

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:  
**Geologie**

Studijní obor:  
**Geobiologie**



Bc. Kateřina Burkartová

Využití mikrobiálních komunit jako markeru podmínek  
v podzemních biotopech

Use of microbial community structure as a marker of conditions in underground  
biotops

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Lukáš Falteisek, Ph.D.

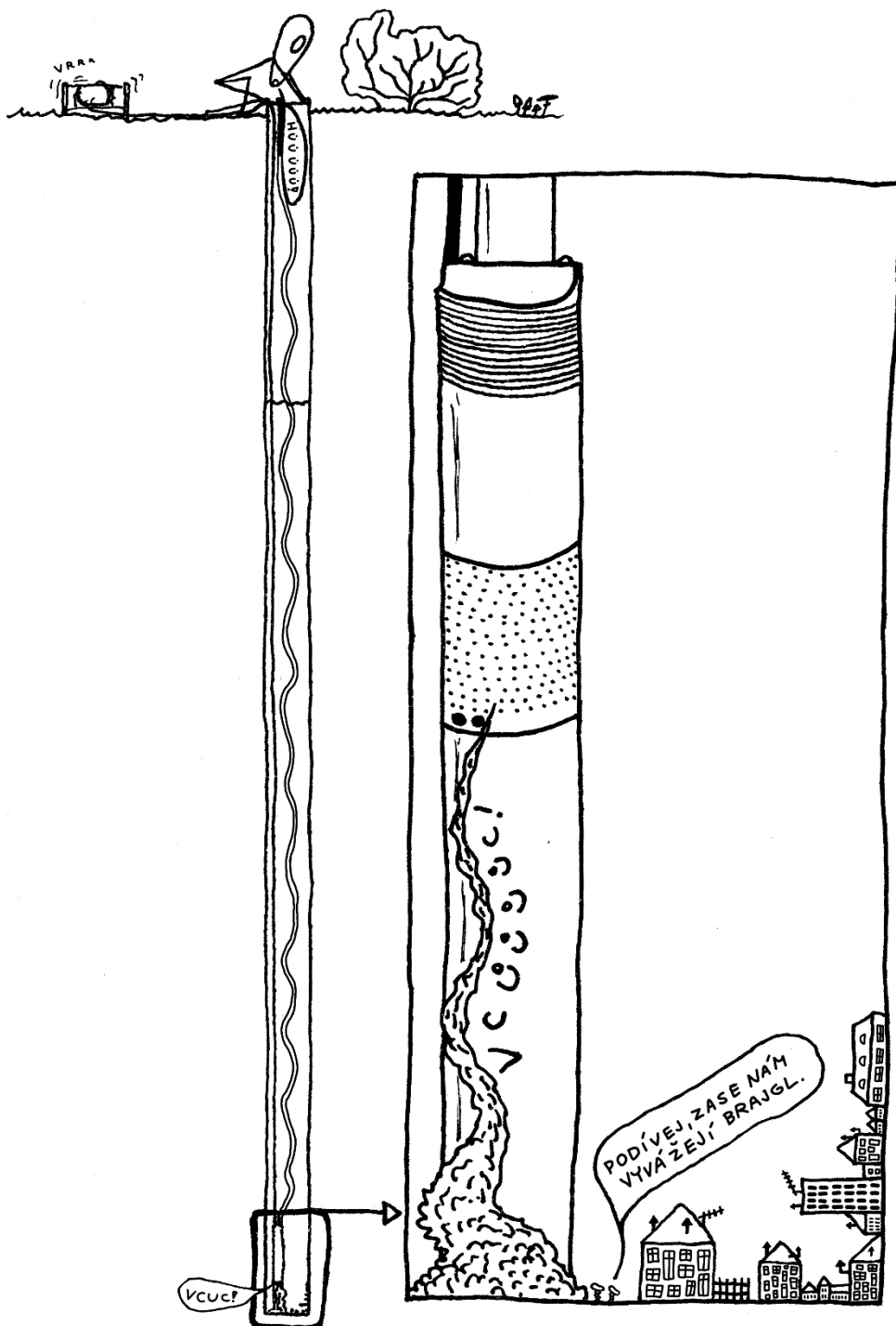
PRAHA, 2017

## **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, 10. 08. 2017*

*Kateřina Burkartová*



## Poděkování

Děkuji především svému školiteli Lukášovi za čas, který mi věnoval při psaní této práce a za debaty nad nejen geomikrobiologickými tématy. Za nákresy vrtných profilů a obrázek viditelný nad tímto textem děkuji Máří Mikšaníkové. Dík patří samozřejmě i všem bakteriím a archeím a jiným mým příbuzným a kamarádům, kteří mi umožnili vyskytnout se právě tady mezi nimi.

# OBSAH

<i>Abstrakt</i> .....	7
<i>Abstract</i> .....	8
<i>Zkratky</i> .....	9
<b>1 Úvod</b> .....	10
1.1 Mikroorganismy v podzemní vodě .....	10
1.2 Procesy a mikroorganismy v ekosystému podzemních vod .....	10
1.2.1 Potenciál mikrobiální analýzy .....	12
1.3 Přístupy ke studiu mikrobiálních komunit v podzemních vodách .....	12
1.3.1 Já je viděl! .....	12
1.3.2 Současné přístupy .....	13
1.4 Beta-diverzita .....	14
1.5 Krize koncepce druhu u prokaryot.....	15
1.6 Genotyp 16Sr DNA jako jednotka diverzity.....	15
1.7 Fylogenetická disimilarita mikrobiálních komunit .....	16
1.8 Popis lokalit.....	18
1.8.1 Černuc .....	18
1.8.1.1 Charakteristika horninového podloží a proudění vody.....	18
1.8.1.2 Charakteristika jednotlivých vrtů .....	21
1.8.2 Pekařka.....	24
1.8.2.1 Geologická charakteristika a využití vrtů .....	24
1.8.2.2 Chemismus vod .....	25
1.8.3 Vlastislav.....	25
1.8.3.1 Oběh podzemní vody v povodí Modly .....	26
1.8.3.2 Charakteristika vrtů .....	27
<b>2 Materiál a metody</b> .....	29
2.1 Přístroje .....	29
2.2 Chemikálie .....	29
2.2.1 Primery.....	29
2.2.2 Roztoky pro elektroforézu: .....	30
2.2.3 Komerční kity .....	30
2.3 Odběr vzorků.....	30
2.4 Izolace DNA .....	30
2.5 PCR .....	31
2.6 Elektroforéza .....	31
2.7 Sekvence a zpracování sekvencí .....	32

2.8	Bioinformatické analýzy .....	32
2.8.1	Vyřazení kontaminací, semiautonomních organel a singletonů .....	32
2.8.2	Analýza nejhojnějších mikroorganismů.....	32
2.8.3	Ordinační gradientová analýza v programu Canoco .....	33
2.8.4	Analýza fylogenetické disimilarity .....	34
3	<i>Výsledky</i> .....	35
3.1	Odběry podzemních vod a měření geochemických parametrů .....	35
3.1.1	Černuc .....	35
3.1.2	Pekařka.....	36
3.1.3	Vlastislav.....	37
3.2	Odstranění nežádoucích sekvencí .....	37
3.3	Analýza nejhojnějších mikroorganismů.....	41
3.3.1	Zastoupení prokaryotních kmenů na lokalitách .....	41
3.3.2	Pekařka.....	44
3.3.3	Černuc .....	48
3.3.4	Vlastislav.....	55
3.4	Výsledky ordinačních metod .....	60
3.4.1	Přímé ordinační analýzy.....	60
3.4.1.1	Lokalita – nejlepší vysvětlující proměnná.....	60
3.4.1.2	Rozdíly mezi vzorky kalu a vzorky vody z vrtů.....	61
3.4.2	Nepřímé ordinační metody.....	63
3.4.2.1	Nevýhoda nepřímých ordinačních analýz .....	63
3.4.2.2	Variabilita na základě obsahu metabolických skupin.....	65
3.4.2.2.1	Pekařka .....	66
3.4.2.2.2	Černuc .....	67
3.4.3	Vztah hydrogenovorních mikroorganismů na fermentátorů .....	69
3.5	Výsledky analýzy fylogenetické disimilarity.....	70
3.5.1	Analýza vzorků ze všech 3 lokalit dohromady .....	70
3.5.2	Analýza vzorků z Černuci.....	72
3.5.3	Analýza vzorků z Pekařky .....	73
4	<i>Diskuze</i> .....	74
4.1	Liší se odběry z kalu a z vody? .....	74
4.1.1	Pekařka.....	74
4.1.2	Černuc .....	75
4.2	Existují rozdíly mezi vzorky v rámci jednoduché zvodně na Pekařce?.....	76
4.3	Používat ordinační metody pro mikrobiální komunity? .....	77
4.3.1	Využití nepřímých ordinačních metod.....	77

4.3.2	Využití přímých ordinačních metod .....	80
4.4	Liší se lokality? .....	80
4.5	Závislost oxidace vodíku a fermentace .....	82
4.6	Vodík na Černuci v mnoha kontextech.....	82
4.7	Problematika kontaminací.....	84
4.8	Vliv odběru z vodovodu na strukturu komunity .....	85
4.9	Vysvětlení procesů ve vrtu MO1 .....	85
4.10	Analýza fylogenetické disimilarity .....	86
4.10.1	Fylogenetická analýza všech vzorků dohromady .....	87
4.10.2	Fylogenetická analýza vzorků z Černuci .....	87
4.10.3	Fylogenetická analýza vzorků z Pekařky.....	88
5	Závěr.....	89
6	Seznam použité literatury .....	91
7	Přílohy .....	108

## Abstrakt

V současné době exponenciálně přibývá množství dat získaných barcodingem 16S rDNA bakterií a archeí v různých přirozených prostředích. Proto nabývá na důležitosti rozvoj metod, umožňujících z těchto dat získat smysluplné informace. V této práci byly pomocí sekvenace 16S rDNA analyzovány mikrobiální komunity ze vzorků vody, kalu a vrtného prachu ze tří geologicky dobře prozkoumaných sedimentárních akviferů v Českém masívu. Cílem bylo zjistit, jak je možné využít různé analýzy při interpretaci procesů v podzemní vodě. Mikrobiální komunity z akviferů s různými podmínkami byly charakterizovány třemi metodami: taxonomickým a metabolickým popisem nejhojnějších mikroorganismů v komunitě, ordinačními metodami zobrazujícími variabilitu metabolických skupin a taxonomických jednotek a metodou UniFrac, která ukazuje míru fylogenetické disimilarity mezi komunitami. Z výsledků těchto analýz vyplývá, že na jednotlivých lokalitách odpovídá posun ve složení mikrobiálních komunit vlivu různých složek v prostředí. Pomocí nepřímé ordinační analýzy zobrazující variabilitu metabolických skupin bylo zjištěno, že vzorky z kalu mají lepší výpovědní hodnotu o tom, jaké donory elektronů jsou mikrobiální komunitou využívány, než vzorky vody. Nepřímá ordinační analýza je pro mikrobiální komunity nepoužitelná, pokud jsou vzorky srovnávány z hlediska obsahu operačních taxonomických jednotek (OTU). Mikrobiální komunity totiž zpravidla sdílejí jen malé množství OTU. Analýza fylogenetické disimilarity poskytuje v kombinaci s ostatními metodami a se znalostí hydrogeologických podmínek nové informace o stavu akviferu. Jedná se například o rozdíl mezi mikrobiálními komunitami před a po vytvoření vrtu, nebo o rozdíly mezi prostředími s různou limitací zdroji energie. Kombinací těchto metod lze získat výrazně přesnější informace o trofických poměrech ve vrtu, než by bylo možné pouze chemickými analýzami nebo přístupy tradiční mikrobiologie.

Klíčová slova: mikrobiální komunity, Illumina, beta diverzita, 16S rDNA, podzemní vody, akvifer, mikrobiální metabolismus, biogeochemické cykly, UniFrac

## **Abstract**

The amount of data obtained by barcoding of prokaryotic 16S rDNA from natural habitats is increasing exponentially. Thus, methods enabling us to extract useful information from these data are of increasing importance. In this thesis microbial communities from water, sludge and drilling dust were analyzed by 16S rDNA sequencing in three geologically well described sedimentary aquifers in Bohemian Massif. The main goal of this research was to establish how different analytical approaches can be useful in interpretation of groundwater biogeochemical processes. Three approaches were used: First, taxonomy and metabolic traits of the most abundant microorganisms were assessed. Second, ordination methods showing metabolic and taxonomic variability between communities were used. Last the analysis of phylogenetic dissimilarity using UniFrac metrics was performed. When analyzing individual localities separately, the shift in microbial community composition corresponds with the change of environmental conditions. The unconstrained ordination method based on the variability in metabolic traits indicated, that sludge samples are more informative than water samples when asking which electron donor is used in microbial communities. On the other hand, unconstrained ordination methods were useless when the variability in operational taxonomic units (OTUs) between samples was calculated, since microbial communities share usually only small portion of OTUs. The phylogenetic dissimilarity analysis in combination with the other two methods provided new information regarding the aquifer conditions. This method can capture changes in phylogenetic microbial community composition before and after a borehole was drilled, or differences between environments with various degree of energy source limitation. A combination of these methods can provide significantly more information about trophic relations in hydrogeological wells than chemical analysis or traditional microbiological approaches.

Key words: microbial communities, Illumina, beta diversity, 16S rDNA, groundwater, aquifer, microbial metabolism, biogeochemical cycles, UniFrac



## Zkratky

OTU – operational taxonomic unit, operační taxonomická jednotka

DNA – deoxyribonukleová kyselina

RNA – ribonukleová kyselina

FISH – fluorescence in situ hybridization

TAE – terminální akceptor elektronů

PCoA – principal coordinate analysis

UPGMA – Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

DP – dobývací prostor

CHSK – chemická spotřeba kyslíku

PVC – polyvinylchlorid

ČZU – Česká zemědělská univerzita

CHKO – chráněná krajinná oblast

PCR – polymerase chain reaction

TBE – tris/borate/EDTA

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

UK – Univerzita Karlova

DMSO – dimethylsulfoxid

MBÚ – Mikrobiologický ústav

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

PCA – principle component analysis

CCA – canonical correspondence analysis

AMOVA – analysis of molecular variance

DCA – detrended correspondence analysis

RDA – redundancy analysis, redundanční analýza

# 1 Úvod

Voda v podzemních akviferech tvoří 98 % využitelných sladkovodních zásob na Zemi (NGWA, 2017). Jedná se o velmi důležitou složku planety, na které jsou závislé mnohé suchozemské organismy včetně lidí. To platí zejména pro aridní kontinentální prostředí, která se mohou v důsledku globálních změn v budoucnosti rozšiřovat. Porozumět procesům v podzemní vodě má proto zásadní význam při hospodaření s pitnou vodou. V této práci se věnuji tomu, jak využít znalosti o složení mikrobiálních komunit ze vzorků podzemní vody při interpretaci procesů probíhajících v sedimentárních akviferech.

## 1.1 Mikroorganismy v podzemní vodě

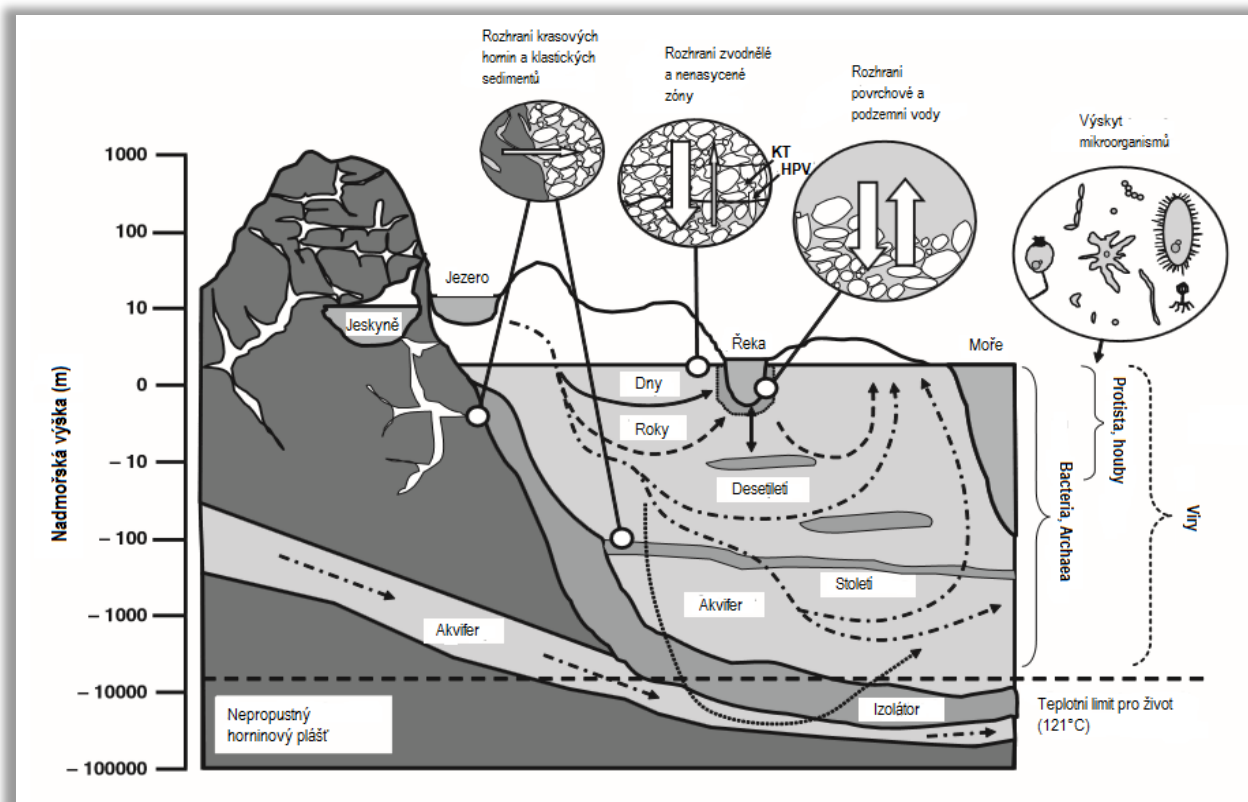
V terestrických akviferech je podle různých odhadů řádově  $10^{27}$  (Whitman, Coleman and Wiebe, 1998) -  $10^{30}$  (Gold, 1992) prokaryotních buněk. Tato čísla jsou odhadována na základě porozity nepevněných sedimentů (nadhodnoceno – s hloubkou porozita klesá) a obsahu volně žijících mikroorganismů v podzemní vodě (podhodnoceno – většina mikroorganismů žije na minerálech přisedle (Hazen *et al.*, 1991)). Jedná se tedy, zvláště v terestrickém prostředí, kde je nedostatek dat, o hrubé odhady. Je ale možné říci, že podzemí je hlavním habitatem prokaryotních mikroorganismů a že jejich celkový počet je zde pravděpodobně vyšší než v jiných složkách biosféry (Whitman, Coleman and Wiebe, 1998).

Koncentrace prokaryot v mělkých podzemních vodách jsou  $10^4$ - $10^6$  buněk/ml v kapalné fázi. V sedimentu bývají zpravidla vyšší:  $10^6$ - $10^8$  buněk/ml (Griebler *et al.*, 2002).

Kromě prokaryotních mikroorganismů, které zde početně dominují (stejně jako všude na Zemi), žije v prostředích podzemních vod i řada protist a bezobratlých, které tvoří spolu s viry a neživou složkou pro koloběh látek na Zemi zcela zásadní ekosystém. Přesto, že se jedná o ekosystém, je z pohledu většinové společnosti vidět, že akvifery jsou stále spíše považovány za zdroj, i když za takový, který je nutné z praktických důvodů chránit (Goldscheider, Hunkeler and Rossi, 2006).

## 1.2 Procesy a mikroorganismy v ekosystému podzemních vod

Akvifery jsou horninová tělesa v zemské kůře nasycená vodou (obr. 1). Podzemní voda, která jimi protéká, reaguje s horninovou složkou akviferu, obohacuje se rozpouštěním nestabilních minerálních fází nebo naopak vytváří srážením nové minerály v závislosti na konkrétních podmínkách (teplota, pH, koncentrace látek atd.). Při zvětrávání minerálů, ale i dalších procesech v podzemní vodě hrají významnou roli prokaryotní mikroorganismy (*Bacteria*, *Archaea*) díky své vysoké metabolické diverzitě (Rooney-varga *et al.*, 1999; Shelobolina *et al.*, 2012). Heterotrofní mikroorganismy v podzemní vodě jsou často adaptované na nedostatek organického uhlíku, v anoxických akviferech často i na nedostatek vhodných akceptorů elektronů pro respiraci. Některé mikroorganismy mají kvůli této adaptaci vyvinuté speciální metabolické schopnosti, například anaerobní rozklad těžce degradovatelných organické látek (Rooney-varga *et al.*, 1999). Podstatnou složkou mikrobiální komunity jsou i chemoautotrofní mikroorganismy těžící energii z oxidace anorganických látek (Griebler and Lueders, 2009; Shelobolina *et al.*, 2012). Mikroorganismy pro své potřeby



**Obr. 1 Schematický náčrt povrchových a podzemních vodních habitatů.** Šipky zobrazují proudění podzemní vody, v obdélnících je uvedena doba zdržení vody v horninách. Kolečka ukazují důležitá rozhraní. Vpravo je uveden výskyt nejhojnějších organismů ve podzemních vodách. KT – kapilární tržáseň, HPV – hladina podzemní vody. Upraveno podle Griebler & Lueders 2009

využívají různým způsobem látky přítomné v minerálech nebo rozpuštěné ve vodě a mění chemismus vody, což může vést ke vzniku minerálů (např. sulfidy) a být přínosné např. při imobilizaci těžkých kovů (Wolfe and Wilkin, 2017). Mikroorganismy využívají zejména látky, které mohou sloužit jako zdroj uhlíku či jiných biogenních prvků, jako donory elektronů pro anabolické syntézy nebo jako akceptory elektronů v respiračních řetězcích. Tyto látky jsou důležité pro energetický metabolismus, a tedy pro růst různých mikroorganismů, které utvářejí mikrobiální komunitu. Složení mikrobiálních komunit se kromě dostupnosti těchto konkrétních látek řídí i mnoha jinými faktory prostředí jako je pH, teplota, eutrofie, přítomnost jiných členů mikrobiální komunity (Ross *et al.*, 2001) atd. Pokud platí, že složení mikrobiální komunity odpovídá určitým podmínkám v prostředí, kde její členové prosperují, je zajímavé podívat se na tento problém z druhé strany a pokusit se využít bioindikační potenciál obsahu mikrobiálních komunit. Pokud se totiž v prostředí nevyskytuje určitý metabolický typ, není to způsobeno tím, že by tam příslušné mikroorganismy nebyly schopné nebo nestihly proniknout, ale tím, že pro ně na daném místě nejsou vhodné podmínky pro růst (např. nepřítomnost substrátů). Proto mají mikrobiální komunity potenciál být velmi dobrými indikátory podmínek. Mikroorganismy zároveň mění vlastnosti podzemní vody, mohou ji čistit (Rooney-varga *et al.*, 1999; Wolfe and Wilkin, 2017) nebo naopak působit nežádoucí procesy ve vrtech (např. snižovat jejich vydatnost kolmatací horniny v okolí vrtu). To je důvod, proč může být v hydrogeologii přínosné využívat bioindikační potenciál mikrobiálních komunit.

### 1.2.1 Potenciál mikrobiální analýzy

Zajímavou otázkou je, zdali mohou analýzy mikrobiálních komunit přinést nějakou jinou informaci o prostředí, než je přítomnost určitých biogeochemických reakcí. Důležité nemusí být pouze to, z jakých mikroorganismů se mikrobiální komunita skládá, ale také to, proč ji tvoří právě určité mikroorganismy a ne jiné. Principy řídicí strukturu mikrobiálních komunit jsou při současném stavu poznání objasněné jen částečně (Nemergut *et al.*, 2013). Pokud bychom dokázali lépe definovat obecné zákonitosti struktury mikrobiálních komunit, bylo by teoreticky možné, že získáme principiálně jiné informace o dynamice prostředí, které nám není schopen poskytnout žádný jiný rozbor (např. chemický, petrologický atd.).

Bez velkého rizika omylu lze předpokládat, že se v každém prostředí bude mikrobiální ekosystém vyvíjet k určité stabilní strategii využití dostupných zdrojů energie. To by pak znamenalo, že pokud budou k dispozici určité zdroje a typ prostředí, měl by pro ně teoreticky existovat i optimální mikrobiální ekosystém. Je například obecně známo, že v mnoha prostředích jako jsou akvifery, půda, sedimenty a vodní sloupce oceánů nebo jezer dochází ke vzniku redoxních zón na různých velikostních škálách. Jedná se o stav, ke kterému systém vždy spěje. Z hlediska struktury mikrobiálních komunit by bylo možné ke vzniku redoxních zón (redoxních cyklů) přistupovat jako k sukcesi, která může být zpomalena disturbancemi nebo vychýlena do určitého směru nedostatkem komponent v cyklu (např. látek vhodných pro transportní cykly TAE mezi těmito zónami). Struktura komunity by pak mohla vypovídat o tom, jaký „nedostatek“ v prostředí ji limitoval v dosažení ideálního stavu. Takovouto informaci o příčině limitace procesů probíhajících v prostředí totiž může těžko poskytnout chemický nebo mineralogický rozbor. Využití tohoto potenciálu by bylo právě zajímavé v podzemních akviferech, kam je složitý přístup, a často jediným oknem do procesů v nich probíhajících jsou prameny, ze kterých není složité získat přehled o tom, jaké mikroorganismy v nich žijí.

### 1.3 Přístupy ke studiu mikrobiálních komunit v podzemních vodách

Pokud chceme zjistit, jaké mikroorganismy tvoří přirozenou komunitu v podzemní vodě, je nutné určitým způsobem získat vzorky a zvolit metodu, kterou bude mikrobiální komunita studována. Metodologický přístup ovlivňuje to, jakou složku systému, nebo z jakého úhlu tento komplexní systém uvidíme. Proto je zcela zásadní zabývat se možnostmi různých přístupů a interpretací jejich výsledků.

#### 1.3.1 Já je viděl!

Prvním pozorovatelem malých stvoření pohybujících se v mořské, dešťové a podzemní vodě byl v 17. století vynálezce mikroskopu Antonie van Leeuwenhoek. Tento nizozemský obchodník byl velmi pečlivý při zaznamenávání svých pozorování. Z jeho dopisů je patrné, že rozuměl základním ekologickým principům – byl udiven tím, že v čisté pitné vodě z pískovcového akviferu o vysoké vydatnosti, vidí živá stvoření. Pro odběr používal nové nádoby, které nebyly dosud používány v kuchyni. Věděl rovněž, že když voda v nádobě stojí delší dobu, zvláště pak v průvanu, obsahuje více mikroorganismů (Leeuwenhoek, 1677).

*„... In the open court of my house I have a well, which is about 15 foot deep, before one comes to the water. It is encompassed with high walls, so that the Sun, though in Cancer, yet can hardly shine much upon it. This water comes out of the ground, which is sandy, with such a power, that when I have laboured to empty the well, I could not so do it but there remained ever a foot's depth of water in it. This water is in summertime so cold, that you cannot possibly endure your hand in it for any reasonable time. Not thinking at all to meet with any living creatures in it. (it beeing of*

*good taste and clear) looking upon it in Sept. of the last year, I discovered in it a great number of living animals very finall, that were exceeding clear, and a little bigger than the smallest of all that I ever saw; and I think, that in a grain weight of this water there was above 500 of those creatures, which were very quiet and without motion. ... “*

(Leeuwenhoek, 1677)

*„... Na veřejném dvoře mého domu stojí studna, která je asi 15 stop hluboká, než se narazí na vodu. Studna je obklopená vysokou zdí, takže i Slunce v Raku na ní svítí jen stěží. Tato voda pochází ze země, která je písčitá, a má takovou sílu, že když jsem se pokoušel studnu vyprázdnit, nepovedlo se mi to jinak, než že v ní zůstalo pár stop vody. Tato voda je v létě tak chladná, že v ní skoro nemůžete nechat ani ruku. Ani jsem neočekával, že zde narazím na nějaké živé bytosti, (voda je čistá a dobré chuti), když jsem si ji prohlížel v září loňského roku, objevil jsem v ní velký počet živočichů, kteří byli velice průhlední a o něco větší než ti nejmenší, které jsem kdy viděl; a myslím, že ve vodě o hmotnosti zrna bylo více než 500 těchto velmi klidných a nehýbajících se stvoření. ...”*

### 1.3.2 Současné přístupy

V současnosti existují dva základní okruhy metod, kterými je možné studovat mikrobiální společenstva. První skupinu představují kultivační metody, druhou metody na kultivaci nezávislé metody využívající molekulární nástroje (sekvenace, FISH a další).

- Kultivační metody

S rozvojem molekulárních nástrojů se přišlo na to, že v přirozených prostředích existuje velká taxonomická ale i funkční diverzita prokaryotních mikroorganismů. Ukazuje se, že naprostá většina mikroorganismů je v umělých podmínkách nekultivovatelná (Wade, 2002). Kultivačními metodami lze z různých hlubokých podzemních vod získat většinou izoláty příbuzné omezenému okruhu heterotrofních pro povrch typických bakterií ze skupin *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* nebo *Firmicutes* (Bianchi *et al.*, 1995). Analýza fylogenetické disimilarity jasně ukazuje, že proces kultivace silně ovlivňuje složení původních mikrobiálních komunit (Lozupone and Knight, 2007). Vliv kultivace je tak významný, že stírá rozdíly mezi mikrobiálními komunitami z odlišných prostředí jako je ledovec, sediment nebo mořská voda (Lozupone and Knight, 2005). Kultivační metody jsou s ohledem na tyto poznatky zcela nevhodným nástrojem pro zjišťování diverzity mikrobiálních společenstev v podzemních akviferech. V době, kdy je k dispozici řada efektivnějších nástrojů se přesto kultivační postupy používají při hledání odpovědí na např. metabolickou diverzitu společenstev. Příkladem takové práce je studie Wang *et al.* (2007). Podle ní neexistuje korelace metabolických schopností komunity s žádným parametrem v prostředí (hloubkou, typem horniny, množstvím puklin, teplotou) při odběru 2 km hlubokého vrtného jádra. Absence korelace není překvapivá, uvážíme-li že byla vyvozena z růstu 12 izolátů na médiu obsahujícím takové množství organických látek, se kterým se komunita ve 2 km pod povrchem pravděpodobně nikdy nesetkala. Veškerá její přirozená diverzita byla potlačena expanzivním růstem několika (v původním prostředí pravděpodobně minoritních) eutrofních členů komunity.

Kultivační přístupy mohou poskytnout pouze informaci o selektivě média, ale nikoli o diverzitě mikroorganismů v podzemní vodě. Oblíbenost kultivačních metod při popisu oživení podzemních vod tkví

pravděpodobně v setrvačnosti praxe (kultivační metody jsou starší než molekulární) a zakotvení v legislativě. V České republice je podle vyhlášky č. 252/2004 Sb., která stanovuje hygienické požadavky na pitnou vodu, povinnost stanovovat počty kolonií při různých teplotách a kultivací stanovit množství kolonií koliformních bakterií, enterokoků a jiných bakterií. Kultivace je vhodná metoda pro toto konkrétní zadání, tedy pro určování průniku odpadních vod do akviferů s pitnou vodou. Chybou ale je, její použitelnost zobecňovat na řešení dalších problémů (např. při popisu diverzity, nebo identifikaci jiných skupin bakterií, u kterých tak dobře nefunguje).

- Potenciál sekvenačních metod

Mezi metody nezávislé na kultivaci patří sekvenace. Jedná se o běžně používanou metodu, která umožňuje snadnou identifikaci velkých souborů mikroorganismů pomocí sekvenace vybraných genů. V případě bakterií a archeí jde především o gen pro funkční RNA malé podjednotky ribosomu (16S rDNA). Sekvenace metodou Illumina čte paralelně miliony až desítky milionů sekvencí, což umožňuje sekvenovat velké množství vzorků najednou. S rozvojem této metody začalo exponenciálně růst množství osekvenovaných mikrobiálních 16S rDNA z nejrůznějších prostředí (Amaral-zettler et al. 2010; Caporaso et al. 2010; Huse et al. 2008; Kimura et al. 2011 a další).

Většina studií se omezuje na prostý popis mikrobiální diverzity případně na popis jejích změn po určitém ovlivnění podmínek (Nemergut *et al.*, 2007; Winderl *et al.*, 2008; Kabelitz *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2009; Laplante and Derome, 2011; Lin *et al.*, 2012). Je například známo, že určité změny podmínek např. kontaminace těžkými kovy, vedou k podobným změnám ve struktuře komunity na různých lokalitách (Laplante and Derome, 2011). Často se také studie omezují jen na identifikaci nejzákladnějších trofických skupin, např. primárních producentů (Rowe *et al.*, 2007) a netěží mnoho informací z rozdílů ve složení jednotlivých mikrobiálních komunit.

Současný stav porozumění pravidlům řídícím mikrobiální diverzitu ať už v akviferech nebo v jiných ekosystémech lze popsat tak, že je k dispozici dobrý nástroj, který poskytne data. Zároveň víme, že na mikrobiální komunity působí různé podmínky, které ovlivňují její metabolickou, taxonomickou nebo fylogenetickou strukturu (Lozupone and Knight, 2007; Lin *et al.*, 2012). Mikroorganismy mají unimodální odpověď na jednotlivé parametry prostředí. Zároveň samozřejmě mají i navzájem posunutá optima pro růst. Při plynulé změně parametru se obměňují členové mikrobiální komunity. Dochází ke změnám v obsahu taxonomických jednotek a následně, při dalším růstu odlišnosti prostředí, také ke zvětšování průměrné fylogenetické vzdálenosti mezi taxonomickými jednotkami (Faith *et al.*, 2009). Teoreticky je tedy možné využít bioindikační potenciál změn ve složení (metabolického, taxonomického i fylogenetického) mikrobiální komunity mezi vzorky odebranými z různých podzemních vod nacházející se v gradientu působení určitého faktoru.

#### **1.4 Beta-diverzita**

Beta-diverzita je rozdílnost společenstev na různých stanovištích (Whittaker, 1972). V environmentální mikrobiologii se obsah tohoto pojmu někdy zužuje na míru diferenciací komunit podle určitého environmentálního gradientu. Whittaker má beta-diverzitou komunit na mysli rozdíly v druhovém složení,

kteře se mění se změnou faktorů v prostředí. Pokud operujeme s přítomností a abundancí jednotlivých druhů v rámci habitatu, je zcela zásadní, aby bylo možné smysluplně rozlišit jak druhy, tak jednotlivce. Whittaker se ve své práci pojednávající o diverzitě rostlin potýkal s určením jedince, tedy s kvantifikací jednotlivých druhů (Whittaker, 1960). U mikrobiálních komunit je tento přístup naopak omezen pojetím toho, co to znamená mikrobiální druh.

### 1.5 Krize koncepce druhu u prokaryot

V současnosti jsou prokaryotní mikroorganismy řazeny do taxonomických skupin pomocí polyfázické taxonomie založené na popisu fenotypu, chemotaxonomickém zařazení, míře hybridizace DNA (práh pro odlišení druhů 70 %), podobnosti sekvencí 16S rDNA (97 %) a v poslední době i na přibývajících informacích získaných ze sekvenování celých genomů. Taxonomická mikrobiologie stojí nyní na začátku postgenomické éry. Množství nově osekvenovaných mikroorganismů z přirozených prostředí roste rychleji, než je reálně možné je popsat tak časově náročným způsobem, jaký vyžaduje současná polyfázická taxonomie (Sutcliffe 2015, Vandamme & Peeters 2014). Další velice závažný problém je, že mikroorganismus musí být kultivován, aby ho bylo možné formálně popsat. V laboratorních podmínkách lze přitom kultivovat méně než 2% bakterií (Wade, 2002).

Polyfázická taxonomie byla vědomě zavedena pro praktické rozřídění organismů, u kterých nebylo možné definovat druhy přirozeně. Z toho důvodu byly zavedeny arbitrární prahy pro shodu 16S rDNA nebo určitých částí genomu. Nelze pochybovat, že přirozené druhy se takto přesnou hranicí v odlišnosti sekvencí nemohou řídit. Nejnovější studie ukazují, že je možné nejen eukaryotní, ale i prokaryotní druhy definovat pomocí omezeného genového toku (Bobay and Ochman, 2017). Vypadá to tedy, že i u domén *Bacteria* a *Archaea* existují přirozené genetické bariéry vymezující pravé biologické druhy. Biologické druhy se ve značném procentu případů neshodují s pragmatickou definicí druhu, kterou využívá polyfázická taxonomie, často ani u běžných a velmi dobře známých mikroorganismů.

### 1.6 Genotyp 16S rDNA jako jednotka diverzity

Běžně se pro účely identifikace polyfázických druhů v prostředí používá gen pro 16SrDNA, který patří mezi evolučně konzervované geny spjaté s nepostradatelnými, životně důležitými funkcemi (tzv. house-keeping genes), přítomné díky tomu napříč všemi prokaryotními skupinami. Gen pro funkční RNA malé ribozomální podjednotky byl v minulosti základním nástrojem pro tvorbu fylogenetického systému bakterií a archeí na všech fylogenetických úrovních (Woese, 1987).

Vzhledem k uměle stanoveným hranicím mezi prokaryotními druhy není v této práci používáno označení mikrobiální druh, ale přesnější označení – genotyp 16S rDNA dané operační taxonomické jednotky (OTU). Použití genotypů 16S rDNA jako jednotek při zkoumání mikrobiální diverzity má své výhody i nevýhody. Mezi hlavní nedostatky patří výše zmíněný problém, že většina mikroorganismů je nekultivovatelná a dosud z nich není k dispozici osekvenovaný genom, takže zatím nejsou metabolicky popsány. Další nevýhodu přináší plasticita vztahu 16S rDNA a fenotypu (např. metabolických schopností). Mezi prokaryotními organismy je běžný horizontální genový přenos některých genů pro proteiny určité metabolické či regulační dráhy. Mezi klasické případy snadno přenosných vlastností patří rezistence k antibiotikům (Huddleston,

2014), k těžkým kovům (Hobman and Crossman, 2014) nebo schopnost využívat další donor nebo akceptor elektronů pro energetický metabolismus (Han and Perner, 2015). Z toho vyplývá, že nelze používat konkrétní genotyp 16SrDNA jako nezvratný indikátor určitého biogeochemického procesu. Fylogenetický strom prokaryot vytvořený na základě genu pro 16S rRNA vykazuje ostrůvkovité rozmístění jednotlivých metabolických schopností jak napříč doménami, tak v rámci nejnižších taxonomických úrovní - druhů, či kmenů. (Boucher *et al.*, 2003). Existuje tedy velký počet nepříbuzných genotypů 16Sr DNA, ke kterým lze přiřadit stejný typ energetického metabolismu (tj. takovéto vlastnosti mikroorganismů jsou parafyletické). Přesto ale sumárně platí, že když má určitý mikroorganismus nějakou charakteristiku, má jeho blízký příbuzný tuto charakteristiku s větší pravděpodobností než vzdálenější příbuzný. To se může týkat v první řadě komplexních vlastností, které jsou ve fylogenetickém stromu rozmístěny ostrůvkovitě a ne zcela náhodně. Takové vlastnosti musí být logicky hůře horizontálně přenosné. Jedná se o vlastnosti, které jsou zakotvené ve velkém množství genů a lze je tudíž předat pouze vertikálně (děděním). Zatímco rezistence k antibiotikům je jednoduchou doplňkovou vlastností (může ji zajišťovat produkt jediného nebo několika málo genů), zde se jedná o životní strategii a komplexní přizpůsobení podmínkám (pH, teplota, oligotrofie, autotrofie).

### 1.7 Fylogenetická disimilarita mikrobiálních komunit

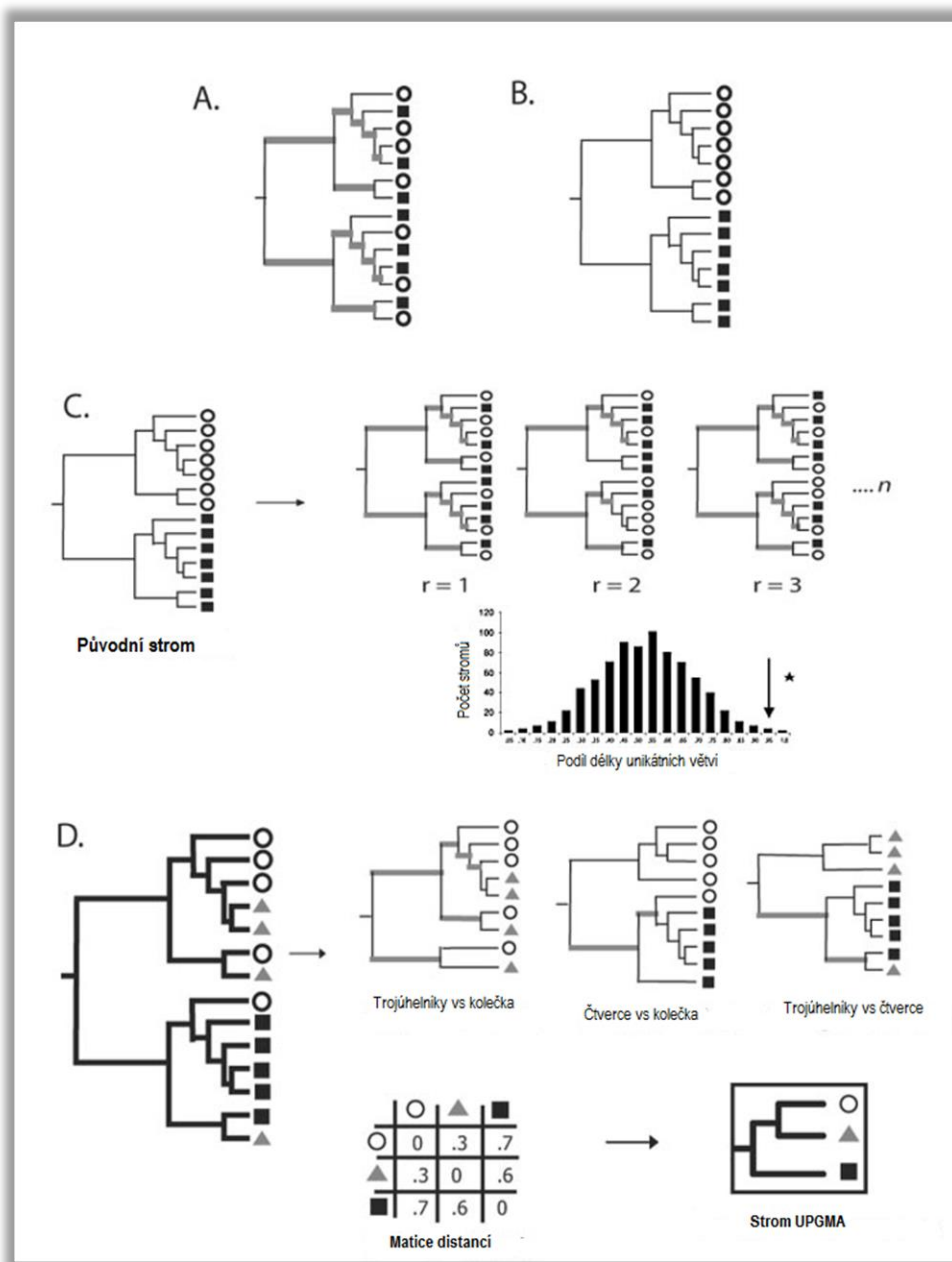
Podle sekvencí 16S rDNA získaných z různých mikrobiálních komunit lze na základě této skutečnosti zjistit míru fylogenetické disimilarit mezi nimi. Míra fylogenetické disimilarit má potenciál ukázat právě rozdíly v komplexních přizpůsobeních a strategiích mikroorganismů v různých komunitách (Lozupone and Knight, 2005, 2007; Faith *et al.*, 2009). Pro stanovení míry fylogenetické disimilarit byla vyvinuta metoda UniFrac (Lozupone and Knight, 2005), která jednoduchým výpočtem stanoví délku unikátních větví (vedoucích pouze k jednomu vzorku) ve fylogenetickém stromě obsahujícím OTU ze dvou či více vzorků (viz obr. 2).

Sekvenace 16S rDNA je v tomto ohledu užitečnější než metagenomický přístup, kdy získáme sice kompletní přehled o všech genech v prostředí, ale nemáme z jednotlivých genů šanci vyčíst právě taková komplexní přizpůsobení jakým jsou životní strategie, neboť nejsou kódovány jedním genem. S ohledem na to, že lze metodou UniFrac odlišit mikrobiální komunity ze slaných a sladkovodních prostředí, eutrofních a oligotrofních mořských prostředí, nebo ze sedimentů a vody (Lozupone and Knight, 2005, 2007), je na místě očekávat podobné korelace i v podzemních akviferech.

Existuje studie, která se zabývala fylogenetickou disimilaritou mezi vzorky z podzemních vod (Sahl *et al.*, 2008), ale jejím základním nedostatkem byl malý počet zkoumaných vzorků a absence obecných závěrů. Jiné studie ale ukazují, že analýza fylogenetické disimilarit může mít praktické využití při hospodaření s pitnou vodou. V málo komplexním prostředí, jakým je reaktor čističky kontaminovaných vod (dusičnany s chloristanem), má potenciál ukázat, že se signifikantně liší komunity, které jsou limitované akceptory elektronů od těch, které jich mají dostatek (Ontiveros-valencia *et al.*, 2014). Takové zjištění může být velmi užitečné, neboť umožňuje zjistit, při jakém nastavení provzdušnění a obsahu různých TAE je proces čištění (anaerobní respirace dusičnanů) nejefektivnější.



Není ovšem známé, zdali je podobné vlivy možné rozlišit ve strukturně tak složitém a rozlehlém prostředí, jakým je akvifer. Komplikaci zde totiž může představovat už samotný způsob odběru z velkých hloubek, při kterém technicky nelze zajistit sterilní podmínky (Sahl *et al.*, 2008).

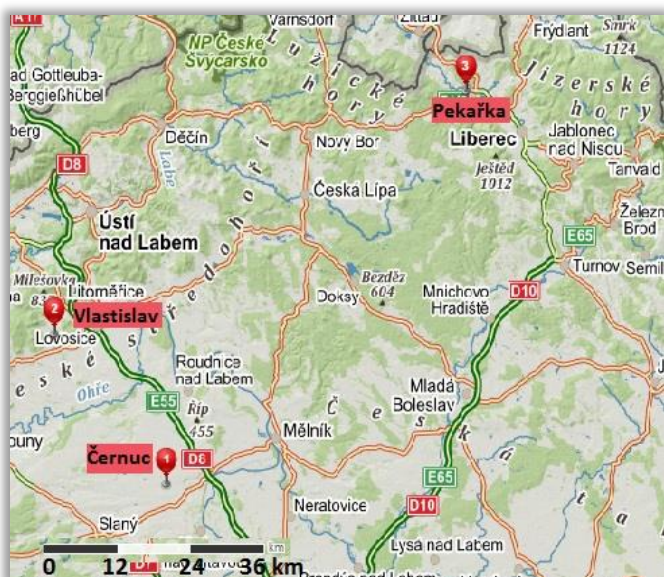


**Obr. 2 Výpočet matice distancí metodou UniFrac.** Čtverce, trojúhelníky a kolečka představují sekvence z jednotlivých prostředí (vzorků, mikrobiálních komunit). Větve vycházející z uzlů jsou vyznačeny černou barvou, pokud jsou unikátní pro konkrétní prostředí (vzorek), a šedivou, pokud jsou sdílené oběma vzorky. A – strom reprezentující fylogeneticky příbuzné komunity, kde je podstatná část větví sdílená (šedivá). B – Strom reprezentující dvě komunity, které jsou maximálně odlišné, takže 100 % délky větvi je unikátních buď pro vzorek reprezentovaný kolečky nebo pro čtverce. C – randomizační test umožňující zjistit, zdali jsou dvě komunity signifikantně odlišné, kde  $n$  je počet opakování a  $r$  je replikát, přiřazení daných sekvencí k jednomu ze dvou prostředí je pro každý replikát náhodně vygenerováno a je spočítána délka unikátních (černá) větví. Výsledná hodnota  $p$  je podíl náhodně vygenerovaných stromů, které mají nejméně takovou délku unikátních větví jako původní strom (znázorněno šipkou v grafu). Pokud je hodnota  $p$  pod určitou (arbitrární) hranicí, vzorky jsou považovány za signifikantně odlišné. D – V případě srovnávání více než dvou vzorků je hodnota UniFrac nezávisle vypočítána pro všechny dvojice srovnávaných vzorků a zobrazena v matici distancí (v tabulce matice distancí čtverce, kolečka a trojúhelníky již představují jednotlivé vzorky a nikoli sekvence). Z matice distancí může být vytvořen standardními mnohorozměrnými statistickými metodami strom UPGMA nebo PCoA diagram ukazující klastrování jednotlivých komunit. Upraveno podle (Lozupone and Knight, 2005).

Otázkou tedy zůstává, jaké procesy (a zda vůbec) lze v podzemní vodě takto rozpoznat, zdali je možné srovnávat vzorky z různých lokalit, zdali se liší komunity podle fyzického charakteru vzorku a typu odběru. Analýza fylogenetické disimilarity je schopná odlišit pouze rozdíly mezi mikrobiálními komunitami, ale ne jevy v přirozeném prostředí, které za ní stojí. Proto byly v této práci použity další přístupy, které mají potenciál vysvětlit příčinu fylogenetické disimilarity mezi vzorky. Mezi ně patří kromě hydrogeologické charakteristiky akviferu i metabolický a taxonomický popis nejčastějších genotypů 16S rRNA a ordinační metody zobrazující variabilitu metabolických skupin a taxonomických jednotek. Srovnáním výsledků různých analýz bude možné posoudit okruh otázek, na které jsou konkrétní metody schopné odpovědět, a také to, jakou novou informaci přináší analýza fylogenetické disimilarity.

## 1.8 Popis lokalit

Pro odběr vzorků byla zvolena tři hydrogeologicky dobře prozkoumaná území v Českém masivu (viz obr. 3). Dvě z míst leží v oblasti České křídové pánve, kde jsou hlavním kolektorem cenomanské sedimenty. Jedná



Obr. 3 Poloha míst odběru vzorků

se o hydrogeologické vrty v okolí Černuci a Vlastislavi. Třetí lokalita na Pekařce leží mimo Českou křídovou pánev na území lugu poblíž Bílého Kostela nad Nisou. Zkoumaný kolektor je tu vyvinut ve štěrkopískových kvartérních naplaveninách.

kvartérní štěrkopísky a odtěžené plochy slouží jako úložiště elektrárenských popílků. Z toho důvodu zde byl vybudován systém monitorovacích vrtů (viz obr. 4, obr. 5) pomocí nichž je možno sledovat ovlivnění jakosti vody hlouběji ležícího cenomanského kolektoru aktivitami v pískovně. Díky tomuto monitoringu je zde k dispozici geochemicky i hydrogeologicky dobře charakterizovaný akvifer. Vrtů zasahují do různých hloubek, mají odlišnosti v litologii a dynamice proudění podzemních vod díky zlomovým strukturám přítomným v okolí. Na poměrně malém území je zde k dispozici sada vrtů s významně odlišnými geochemickými vlastnostmi, a lze očekávat jejich vliv na strukturu mikrobiálních společenstev v jednotlivých vrtech.

### 1.8.1.1 Charakteristika horninového podloží a proudění vody

Oblast je tvořena sedimenty různé propustnosti z období karbonu, křídý a kvartéru (viz obr. 4 a obr. 5).

**Permokarbon:** Litologie a proudění vody v permokarbonských kolektorech v této práci nejsou blíže specifikovány, neboť nejhlubší vrty zasahují maximálně první metry do stropu karbonu. Jedná se zejména o

se o hydrogeologické vrty v okolí Černuci a Vlastislavi. Třetí lokalita na Pekařce leží mimo Českou křídovou pánev na území lugu poblíž Bílého Kostela nad Nisou. Zkoumaný kolektor je tu vyvinut ve štěrkopískových kvartérních naplaveninách.

### 1.8.1 Černuc

První zvolenou lokalitou pro odběr vzorků byl dobývací prostor Černuc (dále jen DP Černuc) a jeho bezprostřední okolí nacházející se v České křídové pánvi severně od Slaného a Kralup nad Vltavou. V DP Černuc se těží

vrt MC-3, který na svém dně zachycuje karbonské izolátory v podobě kaolinických zvětralin a jílovců (obr. 5). Permokarbonské horniny nacházející se pod těmito izolátory jsou tvořené jílovci a různobarevnými pískovci. Tyto horniny s nejvyšší pravděpodobností ovlivňují chemismus vod v křídových kolektorech (zvyšují obsah chloridů) díky hustě vyvinutým tektonickým poruchám v této oblasti (Nakládal, 2009).

**Křída:** Křídové sedimenty jsou v Černuci tvořeny transgresními cenomanskými pískovci, na které nasedají tmavé uhelné prachovce a jílovce. Nad uhelnými prachovci a jílovci se nachází vrstva jemnozrnných mořských pískovců, která je zde posledním sedimentem usazeným v období cenomanu. Nad jemnozrnnými pískovci jsou turonské prachovce a jílovce, jejichž mocnost značně kolísá.

**Kvartér:** Nejsvrchnější vrstvou jsou kvartérní štěrkopísky.

**Transgresní cenomanské pískovce** patří do sladkovodní facie, tvoří je různě zrnité pískovce s variabilním zbarvením – od bílých, přes šedé, žluté, rezavé až černé v závislosti na obsahu organické hmoty a železa v různých oxidačních stavech. V těchto cenomanských pískovcích se vyskytují plošně omezené, avšak pro chemismus podzemních vod významné tmavé uhelné prachovce a jílovce obsahující pyrit a slídu. V pískovcích je rovněž možné najít zuhelnatělé zbytky rostlin. To má významný dopad na chemismus vod ve vrtech, které do něj zasahují (MC-1 a CJ-1). Přítomnost zuhelnatělých zbytků rostlin a pyritu v bazálním kolektoru přispívá ke zvýšenému obsahu síranů, železa a snižuje pH v podzemní vodě. Pískovce ze sladkovodní facie tvoří **bazální cenomanský kolektor**, ve kterém proudí vody hlubokého oběhu. Toto horninové těleso se sklání směrem k severovýchodu, což také odpovídá generelnímu směru proudění podzemní vody v tomto kolektoru (Nakládal, 2000, 2003; Nakládal, Hruška and Starosta, 2009).

Uhelné prachovce a jílovce svou nižší propustností oddělují bazální cenomanský kolektor od svrchního. Ne však zcela dokonale, neboť v nich často najdeme polohy pískovců, jež mohou hydraulicky propojovat oba cenomanské kolektory.

**Jemnozrnné pískovce** z mořské facie tvoří **svrchní cenomanský kolektor**, ve kterém proudí vody mělkého oběhu.

V nadloží jemnozrnných pískovců jsou uloženy turonské prachovitoslinité mořské sedimenty, které svojí nižší propustností izolují svrchní cenomanský kolektor od kvartérních štěrkopísků. Tam, kde turonský izolátor vykliňuje (viz obr. 4) přetéká voda ze štěrkopísků (která teče v oblasti pískovny směrem na jih (Nakládal, 1997)) do svrchního cenomanského kolektoru. Vykliňování izolátoru není plošně homogenní a odpovídá reliéfu mořského dna v období turonu (Nakládal, 2000). Izolátor má tendenci zvětšovat svoji mocnost směrem na severovýchod (vrt MC-3 turonské horniny téměř postrádá, zatímco v MC-1 dosahují mocnosti 15,5 m). K míšení vod kvartérního kolektoru s cenomanskými kolektory ale nedochází v Černuci jen kvůli absenci izolátoru mezi nimi. Celá oblast je protkaná tektonickými poruchami (viz obr. 4) z období třetihorního výzdvihu Českého masívu a poruchami vzniklými synsedimentárně v období křída. Tyto zlomy představují další cestu pro míšení mladších a starších podzemních vod. To způsobuje, že lokálně směr proudění vody nemusí odpovídat generelnímu směru proudu.

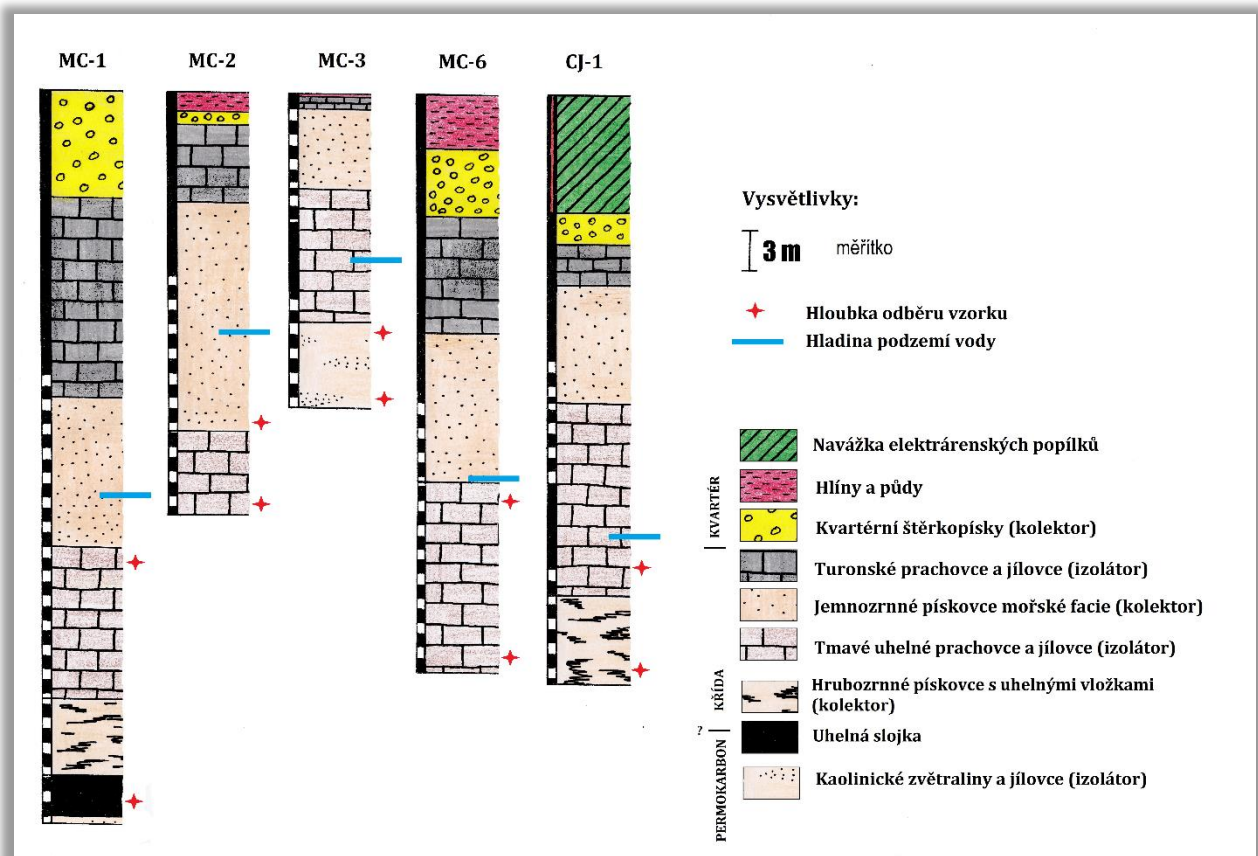
Lze předpokládat, že charakter povrchových vod bude od spodních značně odlišný např. v důsledku zemědělské či jiné antropogenní činnosti, mineralogického složení štěrkopísků a stáří vod. To dokládají chemické rozborů vod (viz přílohu C) z vrtu MC-3, který prakticky postrádá turonský izolátor a je tak přímo

vystaven vlivu povrchových vod (Nakládal, 2003; Nakládal, Hruška and Starosta, 2009).

Podzemní voda ve vrtech na Černuci nevyhovuje požadavkům na pitnou vodu. To je způsobeno jednak mineralogickým složením kolektorů (zuhelnatělé sedimenty, sulfidy, ale i složení izolátorů) a jednak v důsledku infiltrace povrchových vod (dusičnany, dusitany, chloridy).



**Obr. 4** Mapa se systémem vrtů a tektonických poruch v oblasti DP Černuc. Na mapě jsou hnědými čarami vyznačené tektonické zlomy pozorované hydrogeologem Petrem Nakládalem: přerušovaná čára – předpokládané zlomy, plná čára – doložené zlomy. Fialovou čarou je vymezeno území DP Černuc. Zelená čára představuje hranici vyklínění spodnoturonského izolátoru. Tmavě hnědá čára ukazuje vyklínění karbonu. Hydrogeologické vrty jsou označeny červenými kostkami se jménem. V této práci byly pro mikrobiologické rozbory odebrány vzorky z vrtů MC-1, MC-2, MC-3, MC-6, CJ-1 a JZD. Obrázek převzat a upraven podle Petra Nakládala



**Obr. 5 Petrografický popis vrtů a perforace zárubnic ve vrtech.** Vlevo na obrázku jsou zobrazené petrografické profily vrtů, vpravo vysvětlivky. V obrázku je znázorněn pouze vertikální rozměr (tedy šířka vrtů neodpovídá měřítku). Po levé straně sloupce vrtu je zobrazena perforace zárubnice – oblast, kde do vrtu vtéká voda z akviferu. (plná čára – plná zárubnice, přerušovaná čára – perforovaná zárubnice). Všechny zárubnice jsou z PVC. Vrt CJ-1 je zapuštěn na dně asi 9 m hluboké šachty, která byla vybudována až s navážkou elektrárenských popílků do DP Černuc. Hladina vody ve vrtu byla stanovena těsně před odběrem vzorku pro mikrobiální analýzu. Hloubkou odběru vzorku je myšlena poloha čerpadla při odběru vzorku pro mikrobiologické analýzy. Pro danou oblast není přesně vyřešena stratigrafická hranice karbon/ křída, proto je ve vysvětlivkách vlevo od litologických popisů otazník. Petrografický profil jednotlivých vrtů byl vytvořen na základě zpráv o budování vrtů (Nakládal, 2000, 2003, 2008).

### 1.8.1.2 Charakteristika jednotlivých vrtů

#### Vrt MC-3: zóna infiltrace povrchových vod, eutrofie

Vrt MC-3 byl vybudován 13.8.2002. Je ze všech vzorkovaných vrtů nejmělejší, má hloubku pouhých 22 m (Nakládal, 2003). Leží v poli západně od DP Černuc a je prvním vrtem v pořadí, pokud postupujeme ve směru proudění vody v křídových sedimentárních tělesech. Má z vrtů na Černuci nejvyšší obsahy dusičnanů, dusitanů, chloridů a manganu, nejvyšší mineralizaci, vodivost a chemickou spotřebu kyslíku (CHSK) a je naopak oproti zbytku vrtů poměrně chudý na železo (Nakládal, Hruška and Starosta, 2009) (viz příloha C). Vysoká CHSK je důsledkem vysokého obsahu organických látek z primární produkce na povrchu (pole), a příčinou vysoké mineralizace bude pravděpodobně používání zemědělských hnojiv (dusičnany, mangan, chloridy). Ve vrtu byly rovněž zjištěny obtížně degradovatelné chlorované organické polutanty (pesticidy) (Nakládal, 2003).

Obsah těchto látek je v souladu s hydrogeologickou situací ve vrtu: MC-3 se nachází v oblasti přetékání povrchových vod do jemnozrnných pískovců cenomanského kolektoru. V jeho těsné blízkosti vyklíňuje na

povrch turonský izolátor, který je zde již silně zvětralý a má mocnost pouhých 70 cm (obr. 5). Vstupu povrchových vod do cenomanu napomáhá i nedaleko ležící tektonický zlom (obr. 4). Proto lze tvrdit, že ve vrtu MC-3 hraje hlavní roli vliv povrchových eutrofních vod, které vtékají do svrchního cenomanského kolektoru. Naopak vody z bazálního cenomanského kolektoru s uhlím sem nepronikají vůbec, neboť zde zcela chybí vrstva sladkovodních cenomanských pískovců (obr. 5).

### **Vrt MC-1: zóna vzdáleného transportu infiltrovaných vod + ovlivnění uhelnou slojkou**

Vrt byl vyhlouben 14.8.2002. Zasahuje do hloubky 55 m pod terén a je tím pádem nejhlubším vrtem v Černuci. V mnoha ohledech je geochemickým opakem vrtu MC-3: Podzemní vody ve vrtu MC-1 jsou ovlivněné především minerálním složením cenomanských sedimentů a nikoli povrchovými vodami jako MC-3. Vrt prochází velice dobře vyvinutým turonským izolátorem, který brání masivnější infiltraci povrchových vod (viz obr. 5). Přesto nelze tvrdit, že komunikace cenomanského kolektoru s povrchem neexistuje – v blízkosti vrtu se nachází tektonická porucha ve směru východ-západ propojující oba kolektory. Při vrtání byl například zaznamenán příron vody z turonských izolátorů, který musí mít původ v puklinovém systému (Nakládal, Hruška and Starosta, 2009).

Ve vrtu MC-1 se mísí vody svrchního a bazálního cenomanského kolektoru. Svrchní cenomanský kolektor přináší vodu z oblasti infiltrace v okolí vrtu MC-3. Povrchové znečištění přítomné ve vrtu MC-3 se ovšem během transportu vody do oblasti vrtu MC-1 vytrácí díky samočisticí schopnosti jemnozrnných pískovců a možná i ředěním vodou z bazálního kolektoru. Smícháním s bazálním kolektorem na výše zmíněné tektonické poruše se rapidně mění geochemické vlastnosti vody. V tenké vrstvě uhlí, které zde najdeme na stropu permokarbonu (viz obr. 5) se často vyskytuje pyrit a pravděpodobně i jiné sulfidy. Rozklad sulfidů vede ke zvyšování obsahu síranů a železa a k nízkému pH (Nakládal, Hruška and Starosta, 2009). Ve vodě je rovněž doložen zvýšený obsah některých stopových prvků jako je arsen, nikl nebo beryllium (Nakládal, 2003). Jejich původ ale nemusí být jen v minerálech sedimentů nýbrž také v elektrárenských popílcích uložených v pískovně.

Voda vrtu MC-1 oproti MC-3 neobsahuje takové množství dusičnanů ale spíše amoniak. Chloridy, které mají částečně původ v povrchových vodách, také mizí, a naopak přibývá dvojmocného železa a snižuje se pH. Voda má také vysokou CHSK (Nakládal, Hruška and Starosta, 2009). Celkově je podzemní voda ve vrtu MC-1 redukční, kyselá s rozpuštěnými kovy a oligotrofní s poměrně nízkou celkovou mineralizací (druhou nejnížší v Černuci). Tím se vrt MC-1 podstatně liší od ostatních vrtů v Černuci.

### **Vrt MC2: zóna blízkého transportu a čištění infiltrovaných vod**

Monitorovací vrt MC-2 byl vyhlouben 20.8.2002. Je hluboký 31 m.

Podzemní vody ve vrtu MC-2 lze jednoduše popsat jako vody, které přitékají svrchním cenomanským kolektorem z oblasti infiltrace u vrtu MC-3 ale dosud nedorazily ke zlomu u vrtu MC-1 a nejsou tudíž významně ovlivněny redukujícími kyselými vodami bazálního kolektoru. Průtokem jemnozrnnými pískovci ztrácejí částečně povrchová znečištění – ubývá dusičnanů a chloridů. Protože se vody v MC-2 nepotkávají s kyselými vodami bazálního kolektoru, pH se nesnižuje jako ve vrtu MC-1. Voda se zde svými parametry

nejvíce ze všech na Černuci přibližuje pitné. Obsahy dvojmocného železa jsou zde zanedbatelné, pravděpodobně kvůli dobré okysličenosti a neutrálnímu pH vod (všechno železo, které by se zde mohlo objevit z pyritu v uhelných prachovcích se za těchto podmínek vysráží).

Podzemní voda vrtu MC2 zachycuje proces čištění infiltrovaných povrchových vod v izolaci od povrchu (pod turonským izolátorem) bez ovlivnění bazálním cenomanským kolektorem.

### **Vrt MC6: zóna vzdáleného transportu infiltrovaných vod s menším vlivem bazálního kolektoru**

Vrt MC-6 byl vyhlouben 09.10.2008. Jeho hloubka je 43 m.

Vrt MC-6 se nachází podobně jako MC-1 v oblasti transportu cenomanských vod vsakovaných jihozápadně od DP Černuc a je ovlivněn zlomovými strukturami umožňujícími mísení s kyselými vodami bazálního cenomanského kolektoru. Tomu nasvědčují velmi vysoké obsahy síranů a druhé nejnižší pH z vrtů na Černuci. Na druhou stranu vody ve vrtu MC-6 nemají redukční charakter jako v MC-1. Vrt totiž přímo nenaráží bazální cenomanský kolektor. Pouze se mu přibližuje, jak lze usuzovat z hrubnutí sedimentace (výskyt lamin povodňových hrubozrnných pískovců) v tmavých cenomanských prachovcích zastižených na dně vrtu. V těchto horninách byl také během vrtných prací zaznamenán významný příron vody (Nakládal, Hruška and Starosta, 2009).

Vrt MC-6 je tedy kombinací charakteristik vrtů MC-1 a MC-2. Je pro něj příznačný velmi malý vliv povrchových vod ovlivněných zemědělskou činností (nízký obsah dusičnanů a chloridů) a nízké pH jako je tomu u MC-1. Od MC-1 se ale liší menší mírou komunikace s bazálním cenomanským kolektorem a absencí uhelné sloje – v tomto ohledu se přibližuje více vrtu MC-2.

### **Vrt CJ-1: zóna mísení infiltrovaných vod blízkého transportu s hlubokými vodami cenomanu**

Vrt CJ-1 byl vyvrtán 22.08.2000 do hloubky 35 m přímo na území DP Černuc (Nakládal, 2000). V současnosti je ještě o cca 9 m hlubší kvůli navážce elektrárenských popílků na vytěžené dno pískovny. Vrt se nachází v oblasti blízkého transportu vod infiltrovaných v oblasti vrtu MC-3 a zasahuje stejně jako vrt MC-1 do bazálního kolektoru cenomanských pískovců s roztroušenými kusy zuhelnatělých rostlin. Ve vrtu CJ-1 se ale nenachází uhelná slojka jako ve vrtu MC-1.

Vrt CJ-1 má ze všech vrtů nejvyšší obsahy železa a nízké pH stejně jako vrt MC-1 (Nakládal, Hruška and Starosta, 2009).

### **Studna JZD**

Vrt u JZD slouží jako jímací vrt. K tomuto vrtu není k dispozici dokumentace petrografického profilu ani kompletní chemický rozbor vody. Podle dokumentace (Nakládal, 2003) nevyhovuje limitům pro pitnou vodu zvýšeným obsahem dusičnanů, chloridů, síranů, hliníku a celkovou mineralizací. Vrt je mírně znečištěn organickými látkami tlejícími a dně. Vzhledem k poloze lze odhadovat podobnou litologii jako má vrt MC-3 s tím, že není známo, do jaké hloubky vrt zasahuje. Podle ústního sdělení Petra Nakládala by měl vrt zasahovat do permokarbonu, který zde leží, podobně jako u MC-3, blízko k povrchu. Podzemní voda ve vrtu

má původ buďto v kvartérních štěrkopískách nebo se jedná o vody proudící v mělkém oběhu přípovrchového rozpojení horninového masívu (Nakládal, 2003).

## Vrt JL-2C

Vrt JL-2C byl vybudován v roce 1996 a je hluboký 100m. Používá se k jímání vody na území štěrkopískovny v Ledčicích, která leží zhruba 5 km severovýchodně od DP Černuc. Z vrtu je čerpána voda z bazálního cenomanského kolektoru s napjatou hladinou, která je podobné kvality jako ta v Černuci (nízký redox potenciál, vliv uhlí). Příronu vody ze svrchního štěrkopískového kolektoru je zabráněno cementací zaplášťového prostoru v prvních 44 m hloubky vrtu. Vrt má oproti ostatním PVC vrtům pažnici ocelovou s perforací v hloubkových intervalech 58,9 - 68,9 m a 73,5 - 95,60 m. V roce 2008 došlo ve vrtu ke snižování vydatnosti pravděpodobně v důsledku porušení betonové ochrany a průniku okysličených povrchových vod, což mělo za následek mikrobiální kolmataci vrtu. Vrt byl poté mechanicky vyčištěn a desinfikován. Během čištění 2008 byl ve vrtu již od hloubky 59 m detekován černý kal s obsahem železa, manganu a organické mikrobiální hmoty silně zapáchající sirovodíkem (Nakládal, 2008).

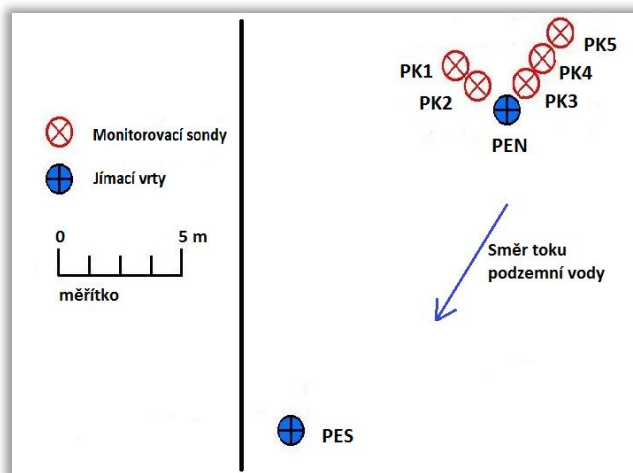
## 1.8.2 Pekařka

### 1.8.2.1 Geologická charakteristika a využití vrtů

Další lokalitou, kde byly odebrány vzorky pro mikrobiologické analýzy je bývalá pískovna nedaleko obce Pekařka v severních Čechách. Na Pekařce je geologická situace podstatně jednodušší než v Černuci. Všechny vrty se nacházejí na malé ploše v dolíku vytěžené pískovny a zasahují do kvartérních štěrkopísků jejichž báze je zde zhruba 14 m pod povrchem. Pod štěrkopísky se nacházejí asi metr mocné jíly, které nasedají na rulové paleozoické podloží. Na Pekařce je navrtána pouze jedna zvodeň v rámci štěrkopísků (obr. 7).

Voda na Pekařce se využívá jako pitná a je čerpána z jednoho z vrtů do blízké vodárny v intervalech závislých na spotřebě. Tento čerpaný vrt (PEN) má ve svém okolí rozmístěny pozorovací sondy (PK1-PK5), které mají sloužit k monitoringu dynamiky hladiny podzemní vody v bezprostřední blízkosti vrtu PEN (obr. 6). Tyto sondy byly vybudovány v roce 2013. Opodál je další jímací vrt (PES) vyvrtaný v roce 1964, který se již v současnosti pro čerpání nevyužívá. Vrt

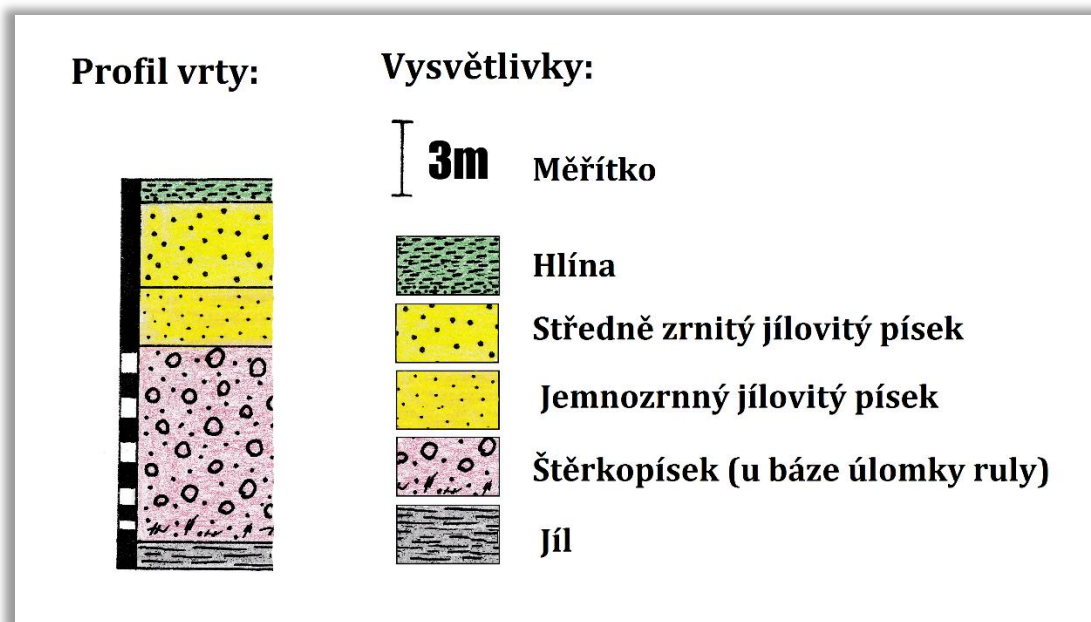
PEN je rovněž z 60. let. Podzemní voda proudí za klidového stavu (když se nečerpá), ve směru od vrtu PEN k vrtu PES. Oba dva jímací vrty se liší od sond tím, že jejich pažnice jsou ocelové, zatímco monitorovací sondy jsou z polyethylenu. Všechny pět sond sahá do hloubky 15 m s tím, že perforace zárubnice je v úseku 7-



**Obr.1** Uspořádání vrtů na Pekařce. Modře jsou vyznačeny jímací vrty: odstavený PES a používaný PEN, červeně jsou zakresleny pozorovací sondy. Upraveno podle Pech et al. 2014.



14 m pod povrchem (obr. 7). Zbytek tvoří zárubnice plná s jílovým těsněním v prvních dvou metrech hloubky. Jímací vrt PEN je hluboký 13,9 m, perforovaný v hloubce 8-13 m (Pech *et al.*, 2014). Odstavený vrt PES má hloubku 15,6m a chybí dokumentace o perforaci. Lze ale očekávat podobnou jako u vrtu PEN.



**Obr. 7 Petrografický profil zvodní na Pekařce.** V obrázku je znázorněn pouze vertikální rozměr (tedy šířka vrtů neodpovídá měřítku). Po levé straně sloupce vrtu je zobrazena perforace zárubnice u pozorovacích (plná čára – plná zárubnice, přerušovaná čára – perforovaná zárubnice). Vytvořeno na základě dat poskytnutých D. Kahudou z ČZU (osobní korespondence).

### 1.8.2.2 Chemismus vod

Vody na Pekařce jsou oligotrofní, dobře okysličené s neutrálním pH, voda ze všech vrtů je po chemické stránce prakticky stejná. To není vzhledem k totožné litologii a malé vzdálenosti vrtů překvapující. Jediné, co geochemickou monotónnost narušuje, je přítomnost ocelové pažnice. Ta způsobuje nejvýznamnější rozdíl v chemismu vod, který je zde možné pozorovat – vrty PES a PEN mají vyšší obsahy celkového i dvoumocného železa, a naopak lehce snížené obsahy dusičnanů oproti plastovým sondám (viz tab.1).

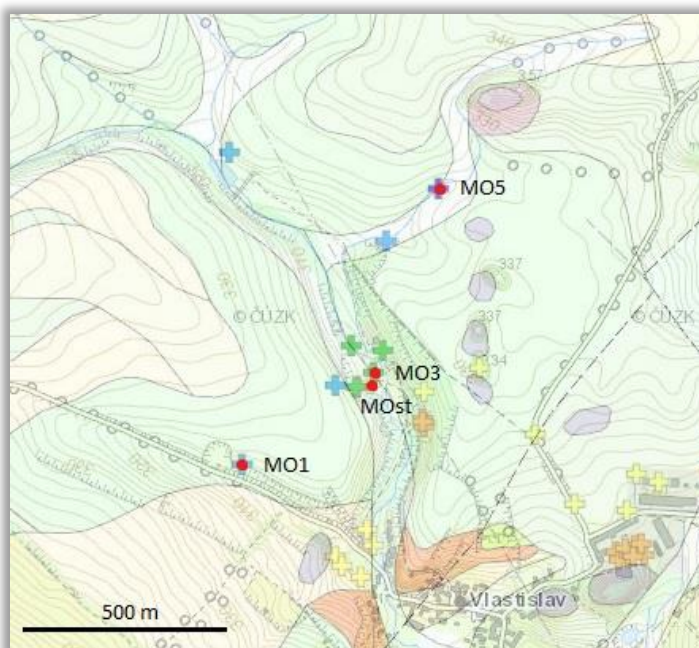
látko	jednotka	PES	PEN	PK1	PK2	PK3	PK4	PK5
Fe <sup>2+</sup>	mg/l	0,27	0,33	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,08
železo	mg/l	6,2	2,2	0,93	0,95	0,54	0,26	0,37
dusičnany	mg/l	52,6	52,9	60,7	64,4	62,6	59,8	58,1

**Tab. 1 Obsahy železa a dusičnanů v podzemní vodě na Pekařce.** Data poskytnuta D. Kahudou z ČZU (osobní korespondence). Datum odběru na chemické rozborů: 14.-15.10. 2013. Vzorky na rozbor byly odebrány před čerpací zkouškou. Barevná škála: sytě žlutá – vyšší obsah, světle žlutá – nižší obsah

### 1.8.3 Vlastislav

Jímací území Vlastislav leží v CHKO České středohoří západně od Lovosic. V 60. letech 20. století zde byly vybudovány vodárenské vrty za účelem odběru pitné vody. Zájmovým kolektorem jsou zde cenomanské a

spodnoturonské sedimenty České křídové pánve s puklinovo-průlinovou propustností. Pro cenomanské písčité sedimenty je typická průlinová propustnost, zatímco pro spodnoturonské slínovce puklinová. Křídové sedimenty jsou zde lokálně překryté kvartérními naplaveninami a alkalickými neovulkanity. Žádný ze vzorkovaných vrtů však přímo těmito vyvělinami neprochází (viz obr. 8 a obr. 9). Podloží křídových sedimentů tvoří tmavošedé slídnaté ruly z období proterozoika až kambria, které mají minimální význam pro oběh podzemních vod (Václavek, 1968).



### 1.8.3.1 Oběh podzemní vody v povodí Modly

Hydrogeologická struktura ve zkoumaném území má jeden obzor podzemní vody s volnou hladinou v křídových sedimentech, jejíž generelní spád je od severozápadu k jihovýchodu. V příčném řezu údolím řeky Modly teče voda z rozvodnice na hřebenech povodí směrem ke korytu řeky, kde se nachází několik vývěrů. Tyto vývěry vznikly přirozeně postupným zahlabováním koryta řeky až pod úroveň hladiny podzemní vody. Nejsilnější z nich je vývěr u kaple na pravém břehu Modly (MOst viz obr. 8). Podle hydrogeologických zpráv (Václavek, 1968) je vydatnost vývěrů významně ovlivněna infiltrací srážek v povodí a při silných výkyvech počasí je možné zaznamenat změny ve vydatnosti ještě týž den – oblast vsaku leží totiž v těsné blízkosti vývěru. Infiltrace probíhá převážně v horninách spodního turonu tvořenými slíntými spongilitickými sedimenty s různým podílem prachové či písčité složky. Tyto horniny tvoří výchozy v depresi řeky Modly. Směrem do svahu (přibližně od vrstevnice 335 m. n. m. – viz obr. 8) je střídají sedimenty mladší a méně propustné (střední a svrchní turon). Sedimenty svrchního a středního turonu mají oproti spodnímu turonu menší propustnost, protože obsahují větší podíl jílové složky, která vyplňuje vlivem větrání pukliny a zabraňuje tak masivnější infiltraci srážek (Václavek, 1968).

**Obr.8 Geologická mapa jímacího území Vlastislav v povodí Modly s vyznačenými vrty a vývěry, ze kterých byly odebrány vzorky na mikrobiologické rozbory. Převzato a upraveno podle geologické mapy 1:25 000 a mapy vrtné prozkoumanosti z mapového serveru České geologické služby. Vysvětlivky: křížky – vrty nebo prameny, červené tečky – vzorkované vrty nebo prameny**  
**Geologické jednotky: zelená – písčité slínovce, spongilitický jílovec (turon), zářivě zelená – pískovec křemenný, jílovitý, glaukonitický (cenoman), fialová – olivinické alkalické vulkanity (terciér), oranžová/červená – ortorula (krystalinikum – saxothuringikum), béžová – štěrky (kvartér)**

Geologické jednotky: zelená – písčité slínovce, spongilitický jílovec (turon), zářivě zelená – pískovec křemenný, jílovitý, glaukonitický (cenoman), fialová – olivinické alkalické vulkanity (terciér), oranžová/červená – ortorula (krystalinikum – saxothuringikum), béžová – štěrky (kvartér)

Vzorkované vrty spadají jak do oblasti infiltrační (vrty MO1 a MO5 – každý na opačné straně údolí řeky) tak do oblasti vývěrové (vrt MO3 a vývěr MOst) ležící v nižších partiích údolí.

### 1.8.3.2 Charakteristika vrtů

#### MO1

Vrt MO1 byl vyhlouben v roce 1967 (listopad–prosinec) do hloubky 50 m v kopci na pravém břehu řeky Modly. Hladina byla naražena v 17 m pod terénem a ustálila se na 14,5m po ukončení vrtných prací (Václavek, 1968). Zárubnice vrtu je ocelová s perforací v hloubce 22–46 m. V prvních 22 m byl zastižen spodnoturonský spongilitický slínovec, skrze který infiltrují srážky do hlubších částí. Zhruba do úrovně hladiny podzemní vody má zprvu bílou, pak šedivou až světle žlutou barvu. Od úrovně hladiny podzemní vody barva horniny tmavne na žlutohnědou a pukliny mají limonitový povlak indukující oxidaci a srážení železa. Na slínovce navazují cenomanské slepence a pískovce v úseku od 22 m do 36,5m. Slepence představující vrchní dva metry cenomanu obsahují pyritové konkrce a impregnace, pod nimi jsou uloženy šedé pískovce s příměsí slídy. Od hloubky 36,5m ke dnu vrtu byly zastiženy horniny, jejichž stratigrafické zařazení není zcela jednoznačné (obr. 9). Kvůli způsobu vrtání nebylo možné zjistit texturu ani strukturu hornin. Není proto jasné, zdali se jedná o pískovce a slepence vzniklé zvětráváním před křídovou transgresí (permokarbon) nebo o podložní rulu, která je bezpečně prokázána pouze ve vrtu MO5. Tyto horniny nejasného zařazení mají červenou barvu, hlouběji přecházejí do hnědé až šedohnědé (Václavek, 1968).

V současné době je výstroj vrtu MO1 v hloubkách cca 21-24 m zhroucená. Vrt je od této hloubky zavalen obsypem. Přesto má vrt MO1 vydatnost 2-3 l/s (Průša, 2014).

#### MO5

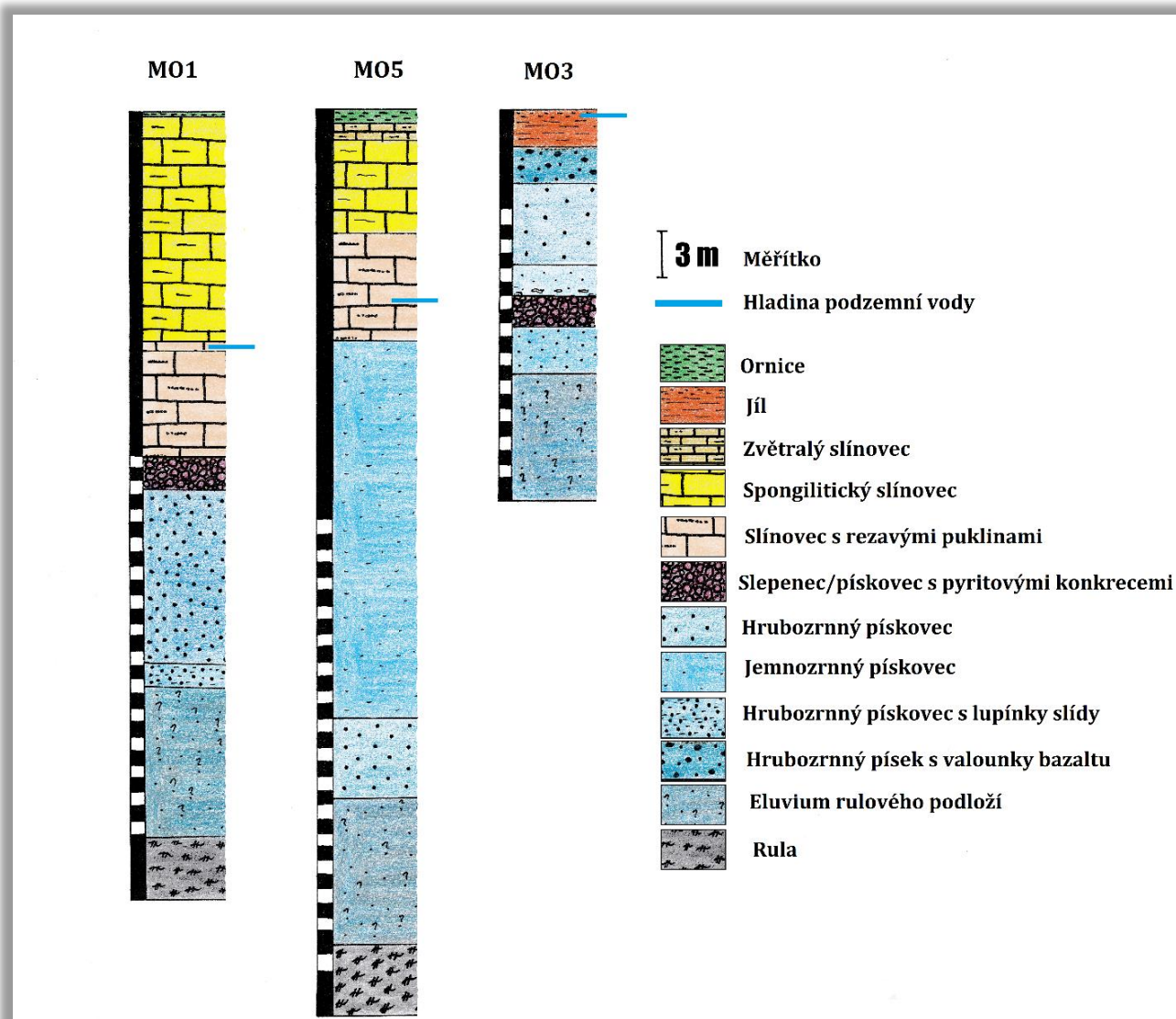
Vrt MO5 byl vyhlouben v roce 1968 (prosinec 1967–leden 1968) do hloubky 57,5 m v kopci na levém břehu řeky Modly. Hladina byla naražena v 18 m pod terénem a ustálila se na 12 m po ukončení vrtných prací (Václavek, 1968). Zárubnice vrtu je ocelová s perforací v hloubce 26–55 m. První dva metry vrtu MO5 zasahují do navětralých kvartérních písčitých slínovců. Vrt poté pokračuje spodnoturonskými slínovci až do hloubky 15 m pod terénem. Spodnoturonské sedimenty zde mají velmi podobný charakter jako ve vrtu MO1 – ve svrchní části mají šedohnědou barvu a až v oblasti okolo hladiny podzemní vody (8–15 m) jsou spíše hnědé s rezavými puklinami. V 15 m vrt zachycuje cenomanské pískovce, nejprve křemité, od hloubky 30 m slídnaté. Podloží cenomanu tvoří žlutohnědý pískovec (jedná se patrně o přeplavené eluvium ruly ležící pod těmito pískovci) a od hloubky 53 m do 57,5 m tmavošedá slídnatá rula (Václavek, 1968)(viz obr. 9).

#### MO3

Vrt MO3 byl vyhlouben v roce 1967 (říjen–listopad) do hloubky 25 m. Vrt leží na pravém břehu řeky v její nivě 25 m od vývěru MOst. Oproti vrtům MO1 a MO5 ležícími výše na svazích údolí má hladinu podzemní vody podstatně blíže povrchu. Hladina byla naražena v 6 m pod terénem a ustálila se na 0,3 m. Zárubnice je perforovaná od hloubky 6,25 m do 23,5 m. Vrt MO3 má mělkou hladinu podzemní vody, protože je ovlivňován řekou ležící v jeho těsné blízkosti. Dynamika řeky se projevuje i v typu sedimentů uložených v nivě. Prvních 5 metrů je tvořeno kvartérními naplaveninami – jíly ve svrchní části a písky s valounky pískovce a bazaltu ve spodní části. Spodnoturonské slínovce v nivě úplně chybí, takže kvartérní sedimenty nasedají rovnou na cenomanské sedimenty, které pokračují až do hloubky 17 m pod terén. Prvních 5 m cenomanský hornin tvoří kaolinické hrubozrnné pískovce, které přecházejí v jemnozrnné slídnaté pískovce.

V hloubkách mezi 11,5 m a 14 m má pískovec tmavší šedou barvu a obsahuje pyritové konkrce a impregnace. Báze cenomanu je tvořena arkózovými pískovci, které nasedají na horniny hnědočervené barvy, jejichž stratigrafické zařazení není jednoznačné stejně jako ve vrtu MO1 (Václavek, 1968) (viz obr. 9).

Vrt MO3 se v současnosti jako jediný z vrtů čerpá.



**Obr.9 Petrografický profil hydrogeologickými vrtů ve Vlastislavi.** V obrázku je znázorněn pouze vertikální rozměr (tedy šířka vrtů neodpovídá měřítku). Po levé straně sloupce vrtu je zobrazena perforace zárubnice (plná čára – plná zárubnice, přerušovaná čára – perforovaná zárubnice). Hladina podzemní vody znázorněná v obrázku odpovídá ustálené hladině po navrtání vrtu. Upraveno podle dokumentace jímacího území Vlastislav (Václavek, 1968).

**Tab.2 Obsahy rozpuštěných iontů v podzemní vodě v jímacím území Vlastislav.** Chemické rozborů v tabulce jsou uvedeny podle současné dokumentace jímacího území Vlastislav (Průša, 2014).

	železo	mangan	dusičnany	pH	sírany
	mg/l	mg/l	mg/l		mg/l
MO1	0,12	<0,05	38,2	7,2	220
MO3	0,22	0,32	2,8	6,9	294
MO5	2,6	0,15	<2,00	7	223
MOst	<0,02	<0,05	29,1	7,2	208

## MOst

Vývěr pod kaplí podchycený krátkou jímací štolou leží na pravém břehu řeky nedaleko od vrtu MO3. Jeho vydatnost značně kolísá v závislosti na srážkách (a roční době). Nejvyšší průtoky jsou spojené s obdobím jarního tání (až 25 l/s). Nejnižší průtoky v obdobích sucha dosahují 8-9 l/s (Průša, 2014). Obsahy rozpuštěných látek a hodnoty pH jsou uvedeny v tab. 2.

## 2 Materiál a metody

### 2.1 Přístroje

Čerpadlo SQ 2–70 (Grundfos) s plastovou hadicí, centrála EU 10i (Honda) pro pohon čerpadla, měřidlo WTW Multi 340i (WTW) s elektrodami Sentix ORP (měření Eh), Sentix 41 (měření pH), Tetracon 325 (měření konduktivity), WTW CelloX 325 (měření kyslíku), čerpadlo Gigant (Ekotechnika), Cykler TouchGene gradient (Techne), cykler XP (Bioer), regulovatelný zdroj stejnosměrného proudu Power station 300 (Labnet), sada mechanických pipet EpResearch pipet (Eppendorf), sterilní zkumavky (Jet Biofil, Eppendorf), stolní centrifuga Minispin Plus (Eppendorf), termoblok Thermomixer comfort (Eppendorf), trans-iluminátor TCP-20-MC (Vilber Lourmat), váhy ABC plus 600H (ADAM Equipment), vortex MS1 minishaker (IKA), centrifuga Hettich universal 32R (DJB Labcare), špičky s filtrem (Sigma)

### 2.2 Chemikálie

LA PCR buffer complete (Top-Bio, Brno), LA DNA Polymerases Mix (Top-Bio, Brno), dNTP Mix každý 10 mM (Thermo Fisher Scientific), primery (Sigma-Aldrich), voda pro PCR (Top-Bio, Brno), DMSO (Top-Bio, Brno), Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific), Gelred (Biotium), agarosa (Sigma), destilovaná voda, PCR enhancer (Top-Bio)

#### 2.2.1 Primery

Pro primární PCR univerzální prokaryotické primery 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), 515 F (CCAGCMGCCGCGGTAA), pro sekundární PCR stejné primery se specifickými tagy 806R\_T115 (ACTAGGCGCCGACTACHVGGGTWTCTAAT), 806R\_T119 (ATAGCCGCGGACTACHVGGGTWTCTAAT) a 515\_FXX se společným základem GTGCCAGCMGCCGCGGTAA a specifickými tagy na začátku sekvence (viz tab. 3).

**Tab. 3 Tagy primeru 515\_FXX**

F01 ATATAC	F07 ATAGAG	F13 ACTCAG	F19 ATCATC	F25 ATCGAC	F32 ATGTCT
F02 ATATCA	F08 ATAGTC	F14 ACTCTC	F20 ATCACT	F26 ATCGTG	F33 ATGTGC
F03 ATATGT	F09 ATAGCT	F15 ACTCGT	F21 ATCAGA	F27 ATCGCA	F34 ATGCAC
F04 ATACAT	F10 ACTATG	F16 ACTGAT	F22 ATCTAT	F28 ATGATA	F35 ATGCTG
F05 ATACTA	F11 ACTACA	F17 ACTGTA	F23 ATCTCG	F29 ATGACG	F36 ATGCGA
F06 ATACGC	F12 ACTAGC	F18 ACTGCG	F24 AGCTGA	F31 ATGTAG	

### 2.2.2 Roztoky pro elektroforézu:

TBE pufr (89 mM Tris.HCl; 89 mM kyselina boritá; 2 mM EDTA; pH 8,0), Vzorkový pufr (50% glycerol; 0,13 M EDTA; 0,12% bromfenolová modř; pH 8,0)

### 2.2.3 Komerční kity

ZR Xpedition soil/fecal™ (Zymo Research), Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research)

## 2.3 Odběr vzorků

Vzorky byly odebírány z hydrogeologických vrtů a pramenů podzemních vod v sedimentech na území Českého masívu. Pokud to bylo možné, byl z vrtů odebrán jak vzorek vody, tak vzorek kalu z kalníku. Nejprve byla změřena hladina podzemní vody, poté se čerpalo z hloubky prvních metrů pod hladinou podzemní vody. Hadice byla promyta proudící vodou z vrtu, aby se zmenšila pravděpodobnost navzorkování mikroorganismů rostoucích uvnitř v hadici nebo mikroorganismů z předchozích čerpání (hadice ani čerpadlo nebyly sterilní). Po několika minutách proplachování byla odebrána voda do sterilní 50ml zkumavky tak, že zkumavka nebyla naplněna až po okraj (voda by během zmrazování vzorku mohla prorazit uzávěr) a byla okamžitě uzavřena. Následně byly v jiné zkumavce naměřeny hodnoty Eh, pH, konduktivity a koncentrace rozpuštěného kyslíku. Pokud to vydatnost vrtu umožnila, měření probíhalo v tekoucí vodě do ustálení hodnot. Poté bylo čerpadlo spuštěno na dno vrtu a byl zvířen kal. Kal byl čerpán a odebrán stejným způsobem jako voda včetně měření hodnot (na místě bylo možné zrakem dobře odlišit, že hadicí již protéká zbarvená voda z kalníku, odebíráno bylo při pokud možno maximálním zákalu).

V případě, že byla vzorkována hornina, byla odebrána jako vrtný prach z vrtné soupravy čerstvě vrtaného vrtu. Vzorky byly v den odběru dopraveny na Přírodovědeckou fakultu UK a zmrazeny na -80 °C, aby se zamezilo růstu mikroorganismů a byly zachovány původní poměry v zastoupení druhů.

## 2.4 Izolace DNA

Izolace DNA probíhala v místnosti pro sterilní práci, kde je přes noc zapínáno UV světlo za účelem sterilizace používaných ploch. Vzorky byly rozmrazovány za pokojové teploty (cca 25 °C). Poté, co roztála všechna voda, byly centrifugací při 9000 otáčkách/min odděleny buňky a případný sediment od nadbytečné vody. Supernatant byl zlikvidován a sediment zpracován kitem DNA ZR Xpedition soil/fecal™ podle návodu výrobce.

## 2.5 PCR

Z každého vzorku byla amplifikována 16S rDNA pomocí příslušných primerů. Vzorky byly amplifikovány v triplikátech po 25 µl. Poté bylo pomocí elektroforézy testováno, zdali je výsledek PCR pozitivní. V případě, že při následné elektroforéze nebylo možné na gelu detekovat amplifikovanou DNA, bylo PCR u daného vzorku provedeno znovu zkušebně v monoplikátu (50µl) s tím, že izolát z problematického vzorku byl přečištěn ve filtrační špičce, aby byly odstraněny případné inhibitory PCR. Pokud nevedlo k lepšímu výsledku ani toto opatření, byl změněn poměr chemikálií v reakční směsi pro primární PCR – např. bylo přidáno větší množství templátu, byla snížena dávka primerů na poloviční, byl přidán PCR enhancer. Kvalita primárního amplifikátu byla kontrolována pomocí TRFLP a sangerovské sekvenace v laboratoři na Přírodovědecké fakultě UK, aby se předběžně zjistilo, zdali se během přípravy amplifikace nedostala do reakční směsi kontaminující DNA – např. *Escherichia coli*. Ve vzorcích s dominujícími kontaminacemi z laboratoře bylo zvýšeno množství templátu přidaného do reakční směsi pro primární PCR. Poté, co bylo nalezeno optimální nastavení pro každý vzorek, byla DNA amplifikována v triplikátech. Po amplifikaci byly triplikáty pro jednotlivé vzorky smíseny a část amplifikátu byla použita pro elektroforetické ověření toho, zdali je výsledek PCR pozitivní. Z amplifikátu bylo poté použito 0,3 µl jako templátu pro sekundární PCR. Složení výchozí reakční směsi (bez úprav pro problematické vzorky) pro primární PCR bylo následující: PCR pufr - 2,5 µl, DMSO - 0,5 µl, dNTP - 0,25 µl, primer U5415F - 0,3 µl, primer U1406R - 0,3 µl, LA DNA Polymerase - 0,15 µl, templát - 0,5 µl, PCR voda - 20,5 µl. Reakční směs byla připravována sterilními nástroji v laminárním boxu.

Primární amplifikace probíhala ve 30 cyklech při nastavení jednotlivých cyklů uvedeném v Tab.4.

Sekundární amplifikace probíhala ve 12 nebo 15 cyklech (podle síly bandu v gelu po elektroforéze z primárního PCR) se stejným nastavením. Reakční směs se lišila pouze tím, že byly použity tagované primery, které umožňují přiřazení sekvence ke vzorku po sekvenaci Illumina MiSeq.

**Tab. 4 Nastavení PCR**

proces	teplota	čas
počáteční denaturace	94 °C	2 min
denaturace	94 °C	20 s
nasedání primerů	55 °C	30 s
amplifikace	68 °C	50 s

## 2.6 Elektroforéza

Po primární i sekundární amplifikaci vždy následovalo přečištění vzorku elektroforézou v 1 % agarosovém gelu v TBE pufru s Gelred ředěném 10 000 x. Každý vzorek byl před elektroforézou smíchán se vzorkovým pufrem v poměru 5:1. Po elektroforéze běžící při napětí 15–17 V/cm byl pod UV světlem vyříznut band o příslušné molekulové hmotnosti podle standardu hmotnosti Gene Ruler DNA Ladder Mix. Vyřezávání pod UV probíhalo velmi rychle, pracovalo se maximálně po 5 vzorcích na jednom gelu, aby nedocházelo zbytečně k degradaci molekul DNA vlivem záření. Vzorky byly na gel umístěny vždy ob jednu dráhu, aby

při vyřezávání nemohlo dojít ke spojení dvou vzorků dohromady. DNA byla z gelu extrahována pomocí kitu Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit v případě, že byl výsledek elektroforézy pozitivní (na gelu byl viditelný band).

## 2.7 Sekvence a zpracování sekvencí

Sekvence proběhla technologií Illumina MiSeq v režimu 2 x 250 bp v Laboratoři environmentální mikrobiologie MBÚ AV ČR. Byly odstraněny sekvence s nevyhovující kvalitou (průměrná kvalita bází <30) a spojeny párové konce v programu Fastq-join (Aronesty, 2013). Tyto úpravy provedla rovněž laboratoř MBÚ.

V programu Seed (Větrovský and Baldrian, 2013) byly přiřazeny sekvence k jednotlivým vzorkům podle specifických tagů. Z obou dvou stran sekvence byly následně odstraněny primery s tagy. V podprogramu UCHIME byly odstraněny chimérické sekvence. Ze zbylých sekvencí byly vytvořeny operační taxonomické jednotky OTU s hranicí rozdílnosti 3 %. OTU byly alignovány ve volně dostupném programu MAFFT (Kato *et al.*, 2002) metodou L-INS-I. Pro každou OTU byla vypočítána reprezentativní sekvence (konsenzus) tvořená nejčastějším typem nukleotidu v daném lokusu. V programu Seed byla zkonstruována tabulka četností jednotlivých OTU ve vzorcích, která byla použita pro následující analýzy.

## 2.8 Bioinformatické analýzy

### 2.8.1 Vyřazení kontaminací, semiautonomních organel a singletonů

Pro všechny následující analýzy byly eliminovány takové OTU, které srovnáním s databází GenBank pomocí nástroje BLAST (Altschul *et al.*, 1990) dosahovaly vysoké podobnosti (více než 97%):

- a) se semiautonomními organelami (plastidy a mitochondrie eukaryotních organismů)
- b) s prokaryotními organismy vyskytujícími se na člověku a jiných obratlovcích a v kvasících potravinách (např. *Enterobacter ludwigii*, *Phenylobacterium sp.*, *Staphylococcus epidermis*, *Lactobacillus coryniformis* a další),
- c) s mikroorganismy prokázanými nebo očekávanými v místě uchovávání vzorků, izolace DNA a amplifikace, které často bývají kontaminacemi i v jiných laboratořích (Salter *et al.*, 2014), jako jsou *Escherichia coli*, *Janthinobacterium svalbardensis*, *Rhodococcus corynebacterioides* a další.
- d) s mikroorganismy popsány ve studiích kyselých důlních vod, kde se pro účely izolace a amplifikace DNA používaly fyzicky stejné chemikálie ve stejné laboratoři a které vzhledem k nárokům na velmi nízké pH nemohou prosperovat ve vodách s neutrálním pH (*Metallibacterium scheffleri*, *Ferrovum myxofaciens*).
- e) singletony – OTU zastoupené pouze jedinou sekvencí – byly vyřazeny pro ordinační analýzu a analýzu fylogenetické disimilarity.

### 2.8.2 Analýza nejhojnějších mikroorganismů

Do analýzy nejhojnějších mikroorganismů byly zahrnuty OTU, které mají minimálně 2% zastoupení v



alespoň jednom vzorku nebo OTU, které patří mezi prvních deset nejhojnějších OTU v aspoň 1 vzorku. Pokud na desátém místě bylo více OTU, byly do analýzy zahrnuty všechny tyto OTU. Analýza se skládala ze dvou kroků:

- a) OTU byly porovnány s databází GenBank pomocí nástroje BLAST, kde k nim byl přiřazen druhový název mikroorganismu. Bylo vybráno 5 nejlepších hitů a na základě typu prostředí, ze kterého těchto 5 nejpodobnějších sekvencí pro 16S rDNA pocházelo, byl stanoven orientačně charakter prostředí pro každý analyzovaný OTU a následně pak charakter prostředí vzorku, který dané OTU obsahoval.
  - b) Na základě druhových případně rodových jmen nejpodobnějších hitů byl v literatuře dohledán metabolismus daného polyfázického druhu, respektive rodu. Jednalo se o popis těchto vlastností: nároky na kyslík, zdroj uhlíku, donor elektronů, akceptor elektronů.
- **Aerobní** – mikroorganismy u kterých byl popsán pouze kyslík jako akceptor elektronů, nebo mikroorganismy, jejichž kmeny jsou v literatuře označovány jako „striktně“ nebo „obligátně“ aerobní (Bouvet & Grimont 1986, Fudou et al. 2002).
  - **Fakultativně anaerobní** – mikroorganismy, které využívají primárně kyslík jako akceptor elektronů, protože se jedná o energeticky výhodnější proces, ale pokud není k dispozici v dostatečném množství jsou schopny respirovat dusičnany nebo jiný energeticky méně výhodný redukovatelný akceptor elektronů, případně fermentovat. Tento typ je mezi prokaryoty nejrozšířenější.
  - **Mikroaerofilní** – mikroorganismy rostoucí na strmém gradientu koncentrace kyslíku – tyto bakterie často kyslík využívají pro respiraci, ale ve vysoké koncentraci jim naopak škodí.
  - **Aerotolerantně anaerobní** – mikroorganismy, které nevyužívají kyslík k žádnému procesu, ale není pro ně toxický
  - **Obligátně anaerobní** – mikroorganismy, pro které je kyslík toxický.

Podle využívání různých zdrojů uhlíku byly mikroorganismy rozděleny na:

- **Autotrofní** – zdrojem uhlíku je oxid uhličitý.
- **Heterotrofní** – zdrojem uhlíku jsou organické látky (včetně metanu).
- **Mixotrofní** – zdrojem uhlíku je jak oxid uhličitý, tak organické látky.

Seznam donorů a akceptorů elektronů je uveden v kapitole výsledky. Pro každý vrt/pramen byl zkonstruován „metabolický profil“ umožňující zhruba si představit biologické procesy, které v daném prostředí mohou probíhat.

### 2.8.3 Ordinační gradientová analýza v programu Canoco

V každé podmnožině zkoumaných OTU (např. vrty na lokalitě Pekařka) byl počet sekvencí zmenšen v každém vzorku na počet sekvencí odpovídající nejmenšímu vzorku. Tento krok byl proveden v programu Seed, kde je možné náhodně vybrat určitý počet sekvencí ze vzorku. Z těchto dat byla sestrojena tabulka četností udávající počty jednotlivých OTU ve vzorcích. Tato tabulka byla použita jako vstup pro ordinační analýzu v mnohorozměrném prostoru v programu Canoco (Lepš and Šmilauer, 2000). Při ordinační analýze

byly použity dva různé přístupy.

Prvním z nich je použití nepřímé neboli neomezené ordinační gradientové metody (PCA – principle component analysis). Pomocí této analýzy jsou vzorky rozmístěny do mnohorozměrného prostoru, kde jejich vzdálenosti a poloha na souřadnicích odpovídají jejich variabilitě tvořené zastoupením jednotlivých OTU.

Druhý přístup představuje přímá neboli omezená gradientová metoda (CCA – canonical correspondence analysis). Zde se zobrazení vzorků vytváří podobně s tím rozdílem, že hlavní ordinační osy představují reálnou charakteristiku prostředí, která je dalším parametrem v analýze a je nezávislá na četnostech OTU.

#### 2.8.4 Analýza fylogenetické disimilarity

Pro analýzu fylogenetické disimilarity byly použita stejná data jako v ordinační analýze, aby bylo možno porovnat výsledky obou dvou analýz.

Analýza byla provedena v prostředí programu Mothur (Schloss *et al.*, 2009) váženou formou příkazu unifrac (Lozupone and Knight, 2005), který spočítá fylogenetické vzdálenosti mezi každými dvěma vzorky. Při výpočtu byl použit jackknife na 80 % sekvencí při 1000 opakování. Při tomto nastavení příkaz unifrac vypočítá 1000 stromů pokaždé z náhodně vybraných 80 % sekvencí z každého vzorku. Na základě těchto 1000 stromů program vygeneruje jeden výsledný strom s nejčastějším rozložením větví. Ve výsledném stromu jsou zobrazena čísla na uzlech větví odpovídající podílu výskytu každého větvení v těchto 1000 stromech. Čísla na uzlech jsou statistickou podporou větvení stromu v daném uzlu. Pomocí nich je možné zjistit, jestli byl fylogenetický signál přítomen ve větší části datasetu, anebo zdali se výsledné větvení opírá pouze o menší část OTU.

Jako vstupní data pro unifrac slouží tabulka četností OTU ve zkoumaných vzorcích a fylogenetický strom vypočítaný z reprezentativních sekvencí pro OTU. Před tím, než byl vytvořen fylogenetický strom, byly OTU z každého souboru alignované a byly vyřezány homologní pozice s >50% mezerami v programu BioEdit (Hall, 1999). Fylogenetický strom byl vypočítán v programu RAxML (Stamatakis, 2014) v modelu GTRCAT, k čemuž byla použita výpočetní kapacita virtuální organizace MetaCentrum (<https://metavo.metacentrum.cz/>). V případě, že některé OTU ležely na velmi dlouhých větvích, byly srovnány s databází GenBank. Pokud se jednalo chybně přečtené sekvence, které nebyly vyřazeny při dechimerizaci v programu Seed, byly ze souboru vyřazeny až v tomto kroku a celý strom byl spočítán znovu bez těchto OTU.

Celkem byly analyzovány tři soubory vzorků. Jeden soubor obsahoval pouze vybrané vzorky z Černuci, druhý soubor jen vzorky z Pekařky a třetí soubor obsahoval vybrané vzorky ze všech tří lokalit (Pekařka, Černuc, Vlastislav). Tyto soubory s použitými vzorky jsou detailněji popsány v kapitole 3. Pro každý z těchto souborů vzorků byl vytvořen fylogenetický strom z OTU, které konkrétní soubor obsahoval. Počty sekvencí byly zmenšeny v každém souboru vzorků podle nejmenšího analyzovaného vzorku. Velké rozdíly v obsahu sekvencí (automaticky tedy i OTU) zkreslují topografii výsledného stromu. Vzorky s hodně sekvencemi mají při jackknife větve pokaždé jinde, zatímco větvení malých vzorků je pořád na stejném místě (jackknife s větší pravděpodobností vybere ty samé sekvence, neboť není z čeho vybírat oproti vzorkům s hodně sekvencemi). Výsledný strom by pak zobrazil vzorky s málo sekvencemi jako sobě

příbuznější.

Vážený unifrac generuje jednak tabulku srovnání fylogenetických vzdáleností (matici distancí) a také strom zobrazující fylogenetickou vzdálenost vzorků. Matice distancí byla dále použita pro PCoA (principle coordinates analysis), kterou Mothur umožňuje. Tento výpočet generuje hodnoty souřadnic v mnohorozměrném prostoru, na kterých leží jednotlivé vzorky. Zobrazením hodnot hlavních dvou souřadnic (např. v Microsoft Excel) lze získat podobný obraz jako při ordinační metodě PCA s tím, že zde pozice vzorků odpovídá celkové fylogenetické vzdálenosti jednotlivých mikrobiálních komunit. Nelze tedy odlišit příspěvek jednotlivých OTU, ani není možné promítnout do grafu jejich pozici. Pomocí příkazu AMOVA (analysis of molecular variance) lze dále testovat, zdali je podobnost mezi vzorky uvnitř předem zvolené skupiny větší než mezi vzorky z různých skupin. Tyto skupiny vzorků mohou být vybrány podle určitého parametru (např. byly-li odebrány z kalníku nebo ne). Výstupem výpočtu je hodnota  $p$ , která vyjadřuje, s jakou pravděpodobností bychom obdrželi stejně silné klastrování, pokud by byly do jednotlivých klastřů zařazovány náhodně vybrané vzorky. Metoda tedy, zjednodušeně řečeno, testuje, zda vzorky, které sdílejí určitou environmentální charakteristiku, si skutečně jsou v rámci dané analýzy fylogeneticky podobnější. Daná environmentální charakteristika v tom případě patrně má predikovatelný vliv na strukturu mikrobiálního společenstva. V našem případě byla při provedení 10 000 Monte Carlo generací (randomizací) pro potvrzení hypotézy za významnou považována hodnota  $p < 0,001$ . Platí to, že čím větší číslo, tím slabší statistická podpora pro zkoumaný jev. Hranice signifikance jevu je samozřejmě arbitrární.

### **3 Výsledky**

#### **3.1 Odběry podzemních vod a měření geochemických parametrů**

Celkem byly odebráno 36 vzorků z prostředí podzemních vod ze 3 různých lokalit na území Českého masívu (viz obr. 3). 19 vzorků pochází z tektonicky rozrušených svrchnokřídových sedimentů s dvěma vodními obzory v Černuci a jejím okolí, 13 vzorků z malého území na Pekařce s kolektorem ve štěrkopískových kvartéřních naplaveninách a 4 vzorky z jímacího území Vlastislav s jedním tektonicky neporušeným kolektorem ve svrchnokřídových sedimentech.

##### **3.1.1 Černuc**

Vzorky byly odebrány dne 20.2.2014 z vrtů označených na přiložené mapě jako MC-1, MC-2, MC-3, MC-6, CJ-1, JZD (obr. 4) a ze vzdálenějšího vrtu JL-2C v písčinně u Ledčic ležícího zhruba 5 km severovýchodně od DP Černuc. Další vzorky byly odebrány za několik dnů poté Petrem Nakládalem při vrtání a vystrojování nového vrtu, jehož poloha je v těsné blízkosti vrtu CJ-1 (není vyznačena v mapě v obr. 4). Z tohoto vrtu byl odebrán vrtný prach z hloubek 31, 35, 42, 47 a 50 m pod povrchem. Během vystrojování vrtu byla odebrána také voda z hloubek 35 m a 51 m pod povrchem (cca dva dny po navrtání). Při odběru vzorků z vrtu JZD a JL-2C nebylo použito čerpadlo, protože voda vytékala v obou dvou případech z potrubí. Z toho důvodu také nebylo možné odebrat kal ze dna vrtu. U ostatních vrtů proběhly odběry standardně jak je popsáno v kapitole materiál a metody. Výsledky měření se jmény vrtů a jmény vzorků pro mikrobiologické analýzy jsou uvedeny v tab. 5.

**Tab. 5 Přehled vrtů, jmen vzorků a dalších údajů o odběru na Černuci.**

HPV = hladina podzemní vody v metrech od povrchu, Eh = redoxní potenciál (nepřepočtený),  $\alpha$  = konduktivita, pH = kyselost; Při vrtání CJ-1N byly odebrány vzorky vrtného prachu. Voda z vrtů JL-2C a JZD je čerpána do potrubí. Z toho důvodu zde chybí údaje o hloubce odběru.

Vrt	vzorek	charakter	HPV [m]	hloubka odběru [m]	Eh [mV]	$\alpha$ [mS/cm]	pH
MC-3	MC3	voda	12,58	18	198	2,29	6,7
	MC3k	kal		21		2,34	
MC-1	MC1	voda	30,52	35	-86	1,491	5,3
	MC1k	kal		54		-71	
MC-2	MC2	voda	18,73	25	143	1,642	6,9
	MC2k	kal		30		150	
MC-6	MC6	voda	28,89	30	143	1,225	6,4
	MC6k	kal		42		152	
JL-2C	JL2C	voda z potrubí			-51	0,871	6,7
JZD	KS	voda z potrubí			175	2,04	7
CJ-1	CJ1St	voda	33,26	35	203	1,432	6,8
	CJ1Stk	kal		43		76	
CJ-1N (vrtání)	CJ1N31	suchý prach	42	31			
	CJ1N35	vlhký prach		35			
	CJ1N42	prach z HPV		42			
	CJ1N47	prach (přítok vody)		47			
	CJ1N50	prach (báze kolektoru)		50			
CJ-1N (vystrojování)	CJ1Nv35	voda	30,22	35	141	1,476	7,3
	CJ1Nv51	kal		51		-70	1,04

### 3.1.2 Pekařka

Vzorky pro mikrobiologické analýzy byly odebrány 10.4. 2014. Voda a kal byly odebírány z 5 pozorovacích sond a 2 jímacích vrtů. Hladina podzemní vody dosahovala ve jímacím vrtu PEN ležícím v těsné blízkosti sond hloubky 7,8 m. Hladina vody sond byla ve stejné úrovni jako v tomto vrtu. V druhém jímacím vrtu PES byla hladina naměřena v 8 m pod povrchem. Z vrtu PEN nebylo možné odebrat vzorek z kalníku, protože u dna vrtu je umístěno jímací čerpadlo vodáren. Vzorkování probíhalo vždy zhruba 2 metry pod hladinou (10 m od povrchu) – tyto vzorky byly kromě jména vrtu označeny jako „10“ (např. PK1 10). Vzorky odebrané z kalníku jsou označené jako „dno“ (např. PK1 dno). Po odebrání vzorků vod a kalů pro mikrobiální rozbor

byly změřeny geochemické parametry. Výsledky tohoto měření zde nejsou uvedeny, neboť došlo k chybě při nastavení měřicího přístroje. K dispozici jsou pouze geochemické parametry vod z roku 2013 uvedené v úvodu. S jistotou lze však říci, že voda na Pekařce je prokysličená až k bázi kolektoru, oligotrofní a má neutrální pH. Toto pozorování potvrzuje navíc fakt, že je čerpána jako zdroj pitné vody. Voda je bez zbarvení a bez zápachu, kromě odstaveného jímacího vrtu PES, kde je zápach lehce železitý.

### 3.1.3 Vlastislav

Odběr vzorků proběhl dne 7.8. 2014 (vrty MO1 a MO5) a 19.8. 2014 (vrt MO3 a pramen MOst). Hadice byla vždy před vlastním odběrem propláchnuta vodou z vrtu. Vzorek byl odebrán ze spodní části vrtu, kam bylo spuštěno čerpadlo a jím zvrženy případné kaly či nárůsty. Následně byl ve chvíli maximálního zákalu odebrána směs vody i pevných fází. V průběhu odběru byla sledována konduktivita, pH a množství rozpuštěného kyslíku ve vodě. Z jímací štol „Pod Kaplí“ (MOst) byl odebrán vzorek vody a ponořeného sedimentu ze dna ve vstupní části objektu a změřena pouze saturace kyslíkem (viz tab. 6). Hladiny podzemní vody nebyly zaznamenány, v úvodu jsou uvedeny hodnoty úrovní hladiny z doby konstrukce vrtů.

**Tab. 6 Výsledky měření při odebírání vzorků ve Vlastislavi**

vzorek	pH	konduktivita ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	saturace $\text{O}_2$ (%)	charakter
MO1	7,3	480	1,4	pomíjivý černý zákal
MO3	6,5	1048	2	rezavá drť
MO5	6,5	814	1,7	pomíjivý černý zákal
MOst	-	-	60-64	kořeny, minerální sediment

## 3.2 Odstranění nežádoucích sekvencí

Po odstranění chimérických sekvencí bylo zpracovááno 472 202 sekvencí patřících celkem pod 8483 OTU. Z těchto OTU byly dále vyřazeny kontaminace. Po tomto kroku zbylo 223 864 sekvencí náležejících k 8290 OTU (včetně singletonů). Proporce vyřazených a zbylých sekvencí jsou zobrazeny v grafech (obr. 10) pro každý vzorek zvlášť.

Ve většině vzorků tvoří kontaminace více než 50 % sekvencí, velice často dokonce více než 80 % sekvencí. Výjimkou jsou vzorky KS, MC3, MC6, MC6k, PK5 dno, PEN 10, PES 10, PES dno a všechny vzorky z Vlastislavi (MO3, MO5, MO1, MOst) ve kterých převažují „dekontaminované“ sekvence.

Semiautonomní organely jsou bezvýznamnou částí nežádoucích sekvencí a hlavní problém představují v první řadě mikroorganismy, jejichž původ je pravděpodobně v laboratoři, kde probíhalo zpracování vzorků. Jedinou významnější kontaminací typu semiautonomních organel jsou plastidy vyšších rostlin a protist. Prvních 6 nejhojnějších OTU z celého setu patří ke kontaminacím z laboratoře (viz Tab. 7). Důležité je si

uvědomit, že těchto 6 OTU představuje celkem 89 % vyřazených sekvencí. O něco méně významným typem kontaminací jsou bakterie přenesené do vzorků z člověka (viz Tab. 8)

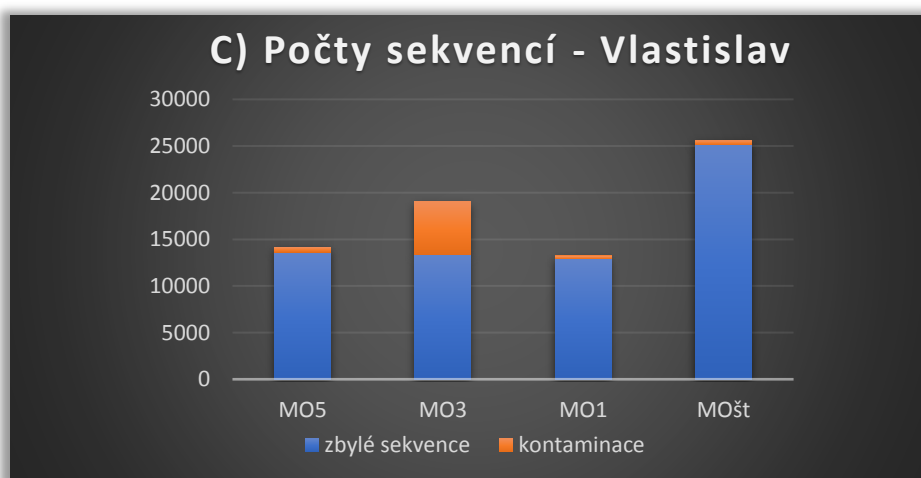
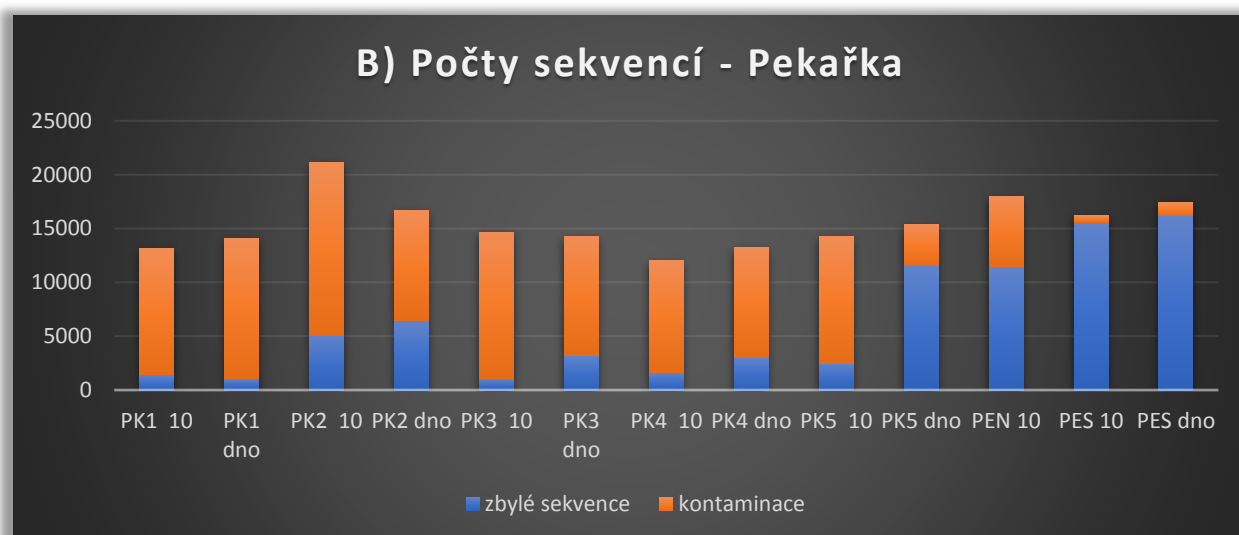
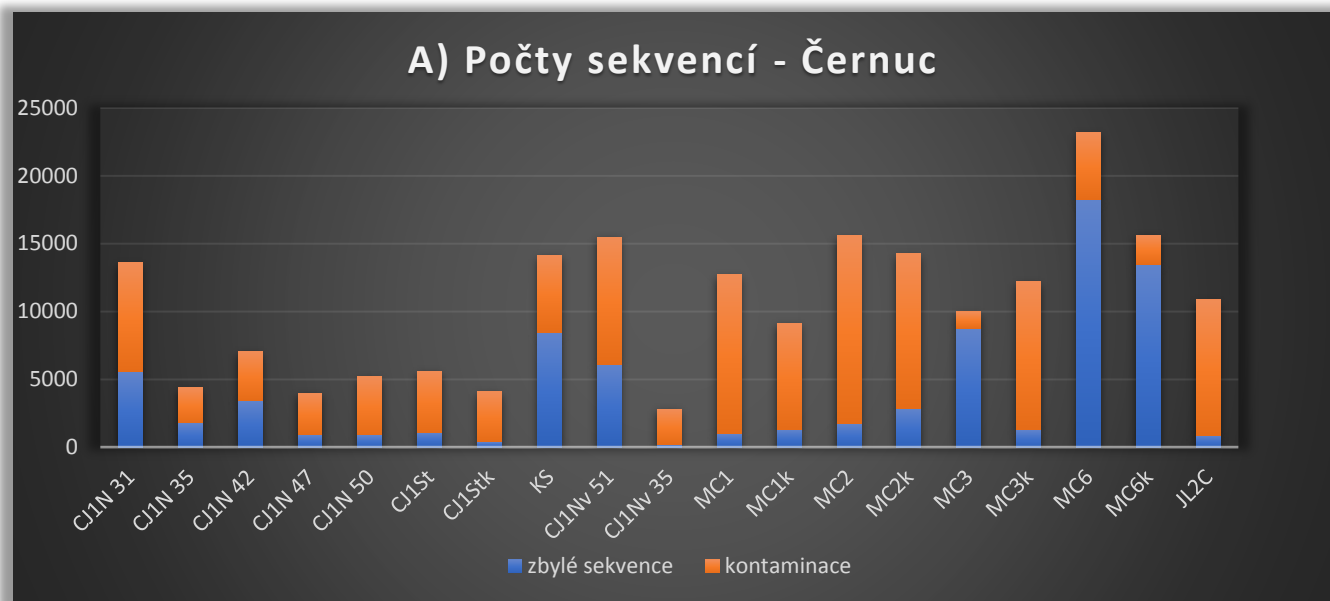
Dalším zásadním faktem je to, že mezi vzorky existují velké rozdíly v počtu sekvencí, ať už bez nebo s kontaminacemi. Některé dekontaminované vzorky se liší v počtu sekvencí až o dva řády (např. vzorek CJ1Nv 35 a vzorek MC6), což působí poměrně zásadní problémy při srovnávání vzorků pomocí ordinačních metod. Pro ordinační a fylogenetickou analýzu byly vzorky zmenšeny na stejný počet sekvencí podle nejmenšího vzorku ve zkoumané skupině vzorků s tím, že vzorky s velmi malým počtem sekvencí nebyly do analýz zařazeny vůbec. Počty sekvencí a OTU před a po zmenšení zkoumaných souborů vzorků jsou uvedeny v tab. 9. Skupina vzorků odebraných z Vlastislavi byla zkoumána pouze jako součást všech vzorků dohromady, neboť obsahuje pouze 4 vzorky, a je proto nevhodná pro samostatnou ordinační analýzu nebo analýzu fylogenetické disimilarity.

**Tab. 7 Nejhojnější OTU ve vzorcích jsou kontaminace.** Jedná se o hity z databáze GenBank, které mají 100 % podobnost sekvencí. V tabulce jsou uvedeny počty sekvencí.

jméno	počet
<i>Janthinobacterium svalbardensis</i>	68094
<i>Escherichia coli</i>	52332
<i>Variovorax boronicumulans</i>	33744
<i>Phyllobacterium</i> sp.	23699
<i>Ralstonia</i> sp.	23029
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	20730
<b>dohromady</b>	<b>221628</b>

**Tab. 8 Nejčastější kontaminace přenesené do vzorků z člověka.** Jedná se o hity z databáze GenBank, které mají 100 % podobnost sekvencí. V tabulce jsou uvedeny počty sekvencí.

jméno	počet
<i>Enterobacter ludwigii</i>	6568
<i>Lactobacillus</i> sp. kmen LS28	1698
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1451
<i>Streptococcus australis</i>	987
<i>Lactobacillus jensenii</i>	966
<i>Lactobacillus iners</i>	853
<b>dohromady</b>	<b>12523</b>



**Obr. 10 (A-C) Počty sekvencí a zastoupení kontaminací na jednotlivých lokalitách.** Oranžová barva označuje kontaminace představující OTU vyřazené na základě kritérií uvedených v kapitole materiál a metody kromě singletonů, jež jsou součástí modře vyznačených zbylých sekvencí.

**Tab. 9 Počty sekvencí a OTU použitých pro analýzy (ordinační a fylogenetické disimilarity) v různých skupinách zkoumaných vzorků.** A – vzorky z Černuci, křížkem proškrtnuté vzorky nebyly zařazeny do ordinačních ani fylogenetických analýz z důvodu malého počtu sekvencí. Počet sekvencí zařazených do analýz (992) byl zvolen podle nejmenšího použitého vzorku MC1, který má 995 sekvencí. 3 singletony byly dodatečně vyřazeny při tvorbě fylogenetického stromu pro UniFrac, protože se jednalo o chybně přečtené sekvence s příliš dlouhými větvemi. B – vzorky z Pekařky, soubor vzorků byl zmenšen na 1059 sekvencí podle vzorku PK3 10. a vyřazeno bylo 10 singletonů ze stejných důvodů jako na Černuci. C – soubor všech vzorků z Vlastislavi, Černuci a Pekařky. Vzorky z Pekařky a Černuci, které soubor neobsahuje byly vyřazeny z důvodu malého počtu sekvencí. Soubor obsahuje všechny vzorky z Vlastislavi. Soubor byl zmenšen na 2505 sekvencí v každém vzorku podle nejmenšího vzorku PK5 10. Při výpočtu fylogenetického stromu byl odstraněn 1 singleton.

A - ČERNUC	CJ1N 31	CJ1N 35	CJ1N 42	CJ1N 47	CJ1N 50	CJ1St	CJ1Stk	KS	CJ1Nv 51	CJ1Nv 35	MC1	MC1k	MC2	MC2k	MC3	MC3k	MC6	MC6k	JL2C	
počet sekvencí	5543	1782	3447	931	898	1111	409	8474	6119	225	995	1317	1725	2847	8760	1297	18248	13475	865	
počet OTU	226	172	227	153	113	195	135	225	248	32	110	81	91	125	505	133	507	471	115	
sekvencí v analýze	992	992	992	x	x	992	x	992	992	x	992	992	992	992	992	992	992	992	992	x
OTU v analýze	88	121	137	x	x	169	x	160	140	x	107	57	59	78	259	106	219	197	x	
unikátních OTU v analýze	32	39	57	x	x	63	x	121	65	x	26	8	16	32	192	37	111	88	x	
% unikátních OTU	36,36	32,23	41,61	x	x	37,28	x	75,63	46,43	x	24,30	14,04	27,12	41,03	74,13	34,91	50,68	44,67	x	
počet sekvencí unik. OTU	105	57	235	x	x	234	x	743	181	x	185	53	42	231	403	102	238	170	x	
% sekvencí unik. OTU	10,58	5,75	23,69	x	x	23,59	x	74,90	18,25	x	18,65	5,34	4,23	23,29	40,63	10,28	23,99	17,14	x	

B - PEKAŘKA	PK1 10 dno	PK2 10 dno	PK2 dno	PK3 10 dno	PK3 dno	PK4 10 dno	PK4 dno	PK5 10 dno	PK5 dno	PEN 10 dno	PES 10 dno	PES dno	
počet sekvencí	1422	1119	5087	6415	1069	3203	1658	3041	2506	11524	11514	15587	16217
počet OTU	100	89	135	187	159	106	122	177	147	157	358	1349	683
sekvencí v analýze	1059	1059	1059	1059	1059	1059	1059	1059	1059	1059	1059	1059	1059
OTU v analýze	76	80	62	52	149	44	89	100	77	49	174	263	240
unikátních OTU v analýze	16	22	22	13	51	10	25	27	14	10	76	137	112
% unikátních OTU	21,05	27,50	35,48	25,00	34,23	22,73	28,09	27,00	18,18	20,41	43,68	52,09	46,67
počet sekvencí unik. OTU	33	23	292	32	453	11	91	170	76	28	296	168	189
% sekvencí unik. OTU	3,12	2,17	27,57	3,02	42,78	1,04	8,59	16,05	7,18	2,64	27,95	15,86	17,85

C - VŠECHNY VZORKY	CJ1N 31	CJ1N 42	KS	CJ1Nv 51	MC2k	MC3	MC6	MC6k	PK2 10 dno	PK2 dno	PK3 dno	PK4 dno	PK5 10 dno	PK5 dno	PEN 10 dno	PES 10 dno	PES dno	MOS	MO3	MO1	Mošt
počet sekvencí	5543	3447	8474	6119	2847	8760	18248	13475	5087	6415	3203	3041	2506	11524	11514	15587	16217	13636	13351	12916	25131
počet OTU	226	227	225	248	125	505	507	471	135	187	106	177	147	157	358	1349	683	1465	616	1575	3937
sekvencí v analýze	2505	2505	2505	2505	2505	2505	2505	2505	2505	2505	2505	2505	2505	2505	2505	2505	2505	2505	2505	2505	2505
OTU v analýze	127	185	183	183	113	379	303	285	83	91	80	143	146	71	211	476	386	465	305	562	893
unikátních OTU v analýze	40	44	113	62	19	228	113	99	12	4	2	13	4	10	47	180	113	191	125	243	585
% unikátních OTU	31,50	23,78	61,75	33,88	16,81	60,16	37,29	34,74	14,46	4,40	2,50	9,09	2,74	14,08	22,27	37,82	29,27	41,08	40,98	43,24	65,51
počet sekvencí unik. OTU	148	115	1463	300	448	865	381	336	215	10	5	222	33	37	306	260	213	368	281	516	1024
% sekvencí unik. OTU	5,91	4,59	58,40	11,98	17,88	34,53	15,21	13,41	8,58	0,40	0,20	8,86	1,32	1,48	12,22	10,38	8,50	14,69	11,22	20,60	40,88



### 3.3 Analýza nejhojnějších mikroorganismů

Do analýzy bylo vybrány OTU, které tvoří alespoň 2 % v alespoň jednom vzorku, minimálně však vždy alespoň 10 OTU nejhojnějších OTU z každého vzorku. Dohromady bylo pro analýzu metabolismu vybráno 193 OTU představujícími celkem 135 052 sekvencí. Jejich kompletní seznam s taxonomickým zařazením, typem metabolismu a zdrojem literatury je v příloze A (pokud se v textu hovoří o metabolických vlastnostech určitého taxonu, je zdroj literatury k této informaci uveden v příloze A, a nikoli přímo v textu). Výsledky této analýzy byly zpracovávány pro každý vrt/pramen zvlášť. Charakteristika mikrobiální komunity byla propojena se znalostmi a měřeními popisujícími geochemické a hydrogeologické parametry akviferu v rámci jednotlivých lokalit. Z těchto výchozích údajů byl pak vytvořen nástin nejpravděpodobnějších procesů odehrávajících se v akviferu. K závěrům této analýzy je nutné přistupovat s opatrností, neboť kontaminace tvoří podstatnou část sekvencí ve většině vzorků. Navíc je běžným jevem, že vzorky, kde je kontaminací málo mají velký počet málo abundantních OTU, takže velká část sekvencí spadá do kategorie „mimo analýzu“, což rovněž znesnadňuje interpretaci výsledků.

V grafech popisujících metabolické schopnosti komunit je zobrazeno 100 % na každý vzorek (např. obr. 12 a obr. 13). Jeden polyfázický druh u prokaryot má zpravidla potenciál využívat různé typy akceptorů a donorů elektronů (viz přílohu A). V grafech je tedy zobrazeno procento sekvencí jejichž OTU, jež jsou teoreticky schopné využívat daný donor/akceptor energie. Z těchto údajů lze vyčíst potenciální schopnosti, které jsou dále uvažovány v kontextu reálného prostředí. V případě autotrofie/heterotrofie nebo nároků na kyslík byl každý OTU zařazen pouze do jedné kategorie. Kategorie „mimo analýzu“ nezahrnuje kontaminace, ale pouze OTU z dekontaminovaného setu, které nesplňují kritéria analýzy nejhojnějších OTU (viz materiál a metody). Do kategorie „neznámý“ spadají takové polyfázické druhy nebo rody, které sice kritéria splňují, ale není k nim dostatečné množství informací v literatuře a databázích nebo je podobnost nejbližších hitů příliš nízká (méně než 95%).

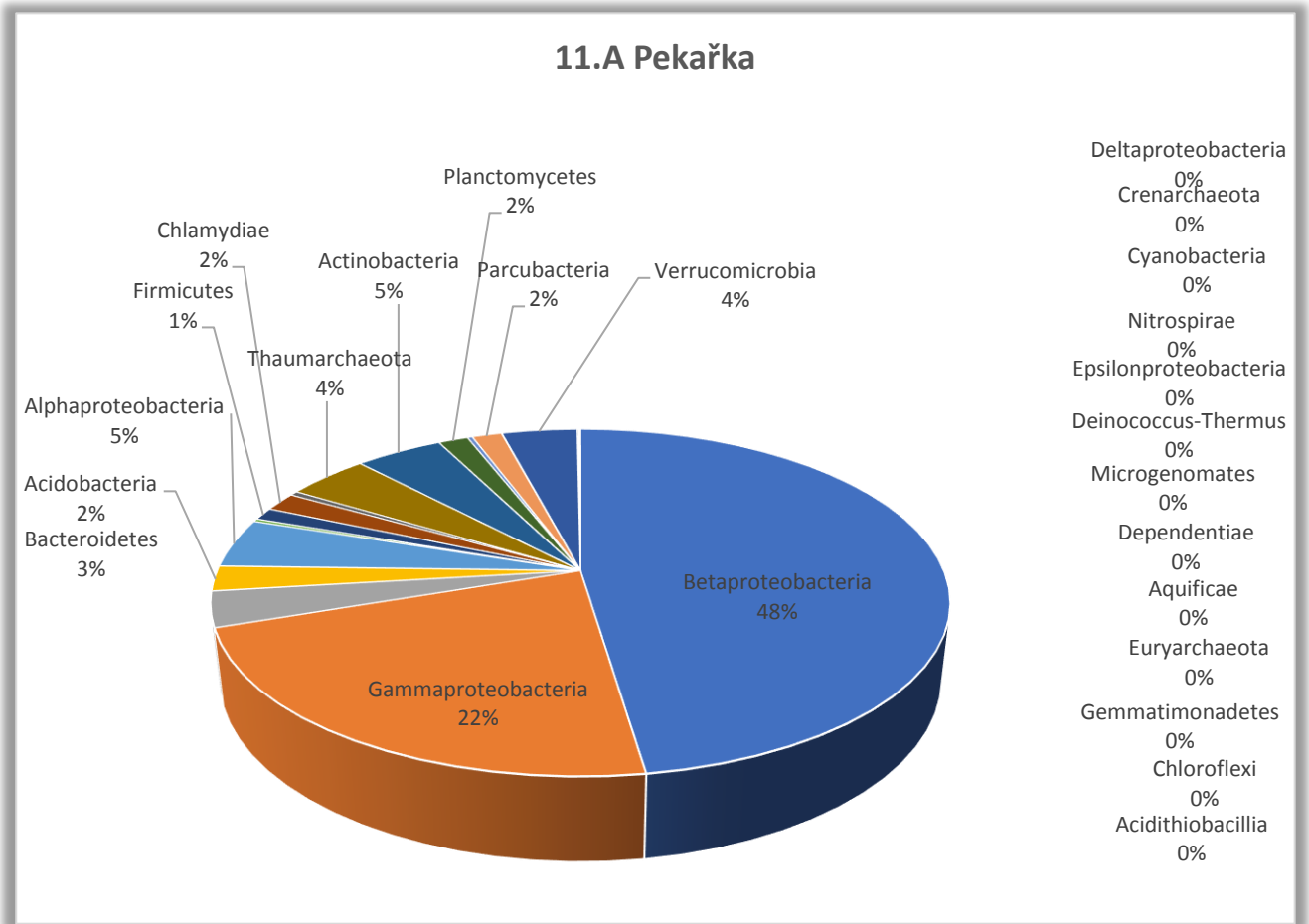
V příloze B jsou pak uvedeny ty samé grafy s tím rozdílem, že jsou vyřazeny kategorie „mimo analýzu“ a „neznámý“ a zbytek je přepočítán na 100 %. Tyto grafy umožňují přehlednější zobrazení metabolických schopností komunit zejména u těch vzorků, kde většina sekvencí spadala právě do kategorie „neznámý“ a „mimo analýzu“.

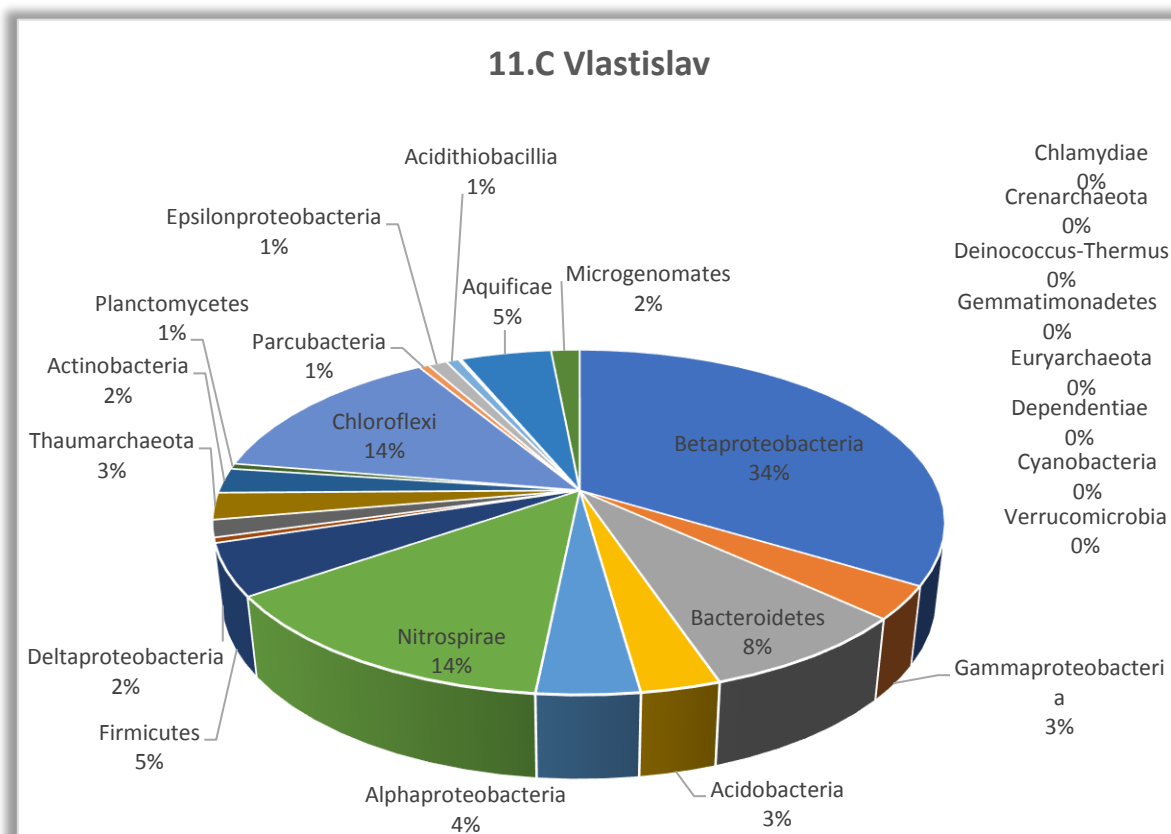
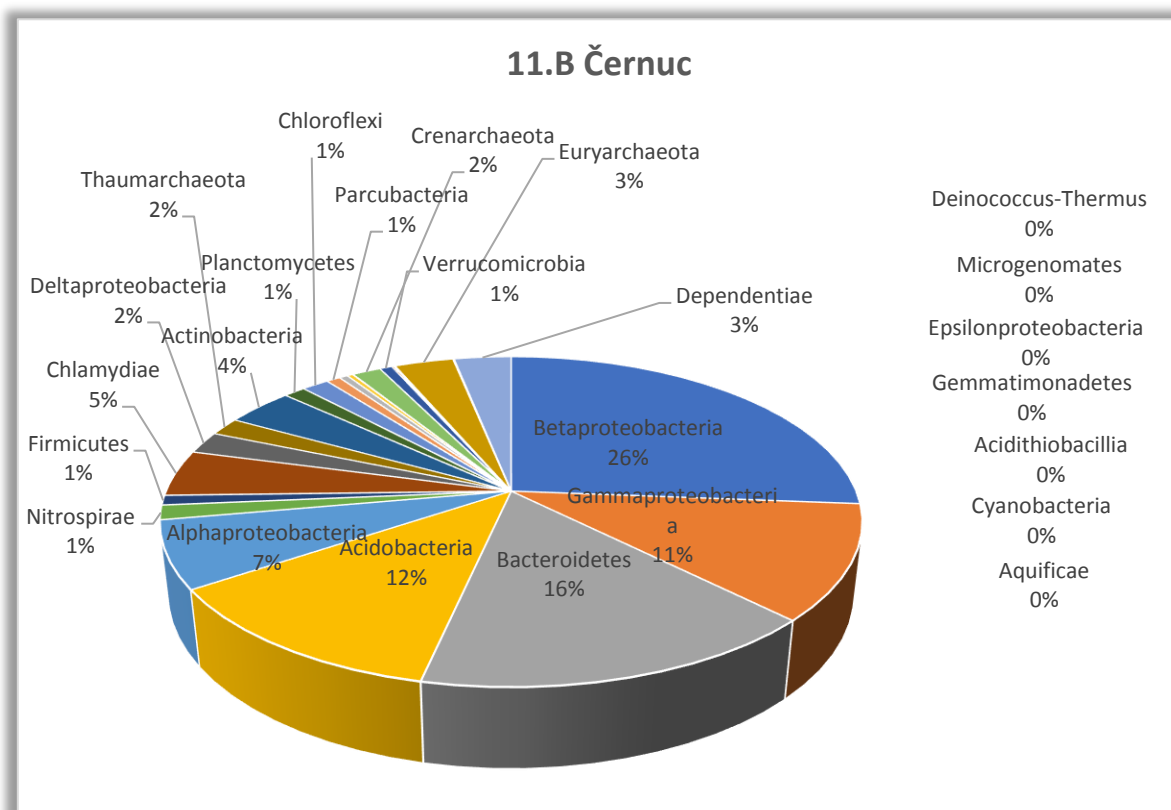
Cílem analýzy nejhojnějších OTU není dopodrobna taxonomicky popsat jednotlivé OTU, jejich zastoupení ve vzorcích a jejich metabolickou kapacitu, ale vybrat takové informace, které budou zajímavé z hlediska mikrobiální ekologie, především pak takové, které se budou týkat vztahu prostředí a mikroorganismů.

#### 3.3.1 Zastoupení prokaryotních kmenů na lokalitách

Zastoupení prokaryotních kmenů bylo vypočítáno na základě dat z přílohy A. Při výpočtu byly sloučeny všechny vzorky z jedné lokality dohromady. Na obr. 11 je vidět zastoupení jednotlivých kmenů na každé lokalitě zvlášť. Na všech lokalitách jsou nejhojnější skupinou *Betaproteobacteria*. Zatímco na Pekařce tvoří tento kmen téměř polovinu všech sekvencí, na Černuci je to 26 % a ve Vlastislavi 34 %. Na Pekařce je 13 kmenů se zastoupením 0 % a 70 % sekvencí spadá pod 2 kmeny. Platí, že všechny kmeny, které jsou na Pekařce, jsou i na Černuci. Na Černuci je pouze 7 kmenů se zastoupením 0 % a rozdělení sekvencí mezi

kmeny je rovnoměrnější. Podobně tomu je ve Vlastislavi, kde není zastoupených 8 kmenů. Ve Vlastislavi však existují kmeny, které na Černuci nenajdeme: *Microgenomates*, *Epsilonproteobacteria*, *Acidithiobacillia*, *Aquificae*. Podle převráceného Simpsonova indexu diverzity (viz popis obr. 11) je největší diverzita na úrovni kmenů na Černuci a nejmenší na Pekařce.





**Obr. 11 A-C. Zastoupení prokaryotních kmenů na lokalitách. Pekařka A, Černuc B a Vlastislav C. Grafy vycházejí z dat v příloze A. Zastoupení kmenů je vyjádřeno v procentech. Jména kmenů, jejichž zastoupení je 0 % jsou uvedena vpravo (0 % je výsledek po zaokrouhlení na celá procenta. Neznamená to tedy nutně, že ve vzorku nebyly tyto kmeny zastoupeny vůbec.). Převrácený Simpsonův index diverzity vypočítaný na [https://www.ayoung.com/labs/biodiversity\\_calculator.html](https://www.ayoung.com/labs/biodiversity_calculator.html) je pro Pekařku 3,49, pro Černuc 7,49 a pro Vlastislav 5,97.**

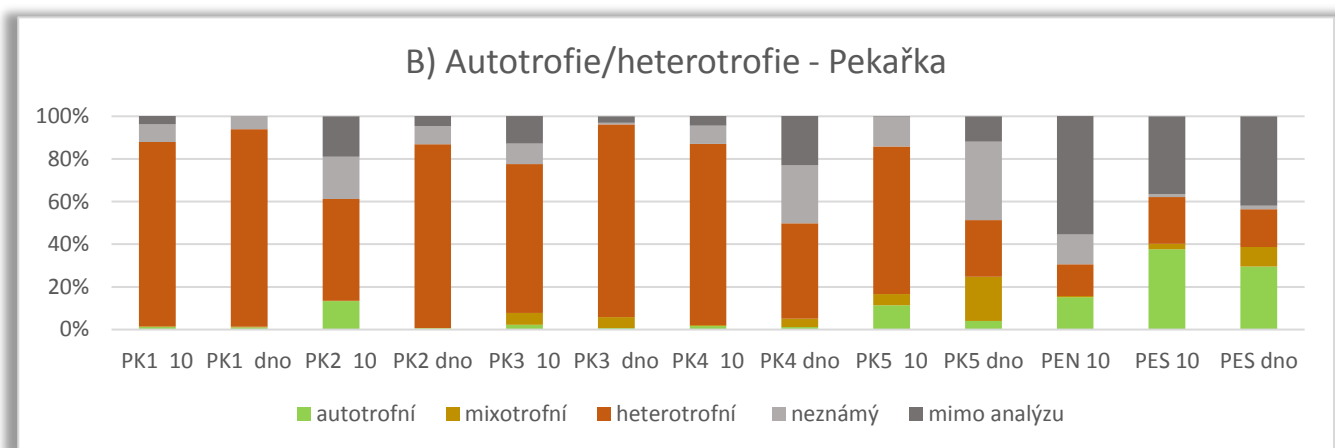
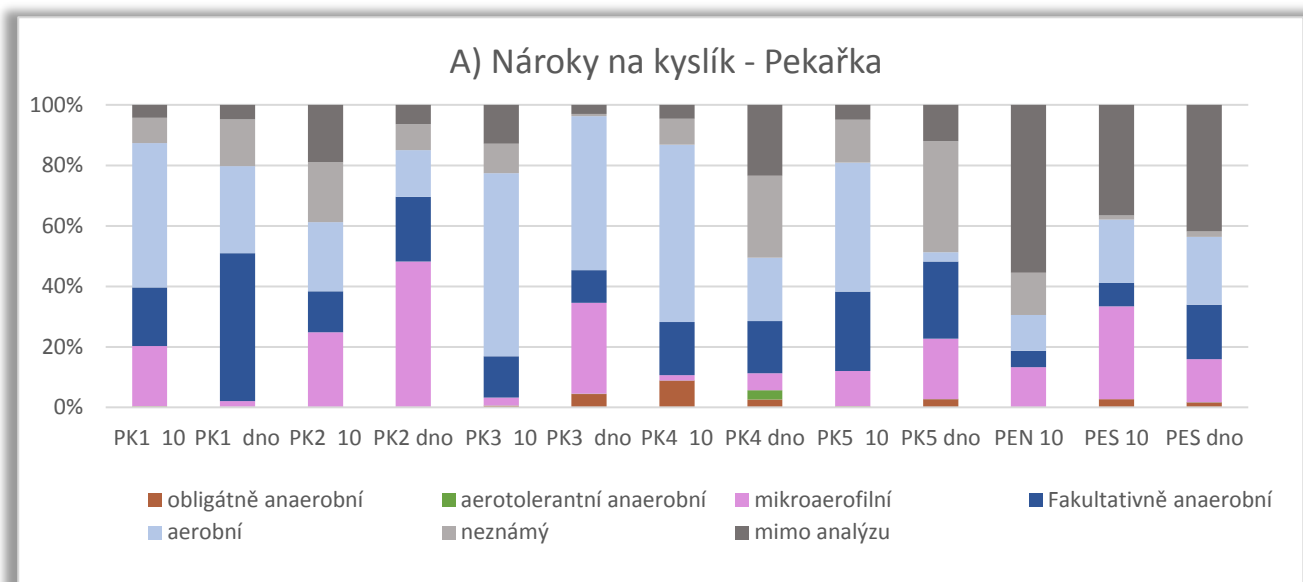
### 3.3.2 Pekařka

V metabolických schopnostech mikroorganismů odebraných z mělkého, geologicky jednotvárného kvartérního akviferu je možné dobře odlišit jeden zásadní faktor, který odlišuje jímací vrty PES a PEN od ostatních: Oba jímací vrty mají ocelovou zárubnici. Vody na Pekařce jsou oxické a oligotrofní, takže limitujícím faktorem pro mikrobiální růst jsou zdroje energie a nikoli terminální akceptory elektronů. Proto jakýkoli přísun redukovaných látek (např.  $\text{Fe}^{2+}$  z výstroje vrtu) je vítaným zdrojem energie v jinak energeticky chudém prostředí. Zvýšené mikrobiální aktivitě v jímacích vrtech se železnou výztuží nasvědčuje vyšší relativní poměr autotrofních mikroorganismů oproti sondám (viz obr. 12B). Zvýšené koncentraci bakterií může také nasvědčovat vyšší počet dekontaminovaných sekvencí získaných ze vzorků, který je dán kvalitou amplifikátu. Kvalita amplifikátu se odvíjí od množství DNA v templátu, tedy od množství buněk ve vzorku, které je ovlivněno počtem buněk v přirozeném prostředí (v akviferu).

Nejhojnějšími mikroorganismy jsou ve vrtech PES a PEN *Sideroxydans* sp. a *Galionella* sp. - primární producenti oxidující železo. V nečerpaném jímacím vrtu mají mikroorganismy navíc schopnost využívat poměrně široké spektrum typů redoxně aktivních látek jako zdroj energie, např. síru, amoniak, dusitany, vodík a metan (viz obr. 13A). Ve vrtu PES je také možná efektivní recyklace dusíku, na které se podílí aerobní oxidací amoniaku *Nitrosotalea devanattera* a dusitanu *Nitrospira* sp., přičemž zpětnou redukci dusičnanů zvládá větší počet různých mikroorganismů.

Lze také říci, že komunita je zde více přizpůsobena lokálnímu nedostatku kyslíku – některé bakterie zde mají schopnost fermentovat (*Planctomyces* sp.) a najdeme zde i určitý podíl obligátních anaerobů (2,7 % *Propionivibrio* sp.). Ve vrtu PES je rovněž hojnou bakterií *Methylobacter* sp., která aerobně oxiduje metan, jež pravděpodobně vzniká v anoxických mikroprostředích vytvořených v důsledku zvýšené mikrobiální aktivity a nečerpanosti vrtu. Komunitu nečerpaného jímacího vrtu lze považovat za metabolicky velmi pestrou. Jedná se o prostředí, které není limitované zdroji energie do takové míry jako voda v sondách. Stabilní podmínky (nečerpanost) zde pravděpodobně umožnily nahromadění sedimentu s organickou hmotou. V tomto sedimentu pak dochází k efektivní recyklaci biogenních prvků z odumřelých buněk, protože protékající voda v akviferu je jinak oligotrofní. To se odráží ve schopnostech mikrobiální komunity, která má dobrou schopnost využít sloučeniny všech základních biogenních prvků jako zdroje energie (obr. 13A), např. oxidací metanu, vodíku, redukovaných forem síry, amoniaku a dusitanů.

Na rozdíl od jímacích vrtů jsou metabolické schopnosti mikroorganismů v sondách poměrně jednotvárné – většina mikrobů jsou aerobní heterotrofové (obr. 12), pouze v některých sondách je možné pozorovat v mikrobiálních komunitách určité metabolické odchylky od tohoto trendu.

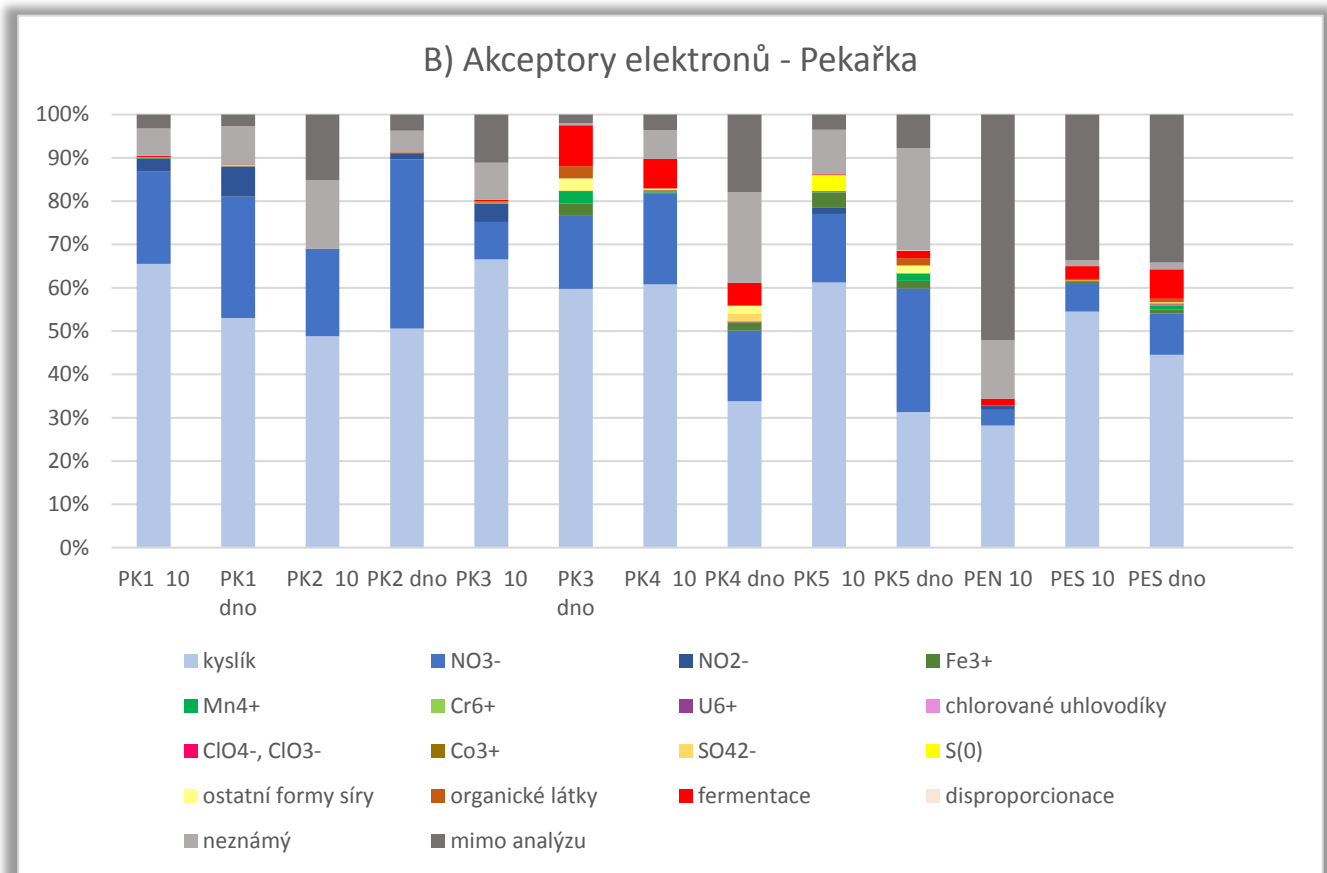
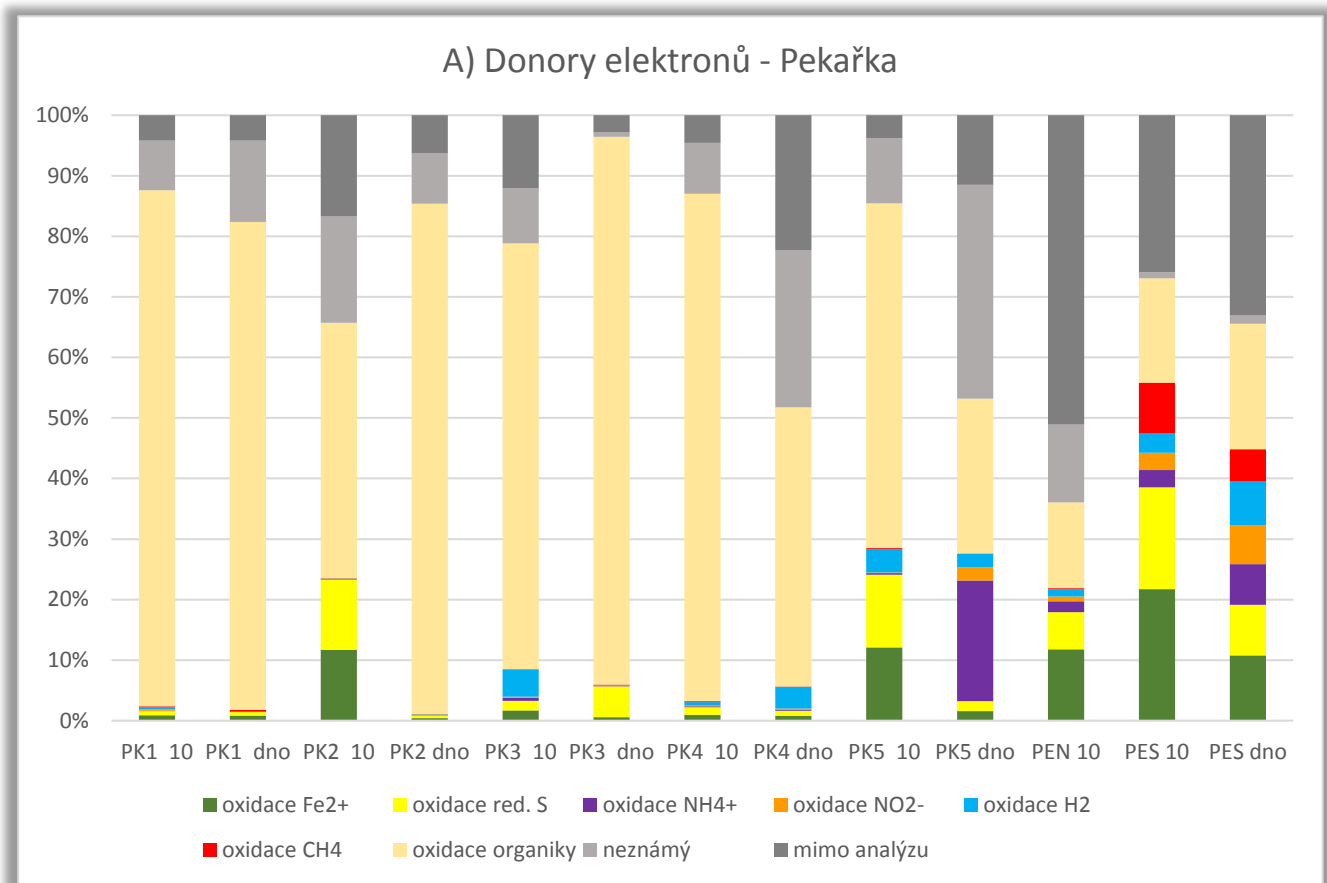


**Obr. 12 A) Nároky na kyslík a B) poměr autotrofie a heterotrofie na Pekařce.** Kategorie neznámý obsahuje takové OTU, které nebylo možné metabolicky určit. Kategorie mimo analýzu obsahuje OTU, které nebyly zařazeny do analýzy. V příloze B jsou uvedeny stejné grafy bez těchto dvou kategorií, aby bylo možno lépe srovnat metabolické poměry. Grafy vycházejí z dat v příloze A.

Zajímavý je lehce zvýšený počet obligátních anaerobů přítomný v sondách PK3 a PK5 u dna a v sondě PK4. Ve sondě PK5 a PK3 se jedná o stejný druh – *Geothrix fermentans* a v sondě PK4 u dna *Desulfosporosinus* sp. a pod hladinou *Opituts* sp. To značí, že nedošlo při čerpání k zavlečení stejného druhu anaerobní bakterie z jednoho vzorku do ostatních, a může to tedy znamenat, že v akviferu jsou v oblasti sond PK3, PK4, PK5 (leží vedle sebe viz obr. 6) přítomna lokálně anaerobní mikroprostředí více nežli v oblasti PK1 a PK2. Tuto hypotézu také podporuje fakt, že v těchto vrtech mají mikroorganismy lépe vyvinuté alternativní způsoby využívání akceptorů elektronů, jako je redukce železa, manganu, síry, síranů nebo organických látek, případně fermentace (viz obr. 13B). Oproti tomu v sondách PK1 a PK2 existují pouze mikroorganismy, které kromě kyslíku respirují nitrát (viz fakultativní anaerobové v obr. 13B), což je běžná doplňková schopnost většiny mikroorganismů respirujících kyslík (Koops *et al.*, 1991; Kalmbach *et al.*, 1999; Kojima and Fukui, 2010) a nebývá spojena s anoxickým prostředím.

Další odchylkou je zvýšený počet autotrofních mikroorganismů ve vzorcích PK2 10, PK5 10 a PK5 dno (viz

obr. 12B a 13A). V kalu vrtu PK5 se jedná o oligotrofní bakterii typickou pro zvodně, potrubí a úpravny pitné vody *Nitrosomonas oligotropha*. Ve vodě všech tří vrtů byl pak detekován *Sideroxydans* sp. se schopností oxidovat železo nebo redukované formy síry. Ve vodě vrtu PK5 byl rovněž detekován *Acidithiobacillus ferrooxidans* se schopností oxidovat kromě železa a síry také vodík. Z rozložení metabolických schopností (využívání akceptorů elektronů) je vidět, že kaly mají vždy o něco menší počet sekvencí odpovídající respiraci kyslíku než vodní vzorky (viz přílohu B).



**Obr. 13 A) Donory elektronů a B) akceptory elektronů na Pekařce.** Kategorie neznámý obsahuje takové OTU, které nebylo možné metabolicky určit. Kategorie mimo analýzu obsahuje OTU, které nebyly zařazeny do analýzy. V příloze B jsou uvedeny stejné grafy bez těchto dvou kategorií, aby bylo možno lépe srovnat metabolické poměry.

### 3.3.3 Černuc

Výsledky analýz vzorků z Černuci jsou stejně jako na Pekařce omezené vysokým počtem kontaminujících OTU ve vzorcích. Pro podrobnější metabolický popis mikrobiálních komunit byly proto vybrány vzorky s relativně nižší proporcí kontaminací tak, aby zastupovaly všechny vrty: KS, MC3, MC6k a MC6, CJ1N 42, CJ1N 31, CJ1Nv 51, CJ1St, MC1k, MC2k – poslední tři vzorky mají velice vysoký poměr kontaminací (více než 70%).

#### Vrt MC6

Ze vzorku MC6k nebylo poměrně velké množství OTU (43 % sekvencí) zařazeno do analýzy a asi 25 % nebylo možné metabolicky charakterizovat. Většina mikroorganismů v tomto vrtu je autotrofních (obr. 15B). Dominuje oxidace železa a redukovaných forem síry (obr. 16A), za kterou jsou zodpovědné bakterie *Sideroxydans* sp. a *Gallionella capsiferiformans* a *G. devanattera*, neutrofilní mikroaerofilní bakterie. Dalším méně významným zdrojem energie je amoniak, který využívá aerobní archeum *Nitrosotalea devanattera*, dále pak dusitany či vodík. Organické látky jsou oxidovány jak aerobně (*Moraxella osolensis*), tak fermentací (*Propionivibrio* sp.).

Kal se liší zejména vyšším zastoupením heterotrofie a obligátních anaerobů (obr. 15). Část bakterií (*Holophaga* sp.) je schopná oxidovat i aromatické uhlovodíky. Jinak je mikrobiální komunita z kalu po metabolické stránce velice podobná té z vodního sloupce – což je jinak na Černuci poměrně výjimečná záležitost.

Vrt MC6 má poměrně jednotvárné TAE – převážně kyslík a v případě anoxických prostředí fermentaci.

Prostředí, ze kterých pochází metabolicky nezařaditelné OTU, jsou podle nejbližších hitů ve vzorku MC6 povrchové vody a půdy a ve vzorku MC6k pak kromě říčních biofilmů a půd také hluboká podzemní prostředí s výskytem sulfidů.

#### MC3

Ve vrtu převládají aerobní heterotrofové (viz. obr. 15) reprezentovaní zejména OTU *Pseudomonas mandelii* a *Flavobacterium psychrolimnae*. Nejbližší hity zde se vyskytujícími heterotrofními OTU jsou často popisovány z prostředí s nadbytkem organické hmoty nebo těžkých kovů, z říčních prostředí a půdy. Jiné OTU jsou naopak častější v čistých podzemních vodách. Autotrofní mikroorganismy představují poměrně nevýznamnou menšinu, zastupují je amoniak oxidující rod *Nitrosopumilus* sp. a mixotrofní *Sphaerotillus montanus* se schopností oxidovat redukované formy síry.

Anaerobní mikroorganismy se ve vrtu ve významném množství nevyskytují. Můžeme zde najít maximálně mikroaerofilní rod *Aquabacterium* sp. degradující organickou hmotu. Nejbližší hity této OTU jsou běžné v reaktorech s nadbytkem nízkomolekulárních organických látek (ethanolu), amoniaku nebo těžkých kovů.

Nízký obsah autotrofních mikroorganismů je v souladu s tím, že vrt nezasahuje do bazálního cenomanského kolektoru s nízkým Eh. Naopak velká spodní část vrtu zasahuje do nepropustných kaolinických zvětralin a



jílovců permokarbonu a vytváří tak přirozený kalnák. Ve vrtu patrně tedy nevzniká redoxní gradient, který by umožňoval oxidaci i jiných zdrojů energie, nežli jsou organické látky spláchnuté z povrchu. Podle některých OTU (*Aquabacterium* sp., *Cupriavidus pauculus*, *Sphaerotilus montanus*) lze odhadovat, že voda ve vrtu reprezentuje jak vysoce eutrofní prostředí, tak prostředí oligotrofní (neznámé OTU ze skupiny *Crenarchaeota* a *Acidobacteria*). Ve vrtu ale chybí obligátní anaerobové, které by bylo možné v eutrofních prostředích očekávat. Lze to vysvětlit tím, že eutrofní mikroorganismy pocházejí z povrchu, kdy splachem z okolních polí došlo k nerovnoměrnému „navzorkování“ půdních biofilmů mimo samotný vrt. Oligotrofní mikroorganismy mohou zastupovat spíše prostředí z biofilmů na zrnech jemnozrnných cenomanských pískovců, skrze které přitéká voda do vrtu.

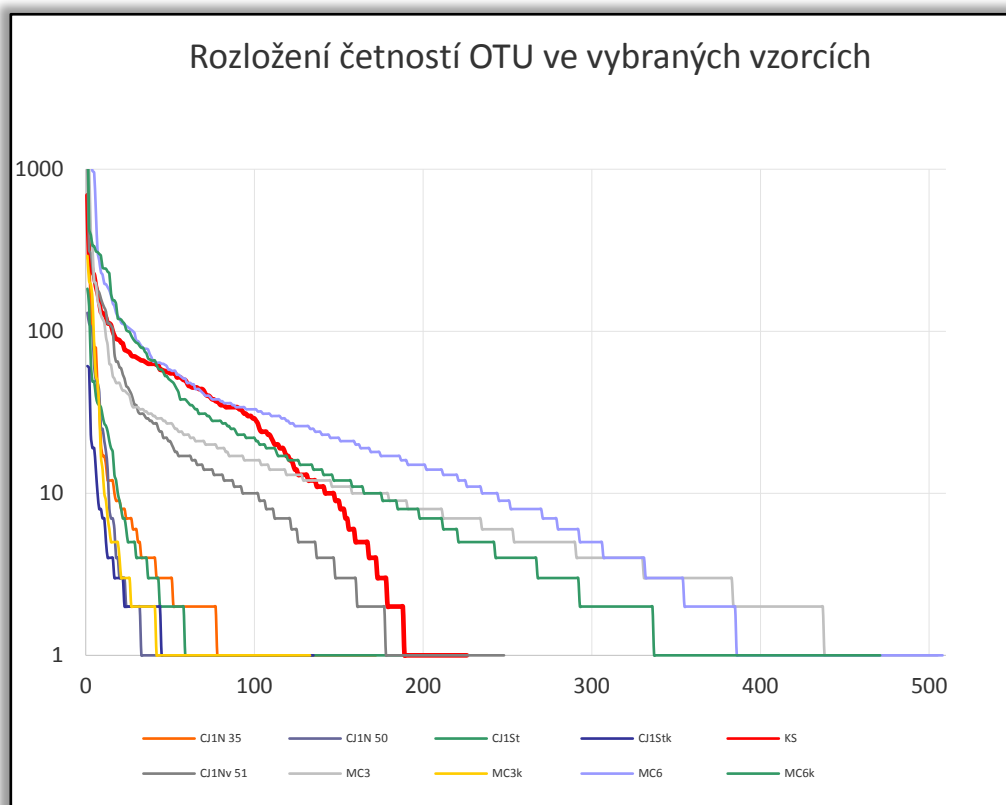
### **Vrt KS**

Vzorek KS obsahuje velké množství středně a málo abundantních OTU, proto cca 62 % nebylo zařazeno do analýzy nejhojnějších OTU. Dalších 19 % sekvencí náleží k OTU, jejichž metabolické vlastnosti nelze charakterizovat. Analyzováno tedy bylo zbylých 19 % sekvencí ze vzorku.

Nejhojnější OTU ve vzorku KS nebylo možné přesně fylogeneticky zařadit, pravděpodobně se však jedná o bakterii z kmene *Nitrospirae*, která se podle nejbližších hitů obvykle vyskytuje v oligotrofních podzemních akviferech a pramenech. Další, méně abundantní nezařaditelné OTU jsou časté ve velmi odlišných typech prostředí. Některé jsou obvyklé v různě hlubokých podzemních prostředích od zaplavených půd a řek až po hlubší akvifery. Jiné pocházejí z vyložené eutrofních prostředí, jsou přítomné v reaktorech odpadních vod nebo odkalovacích nádržích. Vzorek KS tedy pravděpodobně reprezentuje široké spektrum mikrohabitátů vyskytujících se v sedimentech, ve vrtu i ve vodovodu, ze kterého byl odebrán.

Metabolicky bylo možné popsat pouze 4 OTU. Nejčastější je aerotolerantní anaerobní heterotrofní rod *Psychromonas* sp. schopný fermentace. Zbylé tři OTU jsou aerobní a pouze jediná má autotrofní typ metabolismu – *Acidithiobacillus* sp. oxidující redukované formy síry, vodík nebo železo.

Vzorek KS má specifické rozložení četností OTU, které je dobře vidět, pokud ho srovnáme s ostatními vzorky (obr. 14). Na rozdíl od ostatních vzorků je jeho křivka spíše vypuklá než prohnutá, což naznačuje menší rozdíl mezi četnostmi OTU, zvláště pak v úseku středně hojných OTU.



**Obr. 14** Křivka rozložení četností OTU ve vybraných vzorcích na Černuci. Hodnoty na ose y představují četnosti jednotlivých OTU. Hodnoty na ose x čísla OTU od nejhojnějších po nejméně hojně. Vzorky nejsou zmenšeny na stejný počet sekvencí. Z grafu je patrná odlišnost křivky vzorku KS (červená), který byl odebrán z vodovodu a obsahuje vyrovnanější množství středně hojných OTU, proto je jeho křivka vypuklá. Dále jsou vidět dvě skupiny vzorků: Vpravo jsou ty, jež mají velké množství málo abundančních OTU (MC3, MC6, MC6k, CJ1Nv 51). Vlevo jsou ty vzorky, kde převažuje malý počet hojných OTU.

### Vrt CJ1N

Z tohoto vrtu byly analyzovány 3 vzorky – čerstvý vrtný prach z hloubek 31 a 42 m a voda z hloubky 51 m odebraná o několik dní později.

Ve vzorku z vrtného prachu z hloubky 31 m bylo velmi obtížné stanovit, zdali identifikované bakterie pocházejí skutečně z dané hloubky a nebo byly zavlečeny z povrchu bližších zón nebo z půdy – vrtná souprava nebyla sterilní a vrtání postupovalo směrem od povrchu dolů. Všechny OTU je možné charakterizovat jako heterotrofní aerobní mikroorganismy. Některé OTU jako *Bradyrhizobium elkanii*, *Sphingomonas aquatillis* a *Mucilaginibacter* sp. jsou dokonce častými symbionty vyšších rostlin a je tedy vysoce pravděpodobné že pocházejí z půdy, stejně jako většina ostatních OTU, jejichž nejbližší hity jsou různé půdní mikroorganismy. Interpretaci je proto nutné omezit na to, že složení mikrobiální komunity vypovídá v tomto případě více o způsobu odebírání vzorku nežli o procesech probíhajících v horninách 31 m pod povrchem. Z toho vyplývá, že mikrobiální oživení bylo v této hloubce velmi malé.

O deset metrů hlouběji v oblasti hladiny podzemní vody je již situace podstatně zajímavější. Ve vzorku sice stále ještě zůstávají některé OTU, které lze charakterizovat jako půdní (např. opět *Bradyrhizobium elkanii*), tvoří však spíše nevýznamnou menšinu. Přestože dominují aerobní mikroorganismy, objevují se i anaerobní OTU typické pro podzemní redoxní gradientové zóny jako *Desulfuregula conservatrix* – heterotrof

respirující sírany nebo *Desulfosporosinus* sp. schopný oxidovat vodík pomocí síranů nebo železa. Schopnost využívat různé akceptory elektronů je významným rozdílem této mikrobiální komunity oproti CJ1N 31 (viz obr. 16B). Co se týče autotrofního metabolismu, najdeme zde kromě oxidace vodíku i schopnost využívat železo a redukované formy síry.

Ve vzorku vody CJ1Nv 51 úplně chybí obligátně anaerobní mikroorganismy. Vyskytuje se zde pouze mikroaerofilní *Aquabacterium* sp. nebo fakultativně anaerobní *Rhodoferrax ferrireducens*, heterotrofní bakterie redukující pestré škálu různých substrátů od kyslíku a nitrátů až po železo nebo mangan a fumarát. Autotrofní mikroorganismy jsou zastoupené pouze *Sulfuricurvum* sp., využívajícím sulfidy nebo vodík. Druhá nejčastější OTU *Hydrogenophaga* sp. umí rovněž využívat vodík s tím, že je mixotrofní. Ve vzorku převažují heterotrofní mikroorganismy. Podle nejbližších hitů lze usuzovat, že se tyto OTU vyskytují často v eutrofním prostředí s dostatkem lehce degradovatelné organické hmoty, kde probíhá tlení a kvašení, přestože se jedná o aeroby. V případě těchto OTU nelze zcela jistě rozhodnout, zdali se nejedná o kontaminace (např. nejhojnější OTU *Pseudomonas mandelii*) a proto je složitější posoudit, zdali ve vrtu opravdu dochází ke zvýšené degradaci organické hmoty. Zdá se ale pravděpodobnější, že se tyto aerobní heterotrofové dostali do vzorku později během zpracování nebo byli zaneseni z vyšších částí vrtu. Nelze totiž příliš dobře vysvětlit původ takového množství lehce degradovatelné organické hmoty na dně vrtu, který zasahuje do starých vod bazálního cenomanského kolektoru. Je pravděpodobnější, že oživení je zde malé a heterotrofní mikroorganismy mají původ v povrchových prostředích stejně jako ve vzorku z hloubky 31 m.

#### **Vrt CJ-1 (vzorek CJ1St)**

Ve vzorku CJ1St převládá heterotrofní typ metabolismu nad autotrofním, ne ovšem příliš výrazně. Autotrofní mikroorganismy jsou schopné oxidovat především redukované sloučeniny síry, v menší míře i vodík nebo železo. Síra je zde významným zdrojem energie pro primární produkci: Nejhojnější OTU, mixotrofní aerobní bakterie *Thiomonas* sp. oxiduje sirovodík, elementární síru nebo organické látky a je navíc přítomná ve dvou různých genotypech OTU. Redukovanou formu síry může využívat také mikroaerofilní *Sideroxydans* sp. nebo aerobní *Sulfuriferula plumbophila*.

Poměrně významná část mikroorganismů je přizpůsobena anoxickým nebo suboxickým podmínkám: Druhou nejhojnější OTU je aerotolerantní anaerob *Psychromonas* sp. schopný fermentace. Fermentovat dokáže také OTU z obligátně anaerobní skupiny bakterií Anaerolinaceae. Některé mikroorganismy disponují rovněž vlastností využívat jako TAE dusitany.

Nejbližší hity OTU přítomných ve vzorku se často vyskytují v sedimentech s nízkým pH a rozpuštěnými ionty kovů (As, Fe, Hg), spíše v anoxickém či hypoxickém prostředí nebo na redoxních zónách v akviferech. Některé heterotrofní OTU jsou podobnější hitům z oligotrofního, jiné z eutrofního prostředí nebo půd.

#### **Vrt MC1 (vzorek MC1k)**

Vzorek MC1k se nejvýrazněji liší od ostatních vzorků, obsahuje největší počet obligátně anaerobních mikroorganismů (viz obr. 15A) a mikroorganismy zde také mají nejdiverzifikovanější způsoby využívání různých TAE: různé OTU mají schopnost redukovat kromě kyslíku, dusičnany, dusitany, železo, mangan,

chlorované uhlovodíky a jiné organické látky, sírany a elementární síru nebo mají možnost fermentovat.

Nejhojnější OTU je obligátní anaerob *Desulfomonile* sp. s mixotrofním způsobem získávání uhlíku.

Primární produkce je závislá na oxidaci vodíku (*Desulfomonile* sp.) a v menší míře na oxidaci redukováných forem síry (*Sphaerotillus montanus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*) nebo oxidaci železa (*Acidithiobacillus ferrooxidans*).

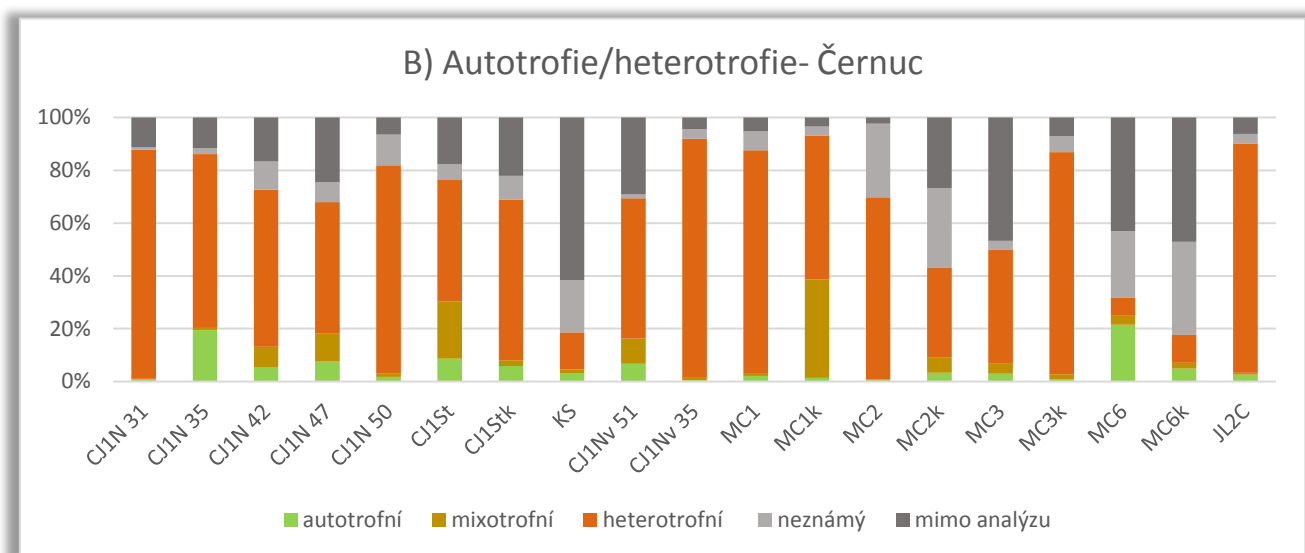
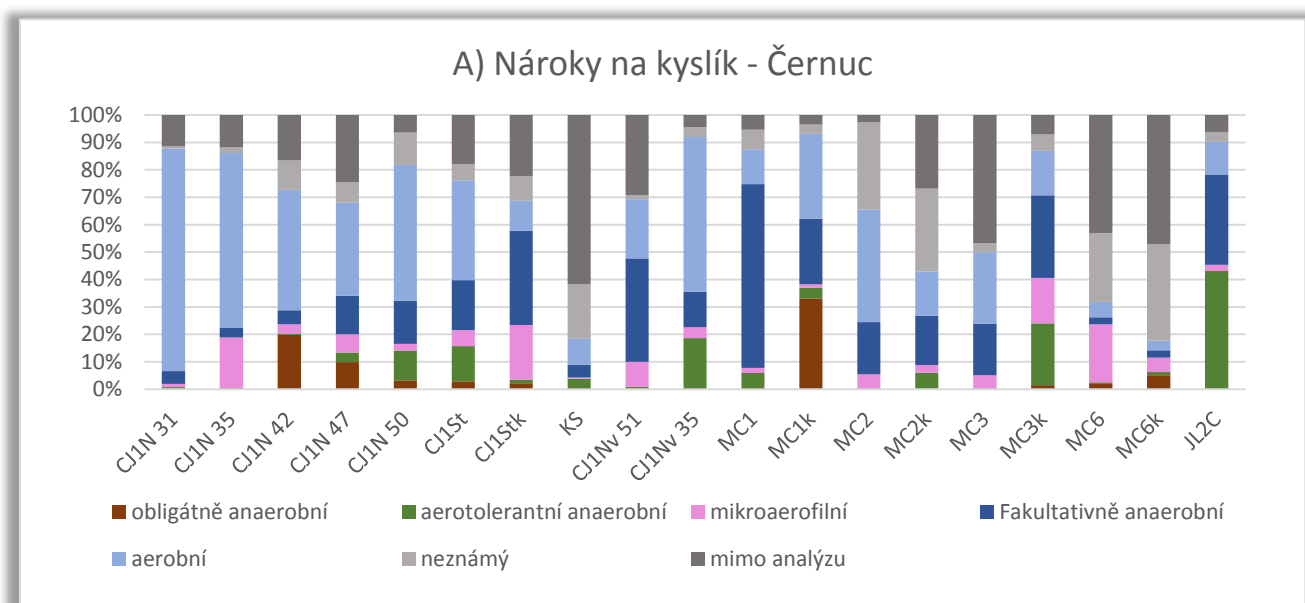
U heterotrofních mikroorganismů nelze s jistotou rozeznat, zdali se nejedná o mikroorganismy, které se dostaly do vzorku odjinud než z vrtu. Vzorek MC1k byl poměrně silně kontaminován (viz obr. 10A). Nejblíže hity heterotrofních OTU pocházejí jak z anoxických sedimentárních prostředí, půdy, oligotrofních vod, organikou bohatých prostředí, nebo prostředí s rozpuštěnými kovy (Fe, Cu).

### **Vrt MC2 (vzorek MC2k)**

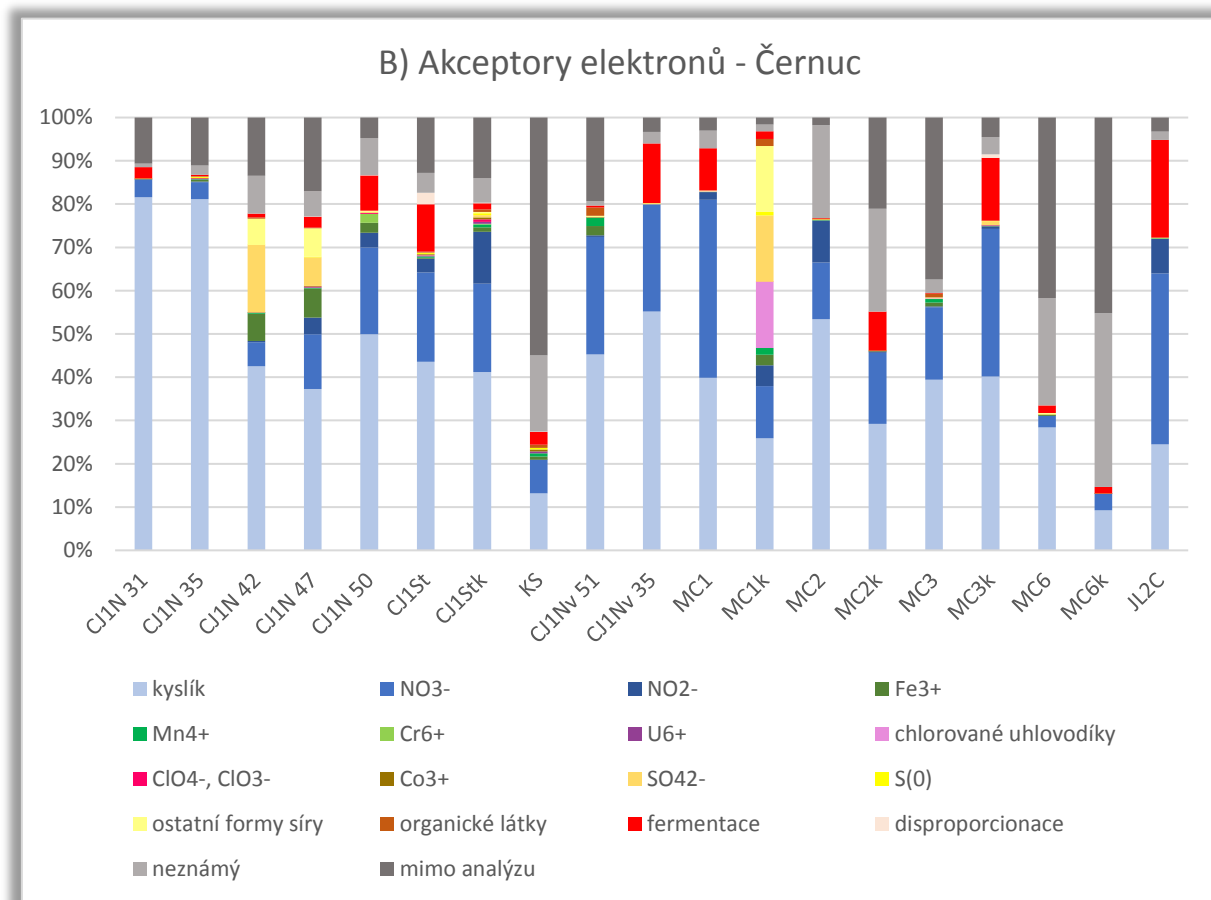
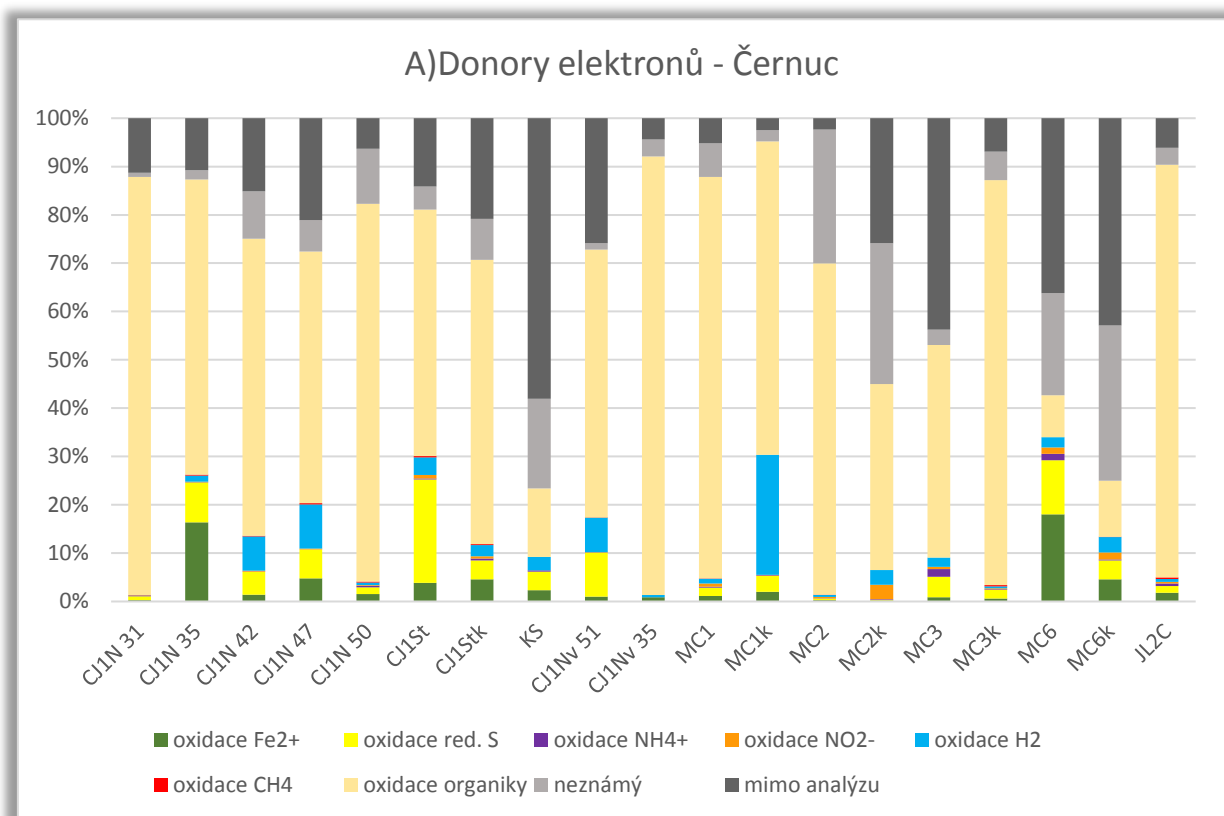
Poměrně velkou část OTU (30 % sekvencí) nebylo možné metabolicky charakterizovat. Podle nejbližších hitů lze říci, že tyto OTU pocházejí z poměrně odlišných typů prostředí. Nejhojnější OTU z prostředí bohatého na rozpuštěné kovy (U, Au, Fe), další OTU z půd, povrchových vod bohatých na organiku, ale i ze suboxických prostředí nebo z podzemí.

Z OTU, které bylo možné popsat, převládají v kalu vrtu MC2 heterotrofní bakterie. Autotrofní OTU jsou reprezentovány pouze rodem *Nitrospira* sp., který oxiduje nitrity nebo vodík. Většina OTU využívá jako TAE kyslík nebo nitráty a jen malé množství je schopno fermentace (*Psychromonas* sp., *Planctomyces* sp.). Jediným OTU, který nerespiruje aerobně je aerotolerantní anaerob *Psychromonas* sp., tvořící 6 % sekvencí (viz obr. 15A)

Skutečnost, že jediný identifikovaný autotrof využívá látky, které v podzemí mělkých podzemních vod mohou pocházet z rozkladu organické hmoty spíše nežli z geologických procesů, lze usuzovat, že hlavním zdrojem energie pro místní komunitu je opravdu organická hmota z povrchu. S ní mohou být do vrtu splavovány i mikroorganismy rostoucí v půdě nebo přípovrchových zónách, jejichž OTU byly ve vzorku identifikovány. Množství alochtonní organické hmoty ale pravděpodobně nebude příliš velké, neboť vlivem jejího rozkladu nedochází k významné tvorbě anoxie – ve vrtu nejsou přítomni obligátní anaerobové, tomu odpovídají i naměřené hodnoty Eh.



**Obr. 15 A) Nároky na kyslík a B) poměr autotrofie a heterotrofie na Černuci.** Kategorie neznámý obsahuje takové OTU, které nebylo možné metabolicky určit. Kategorie mimo analýzu obsahuje OTU, které nebyly zařazeny do analýzy. V příloze B jsou uvedeny stejné grafy bez těchto dvou kategorií, aby bylo možno lépe srovnat metabolické poměry. Grafy vycházejí z dat v příloze A.



**Obr. 16 A) Donory elektronů a B) akceptory elektronů na Černuci.** Kategorie neznámý obsahuje takové OTU, které nebylo možné metabolicky určit. Kategorie mimo analýzu obsahuje OTU, které nebyly zařazeny do analýzy. V příloze B jsou uvedeny stejné grafy bez těchto dvou kategorií, aby bylo možno lépe srovnat metabolické poměry. Grafy vycházejí z dat v příloze A.

### 3.3.4 Vlastislav

Všechny vzorky z Vlastislavi obsahují vysoký počet sekvencí, většina OTU je ale málo hojných, takže nejsou součástí analýzy nejčastějších OTU. Ve vzorku MO1 je 64 % sekvencí mimo analýzu, v MO5 45%, v MO3 32% a nejvíce neanalyzovaných sekvencí má pramen MOst – 75%.

#### Vrt MO1

Metabolismus mikrobů v akviferu je převážně autotrofní. Energii získávají mikroorganismy nejčastěji oxidací redukovaných forem síry (*Sulfuricella* sp., *Thiobacillus thioparus*, *Sulfuricella denitrificans*, *Sulfurimonas* sp.). Oxidace síry je tedy rozdělena mezi různé druhy bakterií, které ji všechny oxidují kyslíkem, případně nitráty a koexistují společně v jednom akviferu. V mnohem menší míře má pak komunita schopnost oxidovat i jiné anorganické substráty jako železo, vodík nebo nitrity. Rovněž je využíván metan, chybí oxidace amoniaku, tato schopnost nebyla detekována v žádném vzorku z Vlastislavi.

Důležité je, že zatímco oxidace redukovaných forem síry probíhá aerobně, degradace organické hmoty zajišťují ve většině případů obligátní anaerobové. Značí to, že redukované formy síry jsou v roztoku, zatímco organická hmota v sedimentu nebo v rámci anoxické zóny biofilmu. Pro vrt MO1 je charakteristická extrémní pestrost možných terminálních akceptorů elektronů (Fe, Mn, Co, U, síra, organické látky), za což je zodpovědný především obligátní anaerob *Geobacter* sp. Menší podíl pak zaujímá fermentace (*Paludibacter* sp.). Pouze nepatrný zlomek komunity redukuje sírany, jejichž zvýšené koncentrace by bylo možné předpokládat vzhledem k vysokým obsahům oxidátorů redukovaných forem síry. V akviferu je ale pravděpodobně dostatek jiných oxidovaných látek např. kovů, které jsou energeticky výhodnějšími TAE.

#### Vrt MO5

Ve vrtu MO5 mají autotrofní mikroorganismy ještě vyšší zastoupení než ve vrtu MO1 (obr. 17B). Rozložení schopností oxidovat různé anorganické substráty je zde rovnoměrnější (viz obr. 18A) než ve vrtu MO1, kde dominuje oxidace redukovaných forem síry. To koresponduje s tím, že ve vrtu MO5 nejsou nikde v okolním sedimentu přítomny pyritové konkrce. Bakterie mají schopnost oxidovat železo, redukované formy síry, vodík nebo metan s tím že tyto schopnosti jsou rozděleny různě napříč OTU (*Gallionella capsiferiformans*, *Sulfuricella* sp., a různé genotypy *Nitrospira* sp.). Opakuje se zde situace z vrtu MO1, že autotrofní bakterie využívají jako TAE pouze kyslík nebo nitráty a jen u heterotrofních mikroorganismů se vyvinula schopnost využívat také jiné TAE. Výběr možných alternativních akceptorů elektronů se ovšem omezuje na chloristany či chlorečnany (obr. 18B) u fakultativního anaeroba *Dechloromonas* sp., který je zároveň nejhojnější OTU. Chlorečnany ani chloristany ovšem ve vrtu nelze očekávat a jedná se mnohem spíše o schopnost, kterou *Dechloromonas* sp. má jako doplňkovou funkci a kterou skutečné mikroorganismy ve vrtu ani mít nemusí. Nebo ji mohou mít a nevyžívají ji.

Je zvláštní, že ve vzorku nebyly detekovány žádné obligátně anaerobní mikroorganismy ale pouze mikroaerofilní (obr. 17A), přestože kal z vrtu byl černé barvy obsahy kyslíku nízké. Je možné to vysvětlit tak,

že voda má velmi malé množství živin stejně jako v MO1 ale na rozdíl od MO1 zde neexistuje žádný strmý gradient, takže nedochází k rapidnímu růstu mikroorganismů, aby vznikala anaerobní zóna vlivem hromadění organické hmoty. Tomu by nasvědčovalo i to, že nepřevládá jeden druh zdroje energie (sulfidy) ale více různých mezi OTU rovnoměrně distribuovaných donorů elektrů a že se jedná o energeticky „klidné“ prostředí s vyvinutou diverzitou ve schopnostech využívání různých zdrojů. Je možné, že nepatrný naměřený obsah kyslíku (1,7%) pomalu rostoucí komunitě pravděpodobně stačí (mikroaerofilům jako *Gallionella* sp. a *Sideroxdans* sp. dokonce svědčí) spolu s využíváním nitrátů. Tato mikrobiální komunita svým charakterem velice připomíná komunitu odstaveného jímacího vrtu PES na Pekaře, kde jsou vody mělké a zcela oxické.

### **Vrt MO3**

V tomto vzorku je velký počet OTU, ke kterým nebylo možné přiřadit názvy organismů, a tudíž ani metabolismy. Ze sekvencí zahrnutých do analýzy (68%) jich více než polovina zůstala bez metabolického určení. V analýze tedy zůstalo tedy pouhých 25 % sekvencí z celkového počtu což značně omezuje interpretaci výsledků.

Oproti předchozím dvěma vrtům bylo ve vrtu MO3 detekováno pouze zanedbatelné množství autotrofních mikroorganismů (obr. 17B). Autotrofní menšina je zde reprezentována mikroorganismy schopnými oxidovat nitrity a vodík, tedy látky, které se mohou týkat recyklace organické hmoty. Anorganické substráty, které by pocházely přímo z rozpouštění minerálů mikrobiální komunita pravděpodobně nevyužívá jako hlavní zdroj energie (nelze to ovšem zcela vyloučit, protože nejhojnější OTU nebylo možné přesně metabolicky charakterizovat). Podle nejbližších hitů jsou ovšem tyto neurčitelné mikroorganismy nejčastěji přítomny v povrchovém prostředí s dostatkem organické hmoty (půda, různé mikrobiální maty, hyporheické sedimenty), takže je méně pravděpodobné, že by mohlo jít o autotrofy.

Detekované mikroorganismy ve vrtu MO3 jsou výhradně aerobní – kyslík a v nepatrné míře i dusičnany jsou jediným možným akceptorem elektronů.

Je tedy opravdu možné, že akvifer je v okolí vrtu MO3 ovlivňován vodou z řeky Modly. Zároveň je ale potřeba vzít v úvahu fakt, že vrt MO3 je jako jediný čerpaný, což může způsobovat kolísání hladiny a provzdušnění akviferu. Čerpání působí také jako selekční faktor, který pravidelně odstraňuje bakteriální nárůsty i vytvořené zásoby sloučenin pro redoxní cykly. Proto nebylo možné v komunitě ve vzorku detekovat anaerobní respiraci a fermentaci typickou pro kalníky a často spojenou s autotrofní regenerací akceptorů výše ve sloupci. Heterotrofní mikroorganismy bylo jednodušší zachytit možná proto, že mají rychlejší růst.

Ochuzení vrtu o pomaleji rostoucí autotrofy a anaeroby odpovídá i to, že 20 nejhojnějších OTU tvoří v vrtu 70 % komunity, a to že diverzita OTU (počet OTU/počet sekvencí) je o řád nižší než v ostatních vrtech ve Vlastislavi.

### **Pramen MOšt**

Pro analýzu bylo z tohoto vzorku použito pouhých 12 % sekvencí, neboť 75% nebylo zařazeno kvůli

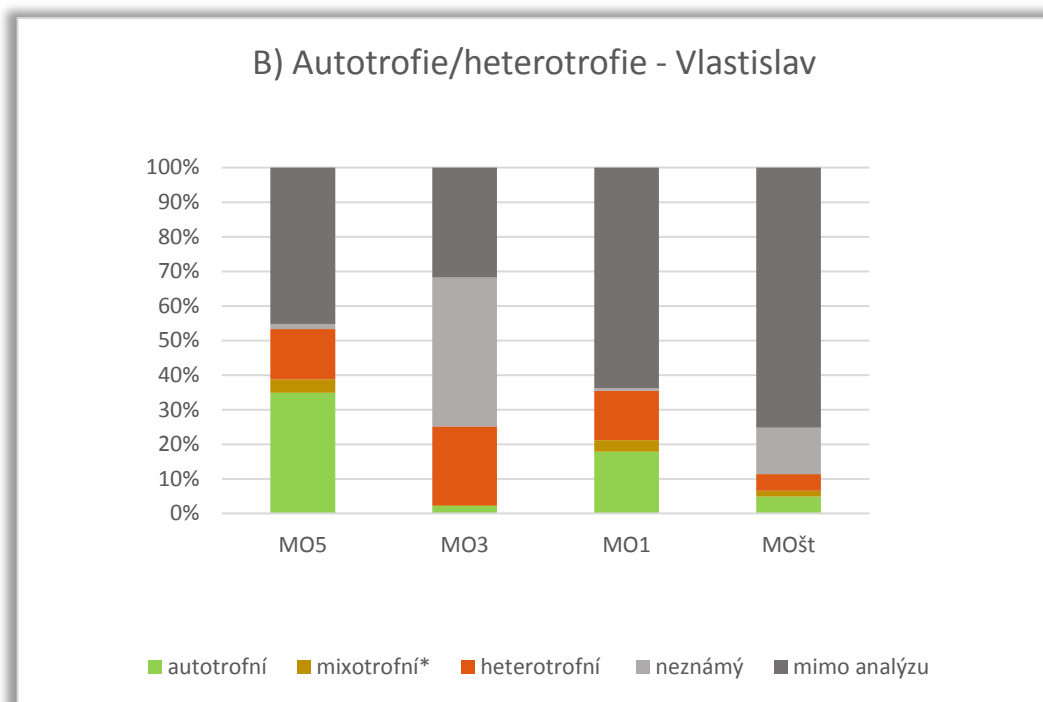
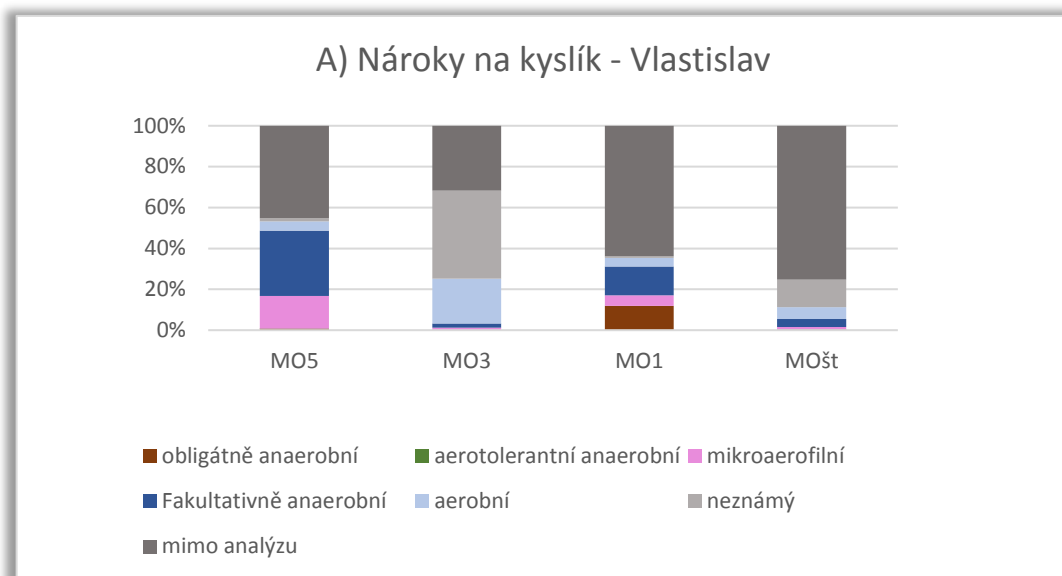


rozložení abundancí OTU a 13% nebylo možné metabolicky určit. Z tak malé části vzorku není možné spolehlivě vyvozovat závěry o procesech v akviferu. Vzorek MOst má jednoznačně nejvyšší diverzitu ve Vlastislavi a velmi vysoký podíl málo hojných OTU.

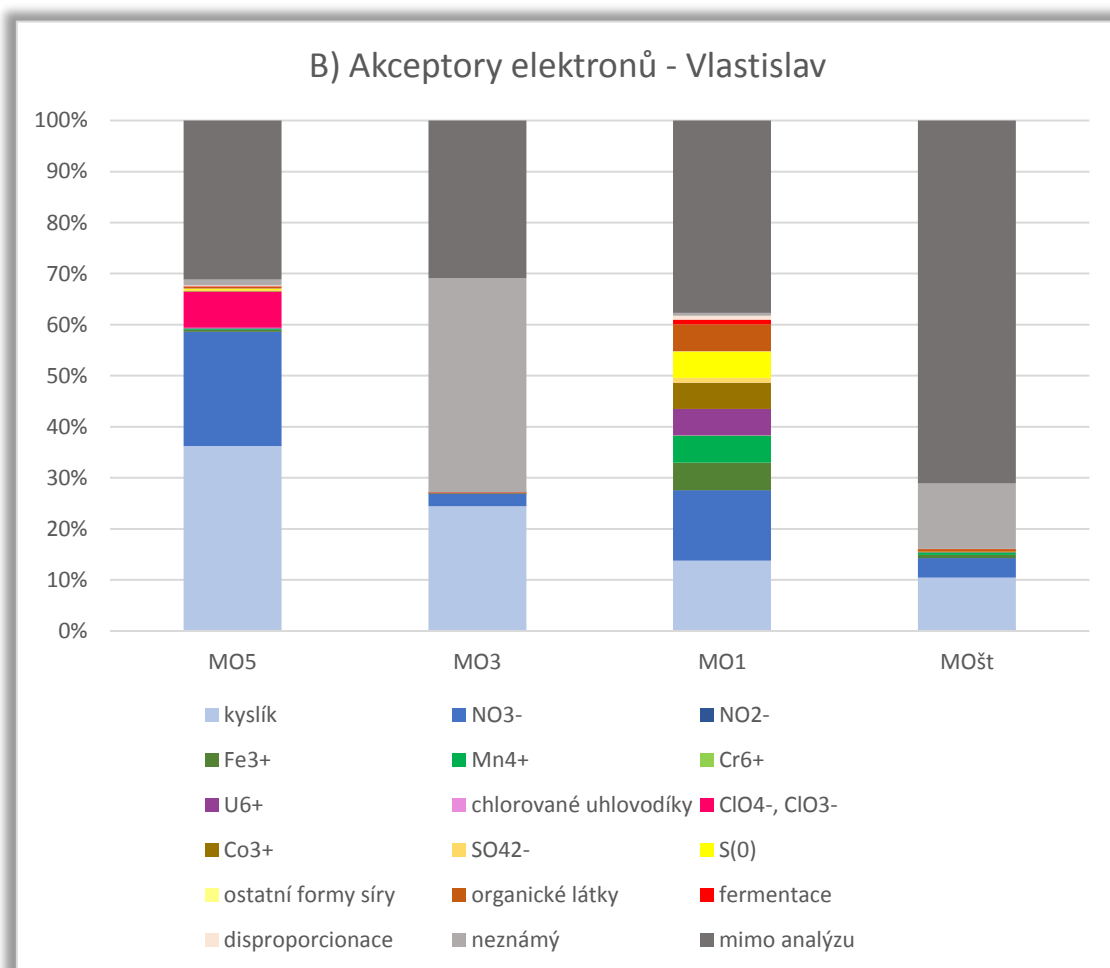
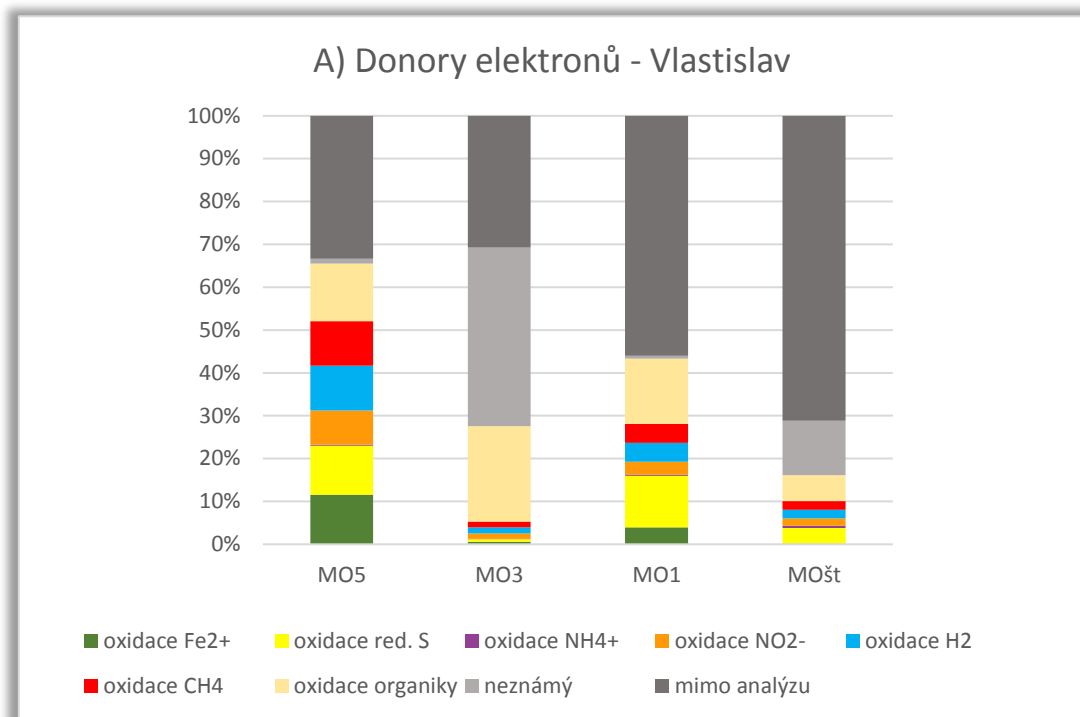
Metabolická pestrost hodnocených 12% OTU je poměrně velká. Převažuje oxidace organických látek, za kterou jsou zodpovědné bakterie *Methylobacillus* sp. a *Cupriavidus* sp. obě dvě preferující nízkomolekulární (lehce degradovatelné) organické látky. Autotrofní mikroorganismy využívají energie z oxidace sirovodíku nebo síry (*Thiobacter* sp. a *Beggiatoa* sp.) a vodíku nebo nitritu (*Nitrospira* sp.)

Většina mikroorganismů je aerobních, část umí respirovat nitráty a ostatní TAE jsou nevýznamné.

Charakter prostředí, ze kterého byly získány nejbližší hity metabolicky nezařaditelných OTU je také dosti pestrý (železitý kal, biofilmy z různých horninových substrátů, oligotrofní karbonátové prostředí, říční a půdní prostředí) a odpovídá dobře charakteru odběrného místa.



**Obr. 17 A) Nároky na kyslík a B) poměr autotrofie a heterotrofie ve Vlastislavi.** Kategorie neznámý obsahuje takové OTU, které nebylo možné metabolicky určit. Kategorie mimo analýzu obsahuje OTU, které nebyly zařazeny do analýzy. V příloze B jsou uvedeny stejné grafy bez těchto dvou kategorií, aby bylo možno lépe srovnat metabolické poměry. Grafy vycházejí z dat v příloze A



**Obr. 18 A) Donory elektronů a B) akceptory elektronů ve Vlastislavi.** Kategorie neznámý obsahuje také OTU, které nebylo možné metabolicky určit. Kategorie mimo analýzu obsahuje OTU, které nebyly zařazeny do analýzy. V příloze B jsou uvedeny stejné grafy bez těchto dvou kategorií, aby bylo možno lépe srovnat metabolické poměry. Grafy vycházejí z dat v příloze A

### 3.4 Výsledky ordinačních metod

Při každém výpočtu ordinačního diagramu (pokud obsahem vzorků byly OTU, a ne metabolické skupiny) byly náhodně vybrány sekvence vždy tak, že ve zkoumaném setu vzorků měly vzorky stejný počet sekvencí. Zároveň byly ze setu vyřazeny vzorky s malým počtem sekvencí a vysokým relativním podílem kontaminujících sekvencí. Vyřazených vzorků bylo vždy maximálně tolik, aby analýza ještě dávala smysl – aby v ní například nezůstal malý počet vzorků, např. 5, ale aby v ní byl zastoupen co největší počet typů vzorků (jak z kalu, tak z vody a vrtného prachu nebo z každého vrtu nějaký).

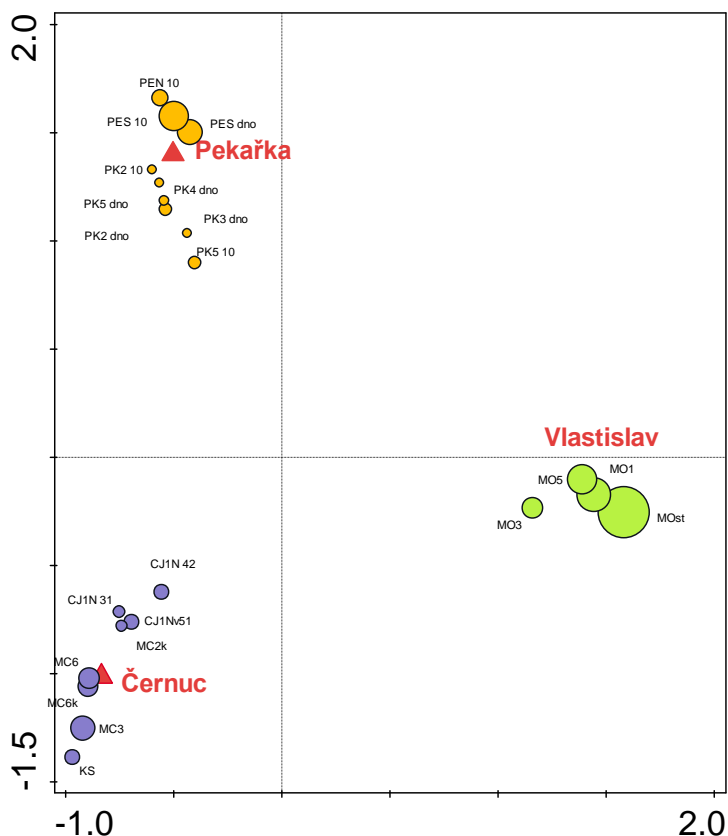
Při analyzování vzorků ze všech tří lokalit dohromady byl počet sekvencí ve vzorku 2505 s tím, že byly vyřazeny vzorky CJ1N35, CJ1N47, CJ1N50, CJ1Stk, CJ1Nv35, MC3k, MC2, MC1, MC1k, JL2C, PK3 10, PK4 10, PK1 10, PK1dno. Pro set Černuc byl počet sekvencí 992 a vyřazeny byly vzorky CJ1N47, CJ1N50, CJ1Nv35, CJ1Stk, JL2C. Pro set Pekařka by počet sekvencí 1059, vyřazeny nebyly žádné vzorky (viz tab. 9). Vzorků z lokality Vlastislav je příliš málo (4) na to, aby byly analyzovány samostatně ordinační metodou. Jsou tedy součástí setu vzorků ze všech lokalit dohromady.

#### 3.4.1 Přímé ordinační analýzy

##### 3.4.1.1 Lokalita – nejlepší vysvětlující proměnná

Vzorky ze všech tří lokalit byly podrobeny přímé ordinační analýze v programu Canoco, která umožňuje najít nejlepší vysvětlující proměnnou. Ukázalo se, že nejlepší vysvětlující proměnnou je příslušnost k místu odběru (viz obr. 19.1). Toto rozdělení vysvětluje nejlépe variabilitu v OTU mezi vzorky, zatímco ostatní parametry prostředí – například rozdíl mezi odběrem z kalu, vody a vrtného prachu má v případě takto rozmanitého setu vzorků velmi malou statistickou podporu. Proto byly další proměnné, které by mohly korespondovat s diverzitou OTU ve vzorcích testovány vždy jen v rámci jedné lokality.

Pokud místo OTU použijeme jako obsah vzorků metabolické skupiny pro různé donory a akceptory elektronů z analýzy nejhojnějších mikroorganismů (příloha A a příloha B), zjistíme, že toto rozdělení do skupin podle lokality vůbec neodpovídá rozdílům v metabolických schopnostech. Dostali bychom podobné rozdělení stejně, pokud bychom k vzorkům s metabolickým obsahem přiřadili příslušnost k lokalitě náhodně ( $p=0,588$  pro donory elektronů,  $p=0,962$  pro akceptory elektronů).



**Obr. 19.1 Diagram nepřímé ordinační analýzy (DCA) vypočítaný v programu Canoco na základě obsahu OTU. Z každého vzorku bylo vybráno náhodně 2505 sekvencí (viz tab. 9). Kolečka představují jednotlivé vzorky. Velikost koleček odpovídá diverzitě OTU. Trojúhelníky představují teoretický průměrný vzorek odpovídající kategorii (pro skupinu Vlastislav je trojúhelník skrytý za vzorkem MO1). Osy x a y jsou osami ordinačního prostoru a hodnoty na nich odpovídají relativní vzdálenosti (podobnosti) vzorků. Zelená barva – vzorky z Vlastislavi, žlutá barva – vzorky z Pekařky, fialová barva – vzorky z Černuci.  $P = 0,002$  při 1000 permutacích.**

### 3.4.1.2 Rozdíly mezi vzorky kalu a vzorky vody z vrtů

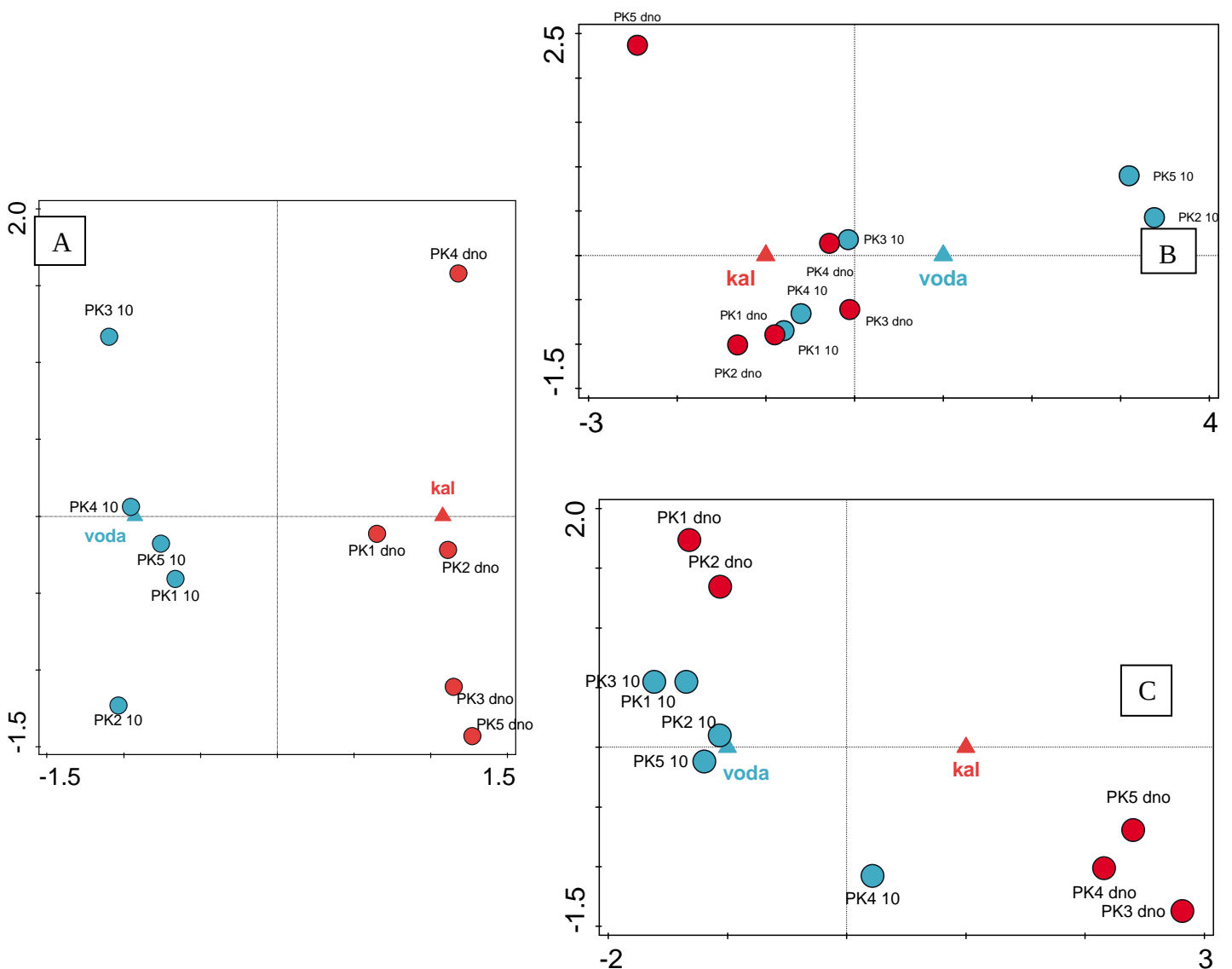
Při hledání odpovědi na tuto otázku bylo přímými ordinačními metodami testováno, zdali se od sebe liší vzorky z kalu a z vody na základě obsahu OTU a na základě obsahu metabolických skupin definovaných schopnostmi využívat různé akceptory, respektive donory elektronů. Tyto metabolické skupiny jsou totožné se skupinami v grafech v příloze B vypočítanými na základě dat z přílohy A. Zkoumány byly takto vzorky na lokalitě Pekařka a Černuc, kde byl ve vybraných vrtech k dispozici jak odběr z kalu, tak odběr z vody ve vrtu. Vzorky z lokality Pekařka byly omezeny na ty z pozorovacích sond, aby byl omezen vliv materiálu výstroje vrtu (vrt PES má ocelovou zárubnici). Na Černuci byly do analýzy zařazeny vzorky z vrtů MC1, MC2, MC3, MC6.

Výsledky přímé ordinační analýzy v programu Canoco ukazují, že rozdíly mezi vzorky z kalu a z vody jsou nevýznamné. To je patrné z vysokých hodnot  $p$  jak pro rozdíly ve složení OTU, tak pro rozdíly ve složení metabolických skupin (obr. 19.2). Nejvýznamnější je rozdíl ve složení OTU (obr. 19.2A), nejméně významný je rozdíl v zastoupení metabolických skupin s různými donory elektronů (obr. 19.2B).

Stejný test odlišnosti vzorků odebraných z kalu a z vody byl proveden rovněž se vzorky z lokality Černuc, kde bylo přímou ordinační metodou zjištěno, že mezi vzorky odebranými z kalu a z vody na Černuci rovněž

neexistuje významný rozdíl. Hodnoty P jsou pro všechny tři typy analýz velmi vysoké: (variabilita na základě OTU:  $p = 0,281$ , na základě skupin TAE –  $p = 0,404$ , na základě donorů elektronů  $p = 0,631$ ), proto zde nejsou uvedeny příslušné ordinační diagramy. Hodnoty p jsou zde ještě vyšší než na Pekařce. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že variabilitu na Černuci řídí širší spektrum procesů (kvůli větší geologické heterogenitě) než na Pekařce a proto už tak málo významný jev jakým je rozdíl mezi kalem a vodou zaniká.

**Obr. 19.2 A-C Ordinační diagramy vypočítané přímou ordinační metodou v programu CANOCO (CCA v případě A, RDA v případě B a C). Kolečka představují jednotlivé vzorky, trojúhelníky představují teoretický průměrný vzorek odpovídající kategorii kal (červená) nebo voda (modrá). Osy x a y jsou osami ordinačního prostoru a hodnoty na nich odpovídají relativní vzdálenosti (podobnosti) vzorků. Z diagramu je možné vyčíst, zdali je daný vzorek podobnější třídě „kal“ nebo třídě „voda“. Ke každému diagramu je proveden permutační test, kde jsou spočítány hodnoty  $p$  při 1000 permutacích, které odpovídají pravděpodobnosti, že dané uspořádání vzorků vznikne náhodným proházením tříd vysvětlovajících proměnných (třídy „kal“ a „voda“) při stejném obsahu vysvětlovaných proměnných (OTU nebo metabolické skupiny) ve vzorcích. Za statisticky významné jsou považovány hodnoty menší než 0,005. A – Vysvětlovanými proměnnými ve vzorcích jsou OTU.  $P = 0,16$ , B – Vysvětlovanými proměnnými ve vzorcích jsou metabolické skupiny s různými donory elektronů,  $p = 0,396$ , C – Vysvětlovanými proměnnými ve vzorcích jsou metabolické skupiny s různými akceptory elektronů,  $p = 0,218$**



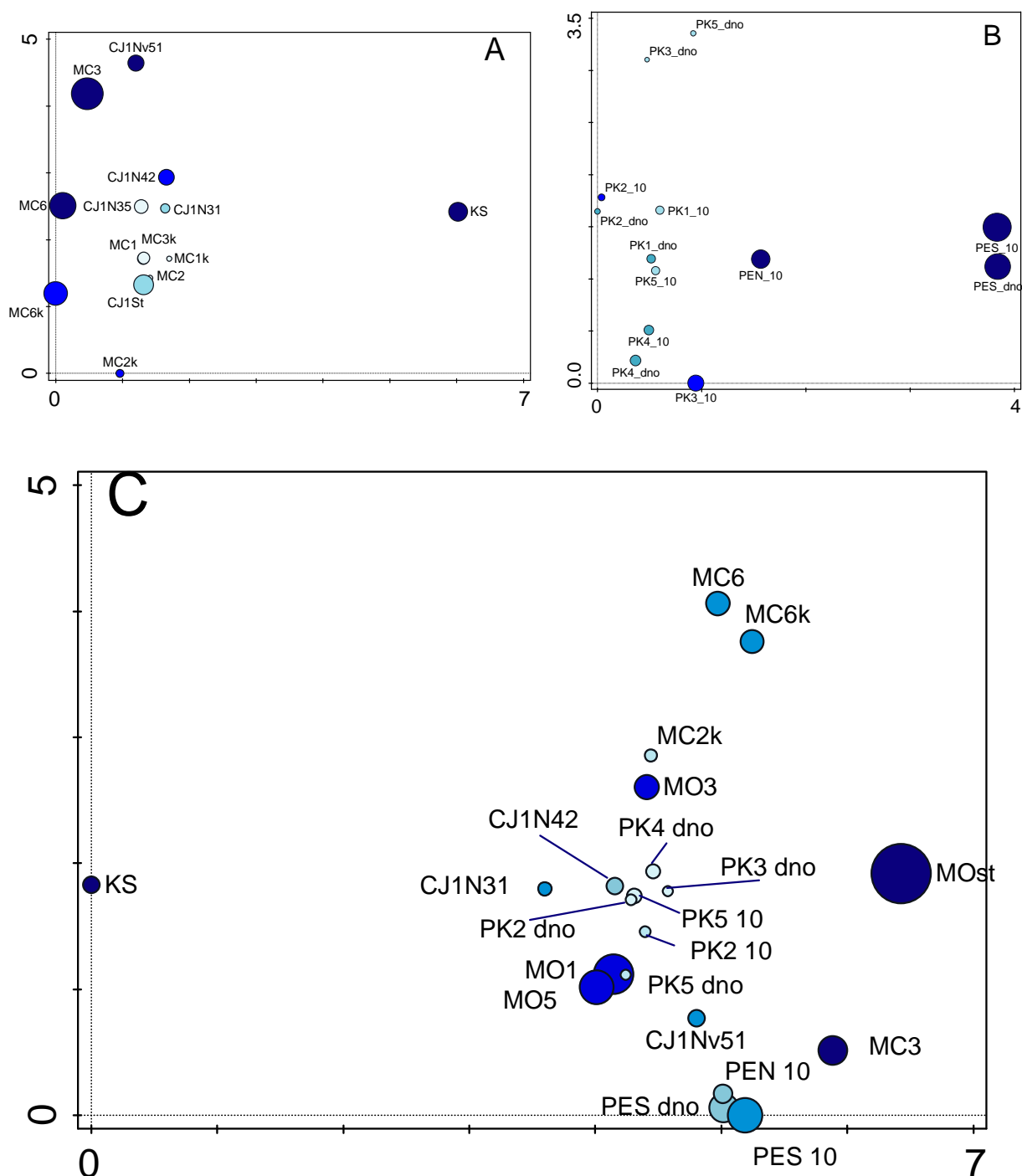
### 3.4.2 Nepřímé ordinační metody

#### 3.4.2.1 Nevýhoda nepřímých ordinačních analýz

Nepřímé ordinační metody umožňují zobrazit hlavní variabilitu mezi vzorky pouze na základě jejich složení (OTU nebo metabolických skupin) bez vlivu vysvětlovajících proměnných (parametrů prostředí).

Obr. 20 ukazuje odlišnost vzorků podle variability v obsahu OTU. Jejich odlišnost je dána především tím, že vzorky obsahující větší množství unikátních OTU (OTU vyskytujících se pouze v jednom vzorku v rámci analyzovaného souboru vzorků) leží spíše na okraji oblaku vzorků nežli vzorky s malým množstvím unikátních OTU. Nejméně výrazný je tento jev na Pekařce (obr. 20 B), kde je zároveň nejmenší rozdíl mezi vzorkem s největším procentem unikátních OTU (PES 10 – 52,09 %) a vzorkem s nejmenším počtem unikátních OTU (PK5 10 – 18,18 %) – viz tab. 9. U vzorků PK5 dno a PK3 dno převládá vliv jiného faktoru. Podle obsahu unikátních OTU by tyto vzorky měly ležet více v centru oblaku vzorků. Vliv velkého počtu unikátních OTU je prakticky nemožné separovat od vlivů, za kterým by mohla stát proměnlivost prostředí tím spíše, čím větší rozdíly v proporcích unikátních OTU mezi vzorky existují. Přehled poměru unikátních OTU a poměru sekvencí unikátních OTU je uveden v tab. 9.





**Obr. 20** Diagramy nepřímé ordinační analýzy DCA vypočítané v programu Canoco na základě obsahu OTU. A – vzorky z Černuci, B – vzorky z Pekařky, C – vzorky ze všech tří lokalit dohromady. Kolečka představují jednotlivé vzorky a jejich velikost počty OTU. Odstíny modré reprezentují obsah unikátních OTU podle tab. 9. Nejtmavší odstín představuje největší podíl unikátních OTU. Diagram ukazuje, že vzorky s větším relativním zastoupením unikátních OTU jsou rozmístěny spíše na okrajích oblaku nežli vzorky s menším procentem unikátních OTU.

### 3.4.2.2 Variabilita na základě obsahu metabolických skupin

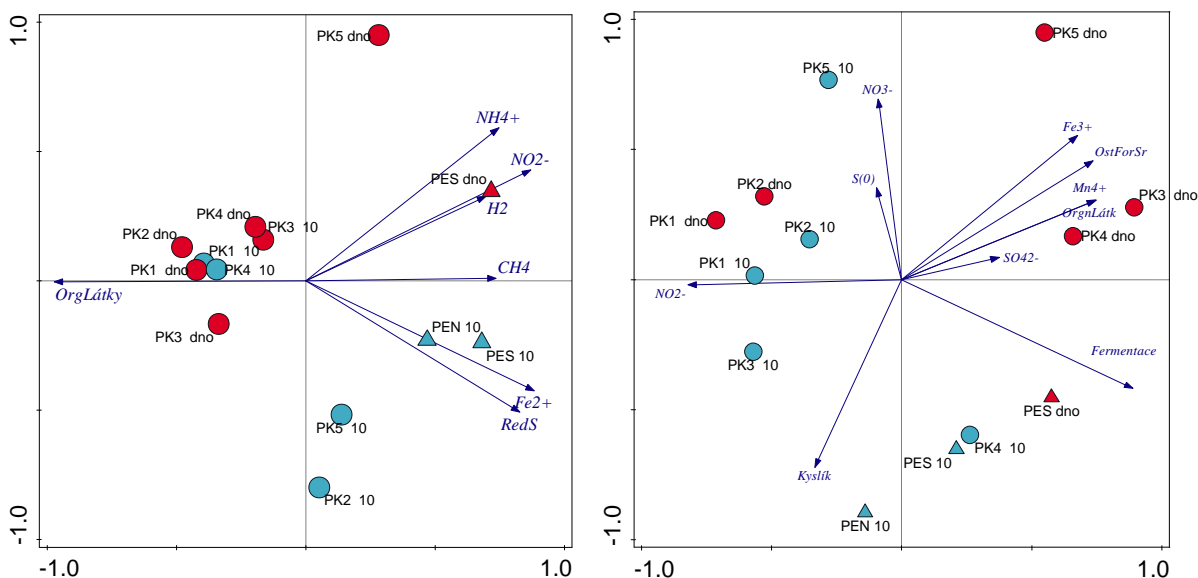
Ordinační diagramy popisující variabilitu v různých metabolických schopnostech nesou několik typů informací. Vzdálenost bodů (vzorků) v ordinačním diagramu představuje míru podobnosti mikrobiálních komunit na základě určité metabolické charakteristiky (například schopnosti využívat různé akceptory

elektronů). V diagramech jsou zobrazeny šipky představující jednotlivé typy metabolismů (využívání různých akceptorů elektronů). Vzájemná orientace šipek naznačuje, jak obvyklé je, že se spolu dané typy metabolismů v prostředí podzemní vody na Černuci vyskytují. Poloha vzorků vůči těmto šípkám ukazuje, jak je daný metabolismus typický pro určitý vzorek. Pokud spustíme kolmici ze vzorku na přímkou šipky, můžeme odečíst míru a směr korelace (negativní, pozitivní) metabolismu s daným vzorkem. Čím blíže jsou vzorky středu os, tím méně je pro ně typický nějaký druh metabolismu.

### 3.4.2.2.1 Pekařka

Podíváme-li se na vzorky z Pekařky z hlediska schopnosti komunit využívat různé donory elektronů, je na první pohled patrný rozdíl mezi jímacími vrty s ocelovou výstrojí a pozorovacími sondami (obr. 21 vlevo). Pro vrty s ocelovou výstrojí je typická pestrá škála využívání různých zdrojů energie, zatímco pro pozorovací sondy jsou charakteristickým donorem elektronů pouze organické látky. Výjimku tvoří vzorek PK5 dno, pro který je typické využívání amoniaku, dusitanů a vodíku spíše nežli organických látek. Pro vzorek PK5 10 a PK2 10 je typický rovněž autotrofní zdroj elektronů, jedná se ale v tomto případě o redukované formy železa a síry. Je možné si všimnout, že vrt PK5 se svým charakterem blíží odstavenému jímacímu vrtu PES – pro mikrobiální komunity z kalu je zde typičtější využívání amoniaku, dusitanů či vodíku, zatímco pro vodu spíše oxidace železa a redukovaných forem síry.

Co se týče akceptorů elektronů (obr. 21 vpravo) je dobře vidět, že čerpaný vrt PEN 10 nejlépe charakterizuje redukce kyslíku. Vzorky z vrtu PES a vzorek PK4 10 leží mezi šípkami největšího nárůstu redukce kyslíku a fermentace. Komunity v nich jsou nejlépe připraveny čelit lokální anoxii, s tím že pro nečerpaný vrt PES je tato schopnost nejlépe vyvinutá v kalníku. Další zajímavostí je, že pro skupinu vzorků z kalníku PK5, PK4, PK3 je charakteristická anaerobní respirace (redukce železa, manganu, síranů a ostatních forem síry), zatímco ostatní vzorky z kalu (PK1 dno, PK2 dno) jsou, co se týče TAE, podobnější vzorkům z vody.

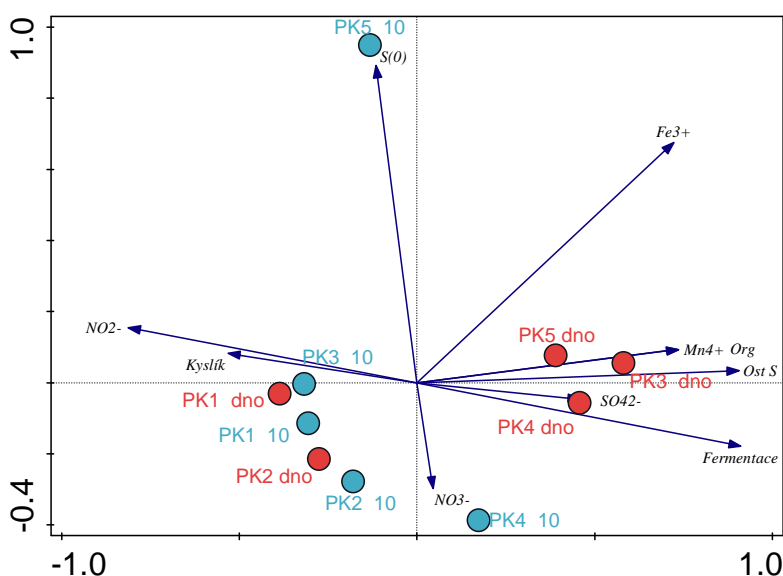


**Obr. 21** Diagramy nepřímé ordinační analýzy PCA vypočítané v programu Canoco na základě obsahu metabolických skupin ve vrtech na Pekařce. Vlevo – donory elektronů. Vpravo – akceptory elektronů. Kolečka představují vzorky z pozorovacích vrtů. Trojúhelníky představují vzorky z jímacích vrtů s ocelovou výstrojí. Vzorky odebrané z kalníku jsou označeny červenou barvou. Vzorky z vody modrou barvou. Šipky představují směr největšího nárůstu hodnot pro konkrétní donory elektronů, respektive akceptory elektronů.

Zobrazeny jsou jen vybrané akceptory elektronů. Diagram je sestrojen na základě metabolických skupin uvedených v příloze B určených na základě dat v příloze A.

Pro lepší znázornění vzájemné podobnosti vzorků PK5 dno, PK4 dno a PK3 dno od ostatních vzorků byl sestrojen diagram bez vzorků z jímacích vrtů (obr. 22). Skupina PK4 dno, PK5 dno a PK6 dno tvoří jeden klastr, kterému se blíží vzorek PK4 10, zatímco ostatní vzorky (kromě zcela odlišného vzorku PK5 10) tvoří další klastr (obr. 22). Odlišnost vzorku PK5 10 je dána výskytem OTU *Acidithiobacillus ferrooxidans*, který je příčinou nárůstu schopnosti komunity redukovat elementární síru. Je zapotřebí vzít v úvahu, že optimální pH podmínky této bakterie se pohybují okolo pH=2 (Valdés *et al.*, 2008) a je tedy spíše nepravděpodobné, že se tato bakterie v akviferu s neutrální vodou opravdu vyskytuje v množství, ve kterém byla detekována (4,9 % sekvencí ve vzorku). Z polohy vzorku PK5 10 tedy není možné vyvozovat spolehlivé závěry.

Pro ověření odlišnosti těchto dvou skupin vzorků (PK5 dno, PK3 dno, PK4 dno oproti zbylým vzorkům z pozorovacích sond bez vzorku PK5 10) byl proveden statistický test v programu Canoco. Použita byla přímá ordinační metoda, kdy obsahem vzorků byly metabolické skupiny využívající různé TAE. Ukazuje se, že rozdělení do těchto dvou skupin má opravdu poměrně silnou statistickou podporu ( $p = 0,009$ ). Na lokalitě Pekařka toto rozdělení vysvětluje významnou část variability ve využívání různých TAE a to podstatně lépe nežli rozdělení do skupin kal/voda.

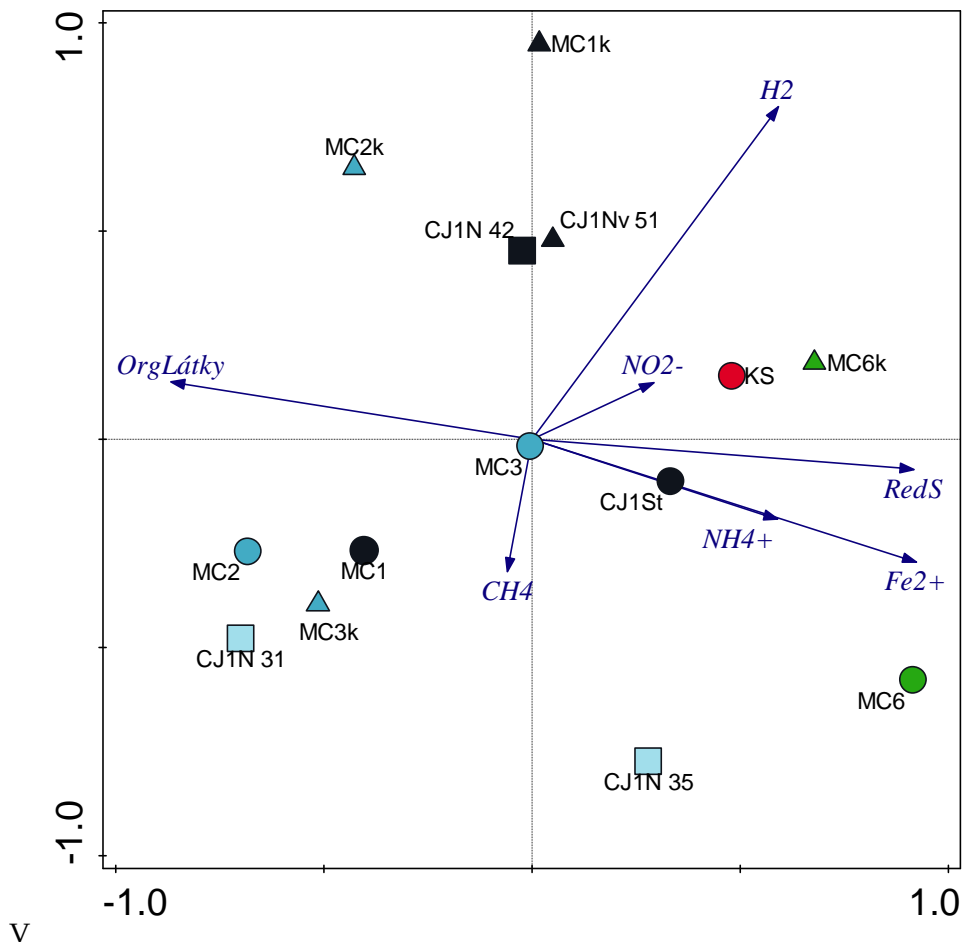


**Obr. 22 Ordinační diagram vypočítaný nepřímou ordinační metodou (PCA) v programu Canoco. Obsahem vzorků jsou různé metabolické skupiny mikroorganismů definované různými akceptory elektronů. Diagram je sestrojen na základě metabolických skupin v grafech v příloze B stanovených podle dat v příloze A. Kolečka=vzorky, šipky=akceptory elektronů. Zkratky: Org, organické látky, OstS – ostatní formy síry (thiosíran, siřičitan). Červená výplň=vzorky z kalu, modrá výplň= vzorky z vody. Variabilita vzorků je dána výpočtem na základě obsahu metabolických skupin z grafu v obr. 13B (různé akceptory elektronů) ve vzorcích. Směr každé šipky znamená směr největšího nárůstu hodnot pro daný typ akceptoru elektronů. Zobrazeny jsou pouze vybrané akceptory elektronů.**

### 3.4.2.2.2 Černuc

Diagram nepřímé ordinační analýzy ukazuje (obr. 23), že na Černuci můžeme odlišit několik skupin vzorků, pro které jsou typické různé zdroje elektronů. První skupinu tvoří vzorky MC2, MC1, MC3k, CJ1N 31. Pro mikrobiální komunity z těchto vzorků je typická oxidace organických látek včetně metanu. Další skupina se

skládá ze vzorků MC1k, CJ1N42, CJ1Nv51 a MC2k a charakterizuje ji nejlépe oxidace vodíku a v případě vzorku MC2k i oxidace organických látek. Poslední skupinou jsou vzorky MC6, MC6k, CJ1St a KS. Pro ně je typická oxidace železa redukovaných forem síry s tím, že pro vzorky MC6k a KS je částečně důležitá také oxidace vodíku. Stranou v ordinačním diagramu stojí vzorek CJ1N35, pro jehož komunitu je charakteristická oxidace železa a metanu.



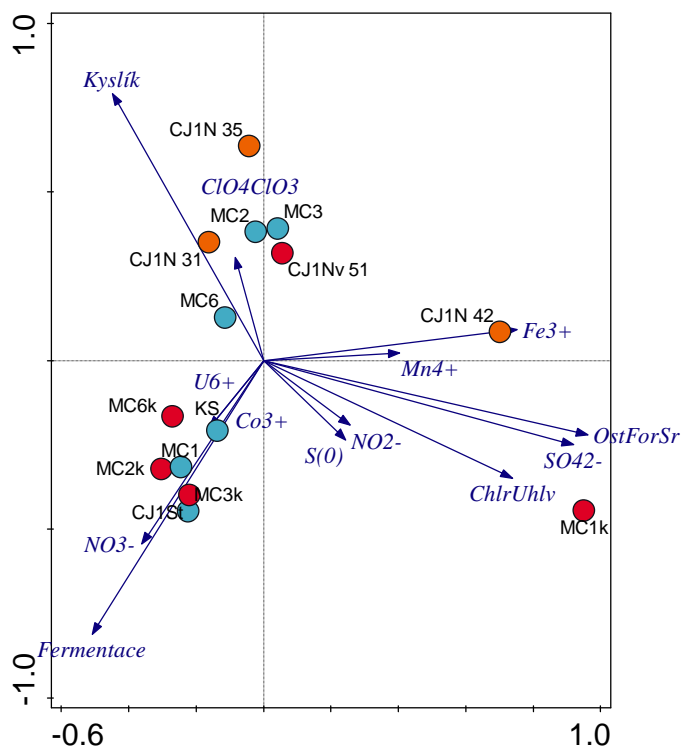
**Obr. 23 Diagram nepřímé ordinační analýzy PCA vypočítaný v programu Canoco.** Obsahem vzorků jsou metabolické skupiny mikroorganismů využívajících různé donory elektronů z grafu v příloze B vypočítané na základě dat z přílohy A. Značky představují jednotlivé vzorky: čtverec – odběr z vrtného prachu, trojúhelník – odběr z kalu, kolečko – odběr z vody. Barvy představují odlišná hydrogeologická prostředí: černá – vzorky z vrtů zasahujících do bazálního cenomanského kolektoru s přítomností uhlí nebo zbytků zuhelnatělých rostlin ve sladkovodním cenomanu s vodou ze vzdáleného transportu. Zelená barva – vzorky z vrtů s vodou ze vzdáleného transportu nezasahující do bazálního cenomanského kolektoru, tmavší modrá – vzorky z vrtů s vodou z blízkého transportu ovlivněné infiltrací z povrchu, světlejší modrá – vzorky odebrané nad hladinou podzemní vody. Červená barva – vzorek odebraný z vodovou z hydrogeologicky neznámého prostředí. Šipky znázorňují směr největšího nárůstu využívání daného zdroje energie. Zkratky zdrojů energie: Org.Látky – organické látky, RedS – redukované formy síry.

Stejná analýza byla provedena i s různými skupinami akceptorů elektronů (obr. 24). Vzorky z Černuci se na základě výskytu akceptorů elektronů rozmísťují pomocí nepřímé ordinační metody do 2 skupin. Pro první skupinu je typické využívání kyslíku případně chlorečnanů, či chloristanů jako terminálních akceptorů elektronů. Do této skupiny patří vzorky odebrané z vody (MC2, MC3, MC6) vrtného prachu z hloubek 31 a 35 m CJ1N31, CJ1N35 a vody z čerstvě vybudovaného vrtu CJ1Nv51.

Pro druhou skupinu je typická fermentace a anaerobní respirace ve formě redukce dusičnanů, případně

uranu či kobaltu. Spadají do ní všechny vzorky odebrané z kalu vrtů (MC6k, MC2k, MC3k) vyjma zcela odlišného vzorku z kalu vrtu MC1. Dále sem patří vzorek odebraný z vodovodu z geologicky nepopsaného prostředí (KS) a vzorky CJ1St a MC1.

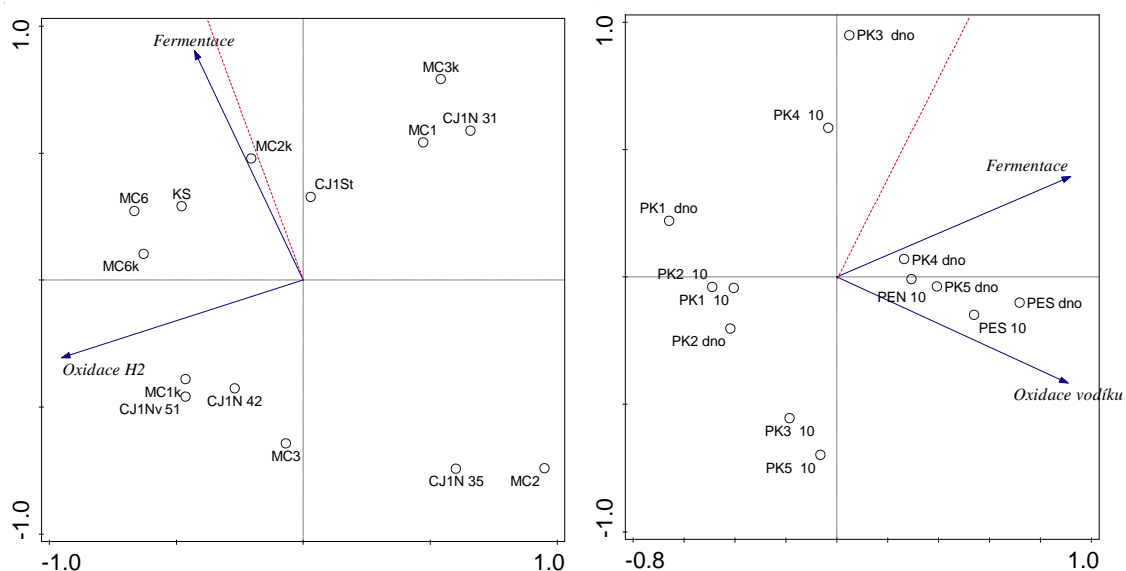
Stranou leží vzorek CJ1N42 a MC1k. Pro tyto dva vzorky je typická anaerobní respirace s širokým spektrem různých akceptorů elektronů od železa a manganu po síru, sírany a další redukovatelné formy síry, dusitany a chlorované uhlovodíky.



**Obr. 24 Diagram nepřímé ordinační analýzy PCA vypočítaný v programu Canoco.** Obsahem vzorků jsou metabolické skupiny mikroorganismů využívajících různé akceptory elektronů z grafu v příloze B vypočítané na základě dat z přílohy A. Kolečka představují jednotlivé vzorky. Oranžová – odběr z vrtného prachu, červená – odběr z kalu, modrá – odběr z vody. Šipky znamenají největší směr nárůstu hodnot skupin akceptorů elektronů: zkratky: ChlrUhlv – chlorované uhlovodíky, OstForS – ostatní formy síry (thiosíran, siřičitan).

### 3.4.3 Vztah hydrogenovorných mikroorganismů na fermentátorů

Srovnání závislosti mikrobiální oxidace vodíku na fermentaci bylo provedeno na vzorcích z Černuci a vzorcích z Pekařky nepřímou ordinační metodou v programu Canoco tak, že obsahem jednotlivých vzorků byly absolutní počty sekvencí fermentátorů a oxidátorů vodíku z metabolické analýzy nejhojnějších OTU. V ordinačním diagramu byly zobrazeny šipky odpovídající největšímu nárůstu hodnot těchto dvou skupin (obr. 25). Na Černuci jsou oxidace vodíku na fermentace na sobě prakticky nezávislé – pro většinu vzorků je typický pouze jeden typ metabolismu. Na Pekařce jsou spolu výskyty schopnosti fermentovat a oxidovat vodík více pozitivně spojeny – pro většinu vzorků jsou typické oba dva metabolismy (PK4 dno, PK5 dno, PEN 10, PES dno, PES10) nebo naopak žádný (obr. 25).



**Obr. 25** Ordinační diagramy vypočítané nepřímou ordinační metodou (PCA) v programu Canoco. Vlevo – Černuc, vpravo – Pekařka. Kolečka představují jednotlivé vzorky, šipky metabolické skupiny. Červená přerušovaná čára představuje kolmici na šipku oxidace vodíku. V případě, že spolu metabolismy korelují pozitivně, svírají šipky ostrý úhel. Úhel 90° znamená nulovou korelaci (nezávislost výskytu metabolismů), tupý úhel pak negativní korelaci.

### 3.5 Výsledky analýzy fylogenetické disimilarity

Pro analýzu fylogenetické disimilarity byly pro příslušné sety vzorků (Černuc, Pekařka, všechny vrty dohromady) použity totožné soubory sekvencí jako při ordinačních metodách, aby bylo možné výsledky porovnat. Počty sekvencí a OTU zařazených do analýzy jsou zobrazeny v tab. 9.

#### 3.5.1 Analýza vzorků ze všech 3 lokalit dohromady

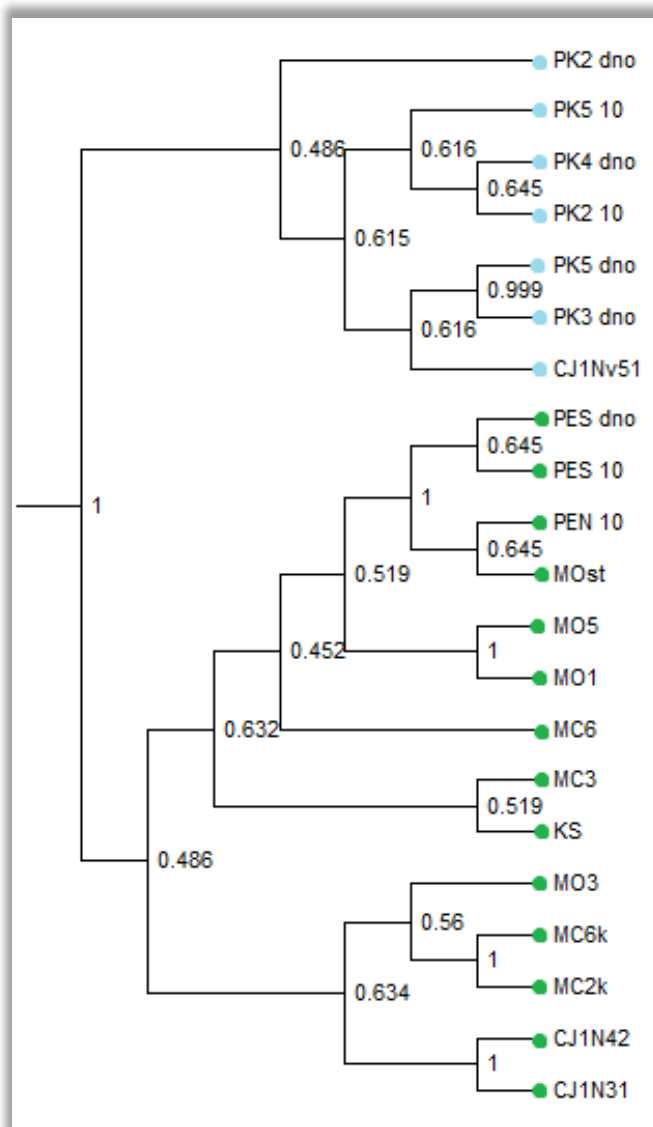
Při analýze fylogenetické disimilarity mikrobiálních komunit ze všech tří lokalit byl hledán parametr, podle kterého se od sebe vzorky nejlépe liší. Signifikance rozdělení vzorků podle vybraných parametrů byla testována metodou AMOVA. Prvním parametrem byl fyzický charakter vzorku. Do analýzy byly zařazen pouze vzorky odebrané standardně čerpadlem z kalu (MC2k, MC6k, MO1, MO3, MO5, PK2 dno, PK3 dno, PK4 dno, PK5 dno, PES dno) nebo z vody (MC3, MC6, PEN 10, PES 10, PK2 10, PK5 10). Pro tyto vrty byla použita matice distancí vypočítaná z celkového souboru vzorků pro vrty ze všech lokalit uvedených v tab. 9. U vyřazených nestandardně odebraných vzorků (z vývěru, suti, vodovodu atd.) byly z tabulky odstraněny hodnoty pro tyto vzorky a matice zbylých vzorků byla použita pro porovnání rozdílů kal/voda. Při 10 000 randomizacích je hodnota  $p$  pro toto rozdělení  $p = 0,1823$ . Rozdíl mezi kalem a vodou lze tedy považovat za nesignifikantní.

Dále bylo zkoumáno, zdali existuje významný rozdíl mezi lokalitami – v tomto případě na celém souboru vzorků pro všechny vrty z tab. 9 a stejně, jako tomu bylo při ordinační analýze. Rozdělení do skupin podle lokality má hraničně signifikantní statistickou podporu –  $p = 0,012$  při 10 000 randomizacích pro odlišnost mezi všemi třemi lokalitami navzájem. Pro rozdíl mezi Pekařkou a Černucí byla získána podobná míra statistické podpory –  $p = 0,0125$ , zatímco odlišnost mezi dvojicí Vlastislav a jakoukoli jinou lokalitou má o řád vyšší hodnoty  $p$ . Odlišnost mezi lokalitami rovněž není příliš dobrým faktorem vysvětlujícím

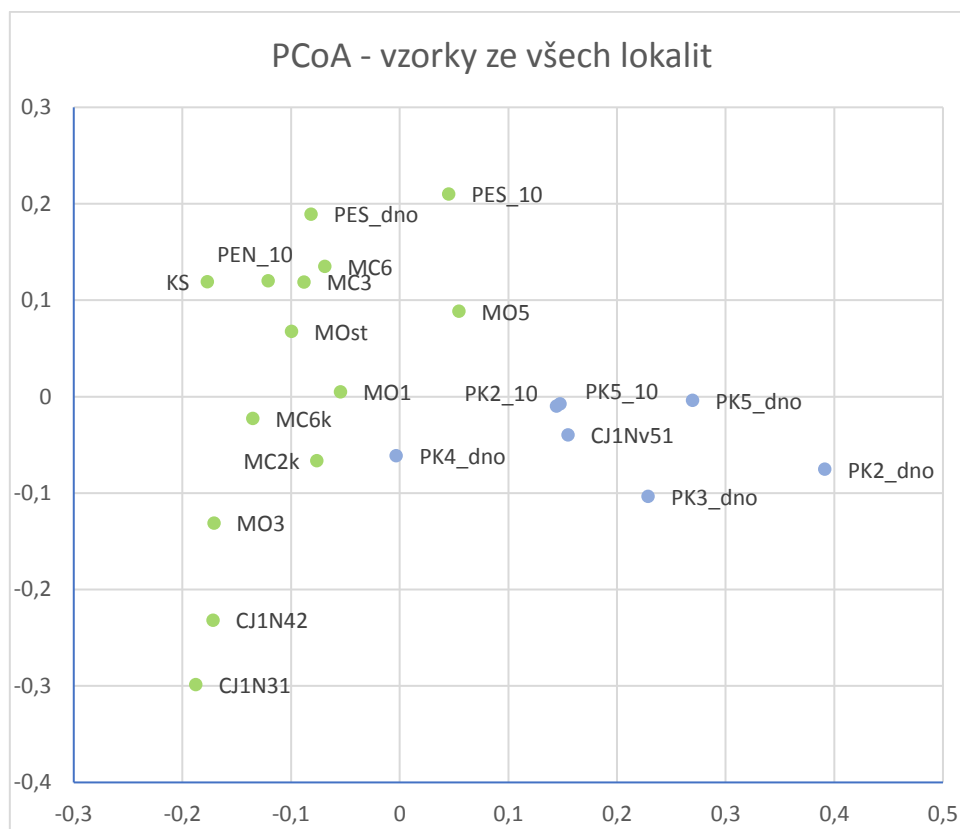
fylogenetickou disimilaritu mezi vzorky mikrobiálních komunit.

Další možné faktory způsobující odlišnost mezi vzorky byly odhadovány na základě stromu zobrazujícího fylogenetickou vzdálenost mezi vzorky vypočítanou ve vážené formě příkazu UniFrac (obr. 26) a diagramu PCoA analýzy zobrazující vzorky na dvou osách vysvětlujících největší fylogenetickou diverzitu (obr. 27).

Na základě těchto dvou diagramů bylo následně testováno, jak významně se liší skupiny vzorků odpovídající nejvyšší úrovni větvení stromu, které má dobrou statistickou podporu. Příslušné skupiny vzorků jsou barevně odlišeny v obr. 26 a 27. Do první skupiny patří všechny vzorky z pozorovacích vrtů na Pekařce a vzorek CJ1Nv51 z Černuci. Druhou skupinu představují odběry z jímacích vrtů na Pekařce, vzorky z Vlastislavi a zbylé vzorky z Černuci. Statistická podpora v analýze AMOVA je pro toto rozdělení  $p = 0,0001$  při 10000 randomizacích. Rozdíl mezi těmito dvěma skupinami mikrobiálních komunit je vysoce signifikantní.



**Obr. 26** Strom vypočítaný váženou formou příkazu UniFrac v programu Mothur. Strom zobrazuje fylogenetickou vzdálenost vzorků mikrobiálních komunit ze všech lokalit dohromady. Hodnoty na uzlech jsou vypočítány při jackknife na 80 % sekvencí a 1000 opakováních. Každý vzorek má 2505 sekvencí (viz tab. 9)



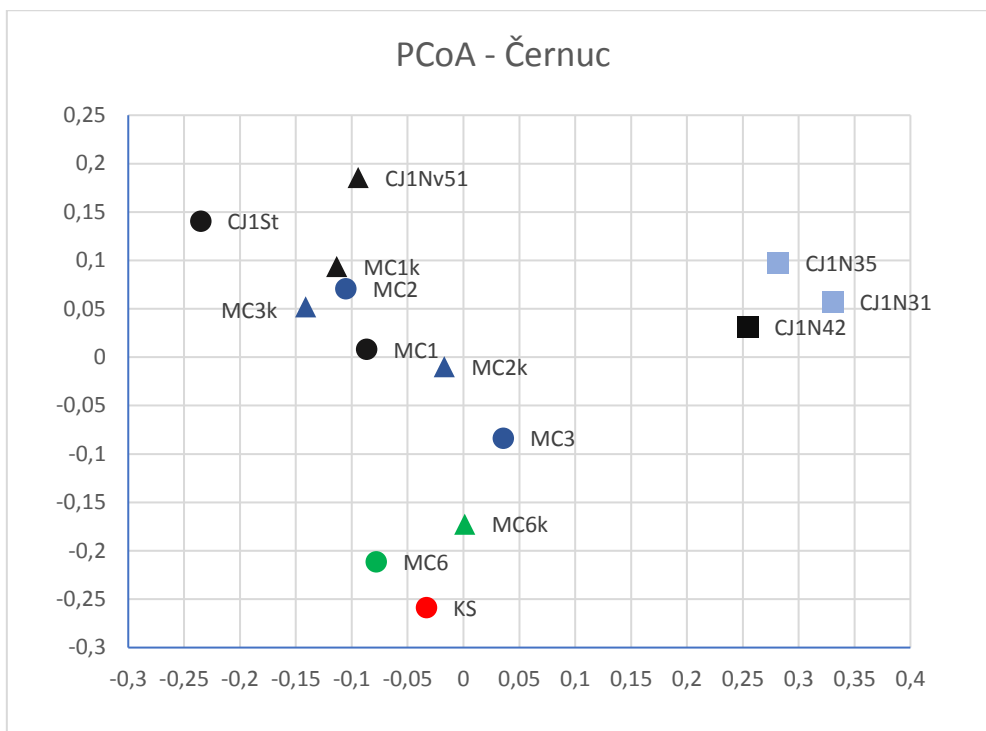
**Obr. 27** PCoA diagram se dvěma osami vysvětlujícími největší rozdíly mezi vzorky mikrobiálních komunit. První osa  $x$  vysvětluje 27,3 % druhá osa  $y$  17,01 % celkové variability mezi vzorky. Hodnoty poloh vzorků na osách jsou vypočítané na základě matice distancí z vážené formy příkazu UniFrac v programu Mothur, na základě které je také vytvořen strom v obr. 26. Hodnoty na osách nemají jiný význam než popis vzájemné relativní pozice vzorků na ploše pole vzájemné fylogenetické disimilarity.

### 3.5.2 Analýza vzorků z Černuci

Na souboru vzorků z Černuci bylo rovněž testováno, do jaké míry se liší různé typy odběrů čerpadlem (kal, voda). Pro tento účel byly odstraněny nestandardně odebrané vzorky z matice distancí podobně jako je popsáno v předchozí kapitole. Vyřazen byl vzorek KS odebraný z vodovodu a vzorek CJ1Nv51 odebraný z vody ze dna čerstvě vystrojeného vrtu a vzorky odebrané z vrtného prachu (CJ1N31, CJ1N35, CJ1N42). Rovněž byl vyřazen vzorek CJ1St, protože u něj chybí kalový ekvivalent (byl vysoce kontaminován). Tím bylo dosaženo stejných podmínek jako při testování této rozdílnosti ordinační metodou (viz kapitola 3.4.1.2). Testem AMOVA bylo zjištěno, že mezi vzorky odebranými z kalu a z vody neexistuje signifikantní rozdíl ( $p = 0,6417$  při 10000 randomizacích).

Dále bylo testováno, zdali se liší vzorky pevné (z vrtného prachu) od všech ostatních (čerpání kalu, a vody, odběr z vodovodu). Tento úkon byl proveden na celém souboru vzorků z Černuci (viz tab. 9). Testem AMOVA bylo zjištěno, že rozdíl mezi pevnými a kapalnými vzorky je poměrně signifikantní ( $p = 0,0033$  při 10000 randomizacích). Odlišnost kapalných vzorků od pevných je dobře viditelná i v PCoA diagramu (obr. 28). Vzorky z kalu a vody tvoří v diagramu jeden oblak, kde se mikrobiální komunity liší využíváním různých donorů elektronů (srovnej s obr. 23). Barevně odlišené skupiny vzorků reprezentují různé typy podzemních vod v Černuci.



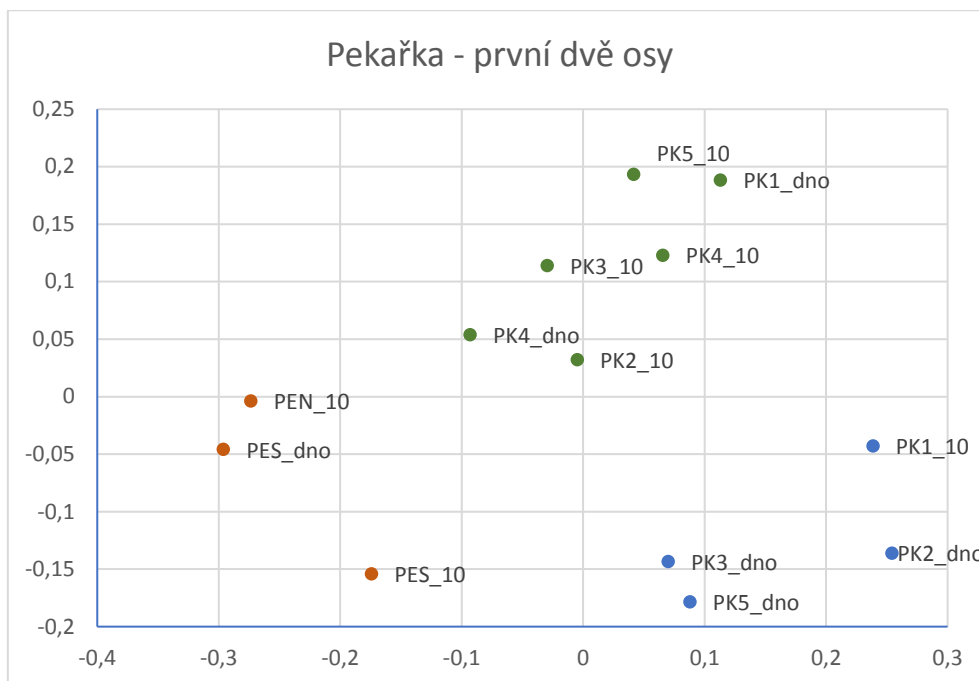


**Obr. 28 PCoA diagram se dvěma osami vysvětlujícími největší rozdíly mezi vzorky mikrobiálních komunit.** První osa x vysvětluje 28,47 % druhá osa y 17,56 % celkové variability mezi vzorky. Hodnoty poloh vzorků na osách jsou vypočítané na základě matice distancí z vážené formy příkazu UniFrac v programu Mothur. Značky jsou pro lepší srovnatelnost uvedeny stejné jako v obr. 23: kolečka – odběr z vody, trojúhelníky – odběr z kalu, čtverce – odběr z vrtného prachu. Barvy představují odlišná hydrogeologická prostředí: černá – vzorky z vrtů zasahujících do bazálního cenomanského kolektoru s přítomností uhlí nebo zbytků zuhelnatělých rostlin ve sladkovodním cenomanu s vodou ze vzdáleného transportu. Zelená barva – vzorky z vrtů s vodou ze vzdáleného transportu nezasahující do bazálního cenomanského kolektoru, tmavší modrá – vzorky z vrtů s vodou z blízkého transportu ovlivněné infiltrací z povrchu, světlejší modrá – vzorky odebrané nad hladinou podzemní vody. Červená barva – vzorek odebraný z vodovou z hydrogeologicky neznámého prostředí.

### 3.5.3 Analýza vzorků z Pekařky

Na Pekaře byl testován vliv typu odběru (kal, voda) na složení mikrobiálních komunit ve vzorcích z pozorovacích sond. Soubor vzorků byl tedy stejný jako při hodnocení rozdílů mezi kalem a vodou ordinačními metodami. Výsledky testu AMOVA ukazují, že významný rozdíl mezi mikrobiálními komunitami z kalu a vody neexistuje ( $p = 0,5961$  při 10000 iteracích).

Pro vrty na Pekaře je důležitý jiný faktor způsobující fylogenetickou odlišnost mikrobiálních komunit. Z diagramu na obr. 29 je vidět, že přítomnost ocelové pažnice ve vrtech zanechává fylogenetický signál a separuje vzorky PEN 10, PES 10 a PES dno od ostatních. Podle testu AMOVA je významnost tohoto rozdělení poměrně velká –  $p = 0,0033$ . Pokud rozdělíme vzorky do vizuálně distinktních tří skupin, které jsou patrné z obr. 29 a testujeme jejich fylogenetickou podobnost, je výsledek ještě více signifikantní –  $p < 0,0001$  při 10000 randomizacích.



**Obr. 29** PCoA diagram se dvěma osami vysvětlujícími největší rozdíly mezi vzorky mikrobiálních komunit. První osa x vysvětluje 35,66 % druhá osa y 20,4 % celkové variability mezi vzorky. Hodnoty poloh vzorků na osách jsou vypočítané na základě matice distancí z vážené formy příkazu UniFrac v programu Mothur. Kolečka představují jednotlivé vzorky. Hnědou barvou jsou označeny vzorky z jímacích vrtů s ocelovou pažnicí, modře a zeleně pak vzorky z pozorovacích sond s pažnicí z polyethylenu. Odlišnost modré a zelené skupiny je podle AMOVA testu významná, proto je v diagramu barevně vyznačena.

## 4 Diskuze

Od mikrobiální analýzy očekáváme bioindikační potenciál. Aby mohl být využit, je potřeba vyřešit některé základní otázky, které mohou značně ovlivnit interpretaci dat.

### 4.1 Liší se odběry z kalu a z vody?

Otázkou je, zdali se od sebe významně liší vzorky odebrané z kalu a vzorky odebrané z vodního sloupce ve vrtu. Pokud by na způsobu odběru záleželo, bylo by zajímavé zjistit, který typ vzorku charakterizuje lépe procesy probíhající v podzemní vodě. Při hledání odpovědi na tuto otázku byly k dispozici dvě lokality – Pekařka a Černuc. Testování odlišnosti mikrobiálních komunit z kalu a z vody bylo provedeno jako pomocí ordinačních metod v programu Canoco (Lepš and Šmilauer, 2000), tak srovnáním fylogenetické podobnosti vzorků metodou UniFrac (Lozupone and Knight, 2005).

#### 4.1.1 Pekařka

Na lokalitě Pekařka mají pozorovací vrty stejné technické parametry (stáří, hloubka vrtu, okolní hornina a chemické složení vody, materiál výztuže, absence čerpadla). Jediným pozorovaným rozdílem je jejich vzájemná poloha, odlišné postavení ke směru proudění podzemní vody a vzdálenost od čerpaného vrtu PEN. Rozdíly ve vzdálenosti se pohybují v prvních metrech, takže lze předpokládat, že jejich vliv bude malý. Ve vzorcích na Pekařce je tedy eliminována možnost působení ostatních vlivů, které by mohly rušit rozdíl mezi kalem a vodou na minimum.

Výsledky přímých ordinačních analýz (obr. 19.2) ani výsledky analýzy fylogenetické disimilarity (kapitola

3.5.3) neodhalily významný rozdíl mezi mikrobiálními komunitami z kalu a vody. Na Pekařce neexistuje z hlediska mikrobiální komunity dobře odlišitelný rozdíl mezi kalem a vodou žádnou jinou metodou nežli analýzou nejhojnějších mikroorganismů. Optikou této metody je vždy v kalu konkrétního vrtu o něco výraznější podíl schopností využívat anaerobní respiraci či fermentaci než ve vodě toho samého vrtu. Fylogenetické metody jako UniFrac neumí odlišit rozdíl mezi kalem a vodou patrně právě pro to, že jediný společný jmenovatel pro odlišnost kalu a vody na Pekařce je míra schopnosti anaerobní respirace a fermentace. Tyto schopnosti nejsou tak silně svázány se sekvencí 16S rDNA jako schopnost autotrofie nebo heterotrofie, jejichž výskyt je na typu odběru kal/voda zcela nezávislý (viz odpovídající grafy na Pekařce ale i na Černuci v příloze B). Rozdělení komunity podle fylogenetického signálu má větší podobnost s rozdělením podle využívaných donorů elektronů (především organických látek oproti železu, redukovaným formám síry, amoniaku). To je dobře patrné při srovnání ordinačního diagramu donorů elektronů (obr. 23) s diagramem PCoA na Černuci (obr. 28). Oproti tomu rozložení vzorků v ordinačním diagramu popisujícím variabilitu ve schopnostech využívat různé akceptory elektronů (obr. 24) nijak nekoresponduje s diagramem PCoA.

Na Pekařce tedy z hlediska mikrobiálních komunit příliš nezáleží na tom, zdali je vzorek odebrán z kalu nebo z vody. Sondy na Pekařce jsou nedávno vybudované a nestihl se v nich vytvořit sediment s redoxními zónami typický pro starší vrty (jako např. PES). Proces tvorby sedimentu v kalníku vrtu je také tím pomalejší, čím je voda oligotrofnější. Oligotrofie s sebou nese menší mikrobiální oživení, takže není tolik pravděpodobný vznik lokální anoxie v kalu a růst anaerobních mikroorganismů využívající různé TAE.

#### 4.1.2 Černuc

Stejně jako na Pekařce ani na Černuci neodhalily výsledky přímých ordinačních analýz ani výsledky analýzy fylogenetické disimilarity významný rozdíl mezi mikrobiálními komunitami z kalu a vody. Odlišnosti mezi kalem a vodou můžeme nicméně dobře vidět, srovnáváme-li nepřímou ordinační analýzou metabolické skupiny. To je patrné z výsledků v obr. 23 a obr. 24. Pro vzorky z vody je typičtější respirace kyslíku než pro vzorky z kalu, které charakterizuje lépe fermentace (obr. 24), což dobře odpovídá i výsledkům metabolického rozboru nejhojnějších OTU. Pokud odebíráme vzorky z kalu vrtu, je dobré si uvědomit, že budou pravděpodobně více obohacené o anaerobní mikroorganismy oproti vodě. V Černuci byly pro všechny vzorky z kalů charakteristické TAE pro anaerobní respiraci nebo fermentace. Pro kaly je také typičtější oxidace vodíku, než pro vodní vzorky (obr. 23) kromě vrtu MC3. Kal vrtu MC3 charakterizuje oxidace metanu a organických látek, což dobře dokresluje povrchový charakter vody v tomto vrtu.

Kaly se zde jeví jako výhodnější typ odběru pro procesy probíhající ve vrtu a jeho těsném okolí. Lépe než voda vystihují rozdíly mezi jednotlivými prostředími ve využívání zdrojů elektronů. Existují mezi nimi v tomto ohledu větší rozdíly, protože se jejich vzorky spíše vyskytují dále od středu os (obr. 23).

Voda se jeví z tohoto hlediska jako více neutrální. Pravděpodobně představuje vzorek mikroorganismů z mnoha různých míst v akviferu s více vyrovnanými poměry metabolických schopností a často reprezentující protichůdná prostředí (například eutrofní i oligotrofní). Dobře je to vidět na extrémním případě vrtu MC3 který je silně ovlivněn splachem z povrchu. Jsou v něm zachycena nekompletně různá

prostředí (např. eutrofie bez anaerobů nebo heterotrofie bez zdroje uhlíku). Toto zkreslení transportem je typičtější pro vodní vzorky nežli pro kaly (obr. 23). Zkreslení může být ale také způsobeno neúplným vzorkováním, pokud existuje šance, že chybějící metabolická skupina byla fyzicky jinde (např. hlouběji, než se čerpalo, v zaplášťovém prostoru) a pak může postihovat i vzorky odebrané z kalu.

#### **4.2 Existují rozdíly mezi vzorky v rámci jednoduché zvodně na Pekařce?**

Z diagramů nepřímých ordinačních metod při srovnávání vzorků podle obsahu skupin využívajících různé akceptory elektronů vyplývá, že pro kaly vrtů PK3, PK4, PK5 je typická fermentace a anaerobní respirace ve formě redukce síranů, železa a dalších látek. V kalech zbylých dvou sond PK1 a PK2 tomu tak ale není a podle analýzy nejhojnějších mikroorganismů zcela jednoznačně dominují mikroorganismy respirující kyslík a dusičnany.

Na Pekařce se v kalech v linii sond PK3, PK4, PK5 rovnoběžné s proudem vody hromadí spíše schopnosti typické pro anoxická prostředí nežli v linii PK1 a PK2 kolmé na proudění podzemní vody. Může to být dáno tím, že vrt PK5 má jednoznačně nejvyšší podíl autotrofních mikroorganismů ze všech sond. Podle analýzy nejhojnějších mikroorganismů zde probíhá oxidace amoniaku. Zajímavé je, že obsahy amonných iontů jsou zde podle chemických analýz opravdu o řád vyšší než ve všech ostatních vrtech na Pekařce (včetně těch jímacích). Je možné, že v okolí vrtu PK5 zvýšená primární produktivita komunity ovlivňuje produkci biomasy sondy PK3 a PK4 ležící po směru proudu. Zvýšená míra tlení této organické hmoty by pak mohla způsobovat detekovanou schopnost anaerobní respirace a fermentace v kalech vrtů PK5, PK4, PK3. Tuto hypotézu (odlišnost sond PK3, PK4, PK5) ovšem nijak významně nepodporuje analýza fylogenetické disimilarity, kde se pouze vzorky PK5 dno a PK3 dno (viz. obr. 26 a 29) sobě významně podobají a vzorek PK4 dno leží v diagramu PCoA (obr. 29) zcela stranou. Vzorky PK3 dno a PK5 dno jeví podobnosti dokonce i na základě nepřímé ordinační analýzy OTU (obr. 20B), kde překonávají vliv rozdílnosti počtu unikátních OTU mezi vzorky.

V oxických a oligotrofních vodách by mohla analýza schopností nejhojnějších mikroorganismů mikrobiální komunity být užitečná pro detekci výše popsaného počínajícího zvýšeného mikrobiálního růstu a hromadění biomasy. Bylo by tak možné například predikovat zvýšenou citlivost dané oblasti akviferu ke kolmataci.

Na Pekařce je v oligotrofní vodě celkově malé mikrobiální oživení. Vidíme tedy i velmi slabé nebo dokonce náhodné jevy. Bylo by proto bylo nutné provést odběry znovu a otestovat, zdali nebyla zachycena pouze náhodná fluktuace, která je pro celkový stav akviferu nevýznamná. To je totiž pravděpodobnější vysvětlení. Ve vrtu je sice amonných iontů o řád více než v ostatních vrtech, stále je ale jejich koncentrace velmi malá a z grafů popisujících relativní obsahy jednotlivých metabolických skupin (příloha B, graf Pekařka – donory elektronů) není možné vyvodit absolutní obsah amoniak oxidujících mikroorganismů a jejich aktivitu. Pokud by se potvrdilo, že vrty PK3, PK4 a PK5 opět obsahují vyšší počet anaerobních mikroorganismů nežli sondy PK1 a PK2 a pokud by pro komunitu vrtu PK5 byla opět typická oxidace amoniaku, bylo by možné jevu začít přikládat význam a zkoumat ho dál.

### 4.3 Používat ordinační metody pro mikrobiální komunity?

Pokud zkoumáme rozdíly mezi vzorky pomocí nepřímých ordinačních metod na základě obsahu OTU, čelíme problému vysokého počtu unikátních OTU ve vzorcích. Velké množství OTU obsažených pouze v jednom vzorku spolu s velkými rozdíly v celkovém počtu OTU ve vzorcích jsou značným problémem při interpretaci dat získaných z mikrobiálních komunit. To bylo demonstrováno na příkladu vzorků z Černuci za použití nepřímé ordinační metody. Podobný výsledek byl získán i ze setu všech vzorků. Nepřímá ordinační metoda se jeví jako nevhodný způsob pro hledání příčin variability OTU ve vzorcích z mikrobiálních komunit podzemní vody (ale i mikrobiálních komunit obecně). Jejím účelem má být zobrazení největšího nárůstu variability ve zkoumaném setu vzorků. V případě mikrobiálních komunit je však skutečná variabilita zkrácena přítomností velkého množství unikátních OTU, které ordinační metoda neumí zhodnotit, neboť je založena na srovnání společných OTU. Unikátní OTU ve vzorku způsobují to, že je v mnohorozměrném prostoru umístěn co nejdále od ostatních. V setu vzorků, kde existují velké rozdíly v počtu unikátních OTU mezi vzorky (viz tab. 9) bude tedy vznikat nepřesný obraz variability, kde vzorky s malým počtem unikátních OTU budou umístěny do centra oblaku a budou se jevit jako sobě podobnější. Vzorky s vysokým počtem OTU budou naopak na okraji oblaku. Toto zkrácení komplikuje detekci přirozených vlivů způsobujících rozdíly v obsahu OTU mezi vzorky.

Je sice vysoce pravděpodobné, že vzorek MC3 se skutečně bude lišit od ostatních, protože pochází z mělkého akviferu s velkým množstvím infiltrované vody z povrchu, kde hlavním zdrojem energie pro mikroorganismy jsou organické látky. Zrovna tak by ale bylo možné očekávat, že vzorek MC1k se bude významně lišit opačným směrem, neboť pochází z vody nízkým Eh., kde významným zdrojem energie mikrobiálních komunit budou látky pocházející z cenomanských sedimentů a kde je významná anaerobní respirace. Z ordinační analýzy to ovšem není patrné, pravděpodobně proto, že vzorek MC1k má nízký počet unikátních OTU (obr. 20A).

Podobně je složité na Pekařce (obr. 20 B) odlišit to, do jaké míry se jímací vrty s ocelovou pažnicí liší kvůli tomu, že mají výztuž z materiálu, který může sloužit jako zdroj energie. Jímací vrty mají totiž zároveň největší počet unikátních OTU (tab. 9), což jistě značně přispívá k jejich separaci od ostatních vzorků.

#### 4.3.1 Využití nepřímých ordinačních metod

Nepřímé ordinační metody nejsou pro analyzování mikrobiálních komunit vhodné, pokud vzorky hodnotíme na základě obsahu OTU. Zdají se být ale poměrně dobrým nástrojem pro zobrazování a testování rozdílnosti v obsahu metabolických skupin nejhojnějších mikroorganismů. Různé metabolické skupiny jsou totiž na rozdíl od OTU zpravidla přítomny alespoň v malé míře ve všech prostředích. Diagram nepřímé ordinační analýzy metabolických skupin je užitečný v tom, že umožňuje zobrazení nárůstu různých typů metabolismu v jednotlivých vrtech, přestože ve většině vzorků převládá jeden typ metabolismu. Například v mělkých podzemních oligotrofních vodách většinou převládá aerobní respirace organických látek. Pokud se podíváme pouze na metabolický rozbor nejhojnějších OTU nemusí z něj na první pohled být tendence nárůstu určitých metabolických schopností patrná. Dobře to lze ilustrovat na Černuci. Složitě hydrogeologické podmínky tam dobře charakterizuje diagram nepřímé ordinační analýzy vypočítaný na základě obsahu metabolických

skupin využívajících různé zdroje energie (obr. 23).

Z grafu (obr. 23) plyne několik zákonitostí:

- 1) Pro vrty, které jsou ovlivněné mladou infiltrovanou vodou (MC2, MC3) je typickým zdrojem energie oxidace organických látek v kombinaci s metanem (v kalu vrtu MC3 a ve vodě z vrtu MC2). Zajímavá je pozice vzorku MC3. Vypadá to, že voda z vrtu MC3 nese nejméně informací o procesech, protože pro ni není typický žádný zdroj energie. To vzhledem ke geologickému kontextu dává smysl vrt MC3 postrádá jako jediný z vrtů izolátor v podobě turonských prachovců a jílovců, takže navzorkovaný soubor mikroorganismů může být ovlivněn mikroorganismy spláchlými z velkého počtu různých habitatů – ať už z půdy, nebo z hornin ležících po cestě vsaku. S tím dobře koresponduje i to, že ve vrtu MC3 byly detekovány OTU typické jako pro eutrofní, tak pro oligotrofní prostředí.
- 2) Pro vzorky odebrané z hlubších částí vrtů zasahujících do bazálního kolektoru (MC1k, CJ1N42, CJ1Nv51) s obsahem uhlí nebo zuhelnatělých zbytků rostlin je typickým zdrojem energie vodík. U vzorku ze dna vrtu MC1k je tento trend nejtypičtější, což dobře odpovídá petrografickému profilu vrtu - vrt MC1 jako jediný naráží slojku černého uhlí. Mikrobiální komunita z kalu zde tedy charakterizuje převážně podmínky ovlivněné výskytem černého uhlí. Pro vodu odebranou vrtu MC1 jsou typické jiné zdroje energie než pro kal: organické látky a metan. Vzhledem k tomu, že ve vrtu MC1 dochází k míšení vod svrchního a spodního cenomanského kolektoru v důsledku blízko ležícího zlomu, lze očekávat, že voda a mikrobiální komunita v ní zachycená bude ovlivněna vodami povrchového charakteru, kterým by měly odpovídat vrty MC2, MC3. Podobnost vzorku MC1, MC3k a MC2 je z grafu dobře patrná.
- 3) Vzorky v pravé části grafu (CJ1St, MC6k, MC6) reprezentují vody vzdáleného transportu, kde byl měl být vliv povrchových vod ze všech vrtů nejmenší. Není tedy překvapivé, že pro mikrobiální komunity v těchto vzorcích je typický autotrofní metabolismus založený na oxidaci železa a síry, tedy prvků přítomných v cenomanských prachovcích, které obsahují pyrit.
- 4) Vodík je typičtějším zdrojem energie pro vzorky z kalu nežli pro vzorky z vody. To neplatí pouze pro hydrogeologicky zcela odlišný vrt MC3, v jehož povrchových vodách nelze očekávat rozpuštěný vodík a kde je spíše využíván metan jako možný produkt rozkladu organické hmoty hromadící se na dně vrtu kvůli slabé propustnosti hornin v kálníku (jílovec a kaolinické zvětraliny).
- 5) Vzorky z kalu jsou více vzdálené od středu os nežli vzorky z vody. Neplatí to pouze u vrtu MC6, kde je metabolické složení kalu i vody velmi podobné (obr. 16A).

Je tedy možné, že odběr kalu je schopný postihnout lépe variabilitu podzemních vod nežli vzorek odebraný z vody. Vodní vzorek spíše obsahuje směs mikrobů z různých habitatů z prostředí akviferu, takže jsou si vzorky vody ve výsledku metabolicky více podobné a podpis procesů probíhajících v podzemní vodě z nich lze hůře vyčíst.

Z ordinačního diagramu zobrazujícího schopnosti využívat různé TAE (obr. 24) jsou patrné 2 skupiny vzorků. Do první skupiny patří většina vzorků odebraných z vody a vzorky z vrtného prachu odebrané v malých hloubkách nad hladinou podzemní vody. Pro mikrobiální komunity je zde typická respirace kyslíku. Výjimku tvoří v této skupině přítomný vzorek CJ1Nv51, který byl sice odebrán ze dna vrtu a je počítán jako vzorek kalu, nicméně byl odebrán do 2 dnů po vyvrtání vrtu, takže je vyloučené, že se v něm stihla vytvořit

mikrobiální komunita s redoxními zónami typická pro kaly z ostatních, podstatně starších vrtů.

Druhou skupinu lze charakterizovat jako skupinu vzorků z kalu. Kromě vzorků z kalu je tvořena vzorkem z vodovodu KS, a vodou z vrtu MC1 a CJ1St. Vrty MC1 a CJ1St zasahují do bazálního cenomanského kolektoru s nižším obsahem kyslíku. Z toho důvodu je i pro vzorky z vody (a nejen kalu, kde vznikají redoxní zóny) v těchto vrtech typická fermentace, neboť mikroorganismy zde musí čelit celkovým nižším koncentracím kyslíku. U vzorku KS, je možné polohu v diagramu vysvětlit tak, že se čerpadlo, jež přivádí vodu do potrubí nachází blízko kalníku a vysává tak určitou část komunity přizpůsobenou lokální anoxii rostoucí v něm.

Stranou hlavních dvou skupin je vzorek CJ1N 42 a MC1k: Vzorek CJ1N42 je odebraný z vrtného prachu v oblasti hladiny podzemní vody. Je pro něj nejtypičtější redukce železa nebo manganu, také pak redukce síranů a dalších forem síry. Mikrobiální komunita řeší nedostatek kyslíku v tomto vzorku zcela jiným způsobem než ve vrtu CJ1St, který leží blízko a má podobný petrografický profil. Od vzorku CJ1St se CJ1N 42 podstatně liší tím, že je pevný. Jsou v něm tedy mikroorganismy z biofilmu na minerálních zrnech. Mikrobiální komunita má díky tomu pravděpodobně úplně jinou strategii zbavování se elektronů v případě nedostatku kyslíku. Je přizpůsobená redukcí železa na minerálních zrnech v okolí hladiny podzemní vody.

Pro kal z vrtu MC1 je nejvíce typická oxidace chlorovaných uhlovodíků, síranů a dalších forem síry. Chemismus vod z bazálního kolektoru je natolik jiný, že umožňuje využívat mikrobiální komunitě i tyto jiné možnosti řešení nedostatku kyslíku, než je fermentace a redukce dusičnanů jako tomu je v kaley ostatních vrtů. Vzorek kalu MC1 proto leží v diagramu (obr. 24) zcela stranou. Je užitečné si v tomto ohledu také uvědomit, že vzorek MC1k je v analýze jediným vzorkem kalu pocházejícím z vody bazálního cenomanského kolektoru. To dobře ukazuje to, jak přínosné, je odebírat kaly z vrtů a neomezovat se na vodní vzorky, u kterých se projevuje tendence zakrývat extremitu podmínek panujících ve vrtu, jak bylo diskutováno výše.

Výhoda využívání nepřímých ordinačních metod při zobrazování různých metabolických skupin má své limity. Odfiltruje efektivně šum způsobený tím, že stejné metabolické vlastnosti má tisíce různých genotypů bakterií. Je však nutné vzít v úvahu, že zároveň s tím se odfiltruje i rozdíl způsobený tím, že ve vrtech mohly panovat jiné podmínky, které způsobovaly systematický posun ve skladbě OTU (např. pH). Zvolením vybraných metabolických skupin v komunitách je do analýzy vnášeno zkreslení, které zobrazuje sice lépe určité procesy, mnohé ale naopak zcela zakrývá. To, že metabolický pohled nezobrazuje zdaleka všechno, ale pouze to, co chceme vidět, nebo to co očekáváme, že uvidíme, dobře ilustruje dvojsečnost mnoha analytických přístupů v mikrobiální ekologii. Zkreslení způsobené předpojatostí jednotlivých metod je patrné velmi dobře pokud analyzujeme stejné vzorky různými metodami. Z metabolické analýzy není možné například odlišit, zdali byly vzorky odebrány z pevného nebo kapalné vzorku. Analýza fylogenetické disimilarity však tuto skutečnost velmi efektivně odhalí, neboť růst v biofilmu na pevném podkladu je životní strategií, za kterou je zodpovědné velké množství genů (Watnick, 2000). Nelze ji jednoduše horizontálně předat, ale je nutné ji zdědit. Proto nese tak silný fylogenetický signál.

### 4.3.2 Využití přímých ordinačních metod

Přímé ordinační metody hledají teoretické proměnné, pro které je celková závislost všech „druhů“ (OTU nebo jiných skupin) nejtěsnější. Je tak možné postihnout vliv vybraného charakteru prostředí na složení komunity.

Zatímco u nepřímých ordinačních analýz bylo dosaženo pokaždé podobného výsledku (vzorky s velkým množstvím unikátních OTU byly rozmístěny na okraji oblaku v diagramu) u přímých ordinačních metod toto rozložení není v diagramu patrné, protože je zobrazována jen variabilita ve vztahu k určité proměnné. Program Canoco navíc provádí permutační test, pomocí něhož lze hodnotit pravděpodobnost náhodného vzniku rozložení vzorků. Lze tak například objevit největší vliv určité reálně existující charakteristiky – v našem případě příslušnosti k lokalitě a dále pak pracovat se vzorky z jednotlivých lokalit a zbavit se tak nejsilnější objevené vysvětlující proměnné, aby nezakrývala další trendy.

### 4.4 Liší se lokality?

Příslušnost k lokalitě nebylo možné jednoznačně detekovat žádnou jinou metodou nežli pomocí přímé ordinační analýzy, kdy obsahem vzorků byly OTU (obr. 19.1). Pokud byly místo OTU dosazeny metabolické skupiny, bylo jasně vidět, že geografické rozdíly zmizí. To dobře odpovídá skutečnosti, že určitá metabolická funkce je typická pro větší počet genotypů OTU a že není důvod pro to, aby se na jiném místě určitý metabolismus nevyskytoval. Genotypy mohou být v prostředí vybírané na základě vlastností, které nesouvisí se sumární rovnicí energetického metabolismu. Takovou vlastností může být například preference oligotrofního nebo eutrofního prostředí. Z metabolické analýzy nejhojnějších OTU navíc nelze vyčíst absolutní počty mikroorganismů a usuzovat tedy na hustotu buněk v prostředí, které by spíše odpovídaly míře živin ve vodě.

Podle metabolické analýzy to vypadá, že na každé lokalitě probíhají v podzemní vodě v zásadě ty samé metabolické cykly, pouze s drobnými odlišnostmi napříč lokalitami (viz tab. 10). Neexistuje ani příliš výrazný rozdíl ve využívání akceptorů elektronů mezi lokalitami jako je Černuc a Pekařka, nebo Vlastislav a Pekařka. V proporcích mikroorganismů respirujících kyslík se Pekařka liší pouze o 10 % od ostatních lokalit, navzdory výraznému rozdílu v obsahu kyslíku podzemních vod. Černuc se vyznačuje například vyšším podílem fermentace, a to zejména od Vlastislavi, kde jsou hlavní TAE anaerobní respirace rozloženy rovnoměrněji.

Tato absolutní převaha respirace kyslíku a nitrátů ve vodách obsahujících zcela odlišné koncentrace kyslíku si zaslouží zvláštní pozornost. Tento jev lze vysvětlit dvěma způsoby: Hlavním důvodem je to, že pro relativní zastoupení aerobů je důležitý obrat kyslíku, o němž koncentrace vypovídá dost nepřesně. O množství aerobů by mnohem lépe mohla vypovídat strmost gradientu kyslíku ve vodním sloupci.

Druhým důvodem může být to, že mikroorganismy využívající aerobní respiraci a respiraci nitrátu mají vyšší energetický výtěžek nežli ty, které získávají energii jinou anaerobní respirací nebo fermentací. Lze tedy očekávat, že mají i rychlejší růst. Je možné, že mikroorganismy stržené do vzorku při čerpání pochází především z biofilmu rostoucím ve vrtu na jeho stěnách a že je jich přirozeně více tam, kde je možné získat vyšší energetický výtěžek při oxidaci různých látek. V případě anoxických a suboxických vod to je u hladiny



podzemní vody ve vrtu, kde se rozpouští kyslík. Při čerpání jsou pak snáze navzorkovány hojnější mikroorganismy nežli mikroorganismy vzácnější rostoucí pomalu a těžící energii z neefektivních redoxních párů (např. organické látky/ síran). Pokud vezmeme v úvahu způsob měření kyslíku je pak možné vysvětlit to, proč byly v anoxických vodách detekovány tak vysoké relativní počty aerobních mikroorganismů: Při měření kyslíku ve vodě z daného vrtu nebyla totiž zaznamenána koncentrace rozpuštěného kyslíku za klidového stavu kdy se nečerpá a ve kterém se biofilm přirozeně ve vrtu vyvíjí. Koncentrace kyslíku a všechny ostatní geochemické parametry byly měřeny během čerpání, navíc většinou až po odběru biologických vzorků. Hodnoty tedy odpovídají vodě, která byla do vrtu vtažena z okolního akviferu a ta svým obsahem kyslíku neodpovídá místu, odkud pochází většina mikroorganismů ve vzorku.

Této problematice je nutné věnovat pozornost při dalším studiu a zkoumat podrobněji rozdíly v mikrobiálních komunitách rostoucích ve vrtu v biofilmech na povrchu pažnice v různých hloubkách. Zároveň je užitečné měřit koncentrace kyslíku, pH, Eh a konduktivitu ponornými měřidly, které zobrazí přirozený klidový stavu vrtu v různých hloubkách. Způsob, kterým bylo měření v této práci prováděno udává jednu hodnotu, která nemůže být reprezentativní pro vodní sloupec hluboký několik desítek metrů (např. vrt MO1, MO5).

Pokud by zkreslení efektivitou růstu aerobních mikroorganismů opravdu existovalo, může už poměrně malé procento anaerobních mikroorganismů ve vzorku znamenat skutečný nedostatek kyslíku ve vodě přitékající z akviferu do vrtu.

**Tab. 10 Průměrné hodnoty jednotlivých typů metabolismů pro každou lokalitu. Průměr je vypočítán z procentuálních hodnot všech vrtů pro daný typ v dané lokalitě. Zpracováno podle tabulky četností z přílohy A.**

AKCEPTOR elektronů %	Černuc	Pekařka	Vlastislav
kyslík	57,4	67,5	57,7
dusičnan	23,1	23,1	22,1
dusitan	3,1	1,7	0,1
Fe <sup>3+</sup>	1,7	1,2	3,2
Mn <sup>4+</sup>	0,5	0,6	3,0
Cr <sup>6+</sup>	0,1	0,0	0,1
U <sup>6+</sup>	0,1	0,1	2,2
chlorované uhlovodíky	0,9	0,0	0,0
chloristan, chlorečnan	0,1	0,1	2,6
Co <sup>3+</sup>	0,1	0,1	2,2
síran	2,5	0,2	0,5
síra	0,2	0,4	2,2
ostatní formy síry	1,8	0,7	0,1
organické látky	0,5	0,6	3,0
fermentace	7,5	3,8	0,6
disproporcionace	0,2	0,0	0,4

DONOR elektronů %	Černuc	Pekařka	Vlastislav
Fe <sup>2+</sup>	6,4	9,4	5,5
redukované formy síry	7,8	7,7	7,3
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,6	4,5	0,6
dusitany	1,1	1,7	1,1
vodík	5,8	3,2	5,8
metan	0,1	1,6	0,2
organické látky	78,2	72,0	79,6

#### 4.5 Závislost oxidace vodíku a fermentace

Z hlediska vztahu mikrobiální komunity k prostředí není důležité jenom to, jaké zdroj energie komunita využívá, ale také to, odkud daný zdroj energie pochází. Zajímavé je řešit tuto otázku na příkladu vodíku, který může být v podzemní vodě produkován fermentujícími mikroorganismy degradací organické hmoty (Das and Veziroglu, 2001) in situ (např. v kalníku), nebo může být alochtonního původu s tím, že je produkován například v hlubších částech akviferu, než byl odebrán vzorek. Tam může být vodík produkován geologickými procesy jako je serpentinizace v ofiolitech (Keir, 2010), radiolýza vody (Lin *et al.*, 2006) nebo může být produkován mikroorganismy mimo vrt. V případě Černuci nebo Pekařky připadá v úvahu pouze poslední varianta. Rozhodnout o tom, zdali je zdroj vodíku ve vrtu nebo ne, může mít dobré praktické uplatnění v hydrogeologii.

Zaměříme-li se na to, jak moc je schopnost komunity oxidovat vodík závislá na schopnosti fermentace můžeme teoreticky sledovat, zdali vodík využívaný komunitou je produktem fermentujících mikroorganismů z toho samého prostředí (z toho samého vzorku) anebo zdali pochází z jiného „vnějšího“ zdroje, který může být i teoreticky poměrně vzdálený vzhledem k snadné migraci vodíku. Z výsledků analýzy v obr. 25 vyplývá, že na Černuci jsou na sobě schopnosti fermentace a oxidace vodíku v komunitě téměř nezávislé. Vodík tedy nemusí být produkován fermentátory v komunitě vrtu, ale může pocházet spíše z jiného vnějšího zdroje.

Na Pekařce je korelace mezi oxidací vodíku a fermentací silnější, což by mohlo naznačovat, že oba dva procesy probíhají ve vrtu. Při řešení tohoto problému je zapotřebí uvážit to, že fermentace je energeticky velmi nevýhodným způsobem zbavování se elektronů z oxidace organických látek. Oxidace vodíku (zvláště pak kyslíkem) je naopak redoxní reakcí s největším výtěžkem energie (Boettger *et al.*, 2013). Na užití určitého množství oxidátorů vodíku je zapotřebí podstatně větší množství fermentujících mikroorganismů, takže prosté korelace relativních počtů nestačí. Pro další zkoumání této problematiky je nutné vzít v úvahu tento fakt a korelovat pomocí jiných, přesnějších statistických metod, které jsou schopné korelaci lépe postihnout. Také by bylo přínosné sekvenovat geny pro tyto dvě metabolické dráhy a nespoléhat se pouze na profil 16Sr DNA, který není schopný tak přesně vystihnout metabolické schopnosti mikroorganismů.

#### 4.6 Vodík na Černuci v mnoha kontextech

Vodík je látkou s nejnižším redoxním potenciálem, takže hydrogenovní mikroorganismy mají nejširší výběr akceptorů elektronů ze všech mikroorganismů (Lovley and Goodwin, 1988). Mohou tedy nejpřesněji indikovat nejvyšší možný redoxní gradient přítomný ve vrtu – pokud má mikroorganismus vyvinutou schopnost oxidovat vodík, je zvýhodněn oproti mikroorganismům, které využívají donor elektronů s vyšším redoxním potenciálem (dusitan, železo) a nemohou si dovolit respirovat anaerobně. Anaerobní hydrogenovní mikroorganismy mohou být dobrými indikátory toho, že mikrobiální komunita nemá dostatečný přísun kyslíku. Akceptor elektronů, který používají hydrogenovní mikroorganismy, je prvním využitelným akceptorem elektronů, který potkává vodík unikající ze spodních částí vrtu. Toto pravidlo je do určité míry omezeno tím, pokud je migrace vodíku vzhůru příliš rychlá, takže se zoxiduje až ve vyšších částech aerobně.

Následující popis OTU vychází z tabulky v příloze A, kde jsou také uvedeny citace ke zjištěným vlastnostem

jednotlivých polyfázických druhů. Popisky typu prostředí, kde se OTU nejčastěji nacházejí jsou zjištěny dle nejbližších hitů k dané sekvenci 16SrDNA v databázi GenBank pomocí nástroje BLAST. „Vodíková metoda“ se samozřejmě omezuje na prostředí, kde je oxidace vodíku důležitým zdrojem energie a kde je dostatek příslušných mikroorganismů. Vrty, kde mikroorganismy neumí využívat vodík, nebo jich je velmi málo nemohou být do analýzy zahrnuty.

V kalu vrtu MC1 mají schopnost oxidovat vodík *Desulfomonile* sp. a *Acidithiobacillus ferrooxidans* vyskytující se běžně ve vodě s nízkým pH, obsahem těžko degradovatelné organické hmoty (rašeliniště, uhlí) a rozpuštěných kovů (kyselé důlní vody). *Desulfomonile* sp. je zároveň nejhojnější OTU v kalu vrtu MC1 (33%), je to obligátní anaerob ze skupiny *Deltaproteobacteria* schopný využívat různé sloučeniny síry nebo meta-halobenzoáty jako TAE.

Ve vrtném prachu vrtu CJ1N je oxidátorem vodíku zcela nepříbuzná bakterie *Desulfosporosinus* sp. ze skupiny *Firmicutes*, která má ovšem velmi podobné ekologické vlastnosti jako *Desulfomonile* sp., která se nachází ve vrtu MC1. Její nálezy pocházejí nejčastěji z hlubokých sedimentárních prostředí s obsahem uhlí, je to obligátní anaerob redukující sírany a jiné sloučeniny síry. Navíc disponuje schopností redukovat železo, což může souviset s tím, že spíše než ve vodním prostředí se vyskytuje v pevné fázi. Ve vodě nového vrtu CJ1N byly detekovány opět úplně jiné OTU, které využívají vodík. Jedná se v tomto případě o *Hydrogenophaga* sp. (*Betaproteobacteria*) využívající zároveň i organické látky a *Sulfuricurvum* sp. (*Epsilonproteobacteria*), které je schopné navíc oxidace síry nebo sulfidů. Tyto bakterie se zase liší od předchozích tím, že jsou aerobní respektive mikroaerofilní.

V těsné blízkosti nově vrtaného CJ1N se nachází původní starý vrt CJ1. V jeho vodě (vzorek CJ1St) najdeme další aerobní bakterii se schopností oxidovat vodík – *Sulfuriferula plumbofila* ze skupiny *Betaproteobacteria* vyskytující se často společně se sulfidy (např. galenitem) schopnou oxidovat kromě vodíku i sirovodík. Tato bakterie je aerobní.

Ve vrtu MC6 (vzorek MC6k) je možné najít dokonce fototrofní hydrogenovorní bakterie *Rhodomicrobium* sp. ze skupiny *Alphaproteobacteria*, kterým vyhovují nízké světelné intenzity a anoxické nebo hypoxické prostředí. Kromě vodíku jako zdroj elektronů využívají sirovodík, železo nebo organické látky a v oxických podmínkách preferují chemoheterotrofní metabolismus. Tato bakterie je ovšem častá v půdě, takže nelze vyloučit její zavlečení do vzorku z povrchu.

Dalším typem oxidátora vodíku je *Nitrospira* sp. (*Nitrospirae*) v kalu vrtu MC2, která umí jako alternativu využívat dusitany. *Nitrospira* sp. respiruje kyslík nebo dusičnan.

Podle akceptorů elektronů hydrogenovorních mikroorganismů je největší nedostatek kyslíku v kalu vrtu MC1, kde obligátní anaerob *Desulfomonile* sp. využívá už tak nevýhodný redoxní pár jako je vodík/síran. Ve vrtu CJ1N *Desulfosporosinus* sp. indikuje nedostatek kyslíku ve vzorku vrtného prachu, tedy ve stavu, kdy vrt ještě neexistoval a nedostatek kyslíku hrál větší roli než po vytvoření vrtu. Ve vodě odebrané po vystrojení vrtu je možné totiž najít i aerobní hydrogenovorní mikroorganismy. Ty mohou sice pocházet z povrchu z obsypu vrtu (aerobní *Hydrogenophaga* sp.), ale rovněž mohou mít původ v bazální vodě cenomanského kolektoru (mikroaerofilní *Sulfuricurvum* sp.). Vrty CJ1St obsahuje vody vzdáleného transportu stejně jako MC1. Na rozdíl od vrtu MC1 se ale nenachází v těsné blízkosti zlomu, takže do něj

nepronikají vody z povrchu a nevzniká zde redoxní okno. Není zde tedy k dispozici tolik energie, takže zde není v důsledku zvýšené spotřeby kyslíku vyvinutá kaskáda TAE a hydrogenovorní mikroorganismy mají k dispozici kyslík.

Vrt MC2 obsahuje naopak vody z blízkého transportu ze svrchního kolektoru infiltrované v oblasti vrtu MC3, to, že je zde bakterií *Nitrospira* sp. respirován kyslík dokresluje dobře hydrogeologickou situaci vrtu.

Tato pestrost v různých řešeních, jak využít vodík poměrně hezky ilustruje známý fakt, že v každém prostředí, kde existuje nějaký energetický potenciál, najde život způsob, jak ho disipovat sledem reakcí, které jsou při daných podmínkách schůdné. Přitom systém sám nalezne cestu, jak provádět z možných reakčních drah tu s nejvyšším výtěžkem energie.

#### 4.7 Problematika kontaminací

Podzemní vody představují prostředí, kde je relativně málo biogenních prvků, zvláště pokud se jedná o akvifery, které slouží jako zdroje pitné vody. Koncentrace mikroorganismů jsou v oligotrofních vodách malé ale jejich diverzita je velká (Perovic *et al.*, 2016). Proto je důležitou otázkou, jak vzorkovat takovéto prostředí o velmi nízké koncentraci buněk, aby byla při vzorkování zachycena maximální možná diverzita. Perovic *et al.* (2016) ukazuje, že pokud je odebrán vzorek pitné vody menší než 10 litrů není možné získat dostatečné množství DNA pro PCR. Jako ideální objem se jeví 10-20 litrů. Toto množství vody by pak bylo nutné přefiltrovat na filtru s póry menšími, než je velikost buněk, a teprve z této frakce izolovat DNA. V této práci bylo použito pouze 50 ml vody vyčerpané z vrtu a amplifikace DNA byla u většiny vzorků velmi obtížná, u některých bylo zapotřebí zkoušet amplifikaci s různými nastaveními až 8x. To pravděpodobně způsobilo, že se amplifikace DNA sice nakonec povedla, ale pouze kvůli tomu, že vzorek byl kontaminován při opakovaném otevírání zkumavky. Kontaminace pak představovaly mikroorganismy z laboratoře a z pracovníků v ní se pohybujících. Zajímavé je, že se problém



objevil i u kalů, které mají obvykle řádově vyšší oživení (a je technicky téměř nemožné je filtrovat v objemech několika litrů) (viz obr. 30). Zde

**Obr. 30 Vzhled kalů.** Kal z vrtu MC-6 na Černuci má zrzavou barvu (viz foto). Kal z vrtu MC-1 je podobně hustý, ale je zbarvený do žluta. Tyto kaly nepochybně obsahují vysoké koncentrace mikroorganismů.

patrně spolupůsobila i izolace DNA kitem, který navzdory tvrzení výrobce není vhodný pro geologické vzorky, protože poskytuje malý výtěžek. To bylo potvrzeno i při testování tohoto kitu při izolaci DNA z dalších vzorků (ústní sdělení, L. Falteisek). U vzorku s tak malými koncentracemi buněk je také mnohem pravděpodobnější, že bude kontaminován na místě odběru půdními mikroorganismy. Půdní mikroorganismy není ale možné jednoduše z analýz vyřadit, neboť je možné, že se v podzemní vodě opravdu vyskytují.

Z tohoto důvodu byla v této práci věnována velká pozornost kritériím pro vyřazování kontaminací uvedených v kapitole metody. Při analýze mikrobiálních komunit z oligotrofních akviferů je velmi důležité zabývat se tím, jak zvýšit přirozeně malou koncentraci buněk ve vodních vzorcích, aby se omezilo zpětné zasahování do souboru získaných dat vyřazováním nevhodných OTU.

#### **4.8 Vliv odběru z vodovodu na strukturu komunity**

Z celého setu vzorků byl odebrán pouze jeden vzorek z vodovodu. Jedná se o vzorek KS, který byl odebrán z vodovodu vedoucího ze studny, kde je umístěno čerpadlo. Způsob odběru se nejvíce projevil na charakteru rozložení abundancí OTU. Při odběru z vodovodu, kde není manipulováno ve vrtu s čerpadlem se do vzorku dostávají spíše mikroorganismy přítomné přirozeně v kapalné fázi vzorku. Jedná se o takové mikroorganismy, které buďto přirozeně žijí ve volné vodě, nebo takové, jejichž buňky jsou prouděním vody uvolněny z biofilmů rostoucích v potrubí nebo na minerálních zrnech v akviferu. Nedochozí však k tak silné dezintegraci biofilmů (a obohacení vzorku silně dominantními OTU) ze stěn vrtu jako při spouštění čerpadla, kdy jde zvláště při odběru kalu o to, dostat do vzorku co nejvíce biomasy vířením kalu. Proto je možné, že vzorek KS obsahuje méně dominantních OTU a má naopak velký počet středně hojných OTU, což se projevuje na tvaru křivky rozložení četností OTU (obr. 14).

#### **4.9 Vysvětlení procesů ve vrtu MO1**

Extrémní relativní obsahy anaerobních mikroorganismů (viz příslušné grafy pro Vlastislav v příloze B) ve vrtu MO1 vyžadují speciální vysvětlení vzhledem k okolnosti, že vrt MO5 má velmi podobný petrografický profil, leží také v infiltrační oblasti, kde se mísí povrchová voda s anoxickou, má stejně nízké obsahy kyslíku a podobné chemické složení vod. Přesto jeho mikrobiální komunita téměř postrádá schopnost anaerobní respirace. Jediné, čím se vrt MO1 od vrtu MO5 liší, je přítomnost 2 m mocné vrstvy drobnozrnných slepenců s pyritovými konkracemi v hloubce 22-24 m, kde začíná perforace vrtu.

Výskyt heterotrofních anaerobů ve vrtu MO1 dobře ilustruje to, že na dně vrtu nebo v okolí vrtu se hromadí organická hmota do té míry, že místní přísun kyslíku na její oxidaci nestačí a začínají se vytvářet alternativní způsoby zpracování. Otázkou je, kde je zdroj energie pro syntézu organické hmoty. Vysvětlením je pravděpodobně následující proces: Rozpuštěné formy redukované síry, které mikroorganismy využívají, se pravděpodobně dostávají do vody z drobnozrnných slepenců s pyritovými konkracemi ležícími v hloubce 22-24 m pod povrchem, kterými protéká podzemní voda. Vrt je v infiltrační oblasti. Voda infiltruje puklinami spongilitického slínovce spodního turonu ležícího v nadloží cenomanu. Přítok infiltrované vody může být, kromě rozpouštění kyslíku na hadině podzemní vody ve vrtu, významným zdrojem kyslíku ve vrtu. Průtok okysličených vod horninou s obsahem pyritu vytváří redoxní okno, které podporuje růst aerobních

autotrofních bakterií oxidujících síru (*Sulfuricella* sp.) nebo sulfidy (*Sulfurimonas* sp.). Vytváří se organická hmota, na kterou už nezbyvá hlouběji ve vrtu dostatek kyslíku, a je tudíž odbourávána anaerobně například bakteriemi *Geobacter* sp., *Geothrix fermentans*., které využívají různé, méně výhodné TAE.

Při oxidaci pyritu by bylo ve vodě logické očekávat vysoké koncentrace síranů (alespoň vyšší než v MO5, kde chybí pyritová vrstva) a nižší pH. Tak tomu ale není. Lze to vysvětlit tak, že v nadloží zmíněné slepencové vrstvy lží několik metrů spongilitických slínovců s významným obsahem CaCO<sub>3</sub>. Voda jimi přitékající má pufrovací účinek na případně kyselou vodu vylouženou z pyritové vrstvy, takže zde není možné naměřit nižší pH než v MO5. Voda ve vrtech jímacího území Vlastislav běžně obsahuje 200 – 300 mg/l síranů, takže příspěvek oxidace pyritu v poměrně vydatném kolektoru (využitelné množství vody ve vrtu MO-1 je 2 – 3 l/s při snížení hladiny do 4,5 m) nemusí být měřitelný. Optikou chemického rozboru vody zůstává pyritová vrstva skrytá.

V tomto případě je důležité si uvědomit, kolik informace navíc může poskytnout mikrobiální rozbor metabolických schopností komunity v podzemní vodě a to, že může mít praktické využití. Dvojnásobný počet aerobních oxidátorů síry oproti vrtu MO5 v kombinaci s vysokým procentem obligátních anaerobů, značí, že ve vrtu jsou dobře vyvinuty redoxní cykly, při kterých autotrofní mikroorganismy reoxidují akceptory elektronů pro anaerobní heterotrofní mikroorganismy. Znamená to, že ve vrtu byl dostatek energie a času na vytvoření tohoto procesu, ke kterému přirozeně spějí všechna prostředí limitovaná přísunem TAE. Vzhledem k tomu, že času bylo k dispozici stejně jako ve vrtu MO5, může být vysvětlením pouze vyšší přísun energie. Tím je redoxní okno existující díky přítomnosti pyritu v okysličené vodě. Ve vrtu MO1 může oxidace pyritu (ať už abiotická či bakteriální – detekovaná *Gallionella capsieriformans* oxiduje železo, oxidátoři pyritu zase lokálně snižují pH a rozpouštějí železo) vysvětlit to, proč je ocelová pažnice zhroucená právě v této hloubce a ne jinde. Dobrým řešením tohoto problému může být výměna ocelové pažnice za výstroj plastovou, kde nehrozí koroze ani rozpouštění.

#### 4.10 Analýza fylogenetické disimilarity

Na mikrobiální komunity působí různé podmínky v prostředí, které ovlivňují jejich složení. Některá přizpůsobení mikroorganismů na podmínky jsou zakotvena ve velkém množství genů, takže není možný jejich horizontální přenos. Takové vlastnosti je možné pouze zdědit. Budou tedy existovat fylogenetické skupiny mikroorganismů, které budou lépe přizpůsobeny takovýmto podmínkám než jiné fylogenetické skupiny mikroorganismů.

Při interpretaci diagramů PCoA (např. obr. 27) a UPGMA stromů (obr. 26) je potřeba mít na paměti, že zobrazení hlavní variability je omezeno na několik rozměrů (graf PCoA má například 2 osy). Obsah mikroorganismů ve vzorku je přitom řízen širokým spektrem faktorů působících na komunitu. V diagramu PCoA jsou hlavní osy lineární kombinací těchto faktorů, tj. jednotlivé jevy lze interpretovat jako vektory, které jsou šikmé vůči osám. Většinou k nim je možné přiřadit známý vliv nějakého faktoru z přirozeného prostředí, ale nemusí tomu tak nutně vždy být.

Bylo zjištěno, že na různých souborech vzorků (z různých lokalit) působí odlišné faktory, které vysvětlují hlavní variabilitu ve fylogenetickém složení vzorků.

#### 4.10.1 **Fylogenetická analýza všech vzorků dohromady**

Pokud byly analyzovány všechny vzorky dohromady, způsobovalo hlavní variabilitu ve fylogenetickém složení mikrobiálních komunit jednoznačně stáří vrtu (viz obr. 26 a obr. 27). Všechny sondy na Pekařce (stáří 1rok v době odběru) a vrt CJ1Nv51 (stáří cca 2 dny v době odběru) tvoří monofyletickou větev ve stromu UPGMA v obr. 26. Pod shrnujícím pojmem stáří vrtu se skrývá několik společně působících faktorů.

Na povrchu stěn a v kalnicích vrtů není vytvořen vyžralý biofilm jako ve starších vrtech:

- U vrtu CJ1Nv51 proto, že je nově vybudovaný a dosud se zde žádné biofilmy nestihly vytvořit kvůli nedostatku času. Přítomny jsou v něm především zbytky aerobních mikroorganismů z obsypu, u kterých lze očekávat, že budou brzy nahrazeny mikroorganismy schopnými lépe odolávat lokálním podmínkám např. přítoku anoxické vody, která do vrtu vtéká z bazálního cenomanského kolektoru. Pak se pravděpodobně složení komunity změní natolik, že se vzorek přesune do druhé skupiny vzorků, kterou reprezentují starší vrty. Pro další výzkum by bylo zajímavé odebrat časovou řadu vývoje tohoto vrtu a zjistit například, kdy jeho komunita přestane být ovlivněna vybudováním a začne reprezentovat procesy ve vrtu. To by bylo totiž teoreticky možné zjistit tím, že se připojí ve stromu do druhé skupiny vzorků. Z toho také plyne závěr, že není možné nekriticky analyzovat mikrobiální komunitu akviferu a procesy v něm, pokud byl vzorek odebrán z několik dní starého vrtu. Mikroorganismy v něm totiž z velké části dosud představují ty zavlečené do hloubky z povrchu.
- Vzorky ze sond na Pekařce byly sice již 1 rok staré, ale pocházejí z povrchových oligotrofních vod, kde jsou mikrobiální komunity limitovány nedostatkem vhodných donorů elektronů, a je tím zpomalována sukcese (vývoj redoxních cyklů). Mikrobiální komunity v nich proto rostou velmi pomalu a nedochází k vytvoření masivnějších biofilmů nebo redoxních gradientů ve vrtu vlivem spotřeby kyslíku. Vrty tedy mají stále charakter „nových vrtů“.

Mikrobiální komunita vrtu CJ1Nv51 se skládá z velké části z mikroorganismů pocházejících z povrchového prostředí, neboť materiál obsypu přítomný ve vrtu byl ještě před několika dny na povrchu. To potvrzuje i metabolická analýza nejhojnějších mikroorganismů, ve které bylo identifikováno velké množství půdních aerobních heterotrofních mikroorganismů (viz popis vrtu v kapitole 3.3.3.). Vzorek CJ1Nv51 se tedy podobá vzorkům z povrchových vod na Pekařce také z tohoto důvodu.

Vzorky CJ1N42 a CJ1N31 pocházejí sice také z nového vrtu, byly ale odebrány z vrtného prachu. Charakter vzorku (kapalný versus pevný) je velmi silným faktorem působícím odlišnost od zbytku vzorků. Mimo to samotná výstavba vrtu je drastickým zásahem do prostředí (způsobuje okysličení hornin). Vzorky vrtného prachu jsou jedinými vzorky zobrazující stav před vyvrtáním vrtu. Tyto dva faktory působí pravděpodobně hlavní odlišnost mezi pevnými vzorky a zbytkem. To je dobře vidět, pokud zmenšíme soubor zkoumaných vzorků.

#### 4.10.2 **Fylogenetická analýza vzorků z Černuci**

Pokud fylogenetickou analýzou zkoumáme vzorky z Černuci, začínají hlavní fylogenetické rozdíly mezi vzorky způsobovat jiné vlivy. Prvním a velmi důležitým faktorem, který byl již patrný z PCoA grafu

všech vzorků dohromady je to, zdali vzorek pochází z vrtného prachu či z vody. Vzorky odebrané z vrtného prachu tvoří jasně oddělenou skupinu v obr. 28. Z vrtného prachu se do vzorku dostávají mikroorganismy rostoucí v biofilmu a patrně zcela chybí bakterie žijící planktonním způsobem. Život v biofilmu je možno považovat za životní strategii, která vychází z velkého množství genů a není ji možné horizontálně přenést. Růst v biofilmu umožňuje mikroorganismům efektivněji využívat zdroje uhlíku nebo donory a akceptory elektronů, oproti tomu, kdyby žily planktonně. Mikroorganismy vytvářející biofilm jsou zároveň lépe přizpůsobené intercelulární komunikaci, v důsledku těsné kooperace se sousedními buňkami v matrix, ta se může týkat genetické i metabolické výměny nebo kompetice. Mikroorganismy se zde nemusí tolik potýkat s virovými infekcemi a predátory a jsou celkově ve stabilnějším prostředí nežli proudem unášené planktonní mikroorganismy (Dang & Lovell 2016, Watnick 2000). Toto přizpůsobení je natolik komplexní, že může nést silný fylogenetický signál, který se nerozptyluje HGT. Proto se pevné vzorky tolik liší od ostatních. Odlišnost vzorků sedimentu od vodních byla již popsána pro mořská prostředí za použití stejné metody (Lozupone and Knight, 2005). Vzorky na Černuci je také možno oddělit do skupin, které odpovídají typu donoru elektronů (především organické látky versus železo, redukované formy síry, amoniak), což lze dobře vidět srovnáním výsledků fylogenetické analýzy na obr. 28 a výsledků ordinační analýzy metabolických schopností v obr. 23. Využívání donorů elektronů zase poměrně signifikantně koresponduje s hydrogeologickými poměry v akviferu. Společně klastrují vzorky s komunitami využívajícími anorganické donory elektronů – MC6, MC6k a KS. Vzorky ovlivněné organickými látkami a povrchovými vodami jsou uprostřed diagramu (modrá barva) a nejvýše se nachází skupina vzorků s mikroorganismy oxidujícími vodík, pocházejícími z komunit z hlubokých vod bazálního cenomanského kolektoru.

#### 4.10.3 Fylogenetická analýza vzorků z Pekařky

Mikrobiální komunity na Pekaře zcela zásadně ovlivňuje to, zdali pocházejí z vrtu se železnou výztuží nebo z pozorovací plastové sondy. Ocelová pažnice představuje v oligotrofní vodě zřejmě podstatnou část železa, které může sloužit jako donor elektronů. Železo oxiduje ve vrtu PES i PEN *Sideroxydnas* sp. a *Gallionella capsiferiformans*. To umožňuje vznik redoxních gradientů v nečerpaném vrtu PES. V důsledku lokálního nedostatku kyslíku je pak možné pozorovat recyklování některých biogenních prvků jako je např. dusík (redoxní cyklus dusíku dokládá například oxidátor amoniaku *Nitrosotenuis cloacae*, oxidátor dusitanu *Nitrospira* sp. a heterotrofní respirátor dusičnanu *Pseudomonas mandelii*).

Přizpůsobení se nedostatku energie je možné rovněž považovat za horizontálně nepřenositelnou životní strategii. Metoda UniFrac umí poměrně spolehlivě odlišit mezi oligotrofním a méně oligotrofním nebo eutrofním prostředím, v případě že na vzorky nepůsobí příliš komplexní soubor vlivů.

Na Pekaře byla v rámci pozorovacích sond identifikována ještě další významná fylogenetická odlišnost mezi vzorky (obr. 29). Tato rozdílnost byla vypořádána pouze na základě rozložení vzorků v diagramu PCoA, byla otestována a bylo zjištěno, že rozdíly mezi těmito skupinami jsou signifikantní. Následně ovšem nebylo možné podle žádné z předchozích analýz ani podle geologických poměrů na lokalitě zjistit, jaký jev za touto odlišností stojí. Je ale velmi pravděpodobné, že díky malému oživení oligotrofních vod má na



Pekařce hlavní roli ve složení vzorků ze sond náhoda. Z toho důvodu je možné, že za objevenou disimilaritou opravdu žádný, v prostředí existující proces, nestojí.

## 5 Závěr

V této práci jsem se zabývala mikrobiálními komunitami v sedimentárních akviferech. Cílem bylo zjistit, jaké informace lze získat ze sekvenace ampliconů 16S rDNA mikroorganismů obsažených ve vzorcích podzemních vod, pokud jsou analyzovány různými metodami. Práce se nepokoušela o popis obecných ekologických zákonitostí, ale byla spíše zaměřena na to, jak je z hydrogeologického pohledu možné využít a interpretovat data o mikrobiálních komunitách. V zásadě šlo o to popsat, jaké procesy v podzemních vodách je vůbec možné jednotlivými metodami nebo kombinací metod popsat s tím, že byly odebírány různé typy vzorků (kal, voda, vrtný prach) na třech různých lokalitách za použití tří různých metodologických přístupů. Tato otázka je poměrně komplexní, ale alespoň částečná odpověď na ni může být pro současný stav poznání dané problematiky přínosná. Molekulární biologie totiž na jedné straně přináší nástroje jako je sekvenace typu Illumina, kdy je možné jednoduše a levně získat obrovské množství dat o mikrobiálních komunitách z jejich přirozených habitatů. Na druhé straně tato záplava dat vede k tomu, že většina studií končí na úrovni popisu taxonomického složení, případně složení trofických úrovní z nejhojnějších taxonomických jednotek v konkrétním prostředí. Chybí tedy přehled a kritického zhodnocení toho, jak jsou jednotlivé interpretační přístupy omezující, a v čem naopak užitečné při zkoumání ekosystému podzemních vod.

Mikrobiální komunity byly nahlíženy optikou tří metod:

### 1) Analýzou nejhojnějších OTU, jejich taxonomického a následně metabolického zařazení.

Tato metoda zobrazuje, jaké reakce jsou důležité pro obrát látek v podzemní vodě. Mikroorganismy jsou katalyzátory těchto reakcí a energie je v závislosti na podmínkách disipována různým způsobem. Buďto přímo aerobní oxidací redukovaných látek, nebo přes redoxní kaskády v případě limitace akceptory elektronů. Pokud není přítomna transportní kaskáda TAE může tomu tak být ze dvou důvodů: Komunita je buďto limitována zdrojem energie (donorem elektronů) nebo je její sukcese blokována vlivem disturbancí (např. rychlost proudění strhávající vyrostlé mikroorganismy). Předpokladem této analýzy je, že organismy, katalyzující zásadní (významné pro bilanci látek) geochemické děje, zpravidla tvoří hojnou složku komunity.

### 2) Ordinační analýzou, kdy obsahem vzorků byly

#### A) OTU

Přímá ordinační metoda testuje vliv známých proměnných. Ukázala, že existují rozdíly ve skladbě OTU napříč lokalitami a že neexistuje rozdíl mezi vzorky kalu a vody. Nepřímá ordinační metoda je v tomto případě nepoužitelná, neboť zvýrazňuje odlišnost vzorků způsobenou počtem unikátních OTU. To, vzhledem k mimořádně velké náhodné fluktuaci mikrobiálních OTU, není příliš informativní údaj.

#### B) metabolické skupiny z analýzy 1 (akceptory a donory elektronů)

Přímá ordinační analýza ukázala, že po metabolické stránce neexistují signifikantní rozdíly ani

mezi lokalitami ani mezi kalem a vodou. Nepřímá ordinační metoda je užitečná v tom, že dokáže odlišit, jaký metabolismus je typický pro určitou skupinu vzorků, přestože ve všech vzorcích mělkých podzemních vod převládá většinou aerobní heterotrofní metabolismus. Nepřímá ordinační analýza je také užitečná při zjišťování toho, jaký typ vzorku (kal, voda) nejlépe vystihuje rozdíly mezi mikrobiálními komunitami.

### 3) Analýzou fylogenetické disimilarity mikrobiálních komunit.

Analýza fylogenetické disimilarity je schopná postihnout komplexní jevy, které nezobrazuje žádná z předchozích metod. Jedná se především o mikrobiální životní strategie, které jsou dány polygenně, takže je nelze horizontálně předat, a proto mají silný fylogenetický signál. Životní strategií je například růst v biofilmu/planktonní růst nebo růst při limitaci zdroji versus růst v konkurenci. Tento typ analýzy ukazuje rozdělení mikrobiálních komunit podle environmentálních proměnných, které mají reálně největší vliv na životní strategie mikroorganismů. Tím může pomoci odhalit podstatný rys prostředí, který nemusí být patrný z žádného měřeného parametru.

Na jednotlivých lokalitách použité analytické postupy prokázaly, že je možné rozpoznat relativní význam jednotlivých složek prostředí (minerály, rozpuštěné látky) pro rozvoj mikrobiální aktivity ve vrtu:

- Vrty MO1 a MC1 jsou limitované akceptory elektronů, takže je v nich vyvinuta redoxní kaskáda využívání různých akceptorů elektronů.
- Vrty MO1 a vrt MO5 mají téměř stejné podmínky prostředí. Vrt MO5 nemá ale tak silný energetický zdroj (pyrit v okysličené vodě), takže mikrobiální komunitě stačí přísun kyslíku na rozdíl od vrtu MO1, kde vznikají v důsledku limitace kyslíkem redoxní cykly.
- Komunita vrtu MO3 nerozvinula transportní cykly TAE, patrně jde o blokování sukcese čerpáním vrtu.
- Vzorky vrtného prachu na Černuci se významně liší od vzorků kalu a vody.
- Je možné odlišit komunity mladých vrtů jako CJ1Nv51 a sond na Pekařce od starších. Komunity v těchto vrtech jsou limitované zdroji energie a není v nich vyvinuta redoxní kaskáda.
- Na Černuci je možné odlišit vliv povrchových čerstvě infiltrovaných vod (heterotrofie ve vrtu MC3, MC2) od vod vzdáleného transportu, pro které je typická autotrofie (MC6, KS).
- Kaly vod na Černuci jsou častěji limitovány akceptory elektronů než vody. Je pro ně typická fermentace a oxidace vodíku.
- Komunity v kalech vrtů jsou navzájem odlišnější a typičtější pro procesy probíhající v akviferu než vody, kde je vlivem mísení mikroorganismů vyplavených z různých stanovišť spíše zastřen rozdíl mezi vzorky.
- Mikrobiální komunity ve vodách na Pekařce jsou limitovány donory elektronů. Na složení mikrobiálních komunit se zde výrazně projevuje materiál výstroje vrtu. Vrty s ocelovou výstrojí mají pestřejší komunity s redoxními cykly biogenních prvků. To jednak v důsledku materiálu vrtu (železo

je donorem elektronů) a jednak v důsledku stáří těchto vrtů. Redoxní cykly jsou vyvinutější v nečerpáném vrtu PES.

## 6 Seznam použité literatury

- Adeleke, A. A., Fields, B. S., Benson, R. F., Daneshvar, M. I., Pruckler, J. M., Ratcliff, R. M., Harrison, T. G., Weyant, R. S., Birtles, R. J., Raoult, D. and Halablab, M. A. (2001) 'Legionella drozanskii sp. nov., Legionella rowbothamii sp. nov. and Legionella fallonii sp. nov.: Three unusual new Legionella species', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), pp. 1151–1160. doi: 10.1099/00207713-51-3-1151.
- Achenbach, L. A., Michaelidou, U., Bruce, R. A., Fryman, J. and Coates, J. D. (2001) 'Dechloromonas agitata gen. nov., sp. nov. and Dechlorosoma suillum gen. nov., sp. nov., two novel environmentally dominant (per)chlorate-reducing bacteria and their phylogenetic position Laurie', *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(August), pp. 527–533. doi: 10.1099/00207713-51-2-527.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. (1990) 'Basic local alignment search tool', *Journal of Molecular Biology*, 215(3), pp. 403–410. doi: 10.1006/jmbi.1990.9999\nS0022283680799990 [pii].
- Amaral-Zettler, L. A., Zettler, E. R., Theroux, S. M., Palacios, C., Aguilera, A. and Amils, R. (2011) 'Microbial community structure across the tree of life in the extreme Rio Tinto', *ISME Journal*. Nature Publishing Group, 5(1), pp. 42–50. doi: 10.1038/ismej.2010.101.
- Aronesty, E. (2013) 'Comparison of Sequencing Utility Programs', *The Open Bioinformatics Journal*, 7, pp. 1–8.
- Aslam, Z., Lee, C. S., Kim, K. H., Im, W. T., Ten, L. N. and Lee, S. T. (2007) 'Methylobacterium jeotgali sp. nov., a non-pigmented, facultatively methylotrophic bacterium isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(3), pp. 566–571. doi: 10.1099/ijs.0.64625-0.
- Auman, A. J., Breeze, J. L., Gosink, J. J., Kämpfer, P. and Staley, J. T. (2006) 'Psychromonas ingrahamii sp. nov., a novel gas vacuolate, psychrophilic bacterium isolated from Arctic polar sea ice', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(5), pp. 1001–1007. doi: 10.1099/ijs.0.64068-0.
- Bianchi, A., Ruimy, R., Garcin, J. and Daumas, S. (1995) 'Comparison of Phenotypical and Molecular Methods for the Identification of Bacterial Strains Isolated from a Deep Subsurface Environment', *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9), pp. 3400–3406.
- Bobay, L.-M. and Ochman, H. (2017) 'Biological species are universal across Life's domains', *Genome Biology and Evolution*, 9(3), pp. 512–232. doi: 10.1093/gbe/evx026.
- Boettger, J., Lin, H., Cowen, J. P., Hentscher, M. and Amend, J. P. (2013) 'Energy yields from

- chemolithotrophic metabolisms in igneous basement of the Juan de Fuca ridge flank system', *Chemical Geology*. Elsevier B.V., 337–338, pp. 11–19. doi: 10.1016/j.chemgeo.2012.10.053.
- Bogan, B. W., Sullivan, W. R., Kayser, K. J., Derr, K. D., Aldrich, H. C. and Paterek, J. R. (2003) 'Alkanindiges illinoisensis gen. nov., sp. nov., an obligately hydrocarbonoclastic, aerobic squalane-degrading bacterium isolated from oilfield soils', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), pp. 1389–1395. doi: 10.1099/ijs.0.02568-0.
- Boucher, Y., Douady, C. J., Papke, R. T., Walsh, D. A., Boudreau, M. E., Nesbo, C. L., Case, R. J. and Doolittle, W. F. (2003) 'Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups', *Annu Rev Genet*, 37, pp. 283–328. doi: 10.1146/annurev.genet.37.050503.084247.
- Bouvet, P. J. M. and Grimont, P. a. D. (1986) 'Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* a', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36(2), pp. 228–240. doi: 10.1099/00207713-36-2-228.
- Bowman, J. P., Sly, L. I., Nichols, P. D. and Hayward, a. C. (1993) 'Revised Taxonomy of the Methanotrophs: Description of *Methylobacter* gen. nov., Emendation of *Methylococcus*, Validation of *Methylosinus* and *Methylocystis* Species, and a Proposal that the Family *Methylococcaceae* Includes Only the Group I Methanotrophs', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(4), pp. 735–753. doi: 10.1099/00207713-44-2-375.
- Brenner, D. J., Hollis, D. G., Moss, C. W., English, C. K., Hall, G. S., Vincent, J., Radosevic, J., Birkness, K. A., Bibb, W. F., Quinn, F. D., Swaminathan, B., Weaver, R. E., Reeves, M. W., O'Connor, S. P., Hayes, P. S., Tenover, F. C., Steigerwalt, A. G., Perkins, B. A. and Daneshvar, M. I. (1991) 'Proposal of *Afipia* gen. nov., with *Afipia felis* sp. nov. (Formerly the cat scratch disease bacillus), *Afipia clevelandensis* sp. nov. (Formerly the Cleveland Clinic Foundation Strain), *Afipia broomeae* sp. nov., and three unnamed genospecies', *Journal of Clinical Microbiology*, 29(11), pp. 2450–2460.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Garrity, G. M., Brenner, D. J., Vos, P. De, Garrity, G. M., Goodfellow, M. and Noel, R. (2005) *Begey's Manual Of Systematic Bacteriology, Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria*. Second Edi.
- Brenner, D. J., Steigerwalt, a. G., Gorman, G. W., Wilkinson, H. W., Bibb, W. F., Hackel, M., Tyndall, R. L., Campbell, J., Feeley, J. C., Thacker, W. L., Skaliy, P., Martin, W. T., Brake, B. J., Fields, B. S., Mceachern, H. V. and Corcoran, L. K. (1985) 'Ten New Species of *Legionella*', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35(1), pp. 50–59. doi: 10.1099/00207713-35-1-50.
- Caccavo, F., Lonergan, D. J., Lovley, D. R., Davis, M., Stolz, J. F. and McInerney, M. J. (1994) '*Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism', *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), pp. 3752–3759. doi: 0099-2240/\$04.00+0.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N.

- and Knight, R. (2010) 'Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, pp. 4516–4522.
- Coates, J. D., Ellis, D. J., Gaw, C. V and Lovley, D. R. (1999) 'Geothrix fermentans gen. nov., sp. nov., a novel Fe(III)-reducing bacterium from a hydrocarbon-contaminated aquifer', *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49(4), pp. 1615–1622. doi: 10.1099/00207713-49-4-1615.
- Dang, H. and Lovell, C. R. (2016) 'Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), pp. 91–138.
- Das, D. and Veziroglu, N. T. (2001) 'Hydrogen production by biological processes : a survey of literature', *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(1), pp. 13–28.
- Dastager, S. G., Lee., J. C., Ju, Y. J., Park, D. J. and Kim, C. J. (2008) 'Marmoricola bigeumensis sp. nov., a member of the family Nocardioidaceae', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(5), pp. 1060–1063. doi: 10.1099/ijs.0.65576-0.
- Denton, M. and Kerr, K. G. (1998) 'Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia* Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*', *Clinical microbiology reviews*, 11(1), pp. 57–80.
- DeWeerd, K., Mandelco, L., Tanner, R., Woese, C. and Suflita, J. (1990) 'Desulfomonile tiedjei gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium', *Archives of Microbiology*, 154(1), pp. 23–30. doi: 10.1007/BF00249173.
- Ding, L. and Yokota, A. (2004) 'Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*]', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), pp. 2223–2230. doi: 10.1099/ijs.0.02975-0.
- Dobritsa, A. P., Reddy, M. C. S. and Samadpour, M. (2010) 'Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(6), pp. 1418–1426. doi: 10.1099/ijs.0.009381-0.
- Drobner, E., Huber, H., Rachel, R. and Stetter, K. O. (1992) 'Thiobacillus plumbophilus spec. nov., a novel galena and hydrogen oxidizer', *Arch Microbiol*, 157(3), pp. 213–217. doi: 10.1007/BF00245152.
- Ehrich, S., Behrens, D., Lebedeva, E. V, Ludwig, W. and Bock, E. (1995) 'A New Obligately Chemolithoautotrophic, Nitrite-Oxidizing Bacterium, *Nitrospira-Moscoviensis* Sp-Nov and Its Phylogenetic Relationship', *Archives Of Microbiology*, 164(1), pp. 16–23. doi: 10.1007/s002030050230.
- Emerson, D., Field, E. K., Chertkov, O., Davenport, K. W., Goodwin, L., Munk, C., Nolan, M. and Woyke, T. (2013) 'Comparative genomics of freshwater Fe-oxidizing bacteria: Implications for physiology, ecology, and systematics', *Frontiers in Microbiology*, 4(SEP), pp. 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2013.00254.

- Everett, K. D., Bush, R. M. and Andersen, A. A. (1999) 'Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family Chlamydiaceae, including a new genus and five new s', *International journal of systematic bacteriology*, 49 Pt 2(1 999), pp. 415–440. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162818.
- Faith, D. P., Lozupone, C. A., Nipperess, D. and Knight, R. (2009) 'The Cladistic Basis for the Phylogenetic Diversity ( PD ) Measure Links Evolutionary Features to Environmental Gradients and Supports Broad Applications of Microbial Ecology ' s “ Phylogenetic Beta Diversity ” Framework', *International Journal of Molecular Sciences*, pp. 4723–4741. doi: 10.3390/ijms10114723.
- Finneran, K. T., Johnsen, C. V. and Lovley, D. R. (2003) 'Rhodoferrax ferrireducens sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III)', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3), pp. 669–673. doi: 10.1099/ijs.0.02298-0.
- Fudou, R., Jojima, Y., Iizuka, T. and Yamanaka, S. (2002) 'Haliangium ochraceum gen. nov., sp. nov. and Haliangium tepidum sp. nov.: novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments.', *The Journal of general and applied microbiology*, 48(2), pp. 109–116. doi: 10.2323/jgam.48.109.
- Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R. and Staley, J. T. (2005) *Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, Volume Two, The Proteobacteria, Part C, The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Second edi.
- Van Der Geize, R. and Dijkhuizen, L. (2004) 'Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications', *Current Opinion in Microbiology*, 7(3), pp. 255–261. doi: 10.1016/j.mib.2004.04.001.
- Gold, T. (1992) 'The deep , hot biosphere', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(July), pp. 6045–6049.
- Goldscheider, N., Hunkeler, D. and Rossi, P. (2006) 'Review : Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods', *Hydrogeology Journal*, 14, pp. 926–941. doi: 10.1007/s10040-005-0009-9.
- Gridneva, E., Chernousova, E., Dubinina, G., Akimov, V., Kuever, J., Detkova, E. and Grabovich, M. (2011) 'Taxonomic investigation of representatives of the genus Sphaerotilus: Descriptions of Sphaerotilus montanus sp. nov., Sphaerotilus hippei sp. nov., Sphaerotilus natans subsp. natans subsp. nov. and Sphaerotilus natans subsp. sulfidivorans subsp. nov., and', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(4), pp. 916–925. doi: 10.1099/ijs.0.023887-0.
- Griebler, C. and Lueders, T. (2009) 'Microbial biodiversity in groundwater ecosystems', *Freshwater Biology*, 54(4), pp. 649–677. doi: 10.1111/j.1365-2427.2008.02013.x.
- Griebler, C., Mindl, B., Slezak, D. and Geiger-kaiser, M. (2002) 'Distribution patterns of attached and

suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers studied with an in situ sediment exposure microcosm', *Aquatic Microbial Ecology*, 28, pp. 117–129.

Hagglblom, M. M., Nohynek, L. J., Palleroni, N. J., Kronqvist, K., Nurmiaho-Lassila, E.-L., Salkinoja-Salonen, M. S., Klatte, S. and Kroppenstedt, R. M. (1994) 'Transfer of Polychlorophenol-Degrading *Rhodococcus chlorophenicus* (Apajalahti et al. 1986) to the Genus *Mycobacterium* as *Mycobacterium chlorophenicum* comb. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3), pp. 485–493. doi: 10.1099/00207713-44-3-485.

Hall, T. A. (1999) 'BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT', *Nucleic Acid Symposium Series*, 41, pp. 95–98.

Han, S. K., Nedashkovskaya, O. I., Mikhailov, V. V., Kim, S. B. and Bae, K. S. (2003) '*Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family Microbacteriaceae from the marine environment', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), pp. 2061–2066. doi: 10.1099/ijs.0.02627-0.

Han, Y. and Perner, M. (2015) 'The globally widespread genus *Sulfurimonas* : versatile energy metabolisms and adaptations to redox clines', *Frontiers in Microbiology*, 6(September), pp. 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2015.00989.

Hazen, T. C., Jimenez, L., Victoria, G. L. De and Fliermans, C. B. (1991) 'Comparison of Bacteria from Deep Subsurface Sediment and Adjacent Groundwater', *Microbial Ecology*, 22, pp. 293–294.

Hedrich, S., Schlömann, M. and Barrie Johnson, D. (2011) 'The iron-oxidizing proteobacteria', *Microbiology*, 157(6), pp. 1551–1564. doi: 10.1099/mic.0.045344-0.

Hirayama, H., Takai, K., Inagaki, F., Nealson, K. H. and Horikoshi, K. (2005) '*Thiobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., an obligately chemolithoautotrophic, thermophilic, sulfur-oxidizing bacterium from a subsurface hot aquifer', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), pp. 467–472. doi: 10.1099/ijs.0.63389-0.

Hoang, V. A., Kim, Y. J., Nguyen, N. L., Min, J. W. and Yang, D. C. (2013) '*Pedobacter ginsengiterrae* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART4), pp. 1273–1279. doi: 10.1099/ijs.0.036376-0.

Hobman, J. L. and Crossman, L. C. (2014) 'Bacterial antimicrobial metal ion resistance', *Journal of Medical Microbiology*, 64, pp. 471–497. doi: 10.1099/jmm.0.023036-0.

Huddleston, J. R. (2014) 'Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract : potential spread of antibiotic resistance genes', *Infection and drug resistance*, 7, pp. 167–176.

Huse, S. M., Dethlefsen, L., Huber, J. A., Welch, D. M., Relman, D. A. and Mitchell, L. (2008) 'Exploring Microbial Diversity and Taxonomy Using SSU rRNA Hypervariable Tag Sequencing', *PLoS Genetics*, 4(11). doi: 10.1371/journal.pgen.1000255.

- Chen, X. G., Geng, A. L., Yan, R., Gould, W. D., Ng, Y. L. and Liang, D. T. (2004) 'Isolation and characterization of sulphur-oxidizing Thiomonas sp. and its potential application in biological deodorization', *Letters in Applied Microbiology*, 39(6), pp. 495–503. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01615.x.
- Chin, K. J., Liesack, W. and Janssen, P. H. (2001) 'Opitutus terrae gen. nov., sp. nov., to accommodate novel strains of the division "Verrucomicrobia" isolated from rice paddy soil', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(6), pp. 1965–1968. doi: 10.1099/00207713-51-6-1965.
- Inglett, K. S., Bae, H. S., Aldrich, H. C., Hatfield, K. and Ogram, A. V. (2011) 'Clostridium chromiireducens sp. nov., isolated from Cr(VI)-contaminated soil', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(11), pp. 2626–2631. doi: 10.1099/ijs.0.024554-0.
- Janssen, P. H. and Schuhmann, A. (1996) 'Disproportionation of inorganic sulfur compounds by the sulfate-reducing bacterium Desulfocapsa thiozymogenes gen. nov., sp. nov.', *Archives Of Microbiology*, 166(3), pp. 184–192.
- Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J. C. and Gillis, M. (1997) 'Transfer of Rhizobium loti, Rhizobium huakuii, Rhizobium ciceri, Rhizobium mediterraneum, and Rhizobium tianshanense to Mesorhizobium gen. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(3), pp. 895–898. doi: 10.1099/00207713-47-3-895.
- Jeon, C. O., Park, W., Ghiorse, W. C. and Madsen, E. L. (2004) 'Polaromonas naphthalenivorans sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from naphthalene-contaminated sediment', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), pp. 93–97. doi: 10.1099/ijs.0.02636-0.
- Jørgensen, N. O. G., Brandt, K. K., Nybroe, O. and Hansen, M. (2009) 'Delftia lacustris sp. nov., a peptidoglycandegrading bacterium from fresh water, and emended description of Delftia tsuruhatensis as a peptidoglycan-degrading bacterium', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(9), pp. 2195–2199. doi: 10.1099/ijs.0.008375-0.
- Kabelitz, N., MacHackova, J., Imfeld, G., Brennerova, M., Pieper, D. H., Heipieper, H. J. and Junca, H. (2009) 'Enhancement of the microbial community biomass and diversity during air sparging bioremediation of a soil highly contaminated with kerosene and BTEX', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(3), pp. 565–577. doi: 10.1007/s00253-009-1868-0.
- Kalmbach, S., Manz, W., Wecke, J. and Szewzyk, U. (1999) 'Aquabacterium gen. nov., with description of Aquabacterium citratiphilum sp. nov., Aquabacterium parvum sp. nov. and Aquabacterium commune sp. nov., three in situ dominant bacterial species from the Berlin drinking water system.', *International journal of systematic bacteriology*, 49 Pt 2(1 999), pp. 769–777. doi: 10.1099/00207713-49-2-769.
- Kant, R., van Passel, M. W. J., Sangwan, P., Palva, A., Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A., del Rio, T. G., Dalin, E., Tice, H., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Chertkov, O., Larimer, F. W., Land, M. L., Hauser, L., Brettin, T. S., Detter, J. C., Han, S., de Vos, W. M., Janssen, P. H. and Smidt, H. (2011) 'Genome sequence of "Pedosphaera parvula" Ellin514, an aerobic verrucomicrobial isolate from pasture soil', *Journal*



- of *Bacteriology*, 193(11), pp. 2900–2901. doi: 10.1128/JB.00299-11.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. and Miyata, T. (2002) ‘MAFFT : a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform’, *Nucleic Acids Research*, 30(14), pp. 3059–3066.
- Keir, R. S. (2010) ‘A note on the fluxes of abiogenic methane and hydrogen from mid - ocean ridges’, *Geophysical Research Letters*, 37(September), pp. 1–5. doi: 10.1029/2010GL045362.
- Kellerman, C. and Griebler, C. (2009) ‘*Thiobacillus thiophilus* sp. nov., a chemolithoautotrophic, thiosulfate-oxidizing bacterium isolated from contaminated aquifer sediments’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(3), pp. 583–588. doi: 10.1099/ijs.0.002808-0.
- Kelly, D. P. and Wood, A. P. (2000) ‘Reclassification of some species of *Thiobacillus* *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus*’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2000), pp. 511–516.
- Kimura, S., Bryan, C. G., Hallberg, K. B. and Johnson, D. B. (2011) ‘Biodiversity and geochemistry of an extremely acidic, low-temperature subterranean environment sustained by chemolithotrophy’, 13, pp. 2092–2104. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02434.x.
- Kishimoto, N., Kosako, Y. and Tano, T. (1991) ‘*Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: An acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment’, *Current Microbiology*, 22(1), pp. 1–7.
- Kodama, Y. and Watanabe, K. (2004) ‘*Sulfuricurvum kujiense* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium isolated from an underground crude-oil storage cavity’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), pp. 2297–2300. doi: 10.1099/ijs.0.63243-0.
- Koch, H., Lückner, S., Albertsen, M., Kitzinger, K., Herbold, C., Spieck, E., Nielsen, P. H., Wagner, M. and Daims, H. (2015) ‘Expanded metabolic versatility of ubiquitous nitrite-oxidizing bacteria from the genus *Nitrospira*.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(36), pp. 11371–6. doi: 10.1073/pnas.1506533112.
- Kojima, H. and Fukui, M. (2010) ‘*Sulfuricella denitrificans* gen. nov., sp. nov., a sulfur-oxidizing autotroph isolated from a freshwater lake’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(12), pp. 2862–2866. doi: 10.1099/ijs.0.016980-0.
- Kojima, H. and Fukui, M. (2011) ‘*Sulfuritalea hydrogenivorans* gen. nov., sp. nov., a facultative autotroph isolated from a freshwater lake’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(7), pp. 1651–1655. doi: 10.1099/ijs.0.024968-0.
- Könneke, M., Bernhard, A. E., de la Torre, J. R., Walker, C. B., Waterbury, J. B. and Stahl, D. a (2005) ‘Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon.’, *Nature*, 437(7058), pp. 543–6. doi: 10.1038/nature03911.

- Koops, H. P., Boettcher, B., Moller, U. C., Pommerening-Roeser, A. and Stehr, G. (1991) 'Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria', *Journal of General Microbiology*, 137, pp. 1689–1699.
- Kristjánsson, J. K., Hjörleifsdóttir, S., Marteinsson, V. T. and Alfredsson, G. A. (1994) 'Thermus scotoductus, sp. nov., a Pigment-Producing Thermophilic Bacterium from Hot Tap Water in Iceland and Including Thermus sp. X-1', *Systematic and Applied Microbiology*, 17(1), pp. 44–50.
- Kwon, S. W., Kim, B. Y., Weon, H. Y., Baek, Y. K. and Go, S. J. (2007) 'Arenimonas donghaensis gen. nov., sp. nov., isolated from seashore sand', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(5), pp. 954–958. doi: 10.1099/ijs.0.64457-0.
- Laplante, K. and Derome, N. (2011) 'Parallel changes in the taxonomical structure of bacterial communities exposed to a similar environmental disturbance', *Ecology and Evolution*, 1(4), pp. 489–501. doi: 10.1002/ece3.37.
- Lee, D. G., Park, J. M., Kang, H., Hong, S. Y., Lee, K. R., Chang, H. B. and Trujillo, M. E. (2013) 'Asinibacterium lactis gen. nov., sp. nov., a member of the family Chitinophagaceae, isolated from donkey (*Equus asinus*) milk', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, pp. 3180–3185. doi: 10.1099/ijs.0.047639-0.
- Lee, J. S., Shin, Y. K., Yoon, J. H., Takeuchi, M., Pyun, Y. R. and Park, Y. H. (2001) 'Sphingomonas aquatilis sp. nov., Sphingomonas koreensis sp. nov. and Sphingomonas taejonensis sp. nov., yellow-pigmented bacteria isolated from natural mineral water', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(4), pp. 1491–1498. doi: 10.1099/00207713-51-4-1491.
- Leeuwenhoek, A. Van (1677) 'Observations, Communicated to the Publisher by Mr. Antony van Leewehoeck, in a Dutch Letter of the 9th of Octob. 1676. Here English'd: concerning little animals by Him observed in Rain-Well-Sea and Snow Water; as also in water wherein Pepper had lain infu', *Philosophical Transactions*, 12, pp. 821–831.
- Lehtovirta-Morley, L. E., Stoecker, K., Vilcinskas, a., Prosser, J. I. and Nicol, G. W. (2011) 'Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), pp. 15892–15897. doi: 10.1073/pnas.1107196108.
- Lepš, J. and Šmilauer, P. (2000) *Mnohorozměrná analýza ekologických dat*. Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.
- Levantesi, C., Rossetti, S., Thelen, K., Kragelund, C., Krooneman, J., Eikelboom, D., Nielsen, P. H. and Tandoi, V. (2006) 'Phylogeny, physiology and distribution of "Candidatus Microthrix calida", a new Microthrix species isolated from industrial activated sludge wastewater treatment plants', *Environmental Microbiology*, 8(9), pp. 1552–1563. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01046.x.
- Li, Y., Ding, K., Wen, X., Zhang, B., Shen, B. and Yang, Y. (2016) 'A novel ammonia-oxidizing archaeon from wastewater treatment plant: Its enrichment, physiological and genomic characteristics', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(March), p. 23747. doi: 10.1038/srep23747.

- Liesack, W., Bak, F., Ju, K. and Stackebrandt, E. (1994) 'Holophaga foetida gen. nov., sp. nov., a new, homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds', *Archives Of Microbiology*, 162(1–2), pp. 85–90.
- Lim, J. H., Baek, S. H. and Lee, S. T. (2009) 'Ferruginibacter alkalilentus gen. nov., sp. nov. and ferruginibacter lapsinanis sp. nov., novel members of the family "chitinophagaceae" in the phylum Bacteroidetes, isolated from freshwater sediment', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), pp. 2394–2399. doi: 10.1099/ijs.0.009480-0.
- Lin, L., Biome, L. C., Lin, L., Wang, P., Rumble, D., Lippmann-pipke, J., Boice, E., Pratt, L. M., Lollar, B. S., Brodie, E. L., Hazen, T. C., Andersen, G. L., Desantis, T. Z., Moser, D. P., Kershaw, D. and Onstott, T. C. (2006) 'Long-Term Sustainability of a high-energy, Low-Diversity Crustal biome', *Science*, 314(479), pp. 479–482. doi: 10.1126/science.1127376.
- Lin, X., Kennedy, D., Fredrickson, J., Bjornstad, B. and Konopka, A. (2012) 'Vertical stratification of subsurface microbial community composition across geological formations at the Hanford Site', *Environmental Microbiology*, 14(2), pp. 414–425. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02659.x.
- Lincoln, S. P., Fermor, T. R. and Tindall, B. J. (1999) 'Janthinobacterium agaricidamnosum s p. n ov., a soft rot pathogen of Agaricus bisporus', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(4), pp. 1577–1589.
- Lovley, D. and Goodwin, S. (1988) 'Hydrogen Concentrations as an Indicator of the Predominant Terminal Electron-Accepting Reactions in Aquatic Sediments', *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 52, pp. 2993–3003.
- Lozupone, C. A. and Knight, R. (2007) 'Global patterns in bacterial diversity', *PNAS*, 104(27), pp. 11436–11440.
- Lozupone, C. and Knight, R. (2005) 'UniFrac : a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities UniFrac : a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities', *Applied and environmental microbiology*, 71(12), pp. 8228–8235. doi: 10.1128/AEM.71.12.8228.
- Martinez-Canovas, M. J. (2004) 'Halomonas ventosae sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, exopolysaccharide-producing bacterium', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), pp. 733–737. doi: 10.1099/ijs.0.02942-0.
- Monciardini, P., Cavaletti, L., Schumann, P., Rohde, M. and Donadio, S. (2003) 'Conexibacter woesei gen. nov., sp. nov., a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class Actinobacteria', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2), pp. 569–576. doi: 10.1099/ijs.0.02400-0.
- Mountfort, D. O., Rainey, F. A., Burghardt, J., Kaspar, H. F. and Stackebrandt, E. (1998) 'Psychromonas antarcticus gen. nov., sp. nov., a new aerotolerant anaerobic, halophilic psychrophile isolated from pond sediment of the McMurdo Ice Shelf, Antarctica', *Archives of Microbiology*, 169(3), pp. 231–238. doi: 10.1007/s002030050566.
- Nakládal, P. (1997) 'DP ČERNUC – Předběžný hydrogeologický průzkum se zaměřením domovních studní,

## KAREL KLINER – VODNÍ ZDROJE’.

Nakládal, P. (2000) *DP Černuc - Vyhodnocení vrtu CJ-1, Karel Kliner – Vodní zdroje.*

Nakládal, P. (2003) *DP Černuc – Zpráva za vybudování monitorovacího systému. Praha: Karel Kliner – Vodní zdroje.*

Nakládal, P. (2008) ‘Zpráva o vrtu JL-2C v Ledčicích’.

Nakládal, P. (2009) *Zpráva o rozšíření monitorovacího systému DP Černuc. – Praha: Karel Kliner – Vodní zdroje.*

Nakládal, P., Hruška, J. and Starosta, A. (2009) ‘DP Černuc – Monitoring vod. Zpráva za rok 2009. Praha: Karel Kliner – Vodní zdroje’.

Nemergut, D. R., Anderson, S. P., Cleveland, C. C., Martin, A. P., Miller, A. E., Seimon, A. and Schmidt, S. K. (2007) ‘Microbial Community Succession in an Unvegetated, Recently Deglaciated Soil’, *Microbial Ecology*, 53, pp. 110–122. doi: 10.1007/s00248-006-9144-7.

Nemergut, D. R., Schmidt, S. K., Fukami, T., O’Neill, S. P., Bilinski, T. M., Stanish, L. F., Knelman, J. E., Darcy, J. L., Lynch, R. C., Wickey, P. and Ferrenberg, S. (2013) ‘Patterns and processes of microbial community assembly’, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(3), pp. 342–356. doi: 10.1128/MMBR.00051-12.

NGWA (2017) ‘Information on Earth’s water - National Groundwater Association’. Available at: <http://www.ngwa.org/Fundamentals/teachers/Pages/information-on-earth-water.aspx>.

Nishimura, Y., Ino, T. and Iizuka, H. (1988) ‘*Acinetobacter radioresistens* sp. nov. Isolated from Cotton and Soil’, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38(2), pp. 209–211. doi: 10.1099/00207713-38-2-209.

Ontiveros-valencia, A., Tang, Y., Zhao, H., Friese, D., Overstreet, R., Smith, J., Evans, P., Rittmann, B. E. and Krajmalnik-brown, R. (2014) ‘Pyrosequencing Analysis Yields Comprehensive Assessment of Microbial Communities in Pilot-Scale Two-Stage Membrane Biofilm Reactors’, *Environmental Science & Technology*.

Pankratov, T. A., Tindall, B. J., Liesack, W. and Dedysh, S. N. (2007) ‘*Mucilaginibacter paludis* gen. nov., sp. nov. and *Mucilaginibacter gracilis* sp. nov., pectin-, xylan and laminarin-degrading members of the family Sphingobacteriaceae from acidic Sphagnum peat bog’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10), pp. 2349–2354. doi: 10.1099/ijms.0.65100-0.

Pech, P., Máca, P., Kuráž, M., Pastuzsek, F. and Kahuda, D. (2014) ‘Udržitelné využívání zásob podzemních vod v ČR - Dílčí zpráva za rok 2014’, *Technologická agentura České republiky, TA - Podpora aplikovaného výzkumu a experimentálního vývoje ALFA.*

Perovic, S. U., De Los Santos, Q. M. B., Rivera, M. C. S. and Pinto, A. J. (2016) ‘voda’, in *Estimating the effect of flow rates and sample volume on investigations of bacterial community diversity in a low biomass*

*aquatic environments.*

Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G. and Laurinavichius, K. (2000) 'Anoxybacillus pushchinensis gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of Anoxybacillus flavithermus comb. nov.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), pp. 2109–2117. doi: 10.1099/00207713-50-6-2109.

Průša, J. (2014) *Vlastislav - jímací území, hydrogeologické posouzení*. Severočeské vodovody a kanalizace.

Qu, J. H. and Yuan, H. L. (2008) 'Sediminibacterium salmoneum gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from sediment of a eutrophic reservoir', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(9), pp. 2191–2194. doi: 10.1099/ijs.0.65514-0.

Qu, J. H., Yuan, H. L., Yang, J. S., Li, H. F. and Chen, N. (2009) 'Lacibacter cauensis gen. nov., sp. nov., a novel member of the phylum Bacteroidetes isolated from sediment of a eutrophic lake', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(5), pp. 1153–1157. doi: 10.1099/ijs.0.003475-0.

Ramamoorthy, S., Sass, H., Langner, H., Schumann, P., Kroppenstedt, R. M., Spring, S., Overmann, J. and Rosenzweig, R. F. (2006) 'Desulfosporosinus lacus sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from pristine freshwater lake sediments', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(12), pp. 2729–2736. doi: 10.1099/ijs.0.63610-0.

Ramirez, M., Obrzydowski, J., Ayers, M., Virparia, S., Wang, M., Stefan, K., Linchangco, R. and Castignetti, D. (2014) 'Pyruvic oxime nitrification and copper and nickel resistance by a cupriavidus pauculus, an active heterotrophic nitrifier-denitrifier', *Scientific World Journal*, 2014. doi: 10.1155/2014/901702.

Rees, G. N. and Patel, B. K. C. (2001) 'Desulforegula conservatrix gen. nov., sp. nov., a long-chain fatty acid-oxidizing, sulfate-reducing bacterium isolated from sediments of a freshwater lake', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 21, pp. 1911–1916.

Reichenbach, H., Lang, E., Schumann, P. and Spröer, C. (2006) 'Byssovorax cruenta gen. nov., sp. nov., nom. rev., a cellulose-degrading myxobacterium: Rediscovery of "Myxococcus cruentus" Thaxter 1897', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(10), pp. 2357–2363. doi: 10.1099/ijs.0.63628-0.

Rooney-varga, J. N., Anderson, R. T., Fraga, J. L. and Lovley, D. R. (1999) 'Microbial Communities Associated with Anaerobic Benzene Degradation in a Petroleum-Contaminated Aquifer', *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), pp. 3056–3063.

Ross, N., Villemur, R., Marcandella, E. and Deschenes, L. (2001) 'Assessment of Changes in Biodiversity when a Community of Ultramicrobacteria Isolated from Groundwater Is Stimulated to Form a Biofilm', *Microbial Ecology*, 42, pp. 56–68. doi: 10.1007/s002480000085.

Rowe, O. F., Sánchez-España, J., Hallberg, K. B. and Johnson, D. B. (2007) 'Microbial communities and geochemical dynamics in an extremely acidic, metal-rich stream at an abandoned sulfide mine (Huelva,

- Spain) underpinned by two functional primary production systems', *Environmental Microbiology*, 9(7), pp. 1761–1771. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01294.x.
- Sahl, J. W., Schmidt, R., Swanner, E. D., Mandernack, K. W., Templeton, A. S., Kieft, T. L., Smith, R. L., Sanford, W. E., Callaghan, R. L., Mitton, J. B. and Spear, J. R. (2008) 'Subsurface Microbial Diversity in Deep-Granitic-Fracture Water in Colorado', *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), pp. 143–152. doi: 10.1128/AEM.01133-07.
- Salter, S. J., Cox, M. J., Turek, E. M., Calus, S. T., Cookson, W. O., Moffatt, M. F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N. J. and Walker, A. W. (2014) 'Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses', *BMC Biology*, 12(1), p. 87. doi: 10.1186/s12915-014-0087-z.
- Santos, P., Pinhal, I., Rainey, F. A., Costa, J., Fields, B., Benson, R., Veríssimo, A., Costa, M. S. and Empadinhas, N. (2003) 'Gamma-Proteobacteria *Aquicella lusitana* gen. nov., sp. nov., and *Aquicella siphonis* sp. nov. Infect Protozoa and Require Activated Charcoal for Growth in Laboratory Media', *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), pp. 6533–6540. doi: 10.1128/AEM.69.11.6533.
- Satsuma, K., Masuda, M. and Sato, K. (2013) 'A role of *Bradyrhizobium elkanii* and closely related strains in the degradation of methoxychlor in soil and surface water environments.', *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 77(11), pp. 2222–7. doi: 10.1271/bbb.130439.
- La Scola, B., Birtles, R. J., Mallet, M. N. and Raoult, D. (1998) '*Massilia timonae* gen. nov., sp. nov., isolated from blood of an immunocompromised patient with cerebellar lesions.', *Journal of clinical microbiology*, 36(10), pp. 2847–2852.
- Segovia, L., Young, J. P. and Martínez-Romero, E. (1993) 'Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov.', *International journal of systematic bacteriology*, 43(2), pp. 374–377. doi: 10.1099/00207713-43-2-374.
- Shelobolina, E., Xu, H., Konishi, H., Kukkadapu, R., Wu, T., Blöthe, M. and Roden, E. (2012) 'Microbial Lithotrophic Oxidation of Structural Fe ( II ) in Biotite', *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), pp. 5746–5752. doi: 10.1128/AEM.01034-12.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Horn, D. J. Van and Weber, C. F. (2009) 'Introducing mothur : Open-Source , Platform-Independent , Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities', *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), pp. 7537–7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09.
- Schmidt, T. M., Arieli, B., Cohen, Y., Padan, E. and Strohl, W. R. (1987) 'Sulfur metabolism in *Beggiatoa alba*.', *Journal of Bacteriology*, 169(12), pp. 5466–5472.
- Song, J., Choo, Y. J. and Cho, J. C. (2008) '*Perlucidibaca piscinae* gen. nov., sp. nov., a freshwater bacterium belonging to the family Moraxellaceae', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), pp. 97–102. doi: 10.1099/ij.s.0.65039-0.

- Stamatakis, A. (2014) 'RAxML version 8 : a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies', *Bioinformatics*, 30(9), pp. 1312–1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.
- Sutcliffe, I. C. (2015) 'Challenging the anthropocentric emphasis on phenotypic testing in prokaryotic species descriptions: Rip it up and start again', *Frontiers in Genetics*, 6(JUN), pp. 6–9. doi: 10.3389/fgene.2015.00218.
- Suzuki, S. and Hiraishi, A. (2007) 'Novosphingobium naphthalenivorans sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium isolated from polychlorinated-dioxin-contaminated environments.', *The Journal of general and applied microbiology*, 53(4), pp. 221–228. doi: 10.2323/jgam.53.221.
- Tan, G., Shu, W., Zhou, W., Li, X., Lan, C. and Huang, L. (2009) 'Seasonal and spatial variations in microbial community structure and diversity in the acid stream draining across an ongoing surface mining site', *FEMS Microbiology Ecology*. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00744.x.
- Thierry, S., Macarie, H., Iizuka, T., Geißdörfer, W., Assih, E. A., Spanevello, M., Verhe, F., Thomas, P., Fudou, R., Monroy, O., Labat, M. and Ouattara, A. S. (2004) 'Pseudoxanthomonas mexicana sp. nov. and Pseudoxanthomonas japonensis sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus Pseudoxanthomonas Finkmann et al. 2000 and of its type species', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), pp. 2245–2255. doi: 10.1099/ijs.0.02810-0.
- Tiago, I., Pires, C., Mendes, V., Morais, P. V., Da Costa, M. and Veríssimo, A. (2005) 'Microcella putealis gen. nov., sp. nov., a Gram-positive alkaliphilic bacterium isolated from a nonsaline alkaline groundwater', *Systematic and Applied Microbiology*, 28(6), pp. 479–487. doi: 10.1016/j.syapm.2005.03.004.
- Van Trappen, S., Tan, T. L., Yang, J., Mergaert, J. and Swings, J. (2004) 'Alteromonas stellipolaris sp. nov., a novel, budding, prosthecate bacterium from Antarctic seas, and emended description of the genus Alteromonas', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), pp. 1157–1163. doi: 10.1099/ijs.0.02862-0.
- Van Trappen, S., Vandecandelaere, I., Mergaert, J. and Swings, J. (2005) 'Flavobacterium fryxelicola sp. nov. and Flavobacterium psychrolimnae sp. nov., novel psychrophilic bacteria isolated from microbial mats in Antarctic lakes', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), pp. 769–772. doi: 10.1099/ijs.0.03056-0.
- Ueki, A., Akasaka, H., Suzuki, D. and Ueki, K. (2006) 'Paludibacter propionigenes gen. nov., sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, propionate-producing bacterium isolated from plant residue in irrigated rice-field soil in Japan', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1), pp. 39–44. doi: 10.1099/ijs.0.63896-0.
- Urzi, C., Salamone, P., Schumann, P., Rohde, M. and Stackebrandt, E. (2004) 'Blastococcus saxobsidens sp. nov., and emended descriptions of the genus Blastococcus Ahrens and Moll 1970 and Blastococcus aggregatus Ahrens and Moll 1970', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), pp. 253–259. doi: 10.1099/ijs.0.02745-0.

- Václavek, V. (1968) *Vyhodnocení hydrogeologického průzkumu v horním povodí Modly u Vlastislavi*. Praha.
- Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R. J., Tettelin, H., Blakeii, R., Eisen, J. A. and Holmesemail, D. S. (2008) 'Acidithiobacillus ferrooxidans metabolism: from genome sequence to industrial applications', *BMC Genomics*, 9(597). doi: 10.1186/1471-2164-9-597.
- Vandamme, P., Gillis, M., Vancanneyt, M., Hoste, B., Kersters, K. and Falsen, E. (1993) 'Moraxella lincolni sp. nov., isolated from the human respiratory tract, and reevaluation of the taxonomic position of Moraxella osloensis', *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 43(0020–7713 (Print)), pp. 474–481. doi: 10.1099/00207713-43-3-474.
- Vandamme, P. and Peeters, C. (2014) 'Time to revisit polyphasic taxonomy', *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 106(1), pp. 57–65. doi: 10.1007/s10482-014-0148-x.
- Vandekerckhove, T. T. M., Willems, A., Gillis, M. and Coomans, A. (2000) 'Occurrence of novel verrucomicrobial species, endosymbiotic and associated with parthenogenesis in Xiphinema americanum-group species (Nematoda, Longidoridae)', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), pp. 2197–2205. doi: 10.1099/00207713-50-6-2197.
- Verhille, S., Baida, N., Dabboussi, F., Izard, D. and Leclerc, H. (1999) 'Taxonomic Study of Bacteria Isolated from Natural Mineral Waters : Proposal of Pseudomonas jessenii sp . nov . and Pseudomonas mandelii sp . nov .', *Systematic and Applied Microbiology*, 22(1), pp. 45–58.
- Větrovský, T. and Baldrian, P. (2013) 'Analysis of soil fungal communities by amplicon pyrosequencing : current approaches to data analysis and the introduction of the pipeline SEED', *Biology and Fertility of Soils*, 49, pp. 1027–1037. doi: 10.1007/s00374-013-0801-y.
- De Vos, P., Kersters, K., Falsen, E., Pot, B., Gillis, M., Segers, P. and De Ley, J. (1985) 'Comamonas Davis and Park 1962 gen. nov., norn. rev. emend., and Cornamonas terrigena Hugh 1962 sp. nov., norn. rev.', *International journal of systematic bacteriology*, 35(4), pp. 443–453.
- Wade, W. (2002) 'Unculturable bacteria—the uncharacterized organisms that cause oral infections', *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95, p. 81. doi: 10.1258/jrsm.95.2.81.
- Wang, E. T., van Berkum, P., Sui, X. H., Beyene, D., Chen, W. X. and Martinez-Romero, E. (1999) 'Diversity of Rhizobia associated with Amorpha fruticosa isolated from Chinese soils and description of Mesorhizobium amorphae sp nov', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1 999), pp. 51–65. doi: 10.1099/00207713-49-1-51.
- Wang, P. L., Lin, L. H., Yu, H. T., Cheng, T. W., Song, S. R., Kuo, L. W., Yeh, E. C., Lin, W. and Wang, C. Y. (2007) 'Cultivation-based characterization of microbial communities associated with deep sedimentary rocks from Taiwan Chelungpu Drilling Project cores', *Terrestrial, Atmospheric and Oceanic Sciences*, 18(2), pp. 395–412. doi: 10.3319/TAO.2007.18.2.395(TCDP).
- Watanabe, T., Kojima, H. and Fukui, M. (2015) 'Sulfuriferula multivorans gen. nov., sp. nov., isolated from



a freshwater lake, reclassification of *Thiobacillus plumbophilus assulfuriferula plumbophilus* sp. nov., and description of sulfuricellaceae fam. nov. and sulfuricellales ord. nov', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(5), pp. 1504–1508. doi: 10.1099/ijs.0.000129.

Watnick, P. (2000) 'MINIREVIEW Biofilm , City of Microbes', *Journal of Bacteriology*, 182(10), pp. 2675–2679.

Wentzien, S. W. and Sand, W. (2004) 'Tetrathionate disproportionation by *Thiomonas intermedia* K12', *Engineering in Life Sciences*, 4(1), pp. 25–30. doi: 10.1002/elsc.200400007.

Weon, H. Y., Kim, B. Y., Hong, S. B., Jeon, Y. A., Koo, B. S., Kwon, S. W. and Stackebrandt, E. (2009) 'Massilia niabensis sp. nov. and Massilia niastensis sp. nov., isolated from air samples', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(7), pp. 1656–1660. doi: 10.1099/ijs.0.006908-0.

Whitman, W. B., Coleman, D. C. and Wiebe, W. J. (1998) 'Perspective Prokaryotes : The unseen majority', *PNAS*, 95(June), pp. 6578–6583.

Whitman, W. B., Parte, A. C., Krieg, N. R., Staley, J. T., Brown, D. R., Hedlund, B. P., Paster, B. J., Ward, N. L. and Ludwig, W. (2010) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Four, The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*. Second edi, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second edi. New York Dordrecht Heidelberg London: Springer. doi: 10.1007/b92997.

Whitman, W. B., Vos, P. De, Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A. and Schleifer, K.-H. (2009) *Bergey's Manual o Systematic Bacteriology, Volume Three, The Firmicutes*. Second edi. Dordrecht Heidelberg London New York: Springer.

Whittaker, R. H. (1960) 'Vegetation of the Siskiyou Mountains , Oregon and California', *Ecological Monographs*, 30(3), pp. 279–338.

Whittaker, R. H. (1972) 'Evolution and Measurement of Species Diversity', *Taxon*, 21(2/3), pp. 213–251.

Wiese, J., Thiel, V., Gärtner, A., Schmaljohann, R. and Imhoff, J. F. (2009) 'Kiloniella laminariae gen. nov., sp. nov., an alphaproteobacterium from the marine macroalga *Laminaria saccharina*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(2), pp. 350–356. doi: 10.1099/ijs.0.001651-0.

Willems, A., Busse, J., Goor, M., Pot, B., Falsen, E., Jantzen, E., Hoste, B., Gillis, M., Kersters, K., Auling, G. and De Ley, J. (1989) 'Hydrogenophaga, a New Genus of Hydrogen-Oxidizing Bacteria That Includes *Hydrogenophaga flava* comb. nov. (Formerly *Pseudomonas flava*), *Hydrogenophaga palleronii* (Formerly *Pseudomonas palleronii*), *Hydrogenophaga pseudoflava* (Formerly *Pseudomonas pseudoflav*', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(3), pp. 319–333. doi: 10.1099/00207713-39-3-319.

Willems, a, Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K. and De Ley, J. (1992) 'Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax*

- konjaci.’, *International journal of systematic bacteriology*, 42(1), pp. 107–119. doi: 10.1099/00207713-42-1-107.
- Williams, R. a, Smith, K. E., Welch, S. G., Micallef, J. and Sharp, R. J. (1995) ‘DNA relatedness of *Thermus* strains, description of *Thermus brockianus* sp. nov., and proposal to reestablish *Thermus thermophilus* (Oshima and Imahori)’ , *International journal of systematic bacteriology*, 45(3), pp. 495–499. doi: 10.1099/00207713-46-2-629.
- Winderl, C., Anneser, B., Griebler, C., Meckenstock, R. U. and Lueders, T. (2008) ‘Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume’ , *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), pp. 792–801. doi: 10.1128/AEM.01951-07.
- Woese, C. R. (1987) ‘Bacterial evolution’ , *Microbiological Reviews*, 51(2), pp. 221–271. doi: 10.1139/m88-093.
- Wolf, A., Fritze, A., Hagemann, M. and Berg, G. (2002) ‘*Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties’ , *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), pp. 1937–1944. doi: 10.1099/ijs.0.02135-0.
- Wolfe, A. L. and Wilkin, R. T. (2017) ‘Evidence of Sulfate-Dependent Anaerobic Methane Oxidation within an Area Impacted by Coalbed Methane-Related Gas Migration’ , *Environmental Science & Technology*, 51, pp. 1901–1909. doi: 10.1021/acs.est.6b03709.
- Yabuuchi, E., Kawamura<sup>2</sup>, Y., Kosako<sup>3</sup>, Y. and Ezaki<sup>2</sup>, T. (1998) ‘Emendation of Genus *Achromobacter* and’ , *Microbiol. Immunol*, 42(6), pp. 429–438.
- Yamada, T., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H. and Kamagata, Y. (2006) ‘*Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the ’ , *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(6), pp. 1331–1340. doi: 10.1099/ijs.0.64169-0.
- Yang, S. Z., Feng, G. Da, Zhu, H. H. and Wang, Y. H. (2015) ‘*Lysobacter mobilis* sp. nov., isolated from abandoned lead-zinc ore’ , *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(3), pp. 833–837. doi: 10.1099/ijs.0.000026.
- Yokota, A., Tamura, T. and Hasegawa, T. (1993) ‘*Catenuloplanes Japonicus* gen nov , sp. nov , nom rev , A New Genus Of The Order Actinomycetales’ , *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(4).
- Yordy, J. R. and Weaver, T. L. (1977) ‘*Methylobacillus*: a new genus of obligately methylotrophic bacteria’ , *International Journal of Systematic Bacteriology*, 27(3), pp. 247–255. doi: 10.1099/00207713-27-3-247.
- Yumoto, I., Iwata, H., Sawabe, T., Ueno, K., Ichise, N., Matsuyama, H., Okuyama, H. and Kawasaki, K. (1999) ‘Characterization of a facultatively psychrophilic bacterium, *Vibrio rumoiensis* sp. nov., that exhibits high catalase activity’ , *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), pp. 67–72.

Zhang, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Hugenholtz, P., Kim, H., Kamagata, Y. and Nakamura, K. (2003) 'Gemmatimonas aurantiaca gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(4), pp. 1155–1163. doi: 10.1099/ijs.0.02520-0.

Zhao, G. Z., Li, J., Qin, S., Zhang, Y. Q., Zhu, W. Y., Jiang, C. L., Xu, L. H. and Li, W. J. (2009) 'Micrococcus yunnanensis sp. nov., a novel actinobacterium isolated from surface-sterilized Polyspora axillaris roots', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), pp. 2383–2387. doi: 10.1099/ijs.0.010256-0.