

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra botaniky
Obor: Algologie a ekologie řas



Bc. Alena Hodačová

**Sinice spojené se stromatolitovými biofilmy
v německém potoce Westerhöfer**

**Cyanobacteria associated with biofilms of tufa
stromatolites in the German creek
Westerhöfer**

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Marek Eliáš, PhD.

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 3.5.2011

.....
Alena Hodačová

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá sinicemi, které se nacházejí v biofilmu tufa stromatolitu pokrývající dno potoku Westerhöfer v Dolním Sasku v Německu.

O sinicích tohoto potoku již byla práce napsána (ARP *ET AL.*, 2010), ale pouze pro jedno odběrové místo (WB 5), a výsledkem této práce bylo šest nevysvětlených fyлотypů sinic z devíti získaných. Moje diplomová práce má za úkol alespoň z části vyjasnit identitu těchto fyлотypů a poukázat na další skupiny, které se zde vyskytují. Výsledky studie jsou rozděleny na dvě části. Na část zaměřenou na morfologii izolátů, které jsem extrahovala ze směsných vzorků všech odběrových míst v tomto potoce, a na fylogenetickou část, která zahrnuje analýzu sekvencí 16S rDNA mých izolátů a sekvencí získaných klonováním environmentální 16S rDNA, a to jak mých z vzorků po 2,5 měsících kultivace, tak také Kathrin I. Mohr (klonování ihned po odběru), která pracovala v laboratoři EPSAG přede mnou na stejném projektu. V morfologické části práce jsem identifikovala 11 morfotypů, odpovídajících tradičním rodům *Aphanothece*, *Synechococcus*, *Cyanothece/Gloeothece*, *Leptolyngbya*, *Pseudanabaena*, *Limnothrix*, *Plectonema*, *Phormidium*, *Tolypothrix* a *Nostoc*, dva izoláty nebylo možno jednoznačně přiřadit k žádnému morfotypu, jedná se o AH 5 a AH 35. Ve fylogenetické části jsem potvrdila polyfyletický status rodů *Synechococcus*, *Leptolyngbya* a *Pseudanabaena*. U některých izolátů zůstávám stále nejistá, o které rody opravdu jde, protože ač morfologie odpovídá určitému rodu, sekvence izolátu se nachází na větvi se sekvencemi s jiným rodovým jménem. To se týká například *Aphanothece*, *Cyanothece/Gloeothece* či izolátů AH 5 a AH 35, která leží u rodu *Synechocystis*, jehož popis neodpovídá přesně pozorovanému morfotypu. Co se týče sinice *Plectonema*, je možné, že se jedná o polyfyletický rod, protože ačkoliv neleží můj izolát na větvi spolu se sekvencí *Plectonema* z GenBank, obě mají jako sesterskou sekvenci *Leptolyngbya*.

Odhalila jsem také, že sinicová diverzita ve stromatolitech v potoce Westerhöfer je velmi podobná diverzitě v mořských stromatolitech, tudíž lze předpokládat, že na vznik stromatolitů mají vliv určité rody/druhy sinic, nezávisle na prostředí, v němž se nacházejí.

Sinice, které se nenacházely na nekalcifikovaném odběrovém místě WB 1, jsem považovala za možné kalcifikující organismy, což se týkalo sinic

Microcoleus/Tychonema/Phormidium, Leptolyngbya, Synechocystis/Izoláty AH 5 a AH 35 a Synechococcus.

Abstract

This diploma thesis is focused on cyanobacteria which occur in the biofilm of the tufa stromatolite covering the ground of Westerhöfer creek in Lower Saxony in Germany.

A study of this creek has already been written (ARP *ET AL.*, 2010) but only for one sampling site (WB 5), with six unidentified phylotypes of nine obtained as the result of that study. One of the aims of my diploma thesis is to identify at least some of them, and to show other groups occurring there. The results of my diploma thesis are divided into two parts. Part One – the morphology of isolates obtained from raw cultures of all sampling sites in the creek. Part Two – a phylogenetical study of 16S rDNA of the isolates and the sequences obtained by cloning of environmental 16S rDNA. The clones were obtained from Kathrin I. Mohr (who worked on the same project in the EPSAG laboratory and who did the cloning immediately after sampling). I also did cloning, but after 2.5 months of cultivation. In the morphological part, I identified 11 morphotypes, corresponding to established genera *Aphanothece*, *Synechococcus*, *Cyanothece/Gloeothece*, *Leptolyngbya*, *Pseudanabaena*, *Limnothrix*, *Plectonema*, *Phormidium*, *Tolypothrix*, and *Nostoc*. Two of isolates could not be assigned to any morphotype. It is isolate AH 5 and isolate AH 35. In the phylogenetical part I confirmed the polyphyly of genera *Synechococcus*, *Leptolyngbya* and *Pseudanabaena*. I remain uncertain about some isolates regarding their genera. The morphology points to one morphotype, but the sequence of the isolate lies on another branch with other genera, i.e. *Aphanothece*, *Cyanothece/Gloeothece*, or isolates AH 5 and AH 35, which are on the same branch as *Synechocystis*, but *Synechocystis* has a rather different description from my isolates. The cyanobacterium *Plectonema* may be a polyphyletic genus because it is on two branches with *Leptolyngbya* (it holds for my isolate and also for the sequence from GenBank).

I also observed that cyanobacterial diversity in stromatolites in Westerhöfer creek is very similar to marine stromatolites and it is there possible to assume that the creation of stromatolites depends on certain genera/species of cyanobacteria, independent of the environment.

The cyanobacteria which did not occur in the non-calcified site WB 1, can be regarded as possibly calcifying organisms, which concerned cyanobacteria *Microcoleus/Tychonema/Phormidium*, *Leptolyngbya*, *Synechocystis*/isolates AH 5 and AH 35, and *Synechococcus*.

Obsah

| | |
|--|----|
| Abstrakt..... | 1 |
| Abstract..... | 2 |
| Obsah..... | 3 |
| Poděkování..... | 4 |
| Úvod..... | 5 |
| 1. Sinice (cyanobakterie, cyanophyta, cyanoprokaryota)..... | 5 |
| 1.1. Fotosyntetický aparát..... | 5 |
| 1.2. Speciální typy buněk..... | 5 |
| 1.3. Rozmnožování..... | 6 |
| 1.4. Ekologie sinic..... | 7 |
| 1.5. Fenoplasticitá (proměnlivost znaků vlivem vnějších podmínek) sinic..... | 7 |
| 1.6. Systém sinic..... | 8 |
| 2. Stromatolity..... | 12 |
| 2.1. Definice stromatolitu..... | 13 |
| 2.2. Vznik stromatolitů..... | 14 |
| 2.3. Vrstvy stromatolitu..... | 15 |
| 2.4. Vznik tufa stromatolitu v potoce Westerhöfer:..... | 16 |
| 3. Sinice a stromatolity..... | 16 |
| 4. Předchozí studie..... | 18 |
| 4.1. Morfologická část předchozí studie..... | 19 |
| 4.2. Molekulární část předchozí studie..... | 20 |
| 4.3. Popis odběrových míst..... | 20 |
| Materiál a metody..... | 22 |
| 1. Odběr vzorků..... | 22 |
| 2. Kultivace vzorků..... | 22 |
| 3. Izolace sinic..... | 23 |
| 4. Molekulární metody..... | 24 |
| 5. Klonování 16S rDNA z environmentální DNA..... | 27 |
| 6. Fylogenetické analýzy..... | 30 |
| 6.1. Analýzy na základě kompletních sekvencí 16S rDNA..... | 32 |
| 6.2. Analýzy se všemi sekvencemi 16S rDNA (včetně parciálních sekvencí 16S rDNA získaných klonováním)..... | 33 |
| Výsledky..... | 34 |
| 1. Izoláty..... | 34 |
| 1.1. Kokální morfotypy..... | 35 |
| 1.2. Vlákňité morfotypy..... | 39 |

| | |
|---|----|
| 2. Fylogenetické analýzy | 46 |
| 2.1. Analýzy na základě kompletních sekvencí 16S rDNA..... | 46 |
| 2.2. Analýzy se všemi sekvencemi 16S rDNA (včetně parciálních sekvencí 16S rDNA získaných klonováním) | 51 |
| Diskuze | 57 |
| 1. Sinice spojené se stromatolity – potok Westerhöfer versus mořské stromatolity | 57 |
| 2. Klonování environmentální DNA – výhody a nevýhody | 58 |
| 3. Fylogenetická analýza + morfologie – izoláty..... | 60 |
| 4. Fylogenetická analýza – Unidentified z předchozí studie | 63 |
| 5. OTUs k určení kalcifikace | 63 |
| Závěr | 65 |
| Použitá literatura | 66 |
| Přílohy..... | 75 |

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala lidem, kteří měli velký podíl na tom, že jsem mohla tuto diplomovou práci sepsat.

Poděkování patří profesoru Thomasu Friedlovi z německé univerzity Georg-August Universität Göttingen, kde jsem vypracovala praktickou část diplomové práce v laboratořích sbírky řas EPSAG, za to, že mi umožnil stát se na rok a půl členem jeho laboratoře, Nicole Brinkmann za introdukci do mé diplomové práce, Christine Hallmann za velkou pomoc s postupem při klonování a rady, jak na problémy této metody. Ilse Kunkel a Marlis Heinemann za velkou pomoc při přípravě medií a rady ohledně izolace sinic. Ostatním lidem této laboratoře moc děkuji za vstřícné a opravdu přátelské prostředí. Dále děkuji svému manželovi Ladislavu Hodačovi za vedení praktické části diplomové práce v Göttingenu a psychickou podporu během celého vzniku této práce.

Velké poděkování patří rozhodně mému českému školiteli Mgr. Marku Eliášovi PhD., který mě provedl postupy molekulární biologie, trpělivě pomáhal se zpracováním fylogenetiky a korigoval samotný text diplomové práce.

V neposlední řadě patří dík mojí rodině, která mě v psaní podporovala všemi možnými způsoby.

Úvod

1. Sinice (cyanobakterie, cyanophyta, cyanoprokaryota)

Sinice jsou fotosyntetická prokaryota, což znamená, že nemají jádro, buněčné organely s membránami (jako jsou například mitochondrie nebo diktyozomy), cytoskelet ani bičíky (ty sice bakterie mohou mít, ale u sinic nebyly nikdy objeveny, MAUSETH, 2009) a jsou schopné fotosyntézy. Jedná se o gramnegativní eubakterie. Sinice jsou známy schopností tvorby vodních květů a toxinů, ale mohou sloužit i jako potravinové doplňky, jako například sinice *Spirulina* (správně *Arthrospira*), nebo se cytotoxiny izolované ze sinic mohou používat dokonce jako cytotoxická antibiotika. Sinice mohou obsahovat aerotopy, což jsou shluky plynových měchýřků, nacházející se uvnitř buňky, a napouštěním či vypouštěním plynu pomáhají k pohybu ve vodním sloupci (KALINA & VÁŇA, 2005).

1.1. Fotosyntetický aparát

Tylakoidy jsou hlavní strukturou fotosyntetického aparátu, uvnitř probíhá samotná fotosyntéza, a na povrchu se nacházejí fykobilisomy. V nich se nachází fykobiliproteiny – allofykocyanin, fykocyanin a fykoerytrin, které umožňují sběr světla v různých oblastech barevného spektra. Sinice mohou mít všechny typy chlorofylů a také β -karoten, zeaxantin, echineon, kantaxantin a xantofyl, specifický pro sinice – myxoxantofyl (KALINA & VÁŇA, 2005).

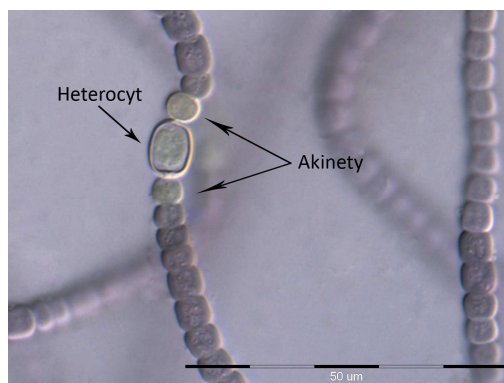
Ze sinic, které byly pohlceny eukaryotickou buňkou (avšak nestráveny), se vyvinuly plastidy, což umožnilo rozšíření fotosyntézy u eukaryotických organismů (DOUGLAŠ & TURNER, 1991, DELWICHE *ET AL.*, 1995, TURNER *ET AL.*, 1999, KEELING, 2004). Která sinice byla pohlcena se však zatím neví (TURNER *ET AL.*, 1999). Sinice tedy měly v historii Země zásadní vliv.

1.2. Speciální typy buněk

Heterocyt je speciální buňka, která je schopna fixovat dusík (začlenit vzdušný dusík do organické sloučeniny) díky enzymu nitrogenáze, která pracuje pouze za přísně anaerobních podmínek. Buňka tedy musí zabránit přístupu vzduchu. Fixace dusíku jsou

schopny i sinice, které heterocyty netvoří. Ty pak využívají k tomuto procesu noc, kdy je fotosyntéza minimální.

Akinety jsou buňky, tvořící se za nepříznivých podmínek, které se ale liší pro různé druhy sinic. Často bývají větší než vegetativní buňky. Akinety jsou běžné pro heterocytární vláknité sinice, ale vyskytují se i u kokálních sinic (KALINA & VÁŇA, 2005).



Obr.č. 1 Sinice *Nostoc* – znázornění heterocytu a akinet, měřítko 50 µm.

1.3. Rozmnožování

Běžně se sinice rozmnožují dělením buněk, a to jak vláknité, tak kokální. Mohou se ale rozmnožovat i exosporami, které vznikají na konci kyjovité buňky, která je přisedlá k podkladu. Ty se pak uvolňují do prostředí (*Chamaesiphon*). Rozmnožování může probíhat pomocí baeocytů (*Chroococciopsis*). Některé vláknité sinice jsou schopny vytvářet hormogonia – krátká pohyblivá vlákna složená z několika málo buněk. Bývají bohatá na zásoby dusíku, fosforu a případně dalších látek (WHITTON & POTTS, 2000). Hormogonia heterocytárních sinic bývají jednodušší než jiných vláknitých (RIPPKA *ET AL.*, 1979). Hormogonia hrají významnou roli v šíření sinic kvůli schopnosti rychlého pohybu a odolnosti. Některé kolonie vznikají ze shluku několika hormogonií (např. *Rivularia*) a některé z jednoho hormogonia (např. *Nostoc*) (WHITTON & POTTS, 2000).



Obr.č. 2 Sinice *Phormidium* – hormogonium, měřítko 20 µm.

1.4. Ekologie sinic

Sinice jsou schopné obývat všemožné biotopy, od sladkovodních nádrží po oceány, půdy, ale také extrémní biotopy, jakými jsou pouště (GARCIA-PICHEL, 2001), Antarktida (JUNGBLUT *ET AL.*, 2005) nebo stromatolity (FOSTER *ET AL.*, 2009). Dokáží žít také v extrémně zásaditých podmínkách (např. *Leptolyngbya* v prostředí s pH 13,5). Důležitá je také jejich schopnost symbiózy. Nejvýznamnější endosymbiózou je to, že sinice daly vznik chloroplastům eukaryotních rostlin (KEELING, 2004).

Sinice jsou ale také fykobionty (cyanobionty) lišejníků a rostlin, jako např. rostlin *Gunnera* nebo *Azolla*. Významným symbiontem je sinice *Nostoc*, a to jak v lišejnících, tak v rostlinách *Gunnera* i *Azolla* (RAI *ET AL.*, 2002).

1.5. Fenoplasticita (proměnlivost znaků vlivem vnějších podmínek) sinic

Sinice jsou velmi flexibilní organismy, které se dokáží přizpůsobit i velké změně prostředí (velká změna teplot, vlhkosti, světelnosti). Jsou to bakterie schopny laterálního (= horizontálního) genového transferu (HGT) (organismus přijme gen dárce, ačkoliv není jeho potomkem, může tak získat nové, výhodné vlastnosti). Toto je problematické pro taxonomii sinic (CASTENHOLZ, 1992, RUDI *ET AL.* 1998).

Taxonomie sinic se z historických důvodů řídí botanickým kódem, jenže se jedná o bakterie a měl by se tedy používat kód bakteriologický (STANIER, 1978). Tohoto kódu se držel RIPPKA *ET AL.* (1979), když vytvářel svůj systém, který obsahoval pět skupin a do těch se organismy rozdělovaly podle přítomnosti vláken, typu větvení, typu dělení, přítomnosti heterocytů a obsahu bází C a G. Testovány byly ale kultury z laboratoří, a proto neodpovídaly plně přírodním podmínkám (ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK, 1985). Nejnovější určovací klíče napsali KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1989, 1990, 1998) a ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK (2005), nicméně se drželi botanického kódu.

Co se týče fylogenetických studií, ribosomální RNA operon, konkrétně úsek 16S rDNA, byl shledán dostatečně konzervativním pro fylogenetické analýzy, ale to pouze do úrovně rodu, určení druhu pomocí 16S rDNA je nereálné právě kvůli stupni konzervace (CASTENHOLZ, 1992, WILMOTE, 1994, STALEY, 2006). Problémem může ale samozřejmě být také HGT. Dlouho se myslelo, že úsek 16S rDNA není tímto transferem ovlivněn, nicméně práce MILLERA *ET AL.* (2005) dokazuje, že to tak není a i tento úsek může obsahovat část sekvence přenesenou z jiného bakteriálního organismu (v tomto případě obsahuje *Acarychloris marina* část regionu SSU *Escherichia coli*). Já jsem se nepouštěla

do podrobné fylogenetické analýzy mých izolátů, ale spíše se zajímala o pozici na fylogenetickém stromu na úrovni rodu (tzv. morfotypy), a to hlavně pro bližší určení neidentifikovaných skupin sinic, které jsem získala klonováním směsných vzorků. V podobných pracích, jako je ta moje, se při molekulárních analýzách pracuje také pouze s rody (JUNGBLUT *ET AL.*, 2005, COUSIN & STACKEBRANDT, 2010). Pozice sinic ve fylogenetickém stromu často souvisí také s ekologickými charakteristikami těchto sinic (ZWART *ET AL.*, 2002). Od toho by se měl také odvíjet nový bakteriální systém, o kterém píše STALEY (2006).

Studie JIŘÍHO KOMÁRKA z roku 2010 říká, že sinice mají zvláštní typ vývoje, tzv. stagnující evoluci, což znamená, že jsou současné sinice morfologicky velmi podobné původním prekambriickým sinicím. Může za to několik faktorů. Jednak ve srovnání s dalšími bakteriemi (například *E.coli*) dlouhá generační doba a velikost genomu, který je u sinic větší, než u ostatních běžně zkoumaných bakterií. Sinice mají často polyploidii, proto se mutace v jedné alele nemusí na morfologii sinice projevit a navíc se mutace objevují málo (CASTENHOLZ, 1992).

STACKEBRAND & GOEBEL (1994) navrhuji limit pro vymezení druhů 95% identitu genomové sekvence, což je hodnota o 2% menší, než u řas zelených, a počítá s určitou variabilitou uvnitř genomu, ale spousta prací stále užívá hladinu 97% (např. LEE & BAE, 2002, FOSTER *ET AL.*, 2009), stejně jako já ve své práci.

1.6. Systém sinic

Sinice jsou tradičně na základě morfologie rozdělovány do čtyř řádů – Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales a Stigonematales (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1989, 1990, 1998, ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 2005). Někteří autoři ještě přidávají řád Pleurocapsales (například RIPPKA *ET AL.* 1979, CAUDALES *ET AL.*, 2000), která obsahuje sinice, jež se od Chroococcales s.s. odlišují rozmnožováním baeocyty a tím, že jsou schopny tvořit nepravá vlákna (např. *Hyella*), nicméně často je tato skupina zahrnována do Chroococcales. Ukazuje se ale, že na základě fylogenetické analýzy jsou řády Chroococcales a Oscillatoriales polyfyletické a netvoří tedy dvě odlišené skupiny (například VALÉRIO *ET AL.*, 2009). Také většina rodů uvnitř Chroococcales je polyfyletická, až na rody *Microcystis* a *Aphanothece* (LEE & BAE, 2002). Stejná situace platí také pro Oscillatoriales a například samotná *Oscillatoria* je rozptýlena po celém fylogenetickém stromu pro Oscillatoriales (LEE & BAE, 2001). U řádů Nostocales a Stigonematales je však

situace jiná. Tam fylogenetické studie na základě 16S rDNA naznačují, že jsou řády monofyletické (WILLMOTE, 1994, TURNER *ET AL.*, 1999, GUGGER & HOFFMANN 2004, HENSON *ET AL.*, 2004). Situace s rody je ještě složitější, pro příklad, rod *Phormidium* je zastoupen na mnoha pozicích ve fylogenetickém stromu například ve studii ARP *ET AL.* (2010) a stejná situace je s rodem *Leptolyngbya* a dalšími. Je proto nemožné sinice rozdělit jak podle morfologie, tak podle odpovídající fylogeneze a je potřeba další revize celého oddělení (nebo kmene, použijeme-li bakteriologické rozdělení). Studie SCHIRRMEISTER *ET AL.* ukazuje na to, že vláknitost u sinic vznikla již velmi brzy a shodné morfologické znaky se musely vyvinout několikrát (některé vláknité sinice se vrátily opět k jednobuněčnosti a naopak) (SCHIRRMEISTER *ET AL.*, 2011), což by správné zařazení podle morfologie v podstatě znemožňovalo. Na to ukazuje již výše zmíněné promíchání Oscillatoriales a Chroococcales. Přesto rozdělení podle morfologie uvádím.

Rozdělení sinic podle morfologických znaků:

Kokální sinice

Řád: Chroococcales

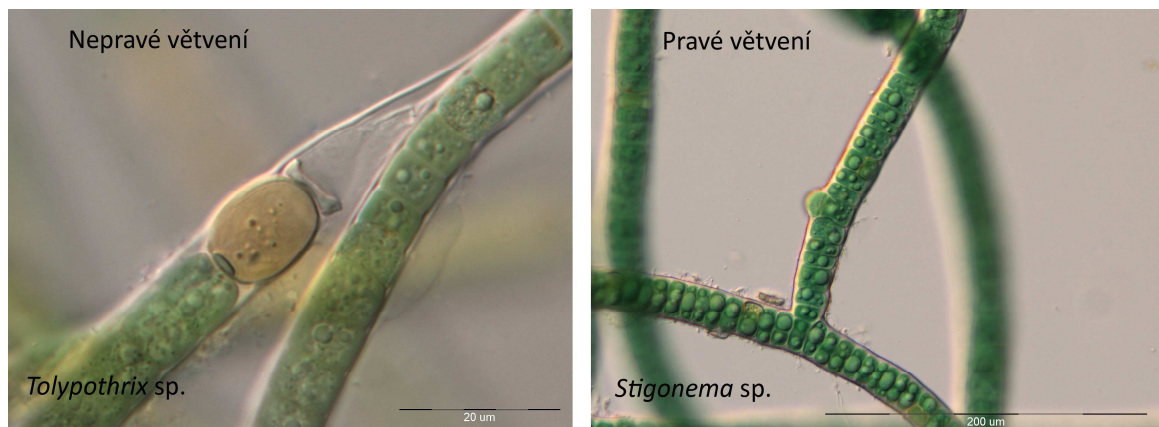
Do tohoto řádu patří kokální sinice a kokální sinice tvořící kolonie. Nikdy netvoří pravá vlákna, ale některé druhy tvoří nepravá vlákna (*Hyella*, Pleurocapsales). Buňky mohou, ale nemusí být polarizované, neboli že rostou jen jedním směrem (a druhý konec buňky je například přichycen k podkladu), a to jak samostatné buňky, tak se tímto směrem buňka i dělí. Některé rody (ale může se vyskytovat třeba i jen u některých druhů) mají slizovitý obal, který je důležitý i pro taxonomii. Tento obal může mít různou strukturu, tvar, trvanlivost, vrstvení a může se lišit i schopností srážení minerálů nebo barvou. Uspořádání tylakoidů je také důležitý morfologický znak. Určuje se počet a uspořádání tylakoidů. Znaky založené na tylakoidech (kromě počtu a pozice v buňce) se mohou měnit i v průběhu roku i v průběhu buněčného cyklu. Důležité jsou pojmy centroplasma a chromatoplasma. Centroplasma je vnitřní část buňky, kde se nenacházejí tylakoidy, zatímco chromatoplasma je vnější část buňky, kde se tylakoidy nacházejí. Rozmnožování probíhá dělením, a to buď v jedné (*Aphanothece*), ve dvou (*Merismopedia*) nebo třech rovinách (*Microcystis*). Polarizované dělení je známé u rodu *Chamaesiphon*. Nanocyty a baeocyty (Pleurocapsales) vznikají vícenásobným dělením (*Stanieria*). Velmi často se

kokální sinice shlukují do kolonií. Mohou a nemusejí být ve slizovité pochvě. Mohou být kulovité, volně plovoucí nebo přichycené k podkladu (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1989).

Vláknité sinice

Vláknité sinice se mohou větvit a jedná se o důležitý morfologický znak (viz níže). Existují 2 typy větvení:

1. Nepravé větvení, kdy se vlákno vychýlí ze směru původního růstu a po překročení nějaké překážky (heterocyt, nekrotická buňka) pokračuje v růstu (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1989).
2. Pravé větvení, kdy kterákoliv buňka může změnit libovolně směr dělení (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1990).



Obr.č. 3 Znázornění nepravého a pravého větvení u sinic. Zde na obrázku rod *Tolypothrix* jako zástupce nepravého větvení a rod *Stigonema* jako zástupce větvení pravého.

Řád: Oscillatoriales

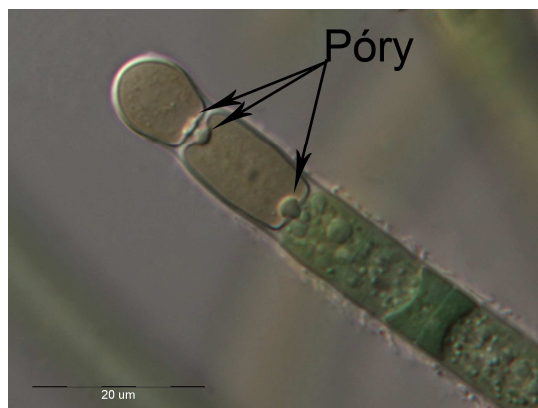
Jedná se o vláknité sinice, které mohou mít nepravé větvení, netvoří ani heterocyty ani akinety. Někdy se mohou pohybovat (*Oscillatoria*). Důležitým morfologickým znakem je často také konečná buňka vlákna a její tvar, zaškrcení mezi buňkami, výskyt slizovité pochvy, velikost buněk nebo také buněčné inkluze (granulace).

Na poslední buňce se může nacházet kalyptra, což jsou zbytky slizové pochvy nebo nekrotické buňky, které buňku pokrývají. Tato poslední buňka může mít výrazně různý vzhled než ostatní buňky vlákna. Může být zaoblená, ale také do špičky nebo paličkovitá.

Vláknina jsou tvořena jednou řadou buněk. (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005)

Řád Nostocales

Nostocales jsou vláknité sinice, jejichž vlákna jsou uniseriátní. Mají nepravé větvení, což znamená, že větev vzniká buď tlakem dvou buněk na sebe a tím proniknou trichomem, nebo přes nekrotickou buňku či heterocyt. Na vzhled má velký vliv prostředí. Vlákna jsou buď isopolární (oba konce vlákna se od sebe neliší, mohou být oba do špičky nebo zakončené heterocytem, *Cylindrospermum* nebo *Nostoc*) nebo heteropolární (konce se od sebe liší, například tím, že se heterocyt nachází jen na jednom konci vlákna, např. *Calothrix*). Charakteristické znaky pro tuto skupinu jsou schopnost tvorby heterocytů, které jsou schopné fixovat vzdušný dusík a častá tvorba akinet. Heterocyty mohou mít jeden nebo dva póry (zabraňují vstupu kyslíku ze sousední buňky do heterocytu), což záleží na tom, kde se heterocyt nachází. Pokud jde o bazální heterocyt, pak potřebuje pouze jeden pór, kterým se dotýká další buňky. Pokud leží heterocyt uprostřed vlákna, pak má póry dva. Jak často se heterocyty ve vlákně objevují, to záleží na prostředí. Pokud je v prostředí málo dusíku, pak je heterocytů více (jak lze například pozorovat při srovnání *Nostoc* na BG 11 a Z 45/4 mediu). Většinou tvoří kolonie, které mohou mít i velké rozměry (např. *Nostoc*). Tvoří hormogonia (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1989).



Obr.č. 4 Rod *Tolypothrix*, znázornění dvou typů heterocytů, na bazálním lze pozorovat jeden pór, na interkalárním jsou pak viditelné póry dva.

Řád: Stigonematales

Stigonematales jsou patrně nejvyvinutější sinice s komplikovanou stavbou stélky. Mají heterotrichální vlákna (jedno hlavní vlákno s postranními větvemi), s pravým větvením, tvoří heterocyty a také akinety a hormogonia. Buňky jsou schopné dělit se ve více směrech, často tvoří multiseriátní vlákna. Zajímavé je, že u tohoto řádu se těžko rozeznává, co je vlákno a co slizovitá pochva, tvoří v podstatě komplex (KOMÁREK &

ANAGNOSTIDIS, 1990). Já jsem ve svých vzorcích nepozorovala žádné sinice z řádu Stigonematales.

2. Stromatolity

Podle MOJZSIS *ET AL.*, 1996 vznikl život na Zemi před 3,8 miliardami let. Jednalo se o malé prokaryotní organismy, které se začaly zvětšovat až před 3 miliardami let. Šlo o sinice a další bakterie, sinice později změnilly bezkyslíkatou atmosféru v atmosféru s kyslíkem a umožnily tím život na souši.

První stromatolity se začaly na Zemi objevovat přibližně před 3450 miliony let (pozdní archaikum) (MASON & BRUNN, 1977, LOWE, 1980, RIDING, 2000) a největší rozmach zažily v mesoproterozoiku. Většina jich pak vymizela v průběhu období fanerozoika (to začalo před 540 miliony let). Dnes je možné nalézt původní stromatolity jen na několika málo lokalitách, například v Shark Bay v Austrálii a na Bahamách (SHIRAISHI, 2008).

Výraz „stromatolith“ (*lat* stroma = ve vrstvách, *řec* lithos = kámen) byl poprvé použit v roce 1908 KALKOWSKYM, který jej popsal jako laminovanou bentickou horninu vzniklou za pomoci mikrobů, a ačkoliv to nemohl dokázat, věřil, že těmi mikroby jsou nižší rostliny. Později bylo dokázáno, že tento velký vliv mají sinice (např. BLACK, 1933, STAL, 2000). Aby bylo možné pochopit, jak se mohou mikroorganismy podílet na vzniku stromatolitu, je třeba vědět, jak stromatolit vzniká. Stromatolit patří do skupiny tzv. microbialities, neboli mezi horniny vzniklé za pomoci mikroorganismů. Microbialities se dělí na 4 skupiny – stromatolity, thrombolity, dendrolity a leiolity (RIDING, 2000).

Základní rozdíly spočívají v typu vzniku a vzhledu horniny (s čímž souvisí uspořádání mikroorganismů při vzniku). Stromatolity jsou laminované horniny, thrombolity mají na průřezu chuchvalcovitý vzor, dendrolit má na průřezu výrazný stromkovitý vzor a leiolit nemá žádný vzor, na průřezu je hladký (RIDING, 2000).

Ale existuje i více typů stromatolitů.

- **Skeletální stromatolit** – v těchto stromatolitech zůstávají mikroorganismy, které měly na jejich vznik vliv, zachované a kalcifikované a z toho pochází i název, vyskytovaly se v mořích v paleozoiku a mesozoiku (před 542 – cca 200 miliony let) a některé současné stromatolity z vápenatých potoků jsou pravděpodobně tohoto typu.

- **Spojený** (naznačuje metody vzniku – grain trapping a binding, kteréžto jsou spojeny) **stromatolit** (agglutinated stromatolite) – vzniká grain trappingem/bindingem, kdy se nabalují různě velká zrna písku, nachází se například v Shark Bay v Austrálii.
- **Stromatolit z jemných zrněk písku** – může vznikat i srážením minerálů i grain trappingem, vyskytují se v tropických oblastech (např. Andros Island).
- **Tufa stromatolit** – stromatolit sladkovodních převážně tekoucích vod, který je tvořen kalcifikujícími a kalcifikovanými sinicemi, vzniká srážením minerálů na a ve slizovitých pochvách sinic a jiných mikroorganismů (RIDING, 2000). Tufa stromatolit také dokáže využít ke kalcifikaci i další organismy v potoce, jako například řasy (*Cladophora, Vaucheria* atd.) (GOLUBIC, 1976, PITOIS ET AL., 2001). V jezerech mohou tyto stromatolity dorůstávat ve vysoké „věže“ (EGGLESTON & DEAN, 1976), v potocích spíše pokrývají povrch dna.
- **Terestrický stromatolit** – tyto stromatolity se nachází na souši a důležité při procesu vzniku nejsou pouze sinice či bakterie, ale i houby a lišejníky (RIDING, 2000).

2.1. Definice stromatolitu

Definice z roku 1983 popisuje stromatolit takto: *Stromatolity jsou lamelované horniny, vznik je jasně spojen s mikrobiálními společenstvími, které svou morfologií, fyziologií a uspořádáním v prostoru a čase interagují s fyzikou a chemií prostředí, aby vyprodukovala vrstvenou předlohu, která se později stane horninou.* (KRUMBEIN, 1983)

Další definice z roku 1976 zní takto: *Sedimentující organická hornina vzniklá vychytáváním sedimentu, navazováním sedimentu a/nebo vysrážením jako výsledek růstu a metabolické aktivity mikroorganismů, převážně sinic.* (AWRAMIK & MARGULIS in WALTER, 1976).

Nicméně nejstarší, nejsnazší a přesto stále platná definice zakladatele slova stromatolit zní: *Stromatolit je lamelovaná hornina vzniklá za pomoci mikroorganismů* (KALKOWSKY, 1908).

WALTER roku 1976 vyslovil nezbytné podmínky ke vzniku „microbialities“.

- 1) Podmínky prostředí musí umožňovat růst organismů, které se podílí na vzniku „microbialities“.
- 2) Tyto organismy musí růst rychleji, než jsou likvidovány predátory.

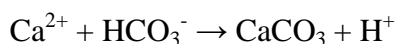
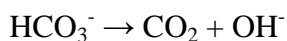
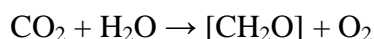
- 3) Rychlost sedimentace nesmí být příliš rychlá, aby organismy stihly povrch kolonizovat.
- 4) Destruktivní síly musí chybět nebo být téměř nezatelné.

Roku 1961 byly objeveny první stromatolity v Shark Bay (západní Austrálie). Tyto stromatolity jsou jen slabě vrstvené pevné vápenaté stromatolity, které jsou považovány za velmi podobné stromatolitům z prekambria. Dnešní vápencové stromatolity se tvoří v Polynéských atolech (kopara) (DÉFARGE *ET AL.*, 1994a, b) a dalších vodních prostředích. Zdá se, že za vrstevnatou strukturu může právě *in situ* srážení vápence (REID & BROWNE, 1991), protože stromatolity, které vzniknou bez vysráženého vápníku vrstevnatou strukturu postrádají.

2.2. Vznik stromatolitů

Je několik způsobů vzniku stromatolitů, ale nejdůležitější je „mineral precipitation“ (srážení, vysrážení minerálů) a s ním související „grain trapping“ (vychytávání zrněk). U sinic je důležité vychytávání CO₂ a/nebo HCO₃⁻ z vody a fixace CaCO₃ (PITTOIS *ET AL.*, 2001) a u ostatních bakterií amonifikace, denitrifikace a redukce sulfátu. Velký podíl na vzniku stromatolitu má také EPS – extracelulární polymerická substance, která se nachází ve slizovitých pochvách sinic (ale třeba i rozsivek nebo jiných bakterií) a je důležitá proto, že poskytuje místo pro nukleaci uhličitane a usnadňuje vychytávání sedimentu (nabaluje na pochvu zrnka písku) a takto nabaleny sediment také stabilizuje (RIDING, 2000).

Rovnice fotosyntetické kalcifikace (VISSCHER *ET AL.*, 1998):



- Grain trapping – mikroby jednak stabilizují dříve utvořený sediment (který bude tvořit nový stromatolit) a jednak zachycují na svou pochvu další zrnka (BLACK, 1933). Trapping jde ruku v ruce s tzv. binding (svázání) - mikroby navazují na sebe zrnka a pak z nich tvoří sediment, aby další mikroorganismy měli na čem růst

(RIDING, 2000). Grain trapping je častý v současných odlivových oblastech (BLACK, 1933) a je považovaný za klíčový bod při tvorbě stromatolitu.

- Precipitation – jedná se o upevnění (cementaci) nachytaného sedimentu ve stromatolitu. Dojde ke kalcifikaci sinic a zpevnění celé horniny. Procesu se říká lithifikace (zkamenění). Tento typ vzniku je běžný v tufa stromatolitech nebo dendrolitech (RIDING, 2000) a vznikaly tak původní dávné stromatolity (AWRAMIK & RIDING, 1988).



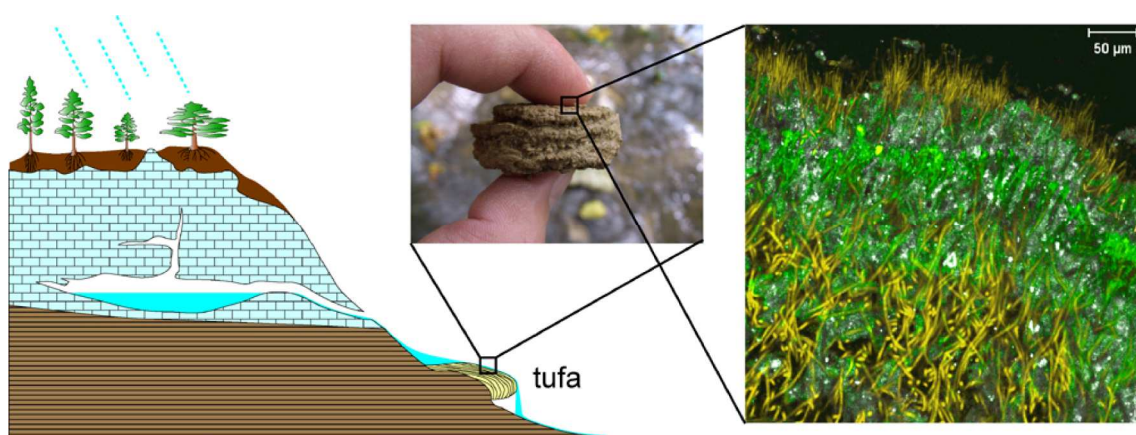
Obr.č. 5 Mořské stromatolity ve srovnání s tufa stromatolity z potoku Westerhöfer. Fotografie mořského stromatolitu pochází z http://www.crikey-adventure-tours.com/images/Stromatolites_underwater_md.jpg

2.3. Vrstvy stromatolitu

Na svrchní vrstvě se vyskytují sinice, což je logické, protože potřebují světlo. Někdy však na sinicích může ležet vrstva rozsivek nebo písku. A nebo tzv. scytonemin, který produkují sinice, které se podílejí na vzniku stromatolitu. Scytonemin je souhrnný název pro karotenoidy, kterými se sinice chrání před velkým množstvím světla a tedy poškozením buněk UV zářením (GARCIA-PICHEL & CASTENHOLZ, 1991). Pod sinicovou vrstvou se nachází vrstva, ve které chemotrofní organismy rozkládají zbytky sinic a kde panuje přísně bezkyslíkaté prostředí. Pod touto vrstvou se nachází vrstva purpurových bakterií, často je ve stromatolitech vidět tenká růžová vrstva (VAN GEMERDEN, 1993). Někdy se mezi sinicovou vrstvou a purpurovými bakteriemi vyskytuje vrstva oxidovaného železa (STAL, 1994). Není známo, jak tahle vrstva vzniká, mohlo by to být způsobeno oxidací při fotosyntéze a nebo bezkyslíkatou fotosyntézou purpurových bakterií. Někdy, zřídka, se pod vrstvou purpurových bakterií nachází vrstva zelených bezkyslíkatých fototrofních bakterií (WIDDEL *ET AL.* 1993, EHRENREICH & WIDDEL, 1994). Úplně spodní vrstva bývá zbarvena do šeda až černa díky obsahu FeS (sulfid železnatý) nebo FeS₂ (pyrit) (WHITTON & POTTS, 2000).

2.4. Vznik tufa stromatolitu v potoce Westerhöfer:

Srážková voda proudí skrz půdu, kde je vyšší tlak CO_2 než v atmosféře a který je tvořen dýcháním mikroorganismů v této půdě. Tato voda rozpouští vápenec, který je v půdě obsažen a vznikají tak vápenaté kationty. Ve chvíli, kdy tato voda dorazí na povrch, CO_2 se začne rychle uvolňovat do ovzduší (právě kvůli vyrovnání tlaku ve vodě a v atmosféře). Když se CO_2 uvolní, začne se rovnováha uhličitanu posouvat k nasycení CaCO_3 . Vzniká usazenina, na které kolonizují sinice a pomocí EPS pomáhají vytvořit kompaktní horninu. Někdy je vidět laminace. (SHIRAISHI, 2008).

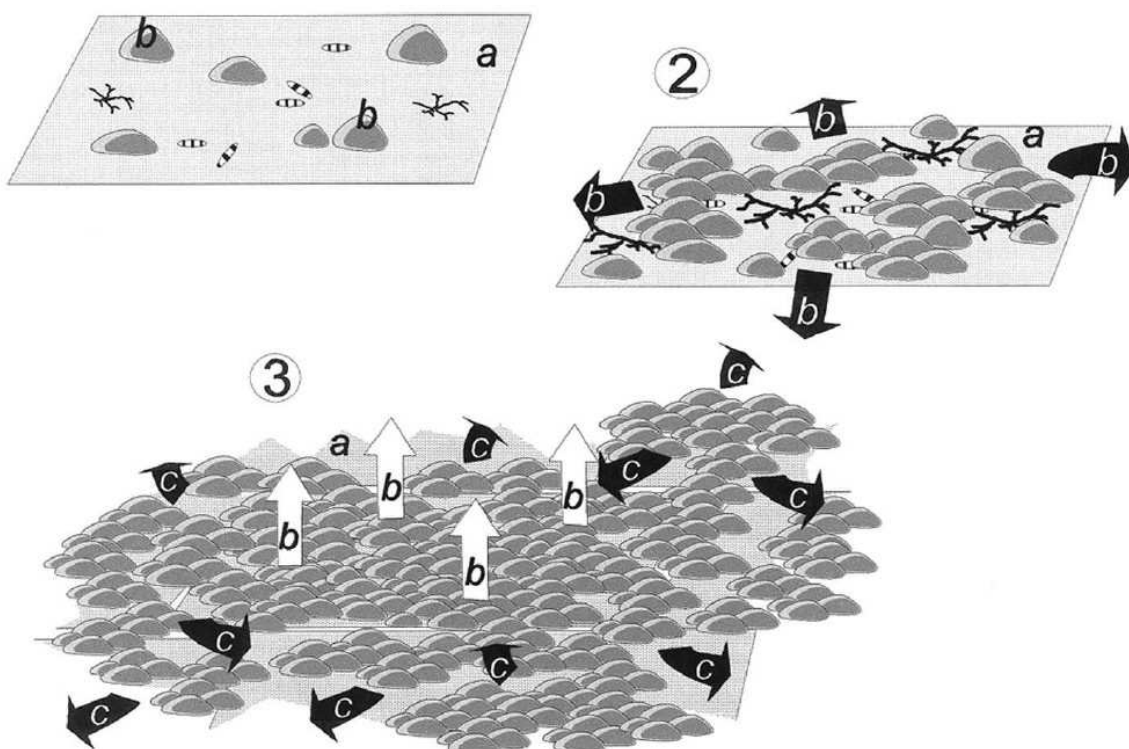


Obr.č. 6 Schematický pohled na vznik tufa stromatolitu v potoce Westerhöfer. Dešťová voda prochází vápencovým podložím a na vzduchu vzniká tufa. Pohled na laminaci. Mikroskopický pohled na povrch tufa stromatolitu s vláknitými sinicemi (SHIRAISHI, 2008).

3. Sinice a stromatolity

To, že právě sinice mají vliv na tvorbu stromatolitů, je způsobeno i kombinací vlastností sinic. Jsou to jedna z fototrofních prokaryot, a prokaryota se změnám přizpůsobují výrazně lépe než eukaryota. Některé sinice jsou schopny využívat jako zdroj dusíku i dinitrogen (N_2) (CHARPY *ET AL.*, 2010) a také jim stačí nižší světelná intenzita – jsou schopné využít větší část světelného spektra (VAN LIERE *ET AL.*, 1979). Jsou také schopné bezkyslíkaté fotosyntézy založené na sulfidech (COHEN *ET AL.*, 1975). Geologický vliv sinic jsem již zmínila v podkapitole 2. Stromatolity (na str. 12), jedná se hlavně o schopnost srážení minerálů (v tomto případě hlavně CaCO_3). Sinice se podílejí již na samotném vzniku stromatolitů (REID *ET AL.*, 2000, PITOIS *ET AL.*, 2001), a to ve třech fázích.

1. Kolonizační fáze – první osidlující, kalcifikující sinice utváří prvotní kolonie a prvotní biofilm.
2. Růstová fáze – dominuje kalcifikující sinice (například *Phormidium incrustatum*), biomasa se zvětšuje, kolonie se spojují, biofilm se rozrůstá do šířky. Dochází ke kalcifikaci sinic.
3. Fáze rozšíření – kolonie se rozšiřují jak horizontálně, tak vertikálně, na přilehlý substrát, utváří se stromatolit, dochází ke grain trappingu a cementaci (PITOIS *ET AL.*, 2001, DUPRAZ & VISSCHER, 2005).



Obr.č. 7 Vznik stromatolitu. 1 – prvotní kolonizace, a – základní biofilm, b – první kolonie sinic, 2 – horizontální expanze biofilmu, a – základní biofilm, b – horizontální růst kolonií sinic, 3 – vertikální a horizontální expanze biofilmu, a – základní biofilm, b – vertikální růst biofilmu, c – horizontální růst biofilmu (PITOIS *ET AL.*, 2001).

Stromatolit se neuvěří stále stejně a vznikají mezery, které kolonizují endolitické kokální sinice. Ty modifikují sediment a vytváří tenké zkamenělé vrstvy, lamely (REID *ET AL.*, 2000). Pohyb sinic stromatolitem není příliš známý, ale některé vláknité sinice jsou schopny po kalcifikaci substrátu vertikálního pohybu díky slizovitým pochvám (REID *ET AL.*, 2000). Předpokládá se, že kolonizace dalších vrstev stromatolitu je možná také díky dalším sinicím přítomným v daném prostředí (PITOIS *ET AL.*, 2001).

Dnes se vytvářejí více sladkovodní stromatolity a souvisí to se skutečností, že výskyt kalcifikujících sinic je vyšší ve sladkovodním prostředí, než v mořském (GOLUBIC, 1973, RIDING, 1991).

Sinice, které dříve tvořily stromatolity, byly podobné dnešním sinicím *Oscillatoria* a *Lyngbya* (Oscillatoriales) a nacházely se zde také sinice podobné rodům *Nostoc* a *Scytonema* (Nostocales), které se vyskytují v dnešních stromatolitech (SCHOPF & WALTER, 1982). Podle studie DITTRICH & SIBLER (2010) je schopná kalcifikace i kokální sinice *Synechococcus*. Většina studií zabývajících se sinicemi a stromatolity se zaměřovala primárně na kalcifikující sinice a ne na diverzitu sinic, které se ve stromatolitu nacházejí. V těchto pracích byly vyhodnoceny jako kalcifikující sinice *Phormidium incrustatum* (MERZ-PREIB & RIDING, 1999, PITOIS ET AL., 2001, ARP ET AL., 2010) (pro sladkovodní stromatolity) a případně *Schizothrix fasciculata* (pro sladkovodní stromatolity) (PITOIS ET AL., 2001) nebo *Schizothrix* bez druhového určení (pro mořské stromatolity) (REID ET AL., 2000, VISSCHER ET AL., 2000, DUPRAZ & VISSCHER, 2005), či *Scytonema mirabile* (mořské stromatolity) (DÉFARGE ET AL., 1994a). V těchto studiích také byly objeveny sinice, které nepovažují autoři za kalcifikující:

Sladkovodní stromatolity: neurčení zástupci Chroococcales, *Rivularia* sp., *Tolypothrix* sp. (PITOIS ET AL., 2001), *Phormidium (Lyngbya)* sp., *Aphanocapsa endolithica* a *Hyella fontana* (MERZ-PREIB & RIDING, 1999).

Mořské stromatolity: *Phormidium crossbyanum*, *Aphanothece stagnina* (DÉFARGE ET AL., 1994a), *Solentia* sp. (endolitická kokální sinice) (REID ET AL., 2000, DUPRAZ AND VISSCHER, 2005).

Nicméně byla studována i sinice *Rivularia* (druhy *R. biasolettiana* a *R. haematites*) na kalcifikaci a byla určena jako schopná kalcifikace (PENTECOST & FRANKE, 2010)

Studie, které byly zaměřeny na biofilm stromatolitů a sinicovou diverzitu obecně, uvádím v kapitole Diskuze – 1. Sinice spojené se stromatolity – potok Westerhöfer versus mořské stromatolity.

4. Předchozí studie

Potok Westerhöfer byl pro své zajímavé vlastnosti studován již dříve (například JACOBSON & USDOWSKI, 1975, USDOWSKI ET AL., 1979), nicméně hlavně z geologického

hlediska, a první větší studie, která byla zaměřena také na organismy tam žijící, je práce Gernota Arpa a kolektivu, publikovaná v roce 2010 (ARP *ET AL.*, 2010), z níž čerpám i následující informace v této podkapitole. Potok Westerhöfer je umístěn 27 km severovýchodně od města Göttingen v Dolním Sasku v Německu, poblíž pohorí Harz (viz příloha č.1). Vodu získává z pramenu z období středního triasu ze skupiny lasturnatého vápence. Povodí zabírá přibližně 3,5 km², potok sám o sobě je široký do 2 m a dlouhý 340 m. Potok je vápenato-bikarbonátového typu, charakteristický koncentrací Ca²⁺ 2-5 mmol/l a celkovou alkalinitou o hodnotách 4-6 meq/l (ARP *ET AL.* 2001, SHIRAISHI *ET AL.* 2008). Voda v potoce je obohacena o Ca²⁺ (3,0-5,2 mmol/l), Mg²⁺ (1,1-1,8 mmol/l), SO₄²⁻ (1,8-3,9 mmol/l) a také hodnota stroncia a baria je vyšší. pH u pramene je 7,0-7,3 a tlak CO₂ je vysoký, 10 000-15 000 µatm, díky rychlému uvolňování CO₂ do ovzduší se však tlak CO₂ sníží velmi rychle na 800-1100 µatm. Snižování pCO₂ je spojeno se zvyšováním pH, takže i když má potok u pramene pH cca 7,3, na konci potoku už je to 8,3-8,4. To, že dochází k vysrážení CaCO₃, je znatelné na ztrátách Ca²⁺ a celkové zásaditosti. Snižování koncentrace SO₄²⁻ ukazuje na to, že se síran také inkorporuje do stromatolitu. pH a teplota vody zůstávají během roku víceméně konstantní. Hydrochemické parametry neukazují na sezónní variabilitu.

4.1. Morfologická část předchozí studie

V předchozí studii byly zkoumány mikroorganismy pouze na odběrovém místě WB 5. Bylo objeveno 6 sinicových morfotypů. *Phormidium incrustatum* na povrchu stromatolitu. Tvoří shluky vláken, mezi kterými se vyskytují také vlákna *Lyngbya* sp. Další morfotyp, *Leptolyngbya foveolarum*, utváří koberce vláken a převažuje hlavně na podzim. *Pseudanabaena* sp. byla nalezena v hlubší části biofilmu. Tam se také nachází *Hyella fontana*. V hlubší části se také vyskytuje *Aphanothece castagnei*.

Problém s morfologickou identifikací sinic spočívá v tom, že prakticky neexistuje jednotná určovací příručka. Jedna konkrétní sinice může být popsána jednou jako *Lyngbya phormidium* a podruhé jako *Phormidium tergestinum*, záleží na použité literatuře. Někteří autoři tak mohou ve stromatolitech identifikovat sinici *Schizothrix* sp., zatímco jiní by ji identifikovali jako *Leptolyngbya foveolarum*. Další problém vyvstává, pokud se rody (popřípadě dokonce druhy) neurčují podle klíče, ale pouze na základě podobnosti sekvencí z GenBank. Není totiž vždycky jasné, jak který autor danou sinici určoval, je možné, že

jde o špatné určení a toto špatné určení se pak přebírá ze studie na studii. Nicméně u sekvencí klonových bank jiný postup zvolit nejde.

4.2. Molekulární část předchozí studie

Molekulárně byl studovaný biofilm odběrového místa WB 5 (ARP *ET AL.*, 2010). Z tohoto místa byla osekvenována parciální 16S rDNA 711 klonů a tyto sekvence utvořily 9 nezávislých linií. 6 z nich zůstalo neidentifikovaných. Dominovaly linie „Unidentified B“ a *Tychonema* sp. (43% a 31% ze všech klonů). Na povrchu biofilmu se objevily linie *Chamaesiphon* sp., „Unidentified D“ a „Unidentified E“. Další linie „Unidentified C“ a *Pseudanabaena* sp. se objevily i pod biofilmem. „Unidentified A“ a „Unidentified F“ pocházely z vrstvy pod biofilmem (ARP *ET AL.* 2010).

Reprezentativní sekvence těchto skupin používám také ve své diplomové práci, a to pro případné objasnění těchto neidentifikovaných skupin, což je jeden z cílů této diplomové práce.

4.3. Popis odběrových míst

Jelikož daná odběrová místa pro potok Westerhöfer byla detailně studována a popsána již v předchozí studii, já jsem tedy měření už neprováděla a ve své diplomové práci používám k popisu těchto míst informace ze studie ARP *ET AL.*, 2010.

WB 1 – toto odběrové místo se nachází u pramene potoku Westerhöfer, je zde nejvyšší tlak CO₂, pohybující se kolem 12000 μatm, není zde patrná kalcifikace, saturační index SI = 0,20 – 0,21 log IAP/KT. pH se pohybuje kolem 7,33. K odběru vzorků slouží plocha od pramene vzdálená 0,5 až 3 m.

(Saturační index $SI_{\text{vápence}} = \log \Omega_{\text{vápence}} = \log(\text{produkt aktivity iontů } \{Ca^{2+}\} \times \{CO_3^{2-}\} / \text{rozpustnost produktu } K_{\text{vápence}})$; SI = ukazuje na vztah mezi vylučováním vápence a rozpouštěním uhličitanu, SI v kladných číslech značí, že dochází k vylučování vápence, souvisí s tím, jaké množství stromatolitu za jednotku času přibude, což znamená, čím vyšší hodnota, tím více stromatolitu přibude).

WB 2 je již částečně kalcifikované odběrové místo. Začíná 50 metrů od pramene a odběrová plocha sahá od 50 metrů po 130 metrů od pramene. pH se zde pohybuje mezi hodnotami 7,82 a 8,11, tlak CO₂ je již výrazně nižší, 50 m od pramene je to 3631 μatm a po 130 metrech pak 1862 μatm. Saturační index je taktéž vyšší a ukazuje na pozorovatelnou kalcifikaci. SI = 0,69 log IAP/KT (po 50 m), 0,96 log IAP/KT (po 130 m).

WB 3 – odběrové místo charakteristické přibližně dvoumetrovým vodopádem, kde je možno pozorovat inkrustované listy, trsy zelených vláknitých řas (*Cladophora*), mechy, ale také jsme zde objevili inkrustovaného slimáka. Kalcifikace je zde výrazná a naznačuje to i saturační index $SI = 1,10 - 1,14 \log IAP/KT$. Plocha se nachází 183 – 234 metrů od prameniště, pH nabývá hodnot od 8,25 do 8,30 a pCO_2 se stále snižuje: 1318 μatm (na 183. metru) a 1148 μatm (na metru 234.)

WB4 – silně kalcifikované odběrové místo ($SI = 1,07 - 1,10 \log IAP/KT$), odběrová plocha sahá od 262 m do 295 metrů od pramene, pH je stejné jako na WB 3 – 8,27 – 8,30 a tlak CO_2 se pohybuje od 1096 μatm (262.metr) do 1175 μatm (295.metr).

WB 5 – jasně kalcifikované, poslední odběrové místo, nachází se na konci potoka, v rozmezí 308 – 339 metrů od prameniště. $SI = 1,01 - 1,09 \log IAP/KT$ (hodnoty jsou tedy menší než na WB 4 a WB 3). pH je srovnatelné s odběrovými místy WB 3 a 4 – pohybuje se v rozmezí 8,22 až 8,29. Tlak CO_2 na 308. metru je 1096 μatm a na 339. metru 1318 μatm (ARP ET AL., 2010).



Obr.č. 8 Odběrová místa potoku Westerhöfer.

Materiál a metody

1. Odběr vzorků

Vzorky jsem odebírala seškrabováním biofilmu na povrchu stromatolitu pomocí skalpelu, přidala jsem i kousek svrchní vrstvy stromatolitu a spolu s vodou z odběrového místa transportovala v 50 ml tubě (Sarstedt s.r.o.), a to v těchto datech: 5.3.2010 (vzorek z pozdní zimy), 26.5.2010 (pozdně jarní vzorek), 4.8.2010 (letní vzorky), 25.10.2010 (podzimní vzorek). Vzorky jsem sbírala proti směru proudu, tedy od odběrového místa WB 5 až po WB 1. První odběr nezahrnoval odběrová místa WB 1 a 2.

2. Kultivace vzorků

Za sterilních podmínek jsem vzorky z jednotlivých odběrových míst rozdělila na třetiny a vhodila po třetině do Erlenmayerových baněk s tekutým médiem (BG 11, Z, Z 45/4). Používala jsem nejprve 4 druhy medií, ale ES medium jsem od druhého odběru již nepoužívala, jelikož v něm nerostly jiné sinice, než v ostatních mediích, ale hlavně v něm dobře rostly zelené řasy a rozsivky, které sinice přerůstaly. Používala jsem tedy media BG 11 (STANIER *ET AL.*, 1971), Z a Z 45/4 (CASTENHOLZ, 1988). Rozdíly mezi BG 11 a Z jsou minimální (BG 11 medium dodává vápník ve formě $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, zatímco Z ve formě $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, BG 11 medium obsahuje kyselinu citronovou a ammonium-ferrum citrát, zatímco u Z media je železo dodáváno ve formě Fe-EDTA komplexu). Zato medium Z 45/4 se liší tím, že neobsahuje dusík a tím tedy zvýhodňuje sinice, které jsou schopné snáze fixovat vzdušný dusík, tudíž heterocytární sinice. Ke kultivaci směsných kultur jsem používala 50 a 100 ml Erlenmayerovy baňky. Jednou jsem zkoušela i rozetřít část biofilmu na stromatolitu na misku s agarovým médiem, nicméně to nepřineslo žádné zajímavé výsledky, a proto jsem to neopakovala. Směsné kultury jsem kultivovala tak dlouho, dokud nezískaly alespoň částečně sinicovou barvu (největší diverzitu biofilmu jsem nacházela ve směsných kulturách přibližně po dvou a půl měsíci). Následně jsem část nárostu přenášela na misky s agarovým médiem a pokračovala tím v izolaci sinic. Zkoušela jsem přenášet nárosty i dříve, než za 2,5 měsíce, nicméně jsem žádné výrazné změny nepozorovala.

Směsné vzorky v Erlenmayerových baňkách byly kultivovány v místnosti s teplotou cca 20°C. Misky s agarovým mediem a izoláty byly kultivovány v místnosti s teplotou 18°C a světelnost byla přibližně 26,5 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

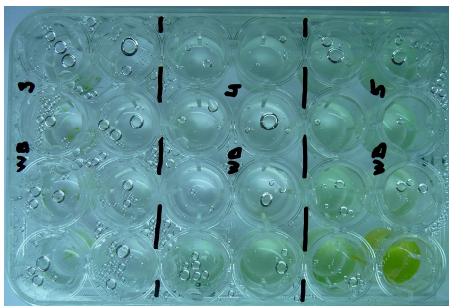
| BG 11 | ES | Z | Z 45/4 |
|---|---------------------------------------|---|---------------------------------------|
| K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O | K ₂ HPO ₄ | K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O | K ₂ HPO ₄ |
| MgSO ₄ . 7H ₂ O | MgSO ₄ . 7H ₂ O | MgSO ₄ . 7H ₂ O | MgSO ₄ . 7H ₂ O |
| Stopové prvky | Stopové prvky | Stopové prvky | Stopové prvky |
| Destilovaná voda | Destilovaná voda | Destilovaná voda | Destilovaná voda |
| EDTA | | Fe-EDTA-Komplex | Fe-EDTA-Komplex |
| Na ₂ CO ₃ | | Na ₂ CO ₃ | |
| NaNO ₃ | | NaNO ₃ | |
| CaCl ₂ . 2H ₂ O | | | CaCl ₂ . 2H ₂ O |
| | KNO ₃ | | |
| | Půdní extrakt | | |
| | | Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O | |
| | | | KH ₂ PO ₄ |
| Kyselina citronová | | | |
| Ammonium-ferrum citrát | | | |

Tab.č. 1 Složení medií podle konkrétního media. Tmavě zelená barva značí sloučeniny, které mají všechna media společná, světle zelená, které sloučeniny měly jen tři media společná, ještě světleji zelená značí sloučeniny, které se vyskytovaly jen ve dvou mediích a bílá pole jsou se sloučeninami, které byly unikátní pro dané medium.

3. Izolace sinic

Existuje několik způsobů izolace řas a sinic, nicméně některé z nich jsem nemohla použít, jelikož jsou sinice bakterie, a tak by například přidání antibiotika bylo spíše na škodu. Taktéž se dalo velmi špatně izolovat buňky pomocí mikropipety, jelikož byly buňky zkrátka tak malé, že jsem toho nebyla schopna. Po nějaké době jsem našla tři nejlepší způsoby izolace, které jsem pak používala po celou dobu, ačkoliv si uvědomuji, že jsem tímto mohla přijít o některé druhy sinic. Používala jsem jednak vypichování kolonií sterilním párátkem, kolonii jsem pak rozetřela mikrobiologickým způsobem (jedna linie protne druhou a tak dále a na konci by měla být jednotlivá kolonie) na novou misku. Také jsem používala metodu výměny medií podle toho, jakou sinici jsem potřebovala. To se dalo uplatnit hlavně u rodů *Nostoc*, *Tolypothrix* a *Calothrix*, které jsou sinicemi heterocytárními, a proto bylo možné je pěstovat v mediu, kde se ostatním sinicím nedařilo dobře. To, že se jim nedařilo dobře bylo ovšem zásadní pro rod *Calothrix*, která úhyn ostatních sinic nepřežila, a proto jsem její izolát nezískala. U rodu *Tolypothrix* bylo také

potřeba použít kombinaci tekutého a pevného media. Z tekutého media, ve kterém rostl směsný vzorek, jsem nanasla trochu biofilmu na misku s agarem, pak jsem pomocí párátko přečišťovala kolonii rodu *Tolypothrix*, při každém přeočkování jsem kolonii promývala pod tekutým mediem a nakonec jsem část přenesla do tekutého media, kde mohla kultura narůst do větších rozměrů. Ani tak se mi sice nepodařilo získat čistě jednořasovou kulturu, nicméně byl počet jiných sinic tak nízký (v rámci jednotek jiných sinic), že se dala osekvenovat. Zkoušela jsem také izolaci pouze v tekutém mediu, kdy jsem používala well-plates (obr.č. 8), která měla 4 řady a každá řada měla 6 komůrek. Tyto komůrky jsem naplnila mediem a do první napipetovala směsnou kulturu, promyla a s novou pipetou kousek odebrala do další komůrky. Takto jsem to opakovala, dokud jsem nedošla na konec. Tímto způsobem se mi nepodařilo získat čisté izoláty.



Obr.č. 9 Well-plate.

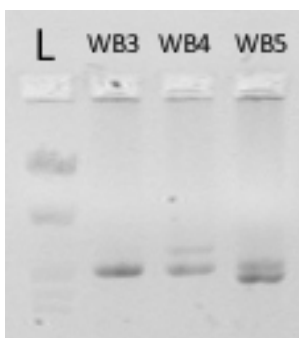
4. Molekulární metody

U čistých izolátů jsem sekvenovala úsek 16S rDNA.

Podle návodu jsem provedla extrakci DNA. Extrakci jsem prováděla s pomocí kitu Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitek). Obměna oproti návodu byla ta, že jsem ještě před rozbíjením buněk napipetovala do mikrozkušavky Eppendorf 100 μ l Lysis Buffer P, přisypala skleněné kuličky o průměru přibližně 0,5 mm a po rozbití buněk v přístroji Mini-BeadbeaterTM (Biospec Products) přidala ještě 300 μ l a 20 μ l Proteinázy K, zatímco v protokolu stojí, že máme dát 400 μ l Lysis Bufferu P až po rozbití buněk. Pro vymývání DNA jsem použila pouze 50 μ l Elution Buffer D (a ne 100 μ l podle návodu) (to jsem dělala pro dosažení vyšší koncentrace DNA). Zda jsem získala extrahovanou DNA, jsem zjišťovala jak měřením na spektrofotometru firmy IMPLEN, tak pomocí elektroforézy (0,5% TBA). Hodnoty na spektrofotometru se pohybovaly u izolátů od cca 10 do 70 ng/ μ l

a u DNA směsných vzorků kolem 100 až 250 ng/μl (což bylo potřeba naředit tak, aby byla hodnota pod 20 ng/μl, která se osvědčila při PCR).

Následně jsem prováděla PCR – master mix viz tabulka č. 2. Pro amplifikaci oblasti jsem používala primery PCR 1 a PCR 18 (viz tab.č. 6).



Obr.č. 10 Fotografie gelu z elektroforézy. L značí žebřík, WB 3, 4 a 5 pak DNA směsných vzorků.

| | |
|--|---------|
| 10 x PCR-Pufr | 5,0 μl |
| DMSO | 1,0 μl |
| dNTP 2,5 mM | 2,0 μl |
| MgCl ₂ | 2,0 μl |
| Forward primer PCR 1 (10 pmol/μl) (Wilmotte <i>et al.</i> , 1993) | 1,0 μl |
| Reverse primer PCR 18 (10 pmol/μl) (Wilmotte <i>et al.</i> , 1993) | 1,0 μl |
| Bioline Taq polymeráza | 0,2 μl |
| HPLC H ₂ O | 36,8 μl |
| DNA | 1,0 μl |

Tab.č. 2 Složení mastermixu pro PCR, HPLC H₂O je produkt s názvem Chromanorm (BDH Prolabo), obsahuje acetonitril (99,9%) a vodu.

| | | |
|----------------------|------|--------|
| Počáteční denaturace | 95°C | 5 min |
| Denaturace | 94°C | 1 min |
| Annealing | 52°C | 45 sec |
| Elongace | 72°C | 3 min |
| Finální elongace | 72°C | 7 min |

Tab.č. 3 Program CyaBiol, program měl 33 cyklů.

Program, který jsem pro PCR používala, se jmenoval CyaBiol a jeho hodnoty byly nastaveny tak, jak je uvedeno v tab.č.3. Podle možností v laboratoři jsem používala cykly FlexiGene, TouchGene Gradient (Techne) a Biotech Primus 96 plus (MWG). Po skončení PCR jsem vzorky opět kontrolovala, zda obsahují DNA, pomocí elektroforézy, a pokud ano, přečistila jsem je. Přečištění jsem prováděla většinou s kitem Invisorb DNA CleanUp

(Invitek), ale několikrát jsem použila také kit MSB Spin PCRapace (Invitek). Výsledky byly identické.

S přečištěnými PCR produkty jsem pak prováděla sekvenační reakci (tab.č. 5). Program na termocykleru jsem nastavila na Cycle35Mohr (tab.č. 4).

| | | |
|----------------------|------|--------|
| Počáteční denaturace | 96°C | 1 min |
| Denaturace | 96°C | 45 sec |
| Annealing | 50°C | 45 sec |
| Elongace | 60°C | 3 min |
| Finální elongace | 60°C | 3 min |

Tab.č. 4 Program Cycle35Mohr. Program měl 35 cyklů.

| | |
|--|----------|
| T-Buffer 5x | 1 µl |
| BigDye (Terminator Ready Reaction Mix) | 2 µl |
| HPLC - H ₂ O | 2 µl |
| Primer (0,8 pmol/µl) | 2 µl |
| DNA | 3 – 5 µl |

Tab.č. 5 Složení master mixu pro sekvenační reakci.

Pokud jsem prováděla sekvenační reakci poprvé, použila jsem pouze Primer PCR 1, v případě, že se mi podařilo získat parciální sekvenci s primerem PCR1, jsem použila primery PCR 18, 460R, 874R, 874F, 1072R a 1528R (viz tabulka č. 6), abych získala celou sekvenci oblasti 16S r DNA.

| Primer | Sekvence 5'→3' | Oblast | Použití | Citace |
|--------|----------------------------|--------|------------------|------------------------------------|
| PCR 1 | GAG TTT GAT CCT GGC TCA | 16S | PCR, sekvenování | Wilmotte <i>et al.</i> , 1993 |
| PCR 18 | TCT GTG TGC CTA GGT ATC | 16S | PCR, sekvenování | Wilmotte <i>et al.</i> , 1993 |
| 460R | CCG TMT TAC CGC GGC TGC | 16S | sekvenování | Wilmotte <i>et al.</i> , 1993 |
| 874R | TCA ATT CCT TTG AGT TTC AC | 16S | sekvenování | Wilmotte <i>et al.</i> , 1993 |
| 874F | GTG AAA CTC AAA GGA ATT GA | 16S | sekvenování | Wilmotte <i>et al.</i> , 1993 |
| 1072R | GTT GCG CTC GTT GCG GGA CT | 16S | sekvenování | Wilmotte <i>et al.</i> , 1993 |
| 1528R | GGA GGT GAT CCA KCC R | 16S | sekvenování | Garcia-Pichel <i>et al.</i> , 1998 |

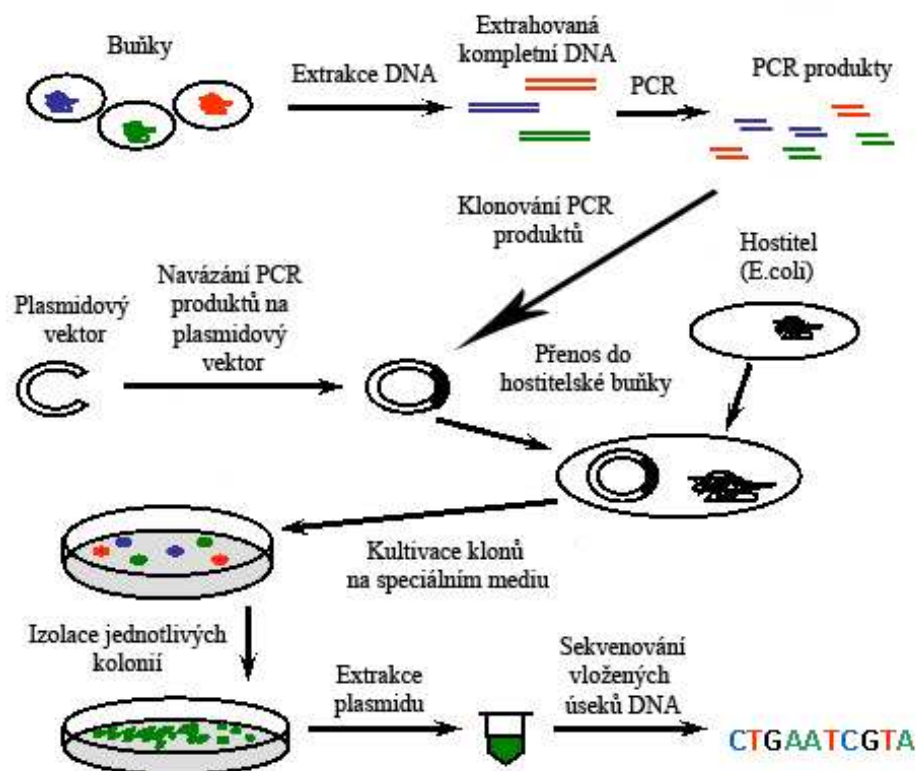
Tab.č. 6 Seznam použitých primerů pro PCR a sekvenování úseku 16S rDNA.

Po sekvenační PCR jsem prováděla vysrážení dle návodu (viz příloha č.2), aby byla možná automatická sekvenace na kapilárovém sekvenátoru ABI-3100 Genetic analyser (Applied Biosystems), kterou prováděla Gabriele Curdt-Hollmann.

5. Klonování 16S rDNA z environmentální DNA

Klonování environmentální DNA je metoda, která se používá pro zjištění diversity ve směsných kulturách nebo v přírodních vzorcích na základě sekvencí.

Já jsem používala ke klonování TOPO TA Cloning[®] kit (Invitrogen). Abych mohla klonovat, potřebovala jsem získat extrahovanou DNA ze směsných vzorků a následně PCR produkty. Pracovala jsem se směsnými kulturami, neboli nepracovala s čerstvě odebranými vzorky, ale s kulturami, které byly nejprve dva a půl měsíce v mediu. Po této době získala kultura výrazně sinicovou barvu. Klonování jsem tedy prováděla 3.5.2010, 26.7.2010 a 4.10.2010. Extrakci DNA jsem prováděla tak, že jsem smíchala biofilm jednoho odběrového místa ze všech typů medií, poprvé jsem prováděla klonování pro WB 3, 4 a 5. Podruhé a potřetí pak pro všechna odběrová místa. Extrakci jsem prováděla podle návodu, stejně jako extrakci DNA izolátů. PCR jsem pak také dělala stejně jako u izolátů. Pro klonování je důležité, aby PCR produkty byly čerstvé, proto jsem prováděla první fázi klonování ve stejný den jako extrakci DNA. Používala jsem chemicky kompetentní buňky *Escherichia coli* TOP10 a metodu transformace One Shot[®] Chemical Transformation. Princip klonování DNA spočívá v ligaci PCR produktu se speciálně upraveným vektorem, který je pak pohlcen buňkou *E.coli*. Každá buňka *E.coli* pak utvoří vlastní kolonii. Plasmidový vektor (v tomto případě pCR[®] 2.1-TOPO[®]) je dodáván jakožto lineární, s 3' koncem obsahujícím zakončení T. PCR produkty mají 5' konce s deoxyadenosinem (A) díky Taq polymeráze, proto může dojít k navázání PCR produktu na vektor, který se následně uzavře a stává se kruhovým (ligace). Tento kruhový vektor je pak pohlcen buňkou *E.coli* (transformace).



Obr.č. 11 Grafické znázornění metody environmentálního DNA klonování. Upraveno, převzato z http://wiki.biomine.skelleftea.se/wiki/index.php/Cloning_vector.

K procesu ligace jsem používala protokol firmy Invitrogen – TOPO TA Cloning® (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf). Složení reakce bylo následující:

| | |
|---------------------|----------------------------|
| Čerstvý PCR produkt | 0,5 – 4 µl |
| Solný roztok | 1 µl |
| Voda | tolik, kolik zbývá do 5 µl |
| TOPO® vektor | 1 µl |
| Celkové množství | 6 µl |

Tab.č. 7 Složení reakce pro proces ligace při klonování environmentální DNA.

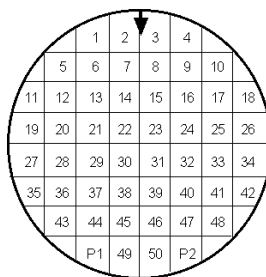
Zkoušela jsem používat různá množství PCR produktu, nicméně jsem nepozorovala, že by množství PCR produktu hrálo nějakou roli. Důležitější byla koncentrace PCR produktu, která mohla mít maximálně 20 ng/µl. Po smíchání směsi jsem ji nechala 30 minut inkubovat při pokojové teplotě. Následovala transformace, kdy jsem 2 µl směsi (z ligace) napipetovala do roztoku chemicky kompetentních buněk *E.coli* a následně nechala na ledu inkubovat 30 minut. Po této době jsem na 30 vteřin buňky vystavila teplotnímu šoku v termobloku (Eppendorf), který byl nastaven na 42°C. Pokračovala jsem podle návodu

(http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf, strana 10), až na výjimku při třepání, kdy jsem nastavila 150 rpm a ne 200 rpm, jak stálo v návodu. Na konci jsem nanesla na vyhřáté misky s LAX médiem různá množství roztoku. Na dvě misky 20 μ l, na další dvě 30 μ l a na poslední dvě 50 μ l. Nechala jsem přes noc inkubovat při 37°C a ráno zkontrolovala misky, zda se na nich nachází kolonie. K dalším krokům jsem používala pouze bílé a lehce modré kolonie. To, zda klony budou obsahovat PCR produkty jsem zjišťovala pomocí metody blue-white screening.

| Ingredience/medium | LAX medium (na 1000 ml bidestillované, sterilní H ₂ O) | LB medium (na 1000 ml bidestillované, sterilní H ₂ O) |
|-----------------------------|---|--|
| Bacto-Trypton | 10 g | 10 g |
| Kvasinkový extrakt | 5 g | 5 g |
| NaCl | 5 g | 5 g |
| Agar | 12 g | |
| Ampicilin (konc. 100 mg/ml) | 1 ml | 1 ml |
| X-Gal (konc. 40mg/ml) | 2 ml | |

Tab.č. 8 Složení LAX a LB media používaných při klonování.

Po inkubaci jsem jednotlivé bílé a světle modré kolonie přenesla na předem vyhřátou misku s LAX médiem, na kterou jsem předtím narýsovala mřížku. V každém okénku se nacházela jiná kolonie. Takovéto master plates jsem opět nechala inkubovat při 37°C přes noc (16 hodin).



Obr.č. 12 Znárodnění master plate, převzato z <http://www.fgsc.net/fgn48/Kaminskyj.htm>.

Další den jsem pak kontrolovala, zda buňky opravdu obsahují vektor s PCR produktem, a to pomocí plasmid-screening. Jedná se o PCR (tab.č. 9).

| | |
|--|---------------------------|
| 19,6 µl | HPLC H ₂ O |
| 2,5 µl | Puffer 10x |
| 1,0 µl | MgCl ₂ (50 mM) |
| 0,8 µl | dNTP (2,5 mM) |
| 0,1 µl | Taq polymeráza (Bioline) |
| 0,25 µl | M13F Primer (10 µM) |
| 0,25 µl | M13R Primer (10 µM) |
| Celkem: 24,5 µl + malé množství kolonie vypíchnuté z okénka párátkem | |

Tab.č. 9 Složení master mixu pro plasmid screening (kontrola po klonování).

| | | | |
|----------------------|-------|------|----------|
| Počáteční denaturace | 2 min | 94°C | 1 cyklus |
| Denaturace | 1 min | 94°C | 25 cyklů |
| Annealing | 1 min | 55°C | |
| Elongace | 1 min | 72°C | |
| Konečná elongace | 7 min | 72°C | 1 cyklus |

Tab.č. 10 Průběh programu M13 Biol, program měl 25 cyklů.

Na cykléru jsem navolila program M13 Biol (tab.č. 10) a po dobehnutí programu jsem kontrolovala pomocí elektroforézy, zda se proužky pohybují nad hodnotou 300 bp. A s těmi, které to splňovaly, jsem pak následně provedla extrakci plasmidové DNA s kitem Spin Plasmid Mini Two (Invisorb) podle protokolu. Buňky jsem ještě na tento krok připravila inkubací přes noc v tekutém LB mediu při 37°C (150 rpm). Takto vyextrahovanou DNA už bylo možno připravit rovnou na sekvenování, následovalo tedy vysrážení a následně sekvenační reakce a samotné sekvenování.

S klonováním bylo mnoho problémů, musela jsem jej často opakovat a ani tak nedosahovaly některé výsledky uspokojivých hodnot. Nejčastějším problémem bylo to, že na miskách s LAX mediem nevyrostly žádné kolonie nebo velmi malé množství (1-20).

6. Fylogenetické analýzy

Pro izoláty jsem sekvenovala kompletní úsek 16S rDNA a chromatogramy, které jsem získala, jsem následně spojila v programu SeqAssem (HEPPERLE, 2004). K získaným sekvencím izolátů jsem pomocí algoritmu BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; ALTSCHUL *ET AL.*, 1990) v celosvětové databázi sekvencí GenBank vyhledala 15 nejpodobnějších sekvencí a ty jsem pak stáhla ve FASTA formátu a přidala ke svému lokálnímu datasetu sekvencí. Tabulku s 1. nejbližší sekvencí z GenBank a 1. nejbližší sekvenci z GenBank s rodovým jménem pro tyto izoláty přikládám v příloze č.3.

Dále jsem sekvenovala část úseku 16S rDNA obsaženou v klonech a získala tak 596 parciálních sekvencí klonů, z nichž 499 bylo programem SeqAssem vyhodnoceno jako splňující standardní kvalitativní kritéria. Sekvenovala jsem 5' konec oblasti 16S rDNA, pro příklad oblast 78-621 sekvence z GenBank Cyanobacterium cCLB-12 (HQ230231.1). Nicméně jsem při bližším zkoumání zjistila, že pro 94 sekvencí je osekvenována jiná část 16S rDNA, než pro zbylých 405 (oblast od báze cca 972 do báze cca 1390), pro srovnání s mou sekvencí například sekvence *Leptolyngbya* GSE-PSE39-07B (HM018686.1) z GenBank. Toto nejsem schopná vysvětlit, protože sekvence, které měly osekvenovaný tento úsek, byly z různých odběrových míst a dob (kromě březnových vzorků, kde se tento jev neobjevil) a jednotlivá odběrová místa z daného odběru jsem sekvenovala dohromady, proto si myslím, že k záměně primeru nemohlo dojít. Jaké je ale jiné vysvětlení nejsem schopna říct. U sekvencí, které byly identické, jsem zanechala pouze jednu z nich, ale pouze pokud se jednalo o sekvence ze stejného odběrového místa a doby odběru, a tak mi pro následnou analýzu zbylo 331 sekvencí, se kterými jsem následně pracovala.

| Odběrové místo | WB 1 | WB 2 | WB 3 | WB 4 | WB 5 | |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|
| Doba odběru | | | | | | |
| 5.3.2010 | x | x | 23/16 | 29/23 | 49/45 | 101/84 |
| 26.5.2010 | 47/44 | 39/33 | 41/35 | 12/6 | 49/10 | 188/128 |
| 4.8.2010 | 48/47 | 49/18 | 49/12 | 35/28 | 29/14 | 210/119 |
| | | | | | | 499/331 |

Tab.č. 11 Počty klonů na odběrové místo a čas odběru. Číslo před zlomkovou čarou je počet původních kvalitních sekvencí, číslo za zlomkem je počet nakonec použitých sekvencí, které odpovídaly začátku úseku 16S rDNA a nebyly identické s jinými ze stejného odběrového místa a doby odběru.

K sekvencím mých klonů jsem přidala sekvence klonů (418 sekvencí), které z mnou studovaného potoka dříve získala Kathrin I. Mohr a pomocí algoritmu bellerophon v programu Mothur (SCHLOSS ET AL., 2009) jsem celý soubor sekvencí otestovala na možnou přítomnost chimerických sekvencí. Objevila jsem 54 pravděpodobných chimér, z toho dvě v mém souboru sekvencí a 52 v souboru Kathrin I. Mohr. Chimerické sekvence jsem z datového souboru odstranila. Objevila jsem také 4 sekvence nesinicových bakterií (jejich sekvence se dala vizuálně odlišit od ostatních sekvencí), 3 sekvence pocházely z odběrového místa WB 5 a jedna z WB2, všechny pocházely ze srpnových vzorků (18_WB2_aug, 13_WB5_aug, 31_WB5_aug, 2_WB5_aug).

Pomocí programu Mothur jsem sekvence klonů o délce více než 492 bazí sdružila do operačních taxonomických jednotek (*operational taxonomic units*, OTUs). Pro

vymezení OTUs byla hladina podobnosti 97%, která je u bakterií charakteristická pro druhu (DOOLITTLE & PAPKE, 2006, MANTER *ET AL.*, 2010, SEGAWA & TAKEUCHI, 2010). Při této hladině se sekvence rozdělily do 42 OTUs. Mothur vytváří OTUs ve čtyřech krocích. Vyžaduje již zalignované sekvence, kterým v prvním kroku oseká konce tak, aby tvořily sekvence jeden blok. V druhém kroku Mothur spočítá distanční matici, ve třetím kroku utváří z nejpodobnějších sekvencí klastry a v posledním kroku vygeneruje reprezentativní sekvenci daného OTU. K těmto reprezentativním sekvencím jsem pak stahovala 15 nejbližších sekvencí z GenBank pomocí algoritmu BLAST. Reprezentativní sekvence OTU 23 (20_WB5_march) vyšla podle BLAST jako Alphaproteobacteria (nejpravděpodobnější *Rhodobacter* sp.), toto OTU obsahovalo pouze jednu sekvenci a tu jsem vymazala. Tabulku s 1. nejbližší sekvencí z GenBank a 1. nejbližší sekvencí z GenBank s rodovým jménem pro daná OTUs přikládám v příloze č.4.

Vytvořila jsem pak dva soubory sekvencí pro dva stromy. Jeden pro strom, který obsahuje pouze kompletní sekvence úseku 16S rDNA a druhý včetně klonů a sekvencí delších než 1000 bp.

6.1. Analýzy na základě kompletních sekvencí 16S rDNA

Z GenBank jsem získala pro izoláty dohromady 1320 sekvencí, vymazala redundance, takže zbylo 617 sekvencí, přidala jsem sekvence rodů *Euhalothece* a *Halothece* dostupné z GenBank (podle doporučení Prof. Jiřího Komárka), sekvence z tabulky číslo 1, reprezentující hlavní sinicové skupiny, ve článku od SCHIRRMESTER *ET AL.* 2011 (strana 2) a sekvence, které zastupovaly fylotypy v článku ARP *ET AL.*, 2010, opět odstranila redundance, zbylo mi 697 sekvencí, odstranila jsem sekvence kratší než 1000 bazí a zbylo 541 sekvencí, přidala jsem sekvence izolátů (o délce cca 1400 bazí) a v programu SILVA (<http://www.arb-silva.de/aligner/>) jsem nechala vytvořit alignment, který jsem následně ručně upravila v BioEdit (autor Tom Hall) a GeneDoc (NICHOLAS & NICHOLAS, 1997). Na základě tohoto alignmentu jsem odvodila fylogenetický strom s použitím metody maximum likelihood (ML). Konkrétně jsem použila program RAxML (verze 7.0.3) (STAMATAKIS *ET AL.*, 2008), substituční model GTR+ Γ +I, a prohledávací heuristiku využívající počáteční proceduru *rapid bootstrap* (100 replikací). Jako outgroup stromu sloužila sekvence *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (BA000045.1), jelikož *G. violaceus* je na základě širších fylogenetických analýz znám coby sinice reprezentující nejhlubší větev sinicové fylogeneze (MULLIS *ET AL.*, 1995). Původní strom se všemi

kompletními sekvencemi tak obsahoval 588 sekvencí. Takto velký strom by bylo těžké vizualizovat, proto aby byl strom přehlednější, provedla jsem další fylogenetickou analýzu na redukovaném setu sekvencí, který jsem z výchozího setu odvodila následujícím postupem:

V původním stromu jsem našla pozice, kde se nacházejí moje izoláty. Od těchto sekvencí jsem postupovala hlouběji do stromu a hledala větve, která by měla podporu alespoň 90%. Když jsem takovou větev našla a obsahovala také taxony z GenBank, které měly alespoň rodové jméno, vytáhla jsem a v další analýze použila všechny sekvence z této větve. Pokud obsahovala jen sekvence Uncultured cyanobacterium/bacterium clone, stáhla jsem také všechny sekvence této větve, ale přidala jsem i sekvence s vyjasněnými rodovými jmény z GenBank, které se nacházely nejbližší, i když nebyla podpora tak vysoká. Totéž jsem udělala také pro sekvence, které byly reprezentativními zástupci Neidentifikovaných skupin z předchozí studie (ARP *ET AL.*, 2010). Následně jsem sekvence ještě prošla v programu BioEdit, a pokud se tam nacházely sekvence téměř identického názvu, kontrolovala jsem ještě ve stromu, zda se nacházejí vedle sebe, a pokud ano, promazala jsem je. U sekvencí s názvy Unidentified cyanobacterium/bacterium clone jsem dělala totéž. Vymazala jsem také zástupce skupiny Stigonematales, protože žádná z mých sekvencí ani ze sekvencí z předchozí studie se nenacházela v této skupině sinic. Následně jsem nově vzniklý strom detailně prošla a překontrolovala, zda odstranění sekvencí hraje významnou roli na jeho uspořádání, ale žádné změny jsem nepozorovala. Strom v příloze č. 5.

6.2. Analýzy se všemi sekvencemi 16S rDNA (včetně parciálních sekvencí 16S rDNA získaných klonováním)

Postup k získání Maximum Likelihood stromu byl stejný, s tím rozdílem, že jsem přidala ještě sekvence získané klonováním, které byly kratší než sekvence z GenBank a izolátů. Jednalo se o parciální sekvence 16S rDNA o délce přibližně 500-600 bazí. Původní strom, který byl počítán se všemi sekvencemi, obsahoval 1260 sekvencí. Takto velký strom není možné zobrazit tak, aby se dal rozumně číst. Proto jsem provedla úpravy tak, jako v předchozím případě. Co se týče klonových sekvencí, ty jsem promazávala podle jednotlivých OTUs a to tak, aby v každém OTU zbyl jeden zástupce, který bude charakterizovat autora těchto sekvencí (pouze čísla označují sekvence, jejichž autorkou je Kathrin I. Mohr, číslo_odběrové_místo_doba_odběru značí moje sekvence) a také dobu a

místo odběru. Pokud tedy jedno OTU zahrnovalo například několik sekvencí z WB5 odebraných v srpnu a několik sekvencí z WB 5 v březnu, nechala jsem tam jednu sekvenci ze srpna a jednu z března.

Tímto postupem jsem získala soubor 487 sekvencí, který se již, ačkoliv špatně, vizualizovat dá (příloha 6, 7 a 8), další odstraňování sekvencí již nebylo možné, aby nebyla snížena výpovědní hodnota tohoto stromu.

Výsledky

Prvním z cílů diplomové práce bylo na základě získaných izolátů identifikovat zatím neidentifikované skupiny sinic z potoku Westerhöfer z předchozí studie (Unidentified A – F) (ARP *ET AL.*, 2010). Skupinu D jsem díky svému izolátu identifikovala. Skupiny Unidentified A, B a C zůstávají nejisté, ale A a B se nacházejí v kladu s *Microcoleus*/*Tychonema*/*Phormidium*, C pak na větvi s *Leptolyngbya* a *Plectonema* (viz příloha č. 5). Pro fylotypy Unidentified E a F se mi nepodařilo získat odpovídající izoláty, takže jejich identita zůstává neznámá. OTUs vytvořené na základě sekvencí získaných klonováním DNA získané ze stromatolitů jednak ihned po odběru (Kathrin I. Mohr) a jednak po dvou a půl měsíční kultivaci v tekutém mediu, vytvořily další skupiny diskutované v kapitole Výsledky – 2.2. Analýzy se všemi sekvencemi 16S rDNA (včetně parciálních sekvencí 16S rDNA získaných klonováním) a v kapitole Diskuze. Také jsem vizualizovala ze směsných kultur 11 morfotypů sinic, které se ve stromatolitech nacházejí.

1. Izoláty

Ze směsných kultur jsem vizualizovala 41 izolátů a získala jak kokální sinice, tak vláknité sinice. Celkem jsem izolovala 11 morfotypů, které jsem pomocí určovací literatury (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1989, 1998, ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK 2005, GEITLER, 1932) popsala jako:

Kokální:

Aphanothece

Synechococcus

Cyanothece/Gloeothece

Izoláty AH 5 a AH 35

Vláknité

Leptolyngbya

Pseudanabaena

Limnothrix

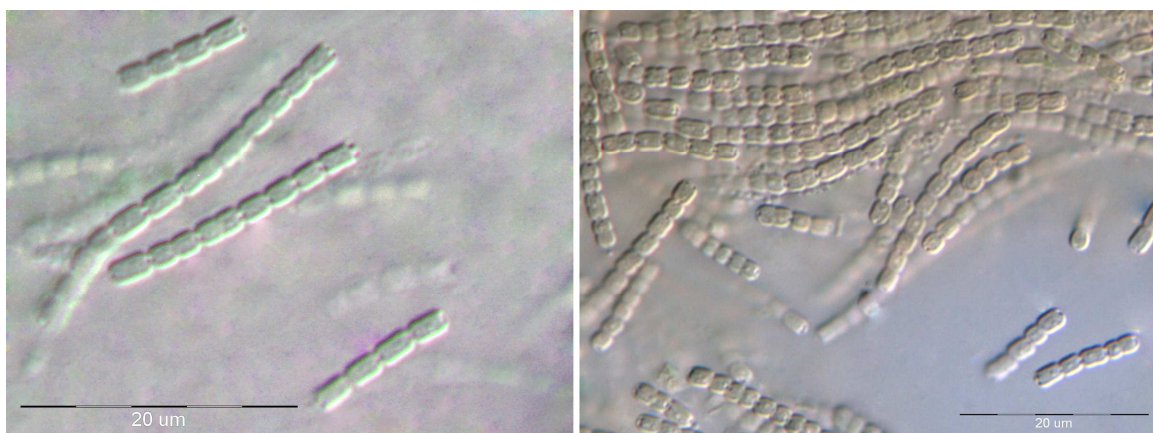
Phormidium/Tychonema

Plectonema/Pseudophormidium

Tolypothrix

Nostoc

Také jsem izolovala sinici *Calothrix*, jenže kdykoliv jsem se zbavila ostatních sinic, uhynula. Některé sinice jsem izolovala několikrát, a to i proto, že se od sebe často lišily, například barvou nebo velikostí buněk. Nicméně se vždy jednalo o tentýž morfotyp. Nejvíce rozdílností jsem objevila u vláknitých, zatímco konkrétní izoláty kokálních sinic (například *Synechococcus* RKC 1 a AH 18) vypadaly víceméně identicky. Jednotlivé izoláty *Leptolyngbya*, *Pseudanabaena*, *Limnothrix* a *Nostoc* se často lišily. A vliv nemělo medium, například *Pseudanabaena* se mohla od druhé výrazně lišit a přesto obě rostly na stejném mediu.



Obr.č. 13 Rod *Pseudanabaena*. Na obou fotografiích jsou 2 typy rodu *Pseudanabaena*, které rostly za stejných podmínek, na mediu Z a obě pochází z odběrového místa WB 4. Nicméně se liší minimálně barvou.

Každý z morfotypů má své významné znaky, na základě kterých je možné morfologické rozlišení:

1.1. Kokální morfotypy

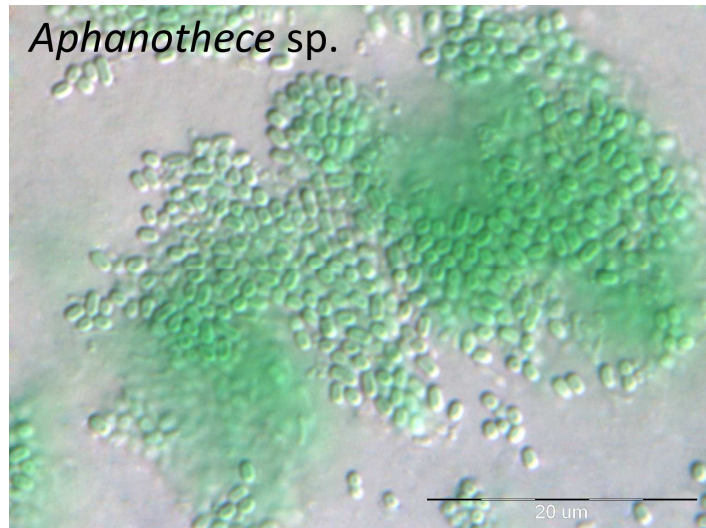
Aphanothece (Nägeli, 1849):

Buňky široce oválné, buněčné dělení binární, buňky jsou uspořádány nepravidelně, volně nebo jsou nahuštěné, v běžné slizovité pochvě. Kolonie jsou kulovité, modrozelené.

Velikost buněk mých izolátů: 2 μm x 1 μm

Rod je v současné době považován za monofyletický (LEE & BAE, 2002).

Získala jsem 4 izoláty (AH 18, 22, 25, 27), a to z odběrového místa WB 5.



Obr.č. 14 Morfotyp *Aphanothece*, měřítko 20 μm .

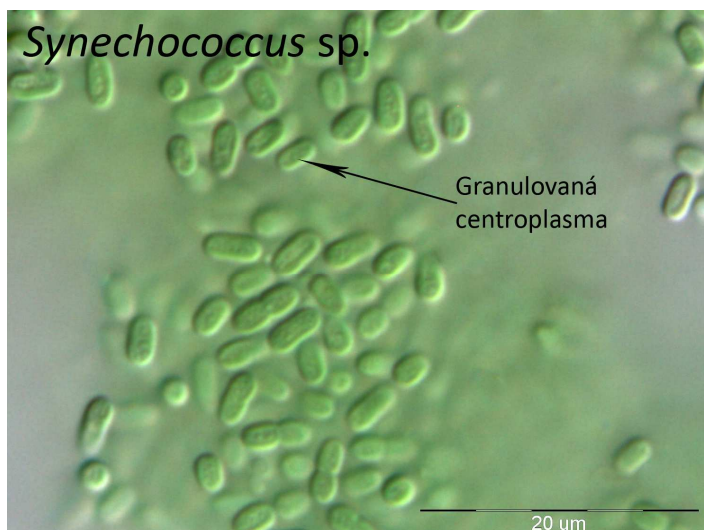
Synechococcus (Nägeli, 1849):

Buňky buď osamocené nebo v nepravidelných shlucích, které netvoří slizovité kolonie. Mohou tvořit i pseudovlákná (což jsem jednou pozorovala). Buňky jsou podlouhlé, oválné, někdy mohou být buňky výrazně delší než široké, buněčné dělení binární. Velikost buněk: 1,5 - 20 μm x 0,4 - 6 μm .

Velikost buněk mých izolátů: 3-5 μm x 2-3 μm

Rod je jednoznačně polyfyletický (ROBERTSON *ET AL.*, 2001).

Z předchozí části projektu jsem dostala 6 izolátů a sama jsem vyizolovala jeden. Izoláty z předchozí části projektu (RKC 1, 3, 4, 9, 17) pocházely z odběrových míst WB 2, 3, 4 a 5. Můj izolát (AH 18) byl z WB 5.



Obr.č. 15 Morfotyp *Synechococcus*, měřítko 20 μm .

Cyanothece (Komárek, 1976)/*Gloeothece* (Nägeli, 1849)

Cyanothece: Buňky samotné, někdy po dělení zůstávají po dvou (někdy zřídka mohou být ve shluku), bez slizovitého obalu nebo jen s jemným obalem kolem jednotlivých buněk, keritomizace.

Velikost buněk: 7 – 70 (100) μm x 6 – 52 μm

Cyanothece je v současné době není monofyletické (KOMÁREK *ET AL.*, 2004).

Gloeothece: Tvoří malé kolonie, obalené buňky nebo skupiny buněk, obal je bez barvy. Obaly produkují po dělení každá buňka svůj vlastní.

Velikost buněk: 0,4 – 18 μm x 0,6 – 10 μm

Rod *Gloeothece* nebyl zatím řádně molekulárně zkoumán, nicméně podle studie KOMÁREK *ET AL.*, 2004 vypadá rod jako parafyletický.

Velikost buněk mých izolátů: 3-8 μm x 3-5 μm

Získala jsem 1 izolát (AH 24), z WB 5.



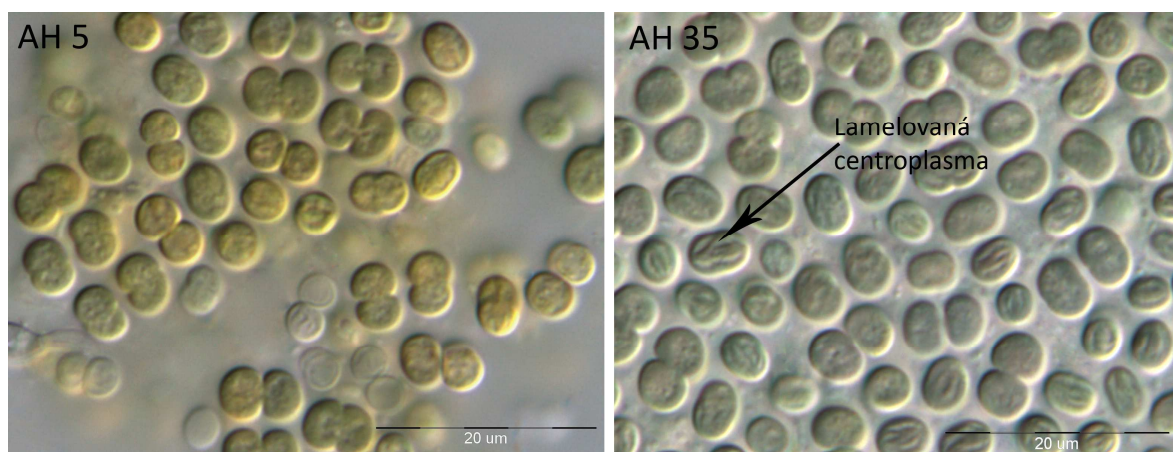
Obr.č. 16 Morfotyp *Cyanothece/Gloeothece*, měřítko 20 μm .

Izoláty AH 5 a AH 35

Objevila jsem také sinici, kterou jsem nedokázala pomocí určovací literatury určit a po krátké e-mailové konzultaci s profesorem Jiřím Komárkem jsem došla k názoru, že se patrně jedná o nový rod či druh. Sama jsem buňky popsala jako oválné, s binárním buněčným dělením, buňky ve shlucích, patrně ve slizovitých koloniích. Mají velmi výrazně striovanou centroplasmu a barvu černo-fialovou, někdy temně žlutou. Makroskopicky tvoří černou lesklou kolonii, která časem obarví BG 11 medium, na kterém roste, z bílo-průhledné barvy do světle až tmavě hnědé.

Velikost buněk: 6-8 μm x 4 μm

Vyizolovala jsem dva izoláty, každý z jiného období, takže výskyt této sinice pravděpodobně nebude náhoda (spad do vody, zanesené odjinud). Izoláty mám z pozdně jarního a pozdně letního odběru. Oba izoláty (AH 5, 35) pocházejí z WB 5.



Obr.č. 17 Izoláty AH 5 a AH 35, měřítko 20 μm .

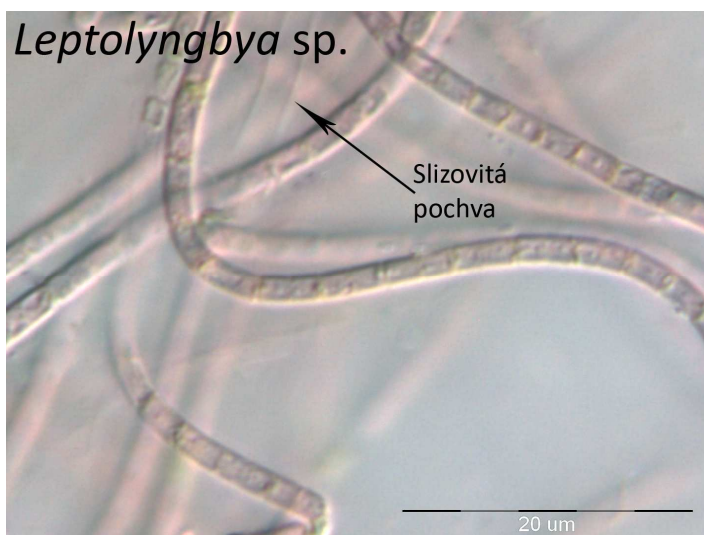
1.2. Vlákňité morfotypy

Leptolyngbya (Komárek & Anagnostidis, 1988):

Vlákna jsou zřídka osamocená, většinou ve shlucích, plovoucí nebo přichycené k podkladu. Vlákna jsou někdy lehce vlnitá, s pevnou, ale tenkou bezbarvou pochvou, buňky jsou cylindrické, isodiametrické a bez plynových měchýřků. Šířka vlákna bývá 0,5 – 3,5 μm . Tvoří hormogonia. Rod je polyfyletický (ISHIDA *ET AL.*, 2001).

Velikost buněk mých izolátů: 2-4 μm x 2-4 μm .

1 izolát jsem dostala z předchozího projektu (RKC 6, 11), 5 je mých (AH 10, 16, 31, 34, 36). Odběrová místa: WB 3, 4, 5.



Obr.č. 18 Morfotyp *Leptolyngbya*, měřítko 20 μm .

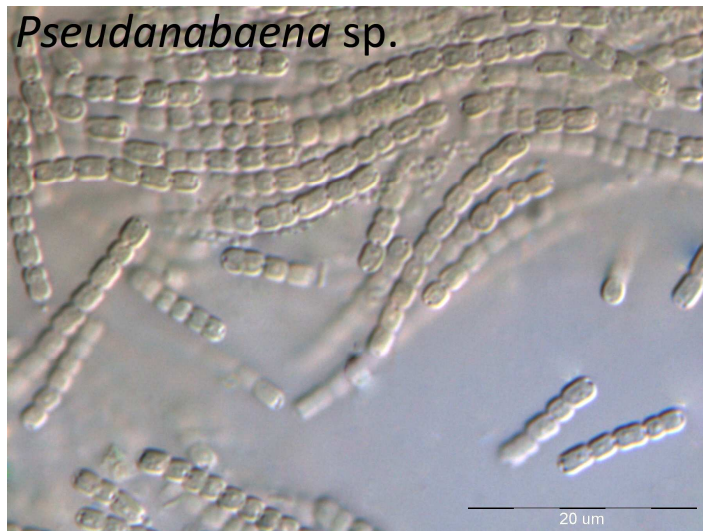
Pseudanabaena (Lauterborn, 1915):

Vlákna jsou bez pochvy, buňky cylindrické se zaoblenými konci, delší než široké, s plynovými měchýřky, vlákno je zaškrcené u spojů mezi buňkami, někdy lze pozorovat můstky mezi buňkami.

Díky sekvenování vypadá tento rod jako polyfyletický (ISHIDA *ET AL.* 2001).

Velikost buněk: 2 μm x 4 μm

Z předchozí části projektu 1 izolát (RKC 10), já vytvořila 6 vlastních (AH 3, 4, 7, 9, 14, 32). Odběrová místa: WB 2, 3, 4, 5.



Obr.č. 19 Morfotyp *Pseudanabaena*, měřítko 20 μm.

Limnothrix (Meffert, 1988):

Vlákná jsou samostatná nebo tvoří malé shluky. Jsou izopolární, nevětvená, bez a nebo někdy s tenkou bezbarvou pochvou. Buňky jsou výrazně delší než široké. Buňky mohou být zaškrčené, ale nemusejí. Podle vlivu prostředí mají nebo nemají aerotopy.

V současné době je rod *Limnothrix* polyfyletický (PERKERSON *ET AL.*, 2010).

Šířka vlákná se pohybuje od 1 do 6 μm.

Mám 8 vlastních izolátů (AH 21 RKC 19, AH 1, 8, 11, 12, 29, 30, 33) z WB 5.



Obr.č. 20 Morfotyp *Limnothrix*, měřítko 20 μm.

Phormidium (Kützing ex Gomont, 1892)/*Tychonema* (Anagnostidis et Komárek, 1988):

Phormidium: Pochva někdy nebo vždy, bez větvení, apikální buňky jsou zašpičatělé nebo zakulacené, bez nebo s kalyptrou, tvoří hormogonia. Někdy jsou vlákna přichycená k podkladu nebo mohou volně plavat, mohou být zvlněná a na šířku měří 2,5 – 15 μm . Nemají aerotopy, tvoří hormogonia.

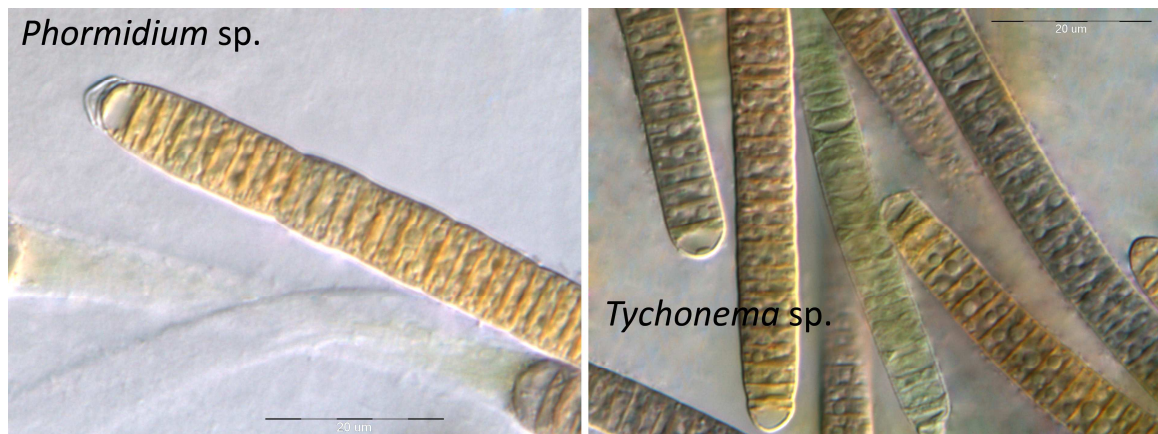
Rod je polyfyletický (COMTE ET AL., 2007)

Tychonema: Bez pochvy, bez větvení, na koncích neztenčené, s velkými granulemi uvnitř buněk, snadno mění barvu díky fykobilinům. Šířka buněk dosahuje 2 až 16 μm . Buňky nejsou zaškrcené, bez aerotopů, někdy s kalyptrou. Zda tvoří hormogonia není jasné.

Rod se jeví jako parafyletický (KOMÁREK, 2005).

Izoláty RKC 2, 13 a 20 jsou široké 8 μm . Všechny tři izoláty jsou z WB 5

Na izoláty, které jsem získala z předchozí části projektu sedí oba popisy, nicméně v kulturách lze také pozorovat hormogonia, a protože u rodu *Tychonema* není jisté, zda hormogonia tvoří, dá se předpokládat, že jde o rod *Phormidium*. *Tychonema* také netvoří slizovité pochvy, které bylo možné ve vzorcích pozorovat. O rodu *Tychonema* jsem přemýšlela i proto, že je v geologických studiích často uváděna jako součást stromatolitového biofilmu (ARP ET AL., 2001, SHIRAISHI ET AL., 2008, COUSIN & STACKEBRANDT, 2010) a proto, že vlákna izolátů nejsou na koncích ztenčená mohla by to být i *Tychonema*.



Obr.č. 21 Morfotyp *Phormidium/Tychonema*, měřítko 20 μm .

Plectonema (Thuret ex Gomont, 1892)

Chomáčkovitá stélka, přichycená k podkladu, žluto-hnědé barvy. Vlákna jsou 8-25 μm široká, nepohyblivá. Nepravé větvení. Heterocyty a akinety chybí. Poslední buňka je

zaoblená, zřídka s kalyptrou. Rozmnožují se hormogoniemi. Rod nebyl zatím molekulárně zkoumán.

Můj izolát má buňky 4,5-8 μm široké.

Vytvořila jsem 1 izolát (AH 20 RKC 18), z odběrového místa WB 4.



Obr.č. 22 Morfotyp *Plectonema*, měřítko 20 μm .

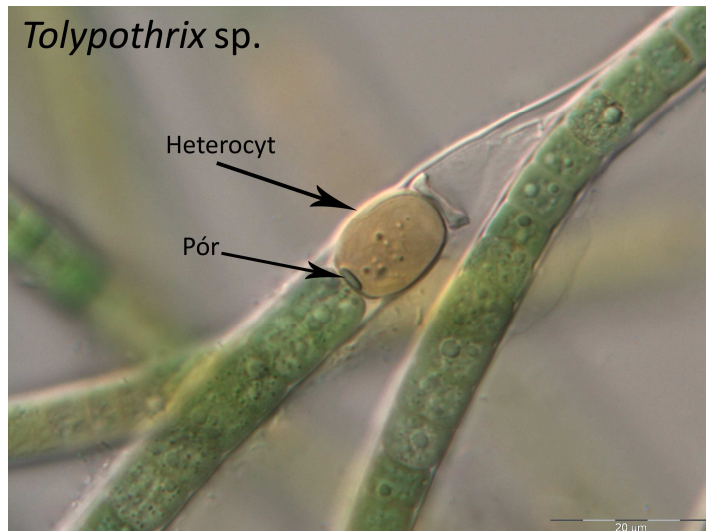
Tolypothrix (Kützing ex Bornet et Flahault 1888):

Vlákno je tvořeno jednou řadou buněk, tvoří chomáčkované kolonie, vlákna jsou heteropolární (bazální heterocyt), bazálních heterocytů může být více nebo jeden. Mají nepravé laterální větvení, které vzniká přes jeden nebo více interkalárních heterocytů. Tento heterocyt má jeden pór, akinety se vyskytují, ale zřídka, rozmnožují se pomocí hormogonií.

Rod *Tolypothrix* byl určen jako polyfyletický (SIHVONEN ET AL., 2007)

Velikost buňky mých izolátů: 10 μm x 10 μm

4 mé vlastní izoláty (AH 41, 43, 46 a 48) z WB 2.



Obr.č. 23 Morfotyp *Tolypothrix*, měřítko 20 µm.

Nostoc (Vaucher ex Bornet et Flahault, 1888):

Vlákná jsou tvořena jednou řadou buněk, vlákna mohou být buď samostatná nebo tvořit slizovité kolonie, jsou izopolární, mají heterocyty i akinety, nemají ani pravé ani nepravé větvení, rozmnožování probíhá pomocí hormogonií nebo nepohyblivých hormocytů.

Vlákná mohou být rovná nebo složitě zakroucená.

Nostoc je považován za rod monofyletický (RAJANIEMI *ET AL.*, 2005)

Vyizolovala jsem 3 kultury (AH 2, 38 a 40) z WB 1, 3 a 5.

Z toho, že se *Nostoc* nachází i na místě WB 1, kde ke kalcifikaci nedochází, se dá usuzovat, že *Nostoc* tak nehraje žádnou roli v procesu tvorby stromatolitů.



Obr.č. 24 Morfotyp *Nostoc*, měřítko 20 µm.

Zde je tabulka, ve které je znázorněno, pomocí jakých medií se mi podařilo vyizolovat které sinice:

| BG 11 | Z | Z 45/4 | Z 45/5 tekuté |
|-----------------------------|-------------------------|---------------|--------------------|
| | <i>Aphanothece</i> | | |
| <i>Synechococcus</i> | <i>Synechococcus</i> | | |
| | <i>Cyano/Gloeothece</i> | | |
| Izoláty AH 5 a AH 35 | | | |
| <i>Leptolyngbya</i> | <i>Leptolyngbya</i> | | |
| <i>Pseudanabaena</i> | <i>Pseudanabaena</i> | | |
| <i>Limnothrix</i> | <i>Limnothrix</i> | | |
| <i>Phormidium/Tychonema</i> | | | |
| <i>Plectonema</i> | | | |
| | | | <i>Tolypothrix</i> |
| | | <i>Nostoc</i> | |

Tab.č. 12 Seznam sinic, které jsem izolovala na různých typech medií. Světle modře označené izoláty jsou ty, které byly izolovány pouze z jednoho typu media, izoláty označené tmavší modrou jsou ty, které bylo možné izolovat z více typů media, v tomto případě ze dvou.

Z ní se dá vyčíst, že *Synechococcus*, *Leptolyngbya*, *Pseudanabaena* a *Limnothrix* se daly izolovat jak z BG 11, tak ze Z media. Ostatní sinice upřednostňovaly určitá media. *Nostoc* a *Tolypothrix*, heterocytární sinice, schopné výkonně fixovat vzdušný dusík, rostly nejlépe v Z 45/4 mediu, *Tolypothrix* ale na agarovém mediu nevydržel a bylo třeba pokračovat v kultivaci v tekutém mediu.

Sinici *Calothrix* (Agardh ex Bornet et Flahault, 1886) se mi sice nepodařilo vyizolovat, nicméně jsem byla blízko a několik „skoro“ izolátů dokazují, že se *Calothrix* ve stromatolitových krustách objevuje.



Obr.č. 25 Morfotyp *Calothrix*, měřítko 100 μm.

| Morfortyp | Odběrové místo | | | | |
|-----------------------|----------------|------|------|------|------|
| | WB 1 | WB 2 | WB 3 | WB 4 | WB 5 |
| Aphanothece | | | | | √ |
| Synechococcus | | √ | √ | √ | √ |
| Cyanothece/Gloeothece | | | | | √ |
| Izoláty AH 5 a AH 35 | | | | | √ |
| Leptolyngbya | | | √ | √ | √ |
| Pseudanabaena | | √ | √ | √ | √ |
| Limnothrix | | | | | √ |
| Phormidium/Tychonema | | | | | √ |
| Plectonema | | | | √ | |
| Tolypothrix | | √ | | | |
| Nostoc | √ | | √ | | √ |

Tab.č. 13 Ukazuje, na kterých místech se nacházely izoláty, které jsem vyizolovala ze směsných kultur. To, že jse nezískala izoláty z některých odběrových míst neznamená, že by se tam nemohly nacházet. Znamená to jen to, že jsem je z jiných odběrových míst neizolovala. Více srovnání morfortypů v diskuzi.

Také jsem prohlížela pod světelným mikroskopem směsné vzorky a výsledky pozorování shrnula do tabulek č. 14 a 15.

| Morfortyp/Odběrové místo | WB 1 | WB 2 | WB 3 | WB 4 | WB 5 |
|------------------------------|------|------|------|------|------|
| <i>Plectonema</i> | √ | √ | √ | √ | √ |
| <i>Cyanothece/Gloeothece</i> | √ | | ch | | ch |
| <i>Pseudanabaena</i> | √ | √ | √ | √ | √ |
| <i>Tolypothrix</i> | √ | √ | √ | √ | √ |
| <i>Calothrix</i> | √ | √ | | | ch |
| <i>Phormidium</i> | | √ | √ | √ | √ |
| <i>Synechococcus</i> | | √ | ch | √ | √ |
| <i>Izoláty AH 5 a AH 35</i> | | √ | √ | ch | √ |
| <i>Limnothix</i> | | | √ | √ | √ |
| <i>Leptolyngbya</i> | | √ | √ | √ | √ |
| <i>Nostoc</i> | | | √ | | √ |
| <i>Chamaesiphon</i> | | | ch | √ | |
| <i>Aphanothece</i> | | | | ch | |

Tab.č. 14 Vzorky z doby odběru 25.10.2010, směsné kultury jsem mikroskopovala v době, kdy měly sinicovou barvu, tedy cca 2 měsíce po odběru. Fajfka značí, ve kterých směsných kulturách z daného místa odběru se daná sinice nachází. Zelená barva značí, že jsem z tohoto místa získala izolát sinice (ne konkrétně k tomuto danému odběru, ale obecně). Červené ch značí rozdíl mezi dvěma tabulkami, které zde prezentuji. To znamená, že některé morfortypy jsem pozorovala jen v kulturách z října, některé jen v kulturách z března. Modře jsou zvýrazněny morfortypy, které jsem nepozorovala ve vzorcích z WB 1, mohly by proto mít hypoteticky vliv na kalcifikaci a bylo by dobré je dále na kalcifikaci testovat. Kurzívou jsou vyznačené morfortypy, které jsem získala jako izoláty.

| Morfotyp/Odběrové místo | WB 1 | WB 2 | WB 3 | WB 4 | WB 5 |
|------------------------------|------|------|------|------|------|
| <i>Plectonema</i> | | | ch | ch | ch |
| <i>Cyanothece/Gloeothece</i> | | | √ | | √ |
| <i>Pseudanabaena</i> | | | √ | √ | √ |
| <i>Tolypothrix</i> | | | √ | √ | ch |
| <i>Calothrix</i> | | | | | √ |
| <i>Phormidium</i> | | | √ | √ | ch |
| <i>Synechococcus</i> | | | √ | √ | ch |
| Izoláty AH 5 a AH 35 | | | √ | √ | √ |
| <i>Limnothrix</i> | | | √ | √ | √ |
| <i>Leptolyngbya</i> | | | √ | √ | √ |
| <i>Nostoc</i> | | | ch | | ch |
| <i>Chamaesiphon</i> | | | √ | ch | |
| <i>Aphanothece</i> | | | | √ | |

Tab.č. 15 Vzorky z odběru v březnu 2010 (5.3.2010). Zde nemá zvýraznění morfotypů smysl, protože vzorky byly odebírány pouze z WB 3 – 5.

2. Fylogenetické analýzy

2.1. Analýzy na základě kompletních sekvencí 16S rDNA

Strom, který jsem získala na základě analýzy kompletních sekvencí 16S rRNA genu (příloha č. 5), potvrzuje předchozí studie o polyfylii rodů *Pseudanabaena*, *Phormidium*, *Synechococcus* a *Leptolyngbya* (například ISHIDA ET AL., 2001, ROBERTSON, ET AL., 2001, CASAMATTA ET AL., 2005). Zástupci řazení ke všem těmto rodům se vyskytují napříč celým stromem. Parafyletický je rod *Tychonema*, který se vyskytuje poblíž sekvencí rodů *Phormidium* a *Microcoleus* v kladu *Tychonema/Phormidium/Microcoleus*. V tomto kladu se vyskytují také 3 izoláty sinic, pomocí určovací literatury zařazené do rodu ***Phormidium***, **RKC** (RohKultur Cyanobacteria, izoláty vytvořené Dorotheou Hause-Reitner, které jsem dostala k osekvenování a dalším analýzám) **2**, **RKC 13**, **RKC 20**.

Naopak monofyletický je rod *Nostoc*, v kladu *Nostoc* (bootstrapová hodnota činí 100%) se nachází také 3 mé izoláty sinice *Nostoc* (**AH 2**, **AH 38** a **AH 40**) a další sekvence *Nostoc* z GenBank, například *Nostoc flagelliforme* IMGA0408 (EU178143.1).

Tolypothrix je v tomto stromu parafyletický, neboť se v *Tolypothrix* kladu nachází také sinice *Coleodesmium* sp. ANT.L52B.5 (AY493596.1), ale také se zde nachází moje izoláty *Tolypothrix* **AH 41**, **43**, **46** a **48** a sekvence *Tolypothrix* sp. UAM 357 (HM751846.1). Celý tento klad je podpořen 96% hodnotou.

Mé sekvence izolátů *Synechococcus* (**AH 19, RKC 1, 3, 4, 9, 12, 17**) se nacházejí na větvi s vysokou bootstrapovou hodnotou 100% - pojmenovala jsem tuto větev *Synechococcus* klad, nejbližší sesterská sekvence *Synechococcus* PCC 7502 (AF448080.1) se nachází na větvi, která spojuje tento *Synechococcus* a můj *Synechococcus* klad, s 97% bootstrapovou hodnotou.

Moje sekvence izolátů, určené jako *Limnothrix* (**AH 1, 8, 11, 12, 30, 33, AH 21 RKC 19**), se nacházejí v kladu *Pseudanabaena/Limnothrix* se 100% bootstrapovou hodnotou, kde se nachází rovněž sekvence z GenBank, pojmenované *Limnothrix* sp. MR1 (AJ580008.1), *Limnothrix redekei* CCAP 1443/1 (AJ580007.1) a *Limnothrix* sp. Sai002 (GU935351.1). Další sekvence rodu *Limnothrix* z GenBank se ve stromu již neobjevuje, nicméně izolát **AH 29 *Limnothrix*** se nachází také v kladu *Leptolyngbya* (vysvětlení viz diskuze, strana 60).

V tomto kladu (*Pseudanabaena/Limnothrix*) se nachází také sekvence *Pseudanabaena*, a to jak moje izoláty (**AH 3, 4, 9, 14 a 32**), tak sekvence z GenBank, například *Pseudanabaena minima* GSE-PSE20-05C (HQ132935.1) nebo *Pseudanabaena* PCC7408 (AB039020.1). Toto lze vysvětlit tím, že morfologická podobnost *Limnothrix* a *Pseudanabaena* je velmi vysoká a i sekvence 16S rDNA jsou velmi podobné. V tomto kladu se nachází ještě sekvence *Arthronema gygaxiana* UTCC 393 (AF218370.1). Další sekvenci izolátu určeného jako *Pseudanabaena* (**RKC 10**) lze najít rovněž v *Leptolyngbya* kladu, kde se vyskytuje na jedné větvi s izolátem RKC 11 *Leptolyngbya* s bootstrapovou hodnotou 98%. A poslední izolát *Pseudanabaena* (**AH 7**) leží rovněž na jedné větvi s izolátem *Leptolyngbya* (AH 16), s podporou 100%.

Sekvence izolátů *Leptolyngbya* (**AH 29, 31, 36, RKC 6, 11**) tvoří spolu s dalšími sekvencemi klad *Leptolyngbya*, podpořený 92% bootstrapovou hodnotou. V tomto kladu se vyskytují také izoláty RKC 10 *Pseudanabaena* a AH 29 *Limnothrix*, ale také sekvence *Phormidium* sp. 195-A12 (EU282429.1). Ze sekvencí rodu *Leptolyngbya* stažených z GenBank, se zde vyskytují sekvence *Leptolyngbya margaretheana* 1T12 (FR798934.1), *Leptolyngbya* sp. N62DM (FJ410906), *Leptolyngbya antarctica* ANT.LACV6.1 (AY493589.1) a *Leptolyngbya foveolarum* PMC302.07 (GQ859653.1). Další izolát *Leptolyngbya* (**AH 16**) se nachází na větvi 100% podpořené spolu s izolátem *Pseudanabaena* AH 7, nejbližší sesterská skupina obsahuje sekvence *Leptolyngbya tenerrima* UTCC 77 (AF218368.1), *Leptolyngbya foveolarum* (FR798945.1) a *Leptolyngbya boryana* UTEX 'B 485' (AF132793.1). Poslední izolát *Leptolyngbya* (**AH 10**)

leží na jedné větvi s Uncultured cyanobacterium clone S3.WB (GQ324972.1), který je v předchozí studii charakterizován jako Unidentified D, a to s podporou 99%. Tento izolát tak jednoznačně vyjasňuje jednu neidentifikovanou skupinu z předchozí studie (ARP *ET AL.*, 2010). Sekvence *Leptolyngbya* z GenBank pak leží ještě na dalších pozicích ve stromu.

Další izoláty, které jsem pomocí klíče určila jako *Aphanothece* (AH 18, 22, 25 a 27), *Plectonema* (AH 20 RKC 18), *Cyanothece* (AH 24) a sinice, kterou jsem nebyla pomocí klíče schopná určit (Izoláty AH 5 a AH 35), pak leží mezi nejbližšími sekvencemi z GenBank, které ale neurčují jasně, zda se opravdu jedná o danou sinici.

Izoláty *Aphanothece* (AH 18, 22, 25 a 27) se nacházejí na větvi podpořené bootstrapovou hodnotou 100% spolu se sekvencemi *Synechococcus* WH8101 (AF001480), *Prochlorococcus* sp. MIT9313 (AF053399), *Cyanobium* sp. JJ23-1 (AM710371.1), *Synechococcus* PCC6307 (AF001477) a *Cyanobium* sp. PCC6904 (AF216944.1). Jediné další *Aphanothece*, vyskytující se v tomto stromu, je *Aphanothece sacrum*, které ale leží na větvi s izolátem *Cyanothece* (AH 24). Žádné další *Aphanothece* nebylo při stahování z GenBank mezi 15 nejbližšími sekvencemi. Jde tedy opravdu o *Aphanothece*? Viz diskuze, strana 61.

Izolát *Plectonema* (AH 20 RKC 18) leží na velmi dobře podpořené větvi (99%) spolu s Uncultured bacterium clone ARDRA0623 (EF451617.1). Na sesterské větvi tomuto klastru leží sekvence *Leptolyngbya frigida* ANT.L52.2 (AY493575.1), s podporou opět 99%. Zatímco sekvence *Plectonema* sp. F3 (AF091110.1) z GenBank se nachází úplně jinde v tomto stromu (jeví se jako vzdáleně sesterská k větvi, na níž leží izoláty *Aphanothece*), tato sekvence leží na větvi podpořené 100% ještě spolu s *Pseudophormidium* sp. ANT.LPE.3 (AY493587.1) a *Leptolyngbya* sp. ANT.L52.1 (AY493584.1). Více viz diskuze, strana 61.

Co se týče izolátu *Cyanothece* (AH 24), ten leží spolu s *Aphanothece sacrum* (AB116658.2) na velmi dobře podpořené větvi (99%). Na sesterské větvi, která ale nemá významnou bootstrapovou podporu (88%), leží sekvence *Gloeothece* sp. SK40 (AB067576.1) a *Cyanothece* sp. PCC8801 (AF296873.1). Opět více v diskuzi, strana 61.

Poslední dva izoláty, AH 5 a AH 35, jsou sinice, které jsem s pomocí určovacího klíče nebyla schopná nikam zařadit. Požádala jsem o konzultaci Prof. Komárka, a ten mi poradil přidat sekvence *Halothece* a *Euhalothece*. V tomto menším stromu se nenachází, a to z toho důvodu, že tyto sekvence ležely daleko od mých izolátů, a proto nebyly s těmito nijak příbuzné. Naopak, podle tohoto stromu se ukazuje, že na sesterské větvi, avšak bez

významné bootstrapové hodnoty, leží sekvence *Synechocystis* PCC6308 (AB039001.1). Nejbližší větev, která má bootstrapovou hodnotu 100% a zahrnuje tyto izoláty, obsahuje sekvence *Cyanobacterium* sp. MBIC10216 (AB058249.1), *Cyanobacterium stanieri* PCC 7202 (AM258981.1), *Synechococcus* sp. PCC 8806 (AF448077.1), Uncultured cyanobacterium clone BK-45-25 (FJ866623.1) a GPENV133 (DQ512832), *Synechocystis* sp. CR_L29 (EF545641) a *Synechocystis* sp. VNM-13-10 (HQ900668.1). Což tedy výrazně k určení rodu pomocí fylogenetiky nepomáhá. Více viz diskuze, strana 62.

Co se týče předchozí studie, byly objasněné 3 fylotypy z devíti, a to *Pseudanabaena*, *Tychonema* a *Chamaesiphon*. Fylotyp *Pseudanabena* (ve studii nazývaný ***Pseudanabena morphotype***, používají výraz morfotyp i přes to, že nebyla pozorována morfologie a vycházejí tedy z fylogenetické analýzy) měl za reprezentativní sekvenci Uncultured cyanobacterium clone DB.NK 1511 (GQ324966). Ten leží na velmi dobře podpořené větvi (98%) spolu se sekvencí *Pseudanabaena* PCC6802 (AB039016.1) a dá se tedy usuzovat, že zařazení v předchozí studii bylo správné.

Fylotyp *Tychonema* (***Tychonema morphotype***), pro který je považována za reprezentativní sekvenci *Tychonema* sp. K27 (GQ324965.1), už je však sporný. Ani v GenBank, ani v článku (ARP ET AL., 2010) není napsáno, zda se jednalo o izolát, ale spíše, podle ostatního textu, usuzují, že šlo o klonovou sekvenci, kterou určili na základě příbuznosti k rodu *Tychonema*. Toto ve své práci zpochybňují, protože ač se sekvence *Tychonema* sp. K27 nachází v kladu *Tychonema/Phormidium/Microcoleus*, neleží na dobře podpořené větvi se sekvencí *Tychonema*, ale nejbližší dobře podpořená větev je ta, která zahrnuje právě všechny tyto sekvence (*Tychonema*, *Phormidium* i *Microcoleus*). Předchozí studie byla dělána na souboru 78 sekvencí, takže je možné předpokládat, že právě tam se stala chyba a podpora větve v jejich článku pro *Tychonema*, vychází z nedostatečného kvanta sekvencí.

Posledním vyjasněným fylotypem z předchozí studie, je fylotyp *Chamaesiphon* (***Chamaesiphon morphotype***). Reprezentativní sekvence Uncultured cyanobacterium clone WB7.4 (GQ324971.1) opravdu leží na stejné větvi spolu se sekvencí *Chamaesiphon subglobulosus* PCC7430 (AY170472.1), nicméně tato větev není podpořená, a podpořená 100% je až větev, která zahrnuje další Uncultured cyanobacterium clone B10811G (HQ189026.1). Podívám-li se do stromu s plným počtem sekvencí, objevím pak, že se zde nachází velké množství Unidentified cyanobacterial/bacterial clone, které mají spolu

s *Chamaesiphon* 100% podporu, ale není jisté, zda se z toho dá usuzovat na to, že se skutečně jedná o *Chamaesiphon* klad.

Součástí mojí diplomové práce je vysvětlit oněch 6 Unidentified skupin (A-F).

Reprezentativní sekvence pro **Unidentified A** se nacházejí, spolu s reprezentativní sekvencí pro **Unidentified B** v kladu *Tychonema/Phormidium/Microcoleus* (podobně to vyšlo i v předchozí studii, ale tam Unidentified B vyčlenili z kladu pro Unidentified A). Jedna z reprezentativních sekvencí Unidentified A (Uncultured cyanobacterium clone WB 18.8, GQ324964.1) leží na dobře podpořené větvi (97%) spolu s Uncultured bacterium Llo_001 (FR667299.1), a na nejbližší sesterské větvi, ovšem bez významné podpory, leží druhá reprezentativní sekvence pro Unidentified A (Uncultured cyanobacterium clone WBK15, GQ324967). Unidentified B leží na bazální větvi kladu *Tychonema/Phormidium/Microcoleus*. Dá se tedy předpokládat, že i když nedokáží zatím říci rodová jména těchto Unidentified, bude se patrně jednat o sinici tohoto morfotypu.

Reprezentativní sekvence pro **Unidentified C**, Uncultured cyanobacterium clone WB1.10 (GQ324968), leží na velmi dobře podpořené větvi (100%) spolu s Uncultured bacterium clone 20B9 (DQ366018.1) a Uncultured cyanobacterium clone RJ094 (DQ181682.1). Další významný bootstrap (99%) se nachází na větvi, která zahrnuje sekvence kolem mého izolátu *Plectonema* (AH 20 RKC 18), nachází se zde také sekvence *Leptolyngbya frigida* ANT.L52.2 (AY493575.1), *Leptolyngbya* sp. CENA103 (EF088339.1) a *Leptolyngbya antarctica* ANT.LWA.1 (AY493604.1). O izolátu *Plectonema* se zmiňuji více v diskuzi, strana 61, ale dá se předpokládat, že jde o sekvenci blízkou rodu *Leptolyngbya*, proto bych určila Unidentified C do rodu *Leptolyngbya*.

Skupina **Unidentified D** je ukázkovým příkladem toho, jak měla tato část diplomové práce dopadnout. Podařilo se mi získat izolát, který má sekvenci tak blízce příbuznou skupině Unidentified, že leží na jedné větvi, s vysokou bootstrapovou hodnotou 99%. Jedná se o izolát *Leptolyngbya* AH 10. Unidentified D se nachází v blízkosti Unidentified C, na sesterské větvi, ačkoliv bez významné bootstrapové hodnoty. Přesto se dá předpokládat, že by se tedy v obou případech mohlo jednat o rod *Leptolyngbya*, možná by šlo o jiný druh.

Skupiny **Unidentified E** a **Unidentified F** se nacházejí rovněž poblíž sebe, ale opět bez významnější bootstrapové hodnoty.

Poblíž skupiny Unidentified E (Uncultured cyanobacterium clone WB17.4, GQ324963.1) neleží žádná sekvence, se kterou by měla významnou podporu. Vystupuje zde jako

sesterská k Unidentified F (Uncultured cyanobacterium clone DB.BC325, GQ423969.1), která leží na jedné větvi s Uncultured cyanobacterium RBE1CI-123 (EF111085.1), a to s vysokým bootstrapem (100%). Toto je identické pro moji diplomovou práci i předchozí studii.

V blízkosti těchto Unidentified se však nenachází žádná větev se slušnou bootstrapovou hodnotou, která by mohla alespoň napovědět, o jaký rod by se mohlo jednat.

2.2. Analýzy se všemi sekvencemi 16S rDNA (včetně parciálních sekvencí 16S rDNA získaných klonováním)

OTU 1 obsahuje klonové sekvence Kathrin I. Mohr a moje sekvence z odběru v březnu z míst WB 3, 4 a 5, v květnu z míst WB 1, 2, 3 a v září z míst WB 1 a 4. Větev, která tyto sekvence spojuje, nemá významnou bootstrapovou hodnotu, ale hned další větev má bootstrapovou hodnotu 96%. Celý klastr obsahuje ještě sekvence Uncultured cyanobacterium clone WB1.10 (GQ324968.1), neboli Unidentified C a další Uncultured cyanobacterium/bacterium clone (AK4DE1_09H, GQ397056, H-B02, DQ181686.1, Fr094, AY151727.1). Žádné sekvence s rodovým jménem, které by mohly identitu tohoto klastru OTU 1 vyjasnit, se zde nenacházejí.

OTU 2 zahrnuje pouze sekvence Kathrin I. Mohr a sesterská větev, ovšem bez slušné bootstrapové hodnoty, obsahuje sekvenci *Microcoleus rushforthii* UTCC 296 (AF218377.1), na vzdálenější větvi, opět bez podpory, leží sekvence *Tychonema bourrellyi* CCAP 1459/11B (AB045897.1) a *Tychonema tenue* SAG 4.82 (GQ324973.1). Bez podpory jsou všechny další větve.

Větev s většinou sekvencí **OTU 3** je sesterská k té, která obsahuje OTU 2. Mezi OTU 3 se vyskytuje také jedna sekvence na dlouhé větvi, se sekvencí z **OTU 6** (sekvence z května, WB 1). Mezi sekvencemi OTU 3 se nachází sekvence Uncultured cyanobacterium clone WB18.8 (GQ324964.1), reprezentativní sekvence pro Unidentified A a sekvence Uncultured bacterium clone Llo_001 (FR667299.1), tudíž je opět těžké říci, jaký rod by mohl charakterizovat OTU 3.

OTU 3 obsahuje sekvence Kathrin I. Mohr a moje sekvence z března (WB 3, 4), z května (WB 1, 3, 5) a ze srpna (WB 1, 2, 5). Některé sekvence Kathrin I. Mohr, patřící do OTU 3 se objevují také ještě mimo klastr OTU 3, na větvi, k níž jsou sesterské sekvence izolátů *Phormidium* a sekvence *Microcoleus*, *Phormidium* a *Tychonema* z GenBank a OTU 2 a 3.

OTU 4 obsahuje pouze klony Kathrin I. Mohr a nachází se na větvi sama, je sesterská k OTU 7 a k OTU 5 a Uncultured cyanobacterium clone WB10.1 (GQ324970.1) (Unidentified B).

OTU 5 obsahuje rovněž pouze klony Kathrin I. Mohr a je sesterská s Uncultured cyanobacterium clone WB10.1 (GQ324970.1) (Unidentified B) a OTU 4. Toto vše ovšem bez významné bootstrapové hodnoty.

OTU 7 je složeno ze sekvencí Kathrin I. Mohr a leží na větvi s Uncultured cyanobacterium clone WB17.4 (GQ324963.1), tato větev je podpořena 100% bootstrapovou hodnotou. OTU 7 je sesterské k OTU 4.

Pro OTU 4, 5 a 7 platí, že žádná další větev až ke kořenu stromu nemá významnou bootstrapovou hodnotu, tudíž ani u těchto OTUs není možné říci, o jaký rod sinic se jedná.

OTU 8 leží na větvi podpořené 84% spolu s OTU 30. Je k OTU 30 sesterské a tvoří klastr sekvencí Kathrin I. Mohr a sekvencí z WB 1 z května a srpna. Další sekvence v tomto klastru jsou opět Uncultured bacterium/cyanobacterium clone (ncd2686g02c1, JF233169.1 a B108204C, HQ189035.1). **OTU 30**, sesterské k tomuto OTU 8, obsahuje sekvence z WB 1 (květen), a leží na této větvi samo. Takže pro obě opět platí, že žádné objasnění rodu není možné.

OTU 9 obsahující sekvence Kathrin I. Mohr leží na dobře podpořené větvi (100%) spolu se sekvencí *Geitlerinema carotinosum* AICB 37 (AY423710.1).

OTU 10, které obsahuje moje sekvence z března z WB 5, leží na větvi podpořené 93% se sekvencí *Microcoleus paludosus* SAG 1449-1a (EF654090.1).

OTU 11 leží na 100% podpořené větvi spolu s mými izoláty AH 7 *Pseudanabaena* a AH 16 *Leptolyngbya*. Klonové sekvence jsou moje z března (WB 5), května (WB 1, 2) a srpna (WB 1, 2). S přihlédnutím k diskuzi (strana 60) pak toto OTU může obsahovat rody jak *Leptolyngbya*, tak *Pseudanabaena*.

Sekvence **OTU 12** leží na větvi dobře podpořené (98%) spolu s **OTU 14**. Na sesterské větvi, se kterou má podporu 100%, leží **OTU 13**. V celé této větvi není žádná sekvence s rodovým jménem, a o které rody by mohlo jít, tak zůstává nejisté.

OTU 12 obsahuje moje sekvence u odběrových míst WB 1 (květen a srpen) a WB 3 (březen) a klony Kathrin I. Mohr. OTU 13 zahrnuje pouze sekvence Kathrin I. Mohr a OTU 14 pak pouze moje sekvence z května (WB 1).

OTU 15 se nachází na větvi (100%) spolu s mými izoláty *Tolypothrix*, se sekvencemi *Tolypothrix* sp. UAM 357 (HM751846.1) a *Coleodesmium* sp. ANT.L52B.5

(AY493596.1), ale také na větvi s mým izolátem *Nostoc* a sekvencí *Nostoc* z GenBank (*Nostoc* sp. SAG 39.87, DQ185252.1). Tato větev má ale podporu 85%. A další sekvence se nachází na větvi sesterské k větvi s rodem *Nostoc*. Nejbližší větev, se kterou má tato větev významnou podporu (95%) pak zahrnuje také **OTU 16**, které leží na velmi podpořené větvi (100%) spolu se sekvencí *Nostoc* sp. CENA105 (EF088340.1)

OTU 15 obsahuje klony Kathrin I. Mohr, moje z května (WB 2) a srpna (WB 1, 2).

OTU 16 obsahuje moji sekvenci z WB 5 z března.

OTU 17 leží na větvi s bootstrapovou podporou 100% spolu se sekvencemi Unidentified D – Uncultured cyanobacterium clone S3.WB (GQ324972.1) a mým izolátem AH 10 *Leptolyngbya*. Jedná se tedy (s přihlédnutím k diskuzi, strana 60) o rod *Leptolyngbya*.

Sekvence **OTU 18** se nacházejí na 2 sesterských větvích. Jedna větev obsahuje sekvence *Limnothrix* a *Pseudanabaena*, a to jak mých izolátů, tak sekvencí z GenBank, například *Limnothrix redekei* CCAP 1443/1 (AJ580007.1), *Pseudanabaena minima* GSE-PSE20-05C (HQ132935.1), ale také *Arthronema gygaxiana* UTCC 393 (AF218370.1) a *Oscillatoria limnetica* MR1 (AJ007908.1). Tato větev obsahuje klony Kathrin I. Mohr a moje z března (WB 4, 5) a září (WB 1, 4, 5). Druhá větev je sesterská k této větvi bez podpory, obsahuje sekvence z WB 5 z března a je sesterská k větvi, na které leží **OTU 19**, které obsahuje také sekvenci z WB 5 z března.

OTU 20 leží na podpořené větvi (100%) spolu s OTU 21, OTU 20 je k **OTU 21** sesterské. V OTU 20 se nachází sekvence Uncultured cyanobacterium clone WB7.4 (GQ324971.1) z předchozí studie a sekvence *Chamaesiphon subglobulosus* PCC 7430 (AY170472.1). Další sekvence jsou Uncultured cyanobacterium/bacterium clone z GenBank. OTU 20 obsahuje sekvence od Kathrin I. Mohr a moje z května (WB 4) a srpna (WB 1, 5). V ideálním případě by se tato větev dala považovat, spolu s OTU 21, za rod *Chamaesiphon*, ale protože samotná větev OTU 20 nemá významnou bootstrapovou podporu, nejsem si tímto určením jistá.

OTU 21 obsahuje dvě sekvence Kathrin I. Mohr.

OTU 22 je skupina sekvencí okolo izolátů AH 5 a AH 35. Dobrá podpora, 100%, se nachází na větvi, která k těmto sekvencím přiřazuje sekvence *Synechocystis* sp. CR_L29 (EF545641.1), *Synechocystis* PCC6308 (AB039001.1) a *Cyanobacterium stanieri* PCC7202 (AF132782.1). OTU 22 obsahuje pouze moje sekvence klonů, a to pouze

z odběrového místa WB 5 (z března a srpna), což odpovídá i izolátům AH 5 a 35, které jsem jinde, než ve WB 5 neobjevila.

OTU 23 obsahovalo 1 sekvenci α -proteobakterie, pravděpodobně *Rhodobacter* sp., proto bylo smazáno.

OTU 24 obsahovalo taktéž jednu sekvenci, která se nacházela uvnitř OTU 22, šlo rovněž o klon z WB 5 z března. Sekvenci neuvádím ve stromu s 487 sekvencemi, protože jde podle mě o zástupce OTU 22.

OTU 25 obsahuje 2 sekvence Kathrin I. Mohr, nejbližší větev s větší podporou (100%) zahrnuje sekvence *Pleurocapsa* sp. SCyano22 (DQ058854.1) a *Dermocapsa* sp. MBIC10768 (AB058287.1), *Myxosarcina* sp. PCC 7325 (AJ344562.1), *Dermocarpella incrassata* (AJ344559.1), *Pleurocapsa* sp. CALU 1126 (DQ293994.1). Jedná se tedy s nejvyšší pravděpodobností o kokální sinici typu Pleurocapsales.

Samotné sekvence **OTU 26** leží na větvi se 100% podporou, nicméně dále ve stromu se nenachází větev s významnou podporou. Sesterské sekvence k OTU 26 jsou Uncultured bacterium clone MIZ36 (AB179527.1) a *Leptolyngbya frigida* ANT.L53B.2 (AY493576.1), *Pseudanabaena tremula* UTCC 471 (AF218371.1) a *Phormidium* sp. SAG 37.90 (EF654082.1), nelze proto říci, o jaký rod se v tomto případě jedná. Sekvence v OTU 26 jsou moje klony ze srpna z WB 1.

Sekvence **OTU 27** leží na větvi s podporou 100%, spolu s izoláty *Leptolyngbya*, *Limnothrix* (viz diskuze, strana 60) a *Pseudanabaena* a sekvencemi *Leptolyngbya* (např. *L. margaretheana* 1T12, FR798934,1), *Oscillatoria* sp. (AJ133106.1) a *Phormidium* (např. *Phormidium* sp. SAG 61.90, EU624415.1) z GenBank. Jedná se tedy s určitostí o vláknitou Oscillatoriální sinici, pravděpodobně morfotypu *Leptolyngbya*.

Sekvence klonů, které obsahuje, jsou od Kathrin I. Mohr a moje z března (WB 5), z května (WB 1) a ze srpna (WB 1, 2).

OTU 28 leží na nepodpořené větvi spolu s *Aphanocapsa muscicola* VP3-03 (FR798916.1) a *Acaryochloris* sp. JJ8A6 (AM710387.1). Půjde tedy pravděpodobně o kokální sinici. OTU 28 obsahuje sekvenci z května z WB 2.

OTU 29 obsahuje sekvence od Kathrin I. Mohr a sekvence z WB 1 ze srpna. Leží na větvi s méně významnou podporou 87% spolu se sekvencemi *Phormidium priestleyi* ANT.LACV5.1 (AY493586.1), *Pseudophormidium* sp. ANT.LPE.3 (AY493587.1), *Leptolyngbya* sp. ANT.L52.1 (AY493584.1) a *Plectonema* sp. F3 (AF091110.1). Bude se tedy jednat o vláknitou sinici oscillatoriálního morfotypu.

OTU 31 se nachází na větvi se 100% bootstrapem spolu s mými izoláty pojmenovanými *Aphanothece* a se sekvencemi z GenBank – *Synechococcus* (např. *Synechococcus* sp. PCC 7920, AF216948.1), *Prochlorococcus* sp. MIT9313 (AF053399) a *Cyanobium* (např. *Cyanobium* sp. JJ23-1, AM710371.1). Půjde tedy o kokální sinici. Toto OTU obsahuje moje klony z března z WB 4 a 5.

OTU 32 se nachází na podpořené větvi 93% spolu s Uncultured cyanobacterium clone DB.NK1511 (GQ324966.1) a *Pseudanabaena* PCC6802 (AB039016.1). Jedná se tedy velmi pravděpodobně o rod *Pseudanabaena*. Obsahuje moje klony z května (WB 1) a ze srpna (WB 2, 5).

OTU 33 leží na větvi s podporou 100% spolu s Uncultured bacterium clone Be_091 (FR667473.1), jedná se o 3 sekvence Kathrin I. Mohr.

OTU 34 obsahuje 2 sekvence od Kathrin I. Mohr a leží na dvou místech. Jedna na větvi s podporou 100% spolu s mými izoláty *Synechococcus* a sekvencí *Synechococcus* sp. PCC 7502 (AF448080.1). Jde tedy zřejmě o rod *Synechococcus*. A druhá část na větvi bez významné podpory a to jako sesterská k OTU 33 a významná podpora hlouběji ve stromu není.

OTU 35 (moje klony z března – WB 4, 5; z května – WB 2, 3, 5; ze srpna – WB 2, 4, 5) leží na větvi sesterské k **OTU 36** (moje klony z března z WB 4), opět bez větší podpory, nenachází se uvnitř žádná sekvence, která by mohla pomoci určit rod, na sesterské větvi, bez podpory, leží sekvence *Calothrix* sp. KVSF5 (EU022730.1). Na druhé sesterské větvi leží OTU 38 a 39, a to opět bez podpory, nicméně se mezi těmito sekvencemi objevují rody *Leptolyngbya*. Proto není možné říci, o jaký rod se u OTU 35 nebo OTU 36 jedná.

Zato **OTU 37** (klony z března z WB 3 a 5, z května z WB 2, 4 a ze srpna z WB 3 a 5) má na sesterské větvi s podporou 95% se sekvencí *Leptolyngbya antarctica* ANT.LWA.1 (AY493604.1) a dá se proto předpokládat, že se jedná o rod *Leptolyngbya*.

Jak již bylo řečeno, **OTU 38** a **OTU 39** leží na sesterské větvi k OTU 35 a 36. OTU 38, obsahující klony z března z WB 5, z května z WB 1, 2, 3 a ze srpna z WB 1, 2, 3, leží na větvi spolu s izolátem *Plectonema* a na větvi se sekvencí *Leptolyngbya frigida* ANT.L52.2 (AY493575.1), to vše sice bez významné podpory, přesto bych usuzovala, že se bude jednat o vláknitou sinici podobnou rodu *Leptolyngbya*. OTU 39 obsahuje klony z května z WB5 a ze srpna z WB 4 a leží na sesterské větvi k OTU 38, na nejbližší

sesterské větvi leží Uncultured bacterium clone 074 (HM240939.1) a na vzdálenější pak *Leptolyngbya* sp. VP3-07 (FR798933.1). Opět bez podpory.

OTU 40 se nachází na větvi podpořené 100% spolu s Uncultured bacterium clone CM73 (EF580987.1). Na sesterské větvi, bez podpory, se nachází reprezentativní sekvence pro Unidentified F – Uncultured cyanobacterium clone DB.BC325 (GQ324969.1). Toto OTU obsahuje sekvence Kathrin I. Mohr a moje ze srpna z WB 2.

Vzdáleně sesterská k větvi, na níž leží OTU 40, je větev, na které leží **OTU 41**. Se slabší podporou (85%) leží na větvi s Uncultured bacterium clone VB13 (FJ790541.1). Sekvence, která by mohla ukazovat na možný rod, se ani u OTU 40, ani OTU 41 neobjevuje. Obsahuje moje sekvence z WB 1 v květnu.

OTU 42 (klony Kathrin I. Mohr) leží na větvi s podporou 100% s Uncultured bacterium clone OTU46 (GU451377.1). Tato větev je sesterská k větvi, na níž leží OTU 31. OTU 42 bude pravděpodobně kokální sinice.

| OTU | Bootstrap > 90 % | Pravděpodobný morfortyp |
|-----|------------------|---|
| 1 | | x |
| 2 | ne | <i>Microcoleus/Tychonema</i> |
| 3 | | x |
| 4 | | x |
| 5 | | x |
| 6 | | x |
| 7 | | x |
| 8 | | x |
| 9 | ano | <i>Geitlerinema</i> |
| 10 | ano | <i>Microcoleus</i> |
| 11 | ano | <i>Leptolyngbya/Pseudanabaena</i> |
| 12 | | x |
| 13 | | x |
| 14 | | x |
| 15 | ano | <i>Tolypothrix, Coleodesmium/Nostoc</i> |
| 16 | ano | <i>Nostoc</i> |
| 17 | ano | <i>Leptolyngbya</i> |
| 18 | ano | <i>Limnothrix/Pseudanabaena</i> |
| 19 | | x |
| 20 | ne | <i>Chamaesiphon</i> |
| 21 | | x |
| 22 | ano | <i>Synechocystis/Cyanobacterium</i> |
| 23 | | odstraněna, <i>Rhodobacter</i> |
| 24 | | patrně zástupce OTU 22 |
| 25 | ano | <i>Pleurocapsa/Myxosarcina/Dermocapsa/Dermocarpella</i> |
| 26 | | x |
| 27 | ano | <i>Leptolyngbya/Pseudanabaena/Oscillatoria/Phormidium</i> |

| | | |
|----|-----|--|
| 28 | ne | kokální sinice |
| 29 | ne | vláknitá Oscillatoriální sinice |
| 30 | | x |
| 31 | ano | <i>Aphanothece/Synechococcus/Cyanobium</i> |
| 32 | ano | <i>Pseudanabaena</i> |
| 33 | | x |
| 34 | ano | <i>Synechococcus</i> |
| 35 | | x |
| 36 | | x |
| 37 | ano | <i>Leptolyngbya</i> |
| 38 | ne | cf. <i>Leptolyngbya</i> |
| 39 | | x |
| 40 | | x |
| 41 | | x |
| 42 | ne | kokální sinice |

Tab.č. 16 Předpokládané morfotypy OTUs. x značí, že žádná sekvence s rodovým názvem nebyla přítomna na větvi, kde se nacházelo OTU. Zeleně označené buňky značí, která rodová jména bych pro daná OTUs mohla použít (silná bootstrapová podpora, pouze jedno rodové jméno).

Diskuze

Typ studie, jakou jsem dělala, není nic nového, ovšem pro potok Westerhöfer tak podrobná studie ještě dělána nebyla. Pro zjištění větší diverzity doporučuji spojit práci závislou na kulturách a na kulturách nezávislou například WARD *ET AL.* (1998). Tímto způsobem byla dělána studie na mořských stromatolitech FOSTERA *ET AL.* (2009) nebo BURNS *ET AL.* (2004), a dalších autorů na jiných biotopech (například JUNGLUT *ET AL.*, 2005).

1. Sinice spojené se stromatolity – potok Westerhöfer versus mořské stromatolity

Podle dostupných studií mají vliv na vznik stromatolitu jak kokální, tak vláknité sinice. Patří mezi ně *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria limosa* (někdy pojmenována jako *Lyngbya* sp.), *Calothrix*, *Scytonema*, *Synechococcus*, *Spirulina*, *Schizothrix* a také *Aphanothece* (WHITTON & POTTS, 2000). Moje sekvence morfotypů *Limnothrix*, *Pseudanabaena* a OTU 18 se nacházejí ve fylogenetickém stromu na větvi spolu s *Oscillatoria limnetica*, sama jsem ve směsných vzorcích pozorovala *Calothrix*, vyzolovala sinici *Synechococcus* a *Aphanothece*.

Ve stromatolitech ze Shark Bay (Austrálie) byly objeveny tyto sinice: *Synechococcus*, *Xenococcus*, *Microcoleus*, *Leptolyngbya*, *Plectonema*, *Symploca*, *Cyanothece*, *Pleurocapsa* a *Nostoc* (BURNS & NEILAN, 2004). Opět příklad toho, že mořské a sladkovodní stromatolity se co do sinicových rodů výrazně neliší. Sinice *Synechococcus*, *Leptolyngbya*, *Plectonema* a *Nostoc* jsem objevila také. Sekvence OTU 25 pak byly příbuzné k sekvenci *Pleurocapsa* z GenBank a sekvence izolátu pojmenovaného *Phormidium* leží na jedné větvi s rodem *Microcoleus*.

Studie z roku 1994 (DÉFARGE ET AL., 1994a, b) popisuje současné jezerní stromatolity z Francouzské Polynésie a popisuje několik druhů sinic, které se zde vyskytují. Jako kalcifikující určují pouze rod *Scytonema mirabile*, nicméně nachází se zde také *Aphanothece stagnina*, *Phormidium crossbyanum*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Aphanocapsa littoralis*, *Aphanocapsa montana*, *Aphanothece nidulans*, *Gloeocapsa decorticans* a *Synechococcus elongatus*. Nicméně o těchto tvrdí, že se na kalcifikaci nepodílí. Já rod *Scytonema* nepozorovala v žádném vzorku, zato jsem pozorovala rody *Aphanothece* a *Phormidium*.

Studie FOSTER ET AL. (2009), zkoumající stromatolity útesu Highborne na Bahamách, uvádí jako kalcifikující sinici *Schizothrix gebeleinii*, dále izolovali rody *Leptolyngbya*, *Symploca*, *Aphanocapsa*, *Hydrocoleum*, *Phormidium* a *Hyella*. Já osobně jsem rod *Hyella* nepozorovala ani ve směsných kulturách, což ovšem může být tím, že jsem zkoumala hlavně biofilm a ve studii ARP ET AL., 2010, která se potokem Westerhöfer zabývala, se píše, že *Hyella fontana* byla pozorována ve větších hloubkách stromatolitu.

2. Klonování environmentální DNA – výhody a nevýhody

Klonování environmentální DNA bylo použito v několika studiích, například ve studii WARD ET AL., 1998, kde díky této metodě objevili ve stromatolitech v termálních potocích *Synechococcus* cf. *lividus*. Autoři také tvrdí, že klonování úseku 16S rDNA má nedostatky i proto, že 16S rDNA stačí pouze k naznačení ekologických jevů.

V další studii (DORADOR ET AL. 2008) bylo prováděno taktéž klonování úseku 16S rDNA směsných vzorků, a to proto, aby odhalila diverzitu sinic ve slaných mokřadech ve vysoké nadmořské výšce v Salar de Huasco (severní Chile). Analyzovali přítok a mělké laguny. Z 268 klonů vytvořili 78 fylotypů, které zahrnovaly Oscillatoriales, Pleurocapsales, Chroococcales a Nostocales. Jako příbuzné sekvence z GenBank (podle BLASTu)

vycházely sekvence z Antarktidy. Objevili, že spoustu sekvencí ale vyšlo nesinicových bakteriálních, i když použili primery specifické pro sinice. Nesinicové sekvence v této studii nepoužili, a to i přes to, že na některých místech to bylo až 92% všech sekvencí. Taktéž tvrdí, že klonováním odhalili 59% celkové sinicové diverzity.

O diverzitě organismů žijících pod křemenem v tundře ve středním Tibetu pojednává článek WONG *ET AL.* (2010). 73% z toho tvoří sinice, ale objevili i další organismy (řasy, houby, další skupiny bakterií a mechy). Klonování prováděli zvlášť pro Archea, bakterie a eukaryota. Ze získaných klonů pak spolu s nejbližšími příbuznými z GenBank sestavili fylogenetické stromy pro jednotlivé skupiny a odhalovali tak diverzitu. Ze sinic objevili *Chroococidiopsis*, *Phormidium*-like, *Leptolyngbya*, *Nostoc* a *Oscillatoria*.

Klonování environmentální DNA je celkem často používanou metodou pro zjištění diverzity ze směsných vzorků (COTTRELL & KIRCHMAN, 2000, WILKINSON *ET AL.*, 2002, BURNS *ET AL.*, 2004, FOSTER *ET AL.*, 2009, ARP *ET AL.*, 2010 a další). Je to jedna z metod, jak odhalit i organismy, které není možné pozorovat ve světelném mikroskopu pro jejich nízkou abundanci ve vzorku nebo proto, že není možné tyto organismy izolovat (HÖFLE *ET AL.*, 2005).

Klonování neukazuje na skutečnou ani relativní abundanci druhů, některé rody se vůbec nemusejí objevit, jiné jsou naopak nadhodnocené. Souvisí to s metodou PCR, kdy některé primery nemusí nasednout na všechny sekvence požadovaných organismů (COTTRELL & KIRCHMAN, 2000).

Klonování může být problematické také proto, že se jím nedá často vůbec zjistit, o jaký rod nebo dokonce řád se jedná. Velmi často se objevují v GenBank jako nejbližší příbuzné sekvence Uncultured cyanobacterium/bacterium clone.

Problémy se objevují už během samotného procesu klonování. Tato metoda je velmi drahá a otázkou zůstává, zda jsou výsledky v poměru cena/výsledek uspokojivé. Určila jsem si hranici 50 klonů na 1 klonovou banku (klonová banka = v tomto případě jedno odběrové místo na daný odběr, celkem tedy 13 klonových bank). Nicméně toho někdy nebylo možné dosáhnout. Některá odběrová místa obsahovala 100-200 klonů na jedno klonování, u jiných jsem musela klonování několikrát opakovat, a přesto jsem dosáhla třeba pouze 12 klonů.

Přesto je tato metoda v současné době jedna z mála, která nám umožňuje alespoň z části nahlédnout do skutečné diverzity v daném vzorku. Jak je vidno z mých fylogenetických stromů, kdybych neprováděla klonování a zůstala pouze u izolování sinic, byla by diverzita značně omezená na 11 morfotypů. Díky klonování jsem odhalila další sekvence napříč stromem, které se v potoku Westerhöfer vyskytují a snad je jen otázkou času, než alespoň některé z nich budou objasněny díky zvětšování objemu sekvencí v GenBank.

3. Fylogenetická analýza + morfologie – izoláty

Co se týče izolátů *Phormidium*, **RKC 2, 13 a 20**, leží společně na dobře podpořené větvi (97%), nicméně další významná podpora (100%) leží až na větvi, která zahrnuje sekvence rodů *Tychonema*, *Microcoleus* a *Phormidium*. Tudíž není možné říci, o který z těchto druhů se opravdu jedná.

Morfologie izolátu *Limnothrix* (**AH 29**), ležící v kladu *Leptolyngbya* je sporný. Z fotografií vyplývá, že se jedná spíše o sinici *Leptolyngbya*. Tuto chybu je možno vysvětlit tak, že ve chvíli, kdy izolát vznikl, mohla se *Limnothrix* na misce nacházet, ale *Leptolyngbya* ji pak přerostla a ačkoliv při mikroskopování byla nafocena *Leptolyngbya*, nápis na misce – **AH 29** *Limnothrix*, zůstal.

Izolát *Pseudanabaena* **RKC 10**, vyskytující se v kladu *Leptolyngbya* je pak také nejistý. Ač částečně odpovídá morfologii rodu *Pseudanabaena*, vyskytuje se u ní slizovitá pochva, což spíše ukazuje na *Leptolyngbya*. Klad *Leptolyngbya* pak patrně zahrnuje sekvence pouze rodu *Leptolyngbya*.

V případě izolátu **AH 7** – *Pseudanabaena* jde s vysokou jistotou o rod *Pseudanabaena* a umístění sinice ve fylogenetickém stromu odpovídá právě polyfylii tohoto rodu.

Izolát *Leptolyngbya* AH 16 není morfologicky sporný. Buňky prakticky nejsou zaškrčené, můstky nejsou pozorovatelné, je evidentně přítomná slizovitá pochva. I *Leptolyngbya* je rod polyfyletický (ISHIDA ET AL., 2001), tudíž je pozice tohoto izolátu s vysokou pravděpodobností správná.

Izolát **AH 10** – *Leptolyngbya* svou morfologií částečně připomíná *Pseudanabaena*, buňky jsou dobře viditelné, jemně zaškrčené. Můstky mezi buňkami ale chybí nebo nejsou viditelné a na některých místech je viditelná slizovitá pochva, ačkoliv jen velmi málo. Právě přítomnost slizovité pochvy v kombinaci s nepozorovatelnými můstky mě vedla

k rozhodnutí, že se jedná o izolát *Leptolyngbya*. Proto sekvenci Uncultured cyanobacterium S3.WB (GQ324972.1) (Unidentified D) popisují jako rod *Leptolyngbya*.

Izoláty *Aphanothece* (AH 18, 22, 25, 27) se vyskytují pohromadě se sekvencemi *Synechococcus*, *Prochlorococcus* a *Cyanobium*. Rod *Prochlorococcus* bych vyloučila, protože se jedná o mořskou pikoplanktonní sinici. Rod *Synechococcus* považuji v tomto případě za nepravděpodobný, protože rozměry buněk rodu *Synechococcus* bývají větší, a navíc jsem sama pozorovala ve svých vzorcích rod *Synechococcus* a moje izoláty *Aphanothece* se od nich výrazně liší. Velikost buněk i popis rodu *Cyanobium* odpovídá mým izolátům *Aphanothece*, nicméně v určovací literatuře se píše, že netvoří shluky (KOMÁREK, 1998), zatímco moje izoláty je tvoří, ačkoliv jsem nepozorovala slizovité obaly kolem daných kolonií. Nicméně v popisu rodu *Aphanothece* se píše, že kolonie mohou mít obaly rozplývavé. Věřím, že bližší studie odborníka na sinice by mohly tento problém vyjasnit, já toho však nebyla schopná.

Pozice izolátu *Plectonema* (AH 20 RKC 18) ve fylogenetickém stromu může mít tři vysvětlení. Jedním je, že jsem větvení v dané kultuře objevila pouze při jednom mikroskopování, ale zato opakovaně, na více místech sklíčka. Tato sinice se nemusí vždy větvit a proto jsem mohla předpokládat, že jde stále o monosinickou kulturu, nicméně několik původně nepozorovaných vláken sinice *Leptolyngbya* mohlo přerůst původní kulturu rodu *Plectonema*, než došlo k sekvenování. V tom případě by byla pozice blízká *Leptolyngbya frigida* ANT.L52.2 (AY493575.1), s bootstrapem 99%, pochopitelná. Avšak druhá možnost je zajímavější, a to proto, že také sekvence z GenBank, *Plectonema* sp. F3 (AF091110.1), leží na sesterské větvi s velmi dobrou bootstrapovou podporou (100%) spolu s *Leptolyngbya* sp. ANT.L52.1 (AY493584.1). Z toho se dá usuzovat, že také rod *Plectonema* je polyfyletický a je blíže příbuzný k rodu *Leptolyngbya*. Dalším vysvětlením by mohlo také být, že ony rody *Leptolyngbya* (jak ANT.L52.2, tak ANT.L52.1) byly špatně určené, a to proto, že nebylo pozorováno větvení. Přesto by však tento rod zůstal polyfyletický, neboť se obě větve nacházejí daleko od sebe.

AH 24 *Cyanothece* – jako nejbližší příbuzný této sinice se silnou bootstrapovou podporou (99%) v mém fylogenetickém stromu je uvedena sinice *Aphanothece sacrum* (AB116658.1). V článku FUJISHIRO ET AL., 2004, kde přímo tuto sinici popisují, uvádí velikost kolem 6 µm. Také podle snímků v tomto článku vyplývá, že toto *Aphanothece sacrum* tvoří kolonie několika málo buněk a pozice ve fylogenetickém stromu je poblíž *Cyanothece* a *Gloeothece*. V mé práci to vychází stejně, a jelikož má můj izolát stejné

rozměry a tvoří podobné kolonie, předpokládám, že se jedná o stejný druh. Otázkou však zůstává, zda zařazení *Aphanothece sacrum* do rodu *Aphanothece* je správné, jelikož *Aphanothece* by mělo podle určovací literatury (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1998) tvořit mnohobuněčné kolonie. *Cyanothece*, za které jsem tento izolát považovala, pak může tvořit buňky těchto rozměrů, ale i výrazně větší, nicméně netvoří slizovité kolonie. Můj první předpoklad vycházel z toho, že jsem při prvním mikroskopování neobjevila buňky ve slizovitých koloniích. Rod *Gloeothece*, rovněž příbuzný, slizovité kolonie tvoří a rozměry by opět odpovídaly (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1998). Je potřebná další revize větve, na které se tyto organismy nacházejí, ale například snímek z <http://www1.ci.uc.pt/pessoal/nunogdias/algario/gloeothece.htm> se výrazně podobá mému izolátu a dává tušit, že by z hlediska morfologie mohlo jít skutečně o *Gloeothece*.



Obr.č. 26 Fotografie *Gloeothece* z <http://www1.ci.uc.pt/pessoal/nunogdias/algario/gloeothece.htm>.

Posledním izolátem, jehož pozici na fylogenetickém stromu budu nyní diskutovat, je **AH 5 a AH 35**. Jak jsem již napsala, nebyla jsem schopná pomocí určovací literatury určit, o jaký rod se jedná. Tento izolát leží na dobře podpořené větvi spolu s dalšími sinicemi. Nejblíže se nachází sekvence *Synechocystis*, dále pak sekvence *Synechococcus* a *Cyanobacterium stanieri*. Popis rodu *Synechocystis* by opravdu mohl odpovídat morfologii zatím neidentifikované sinice, ale tato sinice má velmi výrazně striovanou centroplasmu, zatímco v KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1998 se píše, že centroplasma je spíše hladká, zřídka s globulemi. Morfologie je také zčásti podobná kokálním sinicím *Halothece* a *Euhalothece*, jejichž sekvence jsem na radu Prof. Jiřího Komárka použila při tvorbě prvního fylogenetického stromu, nicméně se tyto sekvence nacházely daleko od izolátů AH 5 a AH 35, proto jsem je při odstraňování zahrнула mezi ty, jejichž přítomnost by nic dalšího nevysvětlila. Nebyla jsem schopna kvalitního barvení, ale na základě odstupu buněk od sebe myslím, že mají slizovitý obal. To tedy vylučuje, že by se mohlo jednat o

rod *Cyanobacterium*, protože ten nikdy nemá slizovitý obal (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1998). Tato sinice také barví agarové medium dohněda, v KOMÁREK, 1992 jsem objevila, že rod *Synechocystis* může mít slizovitý obal, který se obarvuje. Je tedy možné, aby pigmentace pronikla i do agarového media? Jak jsem již zmínila výše, je potřeba výrazné revize kokálních sinic, v současné situaci nejsem schopná říci, zda se jedná skutečně o *Synechocystis* a ponechávám proto pojmenování těchto izolátů Izoláty AH 5 a AH 35.

4. **Fylogenetická analýza – Unidentified z předchozí studie**

Sekvence, které byly v předchozí studii vybrány za reprezentativní pro skupiny Unidentified A – F, jsem použila i ve své fylogenetické analýze a došla k tomu, že skupiny Unidentified A, B, C, E a F nejsem schopná určit do rodu ani s použitím většího souboru sekvencí, a je proto potřeba sekvencí více rodů a druhů sinic. Nicméně sekvence z Unidentified A a B leží na větvi podpořené 100% s rody *Tychonema*, *Microcoleus* a *Phormidium*. Unidentified C leží na větvi podpořené 99% s rodem *Leptolyngbya* a mým izolátem pojmenovaných *Plectonema* (více viz výše), dá se tedy předpokládat, že se jedná o *Leptolyngbya*. Unidentified E a F leží opravdu bez podpory a blízké sekvence s rodovým jménem. Skupinu Unidentified D charakterizují jako *Leptolyngbya*, protože leží na větvi s bootstrapem 100% s mým izolátem AH 10 *Leptolyngbya*.

5. **OTUs k určení kalcifikace**

Na základě výskytu jednotlivých OTUs mohu uvažovat, které sinice by mohly mít vliv na kalcifikaci, a to tak, že tyto OTUs se nebudou vyskytovat na WB 1, kde neprobíhá kalcifikace. První odběrové místo, kde je kalcifikace pozorovatelná, je WB 2. Budu tedy vycházet z toho, že pokud se OTU objeví pouze na odběrových místech WB 2 – 5, je možné, že by tyto sinice mohly mít na kalcifikaci vliv. Pokud objevím v klastru s daným, možná kalcifikujícím OTU sinici, kde je uvedeno rodové jméno, pak se v tabulce objeví i dané rodové jméno. Jelikož Kathrin I. Mohr klonovala směsné vzorky, které smíchala ze všech odběrových míst dohromady, není možné vycházet z jejích sekvencí. Proto OTUs, která obsahují pouze její klony vynechám.

| OTU | Odběrové místo | | | Podpora větší než 80% | Rod v klastru | Kalcifikace |
|-----|----------------|---------|---------|-----------------------|---|-------------|
| | Březen | Květen | Srpen | | | |
| 1 | 3, 4, 5 | 1, 2, 3 | 1, 4 | ano | x | ne |
| 3 | 3, 4 | 1, 3, 5 | 1, 2, 5 | ne | x | ne |
| 6 | | 1 | | ne | x | ne |
| 8 | | 1 | 1 | ne | x | ne |
| 10 | 5 | | | ano | Microcoleus | ano |
| 11 | 5 | 1, 2 | 4 | ano | Pseudanabaena, Leptolyngbya | ne |
| 12 | 3 | 1 | 1 | ne | x | ne |
| 14 | | 1 | | ne | x | ne |
| 15 | | 2 | 1,2 | ano | Tolypothrix, Coleodesmium, Nostoc | ne |
| 16 | 5 | | | ano | Nostoc | ano |
| 17 | 3, 4 | 3 | 2, 3 | ano | Leptolyngbya | ano |
| 18 | 4, 5 | | 1, 4, 5 | ne | Limnothrix, Pseudanabaena | ne |
| 19 | 5 | | | ne | x | ano |
| 20 | | 4 | 1, 5 | ne | Chamaesiphon | ne |
| 22 | 5 | | 5 | ano | Synechocystis | ano |
| 24 | 5 | | | ne | Synechocystis | ano |
| 26 | | | 1 | ne | x | ne |
| 27 | 5 | 1 | 1, 2 | ne | Leptolyngbya, Pseudanabaena, Phormidium | ne |
| 28 | | 2 | | ne | Aphanocapsa, Acaryochloris | ano |
| 29 | | | 1 | ne | Phormidium | ne |
| 30 | | 1 | | ne | x | ne |
| 31 | 4, 5 | | | ne | Aphanothece, Synechococcus, Cyanobium | ano |
| 32 | | 1 | 2, 5 | ne | Pseudanabaena | ne |
| 35 | 4, 5 | 2, 3, 5 | 2, 4, 5 | ne | x | ano |
| 36 | 4 | | | ne | x | ano |
| 37 | 3, 5 | 2, 4 | 3, 5 | ano | Leptolyngbya | ano |
| 38 | 5 | 1, 2, 3 | 1, 2, 3 | ne | Plectonema, Leptolyngbya | ne |
| 39 | | 5 | 4 | ne | x | ano |
| 40 | | | 2 | ano | x | ano |
| 41 | | 1 | | ano | x | ne |

Tab.č. 17 Tabulka znázorňující sinice, které by mohly kalcifikovat. První sloupec značí číslo OTU, druhý, třetí a čtvrtý odběrová místa, buňky zabarvené zeleně značí místa, kde se vyskytují jen ta odběrová místa, kde probíhá kalcifikace, pátý sloupec ukazuje, zda je klastr, kde se nachází dané OTUs, podpořen dostatečnou bootstrapovou podporou. 6. sloupec značí rody, které se nacházely mezi jednotlivými sekvencemi daných OTUs. Ty rody, které jsou označené levandulovou barvou mohou reálně kalcifikovat, 7. sloupec značí, zda je, podle odběrového místa, možné, aby sinice kalcifikovala. Světle zeleně označena odpověď ano.

Rod *Microcoleus* se nachází ve stromatolitech a bývá považován za sinici, která je schopná kalcifikace (ARP ET AL., 2010). Rod *Leptolyngbya* se nachází jak ve sladkovodních,

tak mořských stromatolitech (BURNS & NEILAN, 2004) a je tedy možné, že určité druhy by na kalcifikaci mohly mít vliv (mají slizovitou pochvu). Rod *Synechocystis*, neboli sekvence blízké mým izolátům AH 5 a AH 35, se nacházely pouze na WB 5, pozorovala jsem slizovité kolonie, takže díky produkci EPS by na vznik stromatolitu vliv mít mohly. Co se týče rodů *Aphanothece*, *Synechococcus* a *Cyanobium*, u rodu *Synechococcus* byla kalcifikace skutečně pozorována, proto je i v tomto případě možné, že sinice z této skupiny se na kalcifikaci mohou podílet. Z možnosti kalcifikovat jsem vyloučila sinici *Nostoc*, protože jeden z mých izolátů pochází i z WB 1. Co se týče rodů *Aphanocapsa* a *Acaryochloris*, oba tvoří slizovité obaly, možnost, že se na kalcifikaci podílejí, existuje, nicméně jediný klon z této větve pochází z WB2, které ještě není silně kalcifikované, na jiných místech se nenachází a o kalcifikaci těchto rodů jsem se nedočetla.

Závěr

Jak vyplývá z této diplomové práce, diverzita sinic ve stromatolitech a na stromatolitech je velká, a je potřeba dalšího zkoumání, aby byla odhalena kompletně. K tomu, abychom mohli říci, které sinice opravdu hrají roli v kalcifikaci, je potřeba dalších studií, které se právě na kalcifikaci sinic zaměří. Nicméně se dá předpokládat, že by tuto roli mohly hrát různé druhy rodů *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Leptolyngbya*, *Phormidium/Microcoleus*. Je možné, že svou roli bude hrát i rod *Synechocystis*.

Dále je potřeba zaměřit se na fylogenetiku sinic a najít nejlepší způsob, jak tyto organismy členit a zjistit, nakolik může morfologie odpovídat fylogenetickému rozdělení, zda existuje alespoň nějaký morfologický znak, který by sinice jednoznačně vymezoval v souladu s fylogenetikou. K tomu bude jistě potřeba sekvenování dalších úseků sinicového genomu.

Nicméně tato diplomová práce objasňuje morfotypy/rody, které se ve sladkovodních tufa stromatolitu v potoku Westerhöfer vyskytují, s použitím metod, které byly v podobných studiích využity.

Praha, 3.5.2011

Alena Hodačová

Použitá literatura

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J.** (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:3, 403-410
- ANAGNOSTIDIS, K. AND KOMÁREK, J.** (1985) Modern approach to the classification system of the Cyanophytes 1: Introduction - *Archiv für Hydrobiologie* 71, *Algological Studies*, 38/39, 291-302
- ANAGNOSTIDIS, K. AND KOMÁREK, J.** (2005) Cyanoprokaryota – 2. Teil/ 2nd Part: Oscillatoriales. – In: Büdel, B., Krienitz, L. Gärtner, G. and Schagerl, M. (eds.), *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/2, *Elsevier/Spektrum*, Heidelberg, 759 pp.
- ARP, G., BISSETT, A., BRINKMANN, N., COUSIN, S., DE BEER, D., FRIEDL, T., MOHR, K.I., NEU, T.R., REIMER, A., SHIRAIISHI, F., STACKEBRANDT, E., ZIPPEL, B.** (2010) Tufa-forming biofilms of German karstwater streams: microorganisms, exopolymers, hydrochemistry and calcification, *Geological Society, London, Special Publications*, 336, 83-118
- ARP, G., WEDEMEYER, N., REITNER, J.** (2001) Fluvial tufa formation in the hardwater creek Deinschwanger Bach (Franconian Alb, Germany), *Facies*, 44, 1-22.
- AWRAMIK, S.M. AND MARGULIS, L.** in Walter, M. R. (1976) *Stromatolites* (ed. Walter, M. R.) 1–3, *Elsevier*, Amsterdam
- AWRAMIK, S.M. AND RIDING, R.** (1988) Role of algal eukaryotes in subtidal columnar stromatolite formation. *PNAS*, 85, 1327–1329
- BLACK, M.** (1933) The algal sedimentation of Andros Island Bahamas, *Philosophical Transaction of the Royal Society, London, Series B: Biological Sciences*, 222, 165–192
- BURNS, B.P. AND NEILAN, B.A.** (2004) The living rocks of Shark Bay, *Australian Microbiology*, 25:1, 18-19
- BURNS, B.P., GOH, F., ALLEN, M., NEILAN, B.A.** (2004) Microbial diversity of extant stromatolites in the hypersaline marine environment of Shark Bay, Australia, *Environmental Microbiology*, 6, 1096-1101
- CASAMATTA, D.A., JOHANSEN, J.R., VIS, M.L., BROADWATER, S.T.** (2005) Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria), *Journal of Phycology*, 41:2, 421-438
- CASTENHOLZ, R.W.** (1988) Culturing methods for Cyanobacteria. In: L. Packer and A.N. Glazer, eds., *Cyanobacteria. Methods of Enzymology*, 167, 68-93
- CASTENHOLZ, R. W.** (1992) Species usage, concept, and evolution in the cyanobacteria (blue-green algae), *Journal of Phycology*, 28, 737–745.

- CAUDALES, R., WELLS, J.M., BUTTERFIELD, J.E.** (2000) Cellular fatty acid composition of cyanobacteria assigned to subsection II, order Pleurocapsales, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1029-1034
- CHARPY, L., PALINSKA, K.A., CASARETO, B., LANGLADE, M.J., SUZUKI, Y., ABED, R.M.M., GOLUBIC, S.** (2010) Dinitrogen-Fixing Cyanobacteria in Microbial Mats of Two Shallow Coral Reef Ecosystems, *Microbial Ecology*, 59:1, 174-186
- COHEN, Y., JØRGENSEN, B.B., PADAN, E., SHILO, M.** (1975), Sulphide-dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*, *Nature*, 257, 489-492
- COMTE, K., SABACKÁ, M., CARRÉ-MLOUKA, A., ELSTER, J., KOMÁREK, J.** (2007) Relationship between the Arctic and the Antarctic cyanobacteria; three Phormidium-like strains evaluated by a polyphasic approach, *FEMS Microbial Ecology*, 59:2, 366-376
- COTTRELL, M.T. AND KIRCHMAN, D.L.** (2000) Community Composition of Marine Bacterioplankton Determined by 16S rRNA Gene Clone Libraries and Fluorescence In Situ Hybridization, *Applied and Environmental Microbiology*, 66:12, 5116-5122
- COUSIN, S. AND STACKEBRANDT, E.** (2010) Spatial Bacterial Diversity in a Recent Freshwater Tufa Deposit, *Geomicrobiology Journal*, 27, 275-291
- DÉFARGE, C., TRICHET, J., COUTE, A.** (1994a) On the appearance of cyanobacterial calcification in modern stromatolites, *Sedimentary Geology*, 94, 11-19
- DÉFARGE, C., TRICHET, J., MAURIN, A., HUCHER, M.** (1994b) On the appearance of cyanobacterial calcification in modern stromatolites, *Sedimentary Geology*, 89, 9-23
- DELWICHE, C.F., KUHSEL, M., PALMER, J.D.** (1995) Phylogenetic analysis of *tufA* sequences indicates a cyanobacterial origin of all plastids, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 4:2, 110-128.
- DITTRICH, M. AND SIBLER, S.** (2010) Calcium carbonate precipitation by cyanobacterial polysaccharides (In: Pedley, H.M. & Rogerson, M. (eds) *Tufas and Speleotherms: Unravelling the Microbial and Physical Controls*), *Geological Society, Special Publications*, 336, 51-63
- DOOLITTLE, W.F. AND PAPKE, R.T.** (2006) Genomics and the bacterial species problem, *Genome Biology*, 7:9:116
- DORADOR, CH., VILA, I., IMHOFF, J.F., WITZEL, K-P.** (2008) Cyanobacterial diversity in Salar de Huasco, a high altitude saline wetland in northern Chile: an example of geographical dispersion?, *FEMS Microbiology Ecology*, 64:3, 419-432
- DOUGLAS, S.E. AND TURNER, S.** (1991) Molecular evidence for the origin of plastids from a Cyanobacterium-like ancestor, *Journal of Molecular Evolution*, 33:3, 267-273.

- DUPRAZ, C. AND VISSCHER, P.T.** (2005) Microbial lithification in marine stromatolites and hypersaline mats, *Trends in Microbiology*, 13:9, 429-438.
- EGGLESTON, J.R. AND DEAN, W.E.** (1976) Freshwater stromatolitic bioherms in Green Lake, New York. In: *Stromatolites* (Ed. by M.R. Walter), *Developments in Sedimentology*, 20, *Elsevier*, Amsterdam, 479-488
- EHRENREICH, A. AND WIDDEL, F.** (1994) Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism, *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4517-4526.
- FOSTER, J.S., GREEN, S.J., AHRENDT, S.R., GOLUBIC, S., REID, R.P., HETHERINGTON, K.L., BEBOUT, L.** (2009) Molecular and morphological characterization of cyanobacterial diversity in the stromatolites of Highborne Cay, Bahamas, *The ISME Journal*, 1-15
- FUJISHIRO, T., OGAWA, T., MATSUOKA, M., NAGAHAMA, K., TAKESHIMA, Y., HAGIWARA, H.** (2004) Establishment of a Pure Culture of the Hitherto Uncultured Unicellular Cyanobacterium *Aphanothece sacrum*, and Phylogenetic Position of the Organism, *Applied and Environmental Microbiology*, 70:6, 3338-3345.
- GARCIA-PICHEL, F. AND CASTENHOLZ, R.W.** (1991) Characterisation and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *Journal of Phycology*, 27, 395-409
- GARCIA-PICHEL, F., LÓPEZ-CORTÉS, A., NÜBEL, U.** (2001) Phylogenetic and Morphological Diversity of Cyanobacteria in Soil Desert Crusts from the Colorado Plateau, *Applied and Environmental Microbiology*, 67:4, 1902-1910
- GARCIA-PICHEL, F., NÜBEL, U., MUYZER, G.** (1998) The phylogeny of unicellular, extremely halotolerant cyanobacteria, *Archives of microbiology*, 169, 469-482
- GEITLER, L.** (1932) Cyanophyceae – In: Rabenhorst's Kryptog.-Fl., 14, 1196 pp., Leipzig
- GOLUBIC, S.** (1973) The relationship between blue-green algae and carbonate deposits. In: Carr, N.G., Whitton, B.A. (Eds.), *The Biology of Blue-Green Algae*, *Botanical Monographs* 19, Blackwell, Oxford, 434-472
- GOLUBIC, S.** (1976) Organisms that built stromatolites. In: *Stromatolites* (Ed. by M.R. Walter), *Developments in Sedimentology*, 20, 113-126, *Elsevier*, Amsterdam.
- GUGGER, M. F. & HOFFMANN, L.** (2004) Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales), *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*, 54, 349–357.
- HENSON, B.J., HESSELBROCK, S.M., WATSON, L.E., BARNUM, S.R.** (2004) Molecular phylogeny of the heterocystous cyanobacteria (subsection IV and V) based on *nifD*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 493-497

- HEPPERLE, D.** (2004) SeqAssem©. A sequence analysis tool, contig assembler and trace data visualisation tool for molecular sequences. http://sequentix.de/software_seqassem.php
- HÖFLE, M.G., FLAVIER, S., CHRISTEN, R., BÖTEL, J., LABRENZ, M., BRETTAR, I.** (2005) Retrieval of nearly complete 16S rRNA gene sequences from environmental DNA following 16S rRNA-based community fingerprinting, *Environmental Microbiology*, 7:5, 670-675
- ISHIDA, T., WATANABE, M.M., SUGIYANA, J., YOKOTA, A.** (2001) Evidence for polyphyletic origin of the members of the orders of Oscillatoriales and Pleurocapsales as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 201:1, 78-82
- JACOBSON, R.L. AND USDOWSKI, E.** (1975) Geochemical controls on a calcite precipitating spring. *Contributions to Mineralogy and Petrology*, 51, 65–74.
- JUNGBLUT, A-D., HAWES, I., MOUNTFORT, D., HITZFELD, B., DIETRICH, D.R., BURNS, B.P., NEILAN, B.A.** (2005) Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica, *Environmental Microbiology*, 7:4, 519-529
- KALINA, T. & VÁŇA, J.** (2005) Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii, Univerzita Karlova v Praze, *Karolinum*, 606 stran
- KALKOVSKY, E.** (1908) Oolith und Stromatolith im norddeutschen Buntsandstein. *Zeitschrift der Deutschen Geologischen Gesellschaft*, 60, 68-125, 4-11.
- KEELING, P.** (2004) A Brief History of Plastids and their Hosts, *Protist*, 155, 3-7
- KOMÁREK, J.** (2005) The modern classification of cyanoprokaryotes (Cyanobacteria), *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 3:3
- 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
- KOMÁREK, J. AND ANAGNOSTIDIS, K.** (1989) Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 – Nostocales, *Algological studies*, 56, 247-345
- KOMÁREK, J. AND ANAGNOSTIDIS, K.** (1990) Modern approach to the classification system of Cyanophytes 5 – Stigonematales, *Algological studies*, 59, 1-73
- KOMÁREK, J. AND ANAGNOSTIDIS, K.** (1998) Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales. – In: Ettl, H., Gärtner, G., Heinig, H. and Mollenhauer, D. eds., Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1, *Gustav Fischer*, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 548 pp.
- KOMÁREK, J. AND KOMÁRKOVÁ-LEGNEROVÁ, J.** (1992): Variability of some planktic gomphosphaerioid cyanoprokaryotes in northern lakes. – *Nordic Journal of Botany*, 12, 513-524

- KOMÁREK, J., CEPÁK, V., KAŠTOVSKÝ, J., SULEK, J.** (2004) What are the cyanobacterial genera *Cyanothece* and *Cyanobacterium*? Contribution to the combined molecular and phenotype taxonomic evaluation of cyanobacterial diversity, *Algological Studies*, 113, 1-36
- KRUMBEIN, W.E.** (1983) Stromatolites – the challenge of term in space and time, *Precambrian Research*, 20, 493-531
- LEE, W.J., BAE, K.S.** (2001) The phylogenetic relationship of several oscillatorian cyanobacteria, forming blooms at daecheong reservoirs, based on partial 16S rRNA gene sequences, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11:3, 504-507.
- LEE, W.J., BAE, K.S.** (2002) Inferring the molecular phylogeny of chroococcalian strains (Blue-green algae/Cyanophyta) from the Geumgang River, based on partial sequences of 16S rRNA gene, *Journal of Microbiology*, 40:4, 335-339.
- LOWE, D.R.** (1980) Stromatolites 3,400-Myr old from the Archean of Western Australia, *Nature*, 284, 441-443
- MANTER, D.K., DELGADO, J.A., HOLM, D.G., STONG, R.A.** (2010) Pyrosequencing Reveals a Highly Diverse and Cultivar-Specific Bacterial Endophyte Community in Potato Roots, *Microbial Ecology*, 60:1, 157-166
- MASON, T.R. AND VON BRUNN, V.** (1977) 3-Gyr-old stromatolites from South Africa, *Nature*, 266, 47–49
- MAUSETH, J.D.** (2009) Botany: an introduction to plant biology, 4th Edition, *Jones and Bartlett Publishers*, Sudbury, Massachusetts, 624 p.p.
- MERZ-PREIB, M., AND RIDING, R.** (1999) Cyanobacterial tufa calcification in two freshwater streams: ambient environment, chemical thresholds and biological processes, *Sedimentary Geology*, 126, 103-124
- MILLER, S. R., AUGUSTINE, S., OLSON, T. L., BLANKENSHIP, R. E., SELKER, J., WOOD, A. M.** (2005) Discovery of a free-living chlorophyll d-producing cyanobacterium with a hybrid proteobacterial/cyanobacterial small-subunit rRNA gene, *PNAS*, 102, 850–855.
- MOJZSIS, S.J., ARRHENIUS, G., MCKEEGAN, K.D., HARRISON, T.M., NUTMAN, A.P., AND FRIEND, C.R.L.** (1996) Evidence for life on Earth by 3800 million years ago, *Nature*, 384 (6604), 55-59
- MULLIS, T.D., BRITSCHGI, T.B., KREST, R.L., GIOVANNONI, S.J.** (1995) Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities, *Limnology and Oceanography*, 40:1, 148-158
- NICHOLAS, K.B., NICHOLAS JR., H.B.** (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments, www.psc.edu/biomed/genedoc

- PENTECOST, A. AND FRANKE, U.** (2010) Photosynthesis and calcification of the stromatolithic freshwater cyanobacterium *Rivularia*, *European Journal of Phycology*, 45:4, 345-353
- PERKERSON, R.B., PERKERSON, E.A., CASAMATTA, D.A.** (2010) Phylogenetic examination of the cyanobacterial genera *Geitlerinema* and *Limnothrix* (Pseudanabaenaceae) using 16S rDNA gene sequence data, *Algological Studies*, 134, 1-16
- PITOIS, F., JIGOREL, A., BERTRU, G.** (2001) Colonization Dynamics of an Encrusting Cyanobacterial Mat in a Hardwater River (Eaulne, France), *Geomicrobiology Journal*, 18, 139-155
- RAI, N.A., BERGMAN, B., RASMUSSEN, U.** (2002) Cyanobacteria in symbiosis, *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands, 355 p.p.
- RAJANIEMI, P., HROUZEK, P., KASTOVSKA, K., WILLIAME, R., RENTALA, A., HOFFMANN, L., KOMÁREK, J., SIVONEN, K.** (2005) Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:1, 11-26
- REID, R.P. AND BROWNE, K.M.** (1991) Intertidal stromatolites in a fringing Holocene reef complex, *Bahamas Geology*, 19:1, 15-18
- REID, R.P., VISSCHER, P.T., DECHO, A.W., STOLZ, J.F., BEBOUT, B.M., DUPRAZ, C., MACINTYRE, I.G., PAERL, H.W., PINCKNEY, J.L., PRUFERT-BEBOUT, L., STEPPE, T.F., DESMARAIS, D.J.** (2000) The role of microbes in accretion, lamination and early lithification of modern marine stromatolites, *Nature*, 406, 989-992
- RIDING, R.** (1991) Calcified cyanobacteria, In: Riding, R. (Ed.), *Calcareous Algae and Stromatolites*, Springer, Berlin, 55-87
- RIDING, R.** (2000) Microbial carbonates: the geological record of calcified bacterial-algal mats and biofilms, *Sedimentology*, 47, 179-214
- RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J.B., HERDMAN, M., STANIER, R.Y.** (1979) Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria, *Journal of General Microbiology*, 111, 1-61
- ROBERTSON, B.R., TEZUKA, N., WATANABE, M.M.** (2001) Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 861-871
- RUDI, K., SKULBERG, O.M., JAKOBSEN, K.S.** (1998) Evolution of Cyanobacteria by Exchange of Genetic Material among Phyletically Related Strains, *Journal of Bacteriology*, 180:13, 3453-3461.
- SEGAWA, T. AND TAKEUCHI, N.** (2010) Cyanobacterial communities on Qiyi glacier, Qilian Shan, China, *Annals of Glaciology*, 51:56, 135-144

SHIRAISHI, F. (2008) Microbial metabolisms and calcification in freshwater biofilms, dizertační práce, 126 stran

SHIRAISHI, F., BISSETT A., DE BEER, D., REIMER, A., ARP, G. (2008) Photosynthesis, respiration and exopolymer calcium-binding in biofilm calcification (Westerhöfer and Deinschwanger Creek, Germany), *Geomicrobiology Journal*, 25, 83-94.

SCHIRRMEISTER, B.E., ANTONELLI, A., BAGHERI, H.C. (2011) The origin of multicellularity in cyanobacteria, *BMC Evolutionary Biology*, 11:45

SCHLOSS, P.D., ET AL. (2009) Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities, *Applied and Environmental Microbiology*, 75:23, 7537-7541

SCHOPF, J.W. AND WALTER, M.R. (1982): Origin and early evolution of cyanobacteria: the geological evidence, in N.G. Carr and B.A. Whitton (eds.) *The Biology of cyanobacteria*, Blackwell, Oxford, pp. 543-564

SIHVONEN, L.M., LYRA, C., FEWER, D.P., RAJANIEMI-WACKLIN, P., LEHTIMÄKI, J.M., WAHLSTEN, M., SIVONEN, K. (2007) Strains of the cyanobacterial genera *Calothrix* and *Rivularia* isolated from the Baltic Sea display cryptic diversity and are distantly related to *Gloeotrichia* and *Tolypothrix*, *FEMS Microbial Ecology*, 61:1, 74-78

STACKEBRAND, E. AND GOEBEL, B.M. (1994) Taxonomic Note: a for place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in Bacteriology, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44, 846-849

STAL, J.L. (1994) Microbial mats in coastal environments. In: Stal, L. J. , Caumette, P. (eds.). *Microbial mats. Structure, Development and Environmental Significance*. NTO ASI Series 35, 21-32, Springer Verlag, Heidelberg.

STAL, J.L. (2000) Cyanobacterial Mats and Stromatolites. In Whitton B.A. and Potts M. (eds) *The Ecology of Cyanobacteria. Their Diversity in Space and Time*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 61-120

STALEY, J.T. (2006) The bacterial species dilemma and the genomic-phylogenetic species concept, *Philosophical Transaction of the Royal Society, London, B*, 361, 1899-1909

STAMATAKIS, A., HOOVER, P., ROUGEMONT, J. (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers, *Systematic Biology*, 57:5, 758-771

STANIER, R.Y., KUNISAWA R., MANDEL, M., COHEN-BAZIRE, G. (1971) Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Chroococcales), *Bacteriological Reviews*, 35:2, 171-205

STANIER, R.Y., SISTROM, W.R., HANSEN, T.A., WHITTON, B.A., CASTENHOLZ, R.W., PFENNIG, N., GORLENKO, V.N., KONDRATIEVA, E.N., EIMHJELLEN, K.E.,

- WHITTENBURY, R., GHERNA, R.L., TRUPER, H.G.** (1978) Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria *International Journal of Systematic Bacteriology*, 28, 335-336.
- TURNER, S., PRYER, K.M., MIAO, V.P.W., PALMER, J.D.** (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46:4, 327-338.
- TURNER, S., HUANG, T-C., CHAW, S-M.** (2001) Molecular phylogeny of nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42, 181-186
- USDOWSKI, E., HOEFS, J., MENSCHEL, G.** (1979) Relationship between ^{13}C and ^{18}O fractionation and changes in major element composition in a Recent calcite-depositing spring – A model of chemical variations with inorganic CaCO_3 precipitation. *Earth and Planetary Science Letters*, 42, 267–276.
- VALÉRIO, E., CHAMBEL, L., PAULINO, S., FARIA, N., PEREIRA, P., TENREIRO, R.** (2009) Molecular identification, typing and traceability of cyanobacteria from freshwater reservoirs, *Microbiology*, 155, 642-656
- VAN GEMERDEN, H.** (1993) Microbial mats: A joint venture, *Marine Geology*, 113, 3-25
- VAN LIERE, L., GROOT, G.J., MUR, L.R.** (1979) Pigment variation with irradiance in *Oscillatoria agardhii* gomont in nitrogen (nitrate)-limited chemostat cultures, *FEMS Microbiology Letters*, 6, 337–340
- VISSCHER, P.T., REID, R.P., BEBOUT, B.M., HOEFT, S.E., MACINTYRE, I.G., THOMPSON JR., J.A.** (1998) Formation of lithified micritic laminae in modern marine stromatolites (Bahamas): The role of sulfur cycling, *American Mineralogist*, 83, 1482-1493
- VISSCHER, P.T., REID, R.P., BEBOUT, B.M.** (2000) Microscale observations of sulfate reduction: Correlation of microbial activity with lithified micritic laminae in modern marine stromatolites, *Geology*, 28:10, 919-922
- WALTER, M. R.** (1976) Stromatolites (ed. Walter, M. R.) 1–3, *Elsevier*, Amsterdam, 790 p.p.
- WARD, D.M., FERRIS, M.J., NOLD, S.C., BATESON, M.M.** (1998) A Natural View of Microbial Biodiversity within Hot Spring Cyanobacterial Mat Communities, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62:4, 1353–1370
- WHITTON, B.A. AND POTTS, M.** (2000) The Ecology of Cyanobacteria – Their Diversity in Time and Space, *Kluwer Academic Publishers*, 673 p.p.
- WIDDEL, F., SCHNELL, S., HEISING, S., EHRENREICH, A., ASSMUS, B., SCHINK, B.** (1993) Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria, *Nature*, 362, 834–836

- WILKINSON, D.E., JEANICKE, T., COWAN, D.A.** (2002) Efficient molecular cloning of environmental DNA from geothermal sediments, *Biotechnology Letters*, 24:2, 155-161
- WILMOTTE, A.** (1994) Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria. In: Bryant, D. A. (ed.) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, *Kluwer*, Dordrecht, 1-25.
- WILMOTTE, A., VAN DER AUWERA, G., DE WACHTER, R.** (1993) Structure of the 16 S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium *Chlorogloeopsis* HTF ('*Mastigocladus laminosus* HTF') strain PCC7518, and phylogenetic analysis, *FEBS Letters*, 31:1-2, 96-100
- WONG, F.K.Y., LACAP, D.C., LAU, MAGGIE C.Y., AITCHISON, J.C., COWAN, D., POINTING, S.B.** (2010) Hypolithic Microbial Community of Quartz Pavement in the High-Altitude Tundra of Central Tibet, *Microbial ecology*, 60, 730-739
- ZWART G., CRUMP, B.C., AGTERVELD, M.P.K.V., HAGEN, F., HAN, S.K.** (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers, *Aquatic Microbial Ecology*, 28:2, 141-155.

Přílohy



Příloha č. 1 Mapa Německa, šipka ukazuje na pozici potoku Westerhöfer. Znáznorněno město Göttingen.

Precipitation of sequencing products in 1.5 ml tubes

- Put 10 μ l HPLC H₂O and 30 μ l EtOH (100%) for each sequencing approach in 1.5 ml Eppendorf tubes.
- Add 10 μ l of sequencing product.
- Vortex the samples and incubate each approach for 60 min at room temperature.
- Centrifuge the samples for 20 min at 13000 rpm at room temperature (keep tube direction in mind, DNA pellet is mostly not visible).
- Remove the supernatant completely with a pipette
- Wash the DNA by addition of 125 μ l EtOH (70%) to each sample.
- Centrifuge the samples for 10 min at 13000 rpm at room temperature.
- Remove the supernatant completely with a pipette.
- Dry the DNA pellet for 1 min at 95°C in pre-heated thermoblock. Control that the samples are really dry (no residual EtOH should be visible!). If there is residual alcohol dry for some further seconds...
- For sample resuspension add 12 μ l HIDI (highly deionized formamide) to each sample.
- Heat each sample for 2 min at 95 °C in the pre-heated thermo block for denaturation. Cool down on ice for at least 30 min (for low signalling: up to 2 hours for a better resuspension)
- Add short centrifugation step before you store the samples at 4°C in the refrigerator.
- (10 μ l of the sample will be transferred to a 96-well-plate and used for electrophoresis).

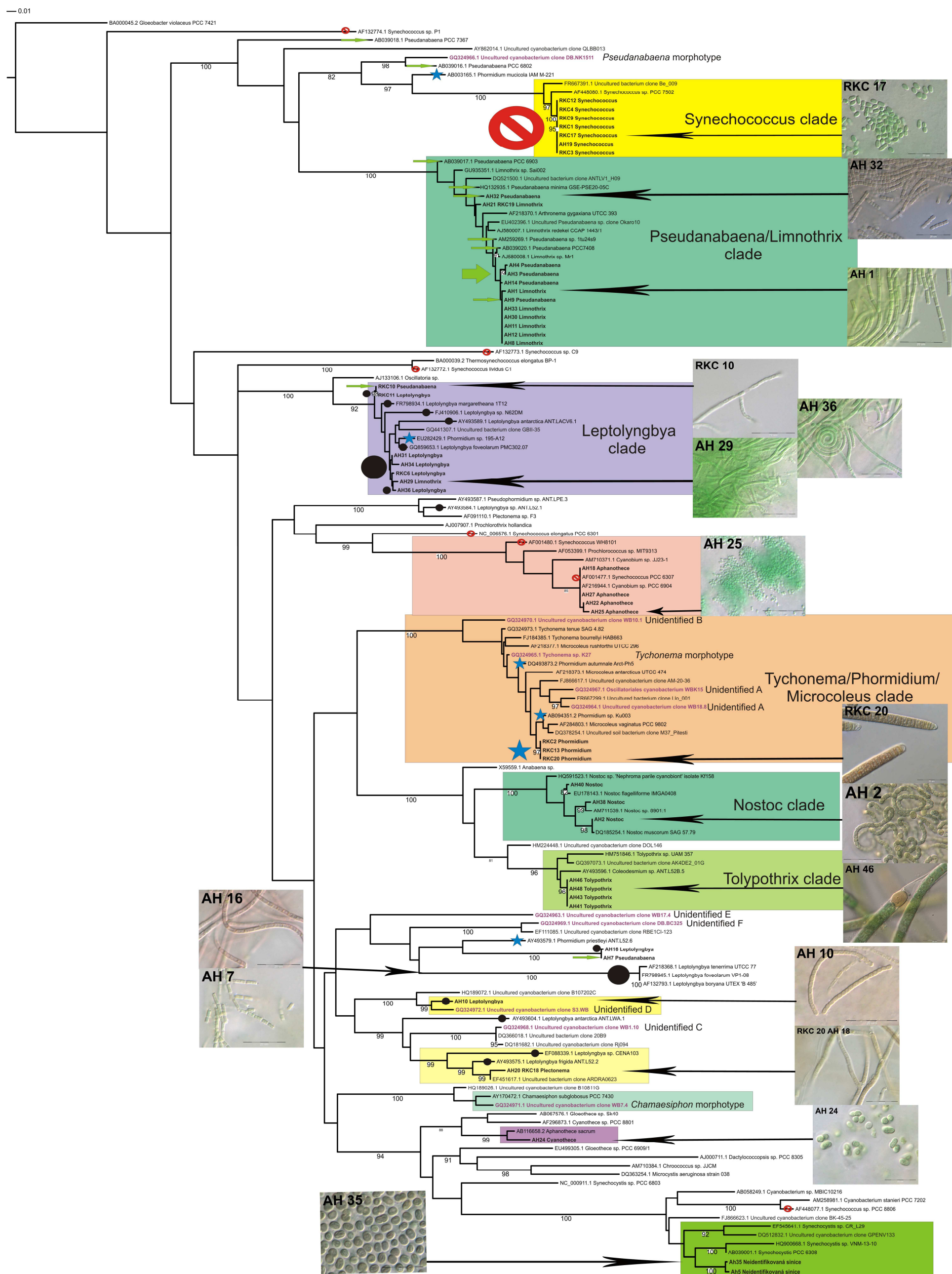
Příloha č. 2 Postup při přesrážení DNA před samotnou sekvenací.

| Izolát | Morfologie | I. nejbližší příbuzná sekvence z GenBank | Accession n° | % ID | I. nejbližší příbuzná sekvence z GenBank s rodovým jménem | Accession n° | % ID |
|--------------|-------------------------|---|--------------|------|---|--------------|------|
| AH 18 | Aphanothece | Cyanobium sp. LT147S01 partial 16S | FM177491.1 | 99 | | | |
| AH 27 | Aphanothece | Cyanobium sp. LT147S01 partial 16S | FM177491.1 | 99 | | | |
| AH 22 | Aphanothece | Cyanobium sp. LT147S01 partial 16S | FM177491.1 | 99 | | | |
| AH 25 | Aphanothece | Cyanobium sp. LT147S01 partial 16S | FM177491.1 | 99 | | | |
| AH 24 | Cyanothece | Aphanothece sacrum genes for 16S | AB116658.2 | 98 | | | |
| AH 31 | Leptolyngbya | Leptolyngbya sp. OBB19S12 partial 16S | AJ639895.1 | 99 | | | |
| AH 34 | Leptolyngbya | Leptolyngbya sp. OBB19S12 partial 16S | AJ639895.1 | 99 | | | |
| RKC 6 | Leptolyngbya | Leptolyngbya sp. OBB19S12 partial 16S | AJ639895.1 | 99 | | | |
| RKC 11 | Leptolyngbya | Leptolyngbya sp. OBB19S12 partial 16S | AJ639895.1 | 99 | | | |
| AH 36 | Leptolyngbya | Leptolyngbya sp. OBB19S12 partial 16S | AJ639895.1 | 99 | | | |
| AH 10 | Leptolyngbya | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone GBe_015 | FR667488.1 | 98 | Pseudanabaena tremula UICC 471 16S | AF218371.1 | 94 |
| AH 16 | Leptolyngbya | Uncultured bacterium clone 2SC37 16S | EU340177.1 | 98 | Phormidium pristesleyi ANT.L52.6 16S | AY493579.1 | 93 |
| AH 33 | Limnothrix | Uncultured cyanobacterium partial 16S isolate cln. ITU39C78 | AM259267.1 | 100 | Pseudanabaena sp. Sai012 16S | GU935358.1 | 99 |
| AH 30 | Limnothrix | Uncultured cyanobacterium partial 16S isolate cln. ITU39C78 | AM259267.1 | 100 | Pseudanabaena sp. Sai012 16S | GU935358.1 | 99 |
| AH 11 | Limnothrix | Uncultured cyanobacterium partial 16S isolate cln. ITU39C78 | AM259267.1 | 100 | Pseudanabaena sp. Sai012 16S | GU935358.1 | 99 |
| AH 8 | Limnothrix | Uncultured cyanobacterium partial 16S isolate cln. ITU39C78 | AM259267.1 | 100 | Pseudanabaena sp. Sai012 16S | GU935358.1 | 99 |
| AH 12 | Limnothrix | Uncultured cyanobacterium partial 16S isolate cln. ITU39C78 | AM259267.1 | 100 | Pseudanabaena sp. Sai012 16S | GU935358.1 | 99 |
| AH 21/RKC 21 | Limnothrix | Uncultured Pseudanabaena sp. clone Okaro10 16S | EU402396.1 | 99 | Pseudanabaena sp. Itu2469 partial 16S | AM259269.1 | 99 |
| AH 1 | Limnothrix | Uncultured cyanobacterium partial 16S isolate cln. ITU39C78 | AM259267.1 | 99 | Pseudanabaena sp. Sai012 16S | GU935358.1 | 99 |
| AH 29 | Limnothrix | Leptolyngbya sp. OBB19S12 partial 16S | AJ639895.1 | 99 | | | |
| AH 5 | Neidentifikovaná sinice | Uncultured bacterium clone SINH908 16S | HM128346.1 | 97 | Synechocystis PCC6308 gene for 16S | AB039001.1 | 97 |
| AH 35 | Neidentifikovaná sinice | Uncultured bacterium clone SINH908 16S | HM128346.1 | 97 | Synechocystis PCC6308 gene for 16S | AB039001.1 | 96 |
| AH 40 | Nostoc | Nostoc flagelliforme IMG40408 16S | EU178143.1 | 99 | | | |
| AH 38 | Nostoc | Nostoc sp. SKJ4 16S | EU022715.1 | 99 | | | |
| AH 2 | Nostoc | Nostoc muscorum SAG 57.79 16S | DQ185254.1 | 99 | | | |
| RKC 2 | Phormidium | Phormidium autumnale SAG 35.90 16S | EF654081.1 | 98 | | | |
| RKC 20 | Phormidium | Phormidium autumnale SAG 35.90 16S | EF654081.1 | 98 | | | |
| RKC 13 | Phormidium | Phormidium autumnale SAG 35.90 16S | EF654081.1 | 98 | | | |
| AH 20/RKC 18 | Plectonema | Leptolyngbya frigida ANT.L52.2 16S | AY493575.1 | 97 | | | |
| AH 3 | Pseudanabaena | Uncultured cyanobacterium partial 16S isolate cln. ITU39C78 | AM259267.1 | 99 | Pseudanabaena sp. Itu2469 partial 16S | AM259269.1 | 99 |
| AH 9 | Pseudanabaena | Uncultured cyanobacterium partial 16S isolate cln. ITU39C78 | AM259267.1 | 100 | Pseudanabaena sp. Sai012 16S | GU935358.1 | 99 |
| AH 4 | Pseudanabaena | Uncultured cyanobacterium partial 16S isolate cln. ITU39C78 | AM259267.1 | 99 | Pseudanabaena sp. Sai012 16S | GU935358.1 | 99 |
| AH 32 | Pseudanabaena | Uncultured Pseudanabaena sp. clone Okaro10 16S | EU402396.1 | 99 | Pseudanabaena minima GSE-PSE20-05C 16S | HQ132935.1 | 99 |
| RKC 10 | Pseudanabaena | Leptolyngbya sp. OBB19S12 partial 16S | AJ639895.1 | 98 | | | |
| AH 7 | Pseudanabaena | Uncultured bacterium clone 2SC37 16S | EU340177.1 | 98 | Phormidium pristesleyi ANT.L52.6 16S | AY493579.1 | 93 |
| AH 14 | Pseudanabaena | Pseudanabaena sp. Sai012 16S | GU935358.1 | 99 | | | |
| RKC 1 | Synechococcus | Synechococcus sp. PCC 7502 16S | AF448080.1 | 98 | | | |
| RKC 12 | Synechococcus | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone Be_069 | FR667451.1 | 99 | Pseudanabaena PCC7403 16S | AB039019.1 | 93 |
| RKC 9 | Synechococcus | Synechococcus sp. PCC 7502 16S | AF448080.1 | 98 | | | |
| AH 19 | Synechococcus | Synechococcus sp. PCC 7502 16S | AF448080.1 | 98 | | | |
| RKC 17 | Synechococcus | Synechococcus sp. PCC 7502 16S | AF448080.1 | 98 | | | |
| RKC 4 | Synechococcus | Synechococcus sp. PCC 7502 16S | AF448080.1 | 98 | | | |
| RKC 3 | Synechococcus | Synechococcus sp. PCC 7502 16S | AF448080.1 | 98 | | | |
| AH 43 | Tolypothrix | Uncultured bacterium clone AK4DE2_01G 16S | GQ397073.1 | 98 | Coleodesmium sp. ANT.L52B.5 16S | AY493596.1 | 98 |
| AH 41 | Tolypothrix | Uncultured bacterium clone AK4DE2_01G 16S | GQ397073.1 | 98 | Coleodesmium sp. ANT.L52B.5 16S | AY493596.1 | 98 |
| AH 48 | Tolypothrix | Uncultured bacterium clone AK4DE2_01G 16S | GQ397073.1 | 98 | Coleodesmium sp. ANT.L52B.5 16S | AY493596.1 | 98 |
| AH 46 | Tolypothrix | Uncultured bacterium clone AK4DE2_01G 16S | GQ397073.1 | 98 | Coleodesmium sp. ANT.L52B.5 16S | AY493596.1 | 98 |

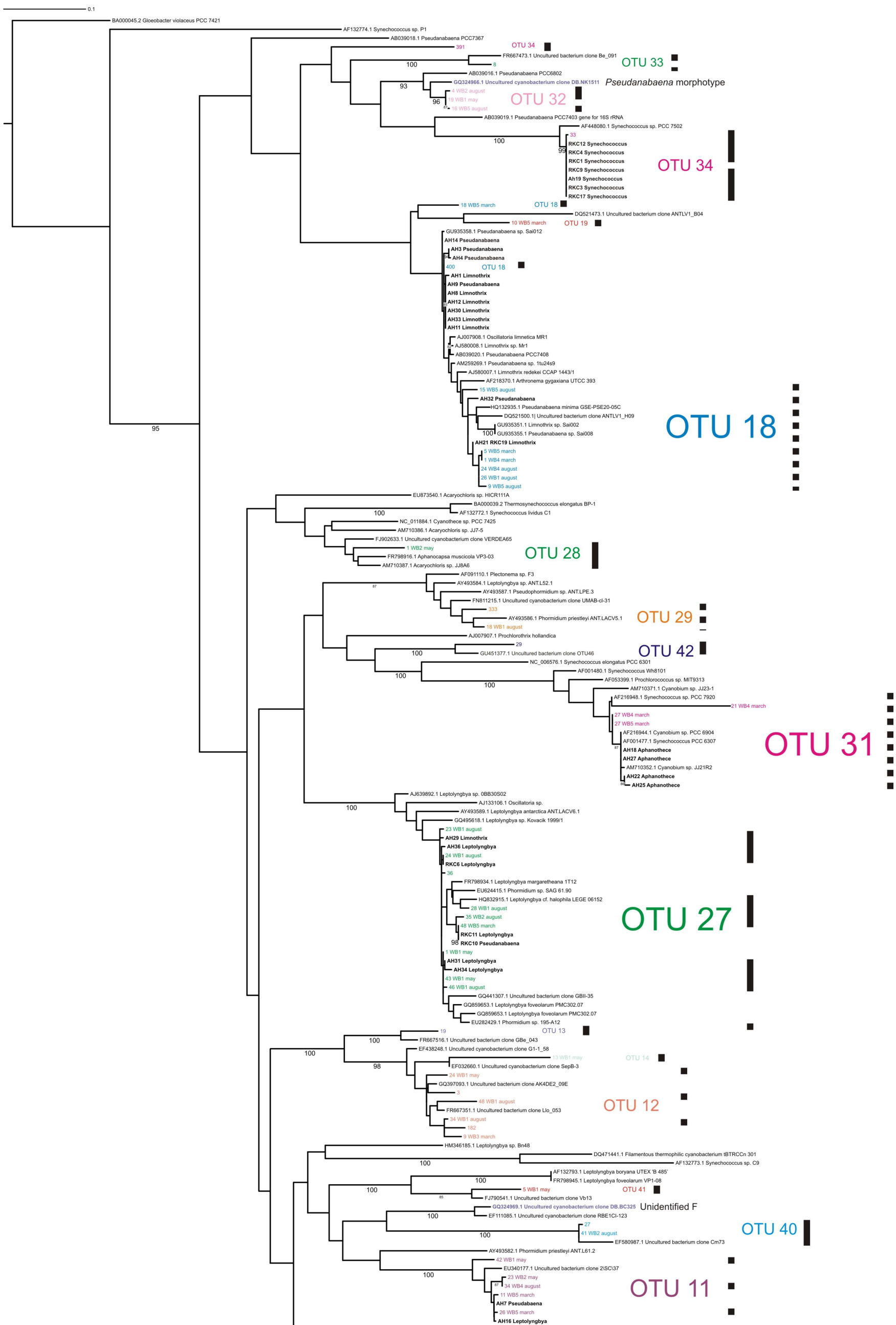
Příloha č. 3 Tabulka znázorňující, které sekvence z GenBank byly nejbližší pro mé izoláty. V prvním sloupci se nachází kód izolátu, v druhém rodové určení, ve třetím pak první sekvence, která byla nejbližší, v šestém sloupci pak první nejbližší sekvence, která obsahovala rodové jméno. Sloupce 4 a 7 obsahují Accession čísla z GenBank a sloupce 5 a 8 procentuální podobnost s mými sekvencemi.

| OTU | I. nejbližší příbuzná sekvence z GenBank | Accession n° | %ID | I. nejbližší příbuzná sekvence z GenBank s rodovým jménem | Accession n° | %ID |
|-----|--|--------------|-----|---|--------------|-----|
| 1 | Uncultured cyanobacterium partial 16S rRNA gene, clone CL3.D35 | FMI175779.1 | 99 | Phormidium sp. PMC301.07 16S | GQ859651.1 | 96 |
| 2 | Uncultured Antarctic cyanobacterium clone Frep19 16S | AY541575.1 | 99 | Tychonema sp. K27 16S | GQ324965.1 | 99 |
| 3 | Uncultured cyanobacterium clone WB18.8 16S | GQ324964.1 | 97 | Tychonema bourrellyi HAB663 16S | F1184385.1 | 97 |
| 4 | Uncultured cyanobacterium clone WB10.1 16S | GQ324970.1 | 97 | Tychonema tenue SAG 4.82 16S | GQ324973.1 | 93 |
| 5 | Uncultured cyanobacterium clone WB10.1 16S | GQ324970.1 | 100 | Tychonema bourrellyi CCAP 1459/11B gene for 16S | AB043897.1 | 96 |
| 6 | Uncultured cyanobacterium partial 16S rRNA gene, clone CL2.C6 | FMI175354.1 | 94 | Phormidium corium PMC299.07 16S | GQ859649.1 | 92 |
| 7 | Uncultured cyanobacterium clone WB17.4 16S | GQ324963.1 | 99 | Leptolyngbya sp. CR 17M 16S | EF545607.1 | 92 |
| 8 | Uncultured bacterium clone ncd978f10c1 16S | JF086595.1 | 99 | Cyanobacterium cCLB-12 16S | HQ230231.1 | 99 |
| 9 | Geitlerinema sp. Sai004 16S | GU935348.1 | 99 | | | |
| 10 | Uncultured bacterium clone FCPP724 16S | EF516628.1 | 99 | Microcoleus paludosus SAG 1449-1a 16S | EF654090.1 | 96 |
| 11 | Uncultured cyanobacterium sp. 0ES36S5 16S | DO264225.1 | 99 | | | |
| 12 | Uncultured cyanobacterium clone H1w-71 16S | EF633023.1 | 98 | Leptolyngbya antarctica ANT.L.WA.1 16S | AY493604.1 | 90 |
| 13 | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone GBe_050 | FR667523.1 | 97 | Cyanotheca sp. PCC 8802, complete genome | CP001701.1 | 91 |
| 14 | Uncultured cyanobacterium clone SepB-3 16S | EF032660.1 | 94 | Oscillatoria lutea gene for 16S | ABI115967.1 | 89 |
| 15 | Uncultured bacterium clone AK4DE2_01G 16S | GQ397073.1 | 98 | Tolypothrix sp. UAM 357 16S | HMT751846.1 | 98 |
| 16 | Nostoc sp. Mau15 partial 16S | AMT711544.1 | 97 | | | |
| 17 | Uncultured cyanobacterium clone S3.WB 16S | GQ324972.1 | 99 | Pseudanabaena tremula UTCC 471 16S | AF218371.1 | 93 |
| 18 | Pseudanabaena sp. Sai012 16S | GU935358.1 | 99 | | | |
| 19 | Pseudanabaena PCC6903 gene for 16S | AB039017.1 | 92 | | | |
| 20 | Uncultured bacterium clone EpiUMA24 16S | FJ849205.1 | 98 | Chamaesiphon subglobosus PCC 7430 | AY170472.1 | 96 |
| 21 | Uncultured bacterium clone EpiUMB54 16S | FJ849308.1 | 97 | Chamaesiphon subglobosus PCC 7430 | AY170472.1 | 95 |
| 22 | Uncultured cyanobacterium clone BK-45-25 16S | FJ866623.1 | 98 | Synechocystis sp. VNM-9-10 16S | HO900669.1 | 96 |
| 23 | Uncultured Rhodospirillum rubrum | FN687098.1 | 90 | Rhodospirillum sp. RCR119 16S, α -proteobacterie | HQ325207.1 | 87 |
| 24 | Uncultured cyanobacterium clone BK-45-25 16S | FJ866623.1 | 93 | Cyanobacterium sp. MBIC10216 gene for 16S rRNA | AB058249.1 | 92 |
| 25 | Pleurocapsa sp. SCyano23 16S | DQ058855.1 | 94 | | | |
| 26 | Cyanobacterium cCLA-3 16S | HQ230225.1 | 97 | Leptolyngbya frigida ANT.L.53B.2 16S | AY493576.1 | 96 |
| 27 | Leptolyngbya sp. 0BB19S12 partial 16S | AI639895.1 | 99 | | | |
| 28 | Acaryochloris sp. J18A6 partial 16S | AMT10387.1 | 97 | | | |
| 29 | Phormidium priestleyi ANT.L.PR2.6 16S | AY493585.1 | 98 | | | |
| 30 | Uncultured bacterium clone ncd1064b05c1 16S | JF087630.1 | 93 | | | |
| 31 | Cyanobium sp. J125-2 partial 16S | AMT10370.1 | 100 | Phormidium priestleyi ANT.L.ACY5.1 16S | AY493586.1 | 92 |
| 32 | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone Llo_016 | FR667314.1 | 99 | Aphanothece sp. 0ES38S3 16S | DQ264198.1 | 98 |
| 33 | Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone Llo_071 | FR667369.1 | 98 | Pseudanabaena PCC6802 gene for 16S | AB039016.1 | 91 |
| 34 | Uncultured Antarctic cyanobacterium clone Ft032 16S | AY151725.1 | 94 | Pseudanabaena sp. 1a-03 partial 16S | FR798944.1 | 91 |
| 35 | Uncultured bacterium clone ncd897a10c1 16S | JF081726.1 | 97 | Phormidium sp. ISC 63 16S | GU477756.1 | 97 |
| 36 | Uncultured bacterium clone ncd897a10c1 16S | JF081726.1 | 93 | Calothrix sp. KVSF5 16S | EU022730.1 | 91 |
| 37 | Uncultured cyanobacterium clone RJ004 16S | DQ181705.1 | 99 | Leptolyngbya antarctica ANT.L.18.2 16S | AY493606.1 | 98 |
| 38 | Uncultured bacterium clone ARDRA0623 16S | EF451617.1 | 99 | Leptolyngbya frigida ANT.L.52.2 16S | AY493575.1 | 96 |
| 39 | Leptolyngbya frigida ANT.L.52.2 16S | AY493575.1 | 94 | | | |
| 40 | Uncultured bacterium clone CM73 16S | EF580987.1 | 98 | Komvophoron sp. ORO36S1 16S | DQ264227.1 | 94 |
| 41 | Uncultured bacterium clone VB13 16S | FJ790541.1 | 96 | Leptolyngbya sp. ISC 67 16S | GU477759.1 | 95 |
| 42 | Uncultured bacterium clone OTU46 16S | GU451377.1 | 96 | Prochlorothrix hollandica SAG 10.89 | AM709625.1 | 91 |

Příloha č. 4 Tabulka znázorňující, které sekvence z GenBank byly nejbližší pro reprezentativní sekvence OTUs. V prvním sloupci se nachází číslo OTU, ve druhém pak první sekvence, která byla nejbližší, v 5. sloupci pak první nejbližší sekvence, která obsahovala rodové jméno. Sloupce 3 a 6 obsahují Accession čísla z GenBank a sloupce 4 a 7 procentuální podobnost s mými sekvencemi.

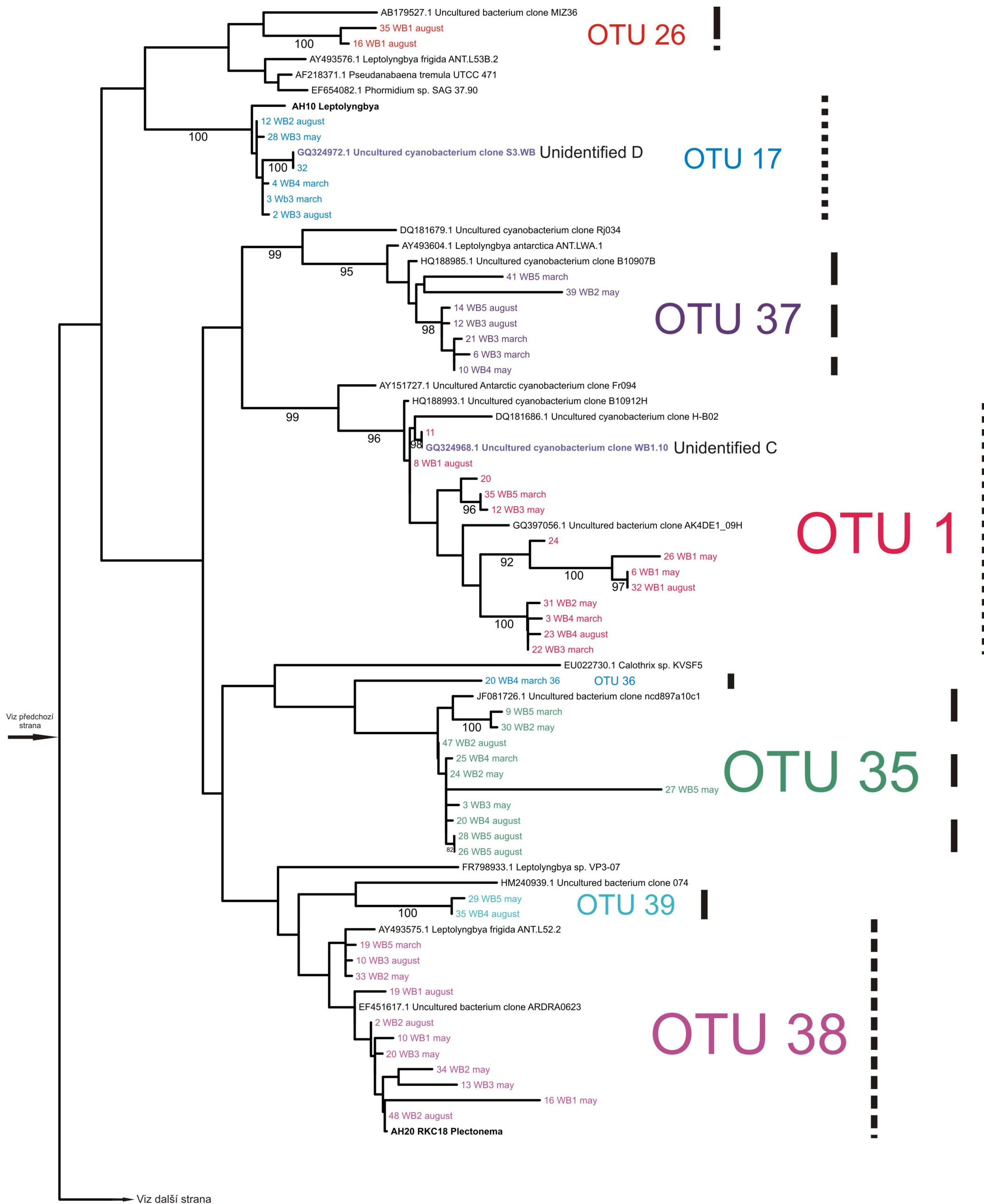


Příloha č. 5 ML strom, kompletní sekvence úseku 16S rDNA, substituční model GTR+ Γ +I, a prohledávací heuristiku využívající počáteční proceduru *rapid bootstrap* (100 replikací), 13759 opakování. Na stromu jsou zvýrazněny klady, obsahující moje sekvence, jedna větev obsahující pouze moje sekvence není zvýrazněna. Pro zvýraznění polyfyletismu rodů *Synechococcus*, *Pseudanabaena*, *Phormidium* a *Leptolyngbya* jsem použila značky ukazující, kde se sekvence těchto rodů vyskytují. Pro *Synechococcus* červený přeškrtnutý kruh, pro *Pseudanabaena* zelenou šipku, pro *Phormidium* modrou hvězdu a pro *Leptolyngbya* černé kolečko. Sekvence z předchozí studie jsou zvýrazněné tučným fialovým písmem, vedle je napsáno o jakou ze skupin se jedná. Moje izoláty jsou zvýrazněné tučným písmem. Zobrazené jsou bootstrapové hodnoty nad 80 %, nad 90 % jsou hodnoty zvětšené.



Viz další strana

Příloha č. 6 ML strom 1.část, sekvenční delší než 1000 bp plus sekvenční environmentální DNA, úseku 16S, získané klonováním. Substituční model GTR+ Γ +I, a prohlédávací heuristiku využívající počáteční proceduru *rapid bootstrap* (100 replikací), 13759 opakování. Sekvenční environmentální DNA, úseku 16S, získané klonováním jsou zvýrazněné barvami podle jednotlivých OTUs. Sekvenční z předchozí studie jsou označeny tučným písmem a fialovou barvou. Sekvenční mých izolátů jsou označeny tučným písmem. Zobrazené jsou bootstrapové hodnoty nad 80 %, nad 90 % jsou hodnoty zvětšené.



Příloha č. 7 ML strom 2.část, sekvenční delší než 1000 bp plus sekvenční environmentální DNA, úseku 16S, získané klonováním. Substituční model GTR+ Γ +I, a prohledávací heuristiku využívající počáteční proceduru *rapid bootstrap* (100 replikací), 13759 opakování. Sekvenční environmentální DNA, úseku 16S, získané klonováním jsou zvýrazněné barvami podle jednotlivých OTUs. Sekvenční z předchozí studie jsou označeny tučným písmem a fialovou barvou. Sekvenční svých izolátů jsou označeny tučným písmem. Zobrazené jsou bootstrapové hodnoty nad 80 %, nad 90 % jsou hodnoty zvětšené.

