anebo Fe²⁺ či Fe³⁺ v roztocích se používají vysoce citlivé a selektivní indikátory. Pro stanovení Fe^{II} v pevné fázi či Fe²⁺ v roztoku se jedná o reakci s K₃[Fe^{III}(CN)₆] (hexakynoželezitanem draselným) a pro Fe^{III} v pevné fázi či Fe³⁺ v roztoku reakce s K₄[Fe^{II}(CN)₆] (hexakynoželezatanem draselným). Pokud se Fe

nachází chemicky vázané v pevné fázi, je nutno jej ve stejném oxidačním stupni převést do roztoku. Proto se aplikují slabě kyselé roztoky indikátorů v destilované vodě okyselené přídavkem HCl. Podle barevné reakce lze určit, ve kterém oxidačním stupni se Fe v pevné fázi či roztoku nachází. Vzhledem k výrazné barevné reakci s Fe v různém oxidačním stupni je tato metoda velice citlivá a snadno proveditelná jako orientační chemická zkouška v terénu při odběru vzorků.

Modré zbarvení, které vzniká reakcí Fe^{3+} se slabě kyselým roztokem $\text{K}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$, je nazýváno berlínská modř $\text{Fe}^{\text{III}}_2[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$. S Fe^{2+} dává jen hnědě zbarvený roztok. Chemicky lze výše popsané interakce vedoucí ke vzniku berlínské modři definovat stechiometrickými rovnicemi (3) a (4) [85, 86]:



Kde, $\text{KFe}^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]$ je rozpustná, ale koloidní forma berlínské modři. Pokud je ale v roztoku nadbytek Fe^{3+} pak chemická reakce probíhá podle stechiometrické rovnice (5) [85, 86]:



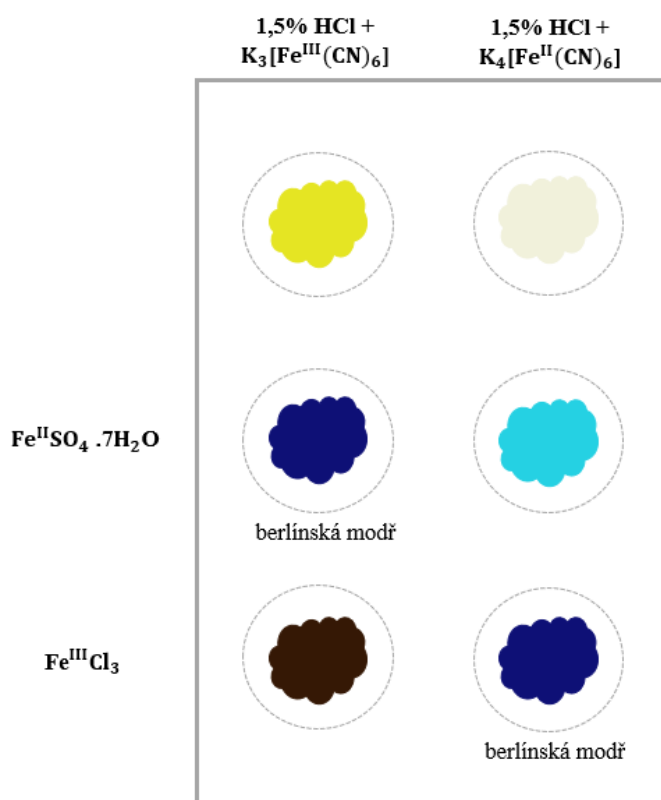
kde $\text{Fe}^{\text{III}}_2[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$ je nerozpustná forma berlínské modři [85, 86].

Roztoky byly připraveny den před jejich aplikací k barvení na přítomnost různých oxidačních stavů Fe. Indikační roztoky pro důkazy Fe^{II} či Fe^{III} v pevné fázi anebo Fe^{2+} či Fe^{3+} v roztocích byly připraveny následně:

- do dvou plastových uzavíratelných zkumavek o objemu 50 ml byl dán slabě kyselý roztok destilované vody a HCl: o přibližné koncentraci 1,5 %, tj. 1,5 ml čisté HCl v 100 ml dH₂O
- v laboratoři se pracovalo s 36% roztokem HCl, tedy po přepočtu přibližně 4,2 ml 36% HCl v 100 ml dH₂O, tj. 2,1 ml 36% HCl v 50 ml dH₂O

- následně byl navážen 1g $K_3[Fe^{III}(CN)_6]$ a 1g $K_4[Fe^{II}(CN)_6]$ a tyto vzorky byly uschovány v samostatných zkumavkách⁵

V terénu se stanovení přítomnosti oxidačních stavů železa provádělo na porcelánových miskách s jamkami. Kontrolní reakce byly provedeny s $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ a $FeCl_3$. Princip kontrolních reakcí je shrnut na Obr. 11, kde nejstěžejnější je nejspodnější jamka vpravo, kde má potenciálně dojít ke vzniku berlínské modře, tedy probíhá zde reakce $K_4[Fe^{II}(CN)_6]$ v okyseleném roztoku s Fe^{3+} .



Obr. 11 Kontrolní stanovení přítomnosti oxidačních stavů (Fe^{2+} , Fe^{3+}) železa prováděné na porcelánové misce s jamkami.
(vytvořeno autorem)

Následně byly provedeny reakce indikačních činidel se vzorky č. 2, 3, 5 a 6 získaných z železitého pramene. Po vložení pevných fází a roztoků, kde se mají různé oxidační formy železa prokazovat, byly do jamek kápnuty indikační roztoky a bezprostředně poté byla sledována a vyhodnocována barevná reakce. Tyto reakce byly provedené na porcelánové misce o 12 jamkách ve třech řadách, tj. první řada obsahovala pouze vzorky

⁵ k smíchání těchto vzorků s okyselenými roztoky došlo až bezprostředně před jejich aplikací v terénu z důvodu rychlé oxidace těchto indikátorů na vzduchu

z pramene, v druhé řadě byly vzorky z pramene s indikátorem na detekci Fe^{2+} a ve třetí nejspodnější řadě byly vzorky z pramene spolu s indikátorem na detekci Fe^{3+} .

5.3.5 Optická a fluorescenční mikroskopie

Analýza vzorků pomocí optické a fluorescenční mikroskopie byla provedena dne 4. 8. 2023 ve zkušební laboratoři optické a fluorescenční mikroskopie pana RNDr. Františka Eichlera, Ph.D. Analýza a dokumentace zkušebního vzorku před vysušením (dispergovaném v původní vodě) byla provedena mikroskopem NIKON Eclipse 600 s fotoaparátem NIKON D810. Následně byla provedena fluorescenční mikroskopie, tj. analýza a dokumentace zkušebního vzorku po vysušení. Byla provedena mikroskopem NIKON Eclipse 600 s fotoaparátem NIKON D7100 s příslušnými filtry. Geometrie osvětlení a filtry jsou uvedeny pod příslušnými fotodokumentacemi ve výsledcích v podkapitole 6.1.4

5.3.6 Elektronová mikroskopie (SEM)

Na základě předešlého pozorování vzorků optickým a fluorescenčním mikroskopem ve zkušební laboratoři, byly vybrány části zkušebního vzorku v původním stavu po vysušení, pro následnou analýzu pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Analýza SEM byla provedena bez pokovení, elektronovým mikroskopem UHR FE-SEM ZEISS Ultra Plus. Tento elektronový mikroskop je vybaven mikroanalytickými detektory OXFORD (EDX a WDX) pro lokální i plošnou kvalitativní i kvantitativní chemickou analýzu. U vybraných částí vzorku byly zdokumentovány přítomné mikroorganismy inkrustované předpokládanou pevnou směsí s Fe^{III} . Dále byla provedena lokální a plošná kvalitativní a kvantitativní chemická analýza. Analýza SEM, EDX a WDX byla provedena panem Ing. Pavlem Kejzlarem, Ph.D. dne 7. 8. 2023.

5.4 Mikrobiologická analýza

5.4.1 Odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu

Na odběrových místech 1–5 byl do připravených označených zkumavek odebrán vždy vzorek planktonu a bentosu. Celkem se jednalo o 10 vzorků, tedy 5 vzorků planktonu (P1–P5) a 5 vzorků bentosu (B1–B5). Tyto vzorky byly převezeny v chladicím boxu (z důvodu uchování daných vzorků) do laboratoře, kde byla následně (během dvou dnů) provedena mikrobiologická analýza „čerstvých vzorků“.

Plankton

Plankton byl odebrán dle odběrové metody popsané v publikaci Úvod do hydrobiologie [87] pomocí hydrobiologické planktonní sítě (planktonky). Jedná se o kónický pytel zhotovený z jemné tkaniny o velikosti ok 20 μm , který je ústím navlečený na kruhový rám. Při tažení planktonkou po hladině vniká voda jejím ústím, přes stěny se filtruje a v zadní části se následně hromadí mikroorganismy. Vzhledem k tomu, že se jednalo o lov ve volné vodě, byla použita planktonka vrhací, jejíž rám je za pomoci oček přichycen na provaz. Použitá planktonka měla na svém konci výpustní kohout, a tak bylo možné nabraný vzorek vždy vypustit do předem připravených uzavíratelných zkumavek. Jednotlivé vzorky planktonu byly získány vždy třemi až čtyřmi odběry planktonkou. Mezi jednotlivými odběry byla planktonka vždy důkladně promyta.

Bentos

Při odběru bentosu byl rukou nabírán tlející materiál (listy, šišky, půda atd.) a vymačkáván do připravených zkumavek. Na každém stanovišti byly zvoleny tři konkrétní místa, ze kterých byly vzorky odebrány, z důvodu zachycení maxima mikroorganismální diverzity vzorků z jednotlivých stanovišť.

5.4.2 Optická mikroskopie

Mikroskopické studium vzorků včetně determinace přítomných druhů bylo provedeno 2.–3. 8. 2023. Pozorování bylo uskutečněno optickým mikroskopem OLYMPUS BX43. Fotodokumentace sinic, řas, bakterií a celkového porovnání vzorků byla pořízena objektivem OLYMPUS 100x OIL a fotoaparátem CANNON EOS 70D. Jednotlivé vzorky (P1–P5 a B1–B5) byly po dobu pozorování uchovávány v lednici. Jednotlivé vzorky byly homogenizovány a poté bylo mikropipetou nanášeno vždy cca 30 μl na podložní sklo, přikryto krycím sklem a poté pozorováno. Pozorování jednotlivých vzorků planktonu a bentosu bylo u každého vzorku provedeno 2–3krát.

5.4.3 Determinace vzorků

Determinace vzorků byla provedena na základě publikací Atlas sinic a řas 1 [88], Atlas sinic a řas 2 [89] a Atlasu vodních organismů se zřetelem na vodárenství, povrchové vody a čistírny odpadních vod [90].

5.4.4 Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení dat bylo použito 10 vzorků, tj. P1–P5 a B1–B5. Statistické analýzy a vizualizace struktury přítomných mikroorganismů byly prováděny v programech Microsoft Office Excel a PAST.

Jednoduché sloupcové grafy zachycující počet druhů ve vzorcích P1–P5 a B1–B5 a zastoupení *L. ochracea* a vysrážených směsí s Fe^{III} byly vytvořeny v programu Microsoft Office Excel. U grafu zastoupení *L. ochracea* a vysrážených směsí s Fe^{III} byla na ose y použita zjednodušující stupnice 0–3, kde 0 značí absenci a hodnoty 1 (nejméně) až 3 (nejvíce) reprezentují subjektivní zjednodušující hodnocení zastoupení BIOX a *L. ochracea* ve vzorcích. Porovnání druhové bohatosti mikroorganismů v bentosu a planktonu napříč vzorky 1–5 je znázorněno krabicovým grafem (BoXPlot), vytvořeným v programu PAST.

Dále byla struktura společenstva nahlížena skrze specifické ordinační techniky, neparametrického mnohorozměrného škálování – NMDS [91] v programu PAST. NMDS není ovlivněna nelinearitou ani mírným šumem v datech, či odlehlými hodnotami. Na rozdíl od většiny ostatních ordinačních metod, které počítají mnoho dimenzí (os), přičemž na závěr zobrazí typicky jen dvě, je v případě NMDS počet dimenzí zadán předem. Tyto dimenze jsou pak vypočítány a zobrazeny v diagramu tak, aby co nejlépe vysvětlovaly druhovou matici, tedy pozorovanou variabilitu mezi vzorky [92]. NMDS nepočítá přímo s druhovou maticí, ale s maticí získanou po přepočtení podle zvolených podobnostních indexů. Byly zvoleny indexy Bray-Curtisův a Jaccardův, s tím že Bray-Curtisův index vycházel z tabulky absence a prevalence mikroorganismů (Příloha E) a index Jaccardův z tabulky abundance (Příloha F). Jednotlivé body v NMDS diagramu představují jednotlivé vzorky. Vzájemná pozice těchto bodů, tj. především vzdálenost, by měla odpovídat podobnosti, resp. odlišnosti vzorků.

6 Výsledky

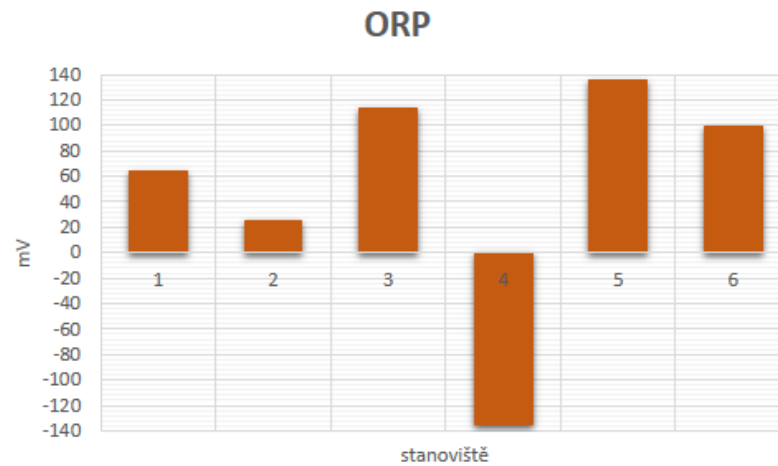
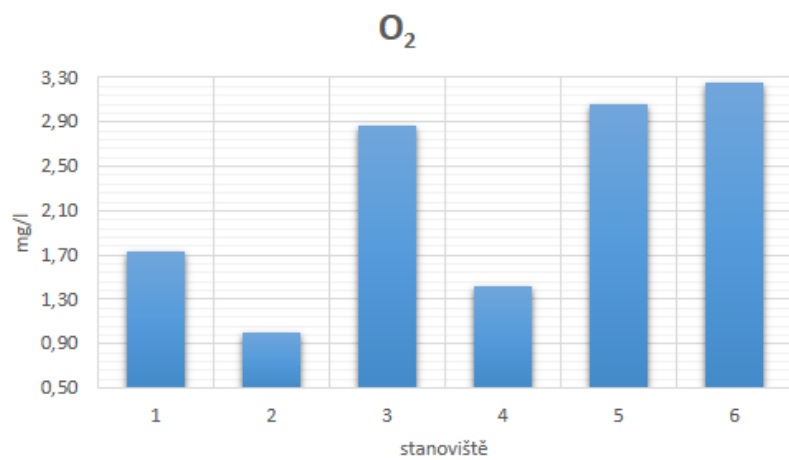
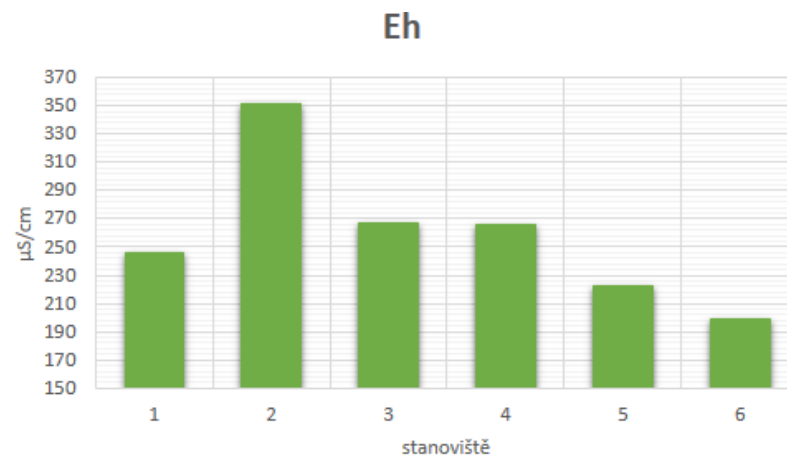
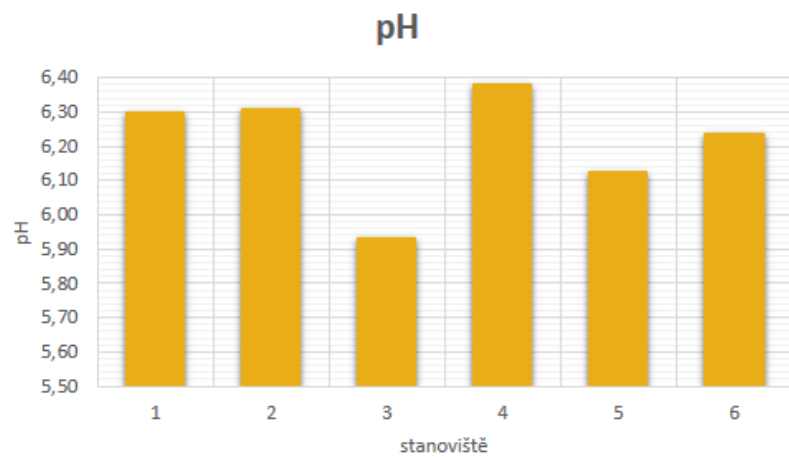
6.1 Hydrogeochemická analýza

6.1.1 Vyhodnocení výsledků terénního měření pH, Eh, O₂ a ORP

Na následujících grafech viz Obr. 12 jsou znázorněny příslušné hodnoty terénního měření pH, Eh, O₂ a ORP napříč stanovišti č. 1–6 (dále již jen st. č.). Výsledné hodnoty na základě, kterých byly grafy vytvořeny, jsou shrnuty v tabulce v Příloha A.

Z grafu **pH** je zřejmé, že hodnoty se pohybují na všech stanovištích přibližně okolo pH = 6, resp. nejnižší hodnoty (pH = 5,931) byly naměřeny na st. č. 3 a nejvyšší (pH = 6,384) na st. č. 4. Z grafu **Eh** je zřetelné, že hodnoty konduktivity se pohybují v rozmezí 199 (st. č. 6) až 267 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (st. č. 3). Nejvyšší hodnoty (352 $\mu\text{S}/\text{cm}$) byly naměřeny na st. č. 2 a nejnižší (199 $\mu\text{S}/\text{cm}$) na st. č. 6.

Výsledné hodnoty měření vyobrazené na grafech **O₂** a **ORP** spolu do značné míry korelují. Je možné pozorovat jistý trend, tedy se zvyšující se koncentrací O₂ se má tendenci zvyšovat i ORP a naopak. Nejvyšší hodnoty tj. 3,25; 3,06 a 2,86 mg/l O₂ byly naměřeny na st. č. 6, 5 a 3. Hodnoty ORP na těchto stanovištích jsou v porovnání s ostatními stanovišti vyšší. Nejvyšší hodnoty ORP byly naměřeny na st. č. 5 (135,7 mV). Avšak neplatí zde přímá korelace, jelikož nejvyšší koncentrace O₂ (3,25 mg/l) na st. č. 6 zcela nekoreluje s ORP, resp. hodnoty ORP na st. č. 3 a 5 jsou vyšší (113,6 a 135,7 mV), ač na nich oproti st. č. 6 byla naměřena nižší koncentrace O₂. Při porovnání hodnot ORP na všech stanovištích se na první pohled výrazně odlišuje st. č. 4, na kterém byla naměřena záporná hodnota ORP, tedy – 135,5 mV. Stanoviště č. 1 a 2 s nízkými koncentracemi O₂ sice vykazují nízké hodnoty ORP, avšak oproti st. č. 4 jsou hodnoty kladné.



Obr. 12 Grafy výsledných hodnot terénního měření pH, Eh, O₂ a ORP

6.1.2 Kvalitativní zkoušky přítomnosti Fe^{II} a Fe^{III}

Kontrolní kvalitativní zkoušky přítomnosti Fe^{II} a Fe^{III} v pevné fázi či Fe²⁺ a Fe³⁺ v roztoku byly provedeny dle již zmíněného postupu (5.2.2). Z Obr. 13 je patrné, že výsledky korelují se zmíněnou teorií. Důkazem je vzniklá berlínská modř⁶ reakcí indikačních činidel na detekci Fe³⁺ tj. 1,5% HCl + K₄[Fe^{II}(CN)₆] s FeCl₃. Hnědé zbarvení vzorku v levé spodní jamce též koreluje s teorií. V levé horní jamce obsahující pouze indikátor, bylo možné pozorovat již částečnou oxidaci, projevující se lehkým zmodráním okrajů indikátoru.

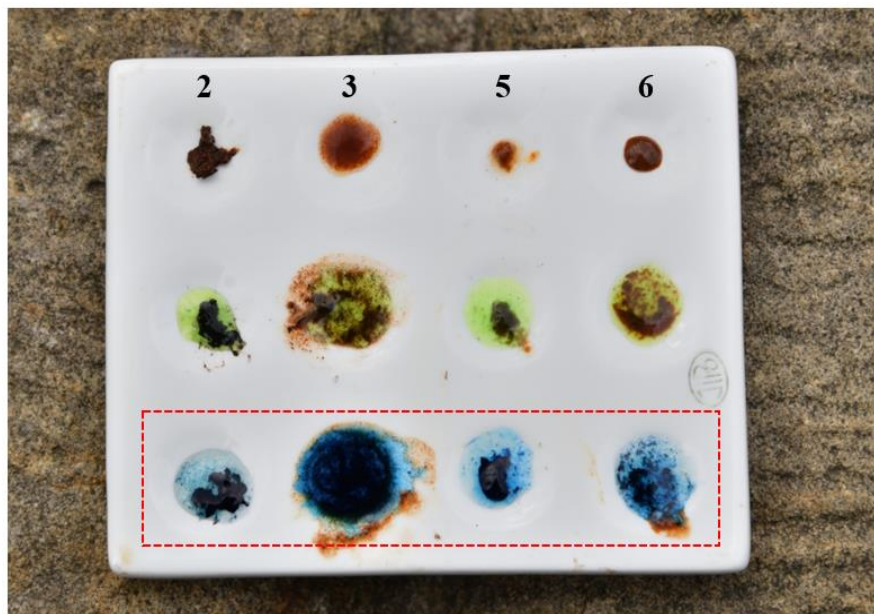


Obr. 13 Kontrolní stanovení přítomnosti oxidačních stavů železa prováděné na porcelánové misce s jamkami. (foto F. Eichler, upraveno autorem)

Kvalitativní zkoušky přítomnosti Fe^{II} a Fe^{III} v pevné fázi či Fe²⁺ a Fe³⁺ v roztoku u vybraných vzorků (č. 2, 3, 5 a 6) ze zkoumaného železitého pramene jsou vyobrazeny na Obr. 14. Zkoumané vzorky byly odebrány z BIOX a materiálu potaženého vysráženým železem (listy, šišky). Vzniklé modré zbarvení (po přidání indikačního činidla na detekci

⁶ označená červenou přerušovanou čarou

Fe^{3+}) u všech čtyř vzorků ve spodním řádku⁷ porcelánové misky zcela jasně dokazuje přítomnost vysrážených Fe^{3+} iontů/ Fe^{III} . Současně je v prostředním řádku (na detekci Fe^{2+}) možné pozorovat částečnou oxidaci vzorků na vzduchu, která se projevuje lehkým namodráním.

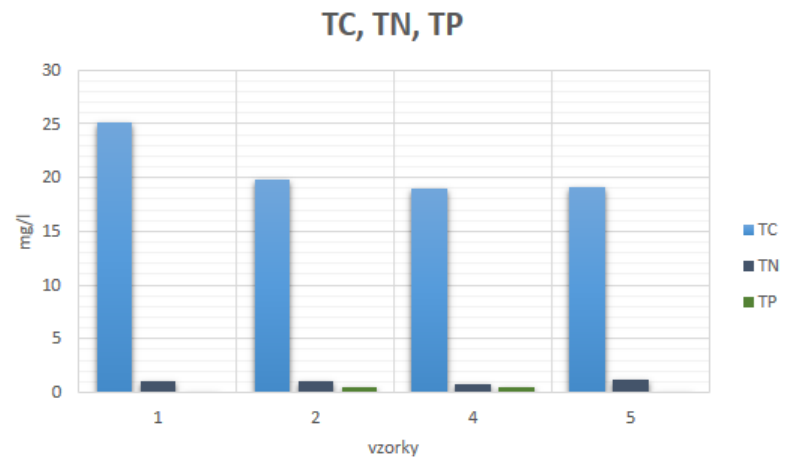
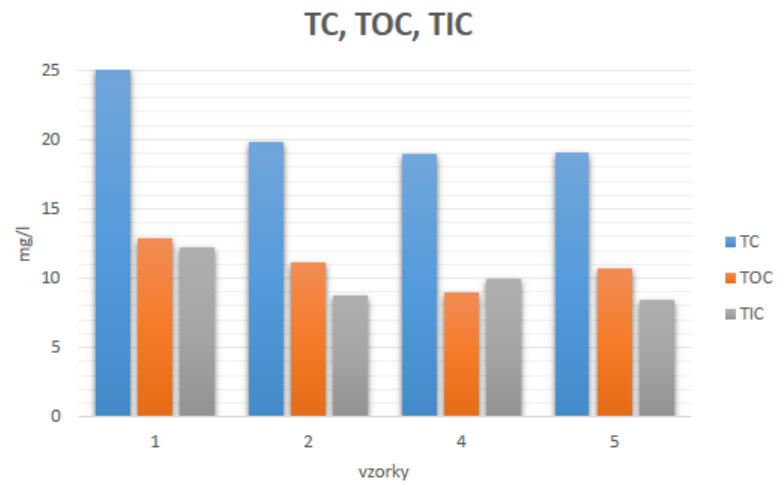
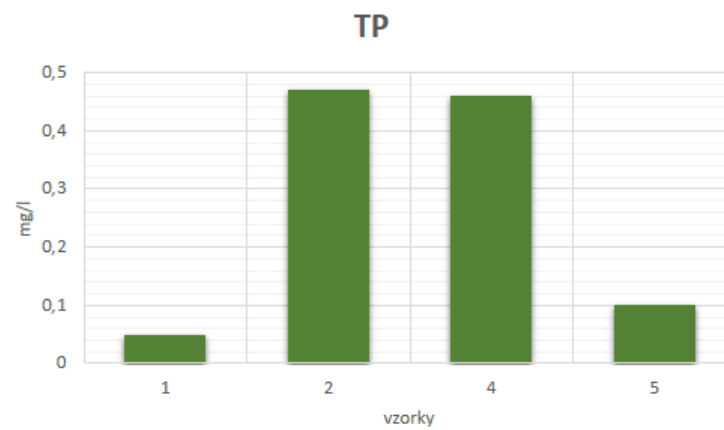
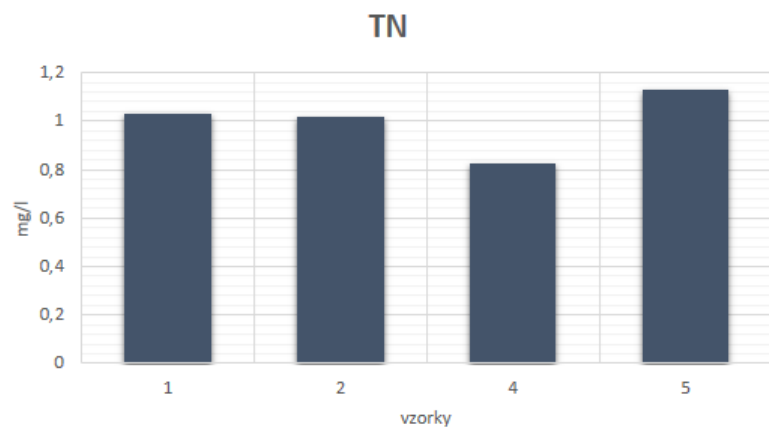


Obr. 14 Kvalitativní zkoušky přítomnosti Fe^{II} a Fe^{III} v pevné fázi či Fe^{2+} a Fe^{3+} v roztoku u vybraných vzorků (2, 3, 5 a 6) ze železitého pramene. (foto F. Eichler, upraveno autorem)

6.1.3 Analýza parametrů TC, TOC, TIC, TN a TP

Obr. 15 zachycuje příslušné grafy, tedy hodnoty parametrů TC, TOC, TIC, TN a TP ve zkoumaných vzorcích č. 1, 2, 4 a 5. Tabulka zachycující výsledné hodnoty je v Příloha B. Hodnoty TN se u všech vzorků pohybovaly okolo 1 mg/l (resp. 0,823 – 1,13 mg/l). Nejvyšší hodnoty TN byly naměřeny ve vzorku č. 5 (1,13 mg/l). Hodnoty TP byly výrazně vyšší u vzorků č. 2 a 4 (0,47 a 0,46 mg/l), kdežto u vzorků 1 a 5 bylo množství takřka stopové (0,05 a 0,1 mg/l). Množství TC bylo ve všech vzorcích řádově vyšší než TN a TP. U vzorku č. 1 byly hodnoty TC nejvyšší tj. 25,13 mg/l. U vzorků 2, 4 a 5 se hodnoty pohybovaly okolo 20 mg/l (resp. 18,97 – 19,87 mg/l). Graf porovnávající TC, TN a TP tyto řádově vyšší hodnoty TC oproti TN a TP zřetelně ukazuje. Poměr uhlíku a dusíku (C:N) napříč vzorky vycházející z tabulky v Příloze B se pohyboval v rozmezí hodnot 16,9–24,4. Nevětší rozdíl hodnot (poměr) uhlíku a dusíku byl ve vzorku č. 1 (tj. 24,4) a nejmenší ve vzorku č. 5 (tj. 16,9).

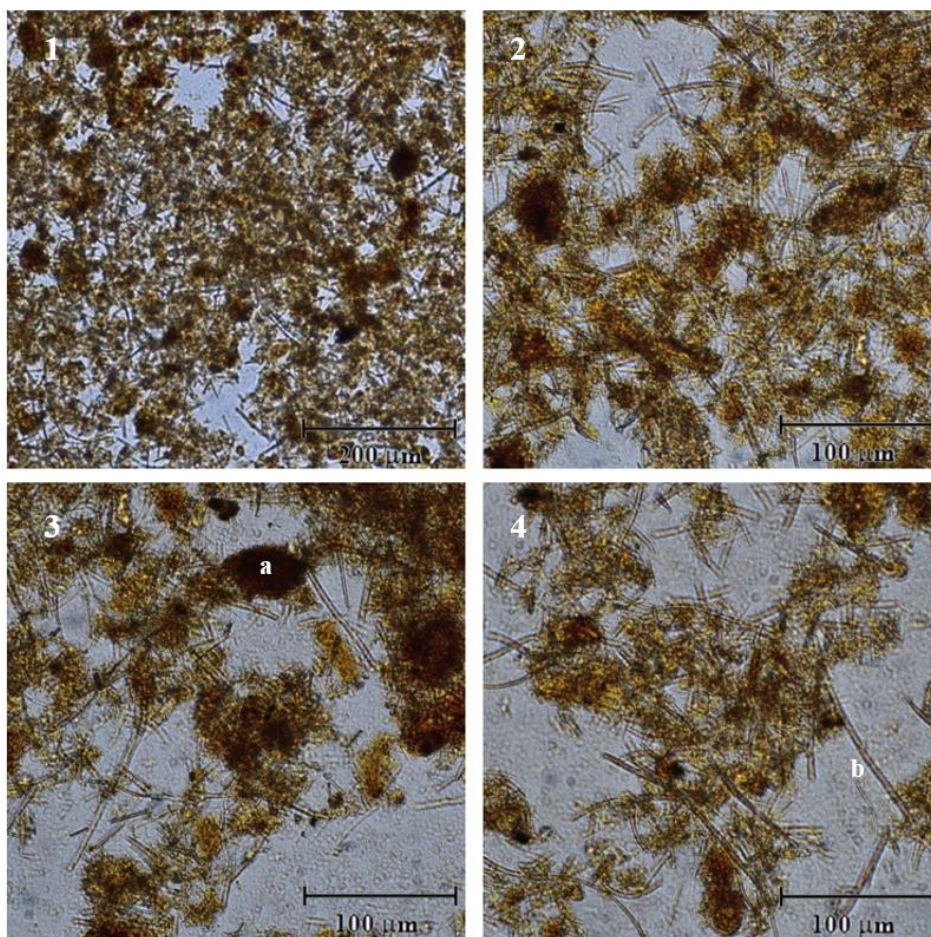
⁷ označené červenou přerušovanou čarou



Obr. 15 Grafy hodnot parametrů TC, TOC, TIC, TN a TP ve zkoumaných vzorcích 1, 2, 4 a 5.

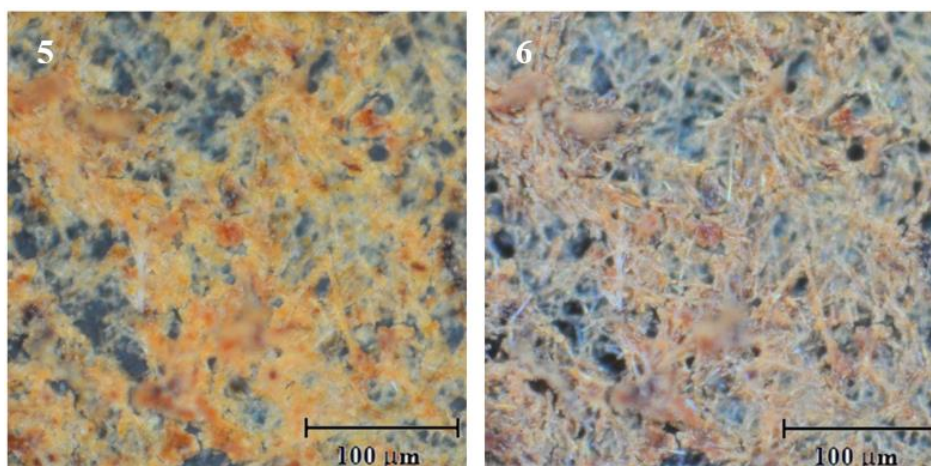
6.1.4 Optická a fluorescenční mikroskopie

Obr. 16 předkládá snímky z optické mikroskopie. Pozorovaný vzorek byl odebrán na stanovišti č. 6 (vzorek č. 6 určený pro hydrogeochemickou analýzu). Na všech snímcích (1–4) je možné pozorovat značný podíl BIOX, tedy rohože s převládajícím podílem směsi pevných látek s Fe^{III} , včetně množství přítomných mikrotubulárních vláken viz snímek 4 (a), která jsou v podkapitolách 6.1.6 a 6.2.1 identifikována jako vlákna *Leptothrix ochracea*. Dále je možné pozorovat, že vysrážené železo (Fe^{III}) není přítomné pouze na pouzdrech *L. ochracea*, ale vytváří i větší sraženiny – shluky tmavší barvy viz snímek 3 (b).



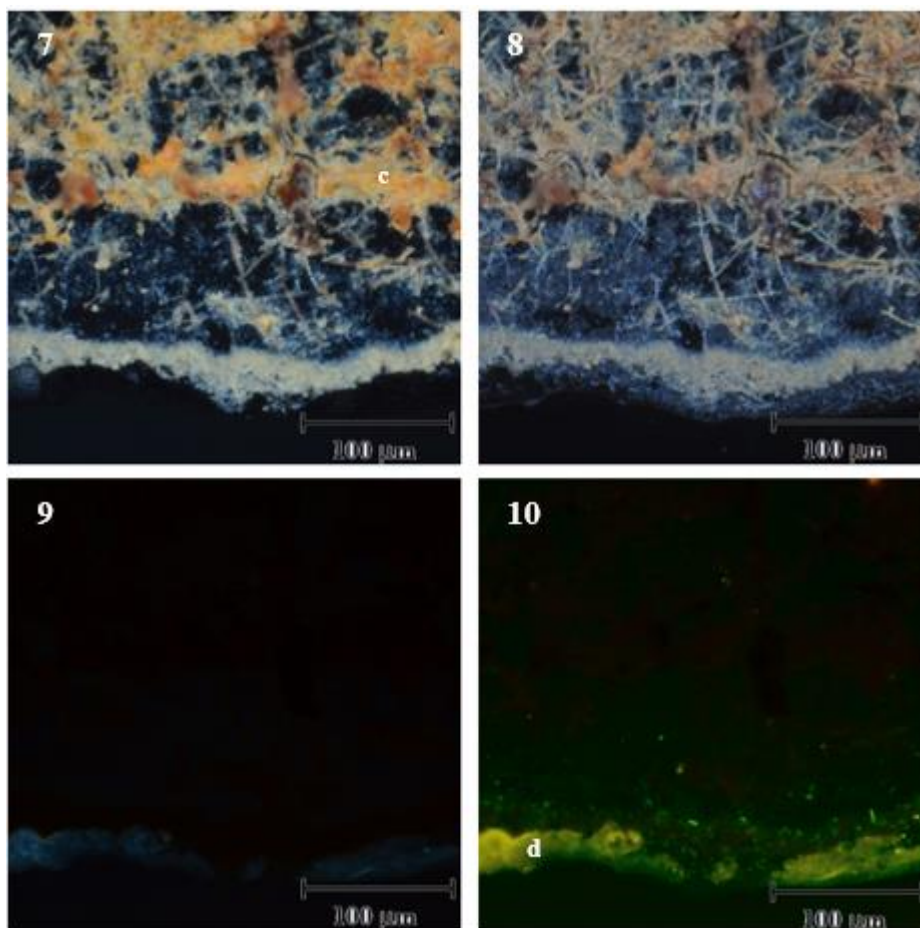
Obr. 16 Mikroskopická dokumentace separované části zkušební vzorku v původním stavu před vysušením, dispergováno v původní vodě, mikroskop NIKON Eclipse 600 s fotoaparátém NIKON D810. Geometrie osvětlení: procházející polarizované světlo s polarizátory || BF, filtr pro denní světlo; objektiv CFI LU Plan Fluor, 10x/0.30 A, W.D. 15 mm, původní zvětšení přibližně 100x (1), objektiv CFI LU Plan Fluor, 20x/0.45 A, W.D. 4.5 mm, původní zvětšení přibližně 200x (2), (3), (4). Shluky směsi pevných látek s Fe^{III} (a), mikrotubulární vlákna *L. ochracea* (b).

Na Obr. 17 je vyobrazen přibližný střed vzorku č. 6 po vysušení. Jedná se o část vzorku s největším zastoupením mikrotubulárních vláken a vysrážené směsi s Fe^{III} . Na snímcích 5 i 6 je možné pozorovat, výraznou inkrustaci množství přítomných mikrotubulárních vláken *L. ochracea* směsí látek s Fe^{III} .



Obr. 17 Mikroskopická dokumentace separované části zkušební vzorku po vysušení, mikroskop NIKON Eclipse 600 s fotoaparát NIKON D7100. Geometrie osvětlení: odražené polarizované světlo s polarizátory x BF, filtr pro denní světlo (5); nepolarizované světlo BF, filtr pro denní světlo (6).

Na Obr. 18 je možné pozorovat stejný vzorek (č. 6) avšak pozornost je zde kladena na výraznou odlišnost okrajů od zbytku vzorku. Je patrné, že při vysušení došlo na okrajích vzorku k odlišné krystalizaci, než kterou je možné pozorovat např. na mikrotubulárních vlákních a větších sraženinách (c). V případě snímku (10) při použití fluorescenční mikroskopie byly tyto okraje zbarvené do žluto-zelena (d), kdežto část vzorku s převahou vysráženého železa a mikrotubulárních vláken zbarvení nejevila. Tento vzorek byl následně dále analyzován v rámci kvalitativního a kvantitativního stanovení zastoupení chemických prvků viz podkapitola 6.1.6.

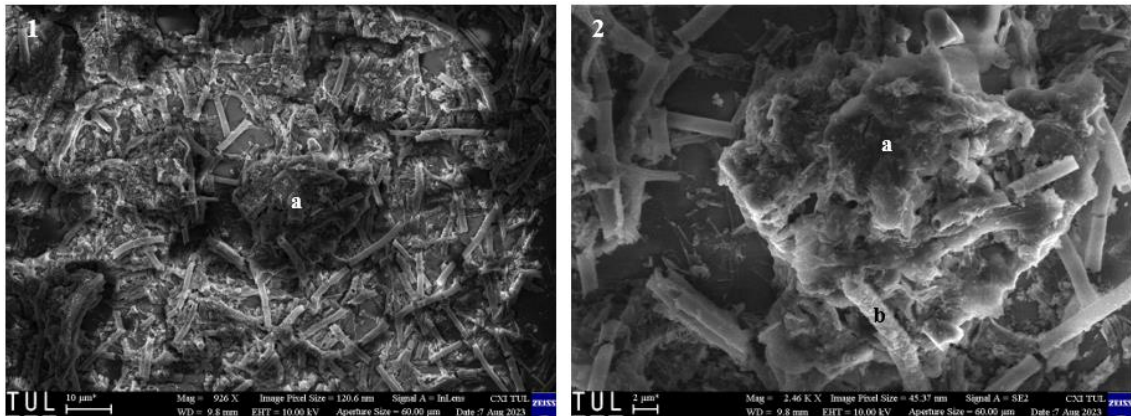


Obr. 18 Mikroskopická dokumentace separované části zkušební vzorku po vysušení, mikroskop NIKON Eclipse 600 s fotoaparátem NIKON D7100. Geometrie osvětlení: odražené polarizované světlo s polarizátory x BF, filtr pro denní světlo (7); nepolarizované světlo BF, filtr pro denní světlo (8); odražené světlo pro excitační oblast UV, sledováno v DF, filtr blok UV-2A EX 330 – 380 DM 400, BA 420 (9); odražené světlo pro excitační oblast B, sledováno v DF, filtr blok B-2A EX 450–490 DM 505, BA 520 (10); objektiv CFI LU Plan Fluor, 20x/0.45 A, W.D. 4.5 mm, původní zvětšení přibližně 200x. Vysrážené pevné směsi s Fe^{III} (c), fluoreskující okraj vzorku (d).

6.1.5 Elektronová mikroskopie (SEM)

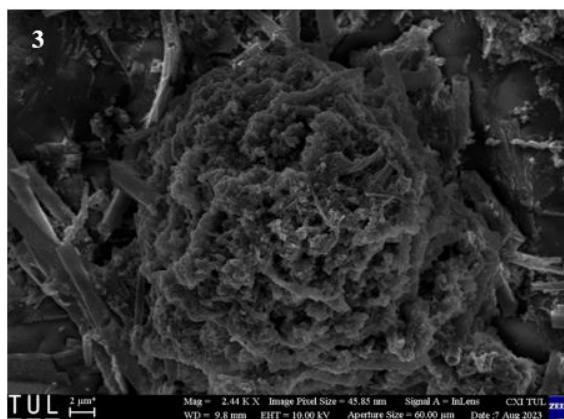
Následující Obr. 19, Obr. 20 jsou snímky vzorku č. 6 z elektronového mikroskopu (SEM). Na Obr. 19 je na snímku 1 vyobrazeno značné množství převážně prázdných mikrotubulárních pouzder *L. ochracea* inkrustovaných vysráženou směsí pevných látek s Fe^{III} . Dále je ve vzorku možné pozorovat shluky těchto pevných látek s Fe^{III} (a). Snímek 2 je detail vzorku s výrazným shlukem amorfně vykrystalizované směsi pevných látek

s Fe^{III} (a) a značně inkrustovaného prázdného mikrotubulárního vlákna (pouzdra) *L. ochracea* (b).



Obr. 19 Snímek 1: Vzorek obsahující množství mikrotubulárních vláken a vysrážených pevných látek s Fe^{III} (a); měřítko 10 μm . Snímek 2: Detail vysrážených pevných směsí s Fe^{III} . (a) a prázdných mikrotubulárních pouzder *L. ochracea* (b); měřítko 2 μm .

Obr. 20, resp. snímek (3) předkládá detailní pohled na vysrážené pevné látky s Fe^{III} s tím rozdílem, že oproti předešlé dokumentaci viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.** je s truktura, tj. krystalizace této směsi značně odlišná. Jedná se o útvar tvořený z množství nanokrystalů kulovitého tvaru.



Obr. 20 Snímek 3: Detail nanokrystalického útvaru tvořeného vysráženými pevnými směsí s Fe^{III} ; měřítko 2 μm .

6.1.6 Kvalitativní a kvantitativní stanovení zastoupení chemických prvků

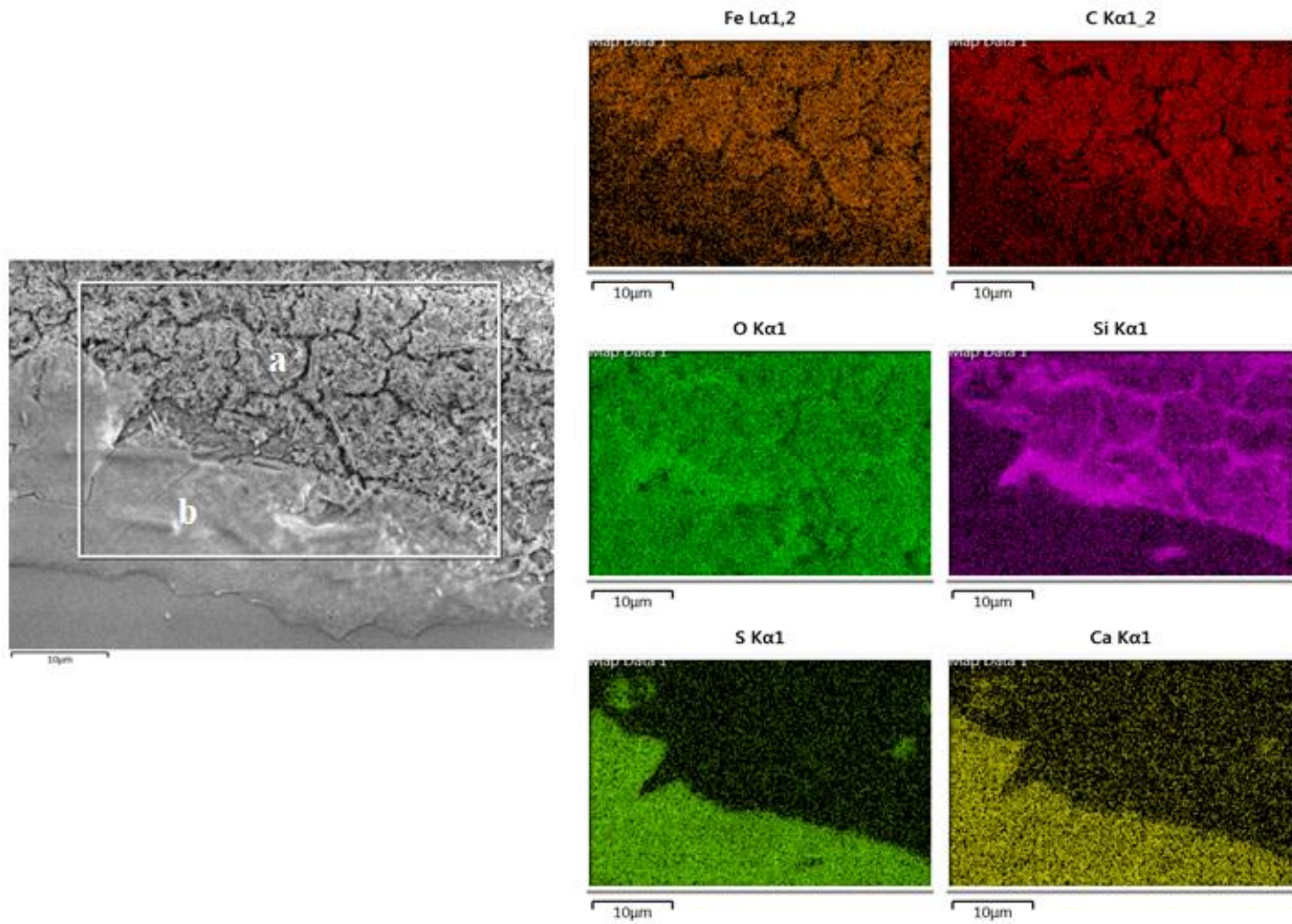
Při kvalitativním stanovení zastoupení chemických prvků ve vzorku č. 6 viz Obr. 21 bylo zjištěno, že dominantními a spolu korelujícími chemickými prvky v části vzorku (a) obsahujícím BIOX byly železo (Fe), uhlík (C), kyslík (O) a také křemík (Si). U okraje vzorku (b) se jednalo o síru (S), vápník (Ca). Kyslík (O) byl dominantní jak v části vzorku (a) tak (b). Dále byly ve vzorku přítomny též sodík, hořčík, hliník chlor a draslík viz Příloha C.

Kvantitativní stanovení zastoupení chemických prvků ve vzorku č. 6, tedy spektra 1, 2, 4, 5⁸ jsou vyobrazena na Obr. 22. Příslušné zastoupení chemických prvků, tj. Wt% resp. hm% a At% a je shrnuto v tabulkách v Příloha D. Na spektru 1, tedy okraji vzorku jsou nejvíce zastoupeny prvky kyslík (52,2 hm%); vápník (19,7 hm%) a síra (17,4 hm%). Na spektru 2 zaměřeném na BIOX jsou nejvíce zastoupeny prvky železo (35,1 hm%); kyslík (31,6 hm%); uhlík (19,0 hm%) a křemík (6,5 hm%). Spektrum 4 zaměřené na výrazný shluk vysrážených minerálů železa obsahuje nejvíce kyslíku (39,4 hm%), železa (25,3 hm%), uhlíku (18,4 hm%), křemíku (8,3 hm%) a hliníku (7,8 hm%). Spektru 5 zaměřenému na specifický nanokrystalický útvar vysrážených minerálů železa dominovalo železo (46,1 hm%) a dále též kyslík (32,3 hm%); uhlík (18,3 hm%) a křemík (1,7 hm%).

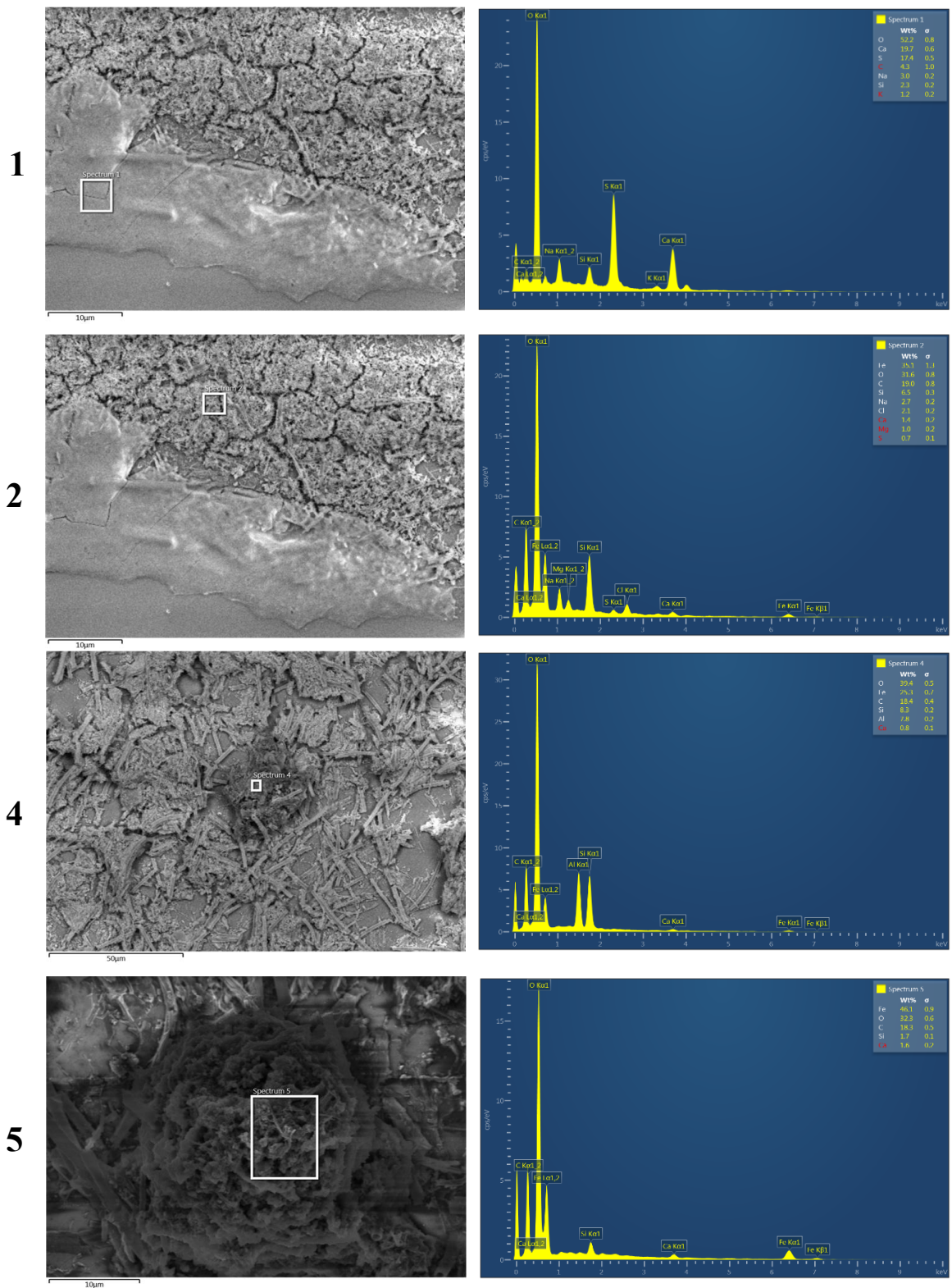
V teoretické části byly popsány vybrané železité minerály, resp. BMFe. Avšak výše popsanými metodami (kvalitativním a kvantitativním stanovení zastoupení chemických prvků ve vzorku č. 6) nebylo identifikováno o jaký železitý minerál, resp. BMFe se jedná. Tato problematika je dále diskutována v kapitole 7.

V souvislosti s popsanou kvalitativní a kvantitativní analýzou je zapotřebí zmínit, že ve vzorku nebyl detekován mangan. Jde o zásadní zjištění v souvislosti s *Leptothrix ochracea*. Současně s morfologickou determinací *L. ochracea* na základě literatury jde o další prokázání, že se jedná právě o tuto FeOB. Toto tvrzení se opírá o poznatek z teoretické části této práce, tedy, že na pouzdrech ostatních druhů rodu *Leptothrix* byla identifikován sloučenina MnO₂, kdežto u *L. ochracea* nikoli. Nepřítomnost MnO₂ v pouzdru tak určuje, že se jedná právě o druh *L. ochracea* [54].

⁸ číslování vynechávající číslo 3 je pouze z důvodu přehlednosti, tedy korelace s číslováním spekter zhotoveným při analýze



Obr. 21 Kvalitativní stanovení zastoupení chemických prvků ve vzorku č. 6; kde (a) – BIOX a (b) okraj vzorku.



Obr. 22 Kvantitativní stanovení zastoupení chemických prvků ve vzorku č. 6 – spektra 1, 2, 4 a 5.

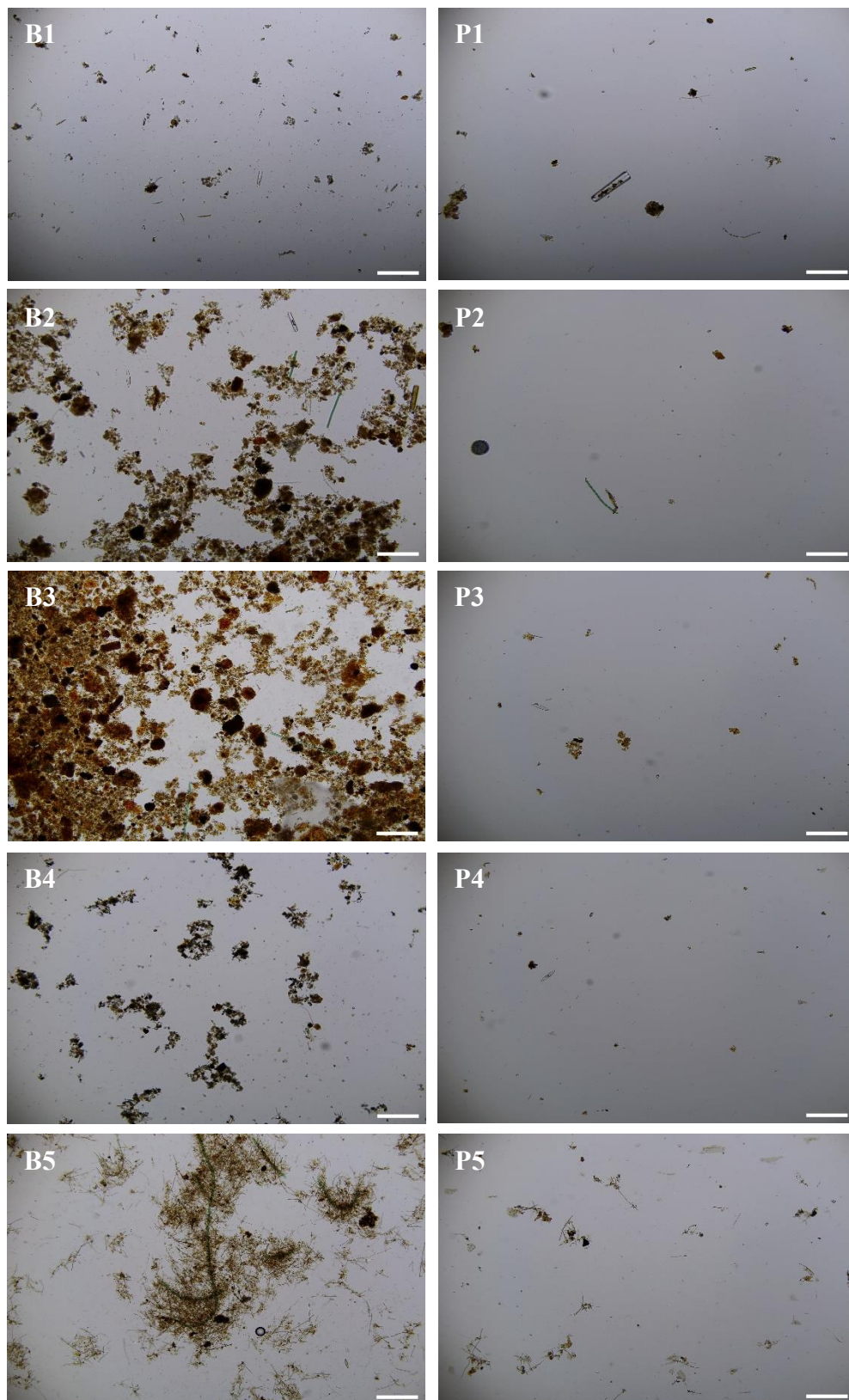
6.2 Mikrobiologická analýza

6.2.1 Determinace vzorků

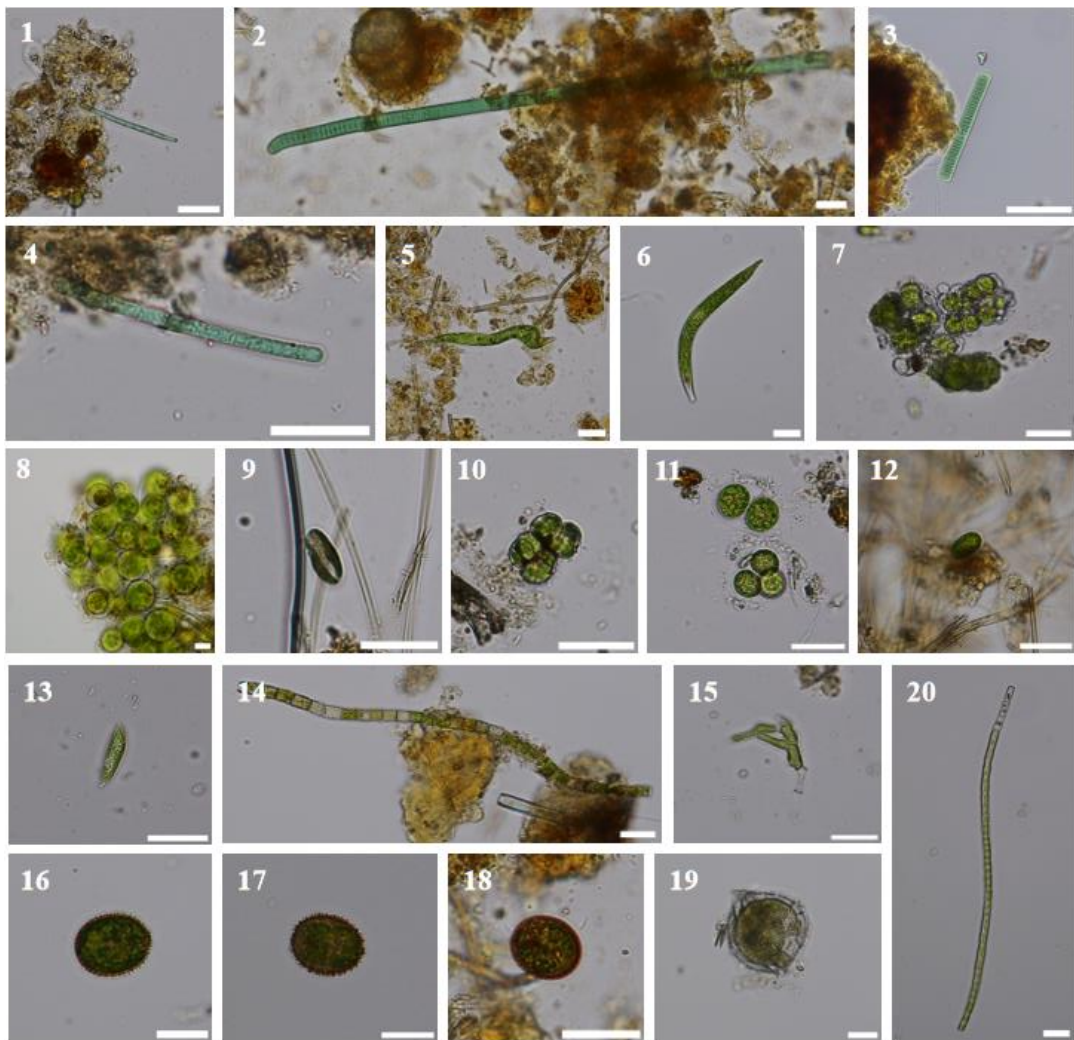
Ze vzorků P1–P5 a B1–B5 byla vytvořena obrazová tabule, viz Obr. 23. Slouží jako dokumentace přibližující mikroskopický pohled daných prostředí vzorků. Ve vzorku B3 bylo možné pozorovat výrazné zastoupení vysrážených směsí s Fe^{III}. Ve vzorku B5 dominovaly shluky mikrotubulárních vláken *Leptothrix ochracea*.

Při determinaci přítomných mikroorganismů (obrazové tabule na Obr. 24, Obr. 25 a Obr. 26) bylo nalezeno celkem 35 taxonů. Byli nalezeni zástupci sinic (snímky 1–4), dominovaly zejména taxony z rodů: *Oscillatoria* a *Phormidium*. Dále 30 zástupců řas z čehož u snímků 5 a 6 se jedná o zástupce krásnooček a morfotypy na snímcích 21–34 patří mezi rozsivky. Mezi nejhojněji zastoupené taxonomy rozsivek patřili zástupci z rodů: *Cymbellaceae*, *Eunotia*, *Navicula*, *Nitzschia*, *Pinnularia* a *Stauroneis*.

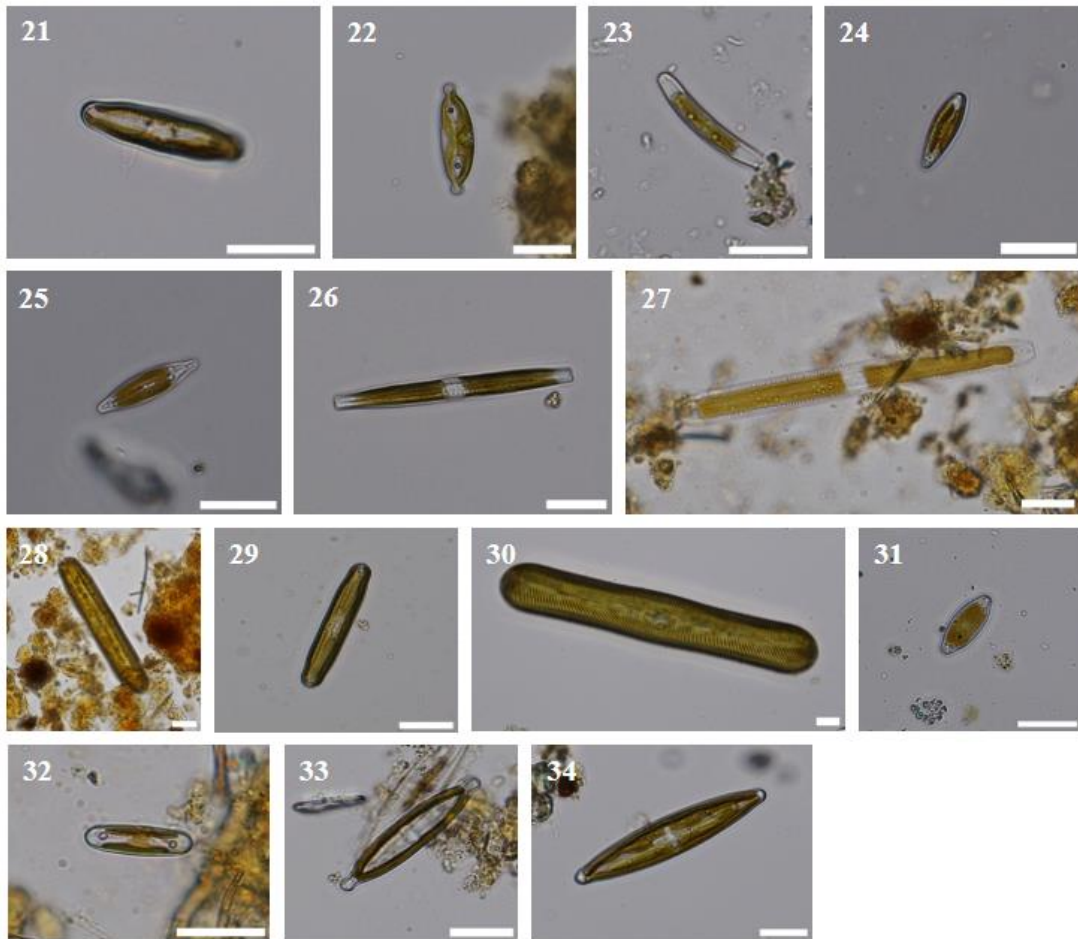
Dále byl determinován zástupce NAF₂O₃, tedy *Leptothrix ochracea* viz Obr. 26 (snímky 35 a 36). Z těchto snímků je patrné, že se jedná o shluk velkého množství tenkých spíše rovných mikrotubulárních vláken, která byla v mnoha případech zlomená. Je patrné, že na snímku 36 dochází k jisté interakci *L. ochracea* a *Oscillatoria* sp.1. Diverzita, abundance taxonů a struktura mikroorganismálního společenstva je dále diskutována v následující podkapitole 6.2.2.



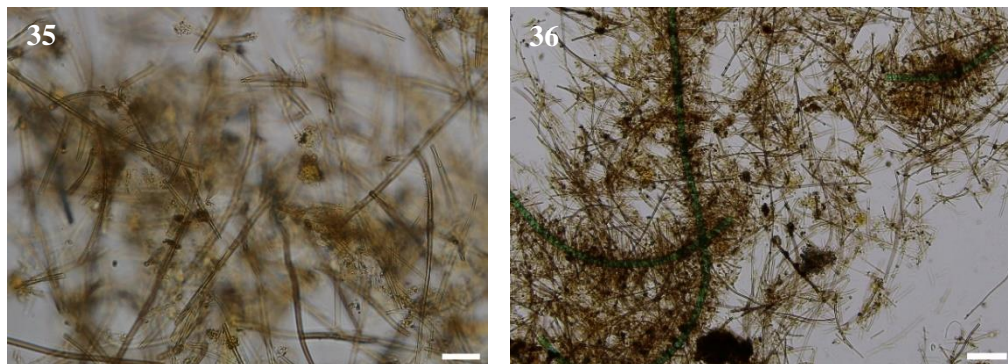
Obr. 23 Obrazová tabule porovnávající homogenizované vzorky bentosu (B) a planktonu (P) napříč stanovišti 1–5. Měřítko 200 µm.



Obr. 24 Nalezené morfotypy sinic a řas: 1 – *Geitlerinema splendidum*; 2 – *Oscillatoria* sp. 1; 3 – *Oscillatoria* sp. 2 tenká; 4 – *Phormidium* sp.; 5 – *Euglena deses adhaerens*; 6 – *Euglena mutabilis*; 7 – cf. *Apatococcus*; 8 – cf. *Bracteacoccus*; 9 – *Cryptomonas* cf. *Phaseolus*; 10 – cf. *Diplosphaera*; 11 – *Chlorophyceae* sp.; 12 – *Chlamydomonas* sp.; 13 – *Characiopsis* sp.; 14 – *Microspora* sp.; 15 – *Microthamnion kuetzingianum*; 16 – *Trachelomonas hispida*; 17 – *Tracheomonas* cf. *bacillifera*; 18 – *Tracheomonas* cf. *intermedia*; 19 – *Peridinium* sp.; 20 – *Xanthonema debile*. Měřítko 20 µm.



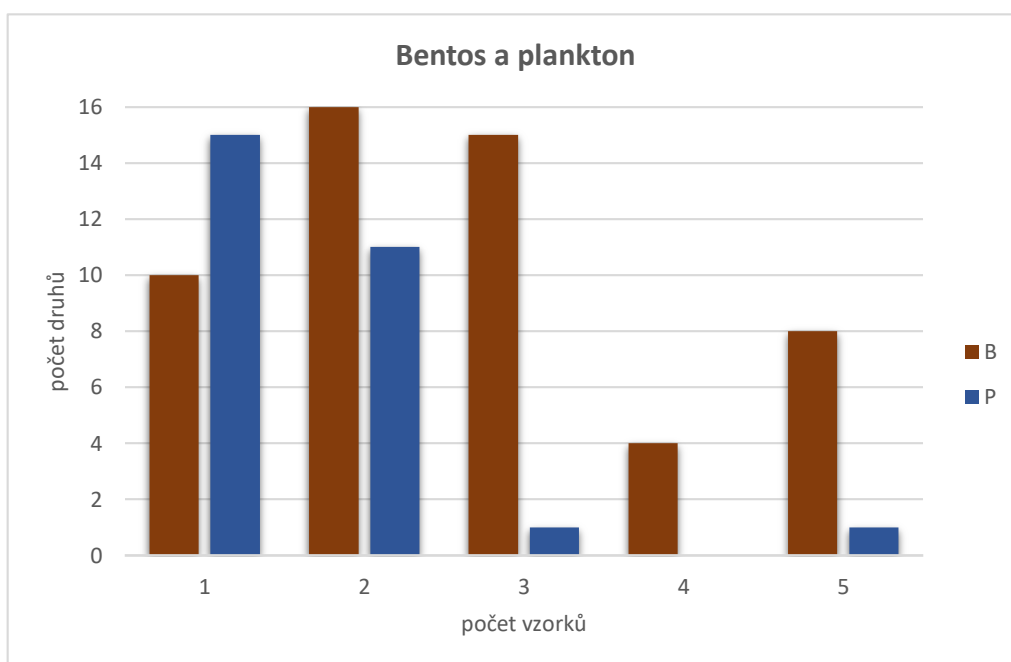
Obr. 25 Nalezené morfotypy rozsviek: 21 – *Caloneis tenuis*; 22 – *Cymbopleura naviculiformis*; 23 – *Eunotia* cf. *minor*; 24 – *Gomphonema* cf. *minor*; 25 – *Navicula* sp.; 26 – *Nitzschia* sp. 1; 27 – *Nitzschia* sp. 2; 28 – *Pinnularia* cf. *viridis*; 29 – *Pinnularia ferrophila*; 30 – *Pinnularia nobilis*; 31 – cf. *Placoneis*; 32 – *Sellaphora* sp.; 33 – *Stauroneis anceps*; 34 – *Stauroneis gracilis*. Měřítko 20 μ m.



Obr. 26 Nalezený morfotyp železo oxidující bakterie: 35 – *Leptothrix ochracea*, měřítko 20 μ m; 36 – *Leptothrix ochracea* a *Oscillatoria* sp. 1, měřítko 50 μ m.

6.2.2 Statistické vyhodnocení

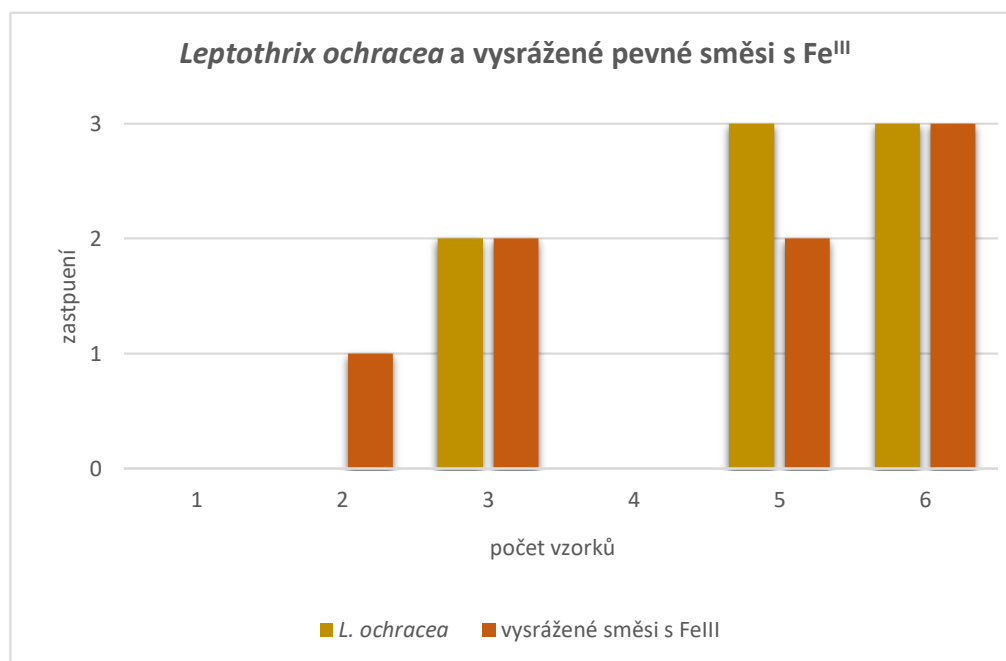
Graf na Obr. 27 vycházející z tabulky (viz Příloha E) zachycuje a porovnává počet jednotlivých taxonů mikroorganismů přítomných ve vzorcích bentosu (B) a planktonu (P) 1–5. Ve vzorku č. 1 je možné pozorovat největší (15) zastoupení taxonů mikroorganismů přítomných v planktonu. Ve vzorku č. 2 bylo zjištěno největší (16) zastoupení druhů mikroorganismů v bentosu. Zároveň jsou u vzorků č. 1 a 2 v porovnání s ostatními vzorky hojně zastoupeny mikroorganismy jak v bentosu, tak v planktonu. Oproti těmto vzorkům bylo u vzorku č. 3 determinováno 15 taxonů mikroorganismů přítomných v bentosu a pouze 1 druh (*Tracheomonas cf. bacillifera*) v planktonu. Plankton ve vzorku č. 4 byl zcela bez oživení mikroorganismy, a v bentosu zde determinovány pouze 4 druhy mikroorganismů, tj. o 75 % méně než u vzorku č. 2. U vzorku č. 5 bylo přítomno 8 druhů v bentosu, tj. o 50 % méně než u vzorku č. 2. Shodně jako u vzorku č. 3 zde byl přítomen pouze 1 druh (*Oscillatoria* sp. 1) v planktonu.



Obr. 27 Graf zachycující počet druhů mikroorganismů ve vzorcích bentosu (B) a planktonu (P) v odebraných vzorcích 1–5.

Graf na Obr. 28 zachycuje přítomnost, resp. míru zastoupení (0–3) železo oxidující bakterie *Leptothrix ochracea* a vysrážených pevných směsí s Fe^{III} . Do grafu byl zařazen též vzorek č. 6, který byl odebrán primárně pro hydrogeochemickou analýzu, a to z důvodů vyšší výpovědnosti grafu. Z grafu je patrné, že úplná absence *L. ochracea* byla ve vzorcích č. 1, 2 a 4. Přítomnost *L. ochracea* byla poprvé zaznamenána ve vzorku č. 3 a následně bylo detekováno její hojné zastoupení ve vzorcích č. 5 a 6. Vzorek č. 4

byl zcela bez vysrážených směsí s Fe^{III} a vzorek č. 1 obsahoval pouze mikroskopické stopy těchto směsí, které nejsou v grafu uvedeny. Ve vzorcích č. 3, 5 a 6 bylo zjištěno výrazné množství vysrážených pevných směsí s Fe^{III}.



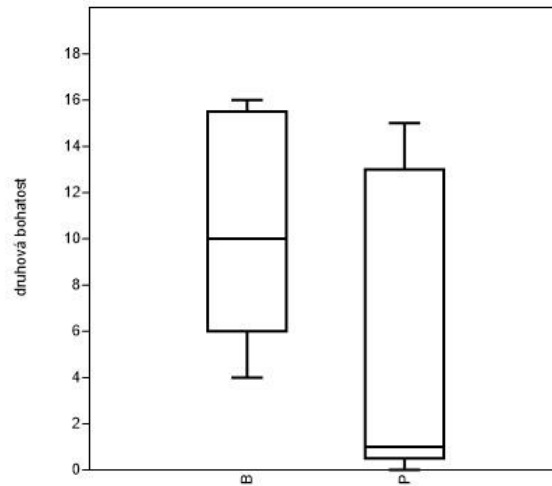
Obr. 28 Graf zachycující míru zastoupení *Leptothrix ochracea* a vysrážených pevných směsí s Fe^{III}.

Při porovnání grafů na Obr. 27 a Obr. 28 bylo zjištěno, že vzorek č. 4 byl v obou případech bez mikroorganismálního oživení a neobsahoval vysrážené pevné směsi s Fe^{III}. Dále z těchto grafů vyplývá jistý trend, tedy, že s přibývajícím zastoupením *L. ochracea* dochází ke snížení zastoupení mikroorganismů v planktonu. Konkrétně např. ve vzorcích č. 1 a 2, kde jsou v rámci planktonu (potažmo i bentosu) hojně zastoupeny druhy sinic a řas není současně přítomna *L. ochracea*. Naopak ve vzorku č. 3, kde byla *L. ochracea* poprvé determinována došlo k rapidnímu poklesu (o 93,3 %)⁹ počtu druhů mikroorganismů přítomných v planktonu. Tento jev byl totožný i ve vzorku č. 5. Vzorek č. 6 nebylo možné porovnat, avšak lze očekávat obdobný trend.

Dalším vzhledem do struktury mikroorganismálního společenstva je níže uvedený krabicový diagram (BoxPlot) na Obr. 29, který navazuje na Obr. 27. Z tohoto diagramu jsou zřejmé výrazné rozdíly v druhové bohatosti společenství mikroorganismů při srovnání bentosu (B) a v planktonu (P). Je patrné, že vzorky B1–B5 (v grafu jen B) vykazují větší rovnoměrnost a větší zastoupení mikroorganismů – v každém vzorku byly

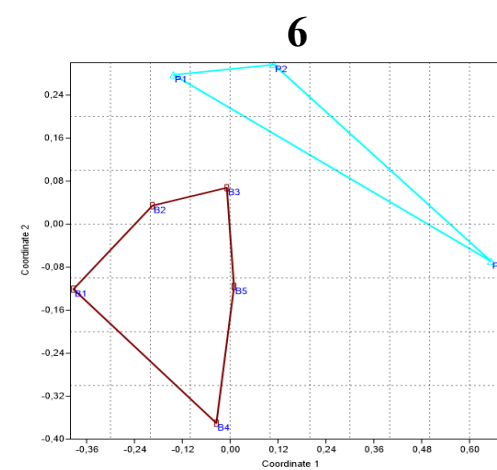
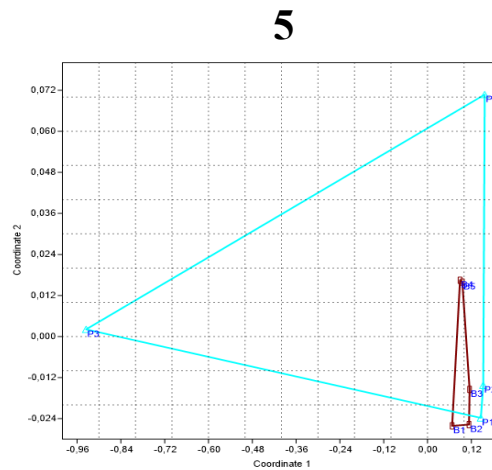
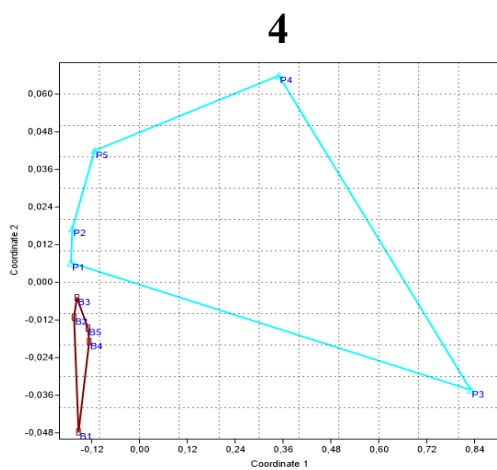
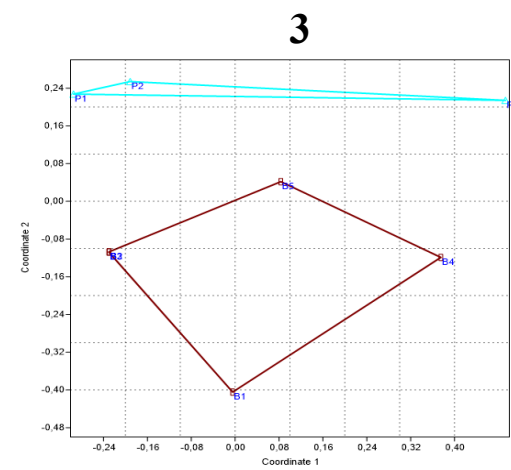
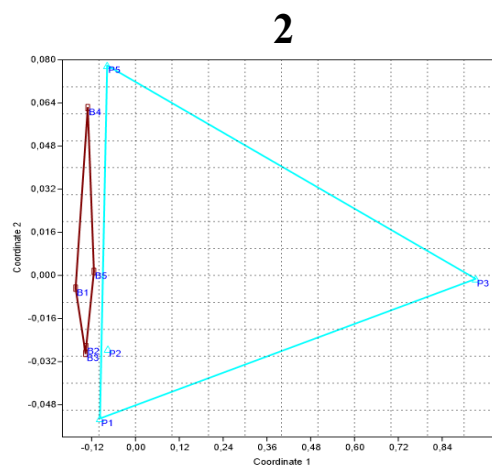
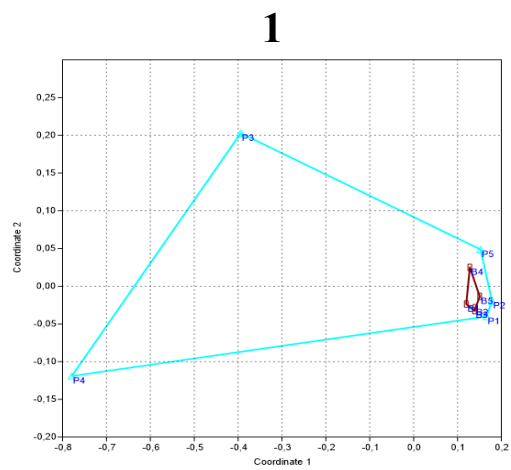
⁹ v porovnání s vzorkem č. 1

nalezeny alespoň 4 taxony. Naopak vzorky P1–P5 (v grafu jen P) vykazují znatelně větší rozptyl dat. Medián je zde $10 \times$ menší než u vzorků bentosu, a to z důvodu převahy vzorků s menším (žádným) zastoupením mikroorganismů. U druhové bohatosti mikroorganismů v planktonu docházelo oproti bentosu k znatelnějším skokovým změnám, což dokládá porovnání vzorků P1 a P2 s vzorky P3, P4 a P5 na Obr. 27.



Obr. 29 Druhová bohatost mikroorganismů přítomných v bentosu (B) a planktonu (P): (LM-vzorky); zobrazená pomocí krabicového diagramu.

Struktura společenstva byla dále analyzována pomocí NMDS metody zobrazené na příslušných grafech na Obr. 30. Do grafů 1 a 4 byly zařazeny všechny zkoumané vzorky, u grafů 2 a 5 byl vyjmut vzorek P4 a u grafů 3 a 6 i vzorek P3. Na NMDS grafech 1–3, kde byl použit Bray-Curtis index je patrné, že vzorky bentosu (B1–B5) jeví zásadně větší podobnost než vzorky planktonu (P1–P5). U vzorků planktonu vykazují největší podobnost pouze vzorky P1 a P2. Zbylé vzorky planktonu (P3–P5) se výrazně odlišují, jelikož vzorky obsahují pouze 1 taxon (rozdílný) a vzorek P4 je bez oživení mikroorganismů. NMDS grafy 4–6 vytvořené dle indexu Jaccard, vykazují obdobný trend. U vzorku B4 na grafech 2, 5 a 6 je patrná jistá odlišnost v porovnání s ostatními vzorky bentosu



Obr. 30 NMS grafy, kde 1–3 dle Bray-Curtis a 4–6 dle Jaccard.

7 Diskuze

Diskuze si klade za cíl shrnutí výsledků hydrogeochemické a mikrobiologické analýzy, a to s důrazem na uvědomění si neodmyslitelné provázanosti abiotických a biotických faktorů prostředí a nahlížení tak této problematiky v širším kontextu. Diskuze je rozdělena do vzájemně se prolínajících částí pojednávající o problematice nově krystalované pevné fáze s Fe^{III} a její spjitosti s přítomnými mikroorganismy a zodpovídá otázky nastíněné v kapitole 4.

Velice podstatným a překvapujícím zjištěním při terénním měření pH, Eh, O_2 a ORP byla skutečnost, že na tak malém vytyčeném úseku pramene dochází k tak rapidním změnám těchto abiotických a s tím souvisejících biotických faktorů. Tedy rozdílné hodnoty pH, Eh, O_2 a ORP, přítomnost či absence BIOX a zásadně se proměňující druhová abundance mikroorganismů napříč odběrovými místy dokazuje skutečnost, že se jedná o sled mnoha faktorů a výsledky nelze interpretovat pouze jako na sobě nezávislé dílčí faktory. Na základě použitých určitých metod analýzy jsou zodpovězeny pouze některé otázky týkající se této problematiky. Limity a potenciál práce jsou diskutovány níže.

Již z pouhého makroskopického pohledu na stanoviště č. 1–6 je zřejmé, že se výrazně odlišují, viz Obr. 10. Při terénním měření byly zaznamenány poměrně konzistentní hodnoty pH napříč stanovišti. pH prostředí ve zkoumaných částech pramene bylo přibližně okolo $\text{pH} = 6$, tedy prostředí je možné definovat jako cirkumneutrální viz Obr. 12. Dále také hodnoty TC (TIC a TOC) byly na měřených stanovištích č. 1, 2, 4 a 5 obdobné, s tím že nejvyšší hodnoty (25,13 mg/l) byly naměřeny na stanovišti č. 1, viz Obr. 15. Hodnoty TN a TP byly na všech stanovištích oproti TC řádově nižší. Dle Redfield ratio je poměr C:N v mořském fytoplanktonu stanoven přibližně na 6,6 avšak poměr C:N u sladkovodního fytoplanktonu má velký rozsah: 7,8–10,5 [93] a to kvůli vyššímu obsahu C a N a větší variabilitě právě ve srovnání s oceány [94]. Naměřené hodnoty TC a TN odpovídaly poměru pohybujícím se v rozmezí hodnot 16,9–24,4; tedy výrazně vyšší poměr, než dokládá literatura. Tato skutečnost nejspíše odpovídá řádově vyššímu množství TC ve vzorcích (primárně z rozkládající si organické biomasy) oproti TN a dále také tomu, že dusík utvářející takovýto poměr s uhlíkem je zjevně v tomto prostředí jakožto terminální akceptor vyčerpán a jedná o limitující prvek. U zbylých

abiotických a potažmo biotických faktorů lze pozorovat výraznější korelace, které budou uvedeny do širšího kontextu.

Z pohledu množství O₂ a hodnot ORP lze ze zkoumaných stanovišť vyhodnotit typicky výrazná oxidační prostředí. Ta podporují růst FeOB, jak popisuje A. Drummond [21]. Jednalo se o stanoviště č. 3, 5 a 6, kde byly oproti stanovištím č. 1, 2 a 4 naměřeny výrazně vyšší hodnoty O₂ tak ORP. V případě nejvyšších hodnot ORP naměřených na st. č. 5 tj. 135,7 mV byl rozdíl hodnot v porovnání s nejnižšími hodnotami na st. č. 4 tj. – 135,5 mV opravdu výrazný. Nejvyšší hodnoty O₂ byly naměřeny opět na st. č. 6 (3,25 mg/l). Hodnoty O₂ na st. č. 3 a 5 byly 2,86 a 3,06 mg/l. Z pohledu konduktivity (Eh), je zapotřebí zdůraznit nejnižší hodnoty (199 μS/cm) na st. č. 6 a nejvyšší hodnoty (352 μS/cm na st. č. 2).

Nejprve je představena, porovnána a interpretována abundance a diverzita mikroorganismů přítomných v bentosu a planktonu.

- Z BoxPlot grafu (Obr. 29) porovnávacím druhovou bohatost mikroorganismů v bentosu a planktonu napříč vzorky 1–5 zcela jednoznačně vyplývá, že v bentosu se vyskytovalo obecně více taxonů než v planktonu. Toto tvrzení dokládá i 10 × vyšší medián u vzorků bentosu v porovnání s vzorky planktonu. Rapidní pokles taxonů v planktonu (P3 a P5) bude dále popsán v souvislosti s BIOX.
- NMDS grafy ukazují další trend, tedy že vzorky bentosu (s největším odchýlením u B4) vykazují oproti vzorkům planktonu znatelně větší podobnost. U vzorků planktonu je rozdílnost jednotlivých vzorků způsobena skokovými změnami napříč těmito vzorky (P1–P5). Princip těchto změn v abundanci mikroorganismů bude obdobně jako u interpretace BoxPlot představen v souvislosti s BIOX.

Při zkoumání *L. ochracea* a BIOX a potažmo dalších přítomných společenstev mikroorganismů v korelaci s výše uvedenými abiotickými faktory prostředí byly zjištěny následující skutečnosti:

- V prostředích, tedy stanovištích č. 1, 2 a 4 s nízkými hodnotami O₂ a ORP (porovnávanými se stanovišti zařazenými výše jakožto výrazně oxidační prostředí) nebyla přítomna *Leptothrix ochracea*.

- Zajímavé ale je, že ve vzorku P1 bylo možné pozorovat největší zastoupení druhů mikroorganismů (15) přítomných v planktonu a ve vzorku B2 bylo zjištěno největší zastoupení druhů mikroorganismů (16) v bentosu. Nutno dodat, že vzorek č. 4 (B4 a P4) byl téměř bez mikroorganismálního oživení, resp. byly zde nalezeny pouze 4 taxony mikroorganismů v bentosu: *Cryptomonas cf. phaseolus*; *Eunotia cf. minor*; *Phormidium* sp. a *Pinnularia cf. viridis*. Tuto skutečnost lze přisoudit méně vhodným podmínkám pro život v kontextu naměřených hodnot abiotických faktorů. Vymykající se vzorek č. 4 bude ještě několikrát diskutován.
- Zároveň je nutno dodat, že ve vzorcích č. 1 a 4 byla úplná absence BIOX a ve vzorku č. 2 (resp. st. č. 2) se jednalo takřka o „stopové množství“ a to převážně vysráženém na tlejícím materiálu.
- Stanoviště č. 4 bylo velice specifické, jelikož se v porovnání s ostatními stanovišti zcela jednoznačně odlišovala. Jednalo se o část pramene, na které se připojovalo ještě druhé kratší rameno. Paradoxní je, že i toto kratší rameno obsahovalo značné stopy BIOX, ale v místě, kde se tato dvě ramena spojila, již žádné BIOX pozorovatelné nebyly, jak již bylo zmíněno. Záporné hodnoty ORP dle literatury [21] indikují redukční prostředí. Rozpuštěné železo se za takovýchto podmínek nachází v oxidačním stavu Fe^{II}. Tento jev byl potvrzen již zmíněnou absencí BIOX a *L. ochracea* právě na tomto stanovišti.

Znatelně rozdílné výsledky měřených abiotických faktorů, tedy z toho plynoucí rozdílné prostředí byly na stanovištích č. 3, 5 a 6, která byla na základě hodnot O₂ a ORP označena jako výrazně oxidační prostředí. V souvislosti s tím je zapotřebí uvést do kontextu také druhy sinic a řas přítomných v těchto zkoumaných vzorcích a problematiku s tím spjatou:

- Tedy jak již bylo zmíněno, na stanovištích č. 3, 5 a 6 byly hodnoty O₂ a ORP oproti výše popsaných stanovištím znatelně vyšší.
- Tuto skutečnost, potvrdila právě přítomnost BIOX a *Leptothrix ochracea* v těchto třech vzorcích.
- První známky BIOX bylo možné zřetelně makroskopicky pozorovat na st. č. 3 (resp. i na st. č. 2 viz výše). Na st. č. 5 a 6 bylo možné pozorovat množství BIOX typické okrové barvy takřka přes celou šíři pramene.

- U zkoumaných vzorků č. 3 a 5 byl zaznamenána dominance *L. ochracea* spojená s rapidním poklesem druhové bohatosti v planktonu (o 93,3 %) ¹⁰.
- U vzorku č. 6, kde byla zaznamenána též dominance *L. ochracea*, avšak z důvodu omezenosti počtu odběrových míst nebyla na stanovišti č. 6 provedena mikrobiologická analýza determinující přítomné mikroorganismy (sinice a řasy).

Zde jsou interpretovány výsledky krabicového grafu a NMDS grafů v souvislosti s nastíněným rapidním poklesem druhové bohatosti v planktonu. Zcela minimální mikroorganismální oživení v planktonu (P3 a P5), tedy i s tím spjatá rozdílnost vzorků planktonu (oproti bentosu) je s největší pravděpodobností způsobena vztahem BIOX právě s fotosyntetizujícími mikroorganismy. Tedy s největší pravděpodobností se jedná o proces, kdy BIOX ve vodním sloupci výrazně omezuje (znemožňuje) přístup těchto mikroorganismů ke světlu. Pro mikroorganismy, pro něž je proces fotosyntézy klíčový pro přežití se tak nejedná o vhodné podmínky k životu. Tato myšlenka potvrzuje hojné zastoupení fotosyntetizujících mikroorganismů (plankton i bentos) na stanovištích bez přítomnosti, resp. se zanedbatelným množstvím BIOX jako jsou stanoviště č. 1 a 2. V tomto kontextu však vyvstává otázka interpretace vzorku č. 4, kde výše uvedené odůvodnění neplatí, jelikož zde nejsou přítomné BIOX ani FMO v planktonu. Tuto skutečnost se nepodařilo zcela jasně vysvětlit, ale zajisté lze počítat s tím, že se jedná o sled mnoha faktorů. Roli zde s největší pravděpodobností hrají naměřené abiotické faktory, a to především záporné hodnoty ORP, tedy výrazné redukční prostředí [21], jak již bylo zmíněno výše. Dále také pravděpodobný průsak spodních vod potenciálně obsahující určité toxické látky, jež výrazně negativně ovlivňují podmínky pro život nejrůznějších mikroorganismů. Tato odůvodnění však vyžadují obsáhlejší analýzu, která je velice žádoucí, jelikož by opět mohla pomoci objasnit a lépe pochopit tuto problematiku.

V následujících bodech jsou naopak představeny dominantní druhy sinic a řas přítomné právě ve vzorcích s BIOX a *L. ochracea*:

- Ve vzorcích P2, B3 a P3 byly přítomny řasy *Tracheomonas*, které jsou typické svými lorikami tvořenými zejména železem [75], což odpovídá jejich přítomnosti právě v těchto vzorcích obsahující směsi s Fe^{III}.

¹⁰ při porovnání s vzorkem č. 1

- Mezi řasy přítomné ve vzorcích B3 a B5 byly druhy rozsivek z rodů: *Navicula*, *Nitzchia*, *Pinnularia*, *Stauroneis*. Tato skutečnost bude dále diskutována v souvislosti s přítomným křemíkem v BIOX.
- U vzorku B5 bylo rozsivek v porovnání s vzorkem B3 méně, avšak dominovala zde sinice determinovaná jako *Oscillatoria* sp. 1. Ta byla přítomna rovněž ve vzorcích B2, B3 a P2, avšak v menším množství.
- Ve vzorcích P2, B2, B3 a B5 byla též přítomna *Pinnularia ferrophila* (absence v B1 a B4), což koreluje s publikací z časopisu Arnika [77], kde je popsán její výskyt výhradně v pramenech (mokřadech) bohatých na železo.

Po diskuzi abiotických faktorů v kontextu přítomných mikroorganismů včetně BIOX, je zapotřebí podrobněji diskutovat právě ony hojně zastoupené BIOX a jejich vztah s *L. ochracea*. V terénu provedenými kvalitativními zkouškami na přítomnost Fe^{2+} a Fe^{3+} resp. Fe^{II} a Fe^{III} ve vzorcích byly u BIOX na st. č. 2, 3, 5 a 6 detekovány vysrážené Fe^{3+} ionty/ Fe^{III} viz Obr. 14. Otázkou je, jestli vysrážené železité ionty jakožto BMFe resp. BIOX vznikly geochemickou oxidací nebo oxidací zprostředkovanou *L. ochracea*. Jako nejpravděpodobnější se jeví skutečnost, že dochází k jisté konkurenci mezi *L. ochracea* a abiotickou oxidací. Jak bylo popsáno v teoretické části, tak v oxickém prostředí dochází k oxidaci železa řádově rychleji než v prostředích anaerobních [26]. Dále bylo popsáno, že abiotická oxidace železnatých iontů dominuje nad oxidací železa zprostředkovanou FeOB v situaci, kdy je koncentrace kyslíku (O_2) nad 1,5 mg/l [32]. Tedy s největší pravděpodobností dochází zejména na stanovištích č. 3, 5 a 6 k abiotické oxidaci železa s možnou doprovázenou oxidací železa zprostředkovanou *L. ochracea*, a to v suboxické oblasti, tedy za mikroaerobních podmínek. Ověření tohoto tvrzení však vyžaduje obsáhlejší analýzu.

Zásadními poznatky byly výsledky kvalitativního a kvantitativního stanovení zastoupení chemických prvků ve vzorku č. 6 odebraného ze zkoumaného pramene, a to právě ve vztahu k *L. ochracea*. Při těchto analýzách byly v části vzorku obsahujícím BIOX tj. Obr. 21 část vzorku (a) a Obr. 22 snímky 2, 4 a 5 dominantními prvky Fe, O, C a Si. Zastoupení železa, kyslíku a uhlíku tak odpovídá vysráženým, resp. inkrustovaným BMFe na mikrotubulárních vláknech. Ač byla v teoretické části popsáním vybraných železitých minerálů potažmo BMFe připravena půda pro jejich následnou analýzu a identifikaci, na základě použitých metod nebyl v této práci přesný typ BMFe

identifikován. Ve vzorku č. 6 byly detekovány pouze blíže nespecifikované nanokrystalické vysrážené pevné směsi s Fe^{III} inkrustované okolo a na mikrotubulárních vláknech *L. ochracea*. Jestli se tedy jedná např. o goethit/nanogoethit-ferrihydritové směsi [45, 46] či Fh–2h [21], nebylo zjištěno. Potenciální Fh–2h by bylo možné identifikovat např. pomocí metody XRD. Jelikož je ale Fh–2h pouze slabě krystalický, je zjištění jeho krystalografické struktury i na základě metody XRD poměrně problematické a v literatuře jsou o tom běžně vedeny diskuze [21]. Metoda XRD nebyla součástí BP.

Dalším podstatným zjištěním při těchto analýzách byla absence manganu ve vzorku. Tato skutečnost potvrzuje přítomnost již morfologicky determinované *L. ochracea*, jelikož ta jako jediná z rodu *Leptothrix* neoxiduje obdobně jako železo i mangan, jak popisuje M. Dworkin [54]. Velice zajímavá je problematika přítomnosti křemíku v BIOX, která lze odůvodnit několika způsoby, které jsou definované následovně:

- Přítomný křemík v BIOX koreluje s publikací [56], která analyzovala, že jsou křemičitany (a fosforečnany) přítomny ve struktuře BIOX, tedy na mikrotubulárních vláknech *L. ochracea*.
- Křemík (a hliník) je potenciální ukazatel přítomnosti jílových minerálů jako např. kaolinit ve vzorku.
- Značný podíl křemíku by také odpovídal výskytu nejrůznějších determinovaných druhů rozsivek např. ve vzorku č. 5 (lze je tak očekávat i ve vzorku č. 6, jelikož zde byly naměřeny podobné abiotické faktory a prostředí bylo takřka shodné). Buněčné stěny rozsivek jsou totiž křemíkem ve formě SiO_2 značně silicifikované, jak zmiňuje Mark Hildebrand [79].

Na okraji vzorku č. 6 viz Obr. 21 (b) a Obr. 22 snímek 1, dominovaly prvky: síra, vápník a kyslík. Tato skutečnost je nejpravděpodobněji zapříčiněna vysušením, resp. potenciálním vysrážením sádrovce ze zkoumaného vzorku, a to právě na jeho okraji. Toto tvrzení by bylo možné ověřit například pomocí rentgenového difrakčního záznamu, tedy jedná se o další limit BP.

Po představení diskutovaných výsledků je zapotřebí představit limity, potenciál dalšího výzkumu a samotný přínos této práce. Potenciál, formulace dalších složitějších hypotéz a možnosti aplikace dalších metod pro navazující výzkum jsou shrnuty v následujících bodech:

- Detailnější analýza vysrážené směsi s Fe^{III} inkrustované na mikrotubulárních vlákních *L. ochracea* např. pomocí metod: XRF, XRD, TEM, SAED, MS, BET.
- Ovlivňování vlastností ferrihydritu na základě změny abiotických faktorů.
- Realizace kvalitativní fázové analýzy vzorku s BIOX stanovené pomocí rentgenového difrakčního záznamu za účelem stanovení přítomných fází (např. ferrihydrit, kaolinit aj.)
- Podrobnější determinace a analýza společenstev mikroorganismů přítomných ve zkoumané oblasti, např. pomocí TEM, SEM, regresní metody, testování pomocí permutační MANOVY (multivariate analysis of variance).
- Kultivace *L. ochracea* včetně zkoumání reakcí na cílené změny abiotických faktorů prostředí.
- Výzkum zaměřený na to, zda má *L. ochracea* obdobně jako různé FeOB schopnost minimalizovat koncentrace těžkých kovů (olovo, nikl, měď, chrom, kadmium a kobalt) ve vodném prostředí.
- Obsáhlejší analýza *L. ochracea*: objasnění biochemického principu oxidace Fe²⁺, analýza exopolymerních sekretů pomocí NMR, zkoumání nativního rozložení buněk *L. ochracea* v BIOX např. pomocí konfokální mikroskopie, za účelem pozorování biomineralizace jakožto potenciálního mechanismu pohybu.

Hlavní přínos BP spočívá zejména v realizaci mezioborové analýzy. Již v úvodu bylo zdůrazněno, že tato práce není pouze vytržení určité specifické problematiky z kontextu celku. Propojení výsledků hydrogeochemické analýzy s analýzou mikrobiologickou a jejich následná diskuze předkládá ucelenější obraz, než kdyby bylo na téma pohlíženo čistě jako na oblast mikrobiologického nebo hydrogeochemického zájmu. Určité skutečnosti nebylo možné interpretovat bez znalosti jevů s tím bezprostředně souvisejících, resp. znalosti co největšího množství faktorů, které danou problematiku ovlivňují a definují. Vzhledem ke komplexnosti studované problematiky byla provedena obsáhlejší rešeršní část se snahou přiblížit a poukázat na onu komplexnost a obsáhlost tohoto téma. Teoretická část slouží jako základní kámen pro již nastíněný navazující výzkum. V experimentální části byly předloženy metody a výsledky, které však popisují jen určité skutečnosti týkající se této problematiky. Použité metody slouží obdobně jako teoretická část jako základní předpoklady pro následné obsáhlejší zkoumání této problematiky.

8 Závěr

Ve zkoumaném prameni bohatém na železo bylo v terénu kvalitativně detekováno vysrážené železo v oxidačním stavu Fe^{III} v odebraných vzorcích BIOX. Celkově zde byly determinovány 4 taxony sinic, 30 taxonů řas a železo oxidující bakterie *Leptothrix ochracea*. Dominující taxony rozsivek patřily zejména do rodů: *Navicula*, *Nitzschia*, *Pinnularia*, *Stauroneis*. Dominantní rody sinic byly *Oscillatoria* a *Phormidium*.

Vytyčená stanoviště vykazovala jistý trend, tedy že s přítomností *L. ochracea* a BIOX rapidně klesala druhová bohatost, resp. přítomnost mikroorganismů v planktonu a v menší míře i v bentosu. Dále bylo zjištěno, že vzorky bentosu vykazují oproti vzorkům planktonu výrazně větší podobnost. Ze snímku SEM a následné kvalitativní a kvantitativní analýzy bylo zjištěno, že mikrotubulární vlákna *L. ochracea* jsou výrazně extracelulárně inkrustována pevnou směsí s Fe^{III} .

Mezi dominující prvky v BIOX patřilo železo, kyslík, uhlík a křemík. Na základě naměřených hodnot pH, O_2 a ORP na stanovištích č. 3, 5 a 6 obsahujících BIOX a *L. ochracea* byla vyslovena hypotéza, že procesu oxidace Fe^{2+} na Fe^{3+} dominuje zejména abiotická (geochemická) oxidace doprovázená oxidací železa zprostředkovanou *L. ochracea*, a to v suboxické oblasti, tedy za mikroaerobních podmínek. Ověření tohoto tvrzení však vyžaduje obsáhlejší analýzu.

Zajímavým zjištěním je problematika *L. ochracea* a její vztah s nově krystalovanou pevnou fází s Fe^{III} . Z teoretické části (v kapitole 2.2.2) vyplynulo, že u *L. ochracea* nebyl zjištěný přímý důkaz o jejím růstu na základě využití energie získané právě z oxidace železa. Rovněž zde bylo nastíněno, že *L. ochracea* potenciálně využívají biomineralizaci jako mechanismus pohybu. Povaha této práce neumožnila tyto otázky zodpovědět, avšak jedná se o několik již nastíněných limitů této práce a s tím spjatý i potenciál dalšího výzkumu tohoto téma.

Na závěr shrnuji a předkládám nejdůležitější zjištěné trendy abiotických faktorů prostředí a mikroorganismální diverzity na zkoumaném úseku toku. V oblasti pramene stanoviště č. 1, kde panovaly mírně oxidační podmínky, nebyly detekovány BIOX ani *L. ochracea*, ale naopak zde bylo determinováno nejvíce taxonů mikroorganismů v planktonu. Na stanovišti č. 2 byly detekovány první známky BIOX (bez přítomnosti *L. ochracea*) a největší zastoupení druhů mikroorganismů v bentosu. Stanoviště č. 3 bylo prvním výrazným oxidačním prostředím s již větším množstvím BIOX spolu s *L.*

ochracea a zároveň zde byl pozorován první rapidní pokles mikroorganismů v planktonu. Stanoviště č. 4 bylo výrazně redukčním prostředím bez BIOX a *L. ochracea*, resp. celkově takřka bez mikroorganismálního oživení. Naopak u stanovišť č. 5 a 6 se opět jednalo o výrazná oxidační prostředí se značným zastoupením BIOX, *L. ochracea* a zároveň (u stanoviště č. 5) minimálním mikroorganismálním oživením v planktonu potažmo v bentosu.

Úplný závěr práce bych rád zakončil slovy:

Má-li člověk dojít do cíle, je třeba nespoléhat se jen na sebe, neplýtvat silami, oprostít se od zbytečné zátěže a s odvahou čelit stále novým výzvám.

Anselm Grün

Seznam použité literatury

- [1] DODDS, Walter Kennedy a Matt R. WHILES. *Freshwater ecology: concepts and environmental applications of limnology*. Third edition. London San Diego Cambridge, MA Kidlington, Oxford: Elsevier, Academic Press, 2020. ISBN 978-0-12-813255-5.
- [2] POULÍČKOVÁ, Aloisie. *Základy ekologie sinic a řas*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. ISBN 978-80-244-2751-5.
- [3] DUDGEON, David, Angela H. ARTHINGTON, Mark O. GESSNER, Zen-Ichiro KAWABATA, Duncan J. KNOWLER, Christian LÉVÊQUE, Robert J. NAIMAN, Anne-Hélène PRIEUR-RICHARD, Doris SOTO, Melanie L. J. STIASSNY a Caroline A. SULLIVAN. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* [online]. 2006, **81**(2), 163–182. ISSN 1464-7931. Dostupné z: doi:10.1017/S1464793105006950
- [4] MAHAPATRA, S. S., Mrutyunjaya SAHU, R. K. PATEL a Biranchi Narayan PANDA. Prediction of Water Quality Using Principal Component Analysis. *Water Quality, Exposure and Health* [online]. 2012, **4**(2), 93–104. ISSN 1876-1666. Dostupné z: doi:10.1007/s12403-012-0068-9
- [5] BLACKSTOCK, James C. *Guide to Biochemistry*. Cambridge: Elsevier Science, 2014. ISBN 978-1-4831-8367-1.
- [6] SAALIDONG, Benjamin M., Simon Appah ARAM, Samuel OTU a Patrick Osei LARTEY. Examining the dynamics of the relationship between water pH and other water quality parameters in ground and surface water systems. *PLoS ONE* [online]. 2022, **17**(1), e0262117. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0262117
- [7] BETHKE, Craig M., Robert A. SANFORD, Matthew F. KIRK, Qusheng JIN a Theodore M. FLYNN. The thermodynamic ladder in geomicrobiology. *American Journal of Science* [online]. 2011, **311**(3), 183–210. Dostupné z: doi:10.2475/03.2011.01
- [8] STUMM, Werner a James J. MORGAN. *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters*. B.m.: John Wiley & Sons, 2012. ISBN 978-1-118-59148-2.
- [9] LUND, Peter A., Daniela DE BIASE, Oded LIRAN, Ott SCHELER, Nuno Pereira MIRA, Zeynep CETECIOGLU, Estefanía Noriega FERNÁNDEZ, Sara BOVERCID, Rebecca HALL, Michael SAUER a Conor O'BYRNE. Understanding How Microorganisms Respond to Acid pH Is Central to Their Control and Successful Exploitation. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2020, **11**, 556140. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.556140
- [10] JIN, Qusheng a Matthew F. KIRK. pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective. *Frontiers in Environmental*

- Science* [online]. 2018, **6** [vid. 2024-02-27]. ISSN 2296-665X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2018.00021>
- [11] LAUBER, Christian L., Micah HAMADY, Rob KNIGHT a Noah FIERER. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2009, **75**(15), 5111–5120. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00335-09
- [12] RATZKE, Christoph a Jeff GORE. Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. *PLoS Biology* [online]. 2018, **16**(3), e2004248. ISSN 1544-9173. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pbio.2004248
- [13] BAKER-AUSTIN, Craig a Mark DOPSON. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology* [online]. 2007, **15**(4), 165–171. ISSN 0966-842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2007.02.005
- [14] HORIKOSHI, Koki. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 1999, **63**(4), 735–750. Dostupné z: doi:10.1128/mmbr.63.4.735-750.1999
- [15] FERNÁNDEZ-CALVIÑO, David a Erland BÅÅTH. Growth response of the bacterial community to pH in soils differing in pH. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 2010, **73**(1), 149–156. ISSN 0168-6496. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00873.x
- [16] TRATNYEK, Paul a Donald MACALADY. Oxidation-Reduction Reactions in the Aquatic Environment. In: *Handbook of Property Estimation Methods for Chemicals: Environmental Health Sciences* [online]. 2000, s. 383–415. Dostupné z: doi:10.1201/9781420026283.ch16
- [17] BOYD, Claude E. Dissolved Solids. In: Claude E. BOYD, ed. *Water Quality: An Introduction* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2020 [vid. 2024-03-09], s. 83–118. ISBN 978-3-030-23335-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-23335-8_5
- [18] *Total Dissolved Solid - an overview | ScienceDirect Topics* [online]. [vid. 2024-04-16]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/total-dissolved-solid>
- [19] *Total Carbon (TC), Total Inorganic Carb. (TIC), Dissolved Organic Carb. (DOC)* [online]. [vid. 2024-04-16]. Dostupné z: <https://maineenvironmentallaboratory.com/?p=1196>
- [20] Simultaneous determination of total dissolved nitrogen and total dissolved phosphorus in natural waters with an on-line UV and thermal digestion. *Talanta* [online]. 2018, **185**, 419–426. ISSN 0039-9140. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2018.03.085
- [21] DRUMMOND, Adam. *A study of iron-oxidising bacteria, their habitats and their associated biogenic iron ochre, sampled from the Greater Glasgow area* [online].

- B.m., 2023 [vid. 2023-08-13]. PhD. University of Glasgow. Dostupné z: <https://theses.gla.ac.uk/83400/>
- [22] BRYCE, Casey, Nia BLACKWELL, Caroline SCHMIDT, Julia OTTE, Yu-Ming HUANG, Sara KLEINDIENST, Elizabeth TOMASZEWSKI, Manuel SCHAD, Viola WARTER, Chao PENG, James M. BYRNE a Andreas KAPPLER. Microbial anaerobic Fe(II) oxidation – Ecology, mechanisms and environmental implications. *Environmental Microbiology* [online]. 2018, **20**(10), 3462–3483. ISSN 1462-2920. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.14328
- [23] JIANG, Zhaoxia, Qingsong LIU, Andrew ROBERTS, Mark DEKKERS, Vidal BARRÓN, José TORRENT a Li SANZHONG. The Magnetic and Color Reflectance Properties of Hematite: From Earth to Mars. *Reviews of Geophysics* [online]. 2022, **60**. Dostupné z: doi:10.1029/2020RG000698
- [24] CUDENNEC, Yannick a André LECERF. The transformation of ferrihydrite into goethite or hematite, revisited. *Journal of Solid State Chemistry* [online]. 2006, **179**(3), 716–722. ISSN 0022-4596. Dostupné z: doi:10.1016/j.jssc.2005.11.030
- [25] HEDRICH, Sabrina, Michael SCHLÖMANN a D. Barrie JOHNSON. The iron-oxidizing proteobacteria. *Microbiology (Reading, England)* [online]. 2011, **157**(Pt 6), 1551–1564. ISSN 1465-2080. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.045344-0
- [26] SINGH, Vipin Kumar, Asha Lata SINGH, Rishikesh SINGH a Ajay KUMAR. Iron oxidizing bacteria: insights on diversity, mechanism of iron oxidation and role in management of metal pollution. *Environmental Sustainability* [online]. 2018, **1**(3), 221–231. ISSN 2523-8922. Dostupné z: doi:10.1007/s42398-018-0024-0
- [27] EMERSON, David, Emily J. FLEMING a Joyce M. MCBETH. Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. *Annual Review of Microbiology* [online]. 2010, **64**, 561–583. ISSN 1545-3251. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.micro.112408.134208
- [28] KAPPLER, Andreas, Casey BRYCE, Muammar MANSOR, Ulf LUEDER, James M. BYRNE a Elizabeth D. SWANNER. An evolving view on biogeochemical cycling of iron. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2021, **19**(6), 360–374. ISSN 1740-1534. Dostupné z: doi:10.1038/s41579-020-00502-7
- [29] SHARMA, Vaibhav, Amit VASHISHTHA, Arsha Liz M. JOS, Akshita KHOSLA, Nirmegh BASU, Rishabh YADAV, Amit BHATT, Akshanshi GULANI, Pushpa SINGH, Sanidhya LAKHERA a Mansi VERMA. Phylogenomics of the Phylum Proteobacteria: Resolving the Complex Relationships. *Current Microbiology* [online]. 2022, **79**(8), 224. ISSN 1432-0991. Dostupné z: doi:10.1007/s00284-022-02910-9
- [30] *A new view of the tree of life | Nature Microbiology* [online]. [vid. 2024-03-06]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nmicrobiol201648>
- [31] FLEMING, Emily J., Amy E. LANGDON, Manuel MARTINEZ-GARCIA, Ramunas STEPANAUSKAS, Nicole J. POULTON, E. Dashiell P. MASLAND a David EMERSON. What's New Is Old: Resolving the Identity of Leptothrix ochracea Using Single Cell Genomics, Pyrosequencing and FISH. *PLoS ONE*

- [online]. 2011, **6**(3), e17769. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0017769
- [32] DUBININA, G. A. a A. Yu. SOROKINA. Neutrophilic lithotrophic iron-oxidizing prokaryotes and their role in the biogeochemical processes of the iron cycle. *Microbiology* [online]. 2014, **83**(1), 1–14. ISSN 1608-3237. Dostupné z: doi:10.1134/S0026261714020052
- [33] EMERSON, David a Johanna V. WEISS. Bacterial Iron Oxidation in Circumneutral Freshwater Habitats: Findings from the Field and the Laboratory. *Geomicrobiology Journal* [online]. 2004, **21**(6), 405–414. ISSN 0149-0451, 1521-0529. Dostupné z: doi:10.1080/01490450490485881
- [34] CORNELL, R. M. a U. SCHWERTMANN. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses* [online]. 1. vyd. B.m.: Wiley, 2003 [vid. 2023-10-16]. ISBN 978-3-527-30274-1. Dostupné z: doi:10.1002/3527602097
- [35] CHÂTELLIER, Xavier, Danielle FORTIN, Marcia M. WEST, Gary G. LEPPARD a F. Grant FERRIS. Effect of the presence of bacterial surfaces during the synthesis of Fe oxides by oxidation of ferrous ions. *European Journal of Mineralogy* [online]. 2001, **13**(4), 705–714. ISSN 0935-1221. Dostupné z: doi:10.1127/0935-1221/2001/0013-0705
- [36] CHÂTELLIER, Xavier, M. Marcia WEST, Jérôme ROSE, Danielle FORTIN, Gary G. LEPPARD a F. Grant FERRIS. Characterization of Iron-Oxides Formed by Oxidation of Ferrous Ions in the Presence of Various Bacterial Species and Inorganic Ligands. *Geomicrobiology Journal* [online]. 2004, **21**(2), 99–112. ISSN 0149-0451. Dostupné z: doi:10.1080/01490450490266343
- [37] LARESE-CASANOVA, Philip, Stefan HADERLEIN a Andreas KAPPLER. Biomineralization of lepidocrocite and goethite by nitrate-reducing Fe(II)-oxidizing bacteria: Effect of pH, bicarbonate, phosphate, and humic acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta* [online]. 2010, **74**, 3721–3734. Dostupné z: doi:10.1016/j.gca.2010.03.037
- [38] POSTH, Nicole R., Sonia HUELIN, Kurt O. KONHAUSER a Andreas KAPPLER. Size, density and composition of cell-mineral aggregates formed during anoxygenic phototrophic Fe(II) oxidation: Impact on modern and ancient environments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* [online]. 2010, **74**, 3476–3493. ISSN 0016-7037. Dostupné z: doi:10.1016/j.gca.2010.02.036
- [39] FORTIN, Danielle a Sean LANGLEY. Formation and occurrence of biogenic iron-rich minerals. *Earth-Science Reviews* [online]. 2005, **72**(1), 1–19. ISSN 0012-8252. Dostupné z: doi:10.1016/j.earscirev.2005.03.002
- [40] KAPPLER, Andreas a Dianne K. NEWMAN. Formation of Fe(III)-minerals by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria 1. *Geochimica et Cosmochimica Acta* [online]. 2004, **68**(6), 1217–1226. ISSN 0016-7037. Dostupné z: doi:10.1016/j.gca.2003.09.006

- [41] CROAL, Laura, Clark JOHNSON, Brian BEARD a Dianne NEWMAN. Iron isotope fractionation by Fe(II)-oxidizing photoautotrophic bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2004, **68**.
- [42] LACK, J. G., S. K. CHAUDHURI, R. CHAKRABORTY, L. A. ACHENBACH a J. D. COATES. Anaerobic biooxidation of Fe(II) by *Dechlorosoma suillum*. *Microbial Ecology* [online]. 2002, **43**(4), 424–431. ISSN 0095-3628. Dostupné z: doi:10.1007/s00248-001-1061-1
- [43] HEGLER, Florian. Microbial Fe(II) oxidation: cell-mineral interactions and implications for modern and ancient environments [online]. 2011 [vid. 2024-03-05]. Dostupné z: <https://publikationen.uni-tuebingen.de/xmlui/handle/10900/49539>
- [44] CHAUDHURI, S. K., J. G. LACK a J. D. COATES. Biogenic magnetite formation through anaerobic biooxidation of Fe(II). *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2001, **67**(6), 2844–2848. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.67.6.2844-2848.2001
- [45] HOHMANN, Claudia, Guillaume MORIN, Georges ONA-NGUEMA, Jean-Michel GUIGNER, Gordon E. BROWN a Andreas KAPPLER. Molecular-level modes of As binding to Fe(III) (oxyhydr)oxides precipitated by the anaerobic nitrate-reducing Fe(II)-oxidizing *Acidovorax* sp. strain BoFeN1. *Geochimica et Cosmochimica Acta* [online]. 2011, **75**, 4699–4712. ISSN 0016-7037. Dostupné z: doi:10.1016/j.gca.2011.02.044
- [46] SENKO, John M., Thomas A. DEWERS a Lee R. KRUMHOLZ. Effect of Oxidation Rate and Fe(II) State on Microbial Nitrate-Dependent Fe(III) Mineral Formation. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2005, **71**(11), 7172–7177. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.71.11.7172-7177.2005
- [47] BARCO, Roman A., David EMERSON, Jason B. SYLVAN, Beth N. ORCUTT, Myrna E. JACOBSON MEYERS, Gustavo A. RAMÍREZ, John D. ZHONG a Katrina J. EDWARDS. New Insight into Microbial Iron Oxidation as Revealed by the Proteomic Profile of an Obligate Iron-Oxidizing Chemolithoautotroph. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2015, **81**(17), 5927–5937. ISSN 1098-5336. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01374-15
- [48] HE, Shaomei, Roman A. BARCO, David EMERSON a Eric E. RODEN. Comparative Genomic Analysis of Neutrophilic Iron(II) Oxidizer Genomes for Candidate Genes in Extracellular Electron Transfer. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, **8** [vid. 2024-02-20]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.01584>
- [49] BERG, Jasmine S., Dolma MICHELLOD, Petra PJEVAC, Clara MARTINEZ-PEREZ, Caroline R. T. BUCKNER, Philipp F. HACH, Carsten J. SCHUBERT, Jana MILUCKA a Marcel M. M. KUYPERS. Intensive cryptic microbial iron cycling in the low iron water column of the meromictic Lake Cadagno.

- Environmental Microbiology* [online]. 2016, **18**(12), 5288–5302. ISSN 1462-2920. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.13587
- [50] ZHOU, Nanqing, Jessica L. KEFFER, Shawn W. POLSON a Clara S. CHAN. Unraveling Fe(II)-Oxidizing Mechanisms in a Facultative Fe(II) Oxidizer, Sideroxydans lithotrophicus Strain ES-1, via Culturing, Transcriptomics, and Reverse Transcription-Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2022, **88**(2), e01595-21. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.01595-21
- [51] SPRING, Stefan. The Genera Leptothrix and Sphaerotilus. In: Martin DWORKIN, Stanley FALKOW, Eugene ROSENBERG, Karl-Heinz SCHLEIFER a Erko STACKEBRANDT, ed. *The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses* [online]. New York, NY: Springer, 2006 [vid. 2024-03-05], s. 758–777. ISBN 978-0-387-30745-9. Dostupné z: doi:10.1007/0-387-30745-1_35
- [52] VAN VEEN, W L, E G MULDER a M H DEINEMA. The Sphaerotilus-Leptothrix group of bacteria. *Microbiological Reviews*. 1978, **42**(2), 329–356. ISSN 0146-0749.
- [53] CALDWELL, Douglas E. a Sarah J. CALDWELL. Fine structure of in situ microbial iron deposits. *Geomicrobiology Journal* [online]. 1980, **2**(1), 39–53. ISSN 0149-0451. Dostupné z: doi:10.1080/01490458009377749
- [54] DWORKIN, Martin. *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*. Third ed. New York: Springer, 2006. ISBN 978-0-387-25499-9.
- [55] CHAN, Clara S., Sean M. MCALLISTER, Anna H. LEAVITT, Brian T. GLAZER, Sean T. KREPSKI a David EMERSON. The Architecture of Iron Microbial Mats Reflects the Adaptation of Chemolithotrophic Iron Oxidation in Freshwater and Marine Environments. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2016, **7**, 796. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.00796
- [56] HASHIMOTO, H., S. YOKOYAMA, H. ASAOKA, Y. KUSANO, Y. IKEDA, M. SENO, J. TAKADA, T. FUJII, M. NAKANISHI a R. MURAKAMI. Characteristics of hollow microtubes consisting of amorphous iron oxide nanoparticles produced by iron oxidizing bacteria, Leptothrix ochracea. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* [online]. 2007, **310**(2, Part 3), Proceedings of the 17th International Conference on Magnetism, 2405–2407. ISSN 0304-8853. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmmm.2006.10.793
- [57] BRONS, H. J., W. R. HAGEN a A. J. ZEHNDER. Ferrous iron dependent nitric oxide production in nitrate reducing cultures of Escherichia coli. *Archives of Microbiology* [online]. 1991, **155**(4), 341–347. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/BF00243453
- [58] HAFENBRADL, D., M. KELLER, R. DIRMEIER, R. RACHEL, P. ROSSNAGEL, S. BURGGRAF, H. HUBER a K. O. STETTER. Ferroglobus placidus gen. nov., sp. nov., A novel hyperthermophilic archaeum that oxidizes Fe²⁺ at neutral pH under anoxic conditions. *Archives of Microbiology* [online].

- 1996, **166**(5), 308–314. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s002030050388
- [59] STRAUB, K. L., M. BENZ, B. SCHINK a F. WIDDEL. Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1996, **62**(4), 1458–1460. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.62.4.1458-1460.1996
- [60] HEISING, Silke a Bernhard SCHINK. Phototrophic oxidation of ferrous iron by a *Rhodomicrobium vannielii* strain. *Microbiology (Reading, England)* [online]. 1998, **144** (Pt 8), 2263–2269. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-144-8-2263
- [61] POULAIN, Alexandre J. a Dianne K. NEWMAN. *Rhodobacter capsulatus* Catalyzes Light-Dependent Fe(II) Oxidation under Anaerobic Conditions as a Potential Detoxification Mechanism. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2009, **75**(21), 6639–6646. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00054-09
- [62] *Protist taxonomic and functional diversity in soil, freshwater and marine ecosystems* - *ScienceDirect* [online]. [vid. 2024-04-16]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412020322170>
- [63] ELSER, James J., Matthew E.S. BRACKEN, Elsa E. CLELAND, Daniel S. GRUNER, W. Stanley HARPOLE, Helmut HILLEBRAND, Jacqueline T. NGAI, Eric W. SEABLOOM, Jonathan B. SHURIN a Jennifer E. SMITH. Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* [online]. 2007, **10**(12), 1135–1142. ISSN 1461-0248. Dostupné z: doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01113.x
- [64] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Aplikovaná a technická hydrobiologie*. 2. vyd. Praha: VŠCHT, 2005. ISBN 978-80-7080-521-3.
- [65] KALINA, Tomáš a Jiří VÁŇA. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 978-80-246-1036-8.
- [66] STRUNECKÝ, Otakar, Anna Pavlovna IVANOVA a Jan MAREŠ. An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis. *Journal of Phycology* [online]. 2023, **59**(1), 12–51. ISSN 1529-8817. Dostupné z: doi:10.1111/jpy.13304
- [67] POULÍČKOVÁ, Aloisie, Petr DVOŘÁK a Petr HAŠLER. *Průvodce mikrosvětlem sinic a řas*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2015. ISBN 978-80-244-4408-6.
- [68] WALTER, Juline M., Felipe H. COUTINHO, Bas E. DUTILH, Jean SWINGS, Fabiano L. THOMPSON a Cristiane C. THOMPSON. Ecogenomics and Taxonomy of Cyanobacteria Phylum. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, **8** [vid. 2024-03-12]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.02132

- [69] QIU, Guo-Wei, Coco KOEDOODER, Bao-Sheng QIU, Yeala SHAKED a Nir KEREN. Iron transport in cyanobacteria – from molecules to communities. *Trends in Microbiology* [online]. 2022, **30**(3), 229–240. ISSN 0966-842X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2021.06.001
- [70] KRANZLER, Chana, Mareike RUDOLF, Nir KEREN a Enrico SCHLEIFF. Chapter Three - Iron in Cyanobacteria. In: Franck CHAUVAT a Corinne CASSIER-CHAUVAT, ed. *Advances in Botanical Research* [online]. B.m.: Academic Press, 2013 [vid. 2024-03-12], Genomics of Cyanobacteria, s. 57–105. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-394313-2.00003-2
- [71] MULHOLLAND, Daniel S., Franck POITRASSON, Liudmila S. SHIROKOVA, Aridane G. GONZÁLEZ, Oleg S. POKROVSKY, Geraldo R. BOAVENTURA a Lucieth C. VIEIRA. Iron isotope fractionation during Fe(II) and Fe(III) adsorption on cyanobacteria. *Chemical Geology* [online]. 2015, **400**, 24–33. ISSN 0009-2541. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemgeo.2015.01.017
- [72] YEE, Nathan, Liane G. BENNING, Vernon R. PHOENIX a F. Grant FERRIS. Characterization of Metal–Cyanobacteria Sorption Reactions: A Combined Macroscopic and Infrared Spectroscopic Investigation. *Environmental Science & Technology* [online]. 2004, **38**(3), 775–782. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/es0346680
- [73] GRAHAM, Linda E., James M. GRAHAM, Martha E. COOK a Lee Warren WILCOX. *Algae*. Third edition. Madison: LJLM Press, 2016. ISBN 978-0-9863935-3-2.
- [74] CARMEL, Nava, Elisha TEL-OR, Yona CHEN a Uri PICK. Iron uptake mechanism in the chrysophyte microalga *Dinobryon*. *Journal of Plant Physiology* [online]. 2014, **171**(12), 993–997. ISSN 0176-1617. Dostupné z: doi:10.1016/j.jplph.2014.03.014
- [75] PONIEWOZIK, Małgorzata. Element Composition of Trachelomonas Envelopes (Euglenophyta). *Polish Botanical Journal* [online]. 2017, **62**(1), 77–85. ISSN 2084-4352. Dostupné z: doi:10.1515/pbj-2017-0007
- [76] NICHOLLS, Kenneth H. *Kephyrion hilliardii* sp. nov. and *Pseudokephyrion millerense* sp. nov., two new members of the Chrysophyceae. *British Phycological Journal* [online]. 1981, **16**(3), 241–245. ISSN 0007-1617. Dostupné z: doi:10.1080/00071618100650251
- [77] PŘEMYSL TÁJEK, KATEŘINA VRBOVÁ, a JANA KULICHOVÁ. Nové nálezy vzácné endemické rozsivky *Pinnularia ferrophila*. *Arnika*. 2017, 30–34.
- [78] POULÍČKOVÁ, Aloisie, Petr HAŠLER, Monika LYSÁKOVÁ a Bryan SPEARS. The ecology of freshwater epipellic algae: an update. *Phycologia* [online]. 2008, **47**(5), 437–450. ISSN 0031-8884. Dostupné z: doi:10.2216/07-59.1
- [79] HILDEBRAND, Mark, Sarah J. L. LERCH a Roshan P. SHRESTHA. Understanding Diatom Cell Wall Silicification—Moving Forward. *Frontiers in Marine Science* [online]. 2018, **5** [vid. 2024-04-09]. ISSN 2296-7745. Dostupné z: doi:10.3389/fmars.2018.00125

- [80] *Periphyton - an overview | ScienceDirect Topics* [online]. [vid. 2024-03-13]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/periphyton>
- [81] *Periphyton: Functions and Application in Environmental Remediation*. 2016.
- [82] *Phytobenthos - an overview | ScienceDirect Topics* [online]. [vid. 2024-03-13]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/phytobenthos>
- [83] LETÁKOVÁ, Markéta, Markéta FRÁNKOVÁ a Aloisie POULÍČKOVÁ. Ecology and Applications of Freshwater Epiphytic Diatoms — Review. *Cryptogamie, Algologie* [online]. 2018, **39**(1), 3–22. ISSN 0181-1568, 1776-0984. Dostupné z: doi:10.7872/crya/v39.iss1.2018.3
- [84] *Železitý pramen u Dečinského rybníka* [online]. [map]. Praha: Česká geologická služba: Geologická mapa 1 : 50 000. In: Geovědní mapy 1 : 50 000 [online]. 2023. Dostupné z: <https://mapy.geology.cz/geocr50/>
- [85] REMY, Heinrich. *Anorganická chemie II. díl*. B.m.: Statní nakladatelství technické literatury., Praha., 1962.
- [86] ROSICKÝ, Vojtěch a Jaroslav KOKTA. *Příručka pro určování nerostů*. 2. vyd. (v nakl. ČSAV 1. vyd.). Praha: Československá akademie věd, 1961.
- [87] MICHAL BÍLÝ, JAN ČERNÝ, LENKA CHVÁTALOVÁ, PETR MUSIL, RADKA PICHLOVÁ, a ANTONÍN REITER. *Biologická olympiáda 1994-1995 Úvod do hydrobiologie*. B.m.: Institut dětí a mládeže Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR. 1994
- [88] KAŠTOVSKÝ, Jan, Tomáš HAUER, Rodan GERIŠ, Barbora CHATTOVÁ, Josef JURÁŇ, Olga SKÁCELOVÁ, Petra PITELKOVÁ, Martin PUZSTAI, Pavel ŠKALOUD, Jan ŠŤASTNÝ, Kateřina ČAPKOVÁ, Markéta BOHUNICKÁ a Radka MÜHLSTEINOVÁ. *Atlas sinic a řas České republiky 1*. 1. vydání. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2018. ISBN 978-80-7568-124-9.
- [89] KAŠTOVSKÝ, Jan, Tomáš HAUER, Rodan GERIŠ, Barbora CHATTOVÁ, Josef JURÁŇ, Olga SKÁCELOVÁ, Petra PITELKOVÁ, Martin PUZSTAI, Pavel ŠKALOUD, Jan ŠŤASTNÝ, Kateřina ČAPKOVÁ, Markéta BOHUNICKÁ a Radka MÜHLSTEINOVÁ. *Atlas sinic a řas České republiky 2*. 1. vydání. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2018. ISBN 978-80-7568-124-9.
- [90] SLÁDEČEK, Vladimír a Alena SLÁDEČKOVÁ. *Atlas vodních organismů se zřetelem na vodárenství, povrchové vody a čistírny odpadních vod. 2. díl, Konzumenti*. Praha: Agrospoj, 1997. ISBN 978-80-02-01101-9.
- [91] KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika* [online]. 1964, **29**(1), 1–27. ISSN 1860-0980. Dostupné z: doi:10.1007/BF02289565

- [92] J. JARKOVSKÝ, S. LITTNEROVÁ, a L. DUŠEK. Statistické hodnocení biodiverzity. *Akademické nakladatelství CERM, Brno, 78 pp.* 2012.
- [93] LI, Wanzhu, Meiling YANG, Baoli WANG a Cong-Qiang LIU. Regulation strategy for nutrient-dependent carbon and nitrogen stoichiometric homeostasis in freshwater phytoplankton. *Science of The Total Environment* [online]. 2022, **823**, 153797. ISSN 0048-9697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.153797
- [94] THEY, Ng H., André M. AMADO a James B. COTNER. Redfield Ratios in Inland Waters: Higher Biological Control of C:N:P Ratios in Tropical Semi-arid High Water Residence Time Lakes. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, **8** [vid. 2024-04-15]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.01505

Seznam příloh

Příloha A: Tabulka hodnot terénního měření pH, Eh, O₂ a ORP.

Příloha B: Hodnoty parametrů TC, TOC, TIC, TN a TP ve zkoumaných vzorcích č. 1, 2, 4 a 5.

Příloha C: Kvalitativní stanovení zbylých chemických prvků ve vzorku č. 6.

Příloha D: Hodnoty kvantitativního stanovení zastoupení chemických prvků ve vzorku č. 6 – spektra 1, 2, 4 a 5.

Příloha E: Seznam druhů zaznamenaných během odběrů (absence, prezenze) ve světelném mikroskopu (LM-vzorky).

Příloha F: Seznam druhů zaznamenaných během odběrů (semikvantity) ve světelném mikroskopu (LM-vzorky).

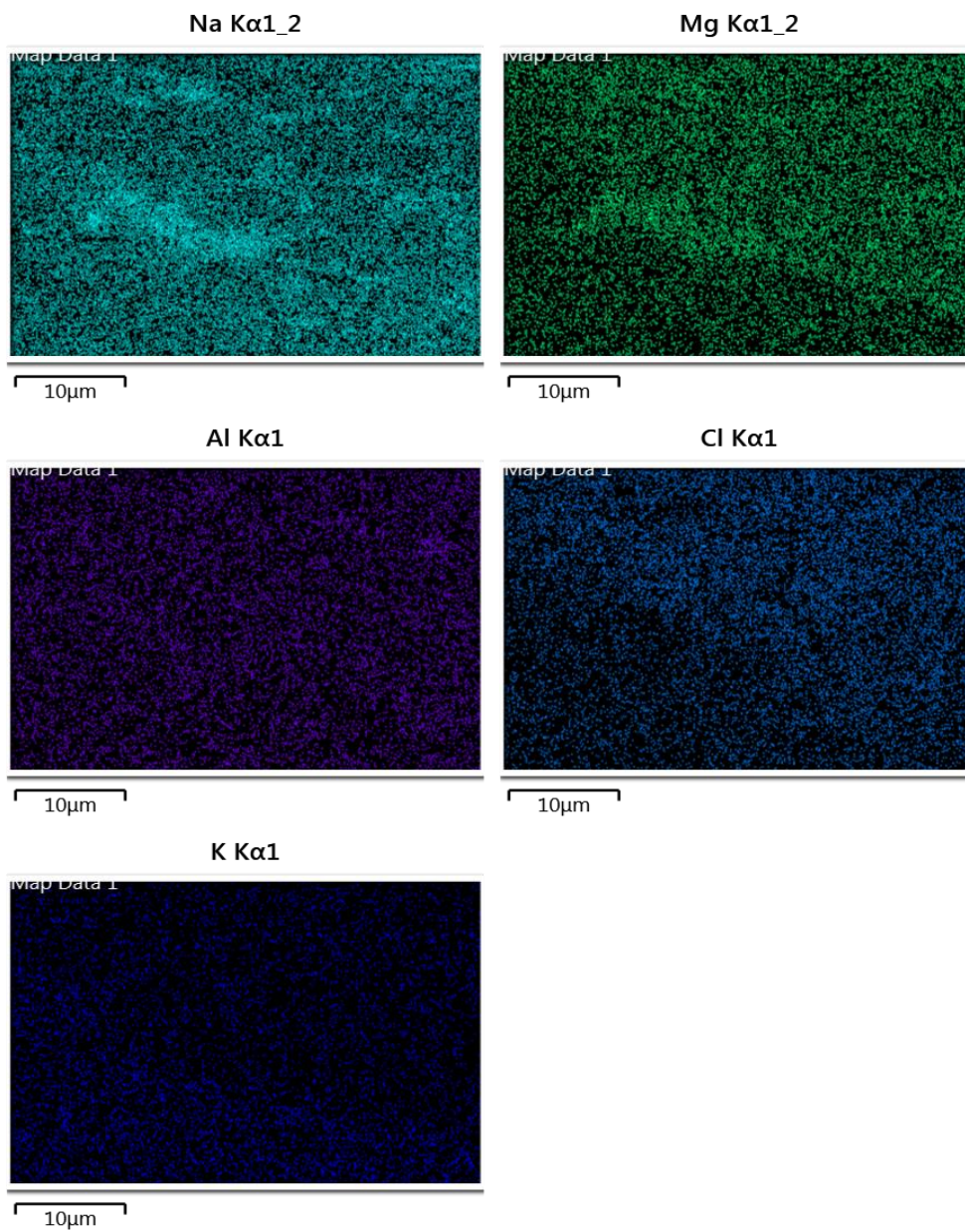
Příloha A: Tabulka hodnot terénního měření pH, Eh, O₂ a ORP.

	pH	O₂	Eh	ORP
		mg/l	μS/cm	mV
1	6,300	1,73	246	63,6
2	6,310	0,994	352	25,4
3	5,931	2,86	267	113,6
4	6,384	1,42	266	-135,5
5	6,126	3,06	222	135,7
6	6,235	3,25	199	98,5

Příloha B: Hodnoty parametrů TC, TOC, TIC, TN a TP ve zkoumaných vzorcích č. 1, 2, 4 a 5.

	TC	TOC	TIC	TN	TP
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
1	25,13	12,85	12,28	1,03	0,05
2	19,87	11,16	8,71	1,02	0,47
4	18,97	9,02	9,95	0,823	0,46
5	19,11	10,73	8,38	1,13	0,1

Příloha C: Kvalitativní stanovení zbylých chemických prvků ve vzorku č. 6.



Příloha D: Hodnoty kvantitativního stanovení zastoupení chemických prvků ve vzorku č. 6 – spektra 1, 2, 4 a 5.

1

Element	Wt%	Wt% Sigma	Atomic %
C	4.25	1.03	7.24
O	52.15	0.85	66.65
Na	2.98	0.22	2.65
Si	2.34	0.19	1.70
S	17.42	0.48	11.11
K	1.17	0.25	0.61
Ca	19.69	0.60	10.04
Total:	100.00		100.00

2

Element	Wt%	Wt% Sigma	Atomic %
C	18.96	0.85	33.68
O	31.59	0.80	42.12
Na	2.73	0.21	2.54
Mg	1.03	0.15	0.91
Si	6.51	0.28	4.94
S	0.66	0.14	0.44
Cl	2.06	0.20	1.24
Ca	1.37	0.24	0.73
Fe	35.10	1.29	13.41
Total:	100.00		100.00

4

Element	Line Type	Wt%	Wt% Sigma	Atomic %
C	K series	18.40	0.43	30.32
O	K series	39.43	0.49	48.77
Al	K series	7.77	0.16	5.70
Si	K series	8.30	0.17	5.85
Ca	K series	0.83	0.12	0.41
Fe	L series	25.25	0.73	8.95
Total:		100.00		100.00

5

Element	Line Type	Wt%	Wt% Sigma	Atomic %
C	K series	18.34	0.52	34.16
O	K series	32.27	0.59	45.13
Si	K series	1.69	0.12	1.35
Ca	K series	1.59	0.19	0.89
Fe	L series	46.11	0.87	18.48
Total:		100.00		100.00

Příloha E: Seznam druhů zaznamenaných během odběrů (absence, prezence) ve světelném mikroskopu (LM-vzorky).

	B1	B2	B3	B4	B5	P1	P2	P3	P4	P5
cf. Apatococcus	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cf. Bracteacoccus	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Caloneis tenuis	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Cryptomonas cf. phaseolus	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Cymbopleura naviculiformis	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
cf. Diplopsheara	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Euglena deases adhaerens	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Euglena mutabilis	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Eunotia cf. minor	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0
Geitlerinema splendidum	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Gomphonema cf. minor	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Characiopsis sp.	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Chlamydomonas sp.	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
Chlorophyceae sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Microspora sp.	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Microthamnion kutzingisnum	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Navicula sp.	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
Nitzschia sp. 1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
Nitzschia sp. 2	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
Oscillatoria sp. 1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1
Oscillatoria sp. 2 "tenká"	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Peridinium sp.	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Phormidium sp.	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Pinnularia cf. viridis	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
Pinnularia ferrophila	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0
Pinnularia nobilis	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
cf. Placoneis	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Sellaphora sp.	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Stauroneis anceps	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Stauroneis gracilis	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
Tracheomonas abrupta	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Trachelomonas hispida	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Tracheomonas cf. bacillifera	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Tracheomonas cf. intermedia	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Xantonema debile	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0

Příloha F: Seznam druhů zaznamenaných během odběrů (semikvantity) ve světelném mikroskopu (LM-vzorky).

	B1	B2	B3	B4	B5	P1	P2	P3	P4	P5
cf. Apatococcus	1									
cf. Bracteacoccus						1	1			
Caloneis tenuis	2	1				2				
Cryptomonas cf. phaseolus				1	1					
Cymbopleura naviculiformis		3	1			1				
cf. Diplospheara		1								
Euglena deases adhaerens			2							
Euglena mutabilis						2				
Eunotia cf. minor	3	2		2		1	2			
Geitlerinema splendidum		1								
Gomphonema cf. minor	1		1							
Characiopsis sp.	3	1								
Chlamydomonas sp.	1	1	1		1					
Chlorophyceae sp.	1									
Microspora sp.						1				
Microthamnion kutzingisnum	2									
Navicula sp.	2	2	2		1		1			
Nitzschia sp. 1			2			1	1			
Nitzschia sp. 2		3	2							
Oscillatoria sp. 1		2	2		3		2			1
Oscillatoria sp. 2 "tenká"							1			
Peridinium sp.						1	2			
Phormidium sp.		3	1	1	2	1				
Pinnularia cf. viridis	1		1	1	2	3				
Pinnularia ferrophila		2	1		1		2			
Pinnularia nobilis		1				1				
cf. Placoneis		1	1							
Sellaphora sp.			1							
Stauroneis anceps		1								
Stauroneis gracilis		3	2		1	2				
Tracheomonas abrupta							1			
Trachelomonas hispida						2	2			
Tracheomonas cf. bacillifera								1		
Tracheomonas cf. intermedia			1							
Xantonema debile		1				2				