

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra ekologie a životního prostředí**



***Phormidium sensu lato* v prameništích a horních tocích Vizovické  
vrchoviny**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Bc. Adéla Smolíková**

Studijní obor: Hydrobiologie

Forma studia: Prezenční

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala sama za pomoci vedoucího práce pana doc. RNDr. Petra Hašlera, Ph.D. a citované literatury.

V Olomouci dne 11. 8. 2021

.....

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na prvním místě bych moc ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Petru Hašlerovi, Ph.D., který mně předal cenné rady a zkušenosti při práci v algologické laboratoři. Oceňuji také trpělivost a ochotu při konzultacích ohledně vypracování této diplomové práce. Velké díky patří mé kolegyni Mgr. Elišce Dřímálové, která mi pomohla s molekulární analýzou a byla mi skvělou spolužačkou a kamarádkou po celou dobu našeho studia. Nakonec bych chtěla samozřejmě poděkovat i mé rodině za velkou podporu a pomoc.

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Adéla Smolíková

Název práce: *Phormidium sensu lato* v prameništích a horních tocích Vizovické vrchoviny

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta UP

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Hašler, Ph.D.

Rok obhajoby: 2021

## ABSTRAKT

Vizovická vrchovina zaujímá značnou část jihovýchodní Moravy a nachází se zde významné prameniště. V rámci diplomové práce se zaměřila na čtyři toky (Vlára, Smolinka, Tichovský a Vysokopolský potok), ve kterých jsem sledovala diverzitu vláknité sinice rodu *Phormidium sensu lato*, která patří taxonomicky mezi nejobtížnější rod sinic. Vzorky jsem odebrala v srpnu roku 2019 z vody, břehu a blízké půdy vždy u pramene, před a za první obcí, jimiž tok protékal a zpracovala je v algologické laboratoři. U izolovaných kmenů jsem zhodnotila morfologii, ekologii a provedla molekulární analýzy (16S rRNA gen, MALDI-TOF, sekundární struktury ITS). Prokázala jsem, že velký vliv na výskyt této sinice má teplota, pH, konduktivita vody i množství dostupných živin. Kromě rodů *Phormidium*, *Microcoleus* a *Kamptonema* se mi podařilo izolovat rod *Ancylothrix*, který byl nalezen zatím pouze v Brazílii. Na základě molekulárních odlišností navrhuji popis nového rodu *Pseudoancylothrix*. Ukázalo se, že molekulární analýzy 16S rRNA genu se zdají být vhodným nástrojem pro studium taxonomie sinic v rámci polyfázového přístupu. Navíc proteomická analýza MALDI-TOF i sekundární struktury ITS dokážou dobře rozlišit i vnitrodruhovou variabilitu a je možné je použít při rozsáhlejších taxonomických studiích.

**Klíčová slova:** sinice, nomenklatura, determinace, *Phormidium*, MALDI-TOF, 16S rRNA, *Microcoleus*, ITS

**Počet stran:** 123

**Počet příloh:** 4

**Jazyk:** čeština

## **BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION**

First name and surname: Adéla Smolíková

Title: *Phormidium sensu lato* in springs and brooks of the Vizovice Highlands

Type of thesis: Master

Workplace: Department of Botany, Faculty of Science UP

Supervisor: doc. RNDr. Petr Hašler, Ph.D.

Year of defense: 2021

## **ABSTRACT**

The Vizovice Highlands form large part of southeastern Moravia and there is an important springs. Within this thesis i focused on four streams (Vlára, Smolinka, Tichovský and Vysokopolský stream), in which we observed the diversity of filamentous cynobacteria of the genus *Phormidium sensu lato*, which is taxonomically one of the most difficult genera of cyanobacteria. In august 2019, i collected samples from the water, shore and nearby soil, always at the spring, in front of and behind the first village through which the stream flowed, and processed them in the algological laboratory. Morphology, ecology and molecular analysis (16S rRNA gene, MALDI-TOF, ITS secondary structures) were evaluated in isolated strains. I confirmed that temperature, pH, water conductivity and the amount of available nutrients have a great influence on the occurrence of this cyanobacteria. In addition to the genera *Phormidium*, *Microcoleus* and *Kamptonema*, i isolated the genus *Ancylothrix*, which has been found only in Brazil. Based on molecular differences, I propose a desription of a new genus *Pseudoancylothrix*. Moleuclar analysis of the 16S rRNA gene have been shown to be a suitable tool for studying cyanobacterial taxonomy within a polyphasic approach. In addition, proteomic analysis MALDI-TOF and the secondary structure ITS can well distinguish intraspecific variability and can be used in larger taxonomic studies.

**Keywords:** cyanobacteria, nomenclature, determination, *Phormidium*, MALDI-TOF, 16S rRNA, *Microcoleus*, ITS

**Number of pages:** 123

**Number of appendices:** 4

**Language:** Czech

# **OBSAH**

<b>CÍLE PRÁCE</b>	<b>8</b>
<b>ÚVOD</b>	<b>9</b>
<b>1. Flóra sinic a řas v prameništích</b>	<b>9</b>
1.1 Prameny a prameniště	9
1.2 Sinice a řasy v pramenech	14
<b>2. Výskyt sinic a řas v horním toku</b>	<b>16</b>
2.1 Popis horního toku	16
2.2 Sinice a řasy v horním toku	17
<b>3. Perifyton</b>	<b>18</b>
3.1 Perifytické sinice a řasy	19
<b>4. Rod <i>Phormidium</i></b>	<b>22</b>
4.1 Kmeny odvozené od rodu <i>Phormidium</i>	25
<b>METODIKA</b>	<b>38</b>
<b>1. Popis studovaného území</b>	<b>38</b>
1.1 Vizovická vrchovina a Přírodní park Vizovické vrchy	38
1.2 Popis studovaných toků	40
<b>2. Sběr vzorků</b>	<b>46</b>
2.1 Průběh měření	37
<b>3. Zpracování vzorků v laboratoři</b>	<b>48</b>
3.1 Zpracování půdního substrátů	48
3.2 Izolace kmenů	49
3.3 Determinace vzorků	50
<b>4. Molekulární analýzy</b>	<b>51</b>
4.1 MALDI-TOF MS	51
4.2 Analýza genu 16S rRNA a regionu 16S-23S ITS	54
4.2.1 Postup izolace DNA – CTAB metoda (Doyle 1991)	55
4.2.2 PCR (Polymerázová řetězová reakce)	57
4.2.3 Stanovení nukleotidové sekvence	59
4.2.4 Fylogenetická analýza	59

<b>VÝSLEDKY</b>	<b>60</b>
<b>1. Ekologická variabilita</b>	<b>60</b>
<b>2. Morfologické zhodnocení</b>	<b>63</b>
2.1 Popis kmenů	66
2.2 Obrazová tabule	69
<b>3. Molekulární metody</b>	<b>87</b>
3.1 Analýza genu 16S rRNA	87
3.2 Sekundární struktury ITS	91
3.3 MALDI – TOF analýza	96
<b>DISKUZE</b>	<b>99</b>
<b>ZÁVĚR</b>	<b>105</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>106</b>
<b>PŘÍLOHY</b>	<b>121</b>

## **CÍLE PRÁCE**

Zjistit:

- Jestli se liší v druhovém složení jednotlivá prameniště
- Jak se mění diverzita druhů v podélném a příčném profilu toku
- Zda má nějaký vliv na výskyt a druhové složení rozdílná teplota, pH a vodivost vody
- Provést analýzu MALDI-TOF izolovaných kmenů a srovnat ji s výsledky analýzy genu 16S rRNA



# ÚVOD

## 1. Flóra sinic a řas v prameništích

### 1.1 Prameny a prameniště

Pramenem označujeme místo, odkud vyvěrá podzemní voda buď na zemský povrch nebo pod hladinu vodního útvaru (rybník, jezero, moře). Jestliže se na jednom místě vyskytuje více pramenů, označujeme tuto oblast jako prameniště. Pokud jsou příznivé podmínky, vytvoří pramen vodní tok. Počet pramenů není znám mnoha geografických oblastí a celkové počty jsou tedy spíše orientační. Prameny jsou malé ekosystémy, ale celosvětově jsou velmi četné. V současné době se podle Stevens et al. (2021) vyskytuje na Zemi zhruba přes 2,5 milionu pramenů. Nicméně, Glazier (2009) odhadl výskyt na více než 57 milionů pramenů na souši (4 prameny na km<sup>2</sup>) vyjma Antarktidy a více než 100 000 termálních pramenů. Vzhledem k jejich hojnosti jsou důležitou součástí hydrologického cyklu, transportu rozpuštěných minerálních látek a zdrojem eroze.

Veškerá pramenitá voda pochází ze srážek, které dopadají na povrch a prosakují do země, kde se shromažďují jako podzemní voda. Díky gravitaci, tlaku či jiným silám vystupuje na povrch voda všude tam, kde hladina podzemní vody protíná povrch země (Glazier 2009).

Prameny jsou uznávány za vzácné a globálně ohrožené ekosystémy, hlavně kvůli malým rozměrům a citlivosti k disturbancím (Davis et al. 2016, Cantonati et al. 2006). Navíc jsou významné při zachování biologické rozmanitosti díky jejich vysoké biodiverzitě. Hlavní příčinou této vysoké rozmanitosti bude pravděpodobně pozoruhodná škála podmínek prostředí, které různé prameny mohou nabídnout (např. zastíněné nebo nezastíněné části, stálá nebo kolísavá hladina vody, měkká či tvrdá voda bohatá na uhličitany) (Cantonati et al. 2015).

Prameny jsou známé pro jejich jedinečné vlastnosti, kterými se liší od ostatních povrchových vod. Mají relativně stabilní fyzikální i chemické podmínky. Voda v prameni má celoročně malé teplotní výkyvy a dostatečné prokysličení oproti nižším částem toku. Směrem od pramene k ústí se mění fyzikálně-chemické parametry vody, např. teplota, množství kyslíku, obsah živin, zákal, ale i charakter dna, šířka a hloubka toku nebo průtok. Tyto parametry ovlivňují složení a strukturu dalších společenstev (Dumnicka et al. 2013).

Teplota vody u mnoha pramenů odpovídá průměrné roční teplotě oblasti, která závisí na nadmořské výšce. Pokud je teplota přibližně rovna této hodnotě, nazývají se prameny jako tzv. ambientní, chladné prameny mají teplotu pod touto hodnotou, termální výrazně nad. Existuje několik kategorií termálních pramenů, např. vřídla (Glazier 2009).

Chemické složení vody v pramenech se může lišit v závislosti na jejich geologickém podloží. Například z vápence pramení relativně zásaditá tvrdá voda bohatá na ionty vápníku a hydrogenuhličitanů a obsahuje málo iontů vodíku ( $\text{pH} > 7$ ), zatímco z pískovce pramení kyselá měkká voda s nízkým obsahem vápníku a hydrogenuhličitanů, ale s vysokým obsahem vodíkových iontů ( $\text{pH} < 7$ ). Hlavní kationty (kladně nabitě ionty) představují sodík, vápník, draslík, hořčík a těžké kovy, jako je železo, zinek a hliník. Hlavní anionty (záporně nabitě ionty) jsou chloridy, uhličitany, hydrogenuhličitanů, sulfáty, sulfidy, dusičnany, fosforečnany a další ionty. Některé prameny obsahují výrazné množství rozpuštěného oxidu křemičitého, či malé koncentrace radioaktivních izotopů (např. radium, radon nebo uran). Mezi typické rozpuštěné plyny patří dusík, oxid uhličitý, kyslík, sirovodík, helium a další vzácné plyny. Některé prameny jsou tak nasycené oxidem uhličitým, že významně zvyšují koncentraci tohoto plynu v okolním vzduchu, a tím zvyšují růst okolní vegetace. Názvy pramenů často odráží jejich chemické složení, například sirné, kyselé, alkalické, minerální, železité (Glazier 2009).

Prameny jsou oligotrofní (obsahují málo živin), protože tato oblast je většinou zastíněna hustou lesní vegetací a primární producenti nemají dostatek světla na průběh fotosyntézy. Produkce a přísun organických látek se dělí na autochtonní, kdy organické látky vznikají přímo v toku (primární produkce sinic, řas, vodních rostlin) nebo alochtonní (z vnějšího prostředí – pyl, opad, prach, rostliny...), který v této části toku převládá. Kvůli tomu je zde převaha hrubozrnných částic (CPOM) nad jemnozrnnými (FPOM). S nedostatkem slunečního záření úzce souvisí i převaha heterotrofie (bakterie, houby) nad autotrofií (řasy, vodní makrovegetace). Pokud se vyskytuje pramen např. na louce, poušti, ledovci s malou nebo žádnou vegetací je zdrojem organického uhlíku hlavně koryto potoka (Pusch et al. 1988).

Illies a Botosaneanu (1963) poznali neobvyklé vlastnosti pramenů a navrhli krenobiologii (studium života v pramenech) jako speciální obor limnologie. Pramenům však dlouhou dobu nebyla věnována velká pozornost. Rané studie se zaměřily na jednotlivé typické organismy, které se vyskytují v pramenech (např. hlemýždi nebo vodní roztoči). Od počátku 90. let vznikaly komplexnější studie o těchto organismech, např. v Alpách (Crema et al. 1996). I přes to, že je zde málo živin, jsou prameny poměrně početně zastoupeny různými organismy, které zde přežívají hlavně díky stabilním podmínkám. Mnoho druhů rostlin a živočichů využívá teplotně stabilní prameny k tomu, aby přečkali horká léta nebo naopak chladné zimy. Můžou tady žít krenobionti a krenofilové, kteří mají velké nároky na čistou vodu s nízkou teplotou. Mezi typické krenobionty patří larvy chrostíku, komárů či brouků. Vyskytují se však i máloštětinatci, blešivci nebo pramenky rakouské. Kromě těchto organismů zde můžeme najít

bentické nebo ojediněle i planktonní sinice a řasy. Korýši a měkkýši jsou běžní v alkalických tvrdých vodách, kde mohou získat dostatek vápníku pro tvorbu krunýře, naopak chybí v kyselých pramenech měkkých vod, kde je dominantní hmyz (Cantoni et al. 2012, Glazier 2009).

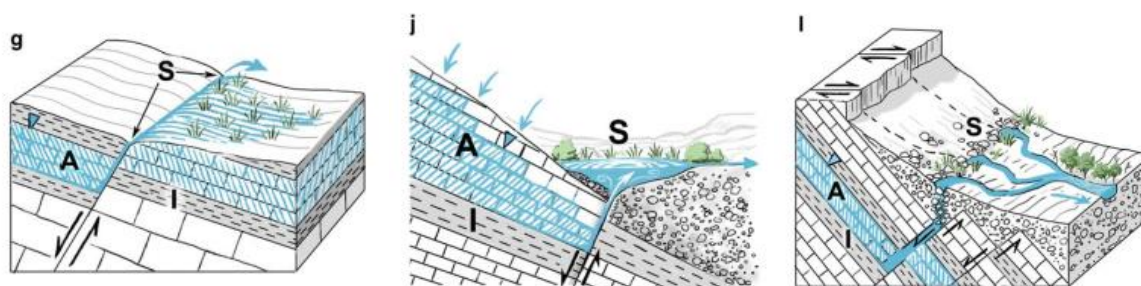
Prameny jsou extrémně rozmanité ekosystémy, které lze klasifikovat podle různých kritérií odvozených z hydrologie, geologie, hydrochemie, teploty vody, ekologie či humánního použití (Cantoni et al. 2015, Glazier 2009). Prameny lze také kategorizovat na základě bentických řas (Cantoni et al. 2012).

Podle způsobu, jakým voda vyvěrá ze země, rozlišil Hynes (1970) tři základní formy pramenů, a to limnokren, helokren a rheokren (Obr. 1). Někdy se může vyskytovat více forem na jednom místě, například rheolimnokren nebo rheohelokren (Glazier 2009).

Helokren (mokřadní pramen) je charakterizován pomalým průsakem podzemní vody na větší ploše směrem na zemský povrch. Obvykle vyvěrá pramen na více místech a pramenná stružka se často vytváří až po určité vzdálenosti od těchto pramenů. Tyto mělké prameny jsou ovlivňovány sezónními i časovými změnami. Tento typ pramene je u nás nejběžnější a můžeme jej nejčastěji najít v nížinách, kde není prudký svah. Vegetace je tvořena mokřadními rostlinami jako jsou rákosy, mechy a kapradí (Külköylüoğlu & Yılmaz 2006, Kubíková & Simon 2009).

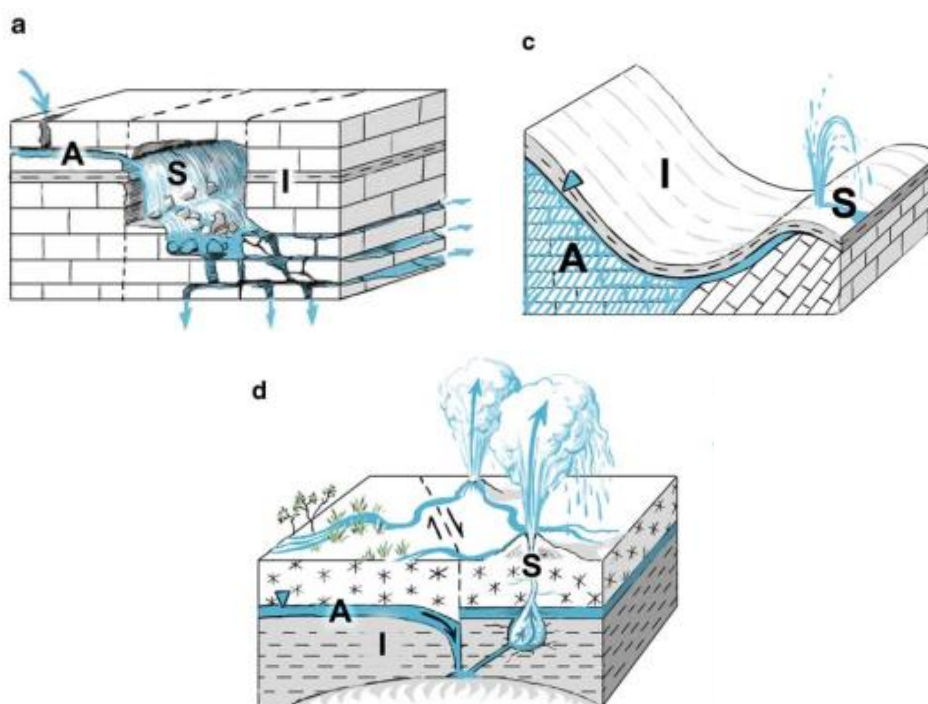
Limnokreny jsou prameny, které při vyvěrání vytváří malé jezírko a teprve z něj voda odtéká jako pramenná stružka. Jezírko je obvykle natolik dostatečně hluboké, aby nebylo ovlivňováno sezónními výkyvy, jako je změna teploty, vlhkosti nebo přísunu živin (Hynes 1970).

Rheokren je pramen, který vyvěrá ze země, ale na rozdíl od limnokrenu se voda nezadržuje na povrchu, ale ihned samovolně odtéká rychle proudící pramennou stružkou. Můžeme jej nejčastěji najít v oblastech s vyšší nadmořskou výškou na otevřených loukách (Di Sabatino et al. 2003).



Obr. 1: Nákresy základních pramenů – (g) helokren, (j) limnokren, (l) rheokren, podle Springer & Stevens (2009).

Springer & Stevens (2009) se snažili o sjednocení klasifikace, proto definovali a popsali celkem 12 pramenů a vytvořili tím komplexnější a složitější systém členění. Do něj zahrnuli kromě třech výše zmíněných i prameny, které se objevují např. v jeskyních, gejzíry nebo tzv. fontány (Obr. 2).



Obr. 2: Příklady pramenů klasifikované podle Springer & Stevens (2009) (a) jeskyně (c) fontána (d) gejzír.

Od 17. století až do první poloviny 20. století představovaly prameny v hydrogeologii téma s vysokou prioritou. Poté zájem opadl a navrátíl se až koncem 20. století, kdy se společnost začala více zajímat o ekologii a ochranu životního prostředí (van der Kamp 1995). Navzdory dlouhé historii hydrogeologických průzkumů (např. Perrault 1674) a současnou rostoucí intenzitou vědeckého výzkumu, např. Glazier (2014) pramenům chybí jeden ucelený klasifikační systém, který by se dal použít globálně. Tato klasifikace by byla užitečná, kdyby se dala univerzálně použít na všechny typy pramenů na Zemi a byla by založena na takových proměnných, které lze lehce pozorovat či měřit. Absence široce použitelného a sjednoceného klasifikačního systému přispěla k nedostatku pozornosti, což mělo za následek ztrátu značného množství pramenů (zejména v aridních oblastech) a druhů organismů závislých na tento ekosystém (Cantoni et al. 2020a). Problémem je také nedostatečná komunikace mezi obory hydrogeologie a ekologie, které mají oba své systémy členění pramenů a je zatím nezáměr je nějakým způsobem propojit (Cantoni et al. 2020b)

Prameny jsou důležité jak geologicky, tak ekologicky a mají pro člověka velký význam. Prameny a pramenné stružky jsou užitečné pro studium široké škály vědeckých oblastí, jelikož zde interaguje země, voda a vzduch. Podzemní voda komunikuje v podzemí s horninami, na povrchu se vzduchem a různými organismy. Výsledkem je, že je možné zkoumat několik důležitých vlastností, jako je hydrogeologie, geomikrobiologie a geotermální procesy. Ekonomický význam pramenů je obrovský jak regionálně, tak globálně. Četné lékařské studie prokázaly léčivé účinky minerální pramenité vody zejména na artritické, respirační a gastrointestinální onemocnění. Koupání v teplých minerálních vodách v lázních je v současnosti celosvětově velmi populární. Nespočet domácností, farem a průmyslových odvětví používá pramenitou vodu k pití, na zavlažování, v pivovarnictví, zpracování materiálu a mnoho dalších účelů. Horké prameny jsou zdrojem geotermální energie, která je využívána zejména v období chladu, například na Islandu (Glazier 2009).

Prameniště jsou velmi citlivé na vlivy způsobené antropogenní činností. Problémem může být rostoucí urbanizace, ničení těchto ekosystémů a obohacení toku živinami kvůli zemědělství, hospodářství atd. Vlivem odběru vody dochází ke snížení hladiny podzemní vody, problémem mohou být i invazní druhy (Nowicka-Krawczyk & Żelazna-Wieczorek 2013, Zelnik et al. 2018).

## 1.2. Sinice a řasy v pramenech

Sinice a řasy jsou dobře adaptovány na oligotrofní prostředí pramenů a patří mezi dominantní primární producenty v prameništích. Zvláště v neutrálních či mírně alkalických pramenech s odtékající vodou, kde je na dně kamenitý substrát, jsou sinice a řasy často jednou z druhově nejbohatších a nejpočetnějších skupinou fotoautotrofů (Cantoni et al. 2015).

Nejčastěji se sinice vyskytují v rheokrenu a limnokrenu. V helokrenu vykazují nízkou rozmanitost a bývají nahrazeny zelenými řasami. To je pravděpodobně způsobeno rozdílem ve schopnosti sinic a zelených řas využívat CO<sub>2</sub> při nízkém a vysokém pH, kdy v helokrenu je kyslejší pH a dostatek CO<sub>2</sub>. Sinice preferují neutrální až alkalické prostředí a nižší hodnoty CO<sub>2</sub>, proto v helokrenu najdeme spíše zelené řasy než sinice (Glime & Vitt 1986).

Studie zabývající se sinicemi pramenišť jsou po celém světě stále velmi vzácné, nejvíce se vědci zaměřují na specifické prameny, jako jsou termální, slané nebo kyselé. Specifické ekologické vlastnosti těchto prostředí vedou ke zvláštním seskupení sinic a řas (Kitner, Pouličková & Hašler 2005). Zajímavá studie od Cantoni et al. (2015) přezkoumává omezenou literaturu, která je k dispozici o sinicích v „ambientních“ pramenech. Například v roce 2014 se v databázi „Institute for Scientific Information“ slovo pramen vyskytuje z celkových 515 článků pouze dvanáctkrát.

Výskyt sinic jak v lentických (stojatých), tak i v lotických (tekoucích) systémech je považován spíše za negativní. Vodní květy vznikají hlavně antropogenní činnosti, především používáním hnojiv v zemědělství a následnému obohacení toku o dusík a fosfor, který využívají sinice. Vodní květy mohou přispívat k omezení slunečního záření, biologickému znečištění, produkci toxinů nebo akumulaci odumřelé biomasy a následné anoxii (Casamatta & Hašler 2016). Toxiny sinic jsou více pozorovány u planktonních druhů než u druhů bentických (Seifert et al. 2007).

Všeobecně v tekoucích vodách je velké množství různých druhů sinic a řas. Mezi časté rody rozsivek v toku patří *Cymbella*, *Diatoma*, *Fragillaria*, *Cocconeis*, *Synedra*, *Gomphonema*, *Navicula*, *Meridion*. Ze zelených řas můžeme najít rody *Closterium*, *Oedogonium*, *Scenedesmus*, *Spirogyra*, *Ulothrix*, ze sinic *Phormidium*, *Oscillatoria*, *Calothrix* (Azim et al. 2005). Nejvíce se vyskytují druhy bentické, které můžeme najít na písku, kamenech nebo bahně, např. *Phormidium* nebo *Geitlerinema*. Další taxony můžeme nalézt jak v bentosu, tak v planktonu, např. *Merismopedia* nebo *Anabaena*. Mezi epilitické rody řadíme např. *Calothrix* nebo *Pleurocapsa*, epifytický je např. *Chamaesiphon*. Mnoho sinic je pohyblivých (např.

*Geitlerinema*) nebo má plynové vakuoly, které jim umožňují rychlý pohyb ve vodním sloupci (např. *Microcystis*). Některé taxony se zdají být kosmopolitní (*Phormidium* nebo *Leptolyngbya*), nicméně i široce rozšířené taxony nemusí představovat geneticky stejný organismus, jelikož nastává problém v identifikaci způsobené kryptickou variabilitou (Casamatta & Hašler 2016).

Sinice a řasy jsou využívány celá staletí pro monitorování a hodnocení stavu vodních ekosystémů. Druhové složení, jejich biomasa a další charakteristiky hodnotí ekosystémy za účelem stanovení pitné vody, rybolovu a rekreace (Stevenson 2014, Manoylov 2014). Problémem je však současná systematika sinic, která je nepřehledná a také obtížná identifikace, která je způsobena kvůli omezenému množství morfologických znaků, fenotypové plasticitě a jejich malé velikosti (Casamatta & Hašler 2016).

## 2. Výskyt sinic a řas v horním toku

### 2.1 Popis horního toku

Podélný profil toku vykazuje změny hydrologické, fyzikální i ekologické. Podle druhového složení ryb, charakteru toku a fyzikálně-chemických podmínek rozdělil v 19. století A. Frič tok na čtyři pásma – pstruhové, lipanové, parmové a cejnové. Definování přesných hranic pásem bývá v praxi složité. V horním toku se vyskytuje pstruhové pásmo, kde je charakteristické kamenité dno, malá hloubka vody, větší spád terénu (přes 0,4 %) a rychle tekoucí voda, která zapříčiňuje proces hloubkové eroze a transport materiálu. Co se týče teploty vody, je stále velmi nízká (max. 12-18 °C), hlavně z důvodu zastínění a nedostatku slunečního záření. Voda je dostatečně okysličená díky mělké vodě a turbulentnímu proudění. Charakter a rozsah pstruhové pásma záleží na nadmořské výšce, typicky se vytváří nad 500 m n. m. Pstruhové toky jsou u nás široké do 10m a hloubka bývá maximálně do 0,5m (Randák et al. 2013).

Mezi typické druhy ryb patří pstruh potoční a vranka obecná. Z bezobratlých organismů zde najdeme druhy, které jsou odolné vůči rychlému proudu a mají většinou speciální adaptace. Jedná se např. o blešivce, larvy chrostíků, jepic či pošvatek, muchničky, pakomáři. V nejjednodušším případě jsou živočichové přilnutí k pevnému podkladu (např. mechovky, houby, někteří chrostíci). Velmi účinné mohou být různé výrůstky, výběžky, háčky, přísavky, které mohou být na končetinách, hrudních segmentech nebo zadečkových člácích. Např. přísavky mají larvy přísalek (*Blepharideridae*) a pijavice, chrostíci z čeledi Rhyacophilidae a Polycentropidae mají hákovité pošinky (Randák et al. 2013, Lellák & Kubíček 1991).

Prameny a všeobecně horní toky mohou být malé, ale poskytují stanoviště pro bohatou škálu druhů, což zvyšuje biologickou rozmanitost pro celý říční systém. Biotu horních toků lze rozlišit do pěti skupin: 1) druhy, které jsou unikátní pouze pro tuto část toku, 2) druhy, které se vyskytují tady, ale i níže v toku, 3) druhy, které se zde vyskytují jen sezónně 4) druhy, které většinu života tráví v dolních tocích, ale přítomnost v horních tocích vyžadují v různých životních stádiích (např. tření), 5) druhy, které přímo nežijí v horním toku, ale můžeme je tu najít (unášený hmyz) (Meyer et al. 2007).

V horním toku je vysoká diverzita a množství organických látek hlavně díky přísunu alochtonního materiálu, např. listy, větve, byliny, kůra, které se rozkládají různou rychlostí. Nejdříve se rozloží listy, později jehličí, a nakonec dřevní hmota, jejíž rozklad může trvat několik let. S vysokým obsahem těchto látek souvisí výskyt mikrobiálních organismů (hlavně bakterií) a živočichů, kteří jsou anatomicky vybaveni pro příjem a zpracování detritu. V horním



toku jsou nejčastější kouskovači (shredders), mezi které patří např. pošvatky, pakomáři nebo chrostíci. Ti rozmělnují organický materiál na jemnější částice, které využívají další skupiny organismů v průběhu toku (Lellák & Kubíček 1991).

I přes přínos a důležitost pro zachování rozmanitosti a funkčnosti celých říčních ekosystémů jsou horní toky neustále ohrožovány lidskou činností. Procesy jako těžba, urbanizace či zemědělství degradují a eliminují biotopy horních toků. Degradace horních toků má negativní důsledky jak pro organismy těchto stanovišť, tak i pro biologickou rozmanitost ekosystémů dolních toků (Meyer et al. 2007).

## **2.2 Sinice a řasy v horních tocích**

Z primárních producentů v horních tocích převládají rozsivky (např. *Cymbella*, *Gomphonosis*, *Fragilaria*), sinice (např. *Schizothrix*, *Phormidium*), ruduchy (např. *Batrachospermum*, *Lemanea*), zelené řasy (např. *Stigeoclonium*). Na místech, kde je horní tok zastíněný s nízkým obsahem živin, se vyskytuje zhruba 30-60 druhů řas a sinic. Navíc některé z nich už nikde v říční síti nenajdeme. Diverzita horních toků bývá však často podceňována, jednak kvůli omezenému odběru a studiu, ale i z důvodu nepopsaných druhů či rodů (Meyer et al. 2007).

V zalesněných horních tocích jsou sinice a řasy vedle alochtonně získaného materiálu důležitým zdrojem potravy pro různé organismy, např. hmyz. Jsou obecně lépe stravitelnější a výživnější než detrit, obsahují základní složky potravy (aminokyseliny, mastné kyseliny,...), který hmyz nemůže získat ani z bakterií, ani z listů (Mayer & Likens 1987).

### 3. Perifyton

Pojem perifyton lze definovat jako společenstvo vodních organismů rostoucích na povrchu ponořených předmětů, který pokrývají svým povlakem. Může být složen z bentických řas a sinic, rostlin, bakterií, prvoků a dalších mikroorganismů, jako jsou vířníci a perloočky (Yadav et al. 2017). V mořském perifytonu můžeme najít navíc například různé typy mlžů, korýšů, sumek, korálů a žahavců, kteří se ve sladkovodním prostředí nevyskytují (Vermaat 2005). Rozdíl mezi pojmem perifyton a bentos není v literatuře jednoznačný. Termíny perifyton a aufwusch jsou víceméně synonymem pro termín bentické řasy podle Stevenson & Bahls (1999), Stevenson, Bothwell & Lowe (1996), Dokulil (2013) a Allan & Castillo (2007).

Perifyton můžeme najít prakticky ve všech vodních ekosystémech od malých rybníků po velké oceány a v trofických podmínkách, které sahají od oligotrofie až po eutrofii (Azim et al. 2005). Můžeme jej nalézt hlavně v horních tocích řeky, jelikož u pramene růstu biomasy brání ještě vysoké procento zastínění a v dolních tocích zase zákal, způsobený velkým množstvím jemnozrnných částic (Vannote et al. 1980).

Všechny ponořené substráty, na které dopadá světlo, ať už v malých potocích nebo ve velkých řekách či jezerech kolonizuje perifyton. Povrch nejdříve kolonizují bakterie (Baker & Orr 1986). Pokud je k dispozici dostatek světla začnou se rozrůstat menší rozsivky (často *Cocconeis*, *Navicula*) a jednobuněčné zelené řasy (např. *Scenedesmus*, *Chlorococcum*). Tyto kokální formy nahradí později vláknité zelené řasy (*Ulothrix*, *Oedogonium*, *Cladophora*), další rozsivky (*Gomphonema*, *Cymbella*, *Synedra*) a vláknité sinice (*Oscillatoria*, *Calothrix*). Nakonec se můžou přichytit epifytické organismy (Hoagland et al. 1982, Vermaat 2005). Výška perifytonu se nejčastěji pohybuje v řádu několika milimetrů až několika centimetrů (Vermaat 2005). Změny v biomase mohou být způsobeny několika faktory, včetně složení substrátu, teploty, světla a přísunu živin (Hansson 1992).

Perifyton se významně podílí na fixaci uhlíku a koloběhu živin ve vodních ekosystémech, a navíc slouží jako zdroj potravy pro bezobratlé, pulce a některé ryby. Může se používat ke zlepšení kvality vody v jezerech a nádržích nebo k čištění odpadních vod (Azim et al. 2005). Funguje také jako výborný bioindikátor čistoty vody, protože obsahuje velký počet druhů, u kterých víme, jakým způsobem reagují na určité změny, navíc jejich sběr je jednoduchý a pěstování levné (Omar 2010). Zejména rozsivky považujeme za užitečné ekologické indikátory používané při monitorování kvality vody (Round 1991, Dixit et. al 1992).

Kolonizují téměř všechny vhodná stanoviště a jsou přizpůsobeny širokému rozsahu ekologických podmínek (Stevenson & Bahls 1999).

Počátky studia perifytonu je obtížné přesně určit, protože bentické řasy byly používány po staletí jako modelové organismy například pro studium fototropismu. První studie perifytonu publikovali Fritsch (1906) a Brown (1908), kteří se zaměřili na důsledek sezónních výkyvů na růst a složení řas v potocích a rybnících. Od 40. let se začaly objevovat studie o vlivu abiotických faktorů na perifyton a využívání perifytonu jako bioindikátoru (Larned 2010). V 50. letech s vývojem modernějších technologií došlo k většímu povědomí o dopadech člověka na životní prostředí a tím i na sladkovodní ekosystémy, např. Odum (1956). Nové technologie také usnadnily výzkum primární produkce a metabolismu organické hmoty (Whitford & Schumacher 1961). Od 70. let se do povědomí dostávaly vlivy přírodních disturbancí, limitací světlem a živinami na perifyton, např. Pringle et al. (1988). Mnoho pokroků v ekologii perifytonu v posledních letech bylo ovlivněno velkými pokroky v technologiích (mikroskopie, fluorometrie) (Larned 2010).

### 3.1 Perifytické řasy a sinice

Rozsivky (Bacillariophyceae), zelené řasy (Chlorophyta) a sinice (Cyanobacteria) obvykle tvoří dominantní skupiny v perifytonu. Kromě nich se mohou však vyskytnout i červené řasy (Rhodophyta). Zlativky (Chrysophyceae), různobrvky (Xanthophyceae), skrytěnky (Cryptophyta) a obrněnky (Dinophyta) jsou spíše planktonní organismy, ale můžeme je najít i v bentosu. Navíc zde jsou různé typy nepohyblivých klidových stádií (Stevenson, Bothwell & Lowe 1996).

Mezi nejběžnější rozsivky můžeme zařadit rody *Diatoma*, *Synedra*, *Gomphonema*, *Achnathes*, *Meridion*, *Nitzschia*, mezi zelené řasy *Cladophora*, *Ulothrix*, *Oedogonium*, *Stigeoclonium*, mezi sinice *Osillatoria*, *Phormidium*, *Rivularia* a mezi ruduchy *Lemanea*, *Hildebrandia*, *Batrachospermum* (Lellák & Kubíček 1991).

Podle toho, jaký substrát řasy a sinice kolonizují je rozdělujeme na epilitické, které rostou na tvrdém povrchu jako je kámen, šterk či balvan (*Cladophora*). Epifytické řasy rostou na rostlinách či větších řasách, které poskytují relativně pevné substráty a jsou výborným zdrojem živin (*Oedogonium*). Epipelické rostou na anorganickém či organickém sedimentu, charakteristické jsou velké rozsivky a vláknité sinice (*Sellaphora*). Metafyon označuje místo ve fotické zóně, které není přímo spojené se substrátem. Tady se typicky nachází vláknité zelené řasy (*Zygnema*, *Spirogyra*, *Mougeotia*) (Dokulil 2013, Stevenson, Bothwell & Lowe 1996).

Fyzická struktura a stabilita podkladu může ovlivňovat kolonizaci řas a sinic. Ty druhy, které vytváří rozsáhlou biomasu, se obvykle nachází na větších kamenech, zatímco malé pohyblivé řasy kolonizují malé útvary, jako je štěrk nebo písek (Burkholder 1996).

Perifytické řasy a sinice podporují potravní sítě, odstraňují z vody živiny a můžou stabilizovat sedimenty, zmírnit proud, a tím upravit vodní prostředí (Allan & Castillo 2007). Mnoho řas může poskytovat vhodné habitaty pro bezobratlé, např. *Chara* podporuje rozmanitost a hustotu vodních bezobratlých v potocích, kde je písčité dno, které je pro ně nevhodným habitatem. *Cladophora* a další vláknité řasy podporují populace bezobratlých např. pakomárů nebo blešivců (Stevenson 1996).

Sinice a řasy můžeme je kategorizovat podle jejich velikost na makro- a mikro-. Makro- jsou bentické formy, u kterých je na první pohled okem zřejmá stélka (např. *Chara*), ve srovnání s mikro-, které nemohou být rozlišeny bez pomoci mikroskopu (např. *Navicula*) (Allan & Castillo 2007).

Perifytické řasy a sinice jsou ovlivňovány fyzikálními, chemickými a biologickými disturbancemi, ke kterým dochází v toku. Perifyton můžou negativně ovlivňovat faktory, jako je vysychání toku, anoxie, mráz, rychlé změny osmotického potenciálu, kontaminace, pohyb substrátu, rychlé zvýšení rychlosti toku, změna slunečního záření nebo teploty (Larned 2010). Nejčastěji dochází k odplavení biomasy vlivem zvýšené hladiny, i když jsou organismy připojeny k substrátu pomocí různých morfologických struktur, jako jsou lepivá vlákna, přísavky, sliz nebo rhizoidy (Reid & Wood 1976). Pokud perifyton vytváří tlustou vrstvu, je obzvláště citlivý na odplavení, zejména vlivem stárí nejspodnější vrstvy, která oslabuje připevnění k podkladu. Nedostatek slunečního záření, nárůst metabolitů a snížená výměna plynů a živin může přispívat k tomu, že tato vrstva není schopna udržet hmotnost překrývajících vrstev. Biomasa perifytonu obvykle rychle roste a následně strmě klesá, tento proces probíhá v rozpětí 3-6 týdnů (Allan & Castillo 2007). Nejméně odolné jsou sinice (např. *Anabaena variabilis*, *Oscillatoria* sp.) a zelené vláknité řasy. Nejodolnější jsou rozsivky (např. *Navicula tenella*, *Nitzschia fonticola*) (Grimm & Fisher 1989).

Světlo je základem pro fotosyntetizující bentické řasy a sinice a může být limitujícím faktorem v malých potocích pod hustým lesním porostem, kde můžou stromy pohlcovat až 95 % PAR (fotosynteticky aktivní záření) (Hill 1996). Tyto populace se snaží dosáhnout maxima na jaro, kdy je zastínění ještě minimální a dosahují v tomto období maximálního růstu. Existuje mnoho studií, kde se po vykácení stromů rozrostl perifyton díky většímu slunečnímu záření,

např. Murphy & Hall (1981) a Lowe et al. (1986). Než světlo pronikne přes celý vodní sloupec, narazí na překážky, jako je rozpuštěná organická hmota, suspendované anorganické částice a fytoplankton, které světlo rozptýlí a absorbují. Málo slunečního záření dopadá na sinice a řasy v hlubokých jezerech nebo obecně v zakalených vodách. Naproti tomu dostatek slunečního záření je v mělké, čisté vodě. Zelené řasy obvykle potřebují ke svému růstu vysokou úroveň světla, naproti tomu sinice a rozsivky vyžadují nižší intenzitu ozáření, můžou proto žít i ve větší hloubce nebo v zastíněném prostředí (Hill 1996, Allan & Castillo 2007).

Teplota vody ovlivňuje biomasu a druhové složení sinic a řas. Rozsivky dominují při teplotě 5 °C až 20 °C, zelené a hnědé řasy 15 °C až 30 °C a sinice kolem 30 °C (DeNicola 1996). V mírném pásu je typická dominance zelených řas a sinic v letních měsících (Allan & Castillo 2007).

Tok vody přináší kontinuálně živiny a plyny a tím podporuje růst perifýtonu. Rozpuštěný anorganický fosfor, dusík ve formě  $\text{NO}_3$  a  $\text{NH}_4^+$  a oxid křemičitý jsou obecně považovány za nejvíce kritické živiny při růstu řas a sinic, za určitých okolností můžou omezit růst i jiné složky. Poměr N/P poskytuje informaci o tom, která živina ve vodě je pravděpodobně limitující. Optimální poměr dusíku a fosforu pro růst sinic a řas je 16:1 (Redfield 1958). Oxid křemičitý využívají hlavně rozsivky, které si z něj staví svou frustulu (Wetzel 2001). Některé sinice mají konkurenční výhodu v tom, že dokážou fixovat vzdušný dusík ve specializovaných buňkách, zvaných heterocyty a významně tak ovlivňovat koloběh dusíku v přírodě (např. *Anabaena* nebo *Nostoc*) (Haselkorn 1978).

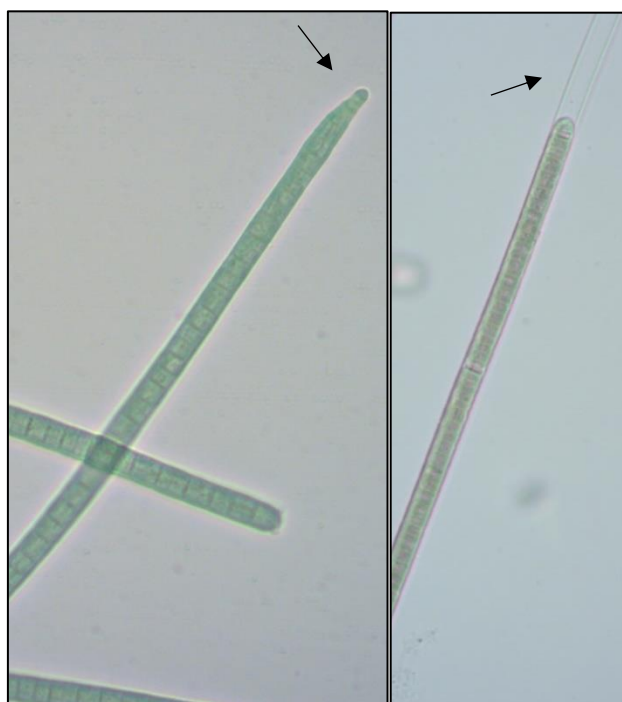
Mnoho studií poskytuje důkazy vlivu spásáčů (grazers) na perifytické řasy a sinice ve fluvialních ekosystémech (Feminella & Hawkins 1995). Mezi spásáče můžeme zařadit např. vodní plže, některé chrostíky a jepice. Tito spásáči mohou snížit biomasu řas a ovlivňovat složení druhů, růstových forem a obsah živin (Allan & Castillo 2007).

Počet bentických druhů sinic, o nichž je známo, že syntetizují cyanotoxiny, se za poslední desetiletí dramaticky zvýšil. I přestože se bentickým druhům dostává méně pozornosti než druhům planktonním, představují v některých částech světa významný problém. Například v Africe, Evropě, Austrálii i v Severní Americe byla úmrť zvířat spojena s neurotoxiny a hepatotoxiny, které produkují sinice (Harland et al. 2013).

#### 4.1 Rod *Phormidium*

*Phormidium* je vláknitá nevětvená sinice, která nevytváří žádné specializované buňky, jako jsou akinety nebo heterocyty. Vlákná jsou protáhlá, většinou velmi dlouhá, šířka vlákna obvykle od 2,5 do 11  $\mu\text{m}$ , různě zakřivená a zúžená, pohybující se, spíše se vyskytující v shlucích než samostatně. Buňky jsou kratší než delší nebo izodiametrické, aerotopy se u tohoto rodu nevyskytují. Apikální buňky mohou být různě utvářeny – zašpičatělé, zakulacené, zaoblené, zúžené. Někdy je vnější stěna apikální buňky tlustší než ostatní, označuje se jako kalyptra a má svůj taxonomický význam (Obr. 3). Typické zbarvení vláken je modrozelené, ale může se vyskytnout i nahnědlé či nafialovělé. Rozmnožují se jako ostatní vláknité sinice pomocí fragmentace vláken, přičemž vznikají typické útvary zvané hormogonie, které se oddělují pomocí nekrotických buněk od mateřského vlákna a dorůstají do nového vlákna (Anagnostidis & Komárek 1985, Komárek & Anagnostidis 2005, Palinska et al. 2011)

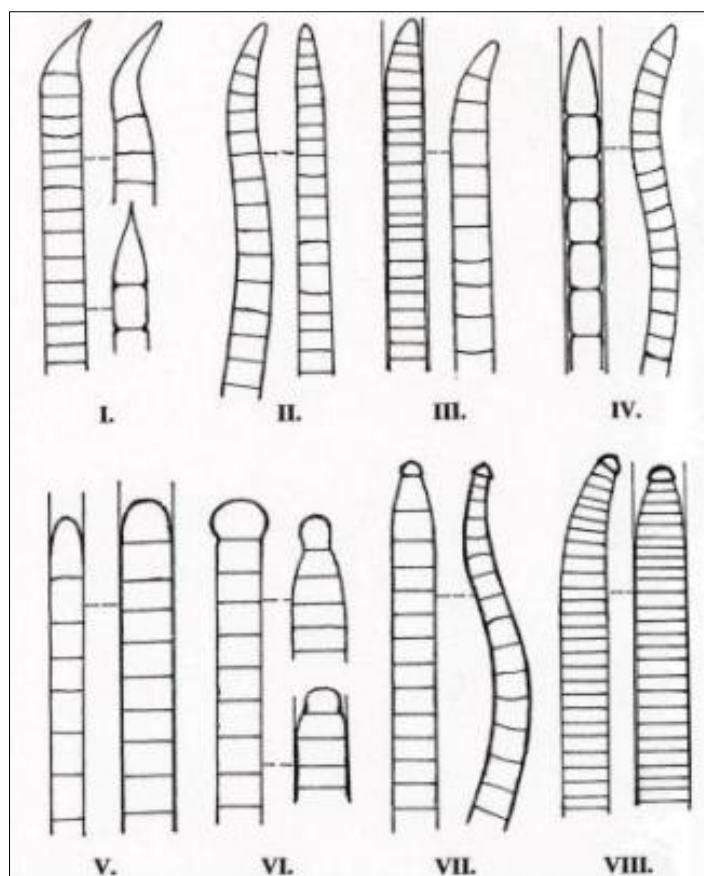
Vláknko může být obaleno tzv. slizovou pochvou (Obr. 3), která je bezbarvá, tenká, obsahující vždy jen jeden trichom. Vyskytuje se fakultativně a slouží jako ochrana před vysycháním. Navíc udržuje vlákna jedné populace propletené a tím vytváří typické shluky, které můžeme nalézt ve vodě či na souši jako makroskopické povlaky i několik cm velké (Palinska et al. 2011).



Obr. 3.: Příklad fotografií *Phormidium* sp. pod mikroskopem, na konci vlákna viditelná kalyptra (vlevo) a slizová pochva (vpravo)

Z hlediska taxonomie řadíme sinice rodu *Phormidium* do řádu Oscillatoriales a čeledi Oscillatoriaceae. Pro sinice z tohoto řádu je výchozí publikací Gomont (1892). V současnosti obsahuje více než 200 druhů jak ze sladkovodního prostředí, tak mořského i suchozemského. A stále nové rody i druhy se objevují hlavně díky molekulárním analýzám genu 16S rRNA. V posledních letech byly z rodu *Phormidium* některé druhy přesunuty do stávajících nebo odštěpeny do nových rodů, např. *Microcoleus*, *Ammassolinea*, *Kamptonema* nebo *Wilmottia*. Z morfologických znaků je důležité pro identifikaci přítomnost či absence kalyptry a slizové pochvy, zúžení vlákna směrem ke konci, tvar apikální buňky a poměr šířky a délky buněk vlákna (Chatchawan et al. 2012).

Pro lepší charakterizaci a identifikaci rozdělili Anagnostidis & Komárek (2005) tento rod do osmi skupin na základě morfologie vláken (viz obr 4.). Jde především o přítomnost či absenci slizové pochvy a kalyptry, tvaru konce vlákna (zúžené dlouze či krátce, zaoblené, zašpičatělé) a tvaru buněk (izodiametrické, kratší než delší).



Obr. 4: Rozdělení do osmi skupin na základě morfologie, podle Komárek & Anagnostidis (2005).



*Phormidium* je kosmopolitní rod, často dominuje v bentosu na dně stojatých i tekoucích vod a na povrchu půd, kde vytváří typické makroskopicky pozorovatelné zelené povlaky (Obr. 5). Vyskytuje se společně s dalšími mikroorganismy, jako jsou bakterie, rozsivky nebo zelené řasy (Wood et al. 2012). Existuje však málo znalostí o tom, jak se mění mikrobiální společenství v biofilmech, kde je dominantní *Phormidium*, např. Brasell et al. (2014). Hraje také důležitou roli v Arktických a Antarktických ekosystémech jako primární producent (Strunecký, Elster & Komárek 2010).



Obr. 5: Fotografie povlaku sinic a řas na břehu Tichovského potoka.

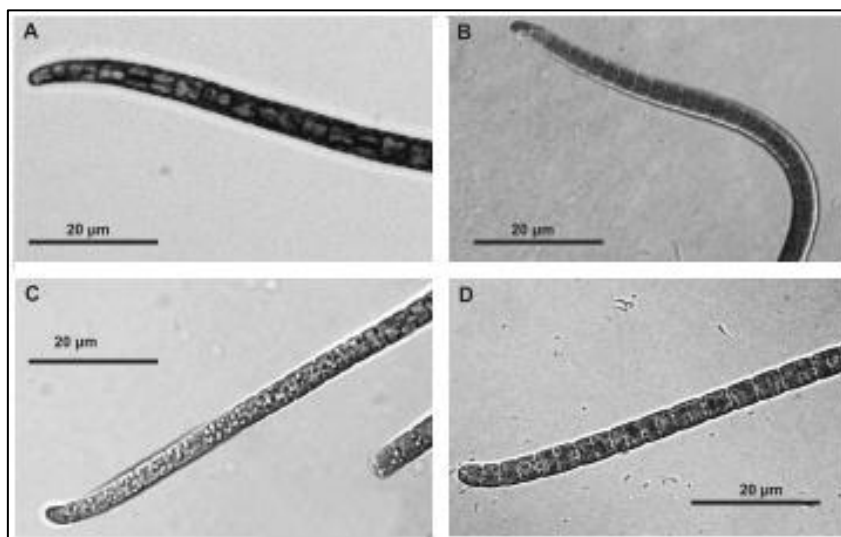
V současné době se pozornost věnuje i toxinům, které tento rod produkuje. Běžným druhem, který produkuje anatoxiny je *Phormidium autumnale* (*Microcoleus autumnalis*) podle nové klasifikace (Strunecký et al. 2013). Například na Novém Zélandu způsobil tento druh během posledního desetiletí četné otravy psů. Představuje významné zdravotní riziko pro člověka, tam, kde jsou řeky hojně využívány pro rekreaci a zásobování pitnou vodou (Wood et al. 2007).



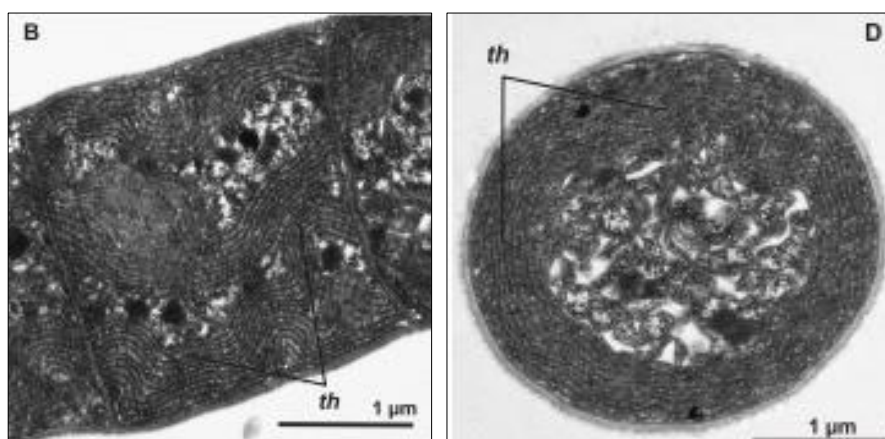
#### 4.1 Kmeny odvozené od rodu *Phormidium*

##### *Kamptonema* (Strunecký et al. 2014)

Na základě morfologie a molekulární analýzy genu 16S rRNA byl odštěpen nový rod pojmenovaný *Kamptonema*. Vytváří podobná vlákna jako rod *Phormidium* a jemu podobné rody, ale lze jej rozlišit podle absence kalyptry a ve většině případů i slizové pochvy (Obr. 6). Vlákna mohou být samostatná nebo mohou vytvářet kolonie. Vlákno se nejčastěji zužuje a ohýbá buď po delší části vlákna nebo po kratší. Apikální buňky mohou být zaoblené nebo zašpičatělé, vždy bez kalyptry. Charakteristické jsou tylakoidy, které zaujímají velkou část buňky a můžou být uloženy centrálně, ale i na vnitřní straně buněk (Obr. 7) (Strunecký et al. 2014).



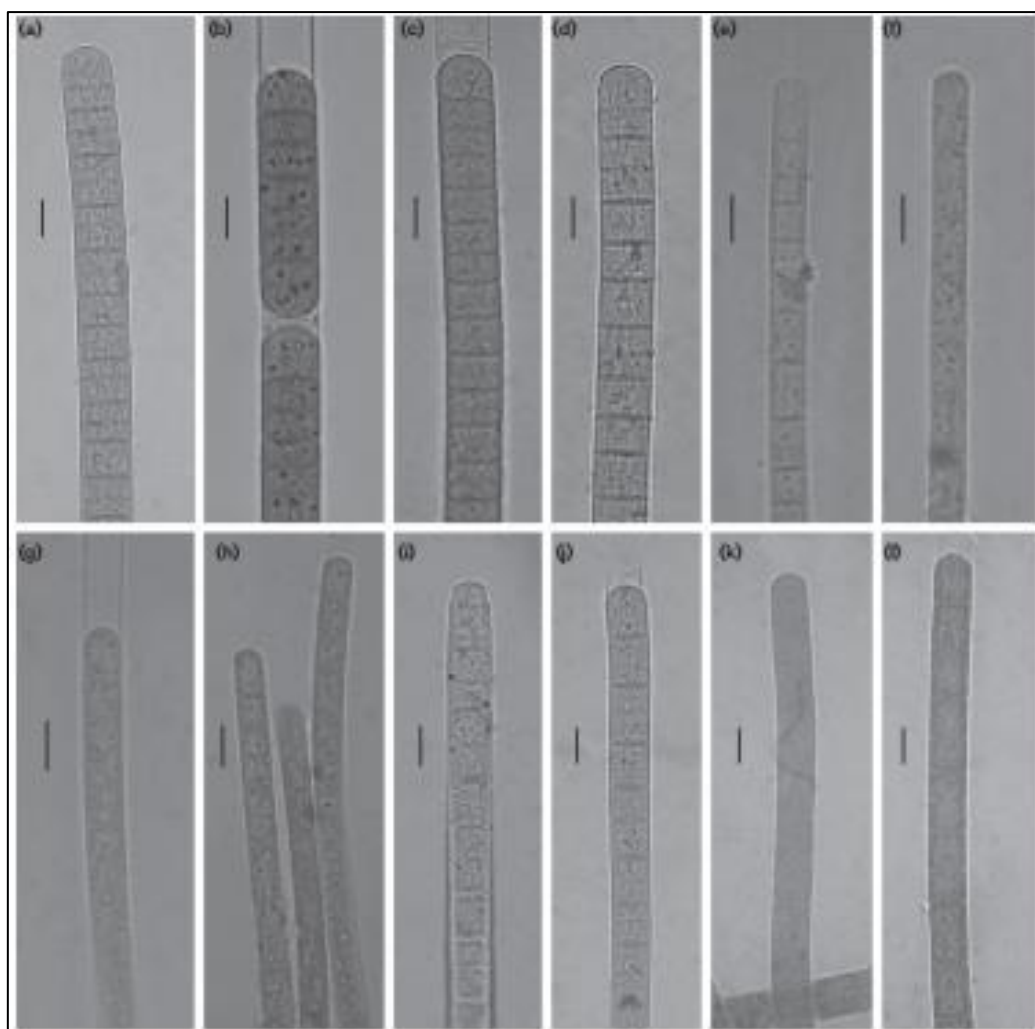
Obr. 6: Fotografie vláken rodu *Kamptonema*, podle Strunecký et al. (2014). Měřítko 20 µm.



Obr. 7: Podélný a příčný řez vlákna rodu *Kamptonema*, charakteristická pozice tylakoidů (th), ribozomy jsou viditelné jako černé tečky, podle Strunecký et al. (2014). Měřítko 1 µm.

### ***Potamolinea* (Martins & Branco 2016)**

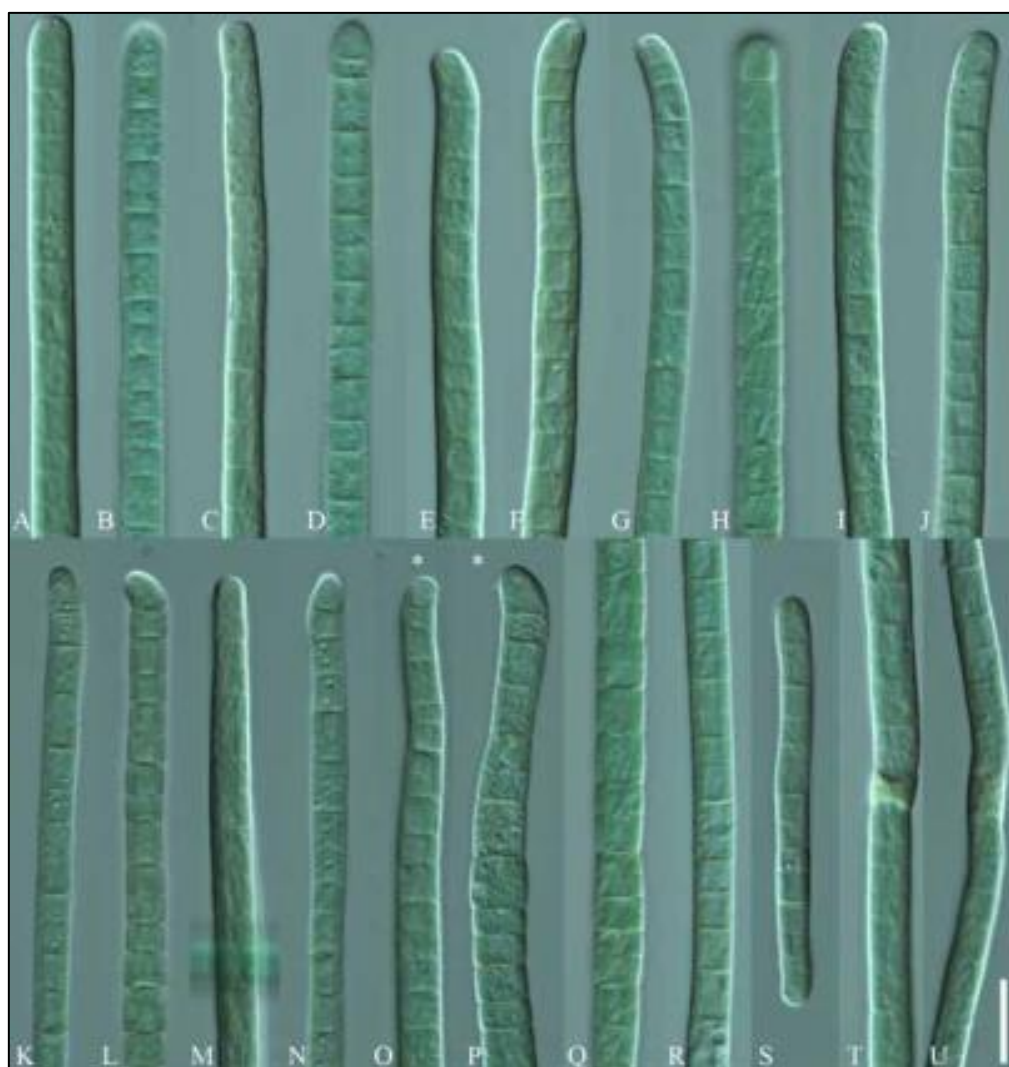
Na základě molekulárních analýz genu 16S rRNA, ale i oblastí ITS (internal transcribed spacer) byl popsán nový rod *Potamolinea*, pod který spadají tři druhy: *P. magna*, *P. aerugineo-caerulea* a *Potamolinea* sp. (Obr. 8), které lze mezi sebou morfologicky rozlišit na základě obsahu buněk a tvaru apikálních buněk. Jejich stélka je většinou přichycena k substrátu, slizovitá, modrozelená. Vlákna jsou hustě zapletena do sebe, pohyblivá. Slizová pochva fakultativní, pevná, tenká, připevněna k trichomům. Trichomy válcovité po celé své délce, nezužující směrem ke konci, široké 6-16,8  $\mu\text{m}$ . Buňky izodiametrické nebo kratší či delší než širší, viditelné granule. Heterocyty a akinety chybí. Reprodukce probíhá rozpadem trichomů pomocí nekrotických buněk (Martins & Branco 2016).



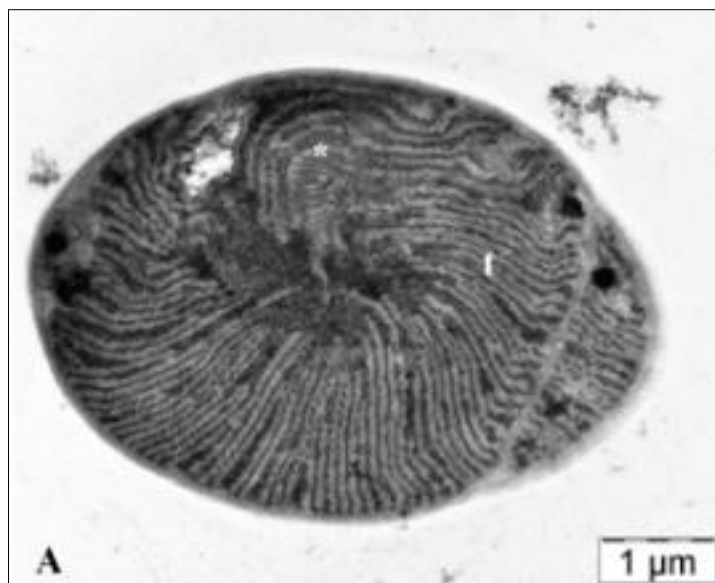
Obr. 8: Fotografie vláken rodu *Potamolinea*: (a-d) *P. magna*, (e-h) *P. aerugineo-caerulea*, (i-l) *Potamolinea* sp. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .

### ***Ammasolinea* (Hašler et al. 2014)**

Nový rod byl odvozen jak na základě morfologických znaků, tak i pomocí analýzy genu 16S rRNA. Trichomy mohou být samostatné nebo tvoří až makroskopicky viditelné kolonie, trichomy nejčastěji rovné nebo mírně zahnuté, vždy bez slizové pochvy, více či méně se zužující ke konci trichomu, zaoblené, bez kalyptry (Obr. 9). Buňky kratší nebo delší než širší a mají uvnitř typické diagonální uspořádání tylakoidů po celé buňce, díky nimž jsou dobře rozlišitelné od rodu *Phormidium*, který je má parietálně nebo radiálně umístěné (Obr. 10). Trichomy se dělí prostřednictvím hormogonií, které vznikají za pomoci nekrotických buněk (Hašler et al. 2014).



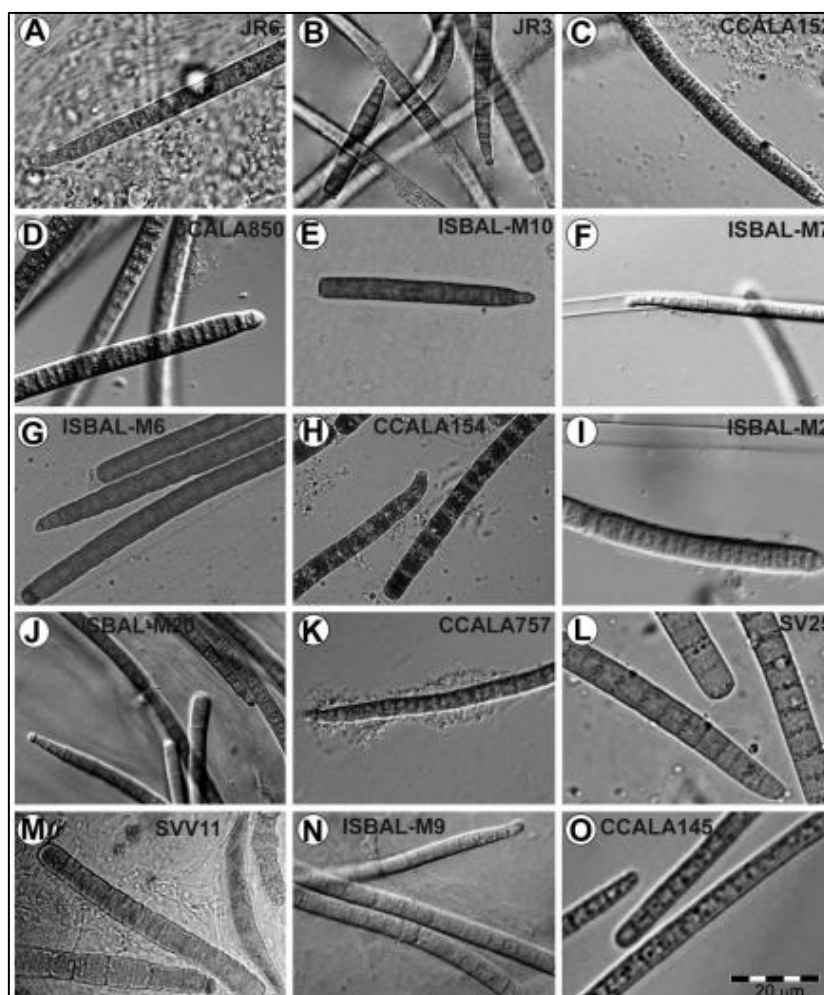
Obr. 9: Zachycená variabilita trichomů druhu *Ammasolinea attenuata* (holotyp) (A-R). Na fotografii viditelné hormogonium (S) a tvorba nekrotických buněk (T-U), podle Hašler et al. (2014). Měřítko 10  $\mu$ m.



Obr. 10: Příčný řez druhu *Ammasolinea attenuata* s viditelným diagonálním uspořádáním tylakoidů po celé buňce, podle Hašler et al. (2014). Měřítko 1  $\mu\text{m}$ .

### *Microcoleus* (Strunecký et al. 2013)

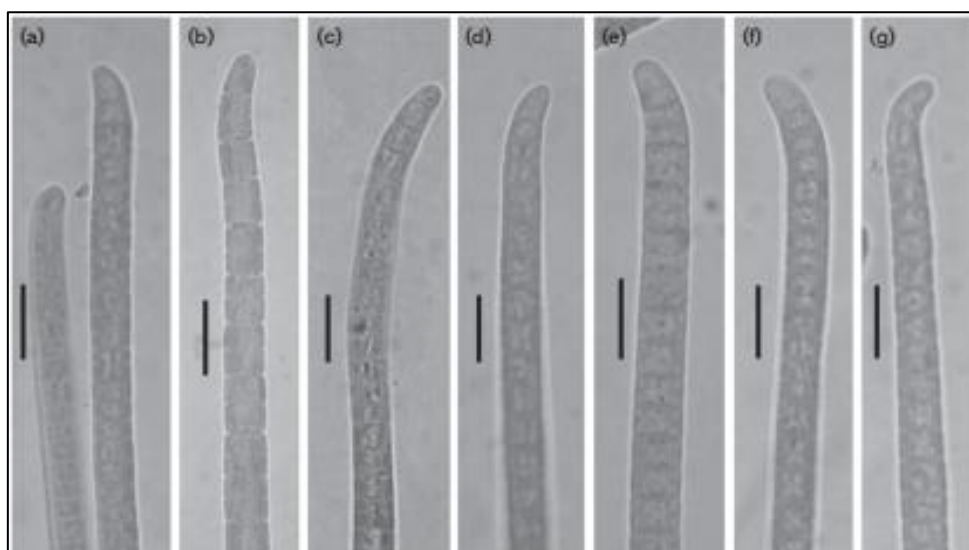
Rod *Microcoleus* je vláknitá sinice, která patří do čeledi Microcoleaceae. V minulosti byla několikrát potvrzena pomocí polyfázového přístupu podobnost druhu *Microcoleus vaginatus* a *Phormidium autumnale*, např. Drouet (1962). Vlákná jsou samostatná nebo mohou tvořit nepravidelné kolonie. Trichomy jsou pohyblivé, typicky se vyskytuje větší počet trichomů v jedné bezbarvé slizové pochvě, většinou se ke konci zužují, jsou zakončené kalyptrou (Obr. 11) nebo zakulacenými apikálními buňkami. Šířka vláken je kolem 4-8  $\mu\text{m}$ . Buňky izodiametrické nebo o něco až dvakrát delší než širší. Reprodukce probíhá pomocí nekrotických buněk, díky nimž vznikají hormogonie, které poté dorostou do velikosti mateřské buňky (Strunecký et al. 2013).



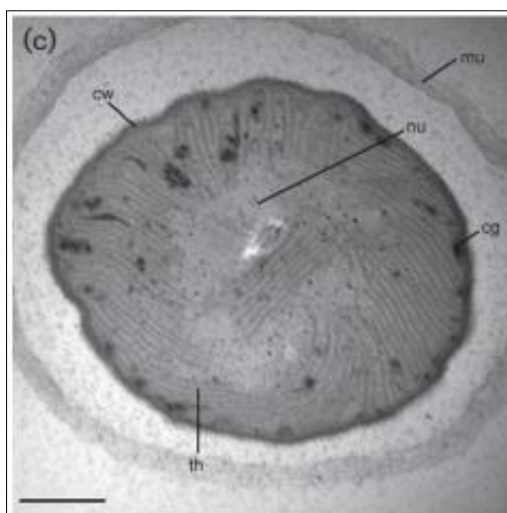
Obr. 11: Morfologie vláken typického druhu (lektotypu) *Microcoleus vaginatus* s viditelnými slizovými pochvami (F, I) a kalyptrami (B, E, J, K, N) podle Strunecký et al. (2013). Měřítko 20  $\mu\text{m}$ .

### *Ancylothrrix* (Martins et al. 2016)

Tento nově vzniklý rod zahrnuje zatím dva popsané druhy (*A. rivularis* a *A. terrestris*), které byly odvozeny na základě morfologických znaků, ale i molekulárních analýz genu 16S rRNA a oblasti ITS. Vyznačují se trichomy, které jsou často bez viditelných slizových pochev, ke konci se zužují, široké kolem 4-7  $\mu\text{m}$ . Apikální buňky bez kalyptry, zakulacené (Obr. 12). Obsah buňky je modrozelený, heterogenní, někdy s viditelnou nukleoplazmou a granulema (Obr. 13). Reprodukce probíhá rozpadem trichomů na hormogonie (Martins et al. 2016).



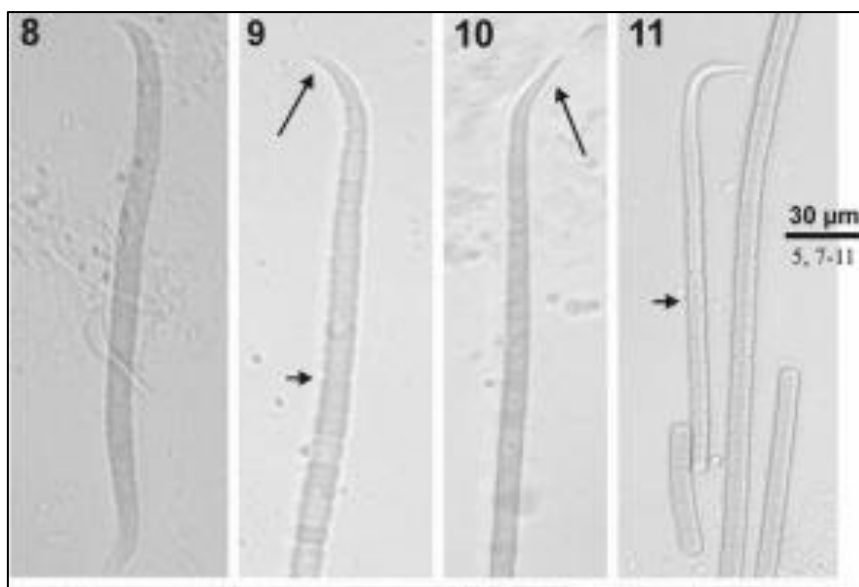
Obr. 12: Fotografie sedmi kmenů rodu *Ancylothrrix* – (a-c) *A. rivularis*, (d-g) *A. terrestris*, podle Martins et al. (2016). Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



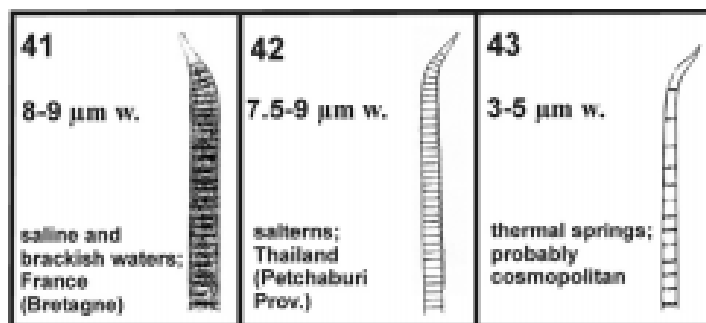
Obr. 13: Příčný řez vlákna rodu *Ancylothrrix* – viditelné tylakoidy (th), slizová pochva (mu), nukleoplazma (nu), buněčná stěna (cw) a granula (cg), podle Martins et al. (2016). Měřítko 1  $\mu\text{m}$ .

### *Oxynema* (Chatchawan et al. 2012)

Podle Chatchawan et al. (2012) rod *Oxynema* zahrnuje 3 druhy – *O. thaianum*, *O. acuminatum* a *O. lloydianum*, které byly odštěpeny z rodu *Phormidium*, konkrétně ze skupiny I. podle Komárek & Anagnostidis (2005). Tato skupina se vyskytuje v halofilním prostředí a má typickou nezaměnitelnou morfologii. Vlákná vytváří modrozelenou stélku až černozelelou, slizová pochva se vyskytuje zřídka a je nepatrně viditelná pod světelným mikroskopem. Trichomy jsou dlouhé, zúžené, u konce krátce ohnuté, apikální buňky protáhlejší a ostře špičaté (Obr. 14), vždy bez kalyptry. Buňky většinou kratší než širší, 2,2-3  $\mu\text{m}$  dlouhé, zřídka izodiametrické. Tylakoidy mají uspořádány radiálně a nepravidelně v buňkách. Druhy se navzájem liší podle zúžení na příčných stěnách, přítomnosti slizové pochvy a délky buněk (Obr. 15).



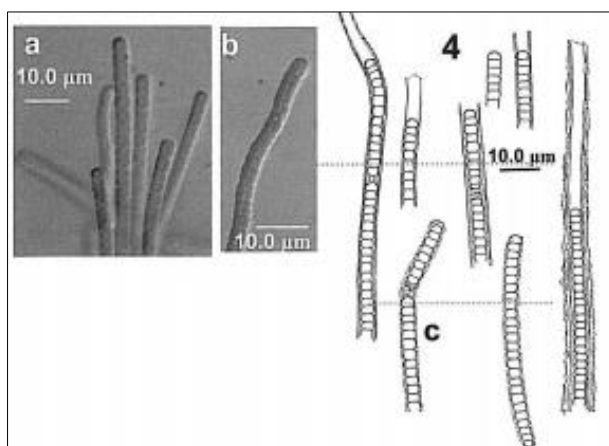
Obr. 14: Fotografie zachycující typickou morfologii konců vláken druhu *Oxynema thaianum*, podle Chatchawan et al. (2012). Měřítka 30  $\mu\text{m}$ .



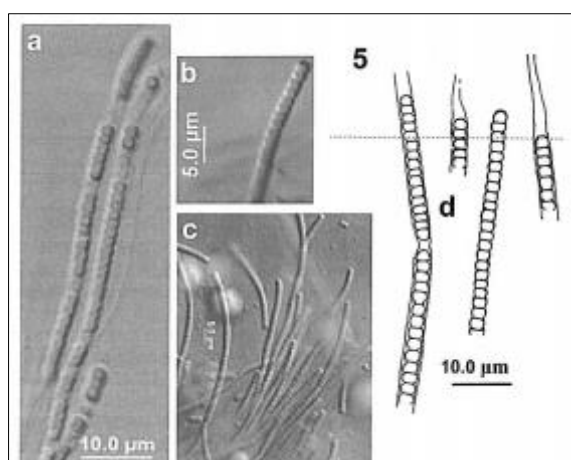
Obr. 15: Srovnání morfologie druhů: 41. *Oxynema lloydianum*, 42. *Oxynema thaianum*, 43. *Oxynema acuminatum*, podle Chatchawan et al. (2012).

### ***Phormidesmis* (Turicchia et al. 2009)**

*Phormidesmis* byl původně zařazován do rodu *Phormidium* kvůli podobným morfologickým znakům. Trichomy nevytváří akinety ani heterocyty, vlákna se nevětví, obvykle je přítomna slizová pochva, která je tenká a bezbarvá a obsahuje většinou jedno vlákno, zřídka 2-3. Šířka vlákna je nejčastěji 2,5-4  $\mu\text{m}$ . Buňky jsou často izodiametrické, ale můžou být delší nebo kratší než širší. Apikální buňky jsou podobné vegetativním buňkám, zakulacené a nikdy nevytváří kalyptru. Tylakoidy jsou v buňce uspořádány pravidelně. Komárek et al. (2009) popsali dva druhy – *P. molle* (Obr. 16) a *P. priestleyi* (Obr. 17), které se liší z hlediska ekologie. *P. molle* obývá tropické oblasti, např. roste jako perifyton či metafyton v litorálu jezer a v rýžových polích, může vytvářet plovoucí povlaky na hladině. Naproti tomu druh *P. priestleyi* je sice morfologicky velmi podobný předchozímu druhu, ale vyskytuje se v epilitoru rychle tekoucí vod při pobřeží Antarktidy (Komárek et al. 2009).



Obr. 16: Typická morfologie vláken druhu *Phormidesmis molle*, podle Turicchia et al. (2009). Měřítka 10  $\mu\text{m}$ .



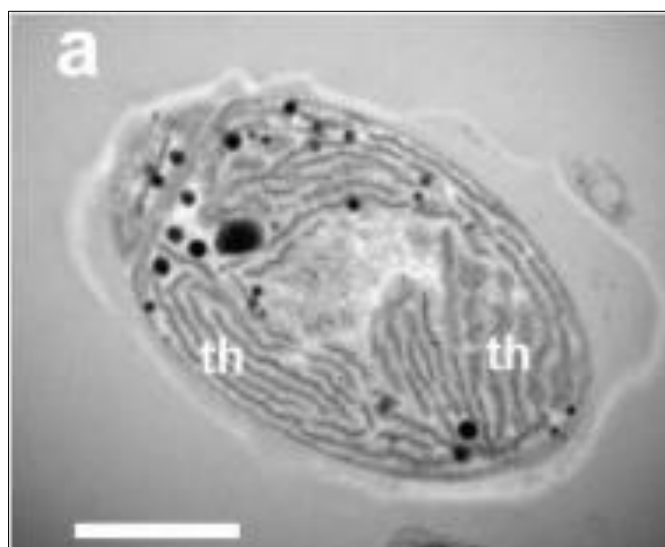
Obr. 17: Typická morfologie vláken druhu *Phormidesmis priestleyi*, podle Komárek et al. (2009). Měřítka 10  $\mu\text{m}$ .



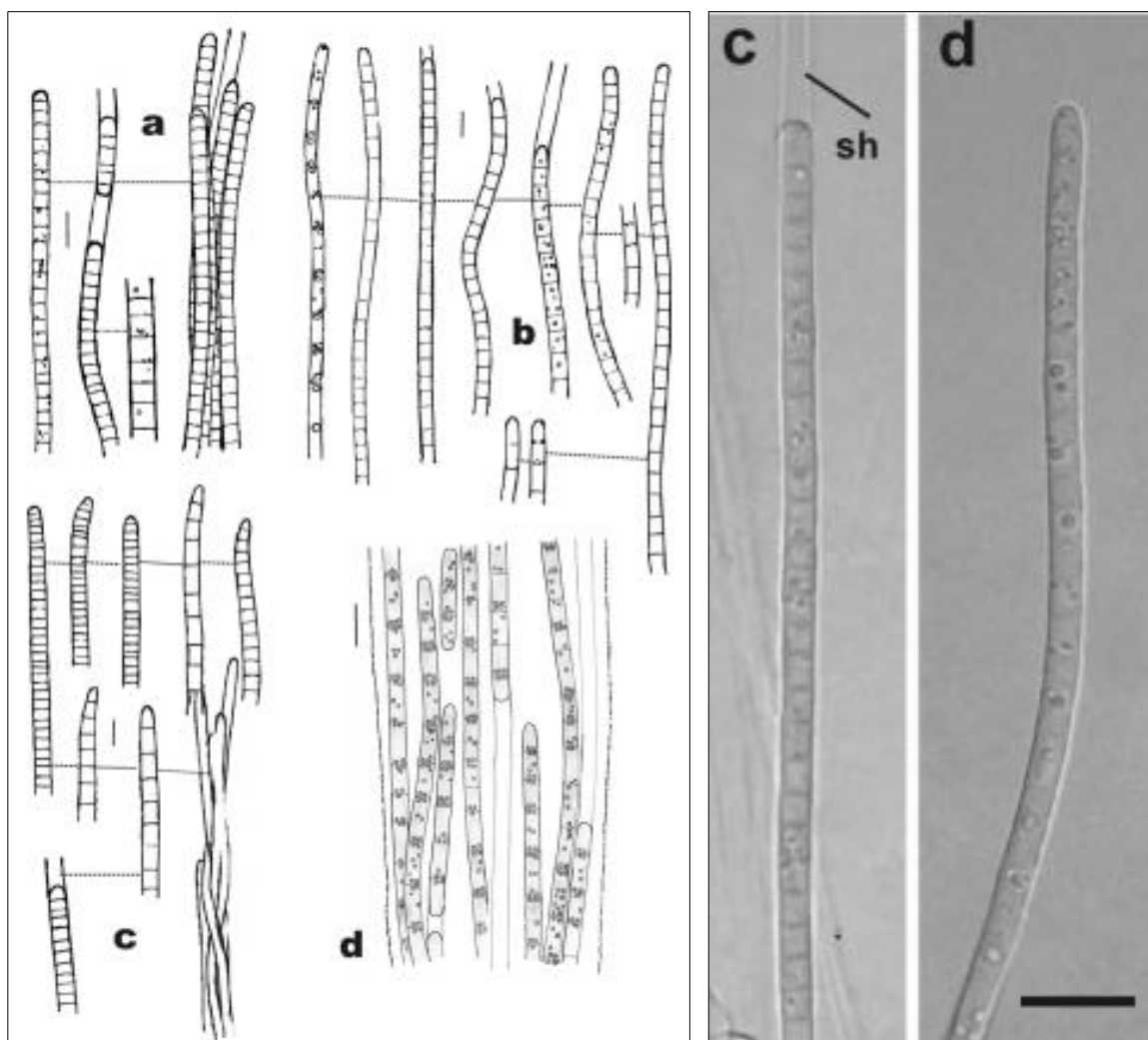
### ***Wilmottia* (Strunecký et al. 2011)**

Rod *Wilmottia* byl dříve zařazován do rodu *Phormidium* a *Microcoelus* i přes to, že je od nich dobře rozlišitelný na základě morfologie a velikosti vláken – má užší trichomy, nezužující se konce vláken, absence kalyptry a absence zúžení u příčných stěn. Taky se liší umístěním tylakoidů, které se vyskytují v buňce po obvodu buněčné stěny (Obr. 18). Typicky vytváří buď samostatná vlákna nebo je dohromady několik paralelně uspořádaných vláken ve slizu – celý shluk může mít šířku až 50  $\mu\text{m}$ . Trichomy mohou vytvářet slizové pochvy, které jsou pevné a bezbarvé, na konci otevřené (Obr. 19). Buňky nejčastěji izodiametrické, modrozelené, homogenní, všechny vegetativní buňky jsou schopny se dělit, pomocí dělení za vzniku segmentů, bez tvorby nekrotických buněk (Strunecký et al. 2011).

Z dříve popsánoho druhu *Phormidium murrayi* byl odvozen druh *Wilmottia murrayi*. Z fylogenetického hlediska má nejblíže k rodu *Geitlerinema* (Strunecký et al. 2011). Poté byly popsány ještě dva druhy na základě molekulárních metod – *Wilmottia stricta* (Machado-de-Lima et al. 2017) a *Wilmottia koreana* (Lee et al. 2020).



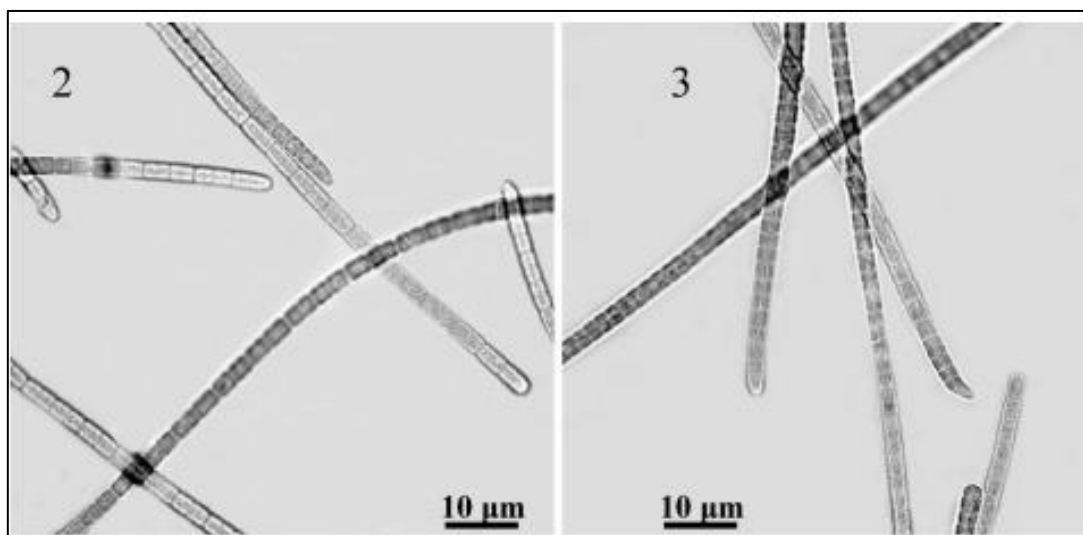
Obr. 18: Typická struktura tylakoidů v příčném řezu vlákna druhu *Wilmottia murrayi*, podle Strunecký et al. (2011). Měřítko 2  $\mu\text{m}$ , th – tylakoidy.



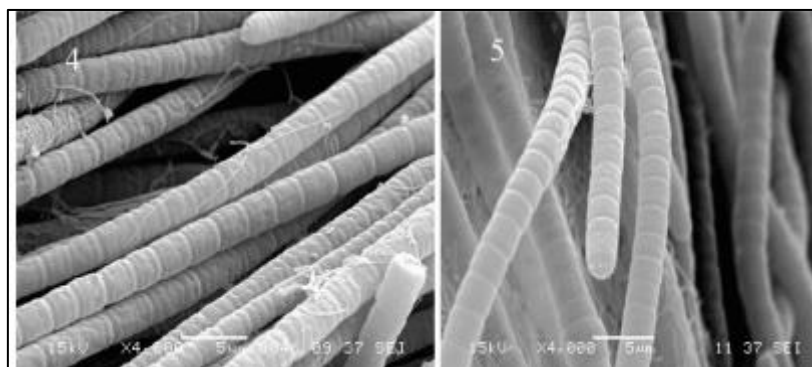
Obr. 19: Kresba (vlevo) a fotografie (vpravo) druhu *Wilmottia murrayi* z různých lokalit, podle Strunecký et al. (2011). Měřítko 20  $\mu\text{m}$ , sh – slizová pochva

### ***Roseofilum* (Casamatta et al. 2012)**

Tento nový rod byl popsán na základě fylogenetických analýz z rodu *Phormidium*, konkrétně z druhu *Phormidium corallyticum*, který byl objeven jako rostoucí epifyt na korálech v Karibiku, Indo-Pacifiku a v Rudém moři. Vlákná jsou většinou samostatná, s jedním trichomem ve slizové pochvě, která je tenká a bezbarvá (Obr. 20). Trichomy jsou pohyblivé, mírně zúžené. Buňky izodiametrické nebo delší než širší, s radiálně umístěnými tylakoidy. Popsaný druh *Roseofilum reptotaenium* (Obr. 21) vytváří černé povlaky přirostlé ke korálu až několik cm široké a 1 mm vysoké, vlákna široká 3-3,9  $\mu\text{m}$ , nezužující se ke konci, s jedním zaobleným koncem a s jedním kuželovitým. Buňky hnědavě červené, kratší než širší až izodiametrické, dlouhé 2,5-4  $\mu\text{m}$ . Nevytváří typické nekrotické buňky (Casamatta et al. 2012).



Obr. 20: Fotografie rodu *Roseofilum* sp., podle Casamatta et al. (2012). Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



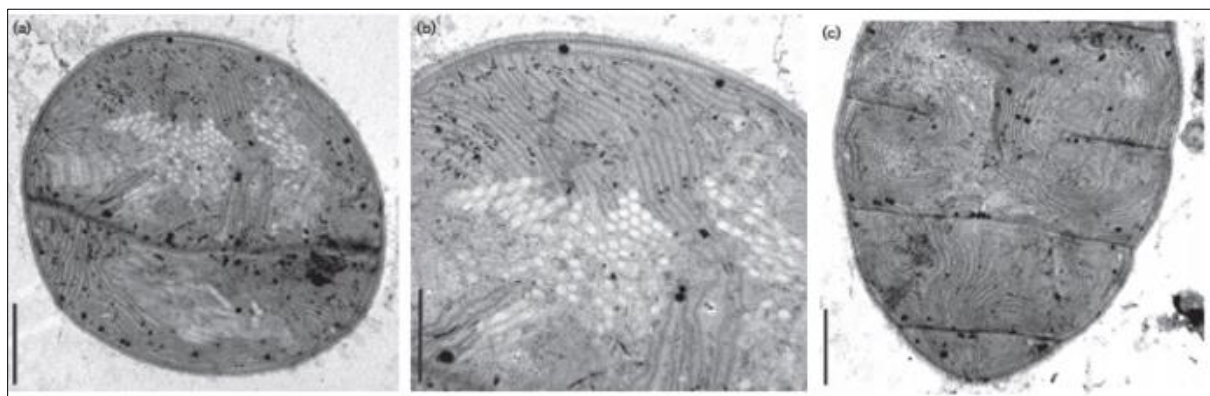
Obr. 21: Fotografie druhu *Roseofilum reptotaenium* vytvořená pomocí elektronového mikroskopu, podle Casamatta et al. (2012). Měřítko 5  $\mu\text{m}$ .

### ***Cephalothrix* (Malone et al. 2015)**

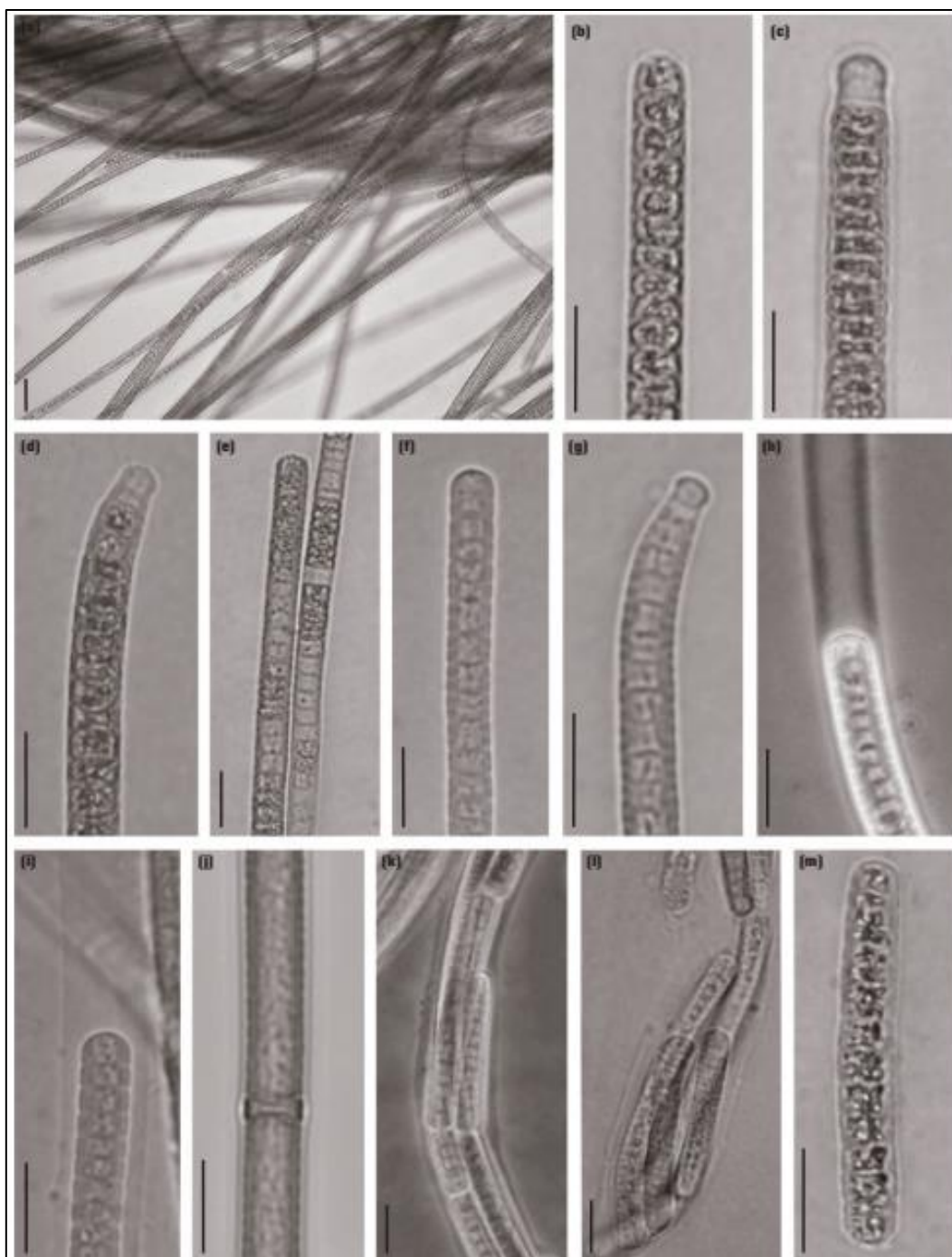
Původně brazilské kmeny byly řazeny do rodu *Phormidium*, ale po detailním srovnáním jejich morfologie a molekulárních analýz byl odštěpen nový rod *Cephalothrix*. Na základě fylogenetické analýzy založené na sekvenování genu 16S rRNA byly popsány dva druhy – *Cephalothrix komarekiana* a *Cephalothrix lacustris*.

Oba druhy mají rovné trichomy, mírně zužující ke konci, někdy ohnuté, často přítomna pevná slizová pochva, která může být buď přilnuta k trichomu, nebo je širší. Buňky jsou širší než delší (2-3,4  $\mu\text{m}$  dlouhé, 4,2-6,5  $\mu\text{m}$  široké), obsah buněk heterogenní s viditelnými aerotopy (Obr. 23). Apikální buňka může mít dobře vyvinutou kalyptru. Tvorba hormogonií probíhá pomocí nekrotických buněk. Tylakoidy jsou radiálně umístěné v buňce (Obr. 22).

Zajímavostí je jejich životní cyklus. V počátečním stádiu mají trichomy aerotopy, ale nevytváří slizové pochvy (Obr. 23 a, b). Po zhruba 6 dnech se začaly ztrácet aerotopy (Obr. 23 e) a vytvářeli se slizové pochvy (Obr. 23 h), které se poté rozšířily (Obr. 23 i) a trichomy se pomocí nekrotických buněk (Obr. 23 j) rozdělili na hormogonie (Obr. 23 k, l) a ty byly uvolněny ze slizové pochvy a začali vytvářet opět aerotopy (Obr. 23 m). Tento cyklus naznačuje, že v přírodě mohou přežívat část životního cyklus v planktonu a část v bentosu bez aerotopů a se slizovou pochvou (Malone et al. 2015).



Obr. 22: Fotografie *C. komarekiana* pořízené pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM). (a) Celkový pohled na vegetativní buňku s aerotopy (příčný řez), (b) detail aerotopů, (c) radiálně uspořádané tylakoidy (podélný řez), podle (Malone et al. 2015). Měřítka (a, c) 1  $\mu\text{m}$ , (b) 0,5  $\mu\text{m}$ .



Obr. 23: Druh *Cephalothrix komarekiana* (a) trichomy s aerotopy a bez slizové pochvy (iniciální stádium), (b-d) vyvinuté apikální buňky, (e) trichomy s viditelnými aerotopy, (f) trichomy bez aerotopů, (g) apikální buňka plně vyvinuta, (h-i) detail slizové pochvy, (j) detail nekrotických buněk, (k-l) formující se hormogonie, (m) hormogonie s vyvinutými aerotopy, podle Malone et al. (2015). Měřítka (a) 20  $\mu\text{m}$ , (b-m) 10  $\mu\text{m}$ .



## METODIKA

### 1. POPIS STUDOVANÉHO ÚZEMÍ

#### 1.1 Vizovická vrchovina a Přírodní park Vizovické vrchy

Velkou část jihovýchodní Moravy pokrývají kopce Vizovické vrchoviny (Obr. 24), které jsou součástí geomorfologického celku Slovensko-moravských Karpat a subprovincie Vnější Západní Karpaty, které se táhnou od Rakouska, přes Česko a Slovensko až do Polska. Na východě se vrchovina stýká s pohořím Javorníky, na jihu s Bílými Karpatami, na severu se Vsetínskými vrchy. Většina oblasti je odvodňována řekou Moravou a část řekou Vlárrou, které spadají do úmoří Černého moře.



Obr. 24: Mapa znázorňující území Vizovické vrchoviny, zdroj: [www.turistika.cz](http://www.turistika.cz).

Vrchovina je součástí tzv. karpatského flyšového pásu. Flyš je podloží, kde se v každé geologické vrstvě střídá pískovec a jílovec. Vrstvy se od sebe liší jak chemicky, tak v procentuálním složení těchto dvou sedimentárních hornin. Mocnost vrstvy je od několika cm až do několika metrů, výjimečně může dosahovat až 1 km (Poprawa & Nemčok 1988).

Chemické složení podzemní vody závisí na složení hornin. Převládají zde slíny (hlavní minerál  $\text{CaCO}_3$ ), jílovce bohaté na vápník, vápenatý pískovec a vápenec. V této geologické oblasti byly nalezeny vysoké koncentrace vápníku, ale také hořčíku, zejména v pramenité vodě. Ve vodě se objevují i zvýšené koncentrace chloridů, síranů a sodíku. Tyto zvýšené koncentrace mají geogenní původ. Vysoká koncentrace síranů je způsobena oxidací pyritu, který je součástí jílovce (Hájek & Hekera 2005).

Vrchovina obsahuje velké množství pramenů, včetně minerálních (např. Vincentka v oblasti Luhačovic). Západokarpatské prameniště jsou nejunikátnější neznečištěná místa na hranici České a Slovenské republiky.

Podnebí je podle průměrných ročních teplot mírně teplé až teplé. Na vyšších vrcholech klesají průměrné roční teploty pod  $7^\circ\text{C}$ . Srážky bývají poměrně vydatné. Vegetaci nižších částí bioregionu tvoří karpatské dubohabřiny, na prudších svazích, kde je kyselejší substrát převládají acidofilní doubravy. Směrem výše přechází do bučin a dále smrčín. Přirozené bezlesí chybí. Nižší polohy typicky tvoří mezofilní luční porosty (psinečkové pastviny, louky s pcháčem potočným), xerofilnější typy jsou vzácné.

Centrem této vrchoviny je Přírodní park Vizovické vrchy (Obr. 25), který leží v okrese Zlín. Rozloha přírodního parku je 13 300 ha. Nejvyšším bodem je kopec Klášťov (753 m). Většinu rozlohy tvoří smrkové monokultury, část zaujímají listnaté stromy s břizami, habry, duby a buky. V nižších polohách převažují hospodářsky využívaná místa jako pole, sady a louky.



Obr. 25: Fotografie východní části Vizovických vrchů, zdroj: [/www.flickr.com/photos/jirka-zapalka/38877093590](https://www.flickr.com/photos/jirka-zapalka/38877093590).

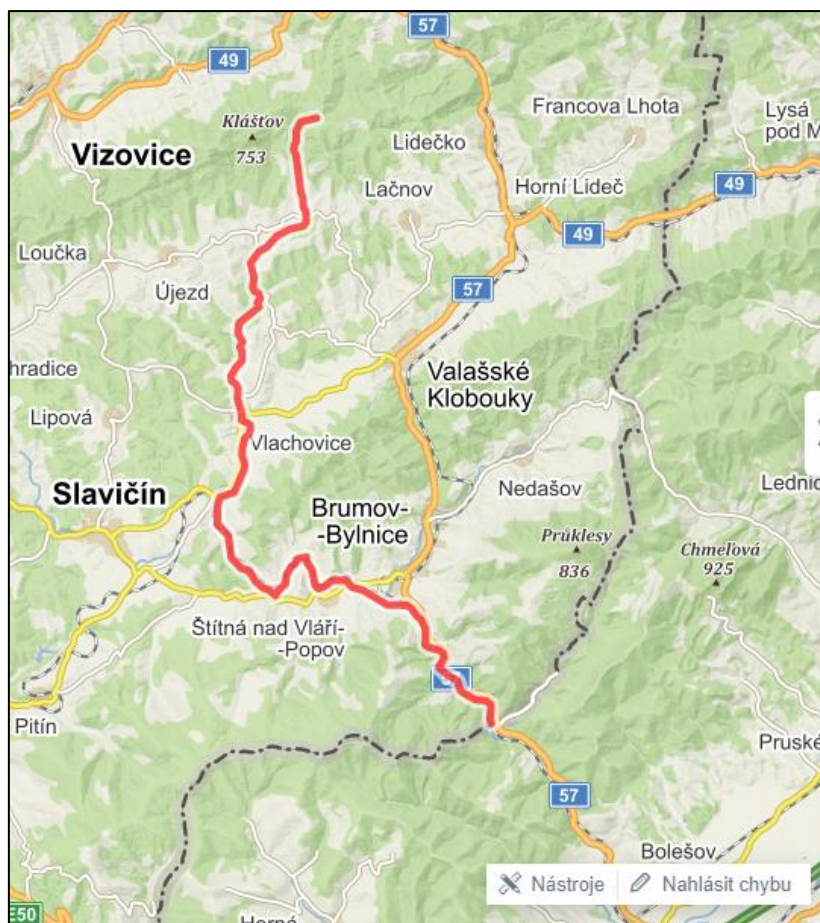


## 1.2 Popis studovaných toků

### Vlára

**GPS pramene: 49.2144011N, 17.9631997E**

Je to významná jihomoravská řeka, která se nepodílí na povodí Moravy nebo Odry. Řeka pramení v jehličnatém lese nedaleko kopce Sverádov a jihovýchodně od vesnice Pozdřechov v nadmořské výšce 650 m n. m. (Příloha 1). První obcí, kterou protéká, jsou Drnovice, poté se koryto u Vysokého Pole rozšiřuje. V těchto místech by měla Vlára v budoucnu vtékat do vodní nádrže Vlachovice, která by měla být dostavěna v roce 2030. Vlára odtéká dále přes Bílé Karpaty až na Slovensko (Obr. 26), kde se vlévá v blízkosti obce Nemšová v nadmořské výšce 219 m n. m. jako pravostranný přítok do řeky Váh. Délka toku je 42,5 km. Průměrný průtok činí 3,2 m<sup>3</sup>/s. Dno řeky v převážné části tvoří štěrk a jíl, v horní části toku také kameny. Vzorky byly odebrány celkem na čtyřech místech. Přímo u pramene, a poté ve vzdálenosti 1 a 2 km od pramene před obcí a další vzorek za obcí Drnovice (Obr. 27).



Obr. 26: Mapa toku řeky Vlára v ČR po hranici SK.



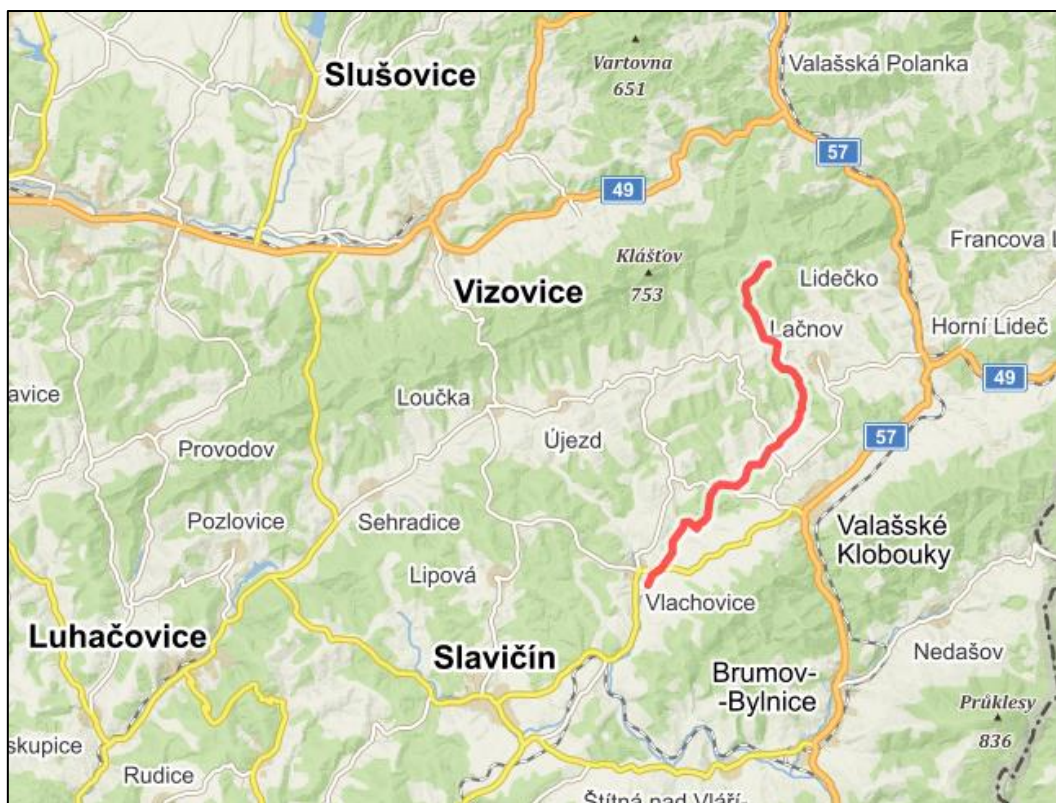


Obr. 27: Detailnější mapa s vyznačenými místy odběru vzorků na řece Vláře.

## Smolinka

**GPS pramene: 49.2090047N, 17.9882364E**

Tento potok pramení v lese jižně nedaleko lokality Vařákovy paseky (Příloha 2) ve Vizovické vrchovině v nadmořské výšce 675 m. První obcí, kterou protéká je vesnice Smolina nedaleko Valašských Klobouk. Potok dále odtéká jižním směrem a tvoří hranici mezi okresy Zlín a Vsetín (Obr. 28). Nedaleko Lačnova protéká přírodní památkou Smolinka a Podskaličí u obce Křekov. Potok v této oblasti přibírá další přítoky z údolí. Toto místo je typické bohatým výskytem šafránu bělokvetého roustoucího přímo u tohoto potoka. Smolinka se vlévá u Vlachovic jako levostranný přítok do Vlára v nadmořské výšce 342 m. Délka toku je 15,3 km. Vzorky byly odebrány celkem na čtyřech místech. Přímo u pramene, a poté ve vzdálenosti 1 a 2 km od pramene před obcí a další vzorek za obcí Smolina (Obr. 29).



Obr. 28.: Mapa toku potoka Smolinka.



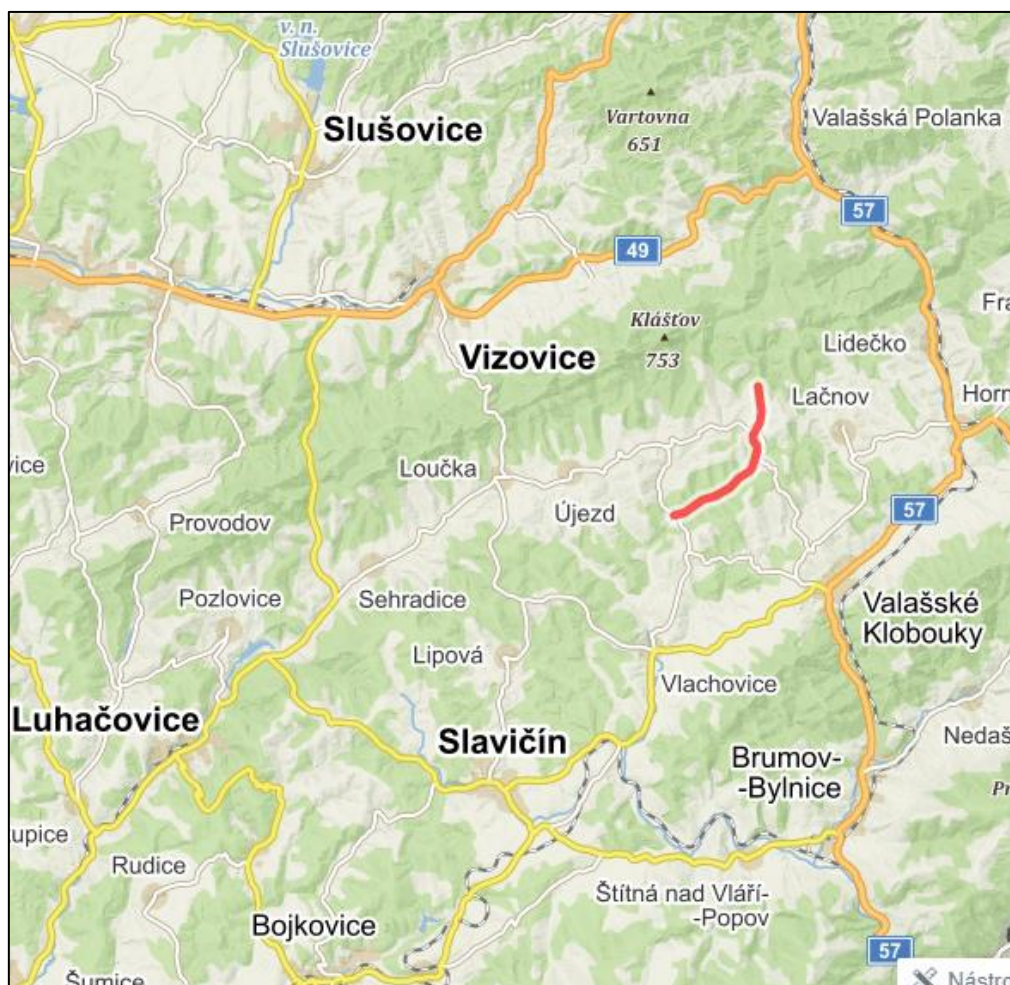
Obr. 29: Detailnější mapa s vyznačenými místy odběru vzorků na potoce Smolinka.



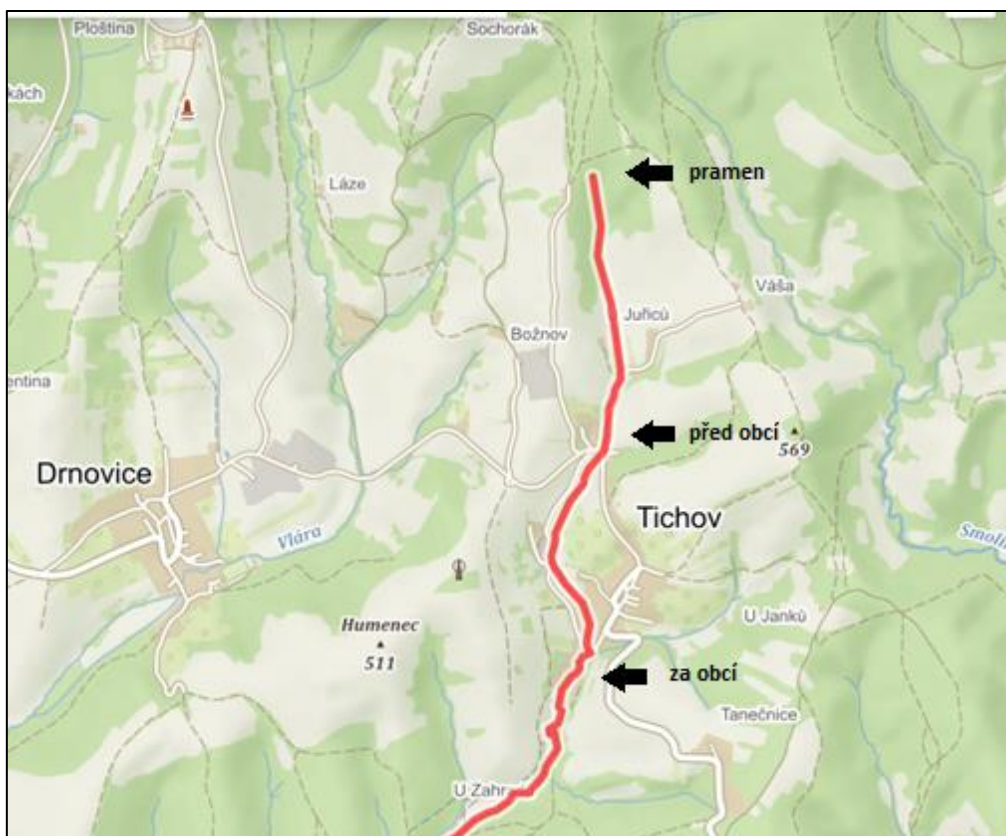
## Tichovský potok

**GPS pramene: 49.1926356N, 17.9809408E**

Tento potok pramení v lese nedaleko obce Tichov, poté touto obcí protéká jihozápadním směrem (Obr. 30). Mezi obcemi Vysoké Pole a Vlachova Lhota se vlévá jako levostranný přítok do řeky Vláry. Délka toku je přibližně 6 km. Vzorky byly odebrány z důvodu krátké délky toku pouze na třech místech. Přímo u pramene, před obcí a další vzorek za obcí Tichov (Obr. 31).



Obr. 30: Mapa toku Tichovského potoka.



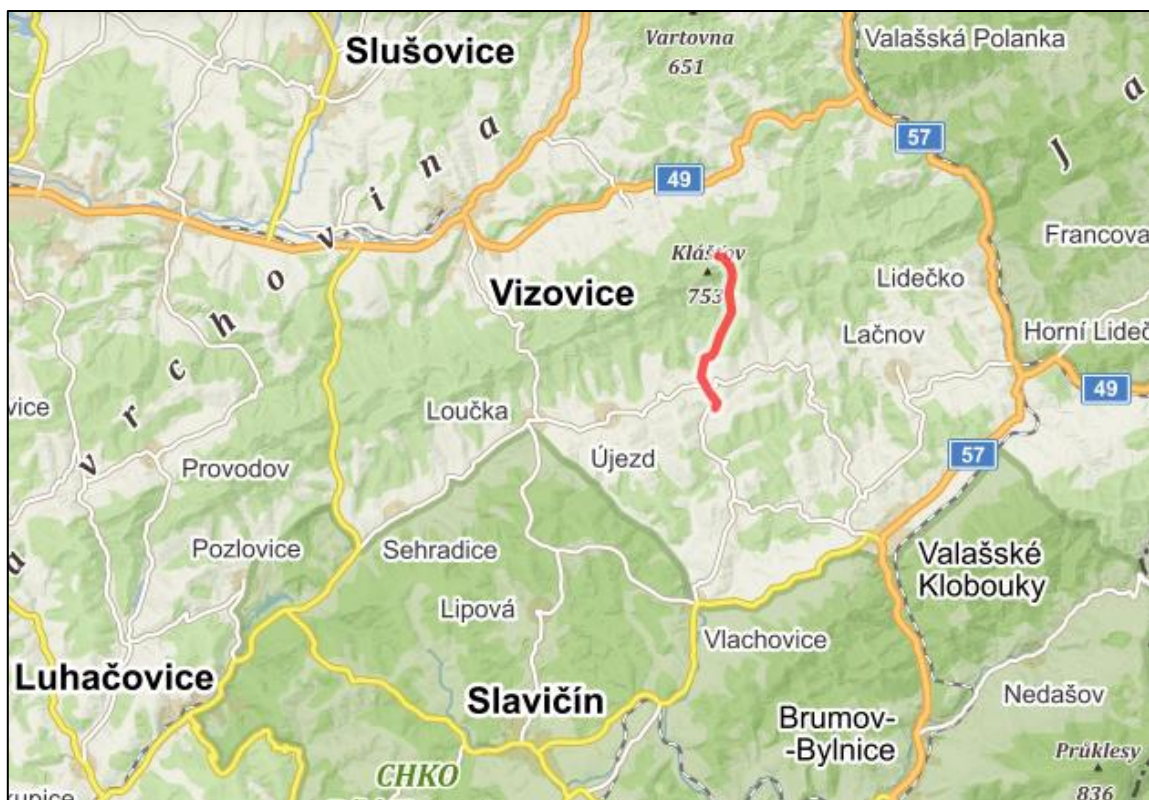
Obr. 31: Detailnější mapa s vyznačenými místy odběru vzorků na Tichovském potoce.

### Vysokopolský potok

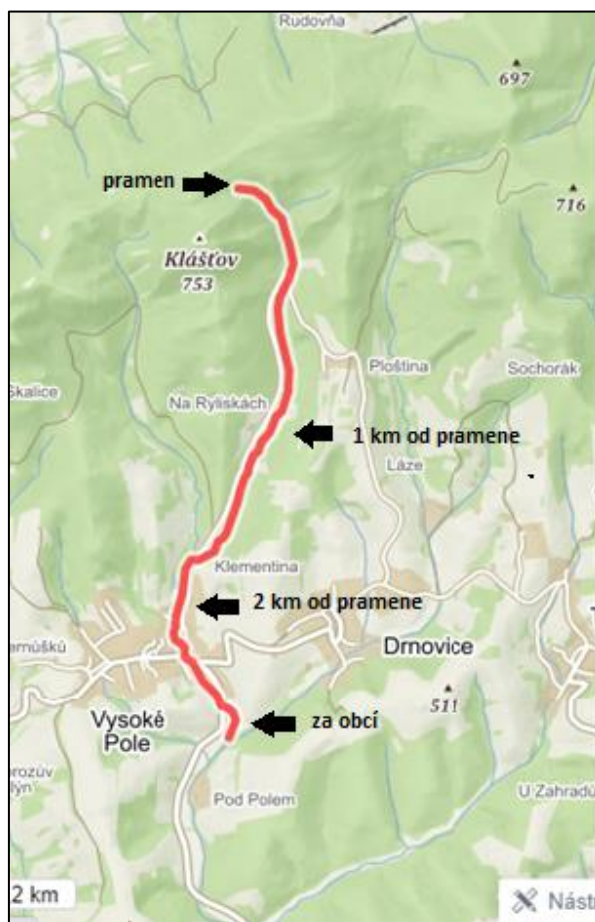
**GPS pramene: 49.2093139N, 17.9478944E**

Potok pramení u kopce Klášťov (753 m n. m.), což je nejvyšší bod Vizovických vrchů (Obr. 32). Poté protéká nedaleko památníku Ploština jižně směrem k obci Vysoké pole. Za touto obcí se vlévá jako pravostranný přítok do řeky Vlára. Délka toku je přibližně 5 km. Vzorky byly odebrány celkem na čtyřech místech. Přímou u pramene a poté ve vzdálenosti 1 a 2 km od pramene před obcí a další vzorek za obcí Vysoké Pole (Obr. 33).





Obr. 32: Mapa toku Vysokopolského potoka.



Obr. 33: Detailnější mapa s vyznačenými místy odběru vzorků na Vysokopolském potoce.

## 2. Sběr vzorků

Vzorky byly sbírány podél čtyř potoků v oblasti přírodní rezervace Vizovických vrchů (Vlára, Smolinka, Tichovský a Vysokopolský potok), které pramení v těchto vrších. Sběr byl proveden v srpnu v roce 2019. Před sběrem jsem provedla fotodokumentaci každé lokality a konkrétního místa odběru vzorku.

Odběr byl proveden podél toku na třech až čtyřech místech. Nejprve jsem získala vzorek přímo u pramene potoka, další dva byly sebrány před první obcí v určité vzdálenosti (1 km a 2 km od pramene – podle dostupnosti terénu) a poslední za obcí. Na každém tomto stanovišti jsem odebrala vzorek ze dna potoka, ze břehu, který omývala voda, a ve vzdálenosti cca 2-3 m od břehu (Obr. 34). Navíc jsem nabrala větší množství půdy (cca 100 g) ve vzdálenosti 2-3 m od břehu.

Na Vláře, Smolince a Vysokopolském potoce jsem tedy shromáždila na 4 místech celkem 36 vzorků. Kvůli kratší délce Tichovského potoka jsem zde na 3 místech posbírala celkem 9 vzorků. Dohromady jsem tedy získala 45 vzorků.

Ke shromáždění kapalných vzorků jsem použila označené zkumavky, zejména na vzorky přímo ze dna řek. Suchou biomasu jsem na břehu nabírala nejčastěji skalpelem, větší množství půdy malou lopatkou. Všechny vzorky jsem dále zpracovávala v algologické laboratoři.



Obr. 34: Odebraný vzorek ze dna potoka (1), ze břehu (2) a cca 2-3 m od břehu (3). Fotografie toku Vlára, cca 2 km od pramene.



## 2.1 Průběh měření

Na každém z patnácti stanovišť jsem změřila a zaznamenala teplotu, pH a vodivost. Použila jsem digitální ruční měřicí přístroj zvaný konduktometr (Obr. 35) pro měření vodivosti a teploty (GRYF 106 L) a digitální dvoukanálový multimetr pro měření pH (Hach HQ40d).



Obr. 35: Průběh měření pomocí konduktometru na druhém kilometru od pramene toku Smolinka.

### 3. Zpracování vzorků v laboratoři

Pro kultivaci nasbíraných vzorků jsem používala médium buď tekuté nebo pevné Z medium (1,5% agar) (Staub 1961). S médii a kulturami jsem pracovala ve flow-boxu s horizontálním prouděním (AURA HZ 48), plochu jsem sterilizovala vždy před prací roztokem Isorapid. Očkovací kličky jsem zbavila kontaminací nad plamenem kahanu, používala jsem jednorázové sterilní pipety, zkumavky a další potřebné pomůcky.

Všech 43 vzorků jsem umístila ve flow-boxu pomocí pinzety z uzavíratelných sáčků do Petriho misek se Z médiem (Obr. 36) a nechala jsem biomasu rozrůst za pokojové teploty s dostatečným osvětlením. Za několik týdnů jsem pozorovala povlaky sinic a řas. V tomto stádiu jsem pomocí očkovacích kliček přenesla tyto kolonie do zkumavek se sterilním Z médiem a nechala je zase rozrůst.



Obr. 36: Petriho misky se vzorky a Z médiem ve flow-boxu.

#### 3.1 Zpracování půdního substrátu

Ve vzdálenosti 3 m od břehu jsem na každém z 15 stanovišť nasbírala cca 100 g půdy. Z tohoto množství jsem v laboratoři smícháním s vodou udělala roztok (Obr. 37) za pomoci váhy a Erlen-Mayerových baněk. Tento roztok jsem nechala 24 hodin usadit a poté jsem změřila pomocí konduktometru vodivost a teplotu (GRYF 106 L) a pomocí multimetru pH (Hach HQ40d).





Obr. 37: Půdní roztok v Erlen-Mayerových baňkách.

### 3.2 Izolace kmenů

Mým cílem bylo získat čisté kmeny, které jsem získala purifikací ve flow-boxu s použitím sterilní jehly buď přes zkumavky se Z médiem, nebo pomocí agarové plotny na Petriho miskách. Poté jsem zkumavky nebo Petriho misky přelepila parafilmem a nechala kultivovat.

Pokud některé vzorky nebyly stále čisté ani po opakovaném přeizolování, použila jsem tzv. kapkovou metodu. Ta je založena na izolaci buněk/vláken pomocí mikropipety v kapce sterilního média. Na podložní skříčko jsem nakapala pět kapek média a pomocí mikropipety a mikroskopu přenášela samostatné vlákno přes tyto kapky. Nakonec jsem toto vlákno přenesla do zkumavky se Z médiem a nechala několik týdnů roztít. Pak jsem zkontrolovala pod mikroskopem čistotu izolovaného kmene. Čisté kmeny jsem uchovávala ve zkumavkách ve fytotronu (Obr. 38).



Obr. 38: Fytotron s řízenými podmínkami pro uchování kmenů sinic.

### 3.3 Determinace vzorků

Vzorky jsem pozorovala ve světelném mikroskopu Zeiss PrimoStar nejčastěji pod zvětšením 40x nebo 100x za použití imerzního oleje. Kmeny jsem determinovala s použitím literatury Komárek a Anagnostidis (2005). Zároveň jsem zaznamenávala důležité morfologické znaky: přítomnost či absenci slizové pochvy a kalyptry a pomocí měřítka zjišťovala šířku buněk. Obrazovou dokumentaci jsem pořizovala pomocí kamery AxioCam ERx 5s, Zeiss, 5Mpx a programu AxioVision Rel. 4.8.1. Fotografie jsem nakonec upravovala na počítači v programu Zoner Phoro Studio X.

## 4. Molekulární analýzy

Pro správnou determinaci mikroorganismů je v současné době důležitý kromě morfologických znaků i podíl molekulárních metod, např. analýza MALDI-TOF MS založená na podobnosti proteinů jednotlivých kmenů nebo sekvenční analýza genu 16S ribosomální RNA, která se běžně používá pro identifikaci prokaryotických organismů.

### 4.1 MALDI-TOF MS

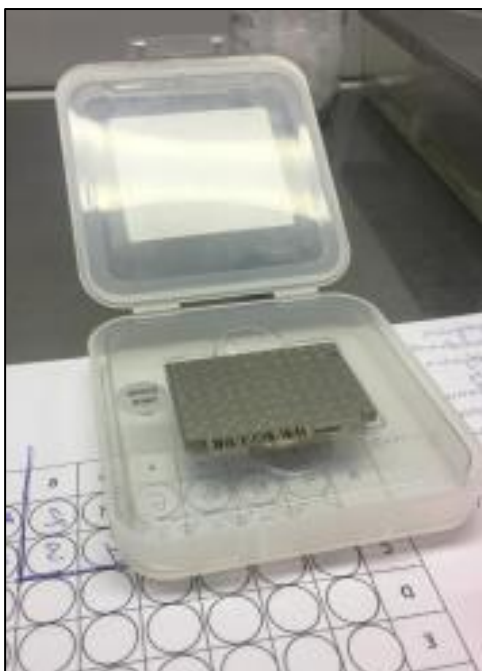
Je to přesná a jednoduchá metoda, založená na hmotnostní spektrometrii, používaná od 80. let 20. století (Patel 2015). Lze ji využít k rychlé identifikaci mikroorganismů do rodu, druhu, či dokonce kmenu. Z malé části biomasy dokážeme vytvořit peptidovou mapu, která je charakteristická pro každý mikroorganismus (Santos et al. 2016).

Hojně je tato metoda využívána k rozpoznání patogenů v klinických mikrobiologických laboratořích. Přispěla k diagnostice nádorů, různých alergií či Alzheimerově chorobě (Marvin et al. 2003). V současnosti se využívá i v průmyslových či biologických laboratořích (Huong et al. 2014, Wieser et al. 2011).

Hmotnostní spektrometrie (MS) je metoda, používaná k rozdělení iontů na základě poměru hmotnosti a jejich náboje. Tyto nabitě částice (ionty) vznikají na základě ionizace z neutrálních molekul vzorku v hmotnostním spektrometru. Byly vyvinuty různé techniky založené na ionizačních a detekčních systémech. Nejčastěji používaná metoda je MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of flight Mass Spektrometry), která byla nejdříve vyvinutá pro analýzu peptidů a bílkovin, později i pro nukleové kyseliny (Wieser et al. 2011, Havliš 1999).

Spektrometr je složen ze tří hlavních částí – a) iontový zdroj, který umožňuje ionizaci vzorku, b) hmotnostní analyzátor, kde se rozdělují ionty o různých hmotnostech, c) detektor, který zachycuje dopadající ionty (Sauer & Kliem 2010) (Obr. 40).

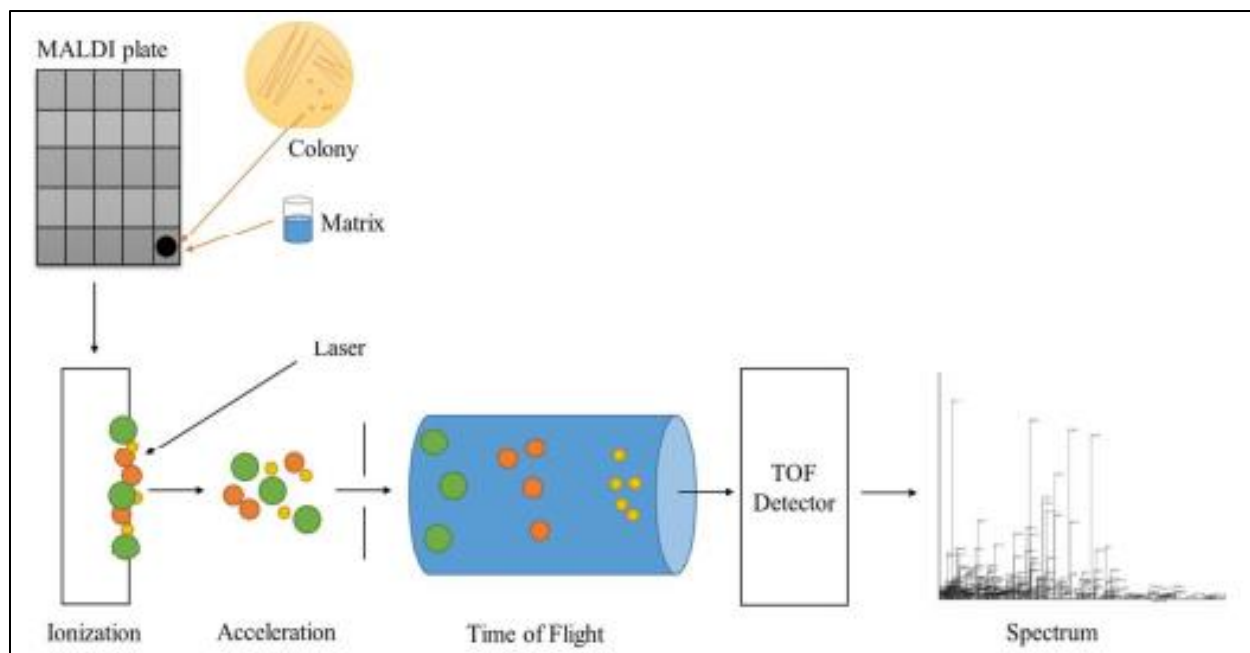
Protože je tato metoda velmi citlivá, stačí pro analýzu malé množství jednodruhové biomasy bez kontaminací. Ta je umístěna společně s matricí na speciální místo uložení na analytické destičce (Obr. 39) a roztok se nechá vykrytalizovat. Matrice pomáhá při desorpci a ionizaci a chrání molekuly před fragmentací laserem. Jako matrice slouží nejčastěji kyselina skořicová nebo deriváty kyseliny benzoové (např. 2,5-dihydroxybenzoová).



Obr. 39: Analytická destička s nanesenou biomasou a matricí.

Poté je destička umístěna do vakuované části hmotnostního spektrometru (Microflex LRF, Bruker Daltonics Inc.). Následně jsou vzorky vystaveny krátkým laserovým impulsům, přičemž je energie záření pohlcena matricí, což vede k zahřátí a desorpci. V této fázi dochází k přeměně analytu z pevného na plynný. Náhodnou kolizí v tomto plynu se náboj přenáší z matrice na mikrobiální molekuly. Tyto ionizované molekuly jsou poháněny elektrickým polem a putují směrem přes hmotnostní analyzátor směrem k iontovému detektoru. Ionty s nižším poměrem hmotnosti/náboje ( $m/z$ ) doletí do detektoru dříve, tzn. první se na něj dostanou menší, tím pádem rychlejší molekuly a postupně čím dal větší a těžší. Detektor zachytí ionty a vypočítá hmotnost každého iontu, který na něj postupně dopadá. Tak vzniká hmotnostní spektrum zvané peptidová mapa, která je generována na základě iontů dopadajících na detektor v průběhu času. Tyto spektra jsou originální pro každý protein mikroorganismu. Spektrální data byla zkontrolována a zpracována pomocí flexAnalysis 3.4 a MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics Inc.). Nakonec se může toto spektrum porovnávat s dříve zjištěnými spektry (Patel 2015, Wieser et al. 2011).

Ačkoli se databáze spekter stávají postupně ucelenější, v důsledku měnící se nomenklatury a popisu nových druhů / rodů bude nutné pravidelně a průběžně aktualizovat databázi, aby poskytovala kvalitní mikrobiální identifikaci (Patel 2015). Navzdory vysokým počátečním pořizovacím nákladům je tato metoda schopna efektivně a rychle identifikovat širokou škálu mikroorganismů (Santos et al. 2016).

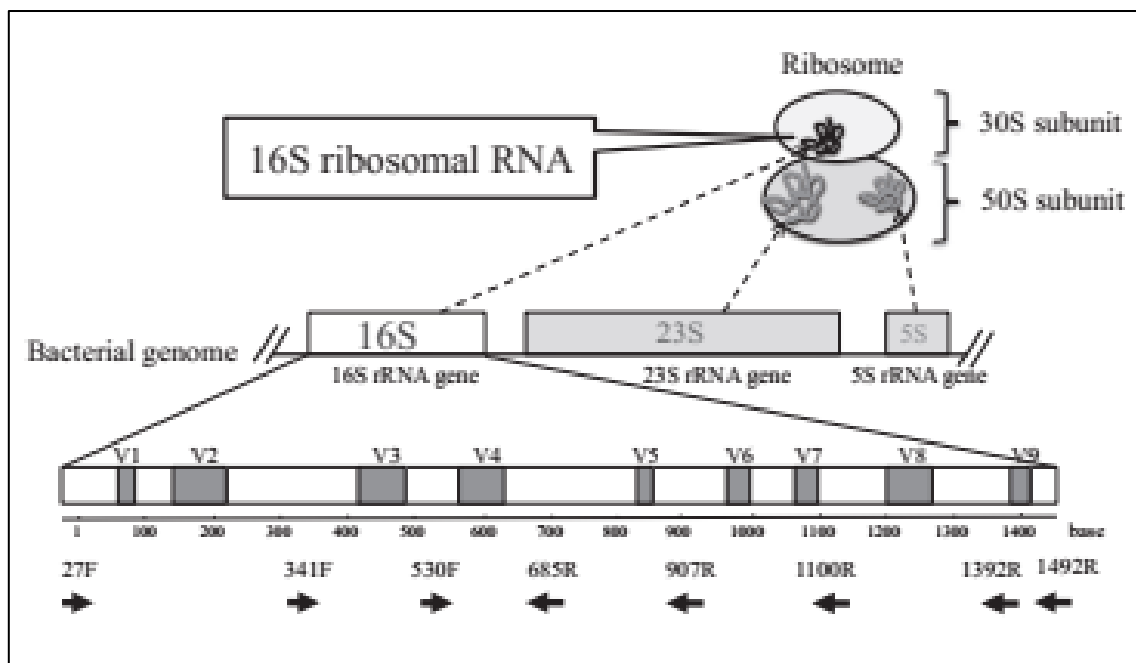


Obr. 40: Schéma MALDI-TOF MS podle Santos et al. (2016).

## 4.2 Analýza genu 16S rRNA a regionu 16S–23S ITS

Ribosomální RNA se vyskytuje uvnitř ribozomu a je zodpovědná za syntézu bílkovin. Je přítomná ve všech organismech od bakterií až po rostliny a živočichy. U prokaryot existují 3 různě velké rRNA – 23S, 16S, 5S. Úplně prvním genem používaným pro identifikaci organismů byl gen 5S rRNA. Kvůli malé délce (jen 120 nukleotidů) a tedy nízkému obsahu informací byl nahrazen genem 16S rRNA, který je součástí menší podjednotky ribozomu 30S (obsahuje cca 1500 nukleotidů). U eukaryot se používá gen 18S rRNA (Staley a Reysenbach 2002).

Jako první navrhli Woese a Fox (1977) úsek genu 16S rRNA jako ideální pro fylogenetické studie, protože byly doposud objeveny v mnoha organismech a tato oblast vykazovala konzervativní úseky (pomalý vývoj genu, lze na ně navrhovat primery), které jsou důležité pro fylogenetické analýzy. Kromě těchto úseků se vyskytují variabilní úseky, které jsou charakteristické pro každý druh (Obr. 41) (Pereira et al. 2010). Na základě informací získaných z rRNA genu bylo objeveno mnoho nových organismů, včetně domény Archea. Často se využívá k vytváření fylogenetických stromů, které znázorňují příbuzenské vztahy mezi druhy, rody či jinými taxonomickými jednotkami, které mají společného předka (Vondráček et al. 2012).



Obr. 41: Schéma ribozomu a genu 16S rRNA. Bílé a šedé pole označují konzervativní a variabilní úseky, šipky značí přibližnou polohu pro primery na analýzu genu 16S rRNA u *Escherichia coli*, zdroj: Fukuda et al. (2016).

Principem této analýzy je získání nukleotidové sekvence genu 16S rRNA určitého organismu, která se poté porovná v databázi (např. BLAST) se sekvencemi již dříve získanými. Pro stanovení sekvence je nutno několik kroků: izolace DNA z čisté kultury, polymerázová řetězová reakce, stanovení nukleotidové sekvence a srovnání s ostatními sekvencemi a následné vytvoření stromu.

#### 4.2.1. Postup izolace DNA – CTAB metoda (Doyle 1991):

Metoda je založena na schopnosti CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid) rozrušit membrány a uvolnit DNA z buněk. Alkohol (isopropanol) rozpouští zbytky solí, bílkovin, polysacharidy a sráží vzniklou DNA, kterou můžeme separovat. RNasa A je schopna degradovat kontaminující RNA.

Většina kroků probíhá v digestoři za sterilních podmínek, aby nedošlo k nežádoucí kontaminaci či poškození zdraví – ochranné rukavice, sterilní pomůcky. Kontaminované špičky, mikrozkušavky, chemikálie a další pomůcky vyhazujeme a vyléváme do speciálních nádob.

- Do třecí misky dáme jednodruhovou biomasu sinic z přichystaných mikrozkušavek (Obr. 42), přidáme trochu písku a roztřeme tloučkem. Na jeden vzorek je určena jedna třecí miska



Obr. 42: Mikrozkušavky s jednodruhovou biomasou sinic, která se přenesla do třecí misky

- K rozdrcenému materiálu přidáme pipetou 700  $\mu$ l roztoku CTAB, poté ke každému vzorku ještě 5  $\mu$ l RNasy A, PVP (polyvinylpyrrolidon) a 2  $\mu$ l merkaptoethanolu



- Vzorek umístíme do mikrozkušavek a uzavřeme, inkubujeme 30 min. v termobloku při 60 °C a 1 400 rpm
- Centrifugujeme 6 min. při 13 200 rpm
- Vzniklý supernatant (tekutina nad sedimentem) přepipetujeme sterilní špičkou do nových mikrozkušavek (Obr. 43)



Obr. 43: V mikrozkušavce viditelné dvě separované části – supernatant a pelet.

- V digestoři přidáme 500 µl směsi chloroform:isoamylalkohol v poměru 24:1
- Eppendorfký uzavřeme, 2-3x převrátíme a necháme stát cca 5 min
- Centrifugujeme 6 min. při 13 200 rpm
- Vzniklý průhledný supernatant (zhruba 500 µl) přepipetujeme do nových eppendorfků
- Přidáme 500 µl vychlazeného isopropanolu
- Párkrát převrátíme a necháme cca 30 min. stát v mrazáku při -20 °C
- Centrifugujeme 3 min. při 13 200 rpm



- Supernatant opět opatrně slijeme v digestoři do kádinky a obrátíme dnem vzhůru na ubrousek, aby zbylá kapalina odtekla – na dně eppendorfký nám zůstane drobný bílý pelet DNA
- K peletu přidáme 400  $\mu$ l vychlazeného 96% ethanolu a inkubujeme v termobloku při 37 °C a 1 200 rpm
- Centrifugujeme 3 min. při 13 200 rpm a supernatant opět slijeme do kádinky
- Přidáme 200  $\mu$ l vychlazeného 70% ethanolu a necháme cca 5 min stát
- Centrifugujeme opět 3 min. při 13 200 rpm
- Supernatant opět opatrně slijeme a eppendorfký necháme 10-15 min stát a vyschnout
- Poté cca 1-2 min vysušíme pelet v otevřených eppendorfkách v termobloku při 90 °C
- Vysušený pelet rozpustíme ve 100  $\mu$ l TE pufru
- Uzavřené eppendorfký inkubujeme 30 min. na termobloku při 37 °C a 600 rpm
- Eppendorfký z DNA zalepíme parafilmem, popíšeme, umístíme do sáčku, který také zalepíme a uchováváme v ledničce či dlouhodobě v mrazáku při nízkých teplotách (-20 °C)
- Po úspěšné izolaci DNA můžeme provést polymerázovou řetězovou reakci (PCR)

#### 4.2.2. PCR (Polymerázová řetězová reakce)

Dnes tuto běžně používanou metodu objevil v polovině 80. letech 20. století americký chemik Kary Mullis, za kterou byl oceněn Nobelovou cenou za chemii. Velmi krátce po objevení se stala metodou používanou jak v molekulárně-biologických laboratořích, tak v oblasti diagnostické medicíny (Hrstka et al. 2014).

Pro molekulární analýzy prováděné s DNA organismu je potřeba dostatečné množství této nukleové kyseliny. Principem metody je množení neboli amplifikace specifického úseku DNA ohraničených primery mnohonásobným opakováním cyklů polymerázové řetězové reakce (Obr. 44). Délka amplifikovaných úseků je většinou několik desítek až tisíc bází. Pro tuto metodu je potřeba čistá DNA bez nežádoucích kontaminací, které by negativně ovlivnily celkový výsledek analýzy (Křemen 1998).

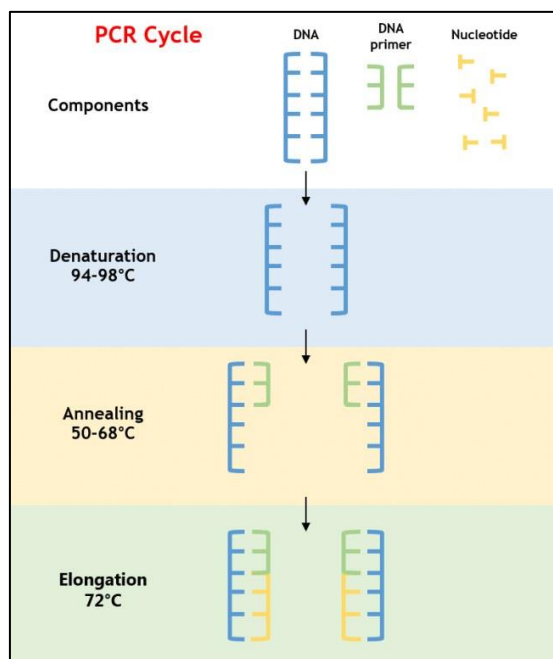
Kopie DNA je syntetizována pomocí termostabilního enzymu polymerázy na základě templátu, kterým je jednořetězcová DNA. Kromě templátu a polymerázy jsou potřeba primery, což jsou oligonukleotidy komplementární ke koncům sledovaného úseku templátové DNA. Pomocí nich je vymezen úsek na nukleové kyselině, který má být amplifikován. A v neposlední

řadě jsou potřeba volné deoxynukleotidtrifosfáty, které na principu komplementarity bází nasedají na vlákno DNA a syntetizují novou DNA (Mazura 2001).

Každý cyklus tvoří následující fáze s odlišnými teplotami:

- Denaturace DNA při teplotě 92-96 °C – separace řetězců z dvouřetězcových na jednořetězcové vlivem rozpadnutých vodíkových můstků
- Asociace (annealing) – probíhá při teplotách 50-60 °C, 30-60 sec – ochlazením se vytvoří podmínky pro nasedání primerů na vlákno DNA na principu komplementarity bází
- Elongace (extenze) – 72 °C, 30-60 sec – DNA polymeráza nasedá na primery a připojuje volné nukleotidy k vláknu DNA na principu komplementarity bází

Tento cyklus se obvykle opakuje až 25-35x. Do reakce se navíc zapojuje i počáteční denaturace, která trvá 2-3 min, v následujících cyklech probíhá pouze 20-30sec a závěrečná polymerační reakce, která trvá obvykle 5 min (dosyntetizování řetězců). Automatické opakování jednotlivých cyklů umožňují speciální termocyklery, ve kterých můžeme přesně definovat teploty i časové intervaly fází. Vniklými produkty jsou tedy řetězce dvouvláknové DNA, jejichž délky jsou dány vzájemnou vzdáleností primerů (Křemen 1998, Mazura 2001).



Obr. 44: Zjednodušený obrázek PCR cyklu – důležité komponenty (DNA, primery a volné nukleotidy) a jednotlivé fáze (denaturace, asociace, elongace), zdroj: [www.clinisciences.com](http://www.clinisciences.com).

#### 4.2.3. Stanovení nukleotidové sekvence

Produkty PCR byly analyzovány pomocí gelové elektroforézy a purifikovány pomocí E. Z. N. A. Cycle Pure Kit (Omega Bio-Tek, Georgia, USA) podle postupu výrobce. Produkty byly osekvenovány pomocí Sangerovy metody (Macrogen Europe B. V., Amsterdam, Nizozemsko). Sekvence poté byly upravovány v softwaru Sequencher 5.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA).

#### 4.2.4 Fylogenetická analýza

Pro konstrukci fylogenetických stromů jsem využila sekvenci genu 16S rRNA. První vytvořený dataset obsahoval pouze sekvence mých izolovaných kmenů během bakalářského a diplomového studia (celkem 24 sekvencí). Dataset byl srovnán s výsledky analýzy MALDI-TOF. Druhý dataset obsahoval stejné sekvence kmenů, a navíc jim podobné sekvence, které byly získány pomocí počítačové databáze BLAST, která je k dispozici na webových stránkách NCBI (National Center for Biotechnology Information) (celkem 47 sekvencí). Zarovnání sekvencí bylo provedeno v programu MEGA X pomocí algoritmu Muscle (Kumar et al. 2018) a doupřeno v programu GBlock, verze 0.91b (Castresana 2000) ([http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks\\_server.html](http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html)).

V programu MEGA X byly provedeny analýzy Maximum likelihood a Maximum parsimony s 500 replikacemi. Na základě Akieho informačního kritéria (AIC) byl vybrán nejvhodnější model pro sestavení stromu – T92 + G + I.

Pro vytvoření sekundárních struktur D1-D1' helix a Box B helix se využily sekvence získané z oblasti 16S-23S ITS. Internal transcribed spacer (ITS) je část DNA, která je umístěna u sinic mezi geny 16S a 23S rRNA a využívá se pro identifikaci organismů až na úroveň druhu, díky odlišnostem v sekvenci, délce i sekundární struktuře (Boyer et al. 2002). Sekundární struktury 16S-23S ITS byly vytvořeny pomocí webové stránky Mfold (Zuker 2003) (<http://www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form.php>).

## VÝSLEDKY

### 1. Ekologická variabilita

#### Pramen

U pramene všech čtyř toků byla všeobecně diverzita sinic a řas poměrně malá. Vyskytovaly se pouze ve vzorcích přímo z vody a z omývaného břehu. Teplota vody u pramene se průměrně pohybovala kolem 16 °C, pH vody dosahovalo většinou hodnoty 8 a konduktivita byla mezi 120 až 270  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Tab. 1). Naproti tomu ve vzorcích z půdy odebraných u pramene jsem nezaznamenala žádný výskyt sinic a řas, pravděpodobně z důvodu nízkého pH, které dosahovalo pouze hodnot mezi 3,8-5,2. V pramenu Vysokopolského potoka byl nalezen druh *Kamptonema formosum* (voda) a *Microcoleus amoenus* (břeh). Rod *Microcoleus* sp. převládá v biomase získané z pramene Vlárý (břeh). Rod *Ancylothrix* sp. byl nalezen v toku Smolinka (břeh) a v Tichovském potoce (voda) (Tab. 2).

#### Před obcí

U Vysokopolského potoka, Smolinky i Vlárý jsem odebírala vzorky z vody, břehu i půdy vždy ve vzdálenosti 1 a 2 km od pramene, a to před první obcí. Na odběrovém místě všech tří toků 1 km od pramene byla diverzita malá – pouze rod *Microcoleus* sp. jsem zaznamenala v půdě v blízkosti toku Smolinka, kde bylo pH 6,9 a konduktivita 11  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Tab. 1).

Ve vzdálenosti 2 km od pramene se vyskytovaly jak vláknité a kokální sinice, tak i například penátní rozsivky. Teplota vody dosahovala hodnot 18-20 °C, pH vody bylo průměrně 7,7 a konduktivita nabývala hodnot mezi 269-528  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . V těchto částech toku převažovaly vláknité sinice, a to konkrétně rod *Phormidium* či od něj odvozené rody – *Kamptonema formosum* (Vlára/voda), *Kamptonema* cf. *animale* (Smolinka/voda), *Kamptonema* sp. (Smolinka/půda), *Microcoleus* sp. (Vysokopolský potok/břeh, Smolinka/břeh) a *Phormidium* sp. (Vlára/břeh) (Tab. 2).

U Tichovského potoka jsem odebírala vzorky pouze na jednom stanovišti ještě před první obcí, jelikož délka toku od pramene po první obec byla krátká (Obr. 31). Teplota vody byla naměřena 19,4 °C, pH 7,6 a konduktivita 473  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Zde na břehu dominoval druh *Microcoleus vaginatus*. Rod *Microcoleus* sp. byl nalezen poblíž toku v půdě, kde pH bylo 6,8 a konduktivita 62  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Tab. 1).

### Za obcí

Všeobecně za první obcí (Tichov, Vysoké Pole, Drnovice, Smolinka) byla naměřena vyšší teplota vody ( $\bar{X}=21,4$  °C), pH se pohybovalo kolem 7-8 a konduktivita byla mezi 230-627  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Tab. 1). Ve velké míře zde dominovaly sinice a řasy, které byly makroskopicky pozorovatelné jako zelené povlaky přímo na kamenech, břehu i v přilehlé vlhké půdě (Příloha 3). Například rod *Pseudoanabaena* byl nalezen přímo za obcí v toku Smolinky a Vysokopolského potoka. Často byl dobře makroskopicky pozorovatelný i rod *Cladophora*. Z odebraných vzorků zde převažoval rod *Phormidium* a od něj odvozené rody a druhy – *Kamptonema animale* (Tichovský potok/břeh), *Microcoleus vaginatus* (Smolinka/půda), *Microcoleus* sp. (Vlára/půda a voda, Vysokopolský potok/břeh, Tichovský potok/půda a voda) (Tab. 2).

Tab. 1: Naměřené hodnoty lokalit jednotlivých odběrů vzorků.

Potok	Místo	Voda			Půda		GPS (N)	GPS (E)
		Teplota [°C]	pH	Konduktivita [μS.cm <sup>-1</sup> ]	pH	Konduktivita [μS.cm <sup>-1</sup> ]		
Vysokopolský	pramen	16,1	8,2	120	3,8	86	49°20'95"	17°94'83"
Vysokopolský	1 km od pramene	16,5	8,2	257	6,2	18	49°19'13"	17°94'83"
Vysokopolský	2 km od pramene	19,8	7,6	299	6,8	45	49°18'29"	17°94'22"
Vysokopolský	za obcí	21,7	7,6	305	7,2	78	49°17'08"	17°94'39"
Tichovský	pramen	16,5	7,8	270	4,4	8	49°19'27"	17°98'10"
Tichovský	před obcí	19,4	7,6	473	6,8	62	49°18'59"	17°98'23"
Tichovský	za obcí	20,8	7,5	573	7,3	50	49°17'10"	17°97'82"
Smolinka	pramen	18,5	7,8	212	5,0	92	49°20'22"	17°99'70"
Smolinka	1 km od pramene	17,7	7,7	334	6,9	11	49°17'34"	18°00'94"
Smolinka	2 km od pramene	20,8	7,6	528	7,0	270	49°16'09"	18°00'17"
Smolinka	za obcí	21,6	7,4	627	6,9	114	49°15'35"	17°99'21"
Vlára	pramen	15,2	8,4	222	5,2	16	49°21'38"	17°96'49"
Vlára	1 km od pramene	18,3	7,8	323	5,8	21	49°20'04"	17°96'35"
Vlára	2 km od pramene	18,1	7,7	269	5,6	40	49°18'80"	17°96'64"
Vlára	za obcí	21,5	7,1	230	6,9	132	49°17'61"	17°95'36"

## 2. Morfologické zhodnocení

Ze všech stanovišť se mi podařilo izolovat celkem 29 kmenů, které obsahovaly rod *Phormidium*, či od něj odvozené rody (*Kamptonema*, *Microcoleus*, *Ancylothrix*). Nejčastěji v sebraných vzorcích tyto rody dominovaly, nicméně v několika vzorcích byla velká převaha zelených kokálních řas. Ve zbytku odebraných vzorků byly pouze eukaryotické řasy, v některých převládal rod *Leptolyngbya* a také jsem zaznamenala rod *Pseudoanabaena*. Větší část odebraných vzorků (celkem 21) se mi podařilo vyizolovat v čisté kultury, které jsem mohla morfologicky vyhodnotit, zdokumentovat a provést molekulární analýzy. Izolované kmeny jsem srovnávala s kmeny izolovanými dříve v rámci mé bakalářské práce (Tab. 3).

Šířka vláken, přítomnost kalyptry a slizové pochvy patří mezi nejdůležitější determinační znaky, podle kterých je Komárek & Anagnostidis (2005) rozděluje do 8 základních skupin. Nejvíce izolovaných kmenů jsem zařadila do skupiny VII, pro kterou je typická přítomnost kalyptry, krátce zužované vlákno, někdy se slizovou pochvou. Několik kmenů spadá do skupiny II a III, například rod *Kamptonema*, který nevytváří kalyptru ani slizovou pochvu.

Šířka vláken se pohybovala mezi 4,5 až 7  $\mu\text{m}$ , nejtenčí vlákno měl druh *Kamptonema formosum* (kmen VII), naopak nejširší vlákno měl rod *Ancylothrix* sp. (kmen XI a XXI). Slizová pochva byla zaznamenána u rodu *Microcoleus* a *Phormidium*. Konce trichomů byly zakončeny ve většině případů kalyptrou. Někdy byly apikální buňky zakulacené, a to u rodu *Ancylothrix* sp. a druhu *Kamptonema formosum*, jehož vlákno se typicky krátce zužuje. Naproti tomu druh *Kamptonema animale* má apikální buňky zašpičatělé a zužuje se na delší části vlákna. Většina buněk je plochá až mírně cylindrická (většinou poměr délky/šířky byl 1:0,5 a 1:0,75) (Tab. 2). V izolovaných kulturách jsem zaznamenala výskyt zaškrpcovaných buněk a hormogonií, což jsou rozmnožovací útvary, které vznikají fragmentací vláken. Všechny buněčné útvary jsou zaznamenány v obrazové tabuli (Obr. 45-78).

Tab. 2: Charakteristika kmenů izolovaných z Vizovických vrchů.

Kmen	Označení kmene	Šířka vláken (μm)	Slizová pochva	Apikální buňky	Poměr délka/šířka buněk	Název toku	Vzdálenost	Habitat
<i>Kamptonema formosum</i>	V	4,9	-	zakulacené	0,5-0,75	Vlára	2 km od pramene	voda
<i>Kamptonema formosum</i>	VII	4,5	-	zakulacené	0,5-0,75	Vysokopolský potok	Pramen	voda
<i>Kamptonema animale</i>	X	5,0	-	zašpičatělé	0,5-0,75	Tichovský potok	Za obcí	břeh
<i>Kamptonema cf. animale</i>	XV	5,0	-	zakulacené	0,5-0,75	Smolinka	2 km od pramene	voda
<i>Kamptonema</i> sp.	XVI	5,4	-	zakulacené	0,75-1,0	Smolinka	2 km od pramene	půda
<i>Microcoleus vaginatus</i>	III	6,5	-	kalyptra	0,75-1,0	Tichovský potok	Před obcí	břeh
<i>Microcoleus vaginatus</i>	XIII	5,0	-	kalyptra	0,5-0,75	Smolinka	Za obcí	půda
<i>Microcoleus amoenus</i>	XVIII	4,5	+	kalyptra	0,25-0,5	Vysokopolský potok	Pramen	břeh
<i>Microcoleus</i> sp.	I	5,3	-	kalyptra	0,5-0,75	Tichovský potok	Před obcí	půda
<i>Microcoleus</i> sp.	II	5,0	-	kalyptra	0,5-0,75	Tichovský potok	Za obcí	voda
<i>Microcoleus</i> sp.	VI	5,0	-	kalyptra	0,5-0,75	Vysokopolský potok	2 km od pramene	břeh
<i>Microcoleus</i> sp.	VIII	5,5	-	kalyptra	0,5-0,75	Vlára	Za obcí	voda
<i>Microcoleus</i> sp.	IX	5,7	+	kalyptra	0,5-0,75	Vysokopolský potok	Za obcí	břeh
<i>Microcoleus</i> sp.	XII	5,0	+	kalyptra	0,5-0,75	Vlára	Pramen	břeh
<i>Microcoleus</i> sp.	XIV	5,3	-	kalyptra	0,25-0,5	Smolinka	2 km od pramene	břeh
<i>Microcoleus</i> sp.	XVII	4,7	+	kalyptra	0,5-0,75	Smolinka	1 km od pramene	půda
<i>Microcoleus</i> sp.	XIX	5,5	-	kalyptra	0,5-0,75	Tichovský potok	Za obcí	půda
<i>Microcoleus</i> sp.	XX	5,5	+	kalyptra	0,75-1,0	Vlára	Za obcí	půda
<i>Ancylothrix</i> sp.	XI	7,0	-	zakulacené	0,5-0,75	Tichovský potok	Pramen	voda
<i>Ancylothrix</i> sp.	XXI	7,0	-	zakulacené	0,5-0,75	Smolinka	Pramen	břeh
<i>Phormidium</i> sp.	IV	6,0	+	kalyptra	0,25-0,5	Vlára	2 km od pramene	břeh



Tab. 3: Srovnávací materiál kmenů izolovaných v rámci bakalářské práce.

Kmen	Označení kmene	Šířka vláken (μm)	Slizová pochva	Apikální buňky	Poměr délka/šířka buněk	Lokalita	Habitat
<i>Kamptonema formosum</i>	C	5,0	-	zakulacené	0,5-0,75	Vysoké Pole	půda
<i>Kamptonema formosum</i>	D	4,5	-	zakulacené	0,5-0,75	Nový Hrozenkov	kaluž
<i>Kamptonema formosum</i>	E	6,0	-	zakulacené	0,5-0,75	Olomouc	půda
<i>Kamptonema formosum</i>	EL 2	5,5	-	zakulacené	0,5-0,75	Rosnička	břeh
<i>Ancylothrix</i> sp.	4	6,5	-	zakulacené	0,25-0,5	Poděbrady	půda
<i>Microcoleus autumnalis</i>	7	5,0	-	kalyptra	0,5-0,75	Vysoké Pole	zahrádka
<i>Microcoleus amoenus</i>	H	4,5	+	kalyptra	0,5-0,75	Malenovice	půda
<i>Microcoleus amoenus</i>	J	4,0	-	kalyptra	0,5-0,75	Langerova vila	půda
<i>Microcoleus amoenus</i>	B	4,5	+	kalyptra	0,25-0,5	Vysoké Pole	zahrádka
<i>Microcoleus vaginatus</i>	1	4,5	-	kalyptra	0,5-0,75	Horka nad Moravou	půda
<i>Microcoleus vaginatus</i>	G	7,0	+	zakulacené	0,25-0,5	Doubrava	půda
<i>Microcoleus</i> sp.	EL 1	5,0	-	kalyptra	0,75-1,0	Adamov	půda
<i>Microcoleus</i> sp.	F	5,5	+	kalyptra	0,75-1,0	Bezručovy sady	kaluž

## 2.1. Popis kmenů

### **Kamptonema (Strunecký et al. 2014)**

Všechny druhy spadající pod rod *Kamptonema* mají podobnou morfologii, která se ale liší od rodu *Phormidium* a *Microcoleus*. V minulosti byl tento rod často řazen do rodu *Oscillatoria*, na základě absence slizových pochev. V současnosti je popsáno a taxonomicky přijato 11 druhů podle AlgaeBase (Guiry & Guiry 2021).

Vlákná se vyskytují buď jednotlivě, nebo mohou tvořit kolonie, většinou bez slizových pochev, heterocyty a akinety nevytvářejí. Trichomy jsou jednoduché, nevětvené, protáhlé, zužující se krátce nebo dlouze směrem ke konci, široké zhruba 3-5  $\mu\text{m}$ , modrozelené, pohyblivé. Buňky většinou izodiametrické, někdy delší než širší. Konce vláken jsou bez kalyptry, apikální buňky zakulacené. Typická ultrastruktura protoplastu buněk, je výsledkem uspořádání tylakoidů a je charakteristická pro tento rod. Nevytváří nekrotické buňky při dělení jako je tomu u rodu *Microcoleus*.

Rod *Kamptonema* je kosmopolitní, ale různé druhy mají odlišné ekologické požadavky a lze jej považovat za odlišné taxony. V České republice je rod široce rozšířen. Je běžný v řekách, na dně louží, v litorálu rybníků a jezer, ale i v záplavových oblastech podél toků či v termálních vodách, např. v Karlových Varech. Tato charakteristika platí zejména pro druhy *K. animale* a *K. formosum*.

*Kamptonema formosum* má vlákna samostatná, nevětvená, nevytváří slizové pochvy ani kalyptru. Trichomy jednoduché, válcovité po celé své délce, pohyblivé, široké 3-5,3  $\mu\text{m}$ , zužuje se na kratší části vlákna zakulaceně, poslední 2-3 apikální buňky mohou být zahnuté (obr. 45, 46, 66, 67, 68, 69). Vyskytuje se ve vlhkých půdách, mělkých tůních a rybnících, pravděpodobně kosmopolitně.

*Kamptonema animale* má vlákna samostatná, nevětvená, nevytváří slizové pochvy ani kalyptru. Trichomy jednoduché, válcovité po celé své délce (až ke konci), mírně zúžené, pohyblivé, široké 3-5,3  $\mu\text{m}$ , zužuje se na delší části vlákna špičatě, poslední 2-3 apikální buňky mohou být zahnuté (obr. 47, 48). Běžně se vyskytuje ve vlhké půdě a ve vodě, ale i v sirných či termálních pramenech, méně často v kalužích. Široce rozšířen v mírném a tropickém pásmu, pravděpodobně kosmopolitní.

### **Microcoleus (Stunecký et al. 2013)**

V současné době je v databázi AlgaeBase (Guiry & Guiry 2021) zapsáno 113 druhů. V některých případech se názory na taxonomii liší mezi autory a dochází stále k novým taxonomickým revizím, proto je přesný počet druhů neznámý. Navíc je obtížné tento rod rozlišovat do druhu pouze na základě morfologických znaků, je potřeba i použití molekulárních metod.

Vlákná jednotlivě nebo vytváří kolonie, složena obvykle z bezbarvé homogenní slizové pochvy, ve které jsou uspořádány trichomy paralelně někdy nepravidelně šroubovitě nebo svazkovitě, trichomy válcovité, s rovnými, obvykle zúženými konci. Buňky izodiametrické nebo kratší či delší (až 3x) než širší, apikální buňky s kalyptrou. Reprodukce pomocí nekrotických buněk a hormogonií.

Patří zde hlavně bentické a půdní druhy pokrývající substrát nebo rostoucí v písčitém substrátu. Několik druhů je známo z písčných a bahnitých pláží a ústí řek nebo z vnitrozemských solných biotopů. Vyskytují se i v litorálu čistých i znečištěných vodních útvarů, kde pokrývají bahno nebo rostou jako epifyty. Známé také z vlhkých skal a minerálních pramenů.

Typický druh (lektotyp) je *Microcoleus vaginatus*. Vlákná často se slizovou pochvou, mohou vytvářet svazkovité kolonie, trichomy světle modrozelené, zužující se ke koncům, často s kalyptrou. Po rozpadnutí či při dělení trichom na konci zakulacený, bez vyvinuté kalyptry (obr. 50, 51, 75, 76). Obývají především terestrické prostředí, jako jsou vlhké půdy a skály, břehy vodních útvarů, kosmopolitní.

*Microcoleus autumnalis* (obr. 71) má trichom většinou rovný, někdy ke konci zahnutý, široký 4-7 µm, světle nebo tmavě zelený či hnědý, pohyblivý, slizová pochva je tenká, někdy může chybět. Buňky izodiametrické nebo až o polovinu delší než širší, dlouhé 2-5 µm. Apikální buňky prodloužené, často s kalyptrou. Je to sladkovodní kosmopolitní druh, obývající perifyton a ponořené substráty (kameny, dřevo), méně často v bahnitém substrátu, v řekách, rybnících i nádržích, preferuje mezotrofní až eutrofní vodu. Objeven i na zdivu, stromech či v termálních pramenech. Jemu podobný je druh *Microcoleus amoenus* (obr. 70, 72, 73, 74), který se od něj liší šířkou vláken (2,5-5 µm) a obývá zejména čisté vody bez polutantů. Najdeme jej i jako epifyton, v litorálu nebo v bahnitém substrátu. Pravděpodobně kosmopolitní.

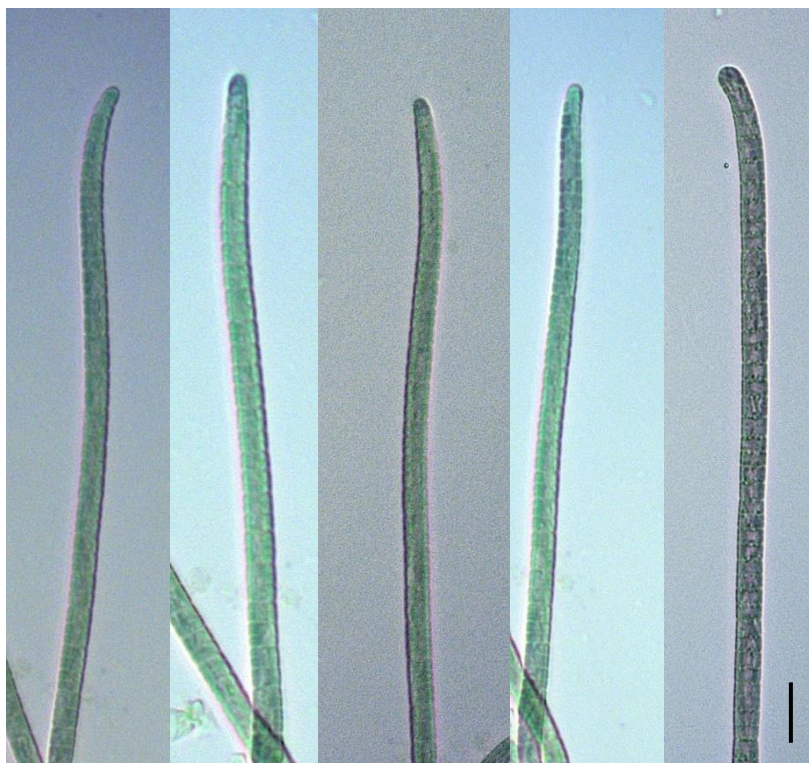
### **Ancylothrix (Martins et al. 2016)**

Popsány jsou zatím dva druhy na základě molekulárních metod, a to – *A. rivularis* a *A. terrestris*. Morfologicky jsou podobné rodu *Kamptonema* (vlákna zužující a ohnutá na konci). Původně nalezen v Brazílii, v široké škále stanovišť – sladká voda, mokrá půda i kůra stromů.

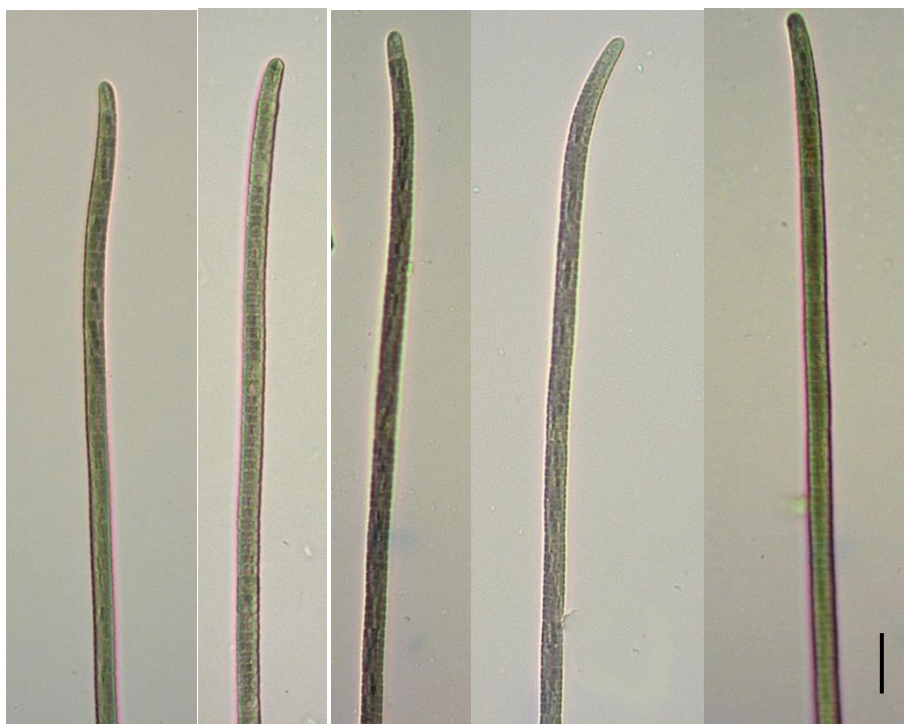
Populace vykazují velmi jednoduchou morfologii. Trichomy jsou světle modrozelené až tmavě modrozelené, téměř vždy bez viditelných slizových obalů, válcovité, často ohnuté a mírně zužující směrem ke koncům, široké 4-7  $\mu\text{m}$ . Buňky většinou izodiametrické nebo kratší než širší, 2,5-6  $\mu\text{m}$  dlouhé. Apikální buňky zaoblené, bez kalyptry (obr. 63, 64, 70). Aerotopy a heterocyty chybí. Tylakoidy radiálně uspořádané v buňkách. Reprodukce rozpadem trichomů na hormogonie pomocí nekrotických buněk. *Ancylothrix rivularis* se vyskytuje v bentosu tekoucích vod, *Ancylothrix terrestris* na vlhké půdě nebo kůře stromů.

## 2.2 Obrazová tabule

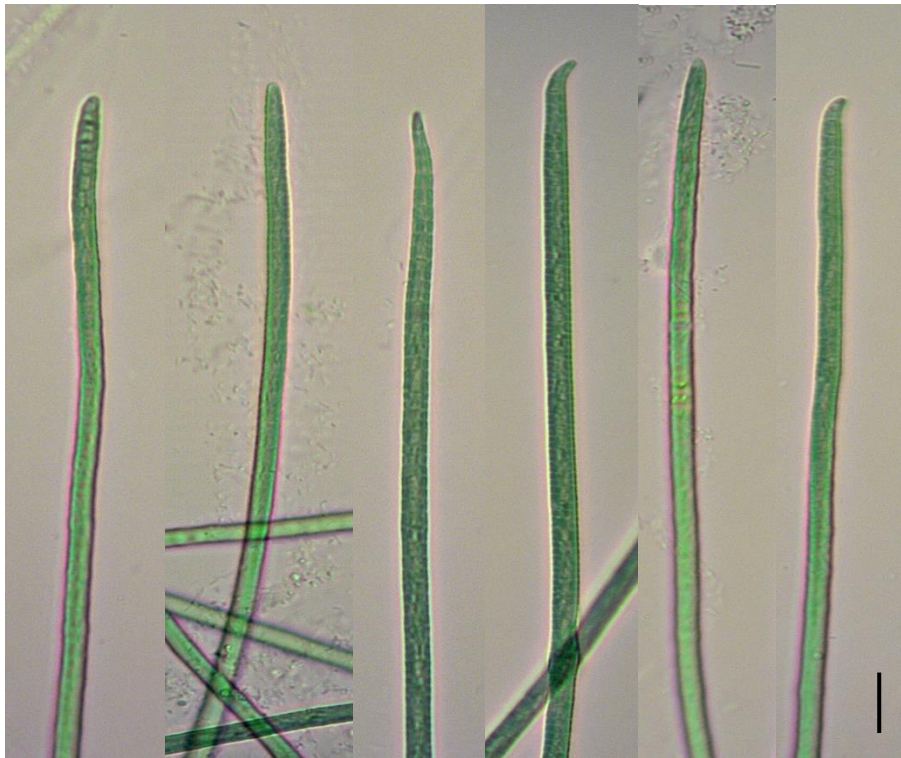
### Kmeny izolované z Vizovických vrchů



Obr. 45: *Kamptonema formosum* (V), měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



Obr. 46: *Kamptonema formosum* (VII), měřítko 10  $\mu\text{m}$ .

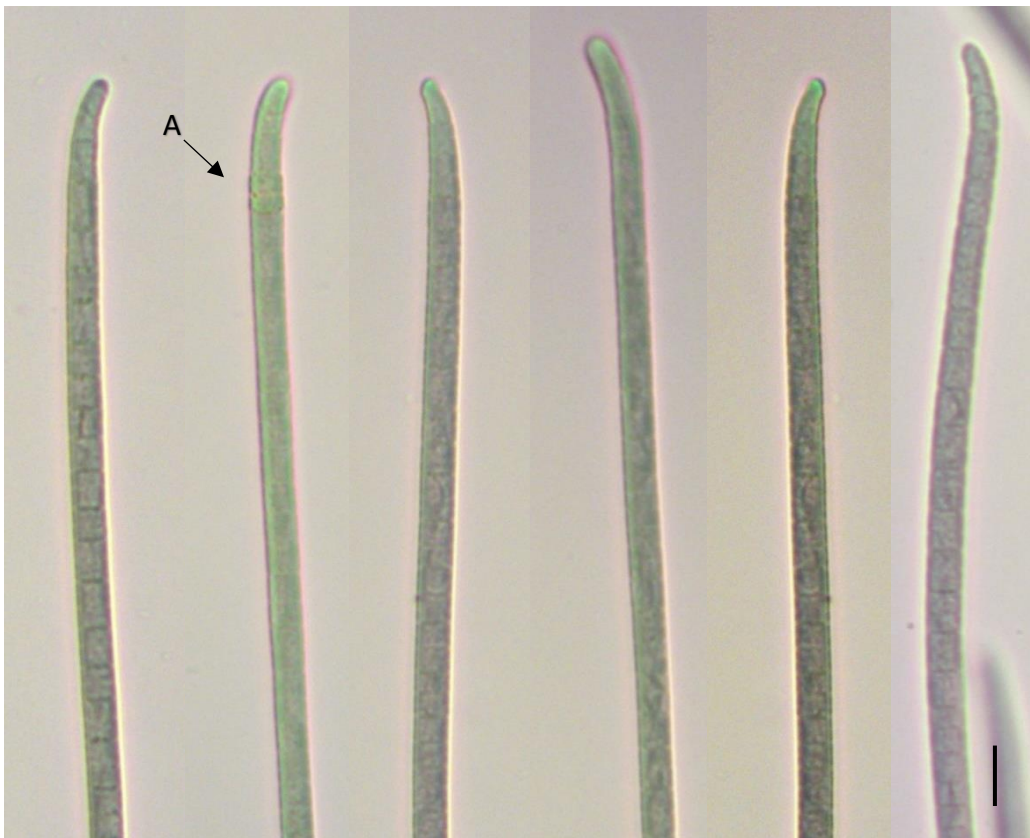


Obr. 47: *Kamptonema animale* (X), měřítko 10  $\mu$ m.

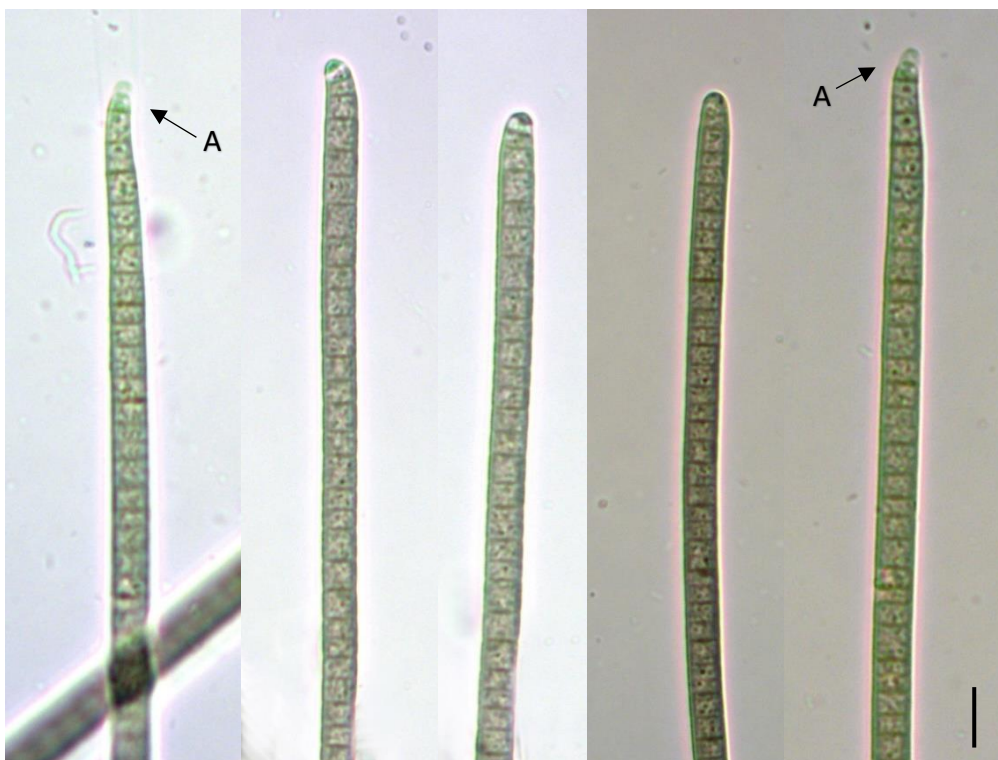


Obr. 48: *Kamptonema cf. animale* (XV), měřítko 10  $\mu$ m.





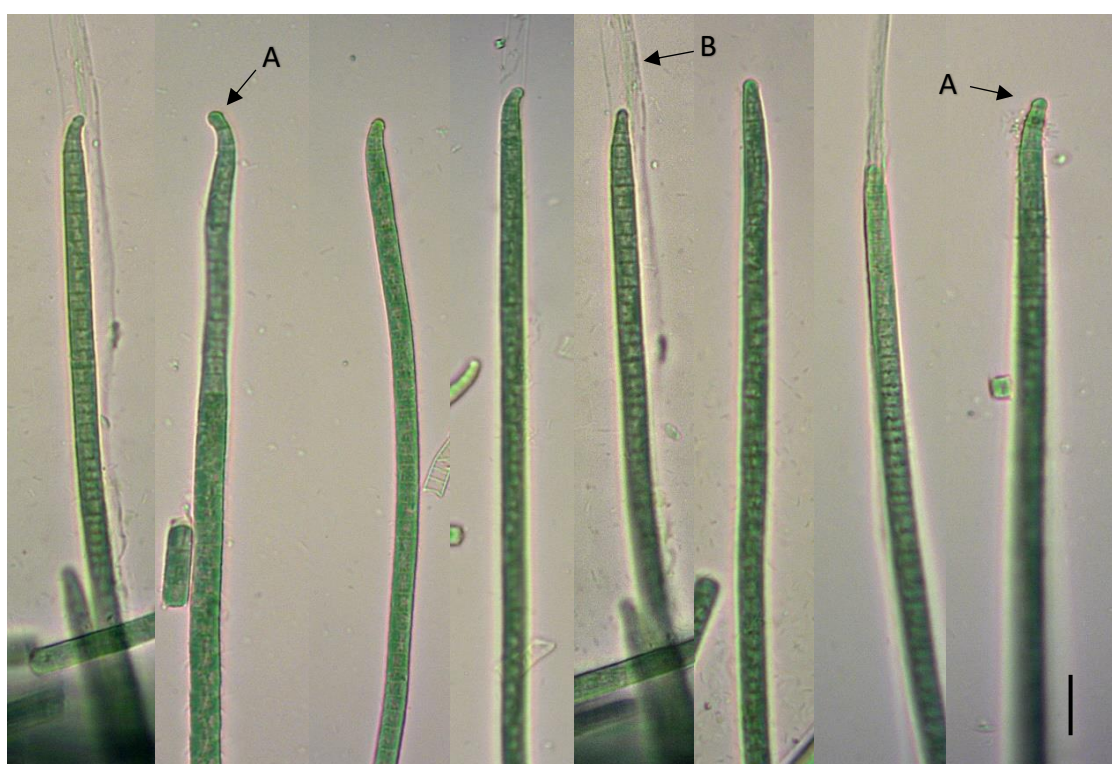
Obr. 49: *Kamptonema* sp. (XVI) , A – zaškrcované buňky, měřítko 10  $\mu$ m.



Obr. 50: *Microcoleus vaginatus* (III), A – kalyptra, měřítko 10  $\mu$ m.

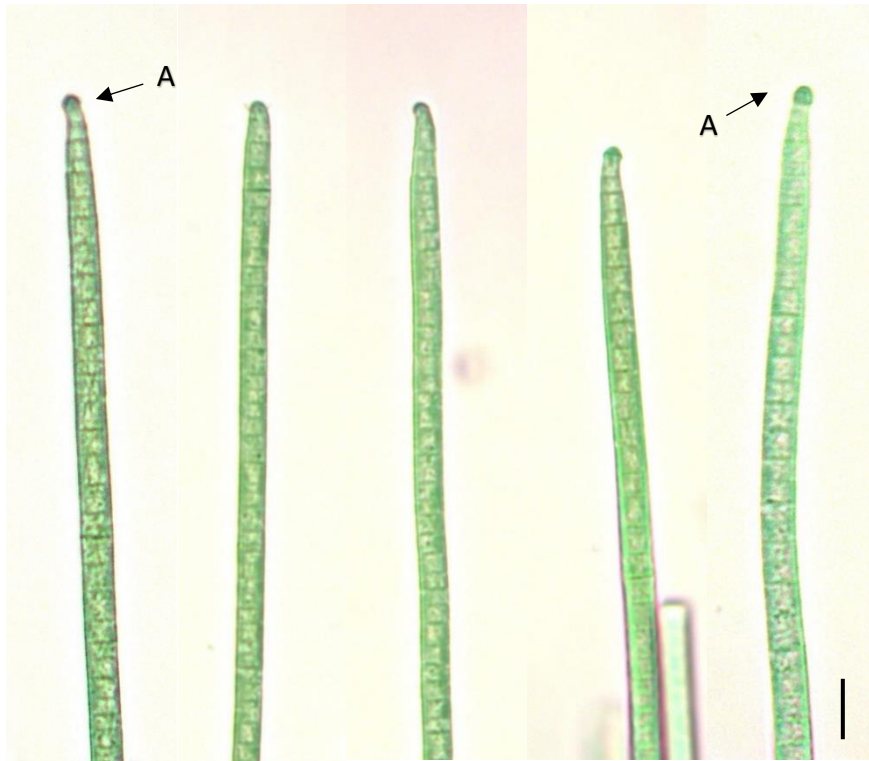


Obr. 51: *Microcoleus vaginatus* (XIII), A – kalyptra, B – zaškrcované buňky, měřítko 10  $\mu\text{m}$

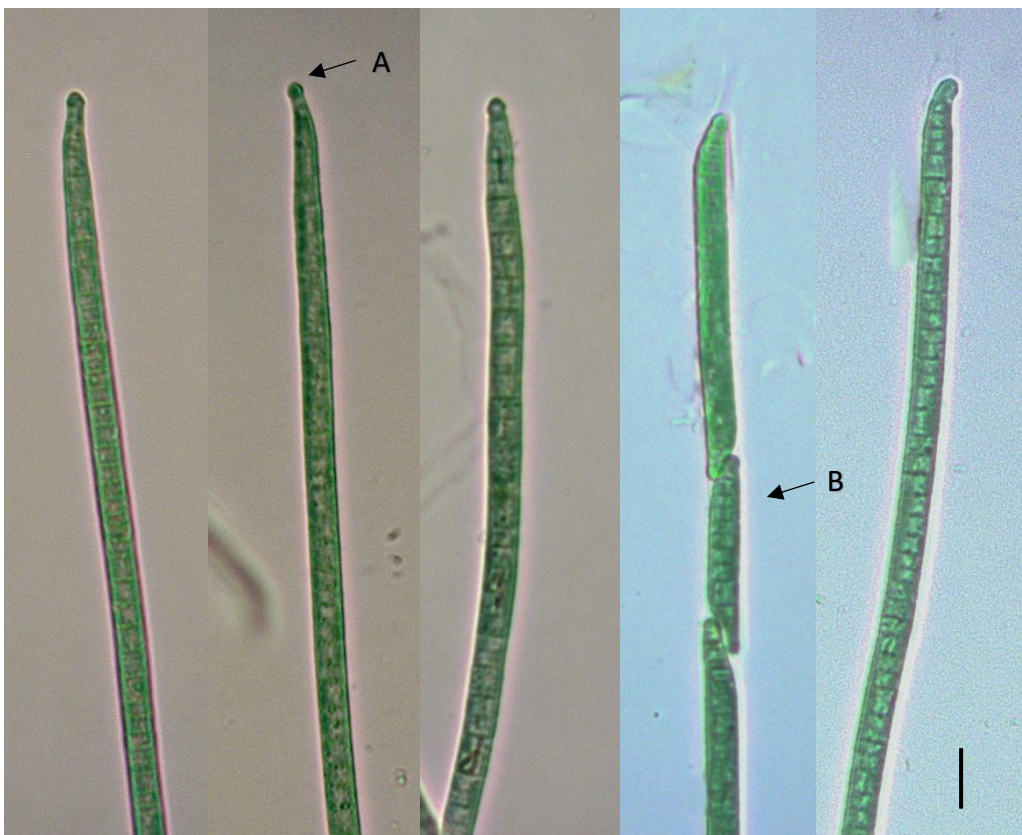


Obr. 52: *Microcoleus amoenus* (XVIII), A – kalyptra, B – slizová pochva, měřítko 10  $\mu\text{m}$

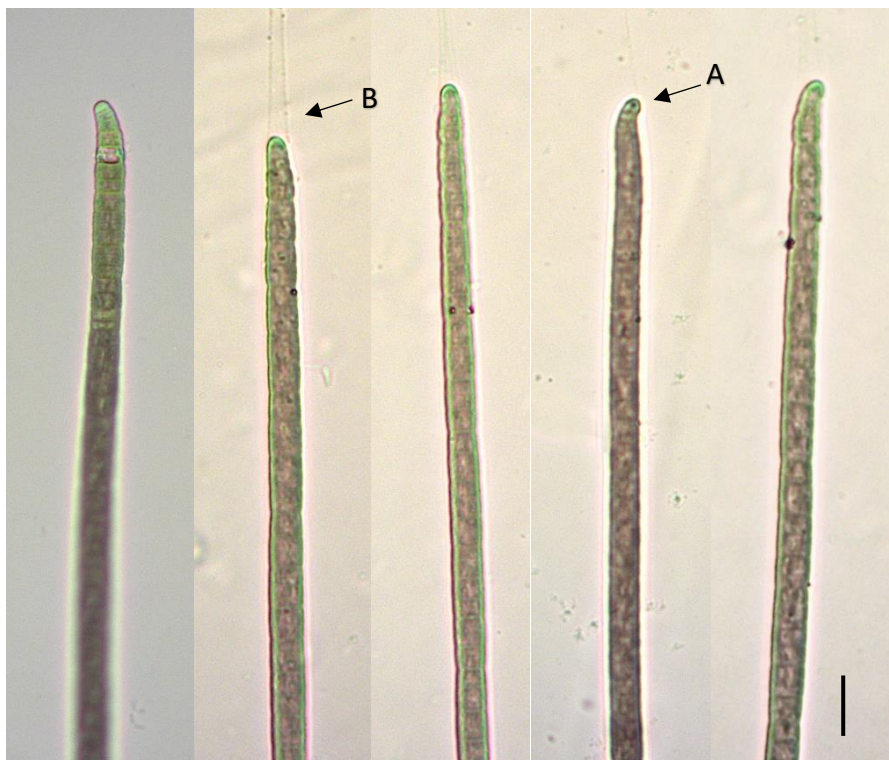




Obr. 53: *Microcoleus* sp. (I), A – kalyptra, měřítko 10  $\mu$ m.



Obr. 54: *Microcoleus* sp. (II), A – kalyptra, B – hormogonie, měřítko 10  $\mu$ m.



Obr. 55: *Microcoleus* sp. (VI), A – kalyptra, B – slizová pochva, měřítko 10  $\mu$ m.

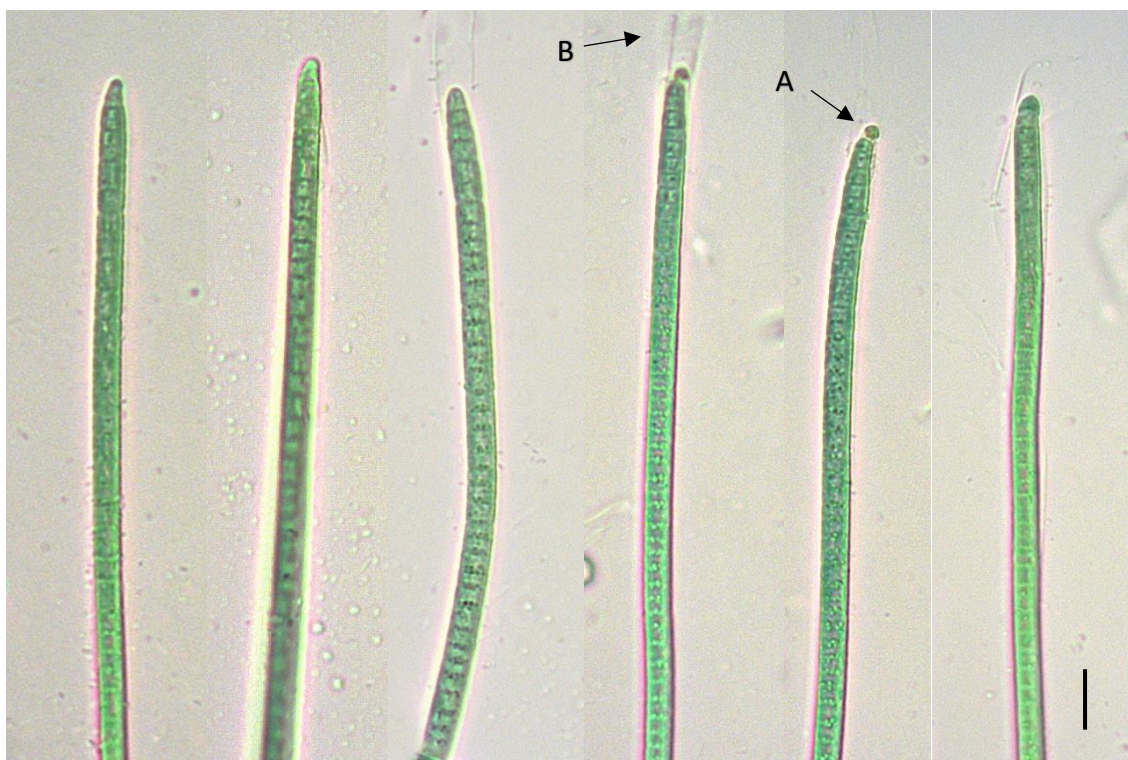


Obr. 56: *Microcoleus* sp. (VIII), A – kalyptra, měřítko 10  $\mu$ m.





Obr. 57: *Microcoleus* sp. (IX), A – kalyptra, B – slizová pochva, měřítko 10  $\mu$ m.

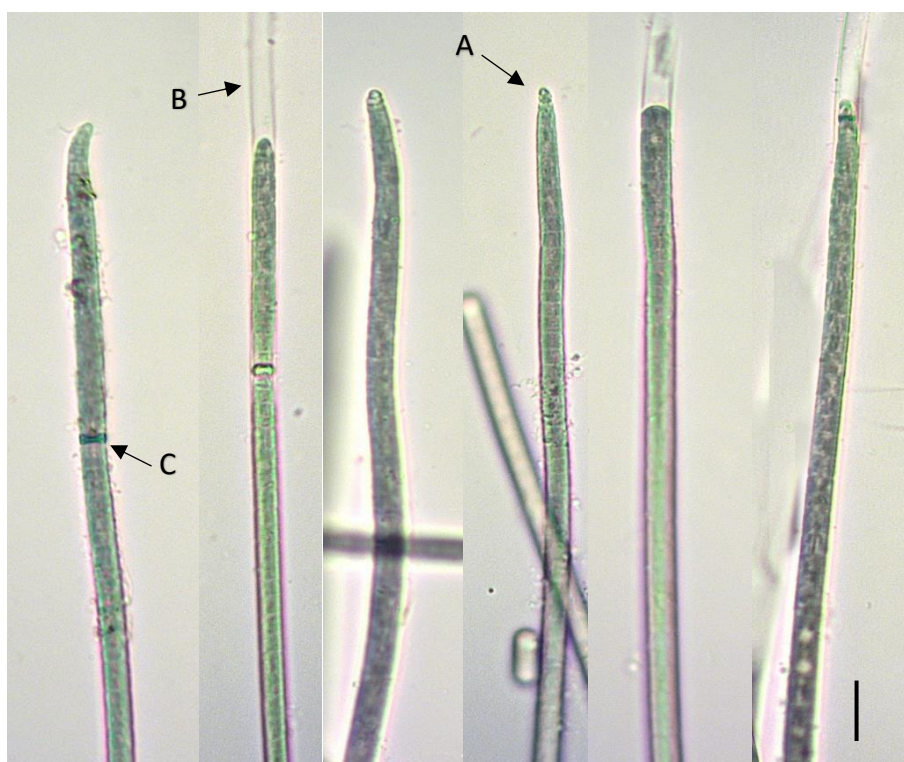


Obr. 58: *Microcoleus* sp. (XII), A – kalyptra, B – slizová pochva, měřítko 10  $\mu$ m.





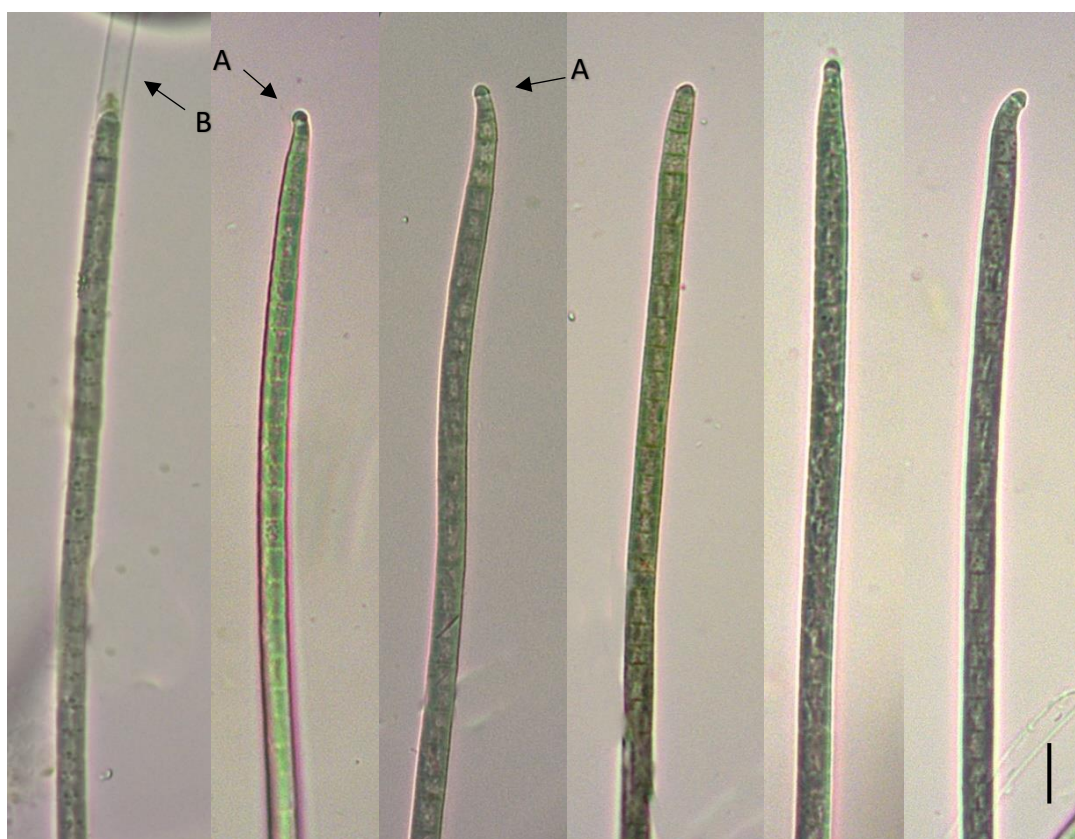
Obr. 59: *Microcoleus* sp. (XIV), A – kalyptra, měřítko 10 µm.



Obr. 60: *Microcoleus* sp. (XVII), A – kalyptra, B – slizová pochva, C – zaškrcované buňky, měřítko 10 µm.

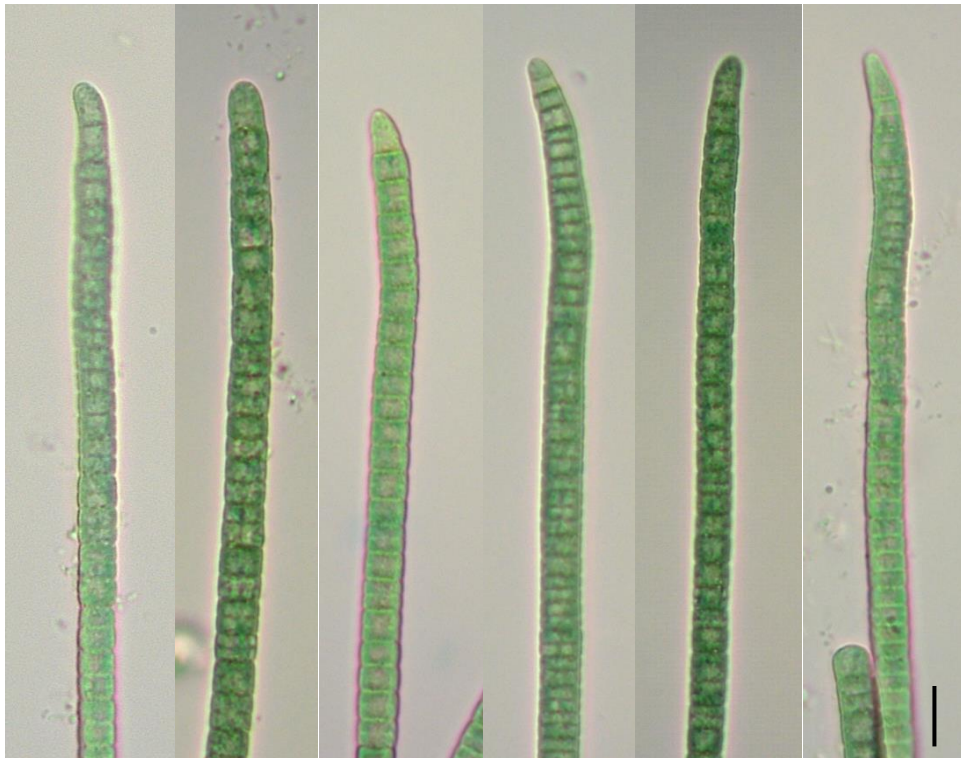


Obr. 61: *Microcoleus* sp. (XIX), A – kalyptra, měřítko 10  $\mu$ m.

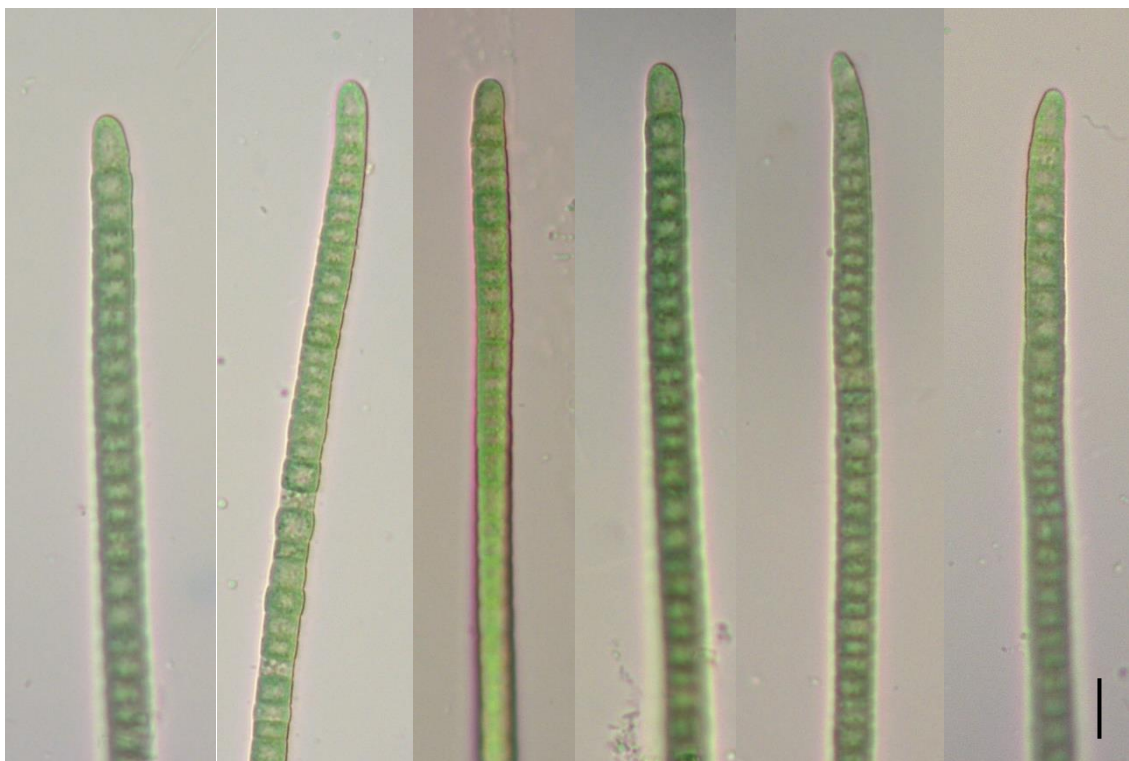


Obr. 62: *Microcoleus* sp. (XX), A – kalyptra, B – slizová pochva, měřítko 10  $\mu$ m.

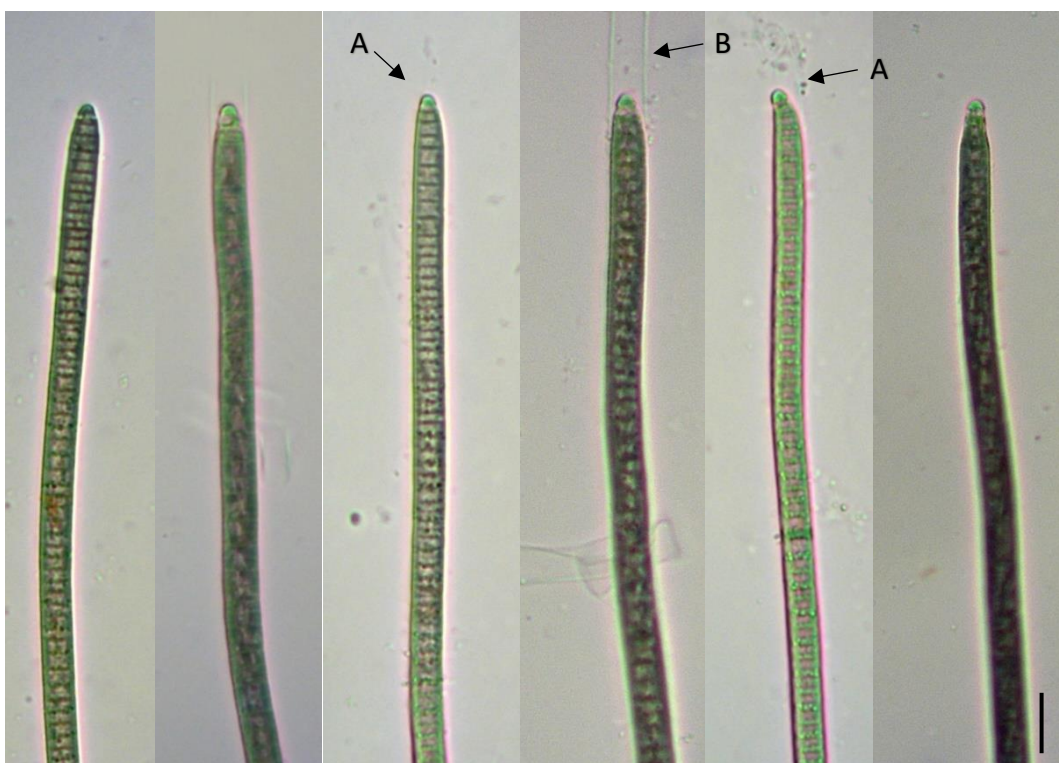




Obr. 63: *Ancylothrix* sp. (XI), měřítko 10  $\mu$ m.

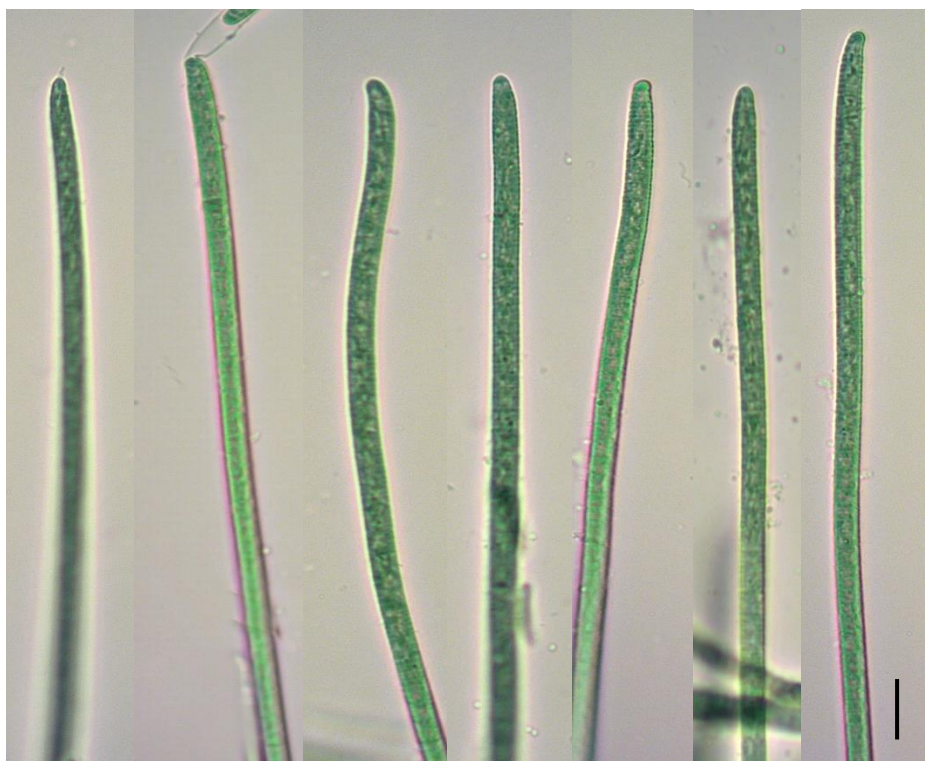


Obr. 64: *Ancylothrix* sp. (XXI), měřítko 10  $\mu$ m.

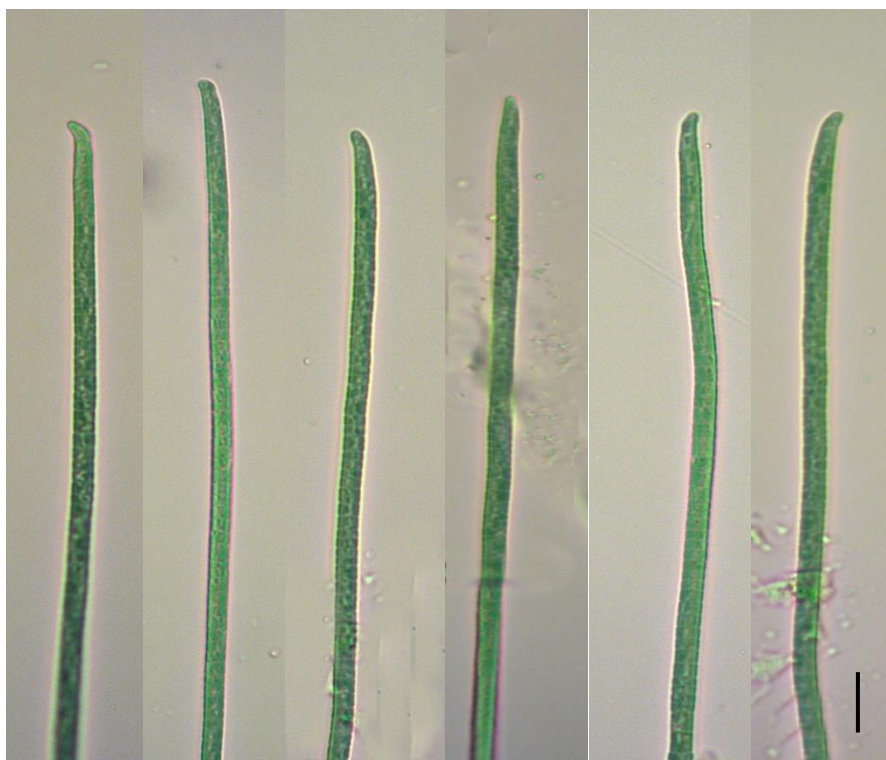


Obr. 65: *Phormidium* sp. (IV), A – kalyptra, B – slizová pochva, měřítko 10  $\mu$ m.

**Srovnávací kmeny izolované v rámci BP**

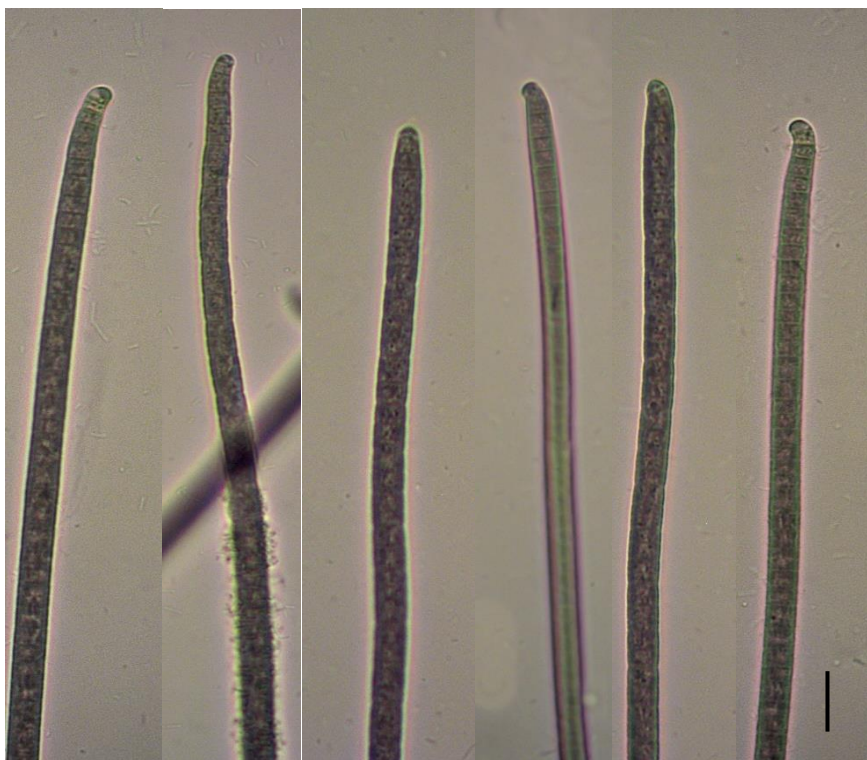


Obr. 66: *Kamptonema formosum* (C), měřítko 10  $\mu$ m.

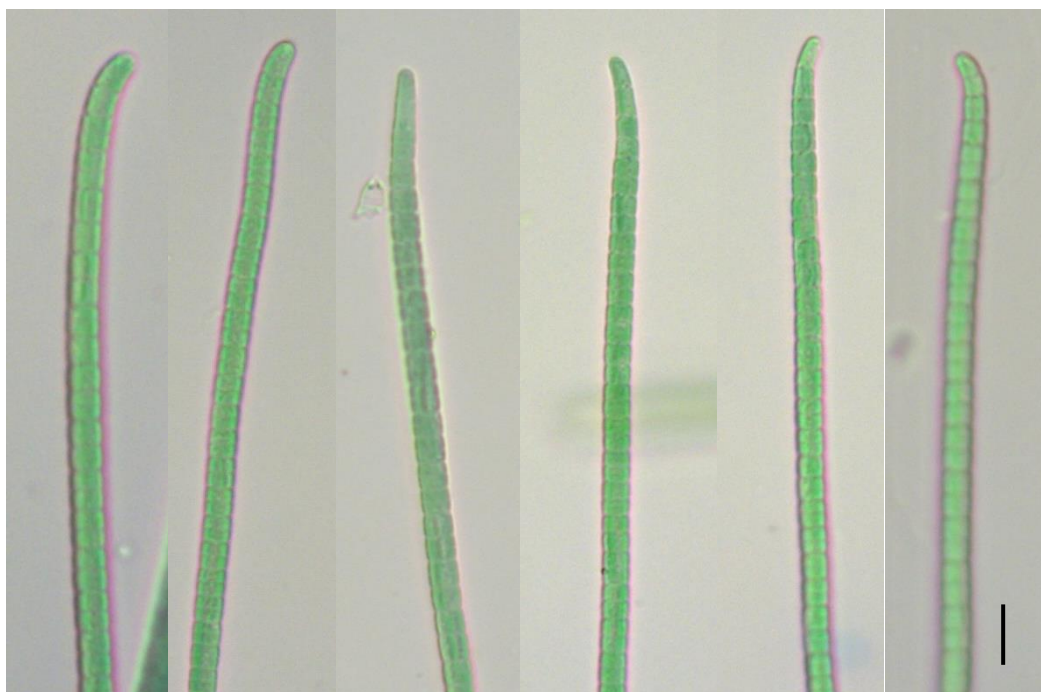


Obr. 67: *Kamptonema formosum* (D), měřítko 10  $\mu$ m.

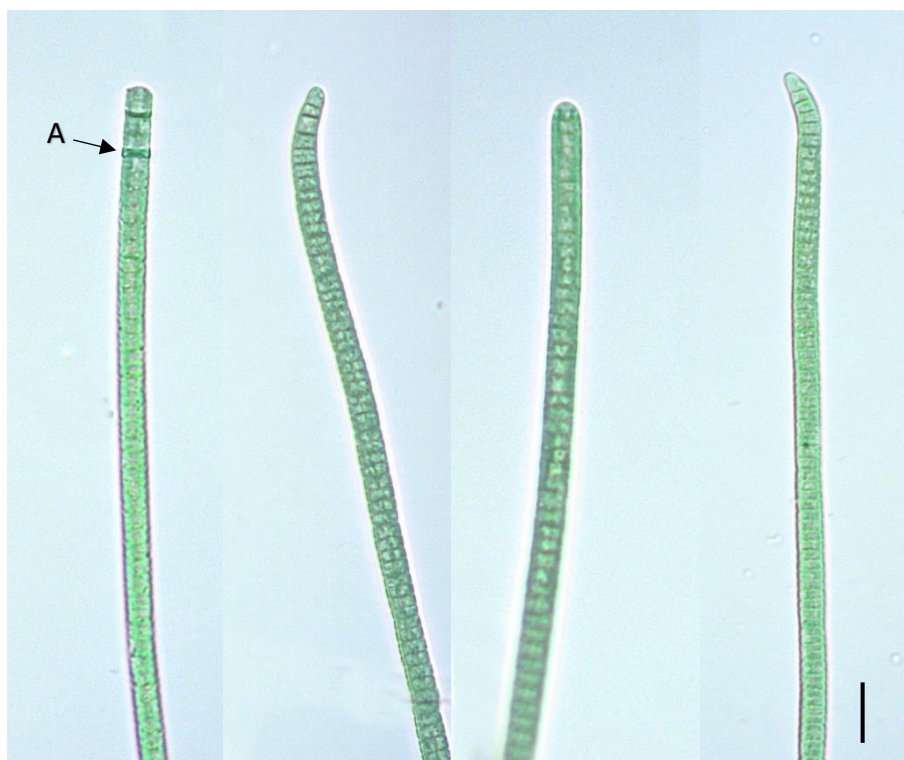




Obr. 68: *Kamptonema formosum* (E), měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



Obr. 69: *Kamptonema formosum* (EL 2), měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



Obr. 70: *Ancylothrrix* sp. (4), A – zaškrcované buňky, měřítko 10  $\mu$ m.

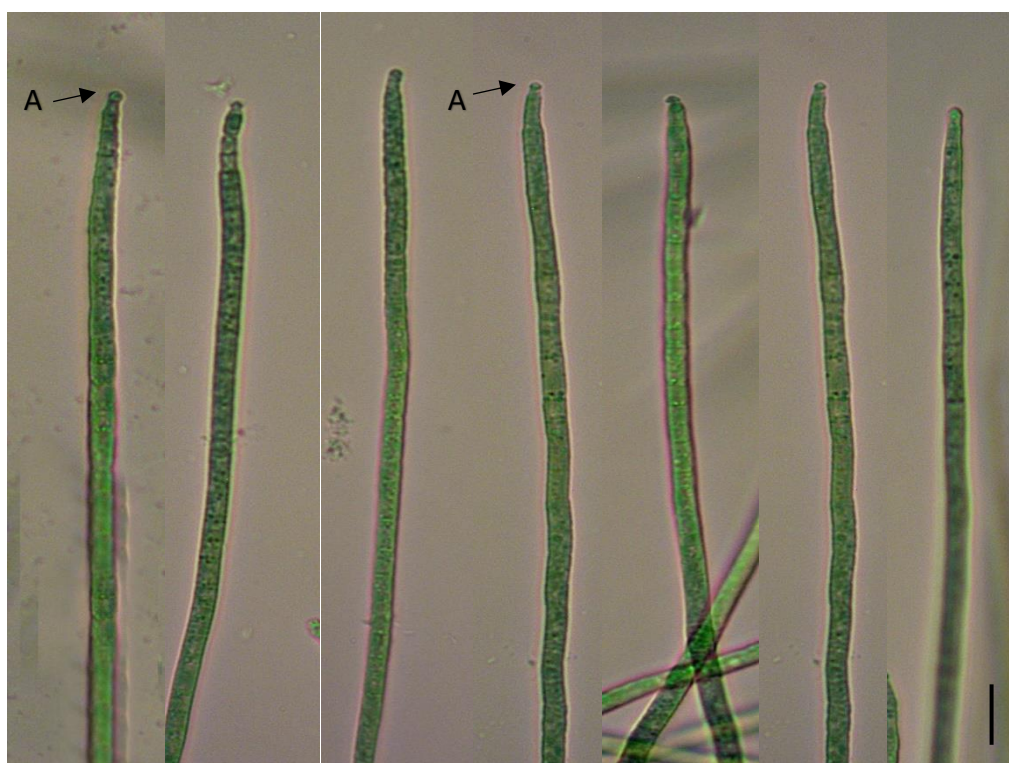


Obr. 71: *Microcoleus autumnalis* (7), A – kalyptra, B – zaškrcované buňky, měřítko 10  $\mu$ m.

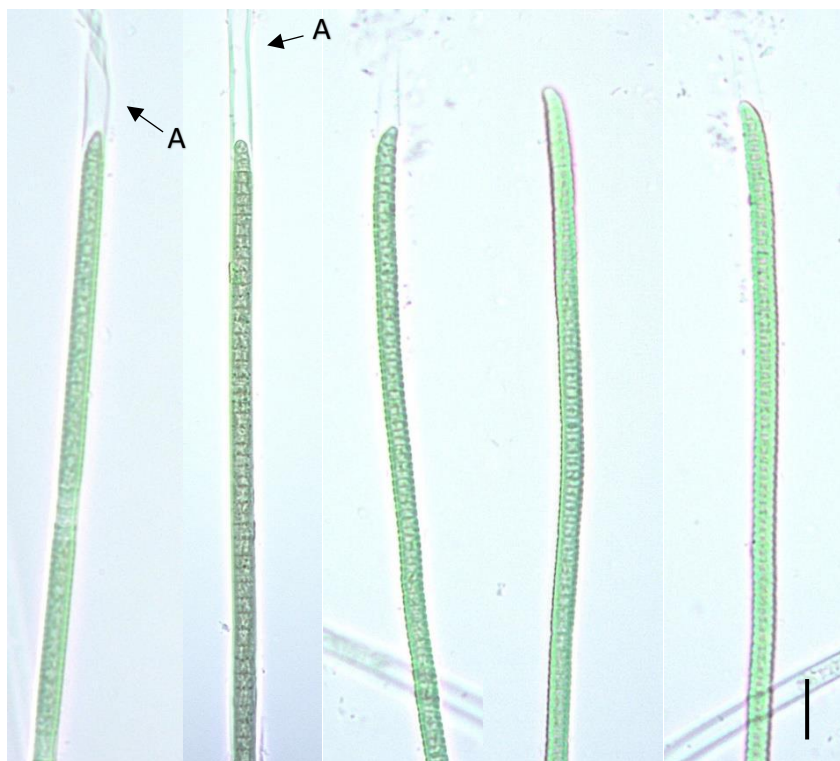




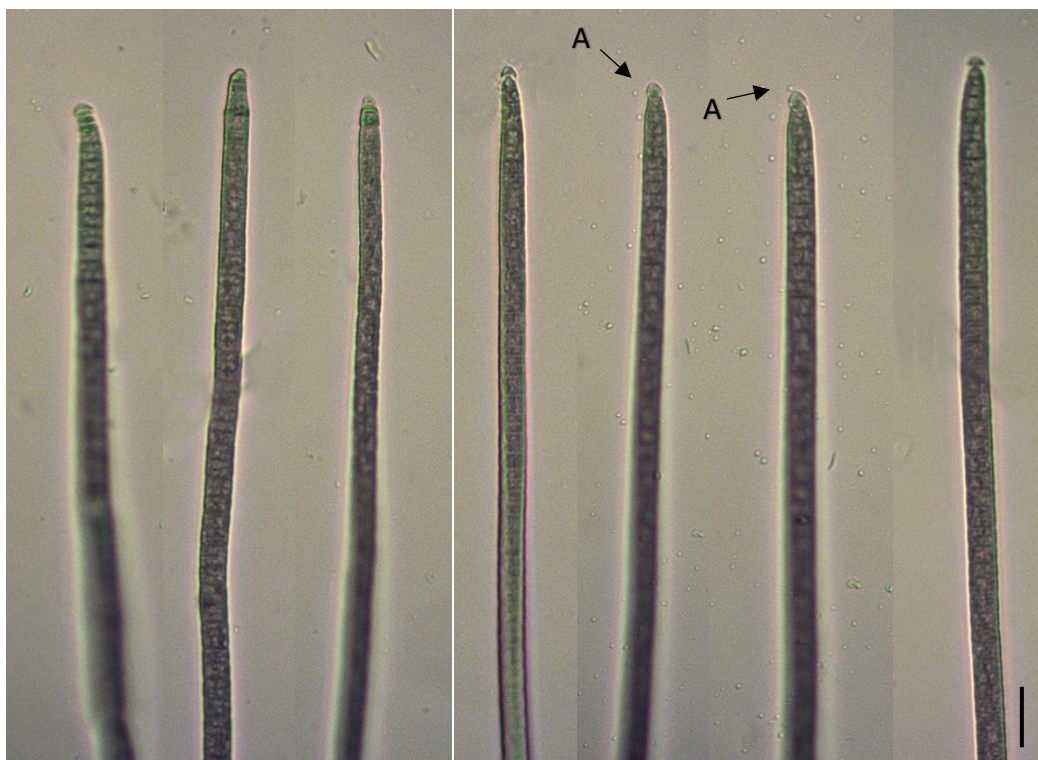
Obr. 72: *Microcoleus amoenus* (H), A – kalyptra, B – slizová pochva, měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



Obr. 73: *Microcoleus amoenus* (J), A – kalyptra, měřítko 10  $\mu\text{m}$ .



Obr. 74: *Microcoleus amoenus* (B), A – slizová pochva, měřítko 10  $\mu$ m.

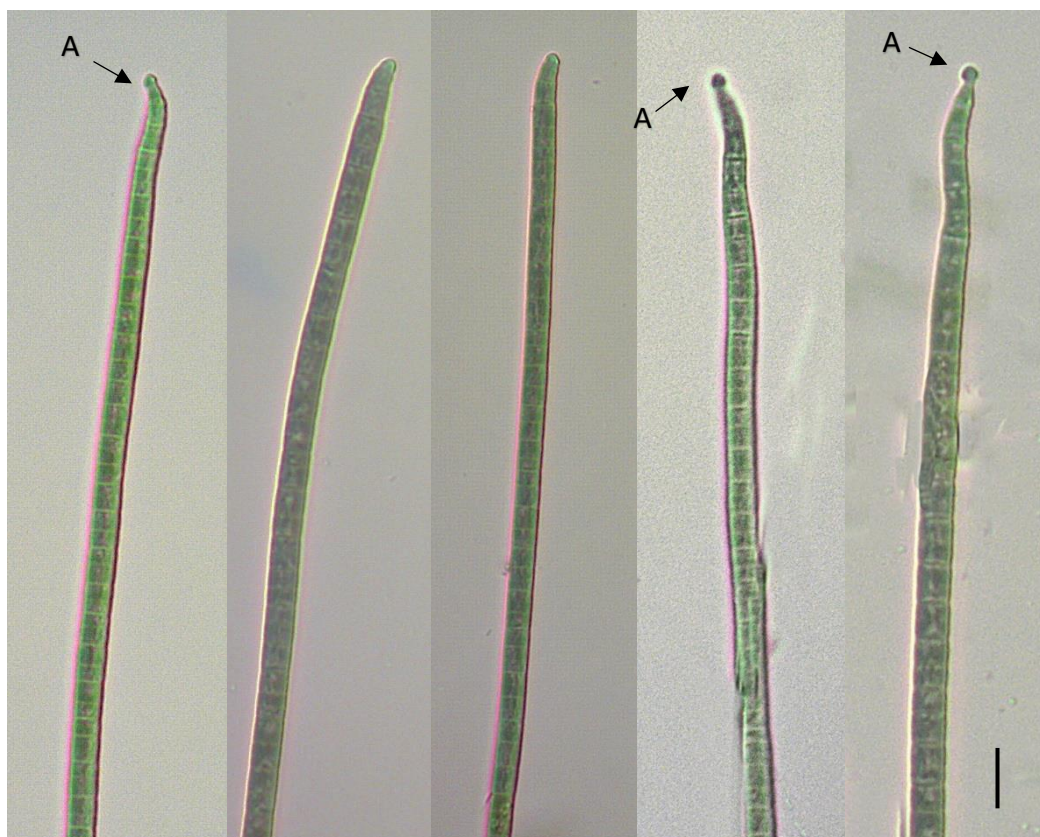


Obr. 75: *Microcoleus vaginatus* (1), A – kalyptra, měřítko 10  $\mu$ m.

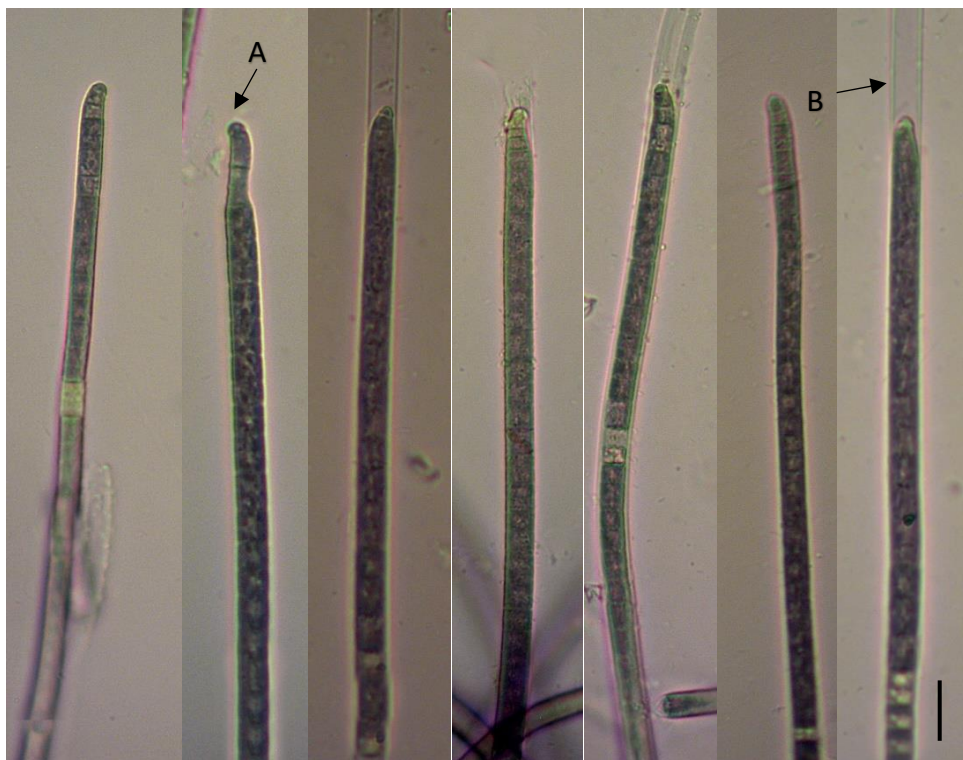




Obr. 76: *Microcoleus vaginatus* (G), A – slizová pochva, měřítko 10 µm.



Obr. 77: *Microcoleus* sp. (EL 1), A – kalyptra, měřítko 10 µm.



Obr. 78: *Microcoleus* sp. (F), A – kalyptra, B – slizová pochva, měřítko 10 μm.

### 3. Molekulární metody

#### 3.1 Analýza genu 16S rRNA

Pro fylogenetickou analýzu genu 16S rRNA jsem použila celkem 24 vyizolovaných kmenů. Do analýzy jsem zahrnula také čisté kmeny, které se mi podařilo získat v průběhu bakalářského studia (Tab. 3). Osekvenované kmeny jsem srovnala se sekvencemi podobných kmenů získaných z počítačové databáze BLAST. Ve fylogenetickém stromě jsou patrné 3 hlavní klastry – *Ancylothrix*, *Kamptonema* a *Microcoleus* (Obr. 79). Jako outgroup jsem použila sekvenci 16S rRNA genu *Gleobacter violaceus* PCC7421. Analýzu genu 16S rRNA jsem srovnala s výsledky proteomické analýzy MALDI-TOF, vytvořených sekundárních struktur ITS a s morfologickým zhodnocením.

##### Klastr *Ancylothrix*

Tři kmeny (XI, XXI, 4) vykazují fylogeneticky blízký vztah se skupinou *Ancylothrix*. Kmeny se podobají v sekvenci 16S rRNA genu (vysoká podobnost, p-distance 100%, Tab. 4), sekundárních strukturách helixů ITS oblasti, stejně tak i morfologicky (Obr. 12). U kmenů XI a XXI tomu nasvědčuje i výsledek proteomické analýzy. Ve srovnání se sekvencí druhu *Ancylothrix terrestris* získanou z databáze BLAST (Tab. 5) je zřejmé, že tyto dva kmeny budou spadat pod tento druh (p-distance = 97,73 % u obou kmenů).

Velmi zvláštní je pozice kmenů 4 a F. Oba kmeny vykazují vysokou molekulární podobnost, nicméně byly determinovány jako odlišné taxony (Obr. 70, 78). Kmen 4 je sice morfologicky velmi podobný kmenu *Ancylothrix*, ale molekulárně má velkou odlišnost už na úrovni rodu (Obr. 79, 86, Tab. 5). S ohledem na tuto skutečnost navrhuji ustanovení nového rodu *Pseudoancylothrix* gen. nov., jehož popis bude součástí připravované publikace.

##### Klastr *Kamptonema*

Celkem čtyři kmeny (E, C, X, VII) byly podle výsledku fylogenetického stromu podobné skupině zahrnující rod *Kamptonema*. Kmeny C a X mají nejbližší fylogenetický vztah s druhem *Kamptonema formosum*, což dokazuje podpora, která přesahuje hodnoty nad 90 i vysoké procentuální p-distance (Tab. 4). Naopak kmeny E a VII jsou v rámci sinic z okruhu rodu *Kamptonema* samostatnější. Kmen VII je umístěn na stejné větvi s *K. animale* CCALA 139 a vykazuje s ním velkou podobnost (p-distance = 99,32%) (Tab. 5). Kmen E tvoří rovněž samostatnou větev a nevykazuje větší podobnost s ostatními zástupci rodu (p-distance ~ 91%). Nachází se společně na větvi s kmenem *Pantanalinema rosanae* CMAA 1559, přičemž



podpora dosahuje hodnoty 99. Podobně kmeny *Kamptonema formosum* C a VII mezi sebou nevykazují významnou úroveň molekulární podobnosti, i když je fylogenetická analýza řadí do svojí blízkosti. Rozlišování *K. animale* a *K. formosum* podléhá do jisté míry subjektivnímu posouzení, tudíž následná interpretace molekulárních dat může být ovlivněna.

#### Klastr *Microcoleus*

Kmeny označeny jako *Microcoleus* spadají podle fylogenetické analýzy do jednoho společného klastru, který však vykazuje značnou vnitřní heterogenitu (Obr. 79). Do klastru *Microcoleus* patří kmeny *Microcoleus amoenus* (kmen H, XVIII, B, J), *Microcoleus vaginatus* (kmen G, III, 1, XIII), *Microcoleus autumnalis* (kmen 7) a *Microcoleus* sp. (kmen F, XIV, I, II, XII).

Z fylogenetického stromu je patrná dobře definovaná skupina zahrnující druhy *Microcoleus amoenus* s hodnotou podpory 82. Tomu odpovídá i morfologie vláken (Obr. 52, 72, 74) a výsledný dendrogram (Obr. 86).

Samostatnou větev podle fylogenetiky (Obr. 79) tvoří kmen J. Sice je ve skupině s druhy *Microcoleus vaginatus*, ale podle morfologie by se mělo pravděpodobně jednat o druh *Microcoleus amoenus* (Obr. 73). To potvrzuje i proteomická analýza MALDI-TOF, kde je společně v jedné skupině s kmeny *Microcoleus amoenus* (Obr. 86).

Z celého okruhu rodu *Microcoleus* vykazuje velmi vysokou podobnost (p-distance = 99-100%) více kmenů. Jedná se o kmeny G, III, 1, J, I, II, XIV, 7, XIII, XII. Hodnota p-distance naznačuje, že by se mohlo jednat o stejné druhy. V rámci klastru ve fylogenetickém stromě však vykazují větší molekulární variabilitu, proto se nachází na více větvích. Přesné určení do druhu je velmi komplikované a musí být využito jak molekulární, tak morfologické vyhodnocení.

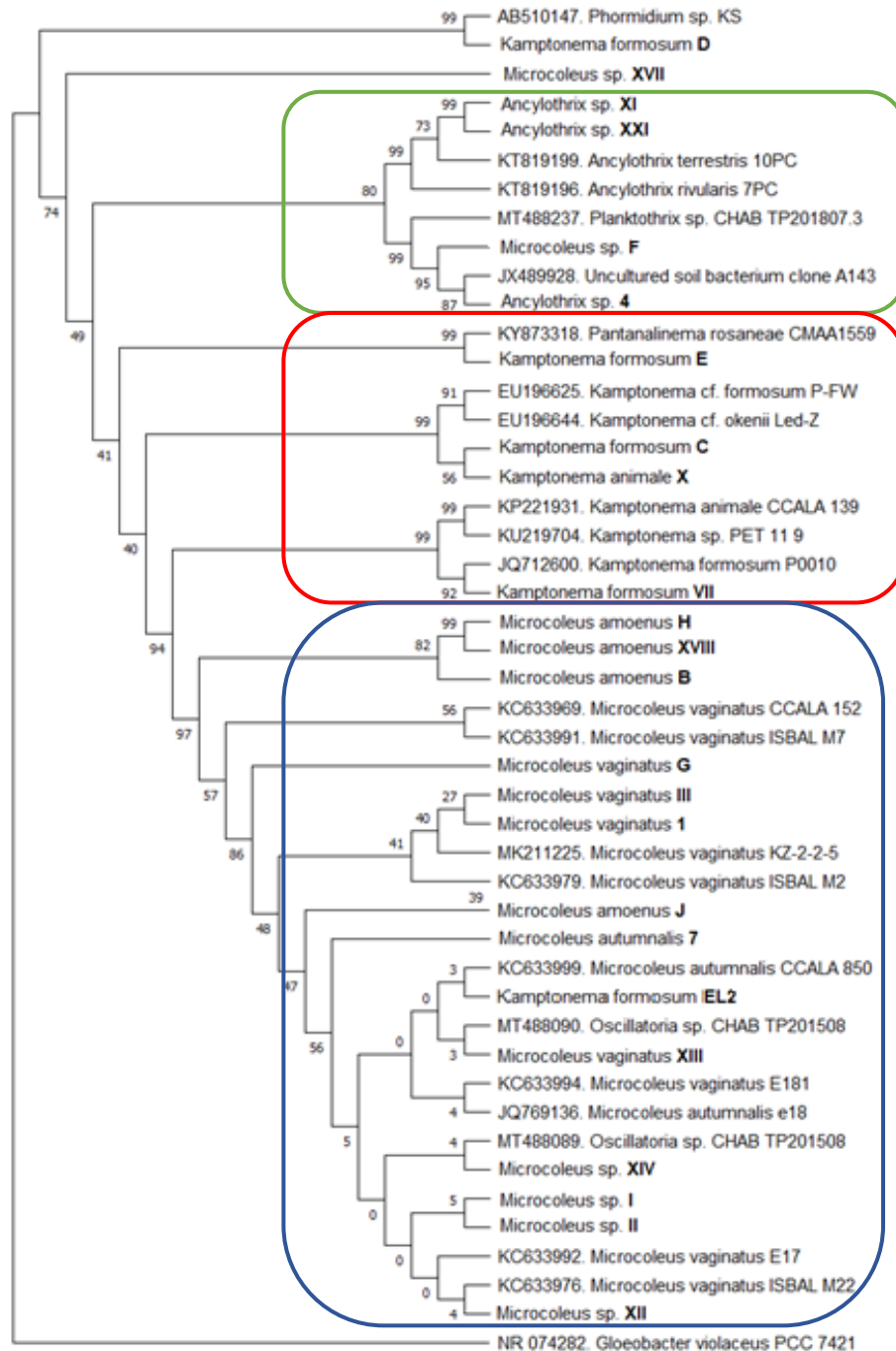
### Hodnocení sekundárních struktur helixů ITS oblasti

Podle morfologických znaků, fylogenetického stromu, ITS struktur i proteomické analýzy lze říct, že kmeny H, XVIII, B spadají s velkou jistotou pod druh *Microcoleus amoenus*. U kmene J (*Microcoleus amoenus*), je sekundární struktura D1-D1' helix (Obr. 80) podobná s kmenem B, ale v Boxu B už se struktura liší (Obr. 81). Naproti tomu téměř identická sek. struktura D1-D1' helix je patrná u kmenů XVIII a H. Velmi vysokou podobnost mezi těmito kmeny dokazuje i hodnota p-distance, která je rovna 100.

Kmen číslo 1 je podobný podle sekundární struktury Boxu B druhu *Microcoleus amoenus* (Obr. 81), ale podle fylogenetického stromu a proteomické analýzy se jedná o kmen *Microcoleus vaginatus* (Obr. 79, 86).

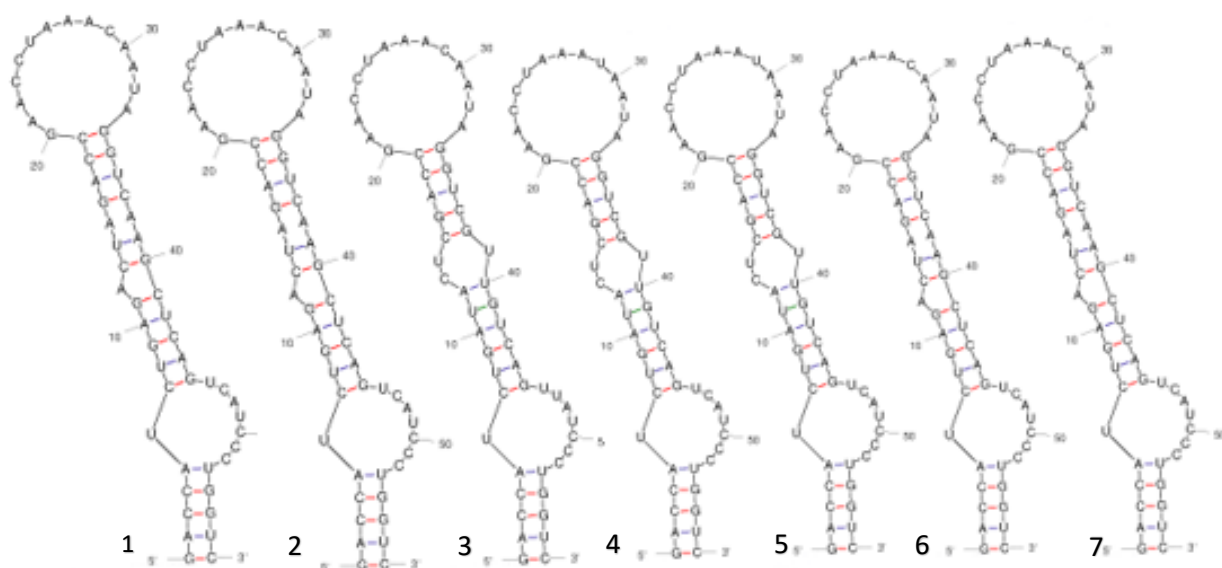
Ostatní druhy, které jsou označeny jako *Microcoleus* sp. mají velmi podobné sekundární struktury D1-D1' helixu mezi sebou i v porovnání s ostatními kmeny rodu *Microcoleus* (Obr. 80, 82). Na základě velmi podobné struktury Boxu B u kmenů I, II, a XII (Obr. 83), fylogenetiky i hodnot p-distance (100 % mezi těmito kmeny) lze předpokládat, že se bude jednat o identický druh (Tab. 4), i přes to, že se D1-D1' helix mezi kmeny I a II mírně liší.

Kmeny XVII a D jsou podle analýzy genu 16S rRNA, proteomické analýzy i p-distance (Tab. 4) odlišné od celého klastru *Microcoleus* i *Kamptonema*, ale na základě morfologie by se mělo jednat u kmene XVII o rod *Microcoleus* (Obr. 60), což dokazuje i podobná sekundární struktura D1-D1' helixu (Obr. 82) i Boxu B (Obr. 83). U kmene D je zajímavá sekundární struktura D1-D1' helixu, která nevykazuje podobnost s jinými sek. strukturami (Obr. 84). Podle morfologie by se mělo jednat o druh *Kamptonema formosum* (Obr. 67). Podle MALDI-TOF (Obr. 86) jsou tyto dva kmeny příbuzné s kmeny X a C (*Kamptonema animale* a *Kamptonema formosum*). Neshoda by mohla být dána možnou leptolyngbyoidní kontaminací vzorku.

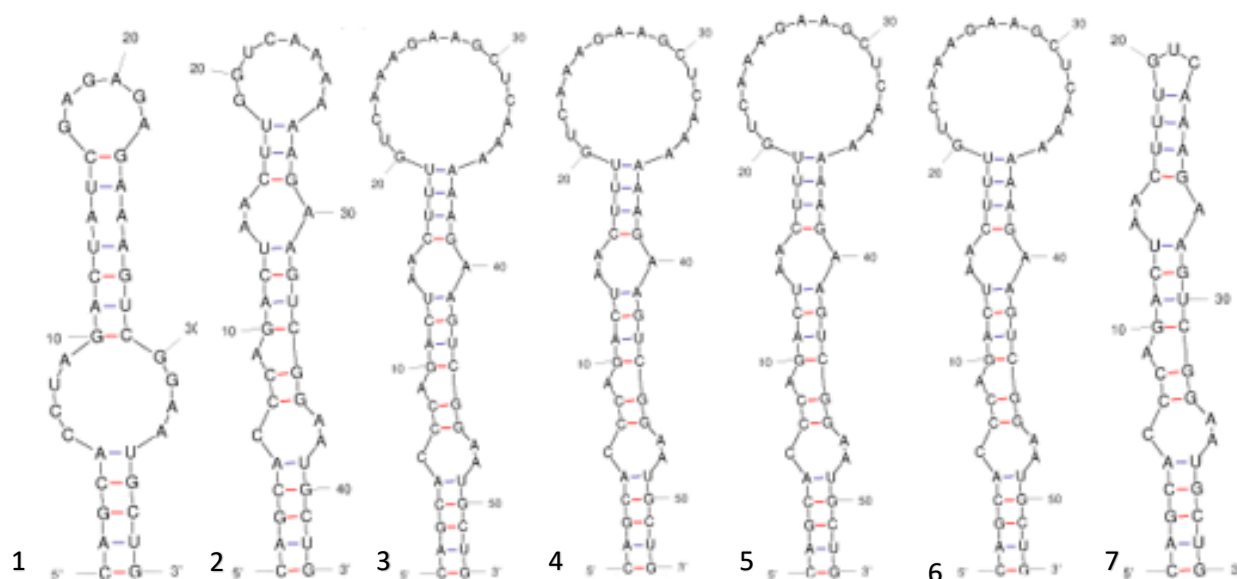


Obr. 79: Fylogenetický strom vytvořený na základě sekvencí genu 16S rRNA pomocí metody Maximum Likelihood (ML) a Tamura-3-parametr modelu v programu MEGA X. Analýza zahrnovala celkem 47 nukleotidových sekvencí. Tučně zvýrazněné jsou mnou izolované kmeny, ostatní srovnávací z databáze BLAST. *Gloebacter violaceus* přidán dodatečně jako outgroup. Zeleně – *Ancylothrix*, červeně – *Kamptonema*, modře – *Microcoleus*.

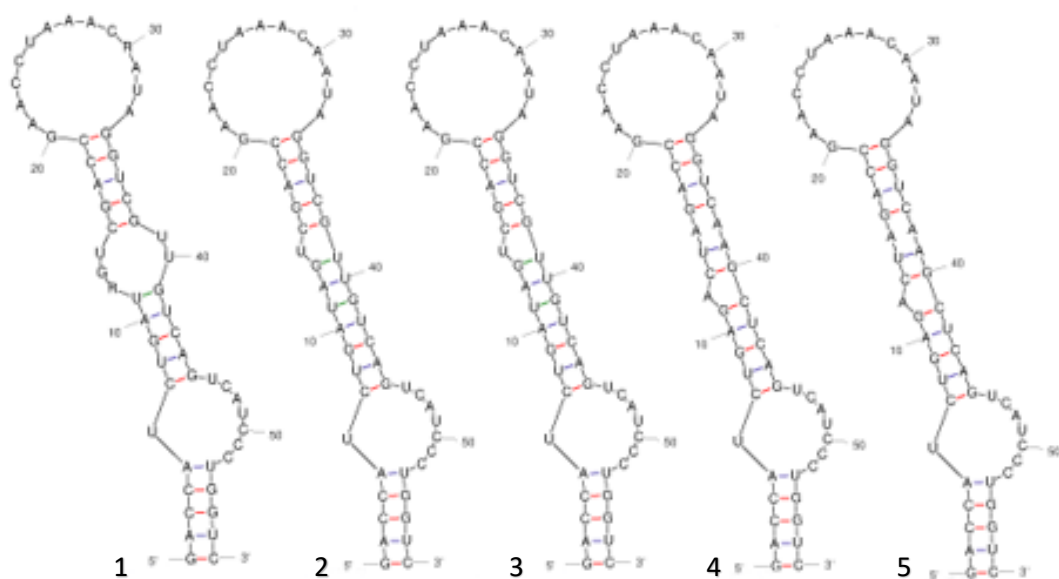
### 3.2. Sekundární struktury ITS



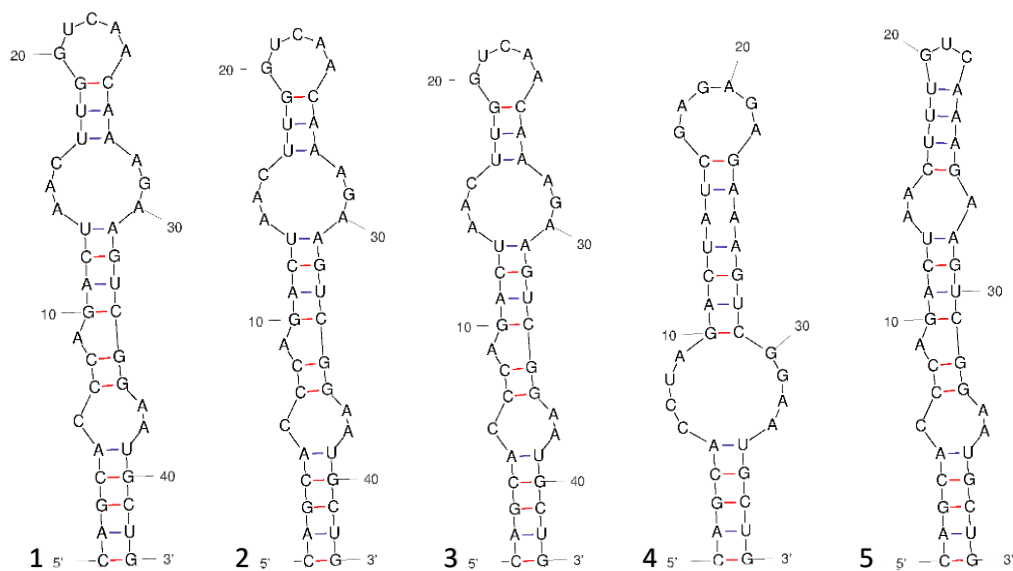
Obr. 80: 16S–23S ITS sekundární struktura (**D1-D1' helix**); *Microcoleus vaginatus* (1 – kmen **XIII**, 2 – kmen **G**, 3 – kmen **1**), *Microcoleus amoenus* (4 – kmen **XVIII**, 5 – kmen **H**, 6 – kmen **B**, 7 – kmen **J**).



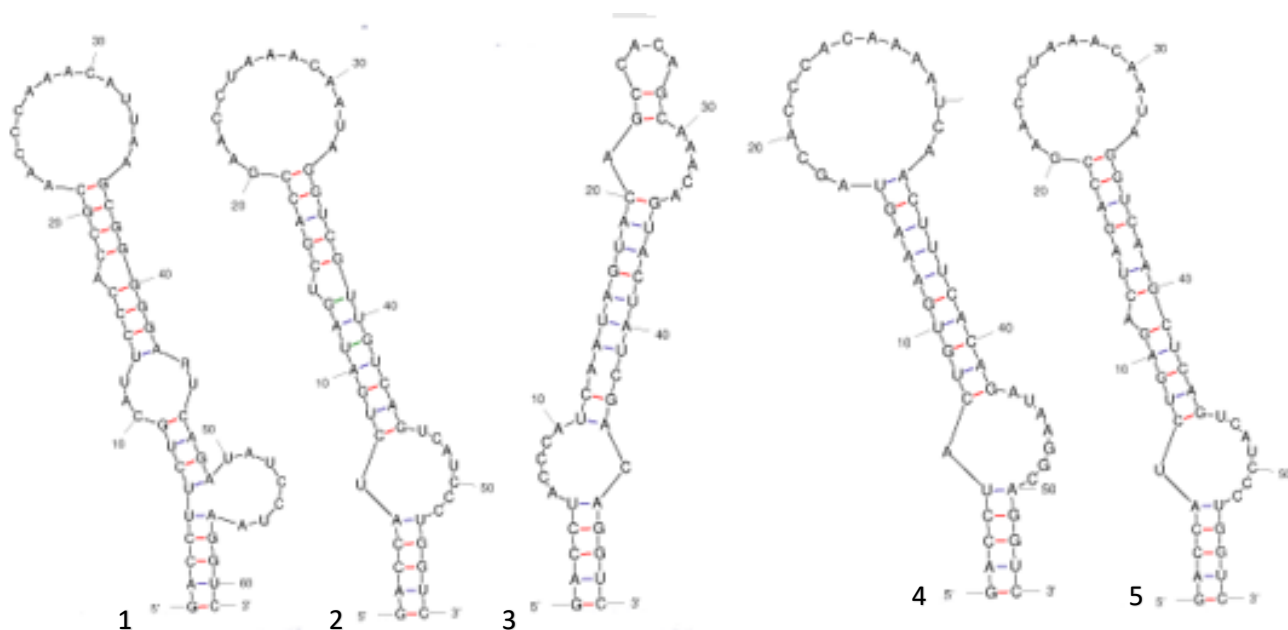
Obr. 81: 16S–23S ITS sekundární struktura (**Box B helix**); *Microcoleus vaginatus* (1 – kmen **XIII**, 2 – kmen **G**, 3 – kmen **1**), *Microcoleus amoenus* (4 – kmen **XVIII**, 5 – kmen **H**, 6 – kmen **B**, 7 – kmen **J**).



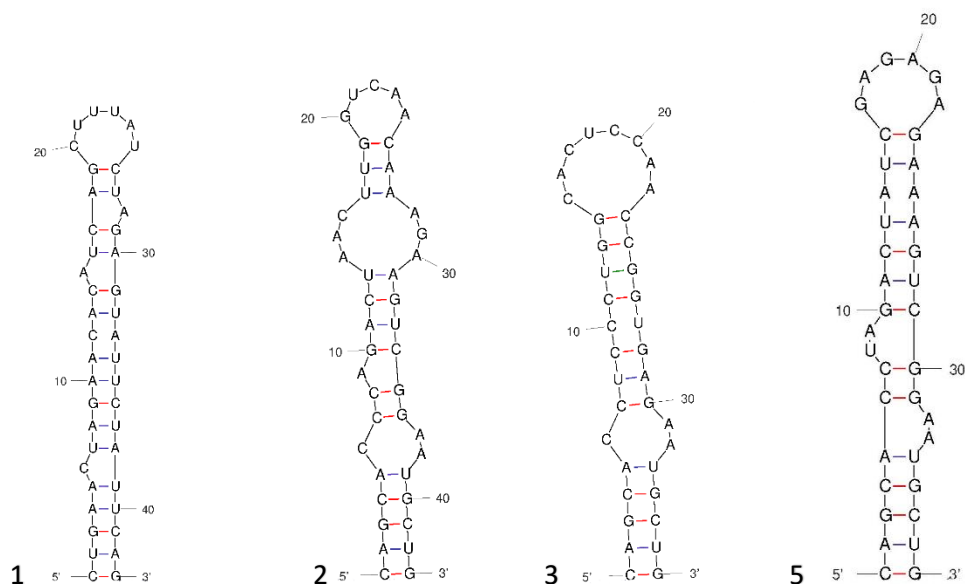
Obr. 82: 16S–23S ITS sekundární struktura (**D1-D1' helix**); *Microcoleus* sp. (1 – kmen **I**, 2 – kmen **II**, 3 – kmen **XII**, 4 – kmen **XIV**, 5 – kmen **XVII**).



Obr. 83: 16S–23S ITS sekundární struktura (**Box B helix**); *Microcoleus* sp. (1 – kmen **I**, 2 – kmen **II**, 3 – kmen **XII**, 4 – kmen **XIV**, 5 – kmen **XVII**).



Obr. 84: 16S–23S ITS sekundární struktura (**D1-D1' helix**); *Kamptonema formosum* (1 – kmen C, 2 – kmen **EL2**, 3 – kmen **D**), *Ancylothrrix* sp. (4 – kmen **XXI**), *Microcoleus autumnalis* (5 – kmen **7**).



Obr. 85: 16S–23S ITS sekundární struktura (**Box B helix**); *Kamptonema formosum* (1 – kmen C, 2 – kmen **EL2**, 3 – kmen **D**), *Microcoleus autumnalis* (5 – kmen **7**). Kmen **XXI** (4) chybí kvůli absenci sekvence pro Box B helix.

Tab. 4: Podobnosti mezi jednotlivými kmeny v rámci sekvenovaného genu 16S rRNA – tučně indikuje stejný rod ( $\geq 97,5\%$ ), *Ancylothrix* (modře), *Kamptonema* (žlutě), *Microcoleus* (zeleně)

	XVII	D	C	X	I	II	G	1	7	XIII	XIV	III	XII	J	XVIII	B	H	4	VII	XI	XXI	E	F
<b>XVII</b>	*																						
<b>D</b>	89,02	*																					
<b>C</b>	88,90	89,46	*																				
<b>X</b>	89,68	90,09	<b>99,46</b>	*																			
<b>I</b>	89,96	90,51	92,84	93,17	*																		
<b>II</b>	89,93	90,48	92,82	93,15	<b>100,00</b>	*																	
<b>G</b>	89,77	90,46	92,53	92,87	<b>99,73</b>	<b>99,73</b>	*																
<b>1</b>	89,69	90,37	92,70	93,04	<b>99,73</b>	<b>99,73</b>	<b>99,73</b>	*															
<b>7</b>	89,96	90,51	92,84	93,17	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>99,73</b>	<b>99,73</b>	*														
<b>XIII</b>	89,96	90,51	92,84	93,17	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>99,73</b>	<b>99,73</b>	<b>100,00</b>	*													
<b>XIV</b>	89,96	90,51	92,84	93,17	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>99,73</b>	<b>99,73</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	*												
<b>III</b>	89,64	90,32	92,66	93,00	<b>99,73</b>	<b>99,73</b>	<b>99,73</b>	<b>100,00</b>	<b>99,73</b>	<b>99,73</b>	<b>99,73</b>	*											
<b>XII</b>	89,96	90,51	92,84	93,17	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>99,73</b>	<b>99,73</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>99,73</b>	*										
<b>J</b>	89,83	90,51	92,84	93,17	<b>99,87</b>	<b>99,87</b>	<b>99,60</b>	<b>99,87</b>	<b>99,87</b>	<b>99,87</b>	<b>99,87</b>	<b>99,87</b>	<b>99,87</b>	*									
<b>XVIII</b>	89,69	89,84	92,43	92,77	<b>98,40</b>	<b>98,39</b>	<b>98,66</b>	<b>98,40</b>	<b>98,40</b>	<b>98,40</b>	<b>98,40</b>	<b>98,39</b>	<b>98,40</b>	<b>98,26</b>	*								
<b>B</b>	88,09	88,50	92,70	93,04	96,26	96,25	96,51	96,26	96,26	96,26	96,26	96,24	96,26	96,12	<b>97,59</b>	*							
<b>H</b>	89,69	89,84	92,43	92,77	<b>98,40</b>	<b>98,39</b>	<b>98,66</b>	<b>98,40</b>	<b>98,40</b>	<b>98,40</b>	<b>98,40</b>	<b>98,39</b>	<b>98,40</b>	<b>98,26</b>	<b>100,00</b>	<b>97,59</b>	*						
<b>4</b>	87,15	88,64	88,38	88,62	89,71	89,68	89,65	89,57	89,71	89,71	89,71	89,52	89,71	89,71	89,30	87,57	89,30	*					
<b>VII</b>	91,32	91,87	91,92	92,40	96,21	96,20	96,32	96,34	96,21	96,21	96,21	96,32	96,21	96,21	96,21	94,58	96,21	89,43	*				
<b>XI</b>	87,28	89,30	88,92	89,56	90,37	90,35	90,73	90,64	90,37	90,37	90,37	90,59	90,37	90,51	90,91	89,04	90,91	90,11	91,46	*			
<b>XXI</b>	87,28	89,30	88,92	89,56	90,37	90,35	90,73	90,64	90,37	90,37	90,37	90,59	90,37	90,51	90,91	89,04	90,91	90,11	91,46	<b>100,00</b>	*		
<b>E</b>	90,15	88,95	90,87	91,50	92,45	92,43	92,82	92,72	92,45	92,45	92,45	92,69	92,45	92,59	91,91	91,24	91,91	87,33	93,17	88,68	88,68	*	
<b>F</b>	87,82	88,24	88,39	88,50	89,86	89,84	89,81	89,73	89,86	89,86	89,86	89,67	89,86	89,86	89,59	87,57	89,59	<b>98,78</b>	89,73	89,73	89,73	87,33	*



Tab. 5: Podobnosti mezi jednotlivými kmeny v rámci sekvenovaného genu 16S rRNA – tučně indikuje stejný rod ( $\geq 97,5\%$ ), %, *Ancylothrix* (modře), *Kamptonema* (žlutě), *Microcoleus* (zeleně)

	10PC	7PC	4	XXI	XI	F	E	VII	D	C	X	B	XVII	I	CCALA139
<i>Ancylothrix_terrestris</i> _10PC	<b>100,00</b>														
<i>Ancylothrix_rivularis</i> _7PC	95,68	<b>100,00</b>													
4	90,39	88,79	<b>100,00</b>												
XXI	<b>97,73</b>	96,93	90,24	<b>100,00</b>											
XI	<b>97,73</b>	96,93	90,24	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>										
F	90,14	89,05	<b>98,78</b>	89,85	89,85	<b>100,00</b>									
E	88,27	88,54	87,42	88,65	88,65	87,41	<b>100,00</b>								
VII	91,19	91,06	89,52	91,44	91,44	89,82	93,17	<b>100,00</b>							
D	90,37	88,37	88,72	89,28	89,28	88,33	88,95	91,87	<b>100,00</b>						
C	90,00	89,05	88,48	88,90	88,90	88,49	90,87	91,92	89,46	<b>100,00</b>					
X	90,50	89,56	88,71	89,53	89,53	88,59	91,50	92,40	90,09	<b>99,46</b>	<b>100,00</b>				
B	88,37	89,57	87,65	89,01	89,01	87,65	91,24	94,58	88,50	92,70	93,04	<b>100,00</b>			
XVII	86,75	87,28	87,23	87,25	87,25	87,91	90,15	91,32	89,02	88,90	89,68	88,09	<b>100,00</b>		
I	90,11	89,57	89,80	90,35	90,35	89,96	92,45	96,21	90,51	92,84	93,17	96,26	89,96	<b>100,00</b>	
<i>Kamptonema_animale</i> _CCALA_139	91,11	90,54	89,19	90,39	90,39	89,32	92,32	<b>99,32</b>	91,84	91,49	91,97	94,12	90,36	95,99	<b>100,00</b>

### 3.3 MALDI – TOF analýza

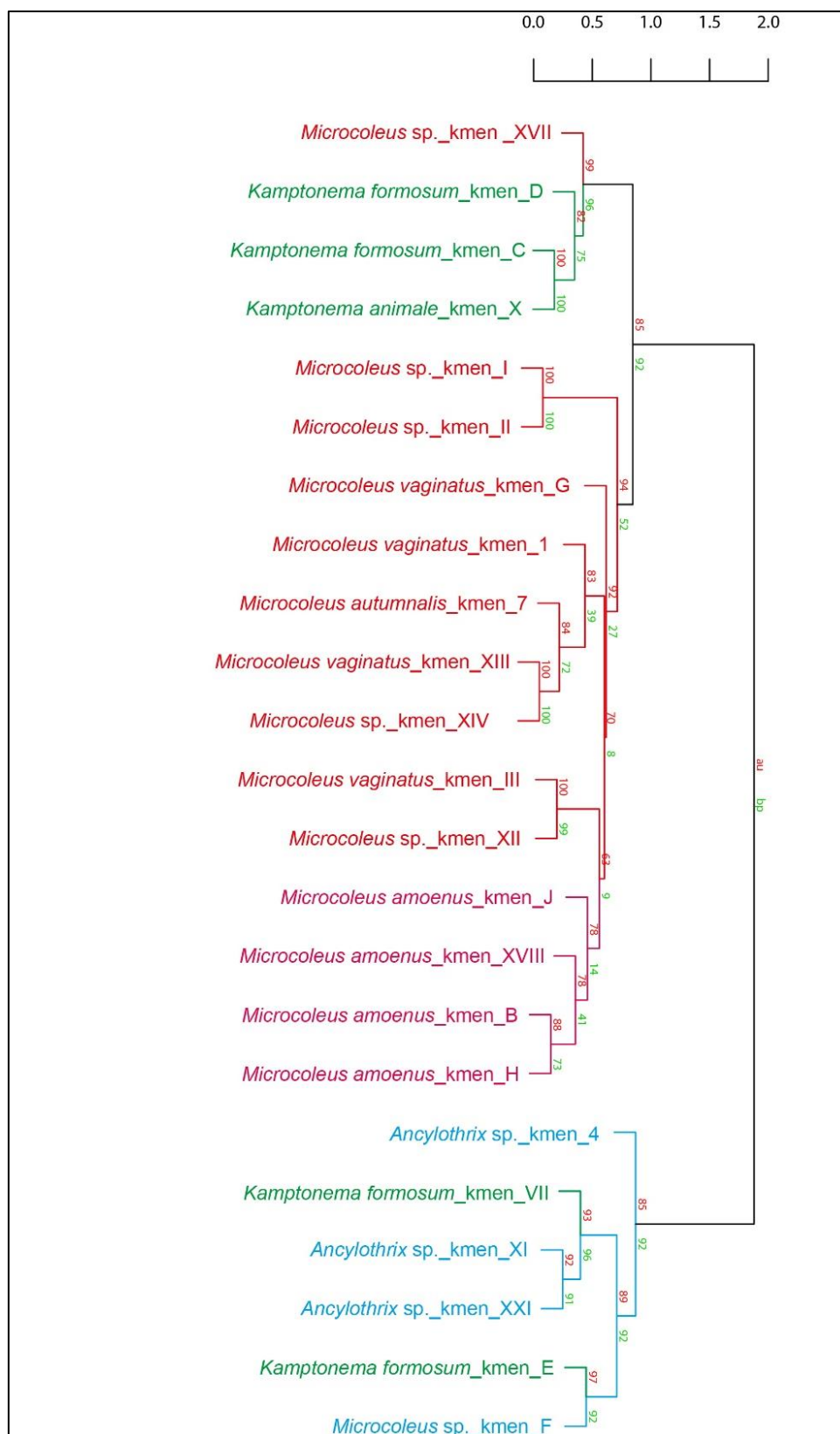
Pro analýzu MALDI – TOF jsem celkově použila 23 kmenů. Část hmotnostních spekter jsem získala už v průběhu bakalářského studia (Tab. 3). Ve výsledném dendrogramu, který je založen na podobnosti hmotnostních spekter peptidů a proteinů mezi jednotlivými kmeny, vznikly tři hlavní skupiny – *Ancylothrix*, *Kamptonema* a *Microcoleus* (Obr. 86). U každého klastru jsou vyznačena čísla, která vyjadřují statistickou podporu – červené – Approximately Unbiased (AU) p-values, zelené – Bootstrap Probability (BP) values.

Největší klastř zahrnuje rod *Microcoleus*. Identifikovány byly 4 hlavní druhy – *Microcoleus amoenus*, *Microcoleus autumnalis*, *Microcoleus vaginatus* a *Microcoleus* sp., které vykazují proteinovou podobnost. Dobře vymezenou skupinu tvoří druh *Microcoleus amoenus* (kmeny J, B, H, XVIII) s podporou větve 78. Kmen J se nachází v dendrogramu blíže kmenům spadající pod druh *Microcoleus amoenus*, než ve fylogenetickém stromě (Obr. 79).

Druhý klastř je složen ze dvou druhů – *Kamptonema animale* (X) a *Kamptonema formosum* (C, D), je zde přítomný i jeden kmen *Microcoleus* sp. (XVII). Na základě analýzy proteinů si nejsou kmeny C, X podobné s kmenem VII, což je rozdíl oproti fylogenetickému stromu (Obr. 79), kde vytvářejí jeden klastř.

Třetí klastř obsahuje kmeny z okruhu rodu *Ancylothrix* sp. (4, XI, XXI), navíc součástí tohoto klastru jsou dva kmeny *Kamptonema formosum* (VII, E) a jeden *Microcoleus* sp. (F). Zajímavostí je, že kmeny F a 4 jsou si v proteomické analýze vzdálenější než ve fylogenetickém stromě a podle hodnot p-distance (97,78%).

Analýza splitstree ukazuje uspořádání kmenů, které je velmi podobné s výsledky provedené analýzou genu 16S rRNA (Obr. 87) a metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Obr. 88). Vytvořily se tři hlavní shluky taxonů na úrovni rodu, a to *Microcoleus*, *Ancylothrix*, *Kamptonema*. Dobře odlišitelní jsou především zástupci rodu *Microcoleus*, kteří vytváří dobře definovaný shluk, kde je především jasně viditelný klastř s kmeny B, H a XVIII zahrnující druh *Microcoleus amoenus*. Kmeny X a C vytváří samostatnou skupinu v obou analýzách splitstree, což se shoduje s výsledky fylogenetického stromu (Obr. 79), dendrogramu (Obr. 86) i p-distance (Tab. 4., 5.). Dobře definovaný je i shluk z okruhu rodu *Ancylothrix*, přičemž kmeny XI a XXI jsou si velmi blízké, což potvrzuje výsledky p-distance (=100%) mezi těmito kmeny i postavení na jedné větvi ve fylogenetickém stromě s podporou 99 (Obr. 79).



Obr. 86: Výsledný dendrogram získaný pomocí metody MALDI-TOF MS. Čísla dokládají statistickou podporu: červené – Approximately Unbiased (AU) p-values, zelené – Bootstrap Probability (BP) values.



ve fylogenetickém stromě (viz Obr. 79).



v dendrogramu (viz Obr. 86).

## DISKUZE

Sinice jsou hojně rozšířené organismy vyskytující se v mnoha vodních i suchozemských ekosystémech. Zástupci řádu Oscillatoriales, zejména kosmopolitní rod *Phormidium sensu lato*, je široce distribuovaný a zahrnuje různé morfortypy, které často dominují v povlacích na dně potoků či řek, v litorálu jezer a rybníků, ve vlhké půdě a skalách, ale i v extrémních stanovištích jako jsou pouště či polární oblasti. Za příznivých hydrologických a enviromentálních podmínek vytvářejí makroskopické povlaky, které mohou pokrývat velké plochy podkladu (kámen, dřevo, vodní makrofyta). Kromě tohoto rodu může povlak obsahovat nepřeberné množství jiných organismů, včetně bakterií, sinic a eukaryotických řas (Brasell et al. 2014). Často jsou tyto přisedlé organismy, společně s jejich extracelulárními polymerními látkami (EPS) a dalšími anorganickými částicemi označovány jako perifyton.

### Diverzita rodu *Phormidium* v podélném a příčném profilu toku

Vizovické vrchy zaujímají značnou část jihovýchodní Moravy. Nejvyšší části pokrývají husté, zejména jehličnaté až smíšené lesy, v nižší nadmořské výšce přechází krajina v louky, pole a osídlené oblasti. Je známo, že tato oblast je významným prameništěm mnoha toků, nejvýznamnějším je řeka Vlára.

Různé druhy rodu *Phormidium* či od něj odvozených rodů, preferují různorodé typy vod. Například některé vyžadují čisté studené vody, např. *P. roseum* nebo *P. insigne*. Jiné dobře snášejí organické znečištění a vyšší teplotu vody, např. *Microcoleus autumnalis* (Komárek & Anagnostidis 2005). Tento rod byl mnohokrát zaznamenán v oligotrofních, mezotrofních i eutrofních vodách (Komárek 1999, Mez et al. 1998). Ve velké míře ovlivňuje výskyt sinic teplota, pH, vodivost i množství dostupných živin. Obecně je podle Fransoeur et al. (1999) nejdůležitějším faktorem pro růst sinic teplota. Naproti tomu Mosser & Brock (1979) oponují, že teplota nemá takový vliv. Prokázali, že i přes to, že je optimální teplota pro růst sinic a řas kolem 20-30 °C, dokážou růst i při teplotách kolem 0 °C.

Určitá míra variability byla pozorována u naměřených hodnot elektrické vodivosti. Konduktivita dosahovala odlišných hodnot v různých částech toku. U pramene byla všeobecně nejnižší (120-270  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), naopak nejvyšší hodnoty byly naměřeny za obcí (až 627  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), což může být způsobeno vzrůstající teplotou směrem k ústí toku a stupněm znečištění vyvolaným obcí.

Diverzita a abundance tohoto rodu se v každé části v podélném i příčném profilu čtyř studovaných toků lišila. U pramene byl výskyt poměrně malý nejspíše z důvodu nízké teploty a pH, které je způsobené přítomností jehličnatých lesů, které okyselují půdu (Příloha 4). Navíc tyto lesy snižují dopad slunečního záření, které je pro fotosyntetizující organismy nepostradatelné. Pouze v omývaném břehu a přímo ve šterkopísčitém dně toků byl nalezen druh *Kamptonema formosum*, *Microcoleus* sp. a *Ancylothrix* sp. V pramenu Vysokopolského potok byl nalezen druh *Microcoleus amoenus*, pro jehož výskyt je typická čistá, neznečištěná voda (Strunecký et al. 2013). V přilehlé půdě jsem nenalezla ani po kultivaci v laboratoři žádnou populaci sinic. Nejspíše je to dáno tím, že sinice včetně tohoto rodu všeobecně preferují spíše vyšší hodnoty pH, ale některé najdeme i v kyselých vodách, např. *P. kolkwitzii* (Komárek & Anagnostidis 2005).

Zajímavý je rod *Ancylothrix*, který se vyskytoval ve studeném pramenu Tichovského potoka (voda) a Smolinky (břeh). Jeho přítomnost v českých tocích jsem potvrdila jak molekulárně, tak morfologicky. Tento rod odvodil Martins et al. (2016) na základě molekulárních analýz z rodu *Phormidium* a dosud byl objeven pouze v tropech a subtropech v Brazílii, kde byl odebrán z bentosu vod, vlhké půdy i z kmenu stromů.

Před první obcí u všech čtyř toků bylo koryto úzké a stále zastíněné, voda byla bez výrazného organického znečištění, což se projevilo na druhovém složení. Ve vzdálenosti 1 km od pramene byla diverzita stále nízká (pouze rod *Microcoleus* sp. se nacházel v půdě v toku Smolinka). Směrem po podélném profilu toku se biodiverzita zvyšovala. Ve vzdálenosti 2 km od pramene byly v biomase kromě vláknitých a kokálních sinic také penátní rozsivky. V této části převažoval rod *Phormidium* a od něj odvozené rody, především rod *Kamptonema*, která je široce rozšířena v České republice a obývá různé typy habitatů. Typový druh pochází sice z termálních vod Karlových Varů, ale je běžný v rybnících, zaplavených oblastech podél řek, na dně i v litorálu toků. Například kmeny shromážděné z eutrofních rybníků po různých částech ČR, byly kultivovány a identifikovány Hašler et al. (2012) jako *Kamptonema formosum*. V ČR se vyskytují hlavně druhy *K. formosum* a *K. animale* (Strunecký et al. 2014).

Druhově nejbohatší byly vzorky odebrané vždy za první obcí, jimiž tok protékal. I přes to, že tok byl stále úzký, tak sem už dopadalo určité množství slunečního záření. V těchto částech byla naměřena nejvyšší teplota vody ( $\bar{X}=21,4$  °C) a pH se pohybovalo kolem 7-8.



V přilehlých obcích nejsou zavedeny centrální čistírny odpadních vod, takže kanály vedou vodu z domácností přímo do toků. Dominantními živinami, které ovládají trofické stavy potoků a řek jsou dusík a fosfor, které jsou limitním prvkem pro sinice a řasy (Kelly & Whitton 1998, Biggs 2000). Dusík se do toku mohl dostat jak ze splachů z přilehlých zemědělských polí, tak z organických dusíkatých látek z domácností. Naopak významným zdrojem fosforu ve vodě jsou často syntetické detergenty (Kočí 1997).

I když nejvíce studované a nejznámější jsou planktonní vodní květy vznikající při přemnožení sinic, byl také potvrzen vztah mezi zvýšeným výskytem živin a vyšší biomasou bentických řas a sinic (Biggs 2000). Kombinace všech výše zmíněných fyzikálně-chemických parametrů vody měla pravděpodobně za následek silný rozvoj fotoautotrofních organismů v těchto částech toku. Ve velké míře zde dominovaly zejména vláknité sinice a řasy, které bylo možno i makroskopicky pozorovat hlavně jako součást epipelonu či epilítu. Kromě makroskopické vláknité řasy rodu *Cladophora* v tocích převažoval rod *Phormidium sensu lato*. Jednalo hlavně o druhy *Microcoleus* sp., *Microcoleus vaginatus* a *Kamptomonas animale*. Rozšíření rodu *Microcoleus* je kosmopolitní, může obývat různé typy habitatů – oligotrofní až eutrofní potoky, minerální či termální prameny, může růst aerofyticky i epifyticky (Strunecký et al. 2013).

### Taxonomie rodu *Phormidium*

Správné taxonomické stanovení nejrozšířenějších vláknitých druhů řas zejména z řádu Oscillatoriales je stále obtížné. V mnoha případech jsou tyto organismy s podobnou morfologií identifikovány jako *Phormidium* nebo jsou klasifikovány pod rody *Leptolyngbya*, *Schizothrix* či *Oscillatoria* (Comte et al. 2007). Rod *Phormidium* patří mezi jeden z taxonomicky nejobtížnějších rodů sinic vůbec.

Často dochází k taxonomickým problémům při rozporu mezi molekulárními a morfologickými přístupy (Palinska et al. 2011, Strunecký et al. 2013). Například Marquardt & Palinska (2007) charakterizovali na základě morfologie 30 kmenů, které spadaly pod rod *Phormidium*. Pomocí fylogenetických studií zjistili, že kmeny vytvářely různé klastry, které obsahovaly rody jako *Microcoleus*, *Leptolyngbya* nebo *Oscillatoria*. Navíc u dvou druhů, které byly morfologicky přiřazeny k *P. autumnale*, bylo zjištěno, že se geneticky liší a seskupují se do jiných skupin. Tyto výsledky naznačují, že rod *Phormidium* není monofyletický a v mnoha studiích byl popsán jako polyfyletický, např. Taton et al. (2006), Palinska & Marquardt (2008), Strunecký et al. (2010).

Na základě typických morfologických znaků jsem se snažila kmeny taxonomicky zařadit s pomocí literatury Komárek & Anagnostidis (2005), ve které tento rod rozdělili do osmi skupin, podle tvaru apikálních buněk a přítomnosti či absence kalyptry a slizové pochvy. Nejvíce kmenů spadalo pod skupinu VII, II a III. Postavení druhů v jednotlivých skupinách bylo několikrát přezkoumáváno. Typickým příkladem je skupina VII, která by měla být podle Strunecký et al. (2013) na základě morfologie i genetiky celá zařazena do nově odštěpeného rodu *Microcoleus*, včetně typického druhu *Phormidium autumnale* (= *Microcoleus autumnalis*).

Problémem při správné identifikaci sinic může být tzv. kryptická variabilita, což znamená, že na první pohled morfologicky stejná vlákna mohou být geneticky rozmanitá. V současnosti je proto pro taxonomii sinic všeobecně využíván tzv. polyfázový přístup, např. Anagnostidis & Komárek (1985), Komárek & Anagnostidis (1989), Komárek (2010). Tento přístup zahrnuje poznatky nejen z ekologie a morfologie, ale také informace získané z molekulárních analýz (např. analýza genu 16S rRNA, oblast ITS, proteomická analýza MALDI-TOF).

Pro fylogenetickou analýzu genu 16S rRNA jsem použila dohromady 24 vyizolovaných kmenů a pro analýzu MALDI-TOF 23 kmenů. Ve výsledném fylogenetickém stromě i dendrogramu jsou viditelné 3 hlavní skupiny – *Ancylothrix*, *Kamptonema* a *Microcoleus*. Kmeny XI a XXI vykazovaly velmi blízký fylogenetický i proteomický vztah s druhem *Ancylothrix terrestris*, který byl izolován v tropických a subtropických částech Brazílie (Martins et al. 2016). Shodné jsou i morfologické znaky, mezi které patří zakulacené apikální buňky bez kalyptry a se zřídka viditelnou slizovou pochvou. Velmi podobný mají mezi sebou i D1-D1' helix s bazálními sekvencemi 5'-GACCU-CUGGA-3'. Je to velmi zajímavý výsledek, jelikož jsem tyto kmeny našla ve studeném prameni Smolinky a Tichovského potoka ve Vizovických vrších.

Kmen 4 byl podle morfologie řazen k rodu *Ancylothrix* a je mu blízký i podle postavení ve fylogenetickém stromě. Avšak podobnost mezi jednotlivými kmeny v rámci sekvenovaného genu 16S rRNA (p-distance) potvrdila, že má tento kmen velkou molekulární odlišnost už na úrovni rodu a jeho sekvence se v databázi neshoduje s žádným už dříve popsáním rodem. Proto byl navrhnout popis nového rodu *Pseudoancylothrix* gen. nov. Molekulárně blízko k němu má kmen F, který byl však na základě odlišných morfologických znaků (slizová pochva, kalyptra) zařazen do rodu *Microcoleus* sp. Je zvláštní, že se tento kmen přiřadil ke skupině *Ancylothrix*. S největší pravděpodobností jde o to, že v kultuře je směs dvou kmenů a jeden z nich, který je sice dominantnější, se ztrácí v rámci fenotypové plasticity rodu *Microcoleus*. Molekulární

analýzy zřejmě zachytily dominantní DNA i proteiny jiného druhu, proto jej zařadily jak ve fylogenetickém stromě, tak v dendrogramu do klastru *Ancylothrix*.

V klastru *Kamptonema* se shlukovaly dva druhy, a to *Kamptonema animale* a *Kamptonema formosum*. Mezi těmito dvěma druhy záleží na utváření konce vlákna a determinace pouze na základě morfologie může být nepřesná. *K. animale* se většinou zužuje do špičky na delší části vlákna a apikální buňky bývají zašpičatělé, *K. formosum* se většinou zužuje krátce a konec je zaoblený (Strunecký et al. 2014). Podle Hašler et al. (2012) jsou tyto morfologické znaky nedostatečné k správné determinaci, protože utváření konců vláken se zdá být variabilní.

Celkem čtyři kmeny byly zařazeny do klastru *Kamptonema* (kmen E, C, X, VII). Kmeny C a X vykazovaly podle provedených molekulárních analýz nejbližší vztah s druhem *Kamptonema formosum*. Podle prvotních morfologických znaků jsem zařadila kmen X do druhu *Kamptonema animale*, nicméně molekulární podobnost s druhem *Kamptonema formosum* je vysoká. Kmen E byl podle morfologie vlákna zařazen do druhu *K. formosum*, ale ve fylogenetickém stromě vytváří samostatnou větev a byl přiřazen s velkou podporou ke kmenu *Pantalaninema rosanae* CMAA 1559 dostupné v databázi. Tento druh byl objeven v mokřadech Brazílie a má blízký fylogenetický vztah k rodu *Leptolyngbya* (Vieira Vaz et al. 2015). Kmen VII je v rámci okruhu tohoto rodu vzdálenější, avšak vykazuje vysokou molekulární podobnost s kmenem *K. animale* CCALA 139 (p-distance=99,32%). Podle proteomické analýzy je tento kmen zařazen v blízkosti kmenů rodu *Ancylothrix* s vysokou podporou 96.

Kmeny z okruhu *Microcoleus* si byly na první pohled velmi morfologicky podobné (kalyptra, slizová pochva, šířka vláken), avšak mnohé kultury vykazovaly mezi sebou velkou molekulární variabilitu. Podle fylogenetické i proteomické analýzy je zřetelně oddělen druh *Microcoleus amoenus* (kmen H, XVIII, B), který vytváří dobře definovanou monofyletickou skupinu. V analýze MALDI-TOF na jejich větev spadá i kmen J, který s nimi sdílí i velkou podobnost sekvence (p-distance ~ 97%) i shodnost sekundární struktury D1-D1' helix.

Všeobecně je velmi složité určit rod *Microcoleus* do druhu. V přirozeném prostředí vytváří typické svazkovité kolonie (vlákna v jedné slizové pochvě), což je dobrý rozpoznávací znak. V kultuře, kde jsou však ideální podmínky, nemusí být slizová pochva přítomna a někdy bývají patrné jen jednotlivé pochvy vláken a determinace může být složitější (Boyer et al. 2002).

Na fylogenetickém stromě je viditelná velká molekulární variabilita v rámci skupiny polyfyletického druhu *Microcoleus vaginatus*. Tento druh se nachází na více větvích, zřejmě se bude jednat o skupinu kryptických druhů, které jsou rozlišitelné pouze molekulárními metodami. Navíc u druhů *Microcoleus vaginatus* a *Microcoleus autumnalis* je morfologický i molekulární rozdíl velmi malý, podle analýzy 16S rRNA se často shlukují ve společné skupině. Více autorů dosud potvrdilo velmi blízký vztah mezi těmito dvěma druhy, např. Marquardt & Palinska (2007) nebo Comte et al. (2007). Např. Hašler et al. (2012) uvedli, že podobnost sekvence genu 16S rRNA studovaných kmenů byla  $\geq 98\%$ . Podobnost těchto druhů poprvé zkoumal Drouet (1962, 1968), jehož práce jsou považovány za kontroverzní. Při studiu variability rodu *Phormidium/Microcoleus* za různých ekologických podmínek považoval ekotypy (ekologické růstové formy) jednoho druhu za nově vzniklý druh.

Do skupiny *Microcoleus* je podle fylogenetické analýzy zařazen i kmen EL2, jehož morfologické znaky odpovídaly spíše rodu *Kamptonema* (absence kalyptry a slizové pochvy). Tato nesrovnalost mezi morfologií a molekulární analýzou může být dána tím, že při determinaci kmene ještě nedošlo v kultuře k rozvinutí všech morfologických znaků typických pro *Microcoleus*.

Mimo klastry se zařadily kmeny D a XVII, které byly na základě morfologie určeny jako *Kamptonema formosum* (D) a *Microcoleus* sp. (XVII). Od ostatních kmenů se liší jak v MALDI-TOF, tak i v analýze genu 16S rRNA i v hodnotách p-distance. Kmen XVII vykazuje velmi podobné sekundární struktury s ostatními kmeny rodu *Microcoleus*. U kmenu D více vypovídá dendrogram, ve kterém je společně na větvi s druhy *Kamptonema formosum* a *Kamptonema animale* (kmen X a C). Neshoda by mohla být pravděpodobně dána nedočištěním vzorků, které mohly mít při molekulární analýze vícedruhové složení.

Kombinace charakteristických morfologických znaků s molekulárními přístupy je v současné době pro identifikaci sinic velmi důležitá, protože na první pohled morfologicky stejné druhy mohou vykazovat kryptickou variabilitu a lišit se v genetické informaci. Nevýhodou analýzy genu 16S rRNA je to, že špatně zachycuje vnitřní skrytou variabilitu, proto je důležité vysledovat i další molekulární markery, např. proteiny nebo sekundární struktury ITS apod. Výsledky ukazují, že současný rod *Phormidium* je stále velmi heterogenní a v budoucnu bude potřeba jej revidovat.

## ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce jsem se specializovala na rod *Phormidium* a od něj odvozené rody. Využila jsem tzv. polyfázový přístup, který zahrnuje kromě studia jejich ekologie a morfologie i molekulární metody.

Diverzitu tohoto rodu jsem studovala podél čtyř potoků v Přírodním parku Vizovické vrchy. Jednalo se o toky Vlára, Smolinka, Tichovský a Vysokopolský potok. Vzorky jsem odebírala jak ze dna toku, ze břehu, tak i z přilehlé půdy vždy u pramene, před obcí a za první obcí, jimiž toky protékaly. Na každém stanovišti jsem změřila teplotu, pH a konduktivitu vody v toku, abych zachytila vliv těchto podmínek na druhové složení a početnost tohoto rodu. Izolované kmeny jsem zdokumentovala a vyhodnotila jejich základní morfologické znaky, jako je například šířka vlákna, přítomnost kalyptry či slizové pochvy, které mají zásadní význam v taxonomii sinic. Nicméně studium kultur zahrnovalo srovnávání fenotypu i s genotypem izolovaných kmenů. V dnešní době se využívá pro identifikaci sinic molekulární metody, proto jsem provedla analýzu genu 16S rRNA, proteomickou analýzu MALDI-TOF a vytvořila jsem sekundární struktury ITS.

Zjistila jsem, že v každém toku za první obcí, ve srovnání s vyššími částmi studovaného toku, byla druhová diverzita největší. Pravděpodobně to bylo dáno příznivými hodnotami pH, teploty, konduktivity a také zvýšeným přísunem živin z komunálních odpadních vod z obcí. Rozdíl v druhové diverzitě mezi jednotlivými prameništi všeobecně nebyl nijak významný. Avšak rod *Phormidium* sensu lato se vyskytoval v biomase odebrané z vody či přilehlého břehu častěji než z půdy.

Při morfologickém a molekulárním zhodnocení kmenů jsem objevila zajímavé nálezy, např. kmen *Ancylothrix*, který byl dosud objeven pouze v tropech Brazílie, byl nalezen v toku Smolinka. Na základě molekulárních odlišností navrhuji popis nového rodu *Pseudoancylothrix*.

Při srovnání morfologických a molekulárních výsledků se mi potvrdilo to, že identifikace taxonů podléhá velmi často subjektivnímu zhodnocení a jenom analýzy, ať už genomů či proteinů mohou vypovědět více o jejich taxonomickém zařazení. Z výsledků je rovněž patrné, že metoda hodnocení proteinových spekter MALDI-TOF MS přináší slibné výsledky při hodnocení variability na mezidruhové a vnitrodruhové úrovni a může tak velmi dobře doplňovat komplexní polyfázový přístup.

## Seznam použité literatury:

Allan J. D., Castillo M. M. (2007): Stream ecology: Structure and Function of Running Waters. Springer, Dordrecht, Netherlands 436 pp.

Anagnostidis K., Komárek J. (1985): Modern approach to the classification system of cyanophytes 1 – Introduction. Algological Studies 38–39: 291–302

Azim E., Verdegem M. C. J., van Dam J. C., Beveridge M. (2007): Periphyton: Ecology, Exploitation and Management. CAB International, Wallingfort, UK 319 pp.

Baker J. H., Orr D. R. (1986). Distribution of epiphytic bacteria on freshwater plants. Journal of Ecology 74: 155–165

Biggs B. J. F. (2000): Eutrophication of Streams and Rivers: Dissolved Nutrient-Chlorophyll Relationships for Benthic Algae. Journal of the North American Benthological Society 19: 17–31

Boyer S. L., Johansen J. R., Flechtner V. R., Howard G. L. (2002): Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S–23S ITS region. Journal of Phycology 38: 1222–1235

Brasell K. A., Heath M. W., Ryan K. G., Wood S. A. (2014): Successional Change in Microbial Communities of Benthic Phormidium-Dominated Biofilms. Microbial Ecology 69: 254–266

Brown H. B. (1908): Algal periodicity in certain ponds and streams. Bulletin of the Torrey Botanical Club 35: 223–248.



Burkholder J. M. (1996): Interactions of benthic algae with their substrata. Pp. 253–297 in Stevenson J. R., Bothwell M. L., Lowe R. L. (Eds.): Algal ecology: freshwater benthic ecosystems. Academic Press, San Diego, 1154 pp.

Cantonati M, Gerecke R., Bertuzzi E. (2006): Springs of the Alps – sensitive ecosystems to environmental change: from biodiversity assessments to long-term studies. *Hydrobiologia* 562: 59–96

Cantonati M., Füreder L., Gerecke R., Jüttner I., Cox E. J. (2012): Crenic habitats, hotspots for freshwater biodiversity conservation: toward an understanding of their ecology. *Freshwater Science* 31(2): 463–480

Cantonati M., Komárek J., Montejano G. (2015): Cyanobacteria in ambient springs. *Biodiversity and Conservation* 24: 865–888

Cantonati M., Poikane S., Pringle C. M., Stevens L. E. et al. (2020a): Characteristics, Main Impacts, and Stewardship of Natural and Artificial Freshwater Environments: Consequences for Biodiversity Conservation. *Water* 12: 1–260

Cantonati M., Stevens L. E., Segadelli S., Abraham E. S. et al. (2020b): Ecohydrogeology: The interdisciplinary convergence needed to improve the study and stewardship of springs and other groundwater-dependent habitats, biota and ecosystems. *Ecological Indicators* 110: 1–15

Casamatta D. A., Stanic D., Gantar M., Richardson L. L. (2012): Characterization of *Roseofilum reptotaenium* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) gen. et sp. nov. isolated from Caribbean black band disease. *Phycologia* 51: 489–499.

Casamatta D. A., Hašler P. (2016): Blue-green algae (cyanobacteria) in rivers. Pp. 5–34 in Necchi O. Jr. (Ed.): River algae. Springer International Publishing, Switzerland 287 pp.

Castresana J. (2000): Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17: 540–552

Comte K., Šabacká M., Carre-Mlouka A., Elster J. Komárek J. (2007): Relationships between the Arctic and the Antarctic cyanobacteria; three *Phormidium*-like strains evaluated by a polyphasic approach. *FEMS Microbiology Ecology* 59(2): 366–376

Crema S., Ferrarese U., Golo D., Modena P., Sambugar B., Gerecke R. (1996): A research on benthic and interstitial fauna in alpine and pre-alpine springs. *Report Centro Ecologia Alpina* 8: 1–104

David J. A. (2016): Springs: Conserving perennial water is critical in arid landscapes. *Biological Conservation* 211: 30–35

DeNicola D. M. (1996): Periphyton responses to temperature at different ecological levels. Pp. 150–181 in Stevenson J. R., Bothwell M. L., Lowe R. L. (Eds.): *Algal ecology: freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, 1154 pp.

Di Sabatino A., Cicolani B., Gerecke R. (2003): Biodiversity and distribution of water mites (Acari, Hydrachnidia) in spring habitats. *Freshwater Biology* 48: 2163–2173

Dixit A. S., Dixit S. S., Smol J. P. (1992): Long-Term Trends in Lake Water pH and Metal Concentrations Inferred from Diatoms and Chrysophytes in Three Lakes near Sudbury, Ontario. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49(1): 17–24

Dokulil M. T. (2009): Comparative Primary Production. Pp. 130–137 in Likens G. E., Tockner K. (Eds.): *Encyclopedia of Inland Waters*. Vol. 1 Academic Press Elsevier, Oxford, UK 2250 pp.

Doyle J. (1991): DNA protocols for plants. Pp. 283–293 in Hewitt G. M., Johnston A.W. B., Young J. P. W. (Eds.): Molecular techniques in taxonomy. NATO ASI Series (Series H: Cell Biology) Vol. 57, Springer, Berlin, Germany 420 pp.

Drouet F. (1962): Gomont's Ecophenes of the Blue-Green Alga, *Microcoleus vaginatus* (Oscillatoriaceae). Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 114: 191–205

Drouet F. (1968): Revision of the classification of the Oscillatoriaceae. Monograph 15. The Academy of Natural Sciences of Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania 370 pp.

Dumnicka E., Galas J., Jatulewicz I., Karlikowska J., Rzonca B. (2013): From spring sources to springbrook: Changes in environmental characteristics and benthic fauna. *Biologia* 68(1): 149–149

Feminella J. W., Hawkins C. P. (1995): Interactions between stream herbivores and periphyton: a quantitative analysis of past experiments. *Journal of the North American Benthological Society* 14: 465–509

Fransoeur S. N., Biggs B. J. F., Smith R. A., Lowe Source R. L. (1999): Nutrient Limitation of Algal Biomass Accrual in Streams: Seasonal Patterns and a Comparison of Methods. *Journal of the North American Benthological Society* 18(2): 242–260

Fritsch F. A. (1906): Problems in aquatic biology, with special reference to the study of algal periodicity. *New Phytologist* 5: 149–169

Fukuda K., Ogawa M., Taniguchi H., Saito M. (2016): Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *Journal of UOEH* 38(3): 223–232

Glazier D.S. (2009): Springs. Pp. 734–755 in Likens G.E., Tockner K. (Eds.): *Encyclopedia of Inland Waters*, Vol. 1. Academic Press Elsevier, Oxford, UK 2250 pp.

Glazier D. S. (2014): Springs. Pp. 1–78 in Elias S. A. (Ed.): *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. *Academic Press* Elsevier, Waltham, Massachusetts, USA 2170 pp.

Glime J. M., Vitt D. H. (1986): A comparison of bryophyte species diversity and niche structure of montane streams and stream banks. *Canadian Journal of Botany* 65: 1824–1837

Grimm N. B., Fisher S. G. (1989): Stability of periphyton and macroinvertebrates to disturbance by flash floods in a desert stream. *Journal of the North American Benthological Society* 8(4): 293–307

Guiry M. D., Guiry G. M. (2021): *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Dostupné na: [www. https://www.algaebase.org/](http://www.algaebase.org/)

Hansson L. A. (1992): Factors regulating periphytic algal biomass. *Limnology and Oceanography* 37(2): 322–328

Harland F. M. J., Wood S. A., Moltchanova E., Williamson W. M., Gaw S. (2013): *Phormidium autumnale* Growth and Anatoxin-a Production under Iron and Copper Stress. *Toxins* 5: 2504–2521

Haselkorn R. (1978): Heterocysts. *Annual Review of Plant Biology* 29: 319–344

Hašler P., Dvořák P., Johansen J. R., Kitner M., Ondřej V., Pouličková A. (2012): Morphological and molecular study of epipellic filamentous genera *Phormidium*, *Microcoleus* and *Geitlerinema* (Oscillatoriales, Cyanophyta/ Cyanobacteria). *Fottea* 12(2): 341–356

Hašler P., Dvořák P., Pouličková A., Casamatta D. A. (2014): A novel genus *Ammassolinea* gen. nov. (Cyanobacteria) isolated from sub-tropical epipelagic habitats. *Fottea* 14: 241–248

Havliš J. (1999): Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF. *Vesmír* 78(8): 448

Hájek M., Hekera P. (2005): The study area and its geochemical characteristics. Pp. 23–28 in Pouličková A., Hájek M., Rybníček K. (Eds.): *Ecology and palaeoecology of spring fens of the West Carpathians*. Palacký University Press Olomouc 209 pp.

Hill W. R. (1996): Effects of light. Pp. 121-148 in Stevenson J. R., Bothwell M. L., Lowe R. L. (Eds.): *Algal ecology: freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, 1154 pp.

Hoagland K. D., Roemer S. C., Rosowski J. R. (1982): Colonization and community structure of two periphyton assemblages, with emphasis on the diatoms (Bacillariophyceae). *American Journal of Botany* 69(2): 188–213

Hrstka R., Kolářová T., Michalová E., Vojtěšek B. (2014): Development of PCR Methods and Their Applications in Oncological Research and Practice. *Klinická Onkologie* 27(1): 69–74

Huong T. T., Komínková M., Guráň R., Ruttkay-Nedecký B., Kopel P. et al. (2014): Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* 1: 64–66

Hynes H. B. N. (1970): *The Ecology of Running Waters*. University of Toronto press, Ontario, Canada 555 pp.

Chatchawan T., Komárek J., Strunecký O., Šmarda J., Peerapornpisal Y. (2012): *Oxynema*, a new genus separated from the genus *Phormidium* (Cyanophyta). *Cryptogamie Algologie* 33: 41–59



Illies J. and Botosaneanu L. 1963. Problèmes et méthodes de la classification et de la zonation écologique des eaux courantes, considérées surtout du point de vue faunistique. Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie 12: 1–57

Kelly M., Whitton B. A. (1998): Biological monitoring of eutrophication in rivers. *Hydrobiologia* 384: 55–67

Kitner M., Pouličková A., Hašler P. (2005): Algal colonization process in fishponds of different trophic status. *Algological Studies* 115(1): 115–127

Kočí V. (1997): Lze snížit množství fosforečnanů v komunálních odpadních vodách správným užíváním detergentů? *Vodní hospodářství* 12: 392–393

Komárek J., Anagnostidis K. (1989): Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4-Nostocales. *Archiv für Hydrobiologie* 82(3): 247–345

Komárek J. (1999): Diversity of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) of King George Island, maritime Antarctica survey. *Archiv für Hydrobiologie* 94: 181–193

Komárek J., Anagnostidis K. (2005): Cyanoprokaryota 2 – Oscillatoriales. In Büdel B., Krienitz L., Gärtner G., Schagerl M. (Eds.): *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/2. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München 759 pp.

Komárek J., Kaštovský J., Ventura S., Turicchia S., Šmarda J. (2009): The cyanobacterial genus *Phormidesmis*. *Algological Studies* 129: 41–59

Komárek J. (2010): Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia* 639: 245–259

Křemen J. (1998): *Techniky molekulární biologie a jejich využití v medicíně*. Karolinum, Praha 117 pp.

Kubíková L., Simon O. (2009): Charakteristika a oživení podhorských šumavských pramenišť s detailnějším zaměřením na rod hrachovka (*Pisidium*). *Příroda* 28: 45–60

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547–1549

Külköylüoğlu O., Yılmaz F. (2006): Ecological requirements of Ostracoda (Crustacea) in three types of springs in Turkey. *Limnologica* 36(3): 172–180

Larned S. T. (2010): A prospectus for periphyton: recent and future ecological research. *Journal of the North American Benthological Society* 29(1): 182–206

Lellák J., Kubíček F. (1991): *Hydrobiologie*. Univerzita Karlova, Praha 98 pp.

Lee N. J., Seo Y., Ki J., Lee O. (2020): Morphology and molecular description of *Wilmottia koreana* sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria) isolated from the Republic of Korea. *Phytotaxa* 447(4): 237–251

Lowe R. L., Golladay S. W., Webster J. R. (1986): Periphyton response to nutrient manipulation in streams draining clear-cut and forested watersheds. *Journal of the North American Benthological Society* 5: 221–229

Machado-de-Lima N. M., Martins M. D., Branco L. H. (2017): Description of a tropical new species of *Wilmottia* (Oscillatoriales, Cyanobacteria) and considerations about the monophyly of *W. murrayi*. *Phytotaxa* 307(1): 43–54

Malone C. F. S., Rigonato J., Laughinghouse H. D., Schmidt E. C., Bouzon Z. L., Wilmotte A., Fiore M. F., Sant'Anna C. L. (2015): *Cephalothrix* gen. nov. (Cyanobacteria): towards an intraspecific phylogenetic evaluation by multilocus analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 2993–3007

Manylov K. M. (2014): Taxonomic identification of algae (morphological and molecular): species concepts, methodologies, and their implications for ecological bioassessment. *Journal of Phycology* 50: 409–424

Marquardt J., Palinska K. A. (2007): Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. *Archives of Microbiology* 187: 397–413

Martins M. D., Branco L. H. Z. (2016): *Potamolinea* gen. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria): a phylogenetically and ecologically coherent cyanobacterial genus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 3632–3641

Marvin L. F., Roberts M. A., Faya L. B. (2003): Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* 337(1–2):11–21

Mayer M. S., Likens G. E. (1987): The importance of algae in a shaded headwater stream as food for an abundant caddisfly (Trichoptera). *Journal of the North American Benthological Society* 6(4): 262–269

Mazura I. (2001): Speciální metody molekulární biologie. Karolinum, Praha 101 pp.

Meyer J. L., Strayer D. L., Wallace J. B., Eggert S. L., Helfman G. S., Leonard N. E. (2007): The contribution of headwater streams to biodiversity in river networks. *Journal of the American Water Resources Association* 43(1): 86–103

Mez K., Hanselmann K., Preisig H. R. (1998): Environmental conditions in high mountain lakes containing toxic benthic cyanobacteria. *Hydrobiologia* 368: 1–15

Mosser J. L., Brock T. D. (1979): Temperature optima for algae inhabiting cold mountain streams. *Arctic and Alpine Research* 8(1): 111–114

Murphy M. L., Hall J. D. (1981): Varied effects of clear-cut logging on predators and their habitat in small streams of the Cascade Mountains, Oregon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38: 137–145

Nowicka-Krawczyk P. B., Żelazna-Wieczorek J. (2013): Cyanobacteria microflora in a limestone spring (Troniny spring, Central Poland). *Polish Botanical Society* 82(3): 219–224

Odum H. T. (1956): Primary production in flowing waters. *Limnology and oceanography* 1: 102–107

Omar W. M. (2010): Omar, Perspectives on the use of algae as biological indicators for monitoring and protecting 2227 aquatic environments, with special reference to Malaysian freshwater ecosystems. *Tropical sciences research* 21(2): 51–67

Palinska K. A., Marquardt J. (2008): Genotypic and phenotypic analysis of strains assigned to the widespread cyanobacterial morphospecies *Phormidium autumnale* (Oscillatoriales). *Archives of microbiology* 189: 325–335

Palinska K. A., Deventer B., Hariri K., Łotocka M. (2011): A taxonomic study on *Phormidium* group (cyanobacteria) based on morphology, pigments, RAPD molecular markers and RFLP analysis of the 16S rRNA gene fragment. *Fottea* 11: 41–55

Patel R. (2015): MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clinical Chemistry* 61(1): 100–111

Pereira F., Carneiro J., Matthiesen R., van Asch B., Pinto N. et al. (2010): Identification of species by multiplex analysis of variable-length sequences. *Nucleic Acids Research* 38(22): 1–17

Perrault P. (1674): *De l'Origine des Fontaines* Pierre Le Petit, Paris. English translation with commentary by A. Larocque (1967): *On the Origin of Springs*, Hafner, New York 209 pp.

Poprawa D., Nemčok J. (1988): *Geological Atlas of the Outer Carpathians and their Foreland 1:500,000*. Państwowy Instytut Geologiczny, Warszawa 9 pp.

Pringle C. M., Naiman R. J., Karr J., Oswood M. W., Webster J. et al. (1988): Patch dynamics in lotic systems: the stream as a mosaic. *Journal of the North American Benthological Society* 7: 503–524

Pusch M., Brettar I., Eisenmann H., Ellis B. K. (1998): The role of micro-organisms in the ecological connectivity of running waters. *Freshwater Biology* 40: 453–495

Randák T., Slavík O., Kubečka J., Adámek Z., Horký P. et al. (2013): *Rybářství ve volných vodách*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Vodňany, 434 pp.

Redfield A. C. (1958): The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist* 46: 205–221

Reid G. K., Wood R. D. (1976): *Ecology of Inland Waters and Estuaries*, Second Edition. D. Van Nostrand Company, New York 584 pp.

Round F. E. (1991). Diatoms in river water-monitoring studies. *Journal of Applied Phycology* 3: 129–145

Santos I. C., Hildenbrand Z. L., Schug K. A. (2016): Applications of MALDI-TOF MS in Environmental Microbiology. *Analyst journal* 141: 2827–2837

Sauer S., Kliem M. (2010): Mass spektrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 8: 74–82

Seifert M., McGregor G., Eaglesham G., Wickramasinghe W., Shaw G. (2007): First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae* 6(1): 73–80

Siegesmund M. A., Johansen J. R., Karsten U., Friedt T. (2008): *Coleofasciculus* gen. nov. (cyanobacteria): Morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont. *Journal of Phycology* 44: 1572–1585

Springer A. E., Stevens L. E. (2009): Spheres of discharge of springs. *Hydrogeology Journal* 17(1): 83–93

Staley. J., Reysenbach A. L. (2002): Biodiversity of Microbial Life: Foundations of Earth's Biosphere. Wiley-Liss, New York 592 pp.

Staub R. (1961): Ernährungsphysiologisch-autökologische Untersuchungen an der planktischen Blaualge *Oscillatoria rubescens* DC. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie* 23: 82–198



Stevens L.E., Schenk E.R., Springer A. (2021): Springs ecosystem classification. *Ecological Applications* 31(1): e002218.10.1002/eap.2218

Stevenson J. R., Bothwell M. L., Lowe R. L. (1996): *Algal ecology: freshwater benthic ecosystems*. Academic Press, San Diego, 1154 pp.

Stevenson R. J., Bahls L. L. (1999): Periphyton protocols. Pp. 1–22 in Barbour M. T., Gerritsen J., Snyder B. D. (Eds.): *Rapid Bioassessment Protocols for Use in Wadeable Streams and Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish*, Second Edition. U.S. Environmental Protection Agency, Washington 336 pp.

Stevenson J. R. (2014): Ecological assessments with algae: a review and synthesis. *Journal of Phycology* 50: 437–461

Strunecký O., Elster J., Komárek J. (2010): Phylogenetic relationships between geographically separate *Phormidium* cyanobacteria: is there a link between north and south polar regions? *Polar Biology* 33: 1419–1428

Strunecký O., Elster J., Komárek J. (2011): Taxonomic revision of the freshwater cyanobacterium „*Phormidium*“ *murrayi* = *Wilmottia murrayi*. *Fottea* 11: 57–71

Strunecký O., Komárek J., Johansen J., Lukešová A., Elster J. (2013): Molecular and morphological criteria for revision of the genus *Microcoleus* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *Journal of Phycology* 49: 1167–1180

Strunecký O., Komárek J., Šmarda J. (2014): *Kamptinema* (Microcoleaceae, Cyanobacteria), a new genus derived from the polyphyletic *Phormidium* on the basis of combined molecular and cytomorphological markers. *Preslia* 86: 193–207

Taton A., Grubisic S., Balthasart P., Hodgson D. A., Laybourn-Parry J., Wilmotte A. (2006): Biogeographical distribution and ecological ranges of benthic cyanobacteria in East Antarctic lakes. *FEMS Microbiology Ecology* 57(2): 272–289

Turicchia S., Ventura S., Komárková J., Komárek J. (2009): Taxonomic evaluation of cyanobacterial microflora from alkaline marshes of northern Belize. 2. Diversity of oscillatorialean genera. *Nova Hedwigia* 89: 165–200

van der Kamp G. (1995): The hydrology of springs in relation to the biodiversity of spring fauna: A review. *Journal of the Kansas Entomological Society* 68(2): 4–17

Vannote R. L., Minshall G. W., Cummins K. W., Sedell J. R., Cushing C. (1980): The river continuum concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37: 130–137

Vermaat J. E. (2005): Periphyton dynamics and influencing factors. Pp. 35–49 in Azim M. E., Verdegem M. C. J., van Dam A. A., Beveridge M. C. M. (Eds.): *Periphyton – Ecology, Exploitation and Management*. CABI Publishing, Wallingford 353 pp.

Vieira Vaz M. G., Genuário D. B., Andreote A. P., Malone C. F., Sant'Anna C. L., Barbiero L., Fiore M. F. (2015): *Pantanalinema* gen. nov. and *Alkalinema* gen. nov.: novel pseudanabaenacean genera (Cyanobacteria) isolated from saline-alkaline lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 298–308

Vondráček J., Lovecká P., Uhlík O., Musilová L., Macková M. (2012): Biodiversita – definice a vysvětlení základních pojmů. *Chemické Listy* 106: 246–252

Wetzel R. G. (2001): *Limnology*, Third Edition. Academic Press, San Diego 1006 pp.

Whitford L. A., Schumacher G. J. (1961): Effect of current on mineral uptake and respiration by a fresh-water alga. *Limnology and Oceanology* 6(4): 423–425

Wieser A., Schneider L., Jung J., Schubert S. (2011): MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3): 965–974

Wood S. A., Selwood A. I., Rueckert A., Holland P. T., Milne, J. et al. (2007): First report of homoanatoxin-a and associated dog neurotoxicosis in New Zealand. *Toxicon* 50: 292–301

Wood S. A., Kuhajek J. M., de Winton M., Phillips N. R. (2012): Species composition and cyanotoxin production in periphyton mats from three lakes of varying trophic status. *FEMS Microbiology Ecology* 79(2): 312–326

Yadav R., Kumar P., Saini V.P., Sharma B. K. (2017): Importance of periphyton for aquaculture. *Aqua Star* 11: 38–43

Zelnik I., Balanč T., Toman M. J. (2018): Diversity and Structure of the Tychoplankton Diatom Community in the Limnocene Spring Zelenci (Slovenia) in Relation to Environmental Factors. *Water* 10(4): 1–12

Zuker M. (2003): Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31(13): 3406–3415

## **PŘÍLOHY**

### **Seznam příloh**

Příloha 1: Fotografie lokality – pramen Vlárý

Příloha 2: Fotografie lokality – pohled na Vařákovy paseky, pod nimiž pramení Smolinka

Příloha 3: Fotografie lokality – makroskopicky viditelné povlaky sinic a řas ve Vysokopolském potoce

Příloha 4: Pramen Vysokopolského potok v lese s převahou jehličnatých stromů



Příloha 1: Fotografie lokality – pramen Vlárý



Příloha 2: Fotografie lokality – pohled na Vařákovy paseky, pod nimiž pramení Smolinka





Příloha 3: Fotografie lokality – makroskopicky viditelné povlaky sinic a řas ve Vysokopolském potoce



Příloha 4: Pramen Vysokopolského potok v lese s převahou jehličnatých stromů