

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie



Markéta Macholdová

Acidofilní sinice a řasy

Acidophilic cyanobacteria and algae

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Linda Nedbalová, Ph.D.

Praha, 2013

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, 15. 5. 2013

Podpis:

Poděkování

Děkuji mé školitelce RNDr. Lindě Nedbalové, Ph.D. za pomoc při psaní této práce, za její milý a velmi vstřícný přístup.

Také děkuji mým nejbližším za podporu a důvěru.

Abstrakt

Zásluhou přírodních procesů a lidské činnosti vznikají na Zemi extrémně kyselá stanoviště, jejichž pH nepřesahuje hodnotu 3,0. Především jsou to území ovlivněná tzv. acid mine drainage (AMD) a oblasti vulkanické činnosti. Biodiverzita těchto stanovišť je velmi redukována, ale existují mikroorganismy, které se na extrémní podmínky velmi dobře adaptovaly. Tyto organismy jsou označovány za acidofilní.

Sinice a řasy jsou na extrémně kyselých stanovištích jedinými primárními producenty a hrají tak zásadní roli v těchto ekosystémech. Ačkoli musí překonat několik problémů, které toto prostředí přináší (přebytek H^+ iontů, zvýšená koncentrace těžkých kovů), vyvinuly celou řadu ekofyziologických adaptací a životních strategií, které jim umožňují toto prostředí obývat. Jedná se především o ultrastrukturální změny v membránách buněk, speciální metabolické procesy a produkci speciálních látek a enzymů. Acidofilní druhy se vyskytují napříč téměř všemi taxonomickými skupinami sinic a řas.

Zájem o acidofilní organismy v posledních desetiletích vzrostl díky jejich potenciálnímu využití v biotechnologiích. Znalosti o taxonomii, ekologii a ekofyziologii této skupiny se dají využít také v paleobiologii či exobiologii.

Klíčová slova: acidofilní, acidotolerantní, extrémně kyselé prostředí, AMD, adaptace, biotechnologie

Abstract

Due to natural processes and human activity extremely acidic habitats, whose pH does not exceed 3.0, are formed on Earth. These are especially areas affected by the acid mine drainage (AMD) and of volcanic activity. The biodiversity of these habitats is greatly reduced, but there are microorganisms that are very well adapted to such extreme conditions. These organisms are termed as acidophilic.

Cyanobacteria and algae are the only primary producers at extremely acidic sites and thus play a crucial role in these ecosystems. Although they must overcome several problems that are associated with such an environment (excess of H⁺ ions, increased concentrations of heavy metals), they developed a range of ecophysiological adaptations and life strategies that allow them to inhabit it. These are mainly the ultrastructural changes in the cell membranes, special metabolic processes and the production of special substances and enzymes.

Acidophilic species are present across almost all taxonomic groups of cyanobacteria and algae.

Interest in acidophilic organisms has increased in recent decades due to their potential use in biotechnology. Knowledge of their taxonomy, ecology and ecophysiology can also be used in paleobiology and exobiology.

Key words: acidophilic, acid-tolerant, extremely acidic environment, AMD, adaptation, biotechnology

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Acidofilní a acidotolerantní organismy	9
3. Chemické vlastnosti extrémně kyselých vod	9
4. Typy extrémně kyselých stanovišť	12
4.1. Acid mine drainage (AMD).....	12
4.2. Oblasti vulkanické činnosti	14
4.3. Stanoviště ovlivněná kyselou atmosférickou depozicí	15
4.4. Rašeliniště.....	16
5. Acidofilní a acidotolerantní sinice a řasy – přehled skupin a zástupců	17
5.1. Sinice	17
5.2. Řasy	18
6. Ekofyziologické adaptace	23
6.1. Adaptace na vysokou koncentraci H^+ iontů v okolním prostředí	23
6.2. Tolerance ke zvýšené koncentraci těžkých kovů.....	25
6.3. Extracelulární polymerické látky.....	26
6.4. Ostatní adaptace.....	27
6.5. Evoluční původ adaptací	28
7. Využití.....	29
8. Závěr	32
9. Seznam použité literatury.....	34

1. Úvod

Mnoho oblastí světa považujeme za „extrémní“, protože tam z antropocentrického pohledu panují podmínky nepříznivé pro život. Místa s extrémní teplotou, tlakem či pH jsou však osídlena mnoha mikroorganismy, které se na tyto podmínky velmi dobře přizpůsobily. Zájem o tzv. extrémofily výrazně vzrostl za posledních 40 let a je stále se rozvíjející oblastí výzkumu (Johnson, 1998). Tato skupina organismů není ale z taxonomického, ekologického i ekofyziologického hlediska zdaleka prozkoumaná a nově získané znalosti se dají uplatnit v nejrůznějších oborech. Je pravděpodobné, že extrémofilové byli mnohem rozšířenější v raném geologickém období naší planety, kdy na Zemi panovaly v porovnání se současností zcela odlišné podmínky, a představují tedy archaické životní formy (Brake a Hasiotis, 2010). Jejich speciální vlastnosti také mohou posloužit při vývoji nových chemických a biotechnologických procesů (Sloth et al., 2005; Graziani et al., 2013). Nově vznikajícím odvětvím je také uplatnění znalostí o extrémofilních organismech včetně metodických postupů při hledání života mimo planetu Zemi – exobiologie (Fernández-Remolar a Knoll, 2008). Jednou z významných skupin extrémofilů jsou acidofilní organismy, kterým se daří ve velmi kyselém prostředí ($\text{pH} < 3,0$).

Extrémně kyselé lokality se nacházejí po celém světě a vznikají přirozeně, ale i antropogenně. Zdrojem nízkého pH prostředí jsou různé geochemické a biologické procesy. Přirozeně kyselé jsou oblasti vulkanické činnosti, kde vyvěrají geotermální prameny, nebo je vodní prostředí okyseleno v důsledku reakce vody s podložím. Další kyselou a velmi specifickou lokalitou, která vznikla přirozeným způsobem, jsou rašeliniště. Většina extrémně kyselých lokalit ale vzniká v důsledku přímého či nepřímého působení člověka. Jedná se především o těžební oblasti, kde dochází v opuštěných povrchových (ale i podzemních) dolech k fenoménu tzv. acid mine drainage (AMD). Nemalý vliv na okyselování prostředí mají samozřejmě také kyselé srážky (Johnson, 1998).

V extrémně kyselém vodním prostředí je diverzita organismů velmi redukována. Vyskytuje se zde jen několik málo druhů bakterií, hub a řas. Řasy jsou pro toto prostředí důležité, protože jsou jedinými primárními producenty. Nacházejí se zde většinou jen v jednobuněčné formě, případně jako vláknité nárosty (Nixdorf et al., 2001). Nicméně se nejedná o vybrané specializované skupiny, acidofilní druhy jsou zastoupeny téměř v každé taxonomické skupině (Novis a Harding, 2007).

Organismy, žijící v prostředí s extrémně nízkým pH, se musí vypořádat hlavně s okolní mnohonásobně vyšší koncentrací vodíkových iontů, způsobující kyselost lokalit. Zásadní

strategií pro přežití je zachování neutrálního pH cytosolu. Existuje několik adaptací buněčných membrán, které to umožňují. Extrémně nízké pH způsobuje i mnoho jiných problémů, jako například zvýšenou koncentraci těžkých kovů či omezený přísun živin. I tyto nepříznivé podmínky jsou schopny acidofilní organismy překonat různými ekofyziologickými adaptacemi či životními strategiemi (Gross, 2000).

V této práci jsem se pokusila shrnout maximum dostupných informací o taxonomickém zařazení, ekofyziologických adaptacích, habitatech a možnostech využití dosud objevených a detailněji zkoumaných acidofilních řasách a sinicích, které rostou v $\text{pH} < 3,0$.

2. Acidofilní a acidotolerantní organismy

Podle hodnot pH, které vyžadují, můžeme organismy rozdělit do tří skupin: alkalofilní, neutrofilní a acidofilní. Neexistuje žádná jednoznačně stanovená hranice pH, podle které můžeme organismy označit za acidofilní či neutrofilní. Acidofilní organismus můžeme obecně definovat jako ten, který má optimum růstu výrazně pod pH 7. Kde přesně se ale nachází hranice, která odlišuje organismy acidofilní od neutrofilních? Tato hranice je pouze arbitrární a liší se podle autora. Důvodem je mimo jiné skutečnost, že organismy mají určitou toleranci k vlivům prostředí a žijí tedy v určitém rozmezí námi měřitelných hodnot.

V dostupné literatuře jsou uváděny tři různé hodnoty pH vymezující acidofilní organismy: pH 4,0 (např. Gyure, 1987; Wollmann, 2000; Pedrozo, 2001), pH 3,5 (např. DeNicola, 2000; Brake a Hasiotis, 2010) a nejčastěji pH 3,0 (např. Johnson, 1998; Lessmann, 2000; Brake, 2001; Messerli, 2005; Aguilera, 2006; Baker-Austin a Dopson, 2007). Organismy, žijící v prostředí s pH pod 3,0 (resp. 3,5 či 4,0) jsou označovány za pravé acidofily. Pro rozlišení přechodu mezi acidofilním a neutrofilním organismem ještě někteří autoři používají pojem acidotolerantní. Za acidotolerantní organismus je považován takový, který roste do pH 5, ale na rozdíl od acidofilů preferuje vyšší hodnoty pH (Gross, 2000).

Ve své práci jsem se zaměřila na sinice a řasy, které jsou považovány za striktně acidofilní, tedy rostou v pH pod 3,0.

3. Chemické vlastnosti extrémně kyselých vod

Abychom mohli pochopit, jak přežívají a rostou autotrofní organismy v extrémně kyselém prostředí, je třeba znát co nejvíce informací o chemismu, koloběhu živin a zdrojích energie na dané lokalitě. Jednotlivé lokality mohou mít rozdílné geomorfologické a chemické vlastnosti, ale druhovou bohatost a růst organismů ovlivňuje několik základních faktorů.

Vodní prostředí má v závislosti na chemickém složení vody a podloží schopnost přirozeně udržovat určitou hodnotu pH. Tato vlastnost se označuje jako neutralizační kapacita (NK) vody a lze ji definovat pomocí protonové bilance podle složek, které se neutralizace účastní. V přírodním prostředí se jedná hlavně o složky uhličitánového pufrčního systému (H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-} , OH^- , H^+), případně další látky, které mohou být akceptory či donory protonů (jiné slabé kyseliny či zásady, ionty kovů a jejich hydroxokomplexy, huminové látky, amoniakální dusík, fosforečnany a křemičitany). V extrémně acidifikovaných vodách se

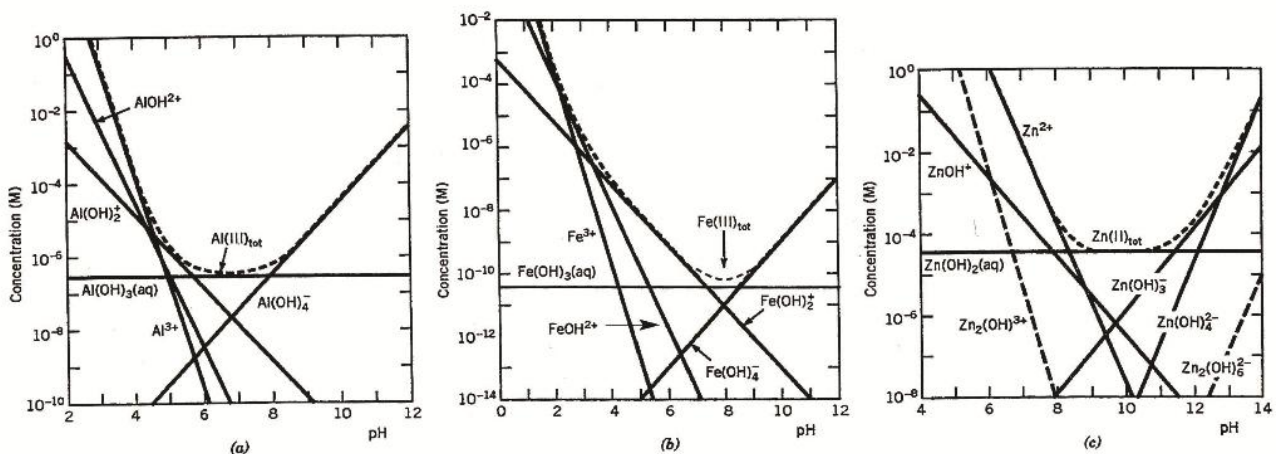
uplatňují i silné kyseliny (Pitter, 1999). Silné kyseliny se do povrchových vod dostávají jako produkt vulkanismu nebo těžební aktivity. Pokles pH může být způsoben i kyselou atmosférickou depozicí a ovlivňuje povodí s podložím, které je citlivé k acidifikaci (například mělké půdy na vyvěřelých či metamorfovaných horninách) (Geller et al., 1998).

V povodí s neutrálním pH je stabilita udržována uhličitanovým pufracním systémem (systém kyseliny uhličité a jejích disociovaných forem: $\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$). Při zvýšeném přísunu H^+ iontů se vyčerpává uhličitanový zásobník (Geller et al., 1998). Rozpuštěný anorganický uhlík (DIC) je v pH pod 3 přítomný téměř výhradně ve formě CO_2 . To může být limitujícím faktorem pro růst autotrofních organismů (Nixdorf et al., 2001).

Jestliže je podloží citlivé k acidifikaci a uhličitanový zásobník je úplně vyčerpán, prostředí již není schopné neutralizovat přebytečné H^+ ionty a pH klesá asi na hodnotu 5,5. Mezi hodnotami pH 4,5–5,5 je prostředí stabilizováno hliníkovým pufracním systémem, při kterém nedochází k dalšímu poklesu pH, ale v prostředí se hromadí toxické hlinité ionty. Po vyčerpání hliníkového pufracního systému je systém stabilizován pomocí železa. Různé druhy železitých hydroxidů a iontová forma Fe^{3+} mají pufracní kapacitu srovnatelnou s uhličitanovým a hliníkovým systémem. Pufracní systém železa se uplatňuje v pH 2–4.

Pufracní systém může být doplněn i o další ionty (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , SO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^- , F^-). V mírně kyselých rašelinistních jezerech může být systém nahrazen interakcemi mezi rozpuštěnými kovy a huminovými látkami (Geller et al., 1998).

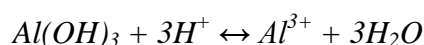
Za extrémně nízkého pH je rozpustnost kovů zvýšená (Obr. 1).



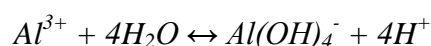
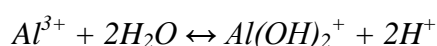
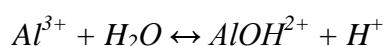
Obr. 1: Vliv pH na rozpustnost kovových (hydr)oxidů: a) $\text{Al}(\text{OH})_3$, b) FeOOH , c) $\text{Zn}(\text{OH})_2$ (Stumm a Morgan, 1996).

V prostředí se tak může vyskytnout i vysoká koncentrace iontových forem těžkých kovů (např. Fe, Al, As, Cu, Zn, Mn, Cd, Pb), které jsou potenciálně toxické pro organismy (Nixdorf

et al., 2001). Typická je vysoká koncentrace železa (až $1 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$), převážně ve formě Fe^{3+} . Železitý kationt se dále účastní mnoha reakcí (viz. Kapitola 4.1). Také koncentrace rozpuštěných forem hliníku jsou v acidifikovaných lokalitách vysoké. Hliník je obsažen v mnoha horninách (např. gibbsit – $\text{Al}(\text{OH})_3$), při zvětrávání se váže na organické látky a ukládá se v půdě. Koncentrace hliníku v neutrálních vodách jsou nízké, protože se tyto komplexy nerozpouští. V oblastech, jejichž povodí má nízkou pufrací kapacitu (např. dobře propustné půdy na silikátovém podloží), dochází rychle k vyčerpání zásaditých iontů, vyplavují se ionty H^+ a následně Al^{3+} . Tento proces popisuje rovnice:



Rozpuštěný hliník se ve vodě vyskytuje buď ve formě volných iontů, nebo jako komplex hydroxidů, fluoridů, sulfátů a rozpuštěných organických látek. V pH pod 5 je 40–70% monomerního hliníku přítomno ve formě Al^{3+} a Al-hydroxidových komplexů. Hydroxidové komplexy tvoří hliník po reakci s vodou (jako slabou kyselinou) podle rovnic:



V pH pod 4,5 se hliník vyskytuje téměř výhradně ve formě Al^{3+} . Komplexů AlOH^{2+} a $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ přibývá, jakmile se hodnota pH zvýší nad 4,5. Hliník v komplexu s organickými látkami převažuje v pH větším než 6 (Lee, 1985). Vysoká koncentrace Al^{3+} v kyselých vodách je toxická pro mnoho organismů. V koncentraci nad $4\text{--}8 \mu\text{mol l}^{-1}$ jsou hlinité ionty silně toxické pro ryby, které mají v důsledku jeho působení dýchací problémy kvůli koagulaci sliznice na žábřácích, nedokážou vyrovnat svůj osmoregulační systém a na následky těchto komplikací hynou. Míra toxicity hliníku závisí na formě, ve které se hliník v prostředí vyskytuje. Je například velmi nízká, když je hliník vázán v komplexu s organickými sloučeninami (Driscoll, 1985).

Rozpustnost fosforu je v nízkém pH také zvýšená. Koncentrace rozpuštěného fosforu však může být extrémně nízká, protože se fosfor dále sráží s železitémi oxyhydroxidy (Nixdorf et al., 2001). Ze sedimentu může být fosfor opět uvolněn redukčními reakcemi. Přebytečné síranové anionty mohou pomoci uvolnit fosfor zpět do vodního sloupce, díky kompetici s fosfáty na vazebných místech. V závislosti na těchto procesech tedy může být i za nízkého pH udržován vhodný poměr SRP : TP, což je výhodné pro primární produkci ekosystému (Pedrozo et al., 2001). Na lokalitách, kde se vytváří gradient pH, může dojít k inaktivaci a ukládání fosforu do sedimentu. Jsou to například jezera s různě kyselými přítoky. Po smíchání kyselého přítoku (obsahujícího uvolněné iontové formy hliníku)

s jezerem se pH dočasně zvýší. Hliníkové ionty hydrolyzují a vytváří koloidní hydroxidy (Al_{part}), které mají vyšší schopnost vázat ortofosfáty z roztoku. Al_{part} se usazuje a zvyšuje sorpci fosforu do sedimentu. Zvýšený obsah hliníku v sedimentu také zamezuje uvolňování fosforu z vazeb s železitými hydroxidy (Kopáček et al., 2001).

Rozpuštěný anorganický dusík je v extrémně kyselých vodách přítomný převážně ve formě NH_4^+ , méně ve formě NO_3^- . Je to důsledek omezení procesu nitrifikace za nízkých hodnot pH (Nixdorf et al., 2001).

4. Typy extrémně kyselých stanovišť

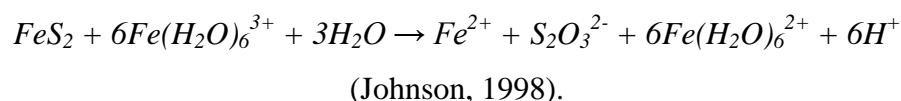
4.1. Acid mine drainage (AMD)

S celosvětovou rozsáhlou těžbou nerostných surovin je spojen vznik extrémně kyselých lokalit, tzv. acid mine drainage (AMD). Ačkoli pojem AMD odkazuje k obecnému jevu vyplavování kyselé vody ze všech míst, kde může potenciálně vznikat, nejvíce je spojen právě s problémy vzniklými v návaznosti na těžební činnost.

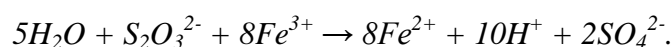
Po skončení těžby jsou důlní jámy ponechány ladem, často dochází k jejich zatopení srážkovou vodou. Jestliže takto vzniklá jezírka nemají jiný přítok než srážkovou vodu, jejich pH může zůstat velmi nízké po celá desetiletí. Vymýváním a průsakem se mohou sloučeniny vzniklé v AMD šířit i do přilehlých toků. Typická pro tyto lokality je také zvýšená koncentrace těžkých kovů (Geller et al., 1998).

K acidifikaci vodních ploch a toků (nadzemních i podzemních) v oblastech těžby dochází převážně z důvodu oxidace sloučenin síry z těžených minerálů. I když tyto procesy probíhají v přírodě přirozeně, těžba způsobuje akumulaci minerálů obsahujících síru na povrchu a urychluje okyselování lokality (Novis a Harding, 2007). Oxidované sulfidy obsahují například měď, olovo, zinek a vůbec nejčastěji železo, se kterým tvoří minerál pyrit (disulfid železnatý, FeS_2). V místě uložení je pyrit stabilní sloučeninou, po vytěžení a přesunu na zemský povrch je v kontaktu se vzduchem a vodou, svou stabilitu ztrácí a je transformován. Dochází ke komplexnímu procesu, zahrnujícímu chemické, biologické a elektrochemické reakce, jehož výsledkem je extrémně nízké pH lokality. Důležité faktory ovlivňující tento proces jsou také podmínky prostředí (např. teplota, hydrologie lokality, pufrční vlastnosti podloží), nasycení vody kyslíkem, povrch a morfologie pyritové rudy a aktivita chemolitotrofních bakterií (Akcil a Koldas, 2006).

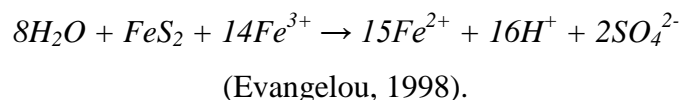
Primárním zdrojem acidity na lokalitě je sled chemických reakcí, který závisí na dostupnosti forem některých prvků. V rámci reakcí hraje významnou roli postupně se snižující pH roztoku. Oxidaci pyritu popisuje chemická rovnice



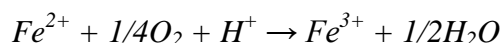
Oxidačním činidlem je přitom v neutrálních až alkalických podmínkách kyslík, v kyselých podmínkách ovšem železitý kationt (Singer a Stumm, 1970). Přítomnost železa v oxidované či redukované formě, závisí na okolním pH a redoxním potenciálu. V kyselých podmínkách se zvyšuje podíl Fe^{3+} . Thiosíran může hydrolyzovat na polysulfáty, elementární síru či sulfát. Při přebytku Fe^{3+} v roztoku dochází k transformaci $S_2O_3^{2-}$ na SO_4^{2-} podle rovnice



Souhrnně je proces oxidace pyritu a okyselování lokality vyjádřen pomocí rovnice:



Sekundárním zdrojem acidity v AMD může být přítomnost acidofilních chemolitotrofních bakterií. Bakterie katalyzují řadu oxidačních reakcí, z nichž získávají energii pro svůj metabolismus. Způsobují především oxidaci železnatého kationtu zpět na železitý podle rovnice



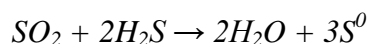
(Banks et al., 1997; Akcil a Koldas, 2006).

Tím se spouští cyklická reakce, jejímž výsledkem je zvýšená oxidace pyritu. Předpokládá se, že abiotická oxidace je nejrychlejší spíše v neutrálních podmínkách (pH 6–7) a v acidických podmínkách (pH 2–3) je nejrychlejší oxidace bakteriální, která také v kyselých vodách dominuje (Banks et al., 1997). Za přítomnosti bakterií a vhodných podmínek může být oxidace pyritu až 10^6 krát vyšší než za abiotických podmínek (Singer a Stumm, 1970). Některé bakterie jsou schopny dále oxidovat redukované sloučeniny síry na sírany a tím dále snižovat pH roztoku. Nejhojnější bakterií, která katalyzuje oxidační reakce, je *Acidithiobacillus ferrooxidans* patřící do skupiny gramnegativních proteobakterií. Dalšími bakteriemi tohoto typu jsou například *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* a *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (Johnson, 1998).

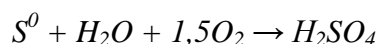
4.2. Oblasti vulkanické činnosti

Přírodním zdrojem acidity vodního prostředí je také vulkanická činnost. Procesy, ke kterým v okolí vulkánů dochází, jsou podobné procesu AMD. Ačkoli problematika AMD je poměrně detailně prostudována, fenoménu vulkanické acidifikace byla věnována zatím menší pozornost. V posledních letech se ale zvyšuje zájem o termoacidofilní organismy, které se zde vyskytují (Pedrozo et al., 2001).

K okyselení vod dochází v bezprostřední blízkosti vulkánu, například v kráterových jezerech. Nízké pH lokalit je způsobeno intenzivním přísunem některých vulkanických plynů a reakcí vody s podložím, popřípadě přímým vývěrem horkých geotermálních pramenů na zemský povrch. Významnými jsou hlavně plyny obsahující síru, tedy SO_2 a H_2S . Jejich kondenzací na okraji jezer dochází ke vzniku elementární síry podle rovnice

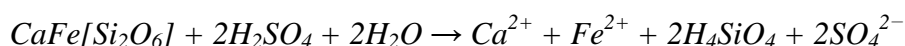


Činností autotrofních či heterotrofních mikroorganismů je elementární síra oxidována až na kyselinu sírovou podle rovnice



(Johnson, 1998).

Další reakce závisí na vlastnostech podloží. Typickou magmatickou horninou jsou pyroxeny či amfiboly, silikátové minerály bohaté na železo. V kyselých podmínkách se snadno rozpouštějí, např. oxidace pyroxenu



Dalším příkladem horniny tohoto typu je andezit, který může obsahovat vysoký podíl fosforu. Výsledkem rozpustných reakcí je vysoká koncentrace volných forem fosforu v roztoku, která je ale ovlivňována přítomností železitých oxyhydroxidů (viz. Kapitola 3). Kyselé zvětrávání magmatických hornin také způsobuje zvýšenou koncentraci železa, stopově také chromu, niklu a zinku (Pedrozo et al., 2001).

V případě horkých geotermálních pramenů jsou významné teplotně závislé procesy. Marini et al. (2002) upozornili na zajímavý jev, tzv. bimodální rozložení pH vulkanických jezer. Po chemické analýze 255 vzorků vody z různých částí světa a porovnání výsledků zjistili, že hodnoty pH vulkanických jezer se pohybují ve dvou oblastech. Nejčtenějším typem jsou jezera s pH 0,5–1,5 a jezera s pH 6–6,5. Jezera s pH 3,5–5 se vyskytují jen málo. Autoři modelovali laboratorně reakční cesty neutralizace vod z kyselého jezera s andezitickým podložím za různých teplot. Teplota, za které reakce probíhá, se zdá být určujícím faktorem výsledného pH jezera. Za vysoké teploty (až kolem 300 °C), která je výsledkem

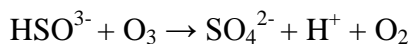
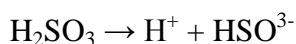
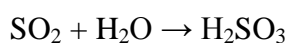
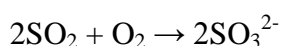
hydrotermálně-magmatických podmínek, nabývají hodnoty pH vodních roztoků středních hodnot. Po prudkém ochlazení (pod 100 °C) – vývěru vody na zemský povrch – dochází k prudkému poklesu hodnot pH a míchání s již kyselou vodou jezera. Výsledné hodnoty pH ve vulkanických jezerech obvykle nejsou vyšší než 3.

4.3. Stanoviště ovlivněná kyselou atmosférickou depozicí

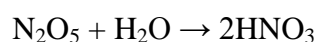
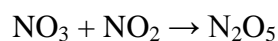
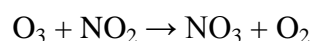
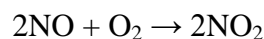
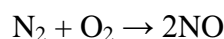
Na vodní ekosystémy má samozřejmě vliv složení atmosférických srážek, které spadnou do jejich povodí. Problémem dnešního světa je fenomén tzv. kyselých dešťů. Normální dešťové srážky jsou také mírně kyselé, protože voda v atmosféře v malé míře reaguje s atmosférickým CO₂ za vzniku slabé kyseliny uhličité. Udává se, že za tzv. kyselý je dešť považován pod pH 5,6 (Evans, 1984).

V důsledku rozvoje průmyslu a dopravy v posledních 200 letech se do atmosféry začaly ve zvýšené míře dostávat emise, které vznikají při spalovacích procesech. Jsou to převážně oxidy síry (SO₂) a dusíku (NO_x). Z emisí se v atmosféře stávají sírany (SO₄²⁻) a dusičnany (NO₃⁻), které se ve vodním prostředí rychle transformují na kyseliny a jsou hlavním zdrojem acidity srážkové vody. Reakce oxidů síry vyjadřují souhrnně *rovnice č. 1*, reakce oxidů dusíku vyjadřují souhrnně *rovnice č. 2* (Singh a Agrawal, 2008).

Rovnice č. 1:



Rovnice č. 2:



Hodnota pH dešťových srážek v průmyslových oblastech v Evropě se v nedávné době pohybovala mezi 3,5–4,5 (Hruška a Kopáček, 2005). V USA byly v 70. letech zaznamenány kyselé srážky s pH 2,7 či dokonce 1,5 (Singh a Agrawal, 2008).

Povodí ovlivněné pouze kyselou depozicí nelze jednoznačně považovat za typické extrémně kyselé habitaty. Almer et al. (1974) studovali efekty acidifikace na jezera ve Švédsku a Norsku. Jejich měření ukázalo, že vlivem spadu kyselých srážek o hodnotách asi pH 4,5 pokleslo pH vody v jezerech za 30 let o 1,8 jednotky (z pH 6,25 na pH 4,5).

Snižováním pH vody a v důsledku souvisejících jevů, došlo ke změně ve složení ekosystému. Počet druhů fytoplanktonu se výrazně snížil pod pH 5,8 a ze záznamu sedimentu byl patrný značný pokles v biomase rozsivek (*Bacillariophyceae*). Počet zástupců zooplanktonu byl velmi malý, většina druhů při nízkém pH úplně mizí. Rybí druhy jsou také indikátory acidifikace, například plotice (*Leuciscus rutilus*) mizí pod pH 5,5 kvůli poruchám v reprodukci. Další druhy citlivé na snížení pH jsou okoun (*Perca fluviatilis*), štika (*Esox lucius*), střevle (*Phoxinus phoxinus*), pstruh (*Salmo trutta*).

Na příkladu okyselování povodí v důsledku kyselé atmosférické depozice ale můžeme pozorovat změny, které probíhají i na extrémně kyselých stanovištích. Navíc může být kyselá atmosférická depozice významným zdrojem acidity na lokalitách, kde jsou srážky hlavním zdrojem vody.

4.4. Rašeliniště

Významným a velmi specifickým habitatem s nízkým pH jsou rašeliniště. Jsou to zamokřená území, s vysokým srážkovým úhrnem a velkou rostlinnou biomasou. Podle zdroje vody, kterou jsou zásobované, a způsobem vzniku dělíme rašeliniště na slatiny a vrchoviště. Slatiny vznikají zazemněním jezer a jsou zásobovány podzemní vodou. Jejich pH bývá 5–6. Vrchoviště jsou zásobovány hlavně vodou srážkovou. Jejich pH je nižší, asi 3,5–4,5 (Lellák a Kubíček, 1991). Ačkoli hodnota pH na těchto lokalitách většinou neklesá dlouhodobě pod pH 3 a organismy zde žijící tedy nemohou být považovány za striktně acidofilní, považují rašeliniště vrchovištního typu za významné kyselé lokality a budu se krátce věnovat jejich charakteristice.

Dominující rostlinou jsou zde různé druhy rašeliníku (rod *Sphagnum*). Rašeliník se u dna tůní anaerobně rozkládá, výsledkem je uvolnění plynů (CH_4 , CO_2 , H_2 , N_2 , H_2S) a uložená biomasa. Voda je bohatá na organické kyseliny. Pro rašeliniště je také typická absence uhličitanového pufracího systému a vertikální gradient rozpuštěného kyslíku ve vodě. Jelikož u vrchovišť jsou v podstatě jediným zdrojem vody srážky, je chemismus lokality ovlivněn i chemickým složením srážek. Mechanismy, které způsobují acidifikaci rašelinišť, jsou v zásadě trojího typu. Jedná se o výměnu kationtů, disociaci organických kyselin a redukci sulfátů (United States Environmental Protection Agency, 2013).

Výměna kationtů probíhá na povrchu buněčných stěn rašeliníku. Buněčné stěny obsahují kyselinu galakturonovou, která váže volné kationty (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) ze svého okolí, a uvolňuje do vodního prostředí vodíkové kationty. Přestože tento proces probíhá na

buňkách rašeliníku neustále, je považován spíše za minoritní zdroj acidity (Clymo, 1963). Při anorganické dekompozici také vznikají organické kyseliny, jejichž rozpustnost závisí na pH roztoku. Tzv. huminové kyseliny se nad pH 2 rozpouštějí a přispívají k celkové iontové bilanci vody. Disociací huminových kyselin vzrůstá koncentrace Ca^{2+} , Mg^{2+} a SO_4^{2-} iontů (Hemond, 1980). Třetím mechanismem je redukce sulfátů. Při dekompozici se mimo jiné plyny uvolňuje sirovodík. Když se dostane do vrstev s vyšším obsahem kyslíku, je oxidován na sulfáty. Sulfáty se v kyselém prostředí rašeliníště mění na kyselinu sírovou, která je zdrojem acidity (Gorham, 1956).

V případě rašeliníšť nejsou problémem toxické ionty Al^{3+} , jelikož 80–90 % celkového rozpuštěného hliníku je navázáno na organické látky (Helmer et al., 1990).

5. Acidofilní a acidotolerantní sinice a řasy – přehled skupin a zástupců

5.1. Sinice

Říše Bacteria

Oddělení Cyanobacteria

Existuje pouze málo dokladů o výskytu sinic na extrémně kyselých lokalitách. Almer et al. (1974) popsal diverzitu organismů v acidifikovaných jezerech ve Skandinávii (viz. Kapitola 4.3). O sinicích udává, že se vyskytovaly až v jezerech s pH nad 5. Jednalo se o kokální druhy *Chroococcus limneticus* a *Merismopedia tenuissima*. Kwiatkowski a Roff (1976) popsali složení fytoplanktonu po okyselení experimentálních jezer v oblasti Sudbury (Ontario). Došli k závěru, že s poklesem pH se snížilo zastoupení druhů řas z třídy Chlorophyceae a začaly být dominantní sinice rodu *Aphanocapsa* a *Chroococcus*. Pod pH 4,4 se jejich růst výrazně snížil. Steinberg et al. (1998) zkoumali složení fytoplanktonu jezer v Bavorském lese a v těžební oblasti Lužice v Německu. Zjistili, že vláknité sinice *Oscillatoria* a *Spirulina* dominují v nejvíce kyselém jezeře (pH 2,9) v těžební oblasti Lužice. Také objevili, že kokální pikoplanktonní sinice zcela chybí v druhovém složení vod s pH pod 4,5 a vláknité druhy jsou lépe adaptované na extrémně kyselé podmínky. Podle svých výsledků i v porovnání s výsledky Almer et al. (1974) a Kwiatkowski a Roff (1976) došli k závěru, že sinice mohou být považovány za acidotolerantní, nikoli za acidofilní.

5.2. Řasy

Říše Protozoa

Oddělení Euglenophyta

Velmi dobře zdokumentovaný je výskyt druhu *Euglena mutabilis* (Euglenophyceae) (Obr. 2). Na mnoha extrémně kyselých lokalitách je dominantním druhem bentosu a vytváří biofilmová společenstva. V rámci eukaryotních organismů, vyskytujících se na kyselých lokalitách, je popsán jako nejlépe adaptovaný na extrémně nízké pH i na vysoké koncentrace těžkých kovů (Aquilera et al., 2006).

Casiot et al. (2003) popsali výskyt *Euglena mutabilis* na opuštěné těžební lokalitě u Carnoulés ve Francii s pH 2,5–4,7 a s vysokými koncentracemi síranů, železa a arsenu. Upozornili, že *Euglena mutabilis* může pomáhat v detoxifikaci prostředí svou schopností oxidovat a akumulovat v buňkách toxické iontové formy arsenu. Schopnost vázat těžké kovy z okolního prostředí a dlouhodobě je akumulovat ve svých buňkách, popsali u *Euglena mutabilis* i Brake et al. (2001). Druh získaný z jezer vzniklých po těžbě uhlí v jihozápadní Indianě v USA toleruje pH až 1,7. V jeho buňkách byly rozpoznány akumulované malé sraženiny železa.

Významnou lokalitou ovlivněnou AMD je řeka Río Tinto v jihozápadním Španělsku. Řeka leží v oblasti tzv. iberského pyritového pásu, jednoho z největších úložišť sulfidových rud na světě, jejichž těžba zde probíhá již téměř 5000 let (Davis et al., 2000). Přestože pH prostředí nabývá hodnot 0,8–3,0 a je silně kontaminováno, představuje podíl eukaryotních mikroorganismů až 65 % celkové biomasy nárostů (Aquilera et al., 2006). *Euglena mutabilis* je opět dominantní složkou bentosu, uplatňuje se hlavně při formování biofilmových společenstev na jaře (Aquilera et al., 2007).

Další rozsáhlé území postižené AMD se nachází v Lužici v Německu. Části opuštěných povrchových dolů po těžbě hnědého uhlí byly zatopeny srážkovou vodou a vznikla zde extrémně acidifikovaná jezera. Z 32 má 14 jezer pH pod hodnotou 3,0 (průměrné pH 2,3–2,9). Jako hojný a často dominantní druh zde byl popsán *Lepocinclis teres* forma *parvula* (Euglenophyceae), jehož podíl na celkové biomase představoval například ve vysoce eutrofním jezere Lugteich až 37 %. Druh *Euglena mutabilis* byl zde popsán jako hojný, nikoli však dominantní (Lessmann et al., 2000).

Druh *Lepocinclis* sp., připomínající *Lepocinclis buetschlii* nebo *Lepocinclis ovum*, byl nalezen v jezírku Hromnice na Plzeňsku. Extrémně kyselé jezírko (pH 2,6) ovlivněné AMD je pozůstatkem někdejší těžby pyritové břidlice (Hrdinka et al., 2013).

Euglena mutabilis je na lokalitách postižených AMD důležitým bioindikátorem. Prostorové rozložení biofilmů v extrémně kyselých tocích může být ukazatelem zlepšení kvality vody. Nejčtenější kolonie v rámci jedné lokality *Euglena mutabilis* vytváří na místech s nejnižším pH a nejvyšší kontaminací těžkými kovy, jak bylo popsáno v případě opuštěných dolů v severním Portugalsku (Valente a Gomes, 2007).

V prostředí neovlivněném člověkem byl výskyt druhu *Euglena mutabilis* popsán na unikátní lokalitě Smoking Hills v Kanadě. Lignitové podloží bohaté na síru způsobuje časté samovznícování a oxidy síry vznikající hořením podloží způsobily okyselení přilehlých jezer až na pH 1,8. I zde je tento druh dominantní (Sheath et al., 1982).



Obr. 2: *Euglena mutabilis* (Euglenophyceae) (Valente a Gomes, 2007)

Oddělení Dinophyta

Acidofilní druh z této skupiny byl popsán pouze jeden, také z oblasti Lužice. *Gymnodinium* sp. (Dinophyceae) představoval na jaře 16 % biomasy v pelagiálu jezera 117, ovšem vždy zcela vymizel během léta (Wollmann, 2000).

Říše Chromista

Oddělení Cryptophyta

Druhy z této skupiny jsou popsány pouze z oblasti Lužice. Druhy *Cyathomonas* sp. a *Rhodomonas minuta* (Cryptophyceae) se objevovaly vzácně, v jediném jezeře představovaly více jak 10 % biomasy (Lessmann et al., 2000).

Oddělení Ochrophyta

Třída Chrysophyceae

Druhy z této skupiny jsou popsány také pouze z oblasti Lužice. Lessmann et al. (2000) popsali jednobuněčné druhy *Chromulina* sp. a *Ochromonas* sp. (Chrysophyceae).

Ochromonas sp. označili jako dominantní ve všech jezerech, představující více jak 50 % biomasy řas. Stejně druhy popsal i Wollmann (2000) ze tří jezer o pH 2,6, 2,8 a 3,6, kde tvořily přes 75 % biomasy řas. Kamjunke et al. (2004) zdůraznil roli druhu *Ochromonas* sp. v potravním řetězci jezer. Jedná se o fagotrofního bičíkovce, který může výrazně ovlivňovat populace jednobuněčných bakterií. Druh *Chromulina* sp. byl nalezen i v kyselém jezírku Hromnice (Hrdinka et al., 2013).

Třída Bacillariophyceae

V porovnání s druhovou bohatostí rozsivek v prostředí s pH 4,5–5, je počet druhů v pH pod 3,5 výrazně menší. Je pravděpodobné, že existuje určitý práh mezi pH 3,5 a 4,5, pod kterým rozsivky již nejsou schopny růst. Přesto bylo popsáno přes 100 druhů, které se vyskytují v pH pod 3,5. Většina z nich se ale na popsaných lokalitách vyskytovala náhodně, pouze 19 druhů hojně. Tyto druhy můžeme považovat za pravé acidofilní rozsivky. Jsou to *Achnanthes minutissima*, *Eunotia exigua*, *E. tenella*, *E. septentrionalis*, *E. osoresanensis*, *E. arcus*, *E. glacialis*, *E. pectinalis*, *Frustulia rhomboides*, *F. rhomboides* var. *saxonica*, *Nitzschia capitellata*, *N. communis*, *N. pusilla*, *N. vasta*, *Pinnularia acoricola*, *P. obscura*, *P. braunii* var. *amphicephala*, *P. subcapitata*, *P. terminitina*. Nesrovnalosti v taxonomii a možná synonymita druhů v různých pracích ovšem mohou snížit počet těchto druhů na méně než devět. Jako acidofilní tak můžeme v současnosti v rámci skupiny rozsivek označit pouze rody. Jsou to *Eunotia*, *Frustulia* a *Pinnularia* (DeNicola, 2000).

Třída Xantophyceae

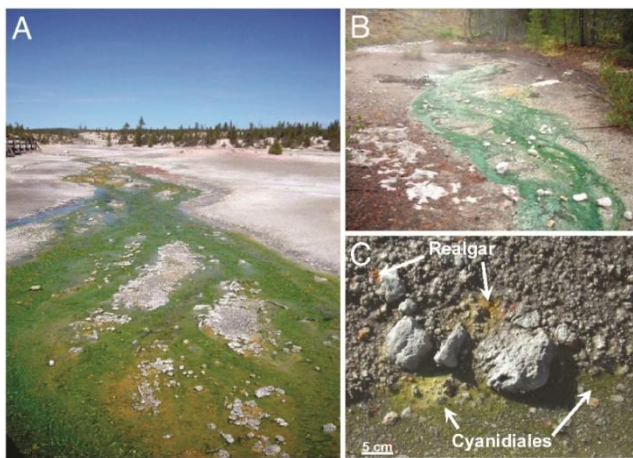
Jediný druh z této skupiny, který může být považován za acidofilní, je vláknitý druh *Tribonema* sp. (Xantophyceae). Byl popsán z těžební oblasti v regionu Buller na Novém Zélandu na dvou lokalitách s pH 3,1 a 3,4 (Winterbourn, 2000).

Říše Plantae

Oddělení Rhodophyta

Acidofilní zástupci ruduch (Obr. 3) se vyskytují převážně v geotermálních oblastech u vývěřů horkých a extrémně kyselých pramenů. *Cyanidium caldarium* (Cyanidiophyceae) je jednobuněčná řasa, obsahující barvivo fykocyanin. V přírodních lokalitách byla nalezena v pH 0,05–5,0, s optimem v pH 2–3. Maximální teplota výskytu je 55–56 °C, s optimem 45 °C (optimální parametry obou hodnot byly naměřeny pro maximální rychlost fotosyntézy). Je to jediný fotosyntetizující organismus, který se vyskytuje v prostředí s pH pod 5 a teplotou nad

40 °C. V minulosti byla zařazována i do jiných taxonomických skupin kvůli morfologické podobnosti s rodem *Chlorella* (Chlorophyta) a kvůli přítomnosti barviva fykocyaninu, které obsahují také sinice (Doemel a Brock, 1971). V okolí pramenů může *Cyanidium caldarium* vytvářet bohatá biofilmová společenstva. Společenstvo může být tvořeno více organismy (bakteriemi či houbami), mezi nimiž vznikají mutualistické vztahy (Belly et al., 1973). Další acidofilní řasy ze skupiny ruduch jsou *Galdieria sulphuraria* a *Cyanidioschyzon merolae* (Cyanidiophyceae), které se vyskytují také v okolí horkých kyselých pramenů (Albertano et al., 2000). Druh *Galdieria sulphuraria* byl nalezen také v řece Río Tinto a roste tedy ve velmi širokém rozpětí teplot (López-Archilla et al., 2000).



Obr. 3: Zástupci ze skupiny Cyanidiophyceae dominují nárostům, které se vyskytují nedaleko vývěrů geotermálních pramenů, NP Yellowstone (Qin et al., 2009).

Oddělení Chlorophyta

Na extrémně kyselých lokalitách je popisován druh *Chlamydomonas* sp., často označovaný jako *Chlamydomonas acidophila* (Chlorophyceae). Zelené jednobuněčné řasy jsou důležitou součástí fytoplanktonu na těchto stanovištích a *Chlamydomonas* sp. je často dominantní složkou. Oproti striktně acidofilním druhům má *Chlamydomonas acidophila* poměrně širokou toleranci k pH prostředí, roste v rozmezí 1,5–7,0 (Sheath et al., 1982; Lessmann et al., 2000; López-Archilla et al., 2000; Wollmann et al., 2000; Gerloff-Elias et al., 2005).

Chlamydomonas sp. a také kokální řasa *Coccomyxa* sp. (Trebouxiophyceae) byly nalezeny v extrémně kyselém jezírku Hromnice (pH 2,6). Také jednobuněčné řasy rodu *Dunaliella* (Chlorophyceae) jsou dobře adaptované na život v extrémně kyselých podmínkách.

Dunaliella acidophila roste při pH 1–2,5. Byla popsána například z přírodní rezervace Hájek (Soos) u Františkových lázní v České republice a z podobných lokalit v okolí Vesuvu v Itálii (Kalina a Váňa, 2005). Z lokalit v Lužici v Německu byly popsány také jednobuněčné druhy *Scourfieldia cordiformis* (Pedinophyceae) a *Nanochlorum* sp. (Trebouxiophyceae), které se

vyskytovaly v menším zastoupení v jezerech ovlivněných AMD s pH 2,3–2,9 (Lessmann et al., 2000). Z těžební lokality ovlivněné AMD na Novém Zélandu byly popsány vláknité druhy *Microspora* sp. (Chlorophyceae) a *Ulothrix* sp. (Ulvophyceae) rostoucí v pH 2,7–3,5.

Oddělení Charophyta

Z této skupiny se hojně na lokalitách ovlivněných AMD vyskytuje rod *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae) (Obr. 3), který vytváří vláknité porosty na dně kyselých toků (Hargreaves et al., 1975; Sabater et al., 2003). V roce 2006 byl z kontaminovaného toku s pH pod 3,0 na Novém Zélandu popsán nový druh *Klebsormidium acidophilum*. Od jiných druhů rodu *Klebsormidium* byl odlišen na základě morfologických a ultrastrukturálních změn, které v buňkách vznikly právě díky dlouhodobému růstu v prostředí s nízkým pH (Novis, 2006). Dalším acidofilním vláknitým druhem je *Mougeotia* sp. (Conjugatophyceae), vyskytující se na lokalitách obvykle společně s rodem *Klebsormidium* (Sabater et al., 2003). Na extrémně kyselých lokalitách se také vyskytuje druh *Zygonium ericetorum* (Conjugatophyceae), který vytváří husté vláknité porosty pokrývající dno jezer i toků (Aquilera et al., 2006; Kleeberg et al., 2006). *Zygonium ericetorum* se vyskytuje také v rašeliníštích, kde pokrývá bahnitě dno (Rydin a Jeglum, 2006).



Obr. 4: *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae) (Valente a Gomes, 2007).

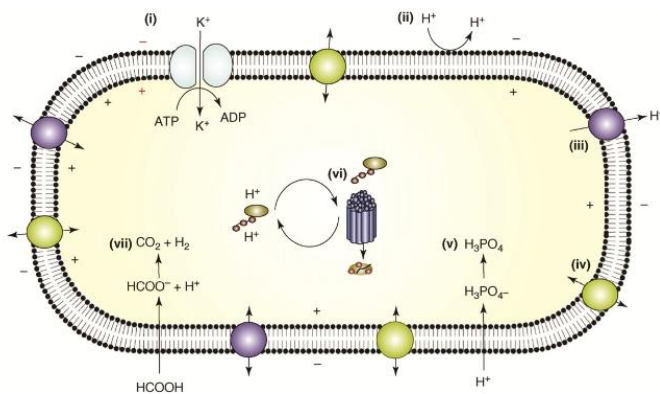
6. Ekofyziologické adaptace

Ve velmi kyselém prostředí se musí buňky sinic a řas vyrovnat s několika problémy. Tím hlavním je umět se vypořádat s okolní vysokou koncentrací H^+ iontů, která může způsobit okyselení cytosolu. Kyselé prostředí vyžaduje i adaptace na související jevy, jako jsou změny v dostupnosti některých živin, zvýšená koncentrace kovových iontů a omezený zdroj CO_2 z důvodu rychlého vyčerpávání uhličitanového zásobníku (Olaveson a Stokes, 1989; Gross, 2000).

6.1. Adaptace na vysokou koncentraci H^+ iontů v okolním prostředí

Bylo prokázáno, že buňky řas žijících ve velmi kyselém prostředí, si udržují pH cytosolu téměř neutrální (pH 5–7), což je nezbytné ke správnému fungování procesů v buňce (Gimmler et al., 1988). Aby bylo udrženo neutrální pH cytosolu, musí být zajištěna (alespoň částečná) neprostupnost buněčné plasmatické membrány pro protony. Zároveň je nezbytné aktivovat mechanismy, které umožní odstranit přebytek H^+ iontů z buňky či dokážou regulovat stupeň pH v buňce (Pick, 1999; Gross, 2000; Messerli et al., 2005).

Několik nedávných prací shrnuje poznatky o adaptacích plasmatické membrány (Brake a Hasiotis, 2010). Gross (2000) shrnul ve své práci, jaké předpoklady musí mít buňka v kyselém prostředí. Jestliže se pH prostředí blíží k 1, musí se plasmatická membrána vyrovnat s protonovým gradientem až 1: 1 000 000. Propustnost membrány pro protony ve velmi nízkém pH tedy nabývá hodnoty maximálně 100 nm s^{-1} (rostlinné buňky žijící v neutrálním prostředí mají permeabilitu membrány až $50 000 \text{ nm s}^{-1}$). Při vyšších hodnotách by došlo k okyselení cytosolu (Gimmler, 1992). Podle Baker-Austin a Dopson (2007) existuje několik procesů, které udržují homeostázu pH v buňkách acidofilních organismů. Plasmatická membrána má obrácený elektrický potenciál, s vnitřním kladným nábojem. Možným mechanismem, jak k tomu může dojít, je zvýšený transport draslíku. Případné přebytečné H^+ ionty jsou vylučovány ven z buňky sekundárními transportéry, kterých je v buňkách acidofilů mnohem více než v buňkách neutrofilů. Buňka také může obsahovat enzymy, které dokážou navázat přebytečné H^+ ionty (Obr. 4).



Obr. 4: Procesy spojené s udržení neutrálního pH v buňce acidofilního organismu (Baker-Austin a Dopson, 2007).

Pick (1999) studoval detailně vlastnosti plasmatické membrány acidofilní jednobuněčné zelené řasy *Dunaliella acidophila*. Zajímal se, jaké modifikace či strukturní adaptace základních transportních mechanismů jsou potřeba k zachování neutrálního pH cytosolu, jak se v buňce akumulují esenciální organické i anorganické elementy a jak je utvořen vnější povrch plasmatické membrány, aby omezil tok vodíkových protonů do buňky bez omezení transportu jiných iontů. Zjistil, že plasmatická membrána této řasy má kromě obráceného vnitřního elektrického potenciálu a zároveň kladný vnější povrchový náboj. Vnější pozitivní povrchový náboj není adaptivní znak, ale důsledek okolního nízkého pH. Za neutrálního pH je vnější náboj membrány záporný. Ale za nízkého pH je většina aniontových skupin (např. karboxylové skupiny, fosfáty), které jsou součástí proteinů a lipidů vnějšího povrchu membrány, protonována a utváří kladný náboj. Vnitřní kladný elektrický potenciál pomáhá udržet široký rozsah gradientu pH, který musí plasmatická membrána vydržet. Ten je generován výkonnou H⁺ ATPázou, která poskytuje vysokou kapacitu vylučování H⁺ iontů. Přítomnost výkonné H⁺ ATPázy je ovšem adaptivní znak. Kvůli změně elektrického potenciálu nemohou fungovat některé transmembránové pumpy, které umožňují přijímat esenciální prvky, například K⁺ ionty. Ty jsou přijímány přes K⁺/H⁺ kotransportéry, které v buňce umožňují udržovat až 100krát vyšší koncentraci K⁺ iontů a přispívají tudíž k vnitřnímu kladnému elektrickému potenciálu membrány. Messerli et al. (2005) studovali energetickou náročnost udržení neutrálního pH cytosolu srovnáním acidofilní řasy *Chlamydomonas* sp. a neutrofilní řasy *Chlamydomonas reinhardtii*. Jejich experimenty ukázaly, že proces odstraňování H⁺ iontů z buňky transmembránovými pumpami je energeticky náročný. Spalování ATP u acidofilního druhu probíhalo mnohem rychleji než u druhu neutrofilního. Nic ovšem nenaznačuje, že by primární struktura H⁺ transportérů u acidofilních organismů byla odlišná od neutrofilních. Autoři se také domnívají, že acidofilní organismy vyvinuly dvě

skupiny enzymů, které jim pomáhají žít v kyselém prostředí – enzymy působící v kanálech plasmatické membrány a hydrolytické enzymy, které jsou součástí buněčné stěny.

Podle Gimmlera et al. (1989) jsou organismy při nedostatečném zdroji energie nebo za úplné tmy schopné dočasně zajistit neprostupnost plasmatické membrány zabudováním sterolů, proteinů či nenasycených mastných kyselin.

Mechanismy, kterými buňky sinic a řas překonávají gradient pH, nebyly zatím zcela prozkoumány. Baker-Austin a Dopson (2007) předložili několik dosud neobjasněných otázek, které by mohly být podnětem k dalšímu studiu. Patří mezi ně například: Používají všechny acidofilní organismy stejné mechanismy k zajištění obráceného membránového potenciálu? Jaké proteiny se podílejí na stavbě specifických membránových kanálů v těchto buňkách? Jaká je stavba membránových pump, které pomáhají odstraňovat přebytek H^+ iontů z buňky? Obsahují tyto organismy nějaké speciální enzymy stabilní v extrémně kyselém prostředí?

6.2. Tolerance ke zvýšené koncentraci těžkých kovů

Pro extrémně kyselé vodní prostředí je charakteristická vysoká koncentrace těžkých kovů (viz. Kapitola 3).

Některé kovy jsou v buňkách důležitými esenciálními prvky (zinek, měď), nicméně těžké kovy jsou pro řasy ve zvýšené koncentraci toxické. Organismy, které se nacházejí v prostředí s nízkým pH, jsou nuceny se s tímto problémem vypořádat. Bylo prokázáno, že několik druhů řas je schopno tolerovat vysokou koncentraci těžkých kovů ve svém okolí. Tato tolerance je výsledkem fyziologických a genetických adaptací (Rai et al., 1981). Pro buňku je zásadní, udržet si vnitřní netoxickou koncentraci kovových iontů. K udržení této rovnováhy slouží především dva mechanismy. Jedním je zabránění průniku kovových iontů do buňky, který je zajištěn ochrannou vrstvou extracelulárních polymerických látek (viz. Kapitola 6.3). Druhým, v případě zvýšení nežádoucí koncentrace kovových iontů uvnitř buňky, je zabránění účasti těchto iontů při metabolických procesech – jejich kompartmentace a tvorba komplexů. To je zajištěno produkcí peptidů metalothioneinů třídy III (MtIII), odvozených od glutationu. Produkce MtIII peptidů je rychlou reakcí buňky na krátkodobý i dlouhodobý stres z nežádoucí koncentrace těžkých kovů a může pozměnit fenotyp řasových buněk k jejich toleranci (Perales-Vela et al., 2006). Syntéza MtIII je indukována přítomností kovových iontů, jako například Cd^{2+} , Ag^+ , Bi^{3+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Au^{2+} (Robinson, 1990). Výsledné kovové komplexy i zvýšené množství MtIII se nacházejí v chloroplastech a mitochondriích buněk řas. Není jasné, zda dochází k syntéze MtIII v cytosolu, navázání kovu a transportu do organel či

zda je MtIII syntetizován přímo v organelách a kovy jsou vázány do nich. Je možné, že jde o kooperaci obou procesů (Mendoza-Cozátl et al., 2004). Z hlediska tolerance jsou nejdolnějšími ty organismy, které produkují jak extracelulární polymerické látky, tak i peptidy MtIII (Pistocchi et al., 2000).

Dočasným mechanismem, jak zajistit toleranci buněk k těžkým kovům je produkce tzv. heat-shock proteinů (Hsp). Tyto proteiny nejsou syntetizovány pouze při teplotním stresu, ale i při působení jiných stresových faktorů (např. nadměrné ozáření, anoxie, infekce), mezi něž patří také expozice těžkým kovům (Lewis et al., 1999). Zvýšená produkce Hsp, hlavně tzv. small Hsp, byla prokázána u acidofilního druhu *Chlamydomonas acidophila*, vyskytující se v jezerech ovlivněných AMD v Německu (Spijkerman et al., 2007).

V geotermálních oblastech i v oblastech s AMD se mimo zvýšenou koncentraci výše zmíněných těžkých kovů může vyskytovat i značné množství toxického arsenu (Nordstrom et al., 2005; Casiot et al., 2004). Některé fotoautotrofní řasy (*Cyanidioschyzon* sp., *Cyanidium*, *Galdieria*, *Euglena mutabilis*) jsou schopné transformovat toxické formy arsenu (AsO_3^{3-} , AsO_2^-) na méně toxické (AsO_4^{3-}) a ty pak v buňce akumulovat či uvolnit zpět do okolního prostředí. Tato vlastnost umožňuje buňkám přežít za zvýšené koncentrace toxického arsenu, ale i hraje důležitou roli v celkovém koloběhu arsenu (Qin et al., 2009).

V prostředí s vysokým obsahem těžkých kovů je důležitá tzv. biosorbce (odstranění látek z roztoku pomocí biologického materiálu) mikroorganismy. Tím, že buňky jednobuněčných řas i biofilmových společenstev dokážou akumulovat těžké kovy (buď vnitrobuněčnou akumulací, nebo vazbou pomocí EPS) i po dlouhou dobu, představují tyto organismy určitou možnost například v sanaci vodního prostředí ovlivněného AMD (Gadd, 2009).

6.3. Extracelulární polymerické látky

Zvláštní strategie na překonání nepříznivých vlivů či podmínek prostředí se vyvinula u biofilmových společenstev. Jedná se o produkci extracelulárních polymerických látek (extracellular polymeric substances – EPS), označovaných také jako exopolymery či exopolysacharidy. EPS jsou součástí biofilmových společenstev bakterií, hub, řas a protist a jejich složení je druhově specifické (Neu, 2003). Tyto látky jsou sekretovány buňkami a slouží primárně k udržení adheze biofilmu. Sekundárně ale také chrání buňku, například vazbou a absorbcí kovů či slouží jako difuzní bariéra proti toxinům (Brake a Hasiotis, 2010). Exopolymery obsahují funkční skupiny (karboxyly, hydroxyly, aminové skupiny), které mohou oddělit ionty a molekuly toxinů a zmírnit toxické působení látek v okolí buněk. EPS

také mohou vázat těžké kovy. V EPS jsou inaktivovány některé enzymy blokací esenciálních vazebných skupin na enzymu, poté jsou přemístěny již přítomné esenciální kovy z enzymu a modifikována strukturní formace enzymu. Biofilm funguje nejefektivněji, když jsou EPS lokalizovány v oddělených oblastech, které se nacházejí dále od buněk. To také dovoluje vazebným enzymům být blíže k buňkám a zajistit jejich lepší ochranu (Decho, 2000). Exopolymery také mohou omezit difuzi látek k povrchu buňky či přispět při odstraňování metabolitů buňky z jejího povrchu. Rychlost difuze závisí na typu biofilmu a koncentraci látek rozpuštěných v okolním vodním prostředí (Stewart, 1998).

García-Meza (2005) studoval vlastnosti EPS u biofilmu zelené řasy *Chlorococcum* sp. a sinice *Phormidium* v sedimentu důlních odkališť. Jeho práce ukazuje, že buňky vykazují větší produkci EPS se zvyšující se expozicí těžkým kovům.

6.4. Ostatní adaptace

V extrémně kyselém prostředí, kde je omezen uhličitanový zásobník nebo dostupnost fosfátů, mohou buňky řas a sinic produkovat enzymy, které jim umožní získávat tyto látky z okolí z jiných zdrojů. Aby mohly být tyto enzymy účinné, musí být odolné vůči nízkému pH nebo mít krátký biologický poločas. Někteří fakultativní heterotrofové (např. *Euglena mutabilis*, *Galdieria sulphuraria*) mohou růst na rozpustných minerálech. Aby si buňky mohly z okolí zajistit polysacharidy či jiné polymery, syntetizují především extracelulární hydrolázy (Gross, 2000). Rozpuštěné formy fosforu v prostředí s AMD vytvářejí nerozpustné sraženiny v sedimentu a dostupnost tohoto prvku je proto omezena (viz. Kapitola 3). Například extracelulární fosfatázy *Chlamydomonas acidophila* hrají důležitou roli v zajištění příjmu fosforu nezbytného pro buňky (Boavida a Heath, 1986). Acidofilní řasa *Dunaliella acidophila* přijímá fosfor aktivně pomocí protonového gradientu plazmatické membrány (Hirsch et al., 1993) a aktivita karboanhydráz je ve srovnání s neutrofilními druhy výrazně omezena (Geib et al., 1996).

Uhličitanový zásobník je v kyselém prostředí rychle vyčerpán a je důležité, aby si řasy zajistily dostatek CO₂ pro fotosyntézu. Nedostatek CO₂ v prostředí vedl u některých prokaryotních i eukaryotních organismů k vytvoření tzv. mechanismů koncentrujících CO₂ (carbon concentrating mechanisms – CCM). Přítomnost CCM závisí na schopnosti organismu aktivně přijímat CO₂ či HCO₃⁻. U acidofilních řas nebyl výskyt CCM jasně prokázán, i když vzhledem k dostupnosti forem uhlíku by mohl být předpokládán. Existují druhy, které CCM mají (např. *Dunaliella acidophila*, *Cyanidioschyzon merolae*), ale i druhy, kterým CCM

schází (např. *Cyanidium caldarium*, *Chlamydomonas acidophila*). Vzhledem k tomu, že primární produkce na některých extrémně kyselých stanovištích je omezena dostupností i jiných živin, není zřejmě vytvoření CCM pro acidofilní řasy hlavním úkolem a záleží na celkovém chemismu konkrétní lokality (Diaz a Maberly, 2009).

Za velmi nízkého pH probíhá difuze CO₂ mezi atmosférou a vodou mnohem rychleji a uhličitanový zásobník je opět částečně vyrovnáván. V rámci vodního prostředí je ale difuze pomalá, a proto omezuje dostupnost CO₂. Některé řasy proto rostou terestricky či endoliticky (např. termoacidofilní řasa *Galdieria sulphuraria*), aby mohl atmosférický CO₂ rychle difundovat do buněk (Gross a Oesterhelt, 1999; Gross, 2000).

V prostředí s velmi nízkým pH často dominují acidofilní řasy bez celulózní buněčné stěny. V kyselých podmínkách jsou vodíkové vazby v celulózových vláknech oslabené a mohlo by dojít k nekontrolovanému růstu buněčné stěny. Řasy ve velmi kyselých podmínkách tedy často mají buď necelulózní buněčnou stěnu nebo ji vůbec nemají. Například povrch buněk *Chlamydomonas sp.* je tvořen bílkovinou zvanou chlamys, buňky druhů *Cyanidioschyzon merolae* či *Ochromonas sp.* buněčnou stěnu nemají (Gross, 2000).

6.5. Evoluční původ adaptací

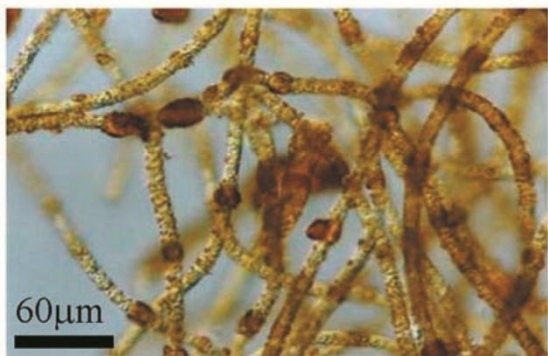
Termoacidofilní řasa *Galdieria sulphuraria* vykazuje neobvyklou metabolickou pružnost, roste fototrofně i heterotrofně na více než 50 různých zdrojích uhlíku. Adaptace, které jí umožňují žít v extrémním prostředí, byly v minulosti nejspíš způsobeny horizontálním přenosem genů z různých extrémofilních bakterií a archeí (nejméně 5 % nebo alespoň 75 různých genů). Horizontální přenos genů byl doprovázen rozšiřováním celých genových rodin, tj. příbuzných genů, které kódují podobné proteiny. Díky introdukci nových genů je řasa schopna syntetizovat důležité proteiny a měnit metabolické dráhy, které jí umožňují změnit propustnost membrány pro protony, zmírnit toxicitu některých kovů ve svém okolí metabolickou transformací či tolerovat široké teplotní rozpětí. Zatímco u archeí a bakterií je rozsáhlý horizontální přenos genů dobře znám, u jednobuněčných eukaryotních organismů jsou informace o tomto fenoménu podstatně omezenější. To otevírá nový pohled na podstatu evoluce genomu těchto extrémofilních mikroorganismů (Schönknecht et al., 2013).

7. Využití

Možnosti výzkumu ekofyziologie acidofilních řas a sinic a extrémního prostředí, v němž se vyskytují, zatím určitě nebyly zdaleka vyčerpány. Nynější znalosti této zajímavé ekologické skupiny můžeme uplatnit v nejrůznějších oborech a je zde také určitý potenciál uplatnění v biotechnologiích.

Na lokalitách ovlivněných AMD byl zkoumán vliv biologických procesů na neutralizaci prostředí a odstranění těžkých kovů. Je jisté, že některé řasy a sinice v tomto prostředí mají schopnost přijímat toxické kovové ionty, a to buď sorpcí do buňky, nebo navázáním na extracelulární látky biofilmu. Otázkou je, jak moc je tato sorpce efektivní vzhledem ke změně chemismu prostředí a také zda je možné navázané kovy získat zpět z biomasy. *Euglena mutabilis* (Euglenophyceae) dokáže vnitrobuněčně navázat z prostředí železo a jiné polutanty. V buňce jsou uloženy ve formě sraženin, které tvoří mikroskopická zrnka. Po smrti buňky tato zrnka mohou sloužit jako jádro pro další nabalování sražených látek. Nicméně tato sorpce probíhá v tak malém měřítku, že v podstatě nemění chemismus prostředí (Brake a Hasiotis, 2010).

V extrémně kyselém prostředí dochází ke srážení velkého množství sulfidů železa i oxidovaných minerálů. Sraženiny vytváří tenkou vrstvu na biologických i detritických materiálech a přesně kopírují jejich strukturu (Obr. 5).



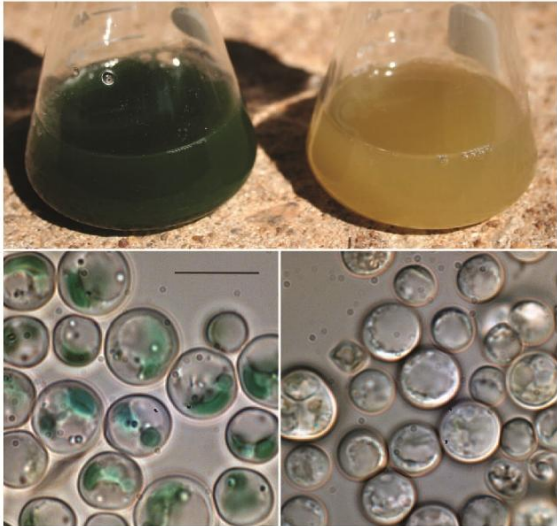
Obr. 5: Okrové sraženiny na buněčných stěnách *Klebsormidium* (Klebsormidiophyceae) (Valente a Gomes, 2007)

Vznikají tak vrstevnaté útvary podobné stromatolitům. Každá vrstva takto mineralizovaných mikrobiálních nárostů představuje poměrně přesný záznam o místní diverzitě, biologických procesech a podmínkách vzniku. Tyto paleobiologické informace nám umožňují pochopit mikrobiální procesy, které probíhaly v době raného života na Zemi (Brake a Hasiotis, 2010).

Můžeme je ale uplatnit i jinak. Na řece Río Tinto byly zkoumány terasovité usazeniny, jejichž stáří bylo odhadnuto až 2 miliony let. V různých vrstvách byly nalezeny fosilizované zbytky bakterií, houbových a řasových vláken, pylových zrn, částí rostlin a kutikuly hmyzu. Sedimentární horniny s podílem železa (např. hematit, goetit, schwertmanit, jarosit) byly nalezeny také ve vzorcích odebraných z povrchu Marsu. Extrémně kyselou řeku Río Tinto lze považovat za analogii tohoto prostředí na Zemi. Jestli na Marsu v minulosti existoval život, mohl by být zaznamenán v těchto sedimentech. Je třeba zjistit, jaká je jejich reálná schopnost zachovávat v kyselém prostředí biologické zbytky jako fosilie. Získané poznatky můžeme použít ke zdokonalení metod odběrů a měření, které v budoucnosti proběhnou na Marsu či jiných mimozemských tělesech (Fernández-Remolar a Knoll, 2008).

Mikroskopické řasy jsou využívány také v potravinářství. Jejich uplatnění jako zdroj potravin je zatím málo rozšířené kvůli technické náročnosti jejich kultivace a také malé znalosti jejich chemického a nutričního složení. Acidofilní řasa *Galdieria sulphuraria* (Cyanidiophyceae) může růst autotrofně, ale i heterotrofně, což umožňuje její poměrně levnou kultivaci (Obr. 6). Také se dá kultivovat ve velmi kyselých podmínkách, což zabraňuje kontaminaci kultury bakteriemi. Buňky této řasy jsou bohaté na proteiny a polysacharidy a chudé na lipidy. Biomasa obsahuje značný podíl nerozpustných vláknin. *Galdieria sulphuraria* má dobrý potenciál jako přísada do potravin a díky vysokému obsahu vlákniny je také aplikovatelná v různých zdravotních dietách. Malý obsah lipidů umožňuje dobrou skladovatelnost biomasy, při níž téměř nedochází k oxidaci. Byl také vypracován postup na extrakci proteinů této řasy, které se ukázaly být dobrým substrátem pro enzymy lidského trávicího systému (Graziani et al., 2013).

Galdieria sulphuraria je vhodným alternativním organismem pro produkci barviva fykocyaninu, který se například využívá jako fluorescenční marker. Komerčně je fykocyanin produkován pomocí kultivace fototrofní sinice *Spirulina platensis*. *Galdieria sulphuraria* obsahuje celkově sice menší množství barviva, ale schopnost heterotrofního růstu je velkou výhodou pro kultivaci. Zároveň umí využívat různé zdroje uhlíku. Řasa je schopná barvivo produkovat i v podmínkách s omezenou dostupností uhlíku i bez zdroje světla. (Sloth et al., 2006).



Obr. 6: Ruducha *Galdieria sulphuraria* kultivovaná fototrofně (vlevo) a heterotrofně na glukóze (vpravo).

8. Závěr

Cílem mojí bakalářské práce bylo shrnout dosavadní poznatky o specifické skupině primárních producentů – acidofilních řasách a sinicích.

Řasy a sinice rostoucí ve velmi nízkém pH (< 3), najdeme téměř napříč všemi taxonomickými skupinami. Vzhledem k tomu, že extrémně kyselé lokality se nachází po celém světě, jsou velmi různorodé a poměrně geograficky oddělené, lze předpokládat, že adaptace k nízkému pH jsou velmi staré či vznikly vícekrát nezávisle na sobě. Sinice ovšem k nízkému pH příliš dobře adaptované nejsou a jsou tedy považovány spíše za acidotolerantní, než za acidofilní.

Acidofilní organismy vyvinuly celou řadu adaptací, které jim umožňují přežít v extrémně kyselém prostředí. Především se jedná o zajištění neutrálního pH cytosolu, aby mohly v buňce probíhat metabolické procesy. Plasmatická membrána buněk má omezenou propustnost pro vodíkové ionty. Membrána má také obrácený elektrický potenciál a má vnitřní kladný náboj. Někdy dochází i k vytvoření kladného náboje na vnější straně membrány v důsledku protonace látek, které membrána obsahuje. Je vyvinuto několik mechanismů na odstranění přebytečných vodíkových iontů z buňky, membrána obsahuje účinnou ATPázu, buňky vyvinuly specializované enzymy a transportéry. Buňky musí být adaptované ke zvýšené koncentraci těžkých kovů, které mají v kyselém prostředí vyšší rozpustnost. V případě průniku toxických kovových iontů do buňky, je zabráněno jejich účasti při metabolických procesech kompartmentací v buňce. V toleranci k těžkým kovům také pomáhají některé enzymy, například tzv. heat shock proteiny. Některé druhy jsou schopny kovové ionty transformovat na méně toxické. U druhů, které vytváří biofilmová společenstva, je vnější ochranou produkce slizovitého obalu, který je tvořený extracelulárními polymerickými látkami. Extracelulární enzymy pomáhají acidofilním řasám a sinicím využít i méně dostupné zdroje živin. Celá řada těchto adaptací vznikla díky horizontálnímu přenosu vhodných genů z extrémofilních bakterií a archeí.

Znalosti o ekofyziologii acidofilních sinic a řas je možné využít v nejrůznějších oborech. Mohly by posloužit k izolaci nových acidostabilních enzymů, jejich složení umožňuje širokou aplikaci v potravinářství a zdravotnictví. Schopnost extrémně kyselých prostředí zachovávat fosilie se dá využít při zkoumání raných životních forem na Zemi i při průzkumu a hledání života na mimozemských tělesech.

Této zajímavé skupině organismů bych se chtěla věnovat i nadále. Především proto, že znalosti o nich nejsou ještě zdaleka vyčerpané a acidofilní řasy a sinice jsou tedy podnětným námětem k dalšímu studiu.

9. Seznam použité literatury

- Aguilera, A., Manrubia, S., Gómez, F., Rodríguez N., Amils, R. (2006): Eukaryotic community distribution and its relationship to water physicochemical parameters in an extreme acidic environment, Río Tinto (southwestern Spain). *Applied and Environmental Microbiology* **72** (8): 5325-5330.
- Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., Gómez, F., Amils, R. (2007): Development and structure of eukaryotic biofilms in an extreme acidic environment, Río Tinto (SW, Spain). *Microbial Ecology* **53** (2): 294-305.
- Akcil, A., Koldas, S. (2006): Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. *Journal of Cleaner Production* **14** (12-13): 1139-1145.
- Almer, B., Dickson, W., Ekström, C., Hörnström, E., Miller, U. (1974): Effects of acidification on Swedish lakes. *Ambio* **3** (1): 30-36.
- Baker-Austin, C., Dopson, M. (2007): Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology* **15** (4): 165-171.
- Banks, D., Younger, P. L., Arnesen, R. T., Iversen, E. R., Banks, S. B. (1997): Mine-water chemistry: the good, the bad and the ugly. *Environmental geology* **32** (3): 157-174.
- Belly, R. T., Tansey, M. R., Brock, T. D. (1973): Algal excretion of ¹⁴C-labeled compounds and microbial interactions in *Cyanidium caldarium* mats. *Journal of Phycology* **9** (2): 123-127.
- Boavida, M. J., Heath, R. T. (1986): Phosphatase activity of *Chlamydomonas acidophila* Negro (Volvocales, Chlorophyceae). *Phycologia* **25** (3): 400-404.
- Brake, S. S., Dannelly, H. K., Connors, K. A. (2001): Controls on the nature and distribution of an alga in coal mine-waste environments and its potential impact on water quality. *Environmental Geology* **40** (4-5): 458-469.
- Brake, S. S., Hasiotis, S. T. (2010): Eukaryote dominated biofilms and their significance in acidic environments. *Geomicrobiology Journal* **27** (6-7): 534-558.
- Brock, T. D. (1978): The habitats. In: Brock, T. D. (editor): *Thermophilic microorganisms and life at high temperatures*, Springer-Verlag, Berlin, 12-38.
- Casiot, C., Bruneel, O., Personné, J. - C., Leblanc, M., Elbaz-Poulichet, F. (2004): Arsenic oxidation and bioaccumulation by the acidophilic protozoan, *Euglena mutabilis*, in acid mine drainage (Carnoulés, France). *The Science of Total Environment* **320** (2-3): 259-267.
- Clymo, R. S. (1963): Ion exchange in *Sphagnum* and its relation to bog ecology. *Annals of Botany* **27** (2): 309-324.

- Davis Jr., R. A., Welty, A. T., Borrego, J., Morales, J. A., Pendon, J. G., Ryan, J. G. (2000): Rio Tinto estuary (Spain): 5000 years of pollution. *Environmental Geology* **39** (10): 1107-1116.
- Decho, A. W. (2000): Exopolymer microdomains as a structuring agent for heterogeneity within microbial biofilms. *In*: Riding, R. E., Awramik, S. M. (editors): *Microbial sediments*, Springer-Verlag, Berlin, 9-15.
- DeNicola, D. M. (2000): A review of diatoms found in highly acidic environments. *Hydrobiologia* **433** (1-3): 111-122.
- Diaz, M. M., Maberly, S. C. (2009): Carbon-concentrating mechanisms in acidophilic algae. *Phycologia* **48** (2): 77-85.
- Doemel, W. N., Brock, T. D. (1971): The physiological ecology of *Cyanidium caldarium*. *Journal of General Microbiology* **67** (1): 17-32.
- Driscoll, C. T. (1985): Aluminum in acidic surface waters: chemistry, transport and effects. *Environmental Health Perspectives* **63**: 93-104.
- Evangelou, V. P. (1998): Pyrite chemistry: The key for abatement of acid mine drainage. *In*: Geller, W., Klapper, H., Salomons, W. (editors): *Acidic mining lakes: acid mine drainage, limnology and reclamation*, Springer-Verlag, Berlin, 197-222.
- Fernández-Remolar, D. C., Knoll, A. H. (2008): Fossilization potential for iron-bearing minerals in acidic environments of Rio Tinto, Spain: Implications for Mars exploration. *Icarus* **194** (1): 72-85.
- Gadd, G. M. (2009): Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **84** (1): 13-28.
- García-Meza, J. V., Barrangue, C., Admiraal, W. (2005): Biofilm formation by algae as a mechanism for surviving on mine tailings. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24** (3): 573-581.
- Geib, K., Gollmack, D., Gimmler, H. (1996): Is there a requirement for an external carbonic anhydrase in the extremely acid-resistant green alga *Dunaliella acidophila*? *European Journal of Phycology* **31** (3): 273-284.
- Geller, W., Klapper, H., Schultze, M. (1998): Natural and anthropogenic sulfuric acidification of lakes. *In*: Geller, W., Klapper, H., Salomons, W. (editors): *Acidic mining lakes: acid mine drainage, limnology and reclamation*, Springer-Verlag, Berlin, 3-14.
- Gerloff-Elias, A., Spijkerman, E., Proschold, T. (2005): Effect of external pH on the growth, photosynthesis and photosynthetic electron transport of *Chlamydomonas acidophila* Negro, isolated from an extremely acidic lake (pH 2.6). *Plant, Cell and Environment* **28** (10): 1218-1229.

- Gimmler, H., Weiss, U., Weiss, C. (1989): pH - regulation and membrane potential of the extremely acid resistant green alga *Dunaliella acidophila*. In: Dainty, J. (editor): Plant membrane transport, Springer-Verlag, Berlin, 389-390.
- Gimmler, H., Weis, U. (1992): *Dunaliella acidophila* – life at pH 1.0. In: Avron, M., Ben-Amotz, A. (editors): *Dunaliella* – physiology, biochemistry and biotechnology, CRC Press, Florida (USA), 99-133.
- Gorham, E. (1956): On the chemical composition of some waters from the Moor House Nature Reserve. *Journal of Ecology* **44** (2): 375-382.
- Graziani, G., Schiavo, S., Nicolai, M. A., Buono, S., Fogliano, V., Pinto, G., Pollio, A. (2013): Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. *Food & Function* **4** (1): 144-152.
- Gross, W., Oesterhelt, C. (1999): Ecophysiological studies on the red alga *Galdieria sulphuraria* isolated from south-west Iceland. *Plant Biology* **1** (6): 694-700.
- Gross, W. (2000): Ecophysiology of algae living in highly acidic environments. *Hydrobiologia* **433** (1-3): 31-37.
- Gyure, R. A., et al. (1987): Algal and bacterial activities in acidic (pH 3) strip mine lakes. *Applied and Environmental Microbiology* **53** (9): 2069-2076.
- Helmer, E. H., Urban, N. R. a Eisenreich, S. J. (1990): Aluminum geochemistry in peatland waters. *Biogeochemistry* **9** (3): 247-276.
- Hemond, H. F. (1980): Biogeochemistry of Thoreau's bog, Concord Massachusetts. *Ecological Monographs* **50** (4): 507-526.
- Hirsch, R., De Guia, M., Falkner, G., Gimmler, H. (1993): Flexible coupling of phosphate uptake in *Dunaliella acidophila* at extremely low pH values. *Journal of Experimental Botany* **44** (8): 1321-1330.
- Hrdinka, T., Šobr, M., Fott, J., Nedbalová, L. (2013): The unique environment of the most acidified permanently meromictic lake in the Czech republic. *Limnologica*, in press.
- Hruška, J., Kopáček, J. (2005): Kyselý déšť stále s námi – zdroje, mechanismy, účinky, minulost a budoucnost. Edice PLANETA XII: 5/2005, str. 24.
- Johnson, D. B. (1998): Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology* **27** (4): 307-317.
- Kalina, T., Váňa, J. (2010): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii, Nakladatelství Karolinum, Praha, str. 463.
- Kamjunke, N., Gaedke, U., Tittel, J., Weithoff, G., Bell, E. M. (2004): Strong vertical differences in the plankton composition of an extremely acidic lake. *Archiv für Hydrobiologie* **161** (3): 289-306.

- Kleeberg, A., Schubert, H., Koschorreck, M., Nixdorf, B. (2006): Abundance and primary production of filamentous green algae *Zygonium ericetorum* in an extremely acid (pH 2.9) mining lake and its impact on alkalinity generation. *Freshwater Biology* **51** (5): 925-937.
- Kopáček, J., Ulrich, K. U., Hejzlar, J., Borovec, J., Stuchlík, E. (2001): Natural inactivation of phosphorus by aluminium in atmospherically acidified water bodies. *Water Research* **35** (16): 3783-3790.
- Kwiatkowski, R. E., Roff, J. C. (1976): Effects of acidity on the phytoplankton and primary productivity of selected northern Ontario lakes. *Canadian Journal of Botany* **54** (22): 2546-2561.
- Lee, Y. H. (1985): Aluminium speciation in different water types. *Ecological Bulletins* **37**: 109-119.
- Lellák, J., Kubíček, F. (1991): Hydrobiologie, Nakladatelství Karolinum, Praha, str. 80.
- Lessmann, D., Fyson, A., Nixdorf, B. (2000): Phytoplankton of the extremely acidic mining lakes of Lusatia (Germany) with pH \leq 3. *Hydrobiologia* **433** (1-3): 123-128.
- Lewis, S., Handy, R. D., Cordi, B., Billingham, Z., Depledge, M. H. (1999): Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* **8** (5): 351-368.
- López-Archilla, A. I., Marin, I., Amils, R. (2001): Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto River, Spain. *Microbial Ecology* **41** (1): 20-35.
- Marini, L., Zuccolini, M. V., Saldi, G. (2003): The bimodal pH distribution of volcanic lake waters. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* **121** (1-2): 83-98.
- Mendoza-Cózatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., Moreno-Sánchez, R. (2005): Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiological Reviews* **29** (4): 653-671.
- Messerli, M. A., Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E., Jung, S. K., Smith, P. J. S., Sogin, M. L. (2005): Life at acidic pH imposes an increased energetic cost for a eukaryotic acidophile. *Journal of Experimental Biology* **208** (13): 2569-2579.
- Neu, T. R., Eitner, A., Paje, M. L. (2003): Development and architecture of complex environmental biofilms. In: Krumbein, W. E., Paterson, D. M., Zavarzin, G. A., (editors): Fossil and recent biofilms: A natural history of life on Earth, Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, 29-45.
- Nixdorf, B., Wollmann, K., Deneke, R. (1998): Ecological potentials for planktonic development and food web interactions in extremely acidic mining lakes in Lusatia. In: Geller, W., Klapper, H., Salomons, W. (editors): Acidic mining lakes: acid mine drainage, limnology and reclamation, Springer-Verlag, Berlin, 148-167.

- Nixdorf, B., Fyson, A., Krumbeck, H. (2001): Review: plant life in extremely acidic waters. *Environmental and Experimental Botany* **46** (3): 203-211.
- Nordstrom, D. K., Ball, J. W., McCleskey, R. B. (2005): Ground water to surface water: Chemistry of thermal outflows in Yellowstone National Park. *In: Inskeep, W., McDermott, T. R. (editors): Geothermal biology and geochemistry in Yellowstone National Park*, 73-94.
- Novis, P. M. (2006): Taxonomy of *Klebsormidium* (Klebsormidiales, Charophyceae) in New Zealand streams and the significance of low pH habitats. *Phycologia* **45** (3): 293-301.
- Novis, P. and Harding J. S. (2007): Extreme acidophiles: freshwater algae associated with acid mine drainage. *In: Seckbach, J. (editor): Algae and cyanobacteria in extreme environments*, Springer-Verlag, Dodrecht, 443-463.
- Olaveson, M. M., Stokes, P. M. (1989): Responses to the acidophilic alga *Euglena mutabilis* (Euglenophyceae) to carbon enrichment at pH 3. *Journal of Phycology* **25** (3): 529-539.
- Pedrozo, F., Kelly, L., Diaz, M., Temporetti, P., Baffico, G., Kringel, R., Friese, K., Mages, M., Geller, W., Woelfl, S. (2001): First results on the water chemistry, algae and trophic status of an Andean acidic lake system of volcanic origin in Patagonia (Lake Caviahue). *Hydrobiologia* **452** (1-3): 129-137.
- Perales-Vela, H. V., Peña-Castro, J. M., Cañizares-Villanueva, R. O. (2006): Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* **64** (1): 1-10.
- Pick, U. (1999): *Dunaliella acidophila* – a most extreme acidophilic alga. *In: Seckbach, J. (editor): Enigmatic microorganisms and life in extreme environments*, Kluwer Academic Publishers, Dodrecht, 465-478.
- Pistocchi, R., Mormile, M. A., Guerrini, F., Isani, G., Boni, L. (2000): Increased production of extra- and intracellular metal-ligands in phytoplankton exposed to copper and cadmium. *Journal of Applied Phycology* **12** (3-5): 469-477.
- Pitter, P. (1999): Koncepce neutralizačních kapacit v hydrochemii a technologii vody. *Chemické listy* **93**: 509-511.
- Qin, J., Lehr, C. R., Yuan, C., Le, X. C., McDermott, T. R., Rosen, B. P. (2009): Biotransformation of arsenic by a Yellowstone thermoacidophilic eukaryotic alga. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106** (13): 5213-5217.
- Rai, L. C., Gaur, J. P., Kumar, H. D. (1981): Phycology and heavy-metal pollution. *Biological Reviews* **56** (2): 99-151.
- Robinson, N. J. (1990): Metal-binding polypeptides in plants. *In: Shaw, A. J. (editor): Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*, CRC Press, Boca Raton, 195-214.
- Rydin, H., Jeglum, J. K. (2006): *The biology of peatlands*, Oxford University Press, New York, str. 26.

- Sheath, R. G., Havas, M., Hellebust, J. A., Hutchinson, T. C. (1982): Effects of long-term natural acidification on the algal communities of tundra ponds at the Smoking Hills, N.W.T., Canada. *Canadian Journal of Botany* **60** (1): 58-72.
- Schönknecht, G. et al. (2013): Gene transfer from Bacteria and Archea facilitated evolution of an extremophilic eukaryote. *Science* **339** (6124): 1207-1210.
- Singer, P. C., Stumm, W. (1970): Acid mine drainage: the rate determining step. *Science* **167** (3921): 1121-1123.
- Singh, A., Agrawal, M. (2008): Acid rain and its ecological consequences. *Journal of Environmental Biology* **29** (1): 15-24.
- Sloth, J. K., Wiebe, M. G., Eriksen, N. T. (2006): Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Enzyme and Microbial Technology* **38** (1-2): 168-175.
- Spijkerman, E., Barua, D., Gerloff-Elias, A., Kern, J., Gaedke, U., Heckathorn, S. A. (2007): Stress responses and metal tolerance of *Chlamydomonas acidophila* in metal-enriched lake water and artificial medium. *Extremophiles* **11** (4): 551-562.
- Steinberg, C. E. W., Schäfer, H., Beisker, W. (1998): Do acid-tolerant Cyanobacteria exist? *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **26** (1): 13-19.
- Stewart, P. S. (1998): A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* **59** (3): 261-272.
- Stumm, W., Morgan, J. J (1996): Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters, John Wiley & Sons, New York, str. 273.
- United States Environmental Protection Agency [webová stránka]. [Datum citace 15. 3. 2013].
<http://yosemite.epa.gov/r10/ecocomm.nsf/c6b2f012f2fd7f158825738b0067d20b/9a6226e464ecdb3f88256b5d0067de0d!OpenDocument>
- Valente, T. M., Gomes, C. L. (2007): The role of two acidophilic algae as ecological indicators of acid mine drainage sites. *Journal of Iberian Geology* **33** (2): 283-294.
- Winterbourn, M. J., McDiffett, W. F., Eppley, S. J. (2000): Aluminium and iron burdens of aquatic biota in New Zealand streams contaminated by acid mine drainage: effects of trophic level. *The Science of Total Environment* **254** (1): 45-54.
- Wollmann, K., Deneke, R., Nixdorf, B., Packroff, G. (2000): Dynamics of planktonic food webs in three mining lakes across a pH gradient (pH 2-4). *Hydrobiologia* **433** (1-3): 3-14.