

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA EKOLOGIE A ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Distribuce metanotrofních bakterií v podélném profilu toku a v hyporheických sedimentech

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Bc. Kristýna Gratzová
Vedoucí práce: doc. RNDr. Martin Rulík, Ph.D.

Olomouc 2013

PALACKY UNIVERZITY IN OLOMOUC
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF ECOLOGY AND ENVIRONMENT

**Distribution of methanotrophic
bacteria along the longitudinal stream
profile and in hyporheic sediments**

Author: Bc. Kristýna Gratzová
Supervisor: doc. RNDr. Martin Rulík, Ph.D.

Olomouc 2013

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Já, níže podepsaná studentka tímto čestně prohlašuji, že text mnou odevzdané závěrečné práce jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace jsem uvedla v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne 1.5. 2013

.....
podpis studentky

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Martinu Rulíkovi, Ph.D., vedoucímu této diplomové práce a Mgr. Pavlíně Badurové, za pomoc při zpracovávání vzorků, poskytnutí odborné literatury, za rady a hlavně za trpělivost.

Dále bych ráda poděkovala rodině za podporu a pomoc při zpracovávání této diplomové práce a přátelům za psychickou podporu.

ABSTRAKT

Gratzová, K.: Distribuce metanotrofních bakterií v podélném profilu toku a v hyporheických sedimentech.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo určit abundanci metanotrofních bakterií na různých velikostních frakcích sedimentu a ve vertikálním profilu sedimentu určené lokality.

Pro analýzu byly vybrány některé rody obou typů metanotrofních bakterií. Pro stanovení celkové abundance bylo použito specifické barvení DAPI a pro analýzu společenstva metanotrofních bakterií fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH).

Byly prokázány rozdíly v upřednostňování různých velikostí sedimentu. Bakterie více upřednostňovaly velikost sedimentu do 1 mm. Prokázána byla i různá distribuce ve vertikálním profilu sedimentu určené lokality.

Klíčová slova:

Metanotrofní bakterie, Fluorescenční in situ hybridizace (FISH), barvení DAPI

ABSTRACT

Gratzová, K.: Distribution of methanotrophic bacteria along the longitudinal stream profile and in hyporheic sediments

The main objective of this thesis was to determine the abundance of methanotrophic bacteria in different size fraction of the sediment and sediment in the vertical profile for identified location.

For the analysis were chosen some genera of both types of methanotrophic bacteria. To determine the total abundance was used specific DAPI staining and analysis of communities of methanotrophic bacteria by fluorescence in situ hybridization (FISH).

There have been demonstrated differences in preference for different sizes of sediment. The bacteria preferred more size of the sediment up to 1 mm. There has been also approved different distribution in the vertical profile of the sediment of designated locations.

Keywords: Methanotrophic bacteria, Fluorescent in situ hybridisation (FISH), DAPI staining

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. METAN	10
3. METANOTROFNÍ BAKTERIE	11
3.1. Obecná charakteristika bakterií	11
3.2. Charakteristika metanotrofních bakterií	12
3.3. Taxonomie metanotrofních bakterií.....	12
3.4. Oxidace metanu aerobními metanotrofy.....	14
3.5. Oxidace metanolu aerobními metanotrofy	15
3.6. Formaldehyd	15
4. EKOLOGIE METANOTROFNÍCH BAKTERIÍ	17
4.1. Obecné charakteristiky výskytu metanotrofních bakterií	17
4.2. Výskyt metanotrofních bakterií	18
4.3. Metanotrofní bakterie v extrémních podmínkách.....	19
5. CÍLE PRÁCE	21
6. LOKALITA	22
7. MATERIÁL A METODIKA	24
7.1. Odběr vzorků	24
7.2. Příprava vzorku.....	24
7.3. Barvení DAPI	25
7.4. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)	26
8. VÝSLEDKY	31
8.1. Abundance bakterií na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu	31
8.2. Vertikální distribuce kyslíku a metanu	38
8.3. Abundance bakterií ve vertikálním profilu sedimentu na lokalitě č. 4.....	39
9. DISKUZE	43
9.1. Abundance metanotrofních bakterií na velikostních frakcích sedimentu.....	44
9.2. Abundance metanotrofních bakterií ve vertikálním profilu sedimentu	46
10. ZÁVĚR	48
SEZNAM OBRÁZKŮ	59
SEZNAM TABULEK	60
SEZNAM GRAFŮ	61

1. ÚVOD

Bakterie jsou organismy, hrající velkou roli v rozkladu různých látek v ekosystémech naší planety. Nalezneme je všude. Šíří se vzduchem, prostřednictvím jiných organismů, vodou, atd.

Ani sediment vodních toků není výjimkou. Nachází se v něm nespočetné množství bakterií, které hrají důležitou roli například v tzv. mikrobiální smyčce, samočištění toku, koloběhu různých prvků (dusík, uhlík, síra...), ale důležitou roli hrají i v kontaminaci toku různými patogenními a potencionálně patogenními bakteriemi.

Tato práce se zabývá metanotrofními bakteriemi, které jsou význané tím, že pohlcují metan, což je jeden z významných skleníkových plynů.

Vzorky sedimentu byly odebírány z nížinného toku Sitka, který se nachází nedaleko Olomouce. Již dřívější průzkumy metanu na této řece dokázaly, různé distribuce metanu v sedimentu v různých časových a prostorových parametrech.

Metan v sedimentech může vznikat tzv. metanogenezí. Metanogenní bakterie se řadí k obligátně anaerobním bakteriím, které přispívají k tvorbě tohoto plynu. Avšak množství plynu, které je uvolňované do atmosféry je mnohem menší než množství vyprodukované metanogenezí, a to proto, že v sedimentech jsou přítomné metanotrofní bakterie, pro které je metan jediným zdrojem uhlíku a energie.

Cílem mé práce bylo určit počty metanotrofních bakterií typu I a II na určitých velikostních frakcích sedimentu a také počet ve vertikálním profilu sedimentu toku na určené lokalitě.

Vzorky byly z řeky odebírány tzv. freeze-core metodou, díky níž jsme získali vzorky sedimentu v jeho původní neporušené struktuře. Pro stanovení početnosti jsem použila fluorescenční barvivo (DAPI) a fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH). Díky tomu jsem pak mohla stanovit určité skupiny metanotrofních bakterií ve vertikálním gradientu sedimentu a na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu. Určované skupiny bakterií byly *Eubacteria*, *Alfaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, metanotrofní bakterie typu I, metanotrofní bakterie typu II, rody *Methylobacter* a *Methylocystis*.

2. METAN

Tento bezbarvý plyn má na světě velmi širokou distribuci. Metan je vedle oxidu uhličitého druhou nejhojnější sloučeninou v atmosféře. Jeho koncentrace ročně stoupá o 1%. Doba zdržení toho plynu v atmosféře je zhruba 9 let (Murrel, 2007; Conrad, 2007).

Metan se do atmosféry dostává jako produkt rozkladu biologických látek, nebo jako produkt metabolismu různých mikroorganismů. Vzniká třemi různými způsoby: tepelným rozkladem organické hmoty, syntézou anorganických sloučenin bez přispění živých tvorů a metabolickou aktivitou mikroorganismů. Největšími zdroji metanu jsou mokřady, rýžová pole a fermentace organismů. Zhruba 90% metanu v atmosféře vzniká díky aktivitě mikroorganismů a zbytek pochází z geologických aktivit (Murrel, 2007; Srivastava, 1998).

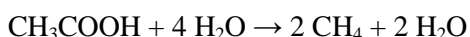
Metan je plyn schopný absorbovat infračervené záření, proto je také významným skleníkovým plynem, který zvyšuje zemskou teplotu. Jeho obsah v atmosféře je zhruba devětkrát menší než obsah CO₂. I přesto, že metanu je v atmosféře mnohem méně než oxidu uhličitého, je skleníkový účinek molekul metanu zhruba sedm až osmkrát větší, než u molekul oxidu uhličitého (Mc Donald, 2008).

Metan vzniklý produkcí mikroorganismů je produktem anaerobního dýchání a fermentace obligátně anaerobních bakterií – metanogenů. Metanogeny jsou organismy patřící do domény *Archaea*, které se vyskytují v anaerobním prostředí. Produkcí metanogenních bakterií vzniká celkově asi 69% metanu (Borrel, 2011).

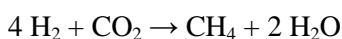
Takto vzniklý metan je spotřebováván metanotrofními bakteriemi. Metanotrofní bakterie využívají jak metan čerstvě vyprodukovaný procesem metanogeneze, tak i přítomný v atmosféře (Conrad, 2007). Celkově jsou metanotrofní bakterie schopné spotřebovat 30-99% metanu vzniklého metanogenezí.

Metanogenezí se tento plyn tvoří třemi nejčastějšími způsoby:

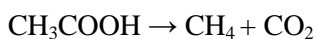
1. Redukce kyseliny octové na metan a vodu



2. Redukce oxidu uhličitého pomocí vodíku na metan a vodu



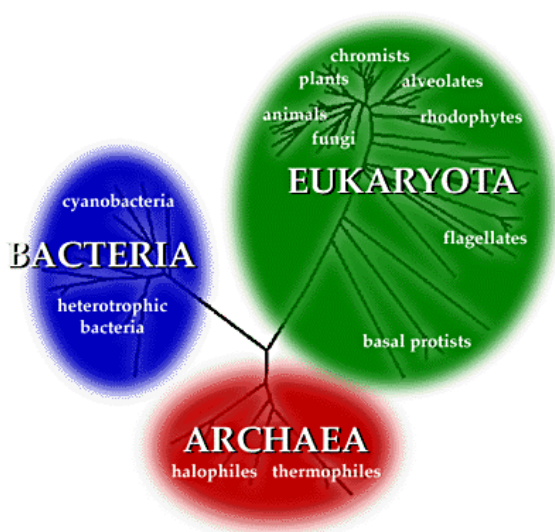
3. Rozkladem kyseliny octové na metan a oxid uhličitý



3. METANOTROFNÍ BAKTERIE

3.1. Obecná charakteristika bakterií

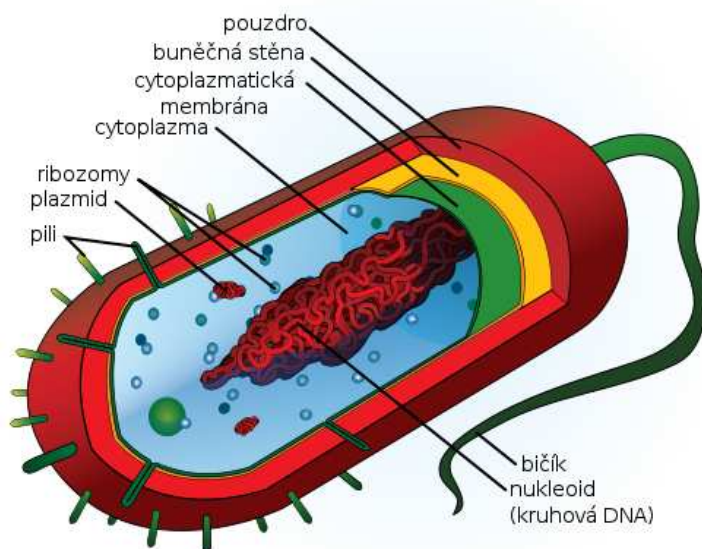
Celkově organismy dělíme na 3 domény: *Bacteria*, *Archaea* a Eucaryota (Obr. č. 1). Skupiny *Bacteria* a *Archaea* jsou jednobuněčné organismy. Obě tyto skupiny se od sebe liší stavbou cytoplazmatické membrány, buněčnou stěnou a některými metabolickými procesy (Collins, 1999).



Obr. č. 1: Tři domény organismů (Collins, 1999)

Bakterie jsou charakterizovány těmito znaky:

- Mají buněčnou stěnu (Obr. č. 2)
- Jejich velikost i tvary jsou různé
- Nemají mitochondrie ani plastidy
- Nukleotid je tvořen jednou molekulou kružnicové DNA
- Rozmnožují se pohlavně i nepohlavně (nepohlavně pučením nebo binárním dělením)
- Mohou být autotrofní nebo heterotrofní
- Jsou součástí různých koloběhů prvků (koloběh dusíku, uhlíku, síry...)
- Pohybují se pomocí bičíku nebo klouzavým pohybem
- Mnoho z nich je patogeních (Rozsypal et al. 2003)



Obr. č. 2: Stavba bakterie (Šípek jr. [online], cit. 15.2. 2013)

3.2. Charakteristika metanotrofních bakterií

Většina vzniklého metanu je oxidována metanotrofními bakteriemi, pouze malá a část se dostává do atmosféry. Tyto bakterie využívají metan jako jediný zdroj uhlíku a jako jediný zdroj energie. Využívají pouze jednouhlíkaté sloučeniny, jako jsou metan, metanol nebo například denaturované aminy (Hanson a Hanson, 1996).

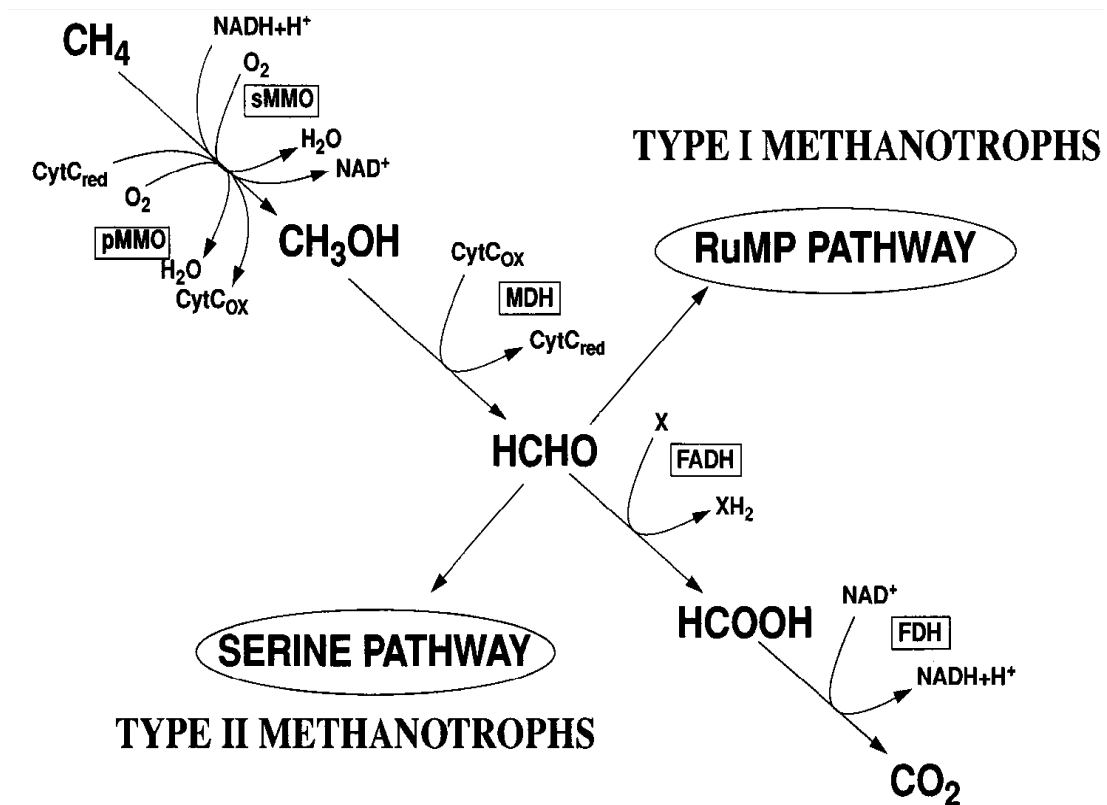
3.3. Taxonomie metanotrofních bakterií

Metanotrofní bakterie jsou gram negativní bakterie patřící do kmene *Proteobacteria*. Rozdělujeme je do dvou typů na základě fyziologických, biochemických i fylogenetických rozdílů (Hanson a Hanson, 1996; Conrad, 2007).

Čeď *Methylococcaceae* (typ I) patří do *Gammaproteobacteria* s druhy *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylomicrobium*, *Methylomonas*, *Methylosphaera*, *Methylocaldum*, *Methylosarcina*. Druhým typem je čeď *Methylocystaceae* (typ II) patřící do *Alfaproteobacteria* s druhy *Methylosinus*, *Methylocella*, *Methylocapsa* a *Methylocystis*. Oba typy jsou rozděleny na základě fylogeneze genu pro 16S ribozomální RNA, asimilační dráhy uhlíku, profilu mastných kyselin a stavby vnitřní buněčné membrány (Hanson a Hanson, 1996).

Metanotrofní bakterie typu I využívají pro asimilaci uhlíku RuMP dráhu (Ribulosomonofosfát) (Obr. č. 3). Mastné kyseliny mají 14 nebo 16 uhlíků. Jejich buňky se obvykle vyskytují samostatně a mají většinou kokální tvar. V některých případech mohou tvořit cysty. Tento typ je také více fylogeneticky různorodý (Hanson a Hanson, 1996; Conrad, 2007).

Metanotrofní bakterie typu II využívají pro asimilaci uhlíku serinovou dráhu (Obr. č. 3). Mastné kyseliny mají obvykle 18 uhlíků. Jsou schopné fixovat dusík a v některých případech mohou tvořit cysty nebo spory. Jejich buňky jsou většinou tyčinkovité nebo hruškovité a jsou uspořádané v růžicích. Metanotrofní bakterie typu II jsou většinou druhy rašelinišť a lesních půd (Hanson a Hanson, 1996).



Obr. č. 3: Různé dráhy oxidace metanu u obou typů metanotrofních bakterií (Hanson a Hanson, 1996)

Oba typy mají charakteristický systém vnitřních membrán, kde dochází k oxidaci metanu a jsou také rozdílné ve způsobu fixace formaldehydu (Hanson a Hanson, 1996; Conrad, 2007; Murrel et al., 1998).

K metanotrofním bakteriím patří také typ X, který je svou strukturou podobný typu I, tyto bakterie však rostou při jiných teplotách a mají tvar koků, které se vyskytují často v páru. Pro asimilaci uhlíku využívají tzv. RuMP dráhu. Mastné kyseliny mají 14 uhlíků, řadíme je do *Betaproteobacteria*. V některých literárních zdrojích je tato skupina přiřazována k metanotrofním bakteriím typu I (Hanson a Hanson, 1996; Conrad, 2007).

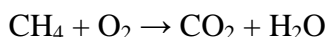
Metanotrofní bakterie mohou být jak aerobní tak anaerobní. Anaerobní metanotrofní bakterie prozatím nebyly izolovány a metan oxidují na oxid uhličitý s použitím sulfátů nebo dusičnanů, jako akceptoru elektronů pro oxidaci metanu (Schubert et al., 2006).

Aerobní metanotrofní bakterie mají k oxidaci metanu speciální enzymy a je nutný dostatek kyslíku a metanu v prostředí (Borrel, 2011). Meziprodukty oxidace jsou metanol, formaldehyd a formiát (Hanson a Hanson, 1996).

Aerobní metanotrofní bakterie jsou v životním prostředí široce rozšířeny. Podílejí se na snižování množství metanu, který uniká do atmosféry, čímž také snižují dopad na globální oteplování. Byly izolovány z mnoha prostředí, jako například sladkovodních a mořských prostředí, půdy, sedimenty, kyselých rašelinišť, rýžová pole, skládkami, alkalických soda jezer, horké prameny, chladné prostředí, a to i od vysoce kyselých teplomilných prostředí (Chen a Murrel, 2009).

3.4. Oxidace metanu aerobními metanotrofy

Oxidace metanu závisí hlavně na dostupnosti metanu a kyslíku (Borrel, 2011). Při této reakci je metan donorem elektronů a zdrojem uhlíku a kyslík akceptorem elektronů. Oxidaci metanu můžeme vyjádřit zjednodušenou rovnicí:

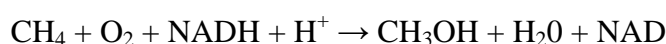


Celý proces oxidace je však složitější. Katalyzátorem oxidace metanu je enzym MMO (Metan monooxygenáza), který urychluje oxidaci metanu k metanolu. Tento enzym se vyskytuje ve dvou formách pMMO a sMMO. Formu cytoplazmatickou, rozpustnou, vyskytující se hlavně u metanotrofních bakterií typu II a některých X označujeme jako

sMMO. sMMO je kódována *mmoX* genem. Membránově vázaná forma pMMO je kódována genem *pmoA* a vyskytuje se u většiny metanotrofních bakterií (výjimkou je rod *Methylocella*, který obsahuje pouze sMMO) (Hanson a Hanson, 1996; Murrel et al., 1998; Conrad, 2007) .

Metanotrofní bakterie s pMMO mají na metanu vyšší růstové výnosy a stejně tak mají i lepší vztah k metanu než buňky s sMMO, jelikož reakce katalyzována enzymem sMMO vyžaduje jako elektronového dárce NADH a H⁺.

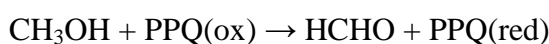
Obecně můžeme oxidaci metanu na metanol vyjádřit rovnicí:



3.5. Oxidace metanolu aerobními metanotrofy

K oxidaci metanolu může docházet jak z endogenního zdroje (metan je oxidován přes MMO) nebo exogenního zdroje. K oxidaci metanolu (CH₃OH) na formaldehyd (HCHO) je zapotřebí katalyzujícího plasmatického enzymu MDH (metanol dehydrogenáza). MDH má malou a velkou dílčí jednotku a je univerzálním genem pro metanotrofní bakterie. Elektrony z MDH jsou přeneseny na cytochrom CL a pak jsou teprve oxidovány v periplasmě. MDH je kódován genem *mxaF* (Hanson a Hanson, 1996).

Obecně můžeme oxidaci metanolu vyjádřit rovnicí: (PPQ je pyrolochinolin chinin)



3.6. Formaldehyd

Vyprodukovaný formaldehyd je zabudován do různých organických sloučenin. Je využíván pro biosyntézu z buněčného materiálu. K oxidaci formaldehydu je zapotřebí formaldehyd dehydrogenáza. Vzniklý formiát je pak rozložen na oxid uhličitý a vodu.

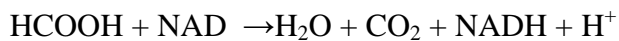
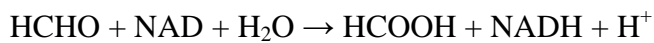
Formaldehyd je využíván dvěma cestami:

1. Serinová cesta – buňky využívající tuto cestu mají již funkční TCA cykly a mají vnitřní membrány typu II

2. RuMP cesta (ribuloso monofosfátová cesta) – mají neúplné TCA cykly a vnitřní membrány typu I

Při využití formaldehydu serinovou cestou jsou všechny atomy uhlíku pro buněčný materiál odvozeny z formaldehydu a formaldehyd je stále ve stejném stavu, aby mohl být použit k dalším biosyntetickým reakcím. Při serinové cestě je důležitý pouze jeden unikátní enzym, čímž je serin hydroxymetyláza. Při využití formaldehydu RuMP cestou je formaldehyd zpracováván ve třech fázích, je zapotřebí velké množství energie a důležité jsou dva enzymy Hexulozofosfát syntetáza a hexuloso-6P syntetáza (Hanson a Hanson, 1996).

Rovnice rozložení formaldehydu na oxid uhličitý a vodu:



4. EKOLOGIE METANOTROFNÍCH BAKTERIÍ

4.1. Obecné charakteristiky výskytu metanotrofních bakterií

Metanotrofní bakterie je skupina mikroorganismů, které využívají metan jako jediný zdroj uhlíku a energie (Murrell et al, 1998; McDonald, 1994, Cen et al., 2007). Tyto mikroorganismy jsou již dlouhou dobu předmětem různých výzkumů.

Výskyt metanotrofních bakterií je velmi hojný (Conrad, 2007). Vyskytují se jak v půdách, rašeliništích, skládkách, rýžových polích, tak i v sedimentech různých vodních prostředí (Hanson a Hanson, 1996; Holmes 1999). Patří rovněž ke známým endosymbiontům slávek (Hanson a Hanson, 1996). Tyto bakterie byly izolovány také ze znečištěných vod, usazenin nebo ropných vrtů (Heyer, 2002).

Jejich existence a distribuce je ovlivněna různými faktory. K hlavním faktorům patří množství kyslíku, metanu, dusíku a také pH prostředí. Kromě toho je také důležité množství živin v prostředí a vlhkost půdy (Dubey, 2003). Dalším faktorem je i intenzita světla. Metanotrofní bakterie s rostoucí intenzitou světla potlačují svůj růst i svou aktivitu (Dumestre, 1999). Důležité při výskytu metanotrofních bakterií je i množství mědi. Při dostatku Cu produkují metanotrofní bakterie enzym pMMO, zatímco při jeho nedostatku sMMO (Durisch-Kaiser, 2005).

Metanotrofní bakterie vyžadují dostupnost kyslíku pro oxidaci metanu, ale jsou schopni přežít období s nedostatkem kyslíku i metanu (Roselev, 1995). Metanotrofní bakterie typu I preferují nízké koncentrace metanu a vysoké koncentrace kyslíku, zatímco u metanotrofních bakterií typu II je to naopak (Conrad, 2007; Wu, 2009; Wang, 2007). V půdách najdeme největší množství ve vrchní vrstvě (Cébron, 2007). V eutrofních jezerech zase na rozhraní vodního sloupce – rozhraní oxického a anoxického prostředí (Miguez, 1999).

Metanotrofní bakterie mohou hrát důležitou roli nejen v koloběhu uhlíku, ale také v koloběhu dusíku. Metanotrofní bakterie typu II jsou schopné poutat vzdušný dusík, typ I schopný poutání dusíku není (Auman, 2001).

4.2. Výskyt metanotrofních bakterií

Je dokázáno, že metanotrofní bakterie typu II se více vyskytují v půdách, zatímco typ I ve vodním prostředí (Singh, 2007). Také se vyskytují v prostředí, kde se množství kyslíku a živin může měnit (Roselev, 1995).

Nejvýznamnějším zdrojem atmosferického metanu jsou mokřady (Yun, 2010). Mokřiny přispívají k produkci přibližně 15-20 % celkového atmosferického metanu (McDonald, 1994). V mokřadech je výskyt metanotrofních bakterií ovlivněn i půdním typem, hloubkou vody nebo typem rostlinstva.

Někteří autoři tvrdí, že jezera odpovídají za vznik malého množství atmosferického metanu a řeky jsou považovány za bezvýznamný zdroj (Hanson a Hanson, 1996). Jiní zase, že jezera, ačkoli pokrývají pouze 0,9% zemského povrchu, patří k hlavním zdrojům atmosferického metanu, protože přispívají zhruba 6-16% (Borrel, 2011).

Oceány patří k menším zdrojům atmosferického metanu a nejvyšší koncentrace najdeme v povrchových vodách (Hanson a Hanson, 1996). Příspěvek množství metanu z mořských ekosystémů je pouhé 1% (Borrel, 2011).

Rozdíly jsou také v počtech metanotrofních bakterií mezi oxickým a anoxickým prostředím v moři. Mikrobiální společenstvo bakterií je v anoxické vodě mnohem menší než ve vodě oxické. Oxické prostředí moří se vyznačuje výskytem až 90% metanotrofních bakterií z celkového počtu bakteriálního společenstva v této části (Durisch-Kaiser, 2005).

Některé studie ukazují, že druhové složení metanotrofních bakterií se měnilo v průběhu vývoje glaciálního jezera a dnes se zde vyskytují jak druhy typické pro sladké vody, tak druhy mořské (Coolen, 2004).

Druhové složení metanotrofních bakterií v půdě může být závislé také na aktivitě žížal (Kumaresan, 2011). Na výskyt metanotrofních bakterií má také vliv zalesnění nebo zalesňování pastvin. Bylo prokázáno, že metanotrofní bakterie typu I se více vyskytují na pastvinách, a typ II zase na zalesněných půdách s křovinami a borovicemi (Singh, 2007).

4.3. Metanotrofní bakterie v extrémních podmínkách

Metanotrofní bakterie mohou žít ve všech typech prostředí a vyskytují se i v extrémních prostředích (Conrad, 2007; Trotsenko a Khmelenina, 2002).

Většina metanotrofních bakterií je mezofilních a neutrofilních. Což znamená, že optimální teplota, při které rostou je 25°C a pH 6-7. Mnoho z těchto bakterií však odolává a přizpůsobuje se různým extrémním podmínkám. Přizpůsobily se jak vysokým, tak nízkým teplotám, různému pH i slanosti. (Trotsenko a Khmelenina, 2002).

Pro život v extrémních podmínkách se u různých zástupců vyvinuly různé strukturně-funkční mechanismy. U extrémních zástupců rozlišujeme zástupce extremofilní, kteří extrémní podmínky vyžadují a extremotolerantní, kteří je nevyžadují, ale jsou schopni jim odolat (Trotsenko a Khmelenina, 2002).

Příkladem jsou druhy *Methylococcus capsulatus* a *Methylothermus thermalis*, jejichž optimální teplota růstu se pohybuje kolem 45-55°C. Dalším extrémním případem je zástupce rodu *Methylocaldum* vyskytující se v termálních pramenech s teplotou až do 72°C (Trotsenko a Khmelenina, 2002).

Opačným případem jsou bakterie psychrofilní a psychrotolerantní. Patří zde někteří zástupci rodů *Methylobacter*, *Methylococcus* nebo *Methylosphaera*, které byly izolovány ze Sibiřské tundry, odolávající extrémně nízkým teplotám (Trotsenko a Khmelenina, 2002).

Z příkladů extrémních pH bych uvedla druhy *Methylocapsa* rostoucí při pH 5-5,5, *Verrucomicrobia* při pH 2-2,5 nebo rody *Methylomicrobium* a *Methylobacter* rostoucí při pH 9-10. Typickým příkladem acidofilní metanotrofní bakterie je *Methylocella palustris* (Kaluzhnaya, 2001; Trotsenko a Khmelenina, 2002).

Některé druhy žijící v suchých prostředích jsou velmi náchylné na vysychání. Což znamená, že přežijí pouze druhy, které jsou schopné adaptovat se na stresové podmínky a následně opět na podmínky optimální. Buňky jsou na vysychání adaptované extracelulárním polysacharidovým pláštěm, který zadržuje vodu. Díky tomuto plášti je buňka schopná zachovat si svou strukturu v době vysychání. Mnohé druhy jsou na nepříznivé podmínky adaptovány tvorbou cyst (Trotsenko a Khmelenina, 2002).

Rozdíly v počtech i distribuci metanotrofních bakterií ve vertikálním profilu půdy i sedimentů, jsou závislé také na tom, zda-li tyto bakterie využívají atmosferický metan nebo metan produkovaný metanogeny. Studie ukazují, že rozdíly v distribuci i počtech jsou

pouze tehdy, když metanotrofní bakterie využívají metan produkovaný metanogenními bakteriemi. Kromě produkce je opět důležité množství kyslíku a také pH prostředí (Chen, 2007; Schubert, 2006; Singh, 2007).

5. CÍLE PRÁCE

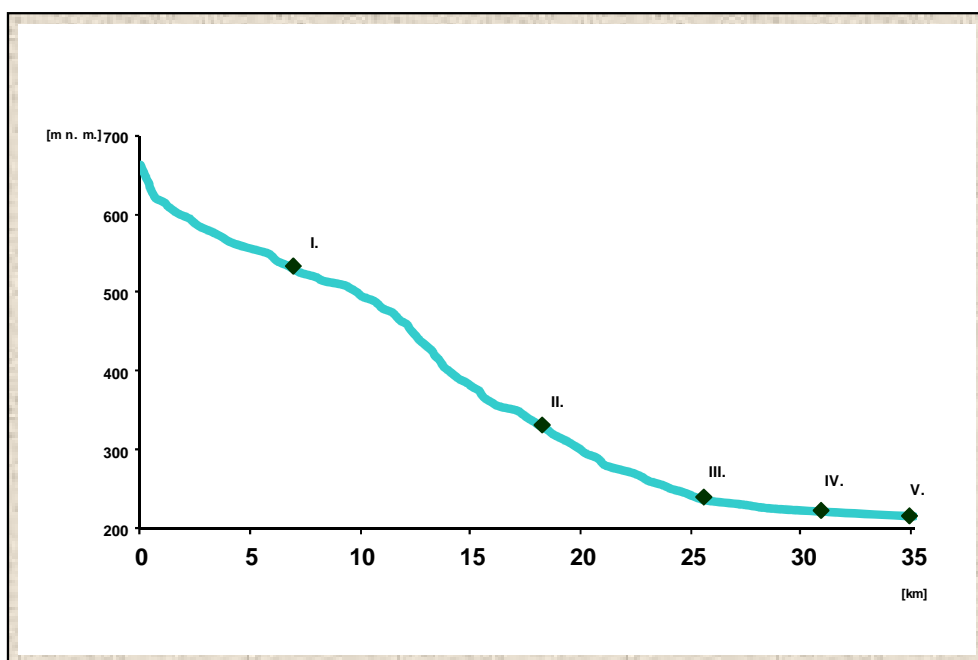
Cílem této práce bylo:

1. Určit počty buněk metanotrofních bakterií typu I a II na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu na všech lokalitách
2. Určit počty buněk metanotrofních bakterií typu I a II v celkovém společenstvu mikroorganismů (DAPI) ve vertikálním profilu sedimentu na lokalitě č. 4
3. Určit počty buněk vybraných rodů metanotrofních bakterií typu I a II na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu na všech lokalitách
4. Určit počty buněk vybraných rodů metanotrofních bakterií typu I a II v celkovém společenstvu (DAPI) ve vertikálním profilu sedimentu na lokalitě č. 4

6. LOKALITA

Vzorky byly odebírány na řece Sitka. Tento tok pramení pod vrcholem kopce Stránský vrch (723 m.n.m) v oblasti Nížkého Jeseníku. Patří k tokům druhého řádu. Jeho délka je 35 km. Protéká obcemi Veveří a Hůzová. Dále pak Šternberk, kde je již koryto řeky upraveno a regulováno. Významnými přítoky jsou Veverský potok a Grygava. U obce Chomoutov se vlévá do Oskavy, která se dále, po přibližně půl kilometru vlévá do řeky Moravy (Turistika.cz [online], cit 1.5.2013).

Na této řece bylo zvoleno 5 lokalit (obr. č. 4), kde byly vzorky odebírány. Z hlediska produkce metanu je nejvýznamnější lokalita č.4 (tab č. 1). Na této lokalitě je dno bez vegetace a je tvořeno převážně písčitým až jílovitým substrátem. V předchozích studiích zde byly naměřené největší množství metanu a nejnižší hodnoty kyslíku, což dokazuje, že z hlediska produkce metanu je tato lokalita významnější než zbývající lokality. Proto se v této práci zaměřujeme na hodnocení abundance a vertikální distribuce metanotrofních bakterií zejména u této lokality.



Obr. č. 4: Jednotlivé lokality na řece Sitka

Tab. č. 1: Charakteristika jednotlivých lokalit a u nich naměřené hodnoty

Lokalita	1	2	3	4	5
Geografická poloha	49°49'27.782"N 17°18'47.528"E	49°45'53.953"N 17°19'5.141"E	49°42'46.109"N 17°15'36.225"E	49°40'43.709"N 17°14'49.025"E	49°38'7.977"N 17°14'37.068"E
Hlavní složka dna	Štěrk	Štěrk	Štěrk	Písek – jíł	Štěrk - jíł
Medián velikosti zrn [mm]	12,4	12,9	13,2	0,2	5,4
Organický uhlík v sedimentu < 1mm [%]	0,9	0,9	0,6	0,8	0,7
Nasycení intersticiálním rozpuštěným kyslíkem [%]	80,5	88,1	82,3	38,5	50,9
Fe ²⁺ [mg/l]	<1	<1	1,8	8,1	4,2
Intersticiální koncentrace metanu [μg/l]	4,9	0,7	8,1	2480,2	42,8
Metanogenní potenciál [μg CH ₄ / kg DW/den]	6,6	1,9	2,9	80,7	9,7

7. MATERIÁL A METODIKA

7.1. Odběr vzorků

Pro analýzu mikrobiálního osídlení na různých velikostních frakcích sedimentu jsme odebírali vzorky na všech lokalitách. Odběr byl proveden lopatkou z povrchové vrstvy sedimentu, takže jsme odebírali sediment z hloubky přibližně 0-10 cm. Vzorky byly poté přesety přes síta s oky různých velikostí, abychom získali požadované velikostní frakce sedimentu. Pro náš výzkum jsme zvolili frakce sedimentu 0-1 mm, 1-3 mm a 3-6 mm, které byly dále zpracovávány v laboratoři

U vertikálního profilu jsme vybrali pouze lokalitu č. 4. A to z důvodu, že je celkově odlišná od ostatních lokalit, ať už ve složení sedimentu, tak v množství produkovaného metanu i jiných měřených hodnotách (tab. č. 1).

U této lokality byly již dříve měřeny různé fyzikálně-chemické parametry, jako množství kyslíku a metanu v jednotlivých hloubkách sedimentu (obr. č. 6). Poté byly teprve odebírány vzorky pomocí namražovací sondy, tzv. freeze-core metodou. Sonda se skládá z kovové trubice, která je do sedimentu zaražena pomocí palice. Do trubice se poté nalévá tekutý dusík, díky kterému se sediment namrazí k povrchu sondy. Ze sondy jsou poté odebírány vzorky po 10 cm. Celkově tedy bylo na každé lokalitě odebráno 5 vzorků, tj. vrstvy 0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm, 30-40 cm a 40-50 cm. Po přesetí přes síta byla získána frakce sedimentu < 1 mm, která byla použita pro další výzkum.

7.2. Příprava vzorku

Do falkonu jsem dala přibližně 10 ml předchystaného sedimentu a přidala 10 ml fyziologického roztoku (0,9% roztok NaCl). Vzorky byly poté sonifikovány 3x po dobu 30 sekund, při síle 15%.

Sonifikací se rozumí použití ultrazvuku, který rozruší agregáty sedimentů a oddělí bakterie od povrchu sedimentu. Při správné síle a délce použití nedochází k narušování buněk.

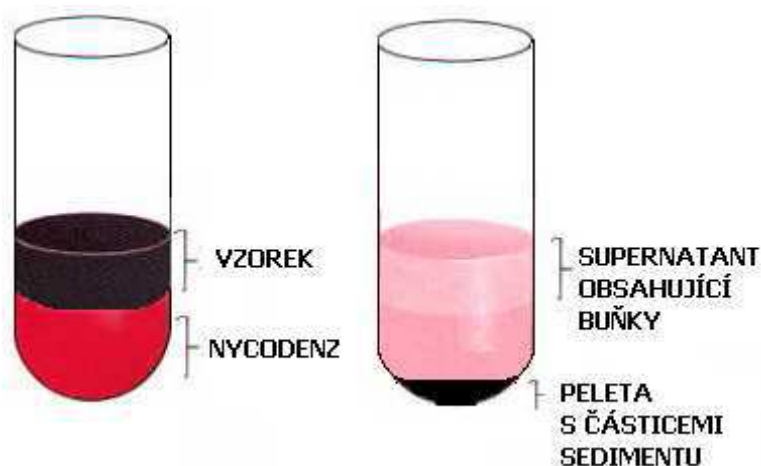
K sonifikovaným vzorkům dále přidáme 150 μ l TRITONu a umístíme do třepačky na dobu 6 hodin. Po protřepání z každého vzorku odebereme 8 ml sedimentu a přidáme

4 ml NYCODENZ, který do falkonu nanášíme dlouhou injekční stříkačkou, aby došlo k navrstvení vzorku (obr. č. 5).

Takto připravené vzorky necháme centrifugovat při maximálním výkonu asi 1 hodinu. Hustotní centrifugace pomůže oddělit částice na základě různé hustoty částic a vzorek se navrství (obr. č. 5).

Z každého vzorku poté odebereme supernatant – 8 ml, ze kterého dále odebíráme jednotlivé vzorky ke zpracování a zbytek uchováváme po určitou dobu v mrazničce.

Do filtrační aparatury (Millipore, Německo) napipetujeme přibližně 1 ml vzorku. Přidáme 2ml destilované vody a zfiltrujeme přes membránový filtr (Millipore, 0,2 μm GTTP, Německo). Jednotlivé filtry rozřezeme a dobře označíme.



Obr. č. 5: Vlevo navrstvení vzorku po přidání Nycodenz a vpravo navrstvení vzorku po hustotní centrifugaci

7.3. Barvení DAPI

Abych zjistila, zda-li je na filtrech dostatečné množství bakterií, na zkušební filtry aplikujeme asi 20 μl fluorescenčního barviva DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol).

DAPI je barvivo specifické tím, že se váže na nukleové kyseliny a má schopnost fluorescence. Barvivo se používá jako sonda pro jadernou, mitochondriální

i chloroplastovou DNA. Přednostně se v buňkách váže na dvouřetězcovou DNA. Barvená buňka lze poté vidět při vlnové délce 365 nm a září jasně modrou barvou.

Po aplikaci DAPI necháme toto barvivo po dobu asi 10 minut působit ve tmě. Dále filtry vymýváme střídavě v destilované vodě, etanolu a opět v destilované vodě. Toto vymytí umožní odstranění špatně nabarvených buněk a lepšího obrazu v mikroskopu.

Filtry sušíme na savých papírech v Petriho miskách opět ve tmě. Suché filtry pokládáme na podložní sklíčka s imersním olejem. Zakápneme imersním olejem a přikryjeme krycím sklíčkem. Dále pozorujeme abundanci bakterií ve fluorescenčním mikroskopu (Olympus, VB) a fotíme pomocí kamery (Olympus, USA). Při této kontrole zjišťujeme pouze, zda-li je na filtru dostatečné množství bakterií k tomu, abychom mohli dále aplikovat oligonukleotidové sondy (próby). Proto obraz pozorujeme pouze při excitační délce 365 nm a zvětšení 1000 x.

7.4. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Tato metoda je zaměřena na ribozomální RNA. Konkrétně na řetězec 16S ribozomální RNA, která je spolu s jednadvaceti bílkovinami součástí malé podjednotky ribozomu. Při metodě FISH se používají oligonukleotidové sondy (próby), které jsou komplementární k určité sekvenci genu sledovaného organismu.

Principem je hybridizace, neboli schopnost molekul nukleových kyselin, pokud obsahují komplementární sekvence, tvořit hybridní molekuly. Sondy se vážou na DNA nebo RNA vzorku na základě komplementarity bází. Touto metodou nejsou objeveny buňky nečinné.

1) Filtrace vzorků na membránový filtr

Popsáno výše

2) Příprava hybridizačního a pracího pufru

Nejdříve připravíme hybridizační a prací pufr. Jeho množství je třeba vypočítat na základě množství použitých prób. Použité próby jsou značené fluorescenčními barvivy (Tab. č. 2), proto je nutné hybridizovat každý vzorek zvlášť.

Hybridizační pufr na 250 ml (cca 48 filtrů):

5 ml	TRIZMA
2,5 ml	EDTA
0,25 ml	1% SDS (přidáváme až na konec)
5,1 ml	NaCl

Doplníme destilovanou vodou na 250 ml

Prací pufr na 25 ml (cca 48 filtrů):

3,75 ml	NaCl
0,5 ml	TRIZMA
0,025 ml	1% SDS (přidáváme až na konec)
7,5 ml	FORMAMID

Doplníme destilovanou vodou na 25 ml

3) Zředění próby na cílovou koncentraci

Dále musíme zředit пробу na cílovou koncentraci. Průbu ředíme MQ vodou na výslednou koncentraci $c = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Pro každou skupinu bakterií používáme jiný typ próby (tab. č. 2). Próby ředíme na určenou koncentraci, podle jejich molární hmotnosti.

Tab. č. 2: Typy používaných prób

Cílová skupina	Proba	Sekvence proby 5' - 3'
Bacteria	EUB 338 I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT
	EUB 338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT
	EUB 338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT
Alfaproteobacteria	ALF1B	CGTTCGYTCTGAGCCAG
Gamaproteobacteria	cGAM42a	GCCTTCCCCTTCGTTT
	GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT
Methanotrof typ I	My705-type	CTGGTGTTCCTTCAGATC
	My84-type	CCACTCGTCAGCGCCCGA
Methanotrof typ II	AM455b	CTTATCCAGGTACCGTCATTATCGTCCC
	Ma450-type	ATCCAGGTACCGTCATTATC
<i>Methylobacter sp.</i>	Mlb662	CCTGAAATTCCACTCTCCTCT
<i>Methylocystis sp.</i>	Mcyst-1432	CGGTTGGCGAAACGCCTT

K detekci metanotrofních bakterií používáme několik typů prób. Pro typ I používáme próby My705 a My84. Přičemž próba My705 pokryje přibližně 80% druhů této skupiny organismů a próba My84 má omezenější pokrytí. Proto se pro lepší výsledek při této metodě kombinují obě tyto próby. Pro typ II používáme próbu Am455, která pokryje prakticky všechny druhy tohoto typu metanotrofních bakterií.

Z každého typu metanotrofních bakterií byl vybrán jeden konkrétní rod. Pro metanotrofní bakterie typ I byl jako zástupce vybrán rod *Methylobacter*, u kterého používáme próbu Mlb662 a pro typ II zástupce rodu *Methylocystis*, pro který je použita próba Mcyst1432. Optimalizace oligonukleotidových prób cílených na konkrétní rody byly testovány na kulturách zaslaných z DSMZ v Německu

Dále jsme používali rovněž próby pro detekci fylogenetických skupin *Alfaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* a *Eubacteria* (tab.č. 2). Přičemž jen u skupiny *Alfaproteobacteria* byla použita pro celkové pokrytí této skupiny próba ALF1B, zatímco

u *Gammaproteobacteria* pro větší pokrytí bakterií byly použity próby dvě, a to GAM 42a a cGAM42a. Pro pokrytí co největšího počtu bakterií ze skupiny *Eubacteria* musíme použít všechny tři typy prób EUB 338I, EUB 338II a EUB 338III.

4) Příprava směsi próby

Do označených ependorfeek napipetujeme $x * 16 \mu\text{l}$ hybridizačního pufru (x = počet vzorků). K hybridizačnímu pufru poté přidáme $x * 2 \mu\text{l}$ jednotlivých prób.

Výjimku tvoří ependorfky obsahující próby pro *Eubacterie* a *Gammaproteobacterie*, kde přidáváme ještě po $x*2 \mu\text{l}$ dalších druhů prób, pro větší pokrytí jednotlivých skupin.

5) Hybridizace

Filtry dobře označené položíme na podložní sklíčko. Na ně napipetujeme směs próby a hybridizačního pufru (tj. $18 \mu\text{l}$ směsi). Falkony (50 ml) vysteleme buničitou vatou, kterou zvlhčíme cca 4 ml hybridizačního pufru. Do každého falkonu pak vložíme jedno podložní sklíčko s filtry. Falkony pak dáme do předehřáté hybridizační pece na 46°C , po dobu 3 hodin.

Důležitým faktorem při hybridizaci je teplota, jelikož mezi sondou a nukleovými kyselinami se tvoří vodíkové můstky. Pokud je teplota příliš vysoká vodíkové můstky se nevytvoří nebo se tvoří pomaleji. A pokud je teplota zase příliš nízká mohou se můstky tvořit i jinde než jen mezi komplementárními bázemi. Optimální teplota je u této metody určena na 46°C .

6) Vymývání

V průběhu hybridizace připravíme do falkonů (50 ml) pro každé jednotlivé sklíčko 50 ml pracího pufru a předehřejeme ho spolu s falkony (50 ml) s destilovanou vodou ve vodní lázni na teplotu 48°C .

Hybridizační falkony vytahujeme z pece postupně. Jednotlivá sklíčka přemístujeme do předehřátých falkonů s pracím pufrem a dáme zpátky do lázně na dobu 15 minut.

Po hybridizaci je vzorek promýván pufrem, který musí mít teplotu cca o 2°C vyšší než byla hybridizace. Promytím se odstraní nepřesně hybridizované molekuly a zůstanou pouze správně komplementární sondy.

Po uplynutí doby 15 minut vylijeme prací pufr i se vzorky do Petriho misky a vymýváme postupně v předehřáté a studené destilované vodě. Filtry dále necháme zcela usušit.

7) Barvení DAPI

Suché filtry obarvíme asi 20 µl DAPI a necháme působit po dobu 10 minut. Filtry dále omyjeme v destilované vodě, etanolu a opět v destilované vodě.

Celé filtry necháme usušit ve tmě.

Na podložní sklíčko si napipetujeme směs Citifluor-Vecta Shield. Tato směs obsahuje látky, které brání rychlému vyblednutí vzorků.

Položíme filtry, znovu napipetujeme směs Citifluor-Vecta Shield a překryjeme krycím sklíčkem.

8) Snímání a vyhodnocení

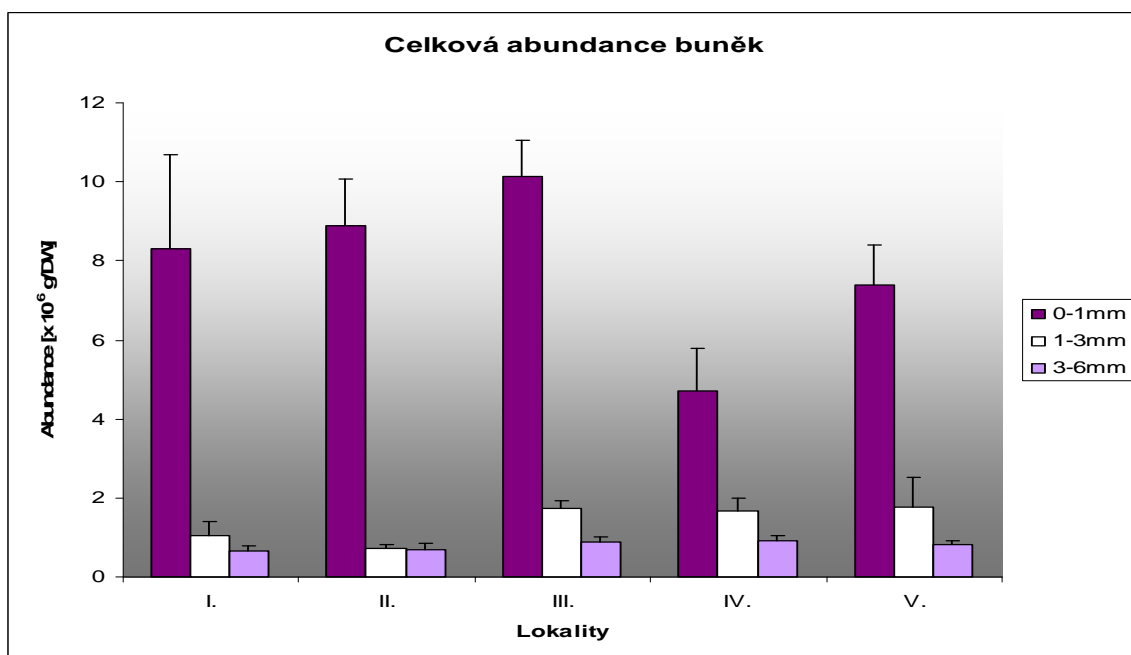
K vyhodnocení výsledků se používá fluorescenční mikroskop (Olympus, VB), jehož zdrojem světla je rtuťová výbojka. Záření dopadající na preparáty ještě prochází filtry. Celý vzorek poté fotíme pomocí kamery (Olympus, USA) při různé vlnové délce a vzorky následně vyhodnocujeme pomocí programu NIS elements.

8. VÝSLEDKY

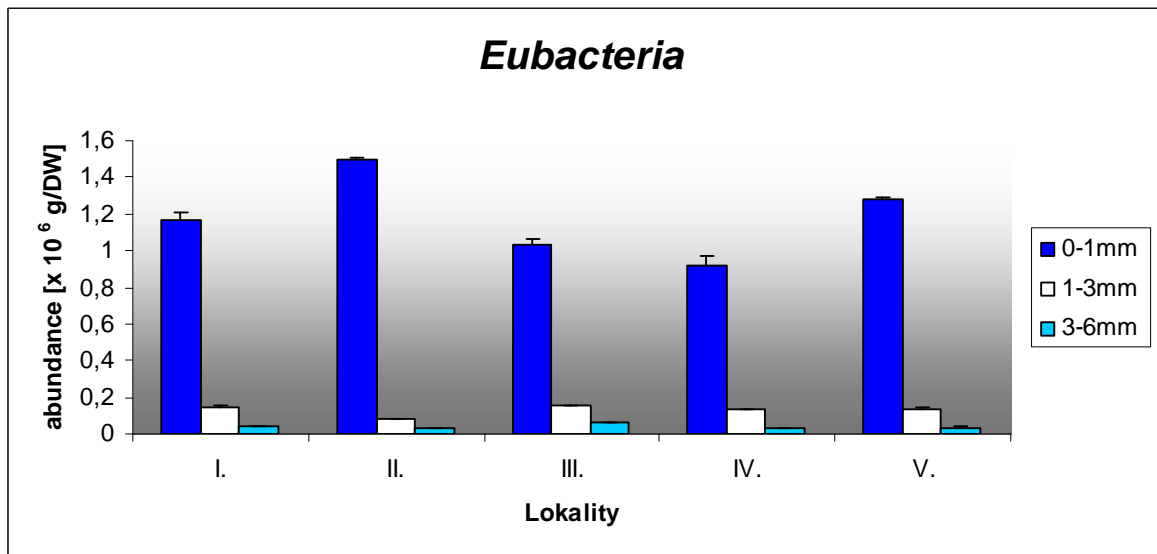
8.1. Abundance bakterií na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu

Vzorky na velikostní frakce sedimentu jsme odebírali na všech lokalitách.

Zastoupení jednotlivých skupin jsem určovala z celkového počtu buněk (graf č.1). Celkově se nejvíce buněk vyskytovalo na nejmenších velikostních frakcích sedimentu a nejméně na největších. Stejně tomu tak bylo i u určovaných skupin bakterií (grafy č. 2, 3, 4, 5, 6, 7 a 8).



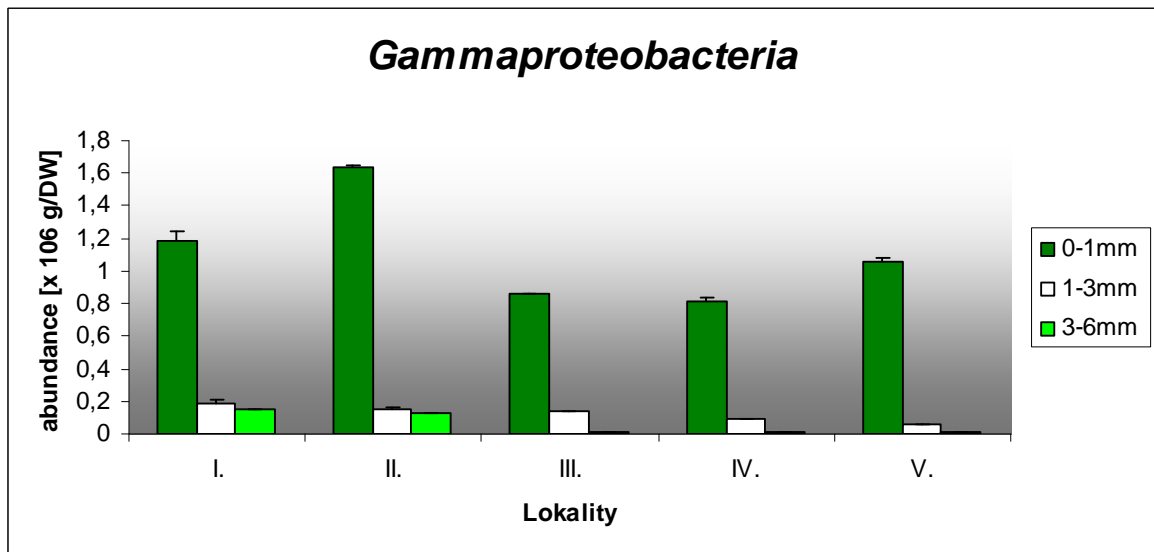
Graf č. 1: Průměrný počet buněk (DAPI) na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu ve vzorcích na 5 lokalitách, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku



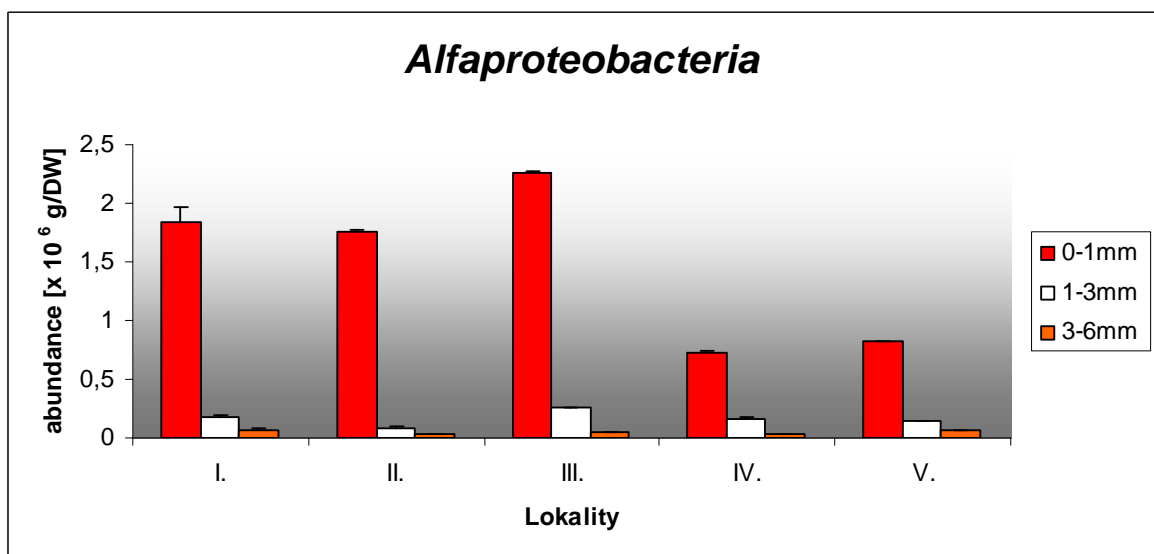
Graf č. 2: Průměrné počty buněk skupiny *Bacteria* na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu, na 5 lokalitách, chybové ústečky značí směrodatnou odchylku

Procentuální zastoupení skupiny *Gammaproteobacteria* z celkového počtu bakterií (DAPI) ve vzorcích na velikostních frakcích sedimentu kolísalo mezi 8-14 %, zatímco skupina *Alfaproteobacteria* z celkového počtu bakterií (DAPI) ve vzorcích na velikostních frakcích sedimentu tvořila 6-18 % (tab. č. 3).

Procentuální zastoupení skupiny *Gammaproteobacteria* z celkového počtu bakterií (DAPI) ve vzorcích na jednotlivých lokalitách kolísalo mezi 8-19 %, zatímco skupina *Alfaproteobacteria* z celkového počtu bakterií (DAPI) ve vzorcích na jednotlivých lokalitách tvořila 10-21 % (tab. č. 4).



Graf č. 3: Průměrné počty buněk skupiny *Gammaproteobacteria* na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu, na 5 lokalitách, chybové ústečky značí směrodatnou odchylku

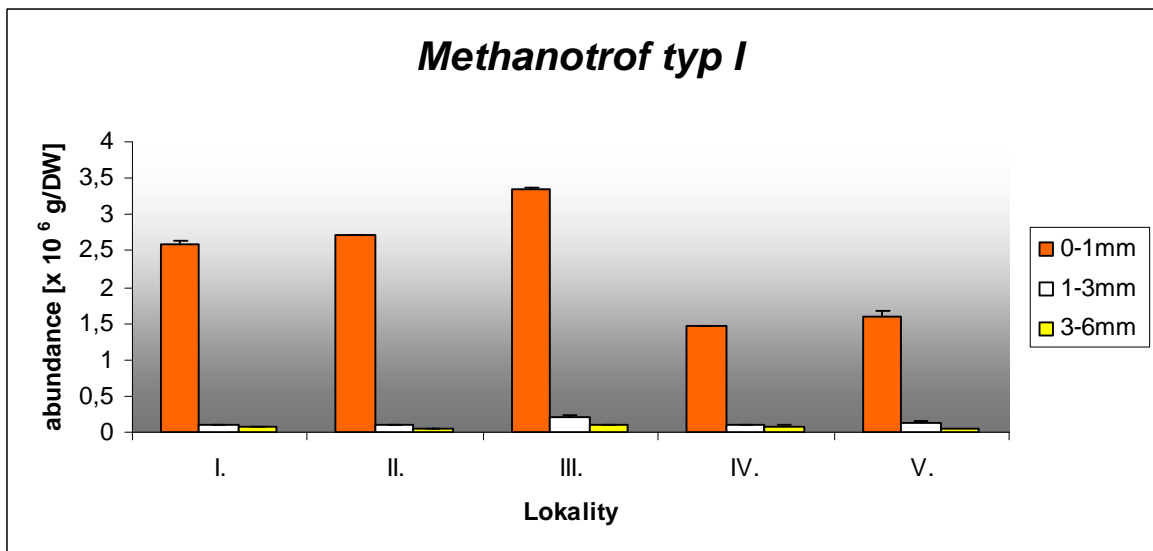


Graf č. 4: Průměrné počty buněk skupiny *Alfaproteobacteria* na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu, na 5 lokalitách, chybové ústečky značí směrodatnou odchylku

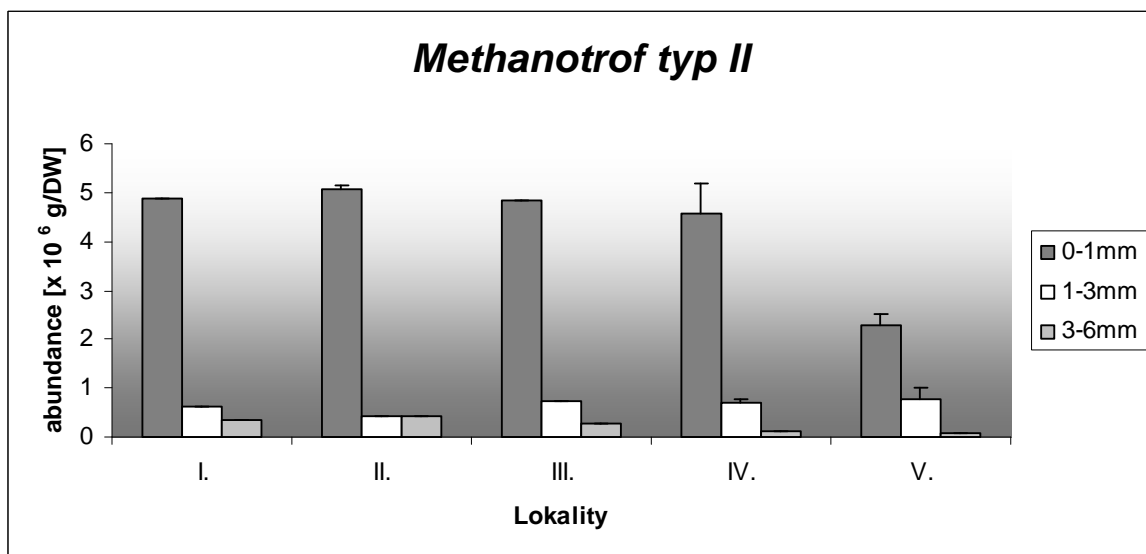
Procentuální zastoupení metanotrofních bakterií typu I patřících do skupiny *Gammaproteobacteria* z celkového počtu buněk (DAPI) ve vzorcích na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu kolísalo mezi 9-30 % (tab. č. 3), zatímco procentuální

zastoupení této skupiny z celkového počtu buněk (DAPI) ve vzorcích na jednotlivých lokalitách kolísalo mezi 18-29 % (tab. č. 4).

Procentuální zastoupení metanotrofních bakterií typu II patřících do skupiny *Alfaproteobacteria* z celkového počtu buněk (DAPI) ve vzorcích na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu kolísalo mezi 31-55 % (tab. č. 3), zatímco procentuální zastoupení této skupiny z celkového počtu buněk (DAPI) ve vzorcích na jednotlivých lokalitách kolísalo mezi 32-73 % (tab. č. 4).



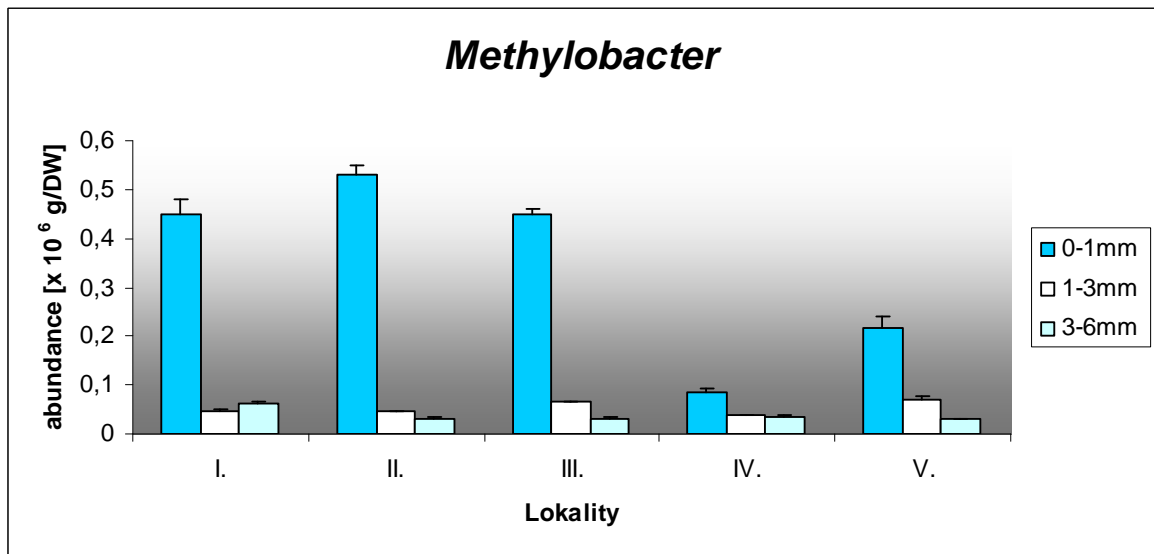
Graf č. 5: Průměrné počty buněk metanotrofních bakterií typu I na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu, na 5 lokalitách, chybové ústečky značí směrodatnou odchylku



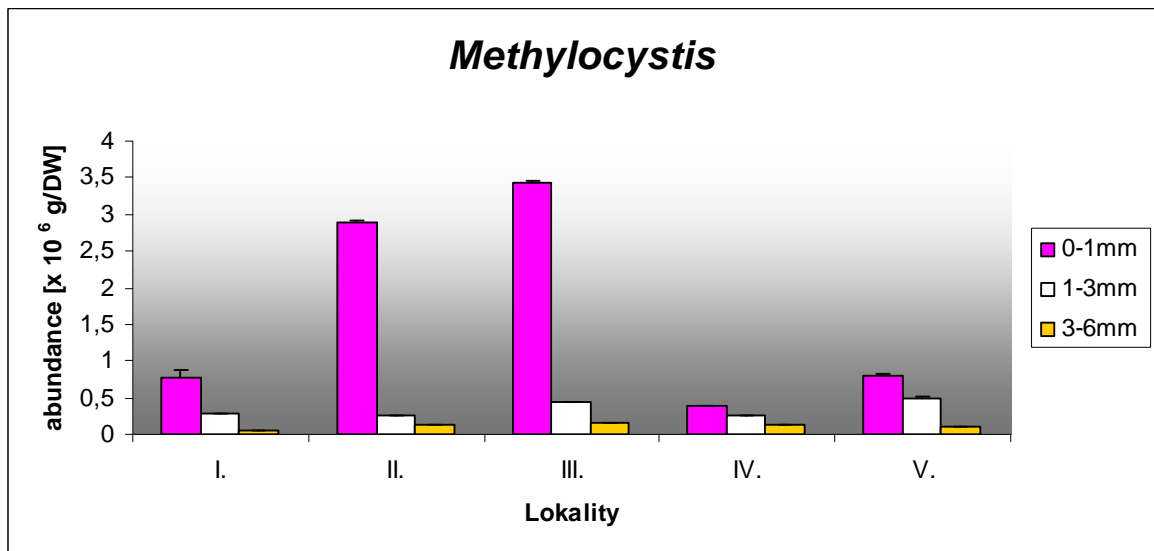
Graf č. 6: Průměrné počty buněk metanotrofních bakterií typu II na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu, na 5 lokalitách, chybové ústečky značí směrodatnou odchylku

Procentuální zastoupení rodu *Methylobacter* z celkového počtu buněk (DAPI) ve vzorcích na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu kolísalo mezi 4-5 % (tab. č. 3), zatímco procentuální zastoupení tohoto rodu z celkového počtu buněk (DAPI) ve vzorcích na jednotlivých lokalitách kolísalo mezi 2-6 % (tab. č. 4).

Procentuální zastoupení rodu *Methylocystis* z celkového počtu buněk (DAPI) ve vzorcích na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu kolísalo mezi 14-25 % (tab. č. 3), zatímco procentuální zastoupení tohoto rodu z celkového počtu buněk (DAPI) ve vzorcích na jednotlivých lokalitách kolísalo mezi 10-32 % (tab. č. 4).



Graf č. 7: Průměrné počty buněk metanotrofních bakterií typu I rodu *Methylobacter* na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu, na 5 lokalitách, chybové ústečky značí směrodatnou odchylku



Graf č. 8: Počty buněk metanotrofních bakterií typu II rodu *Methylocystis* na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu, na 5 lokalitách, chybové ústečky značí směrodatnou odchylku

Tab č. 3. Procentuální zastoupení detekovaných skupin ve vzorcích na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu

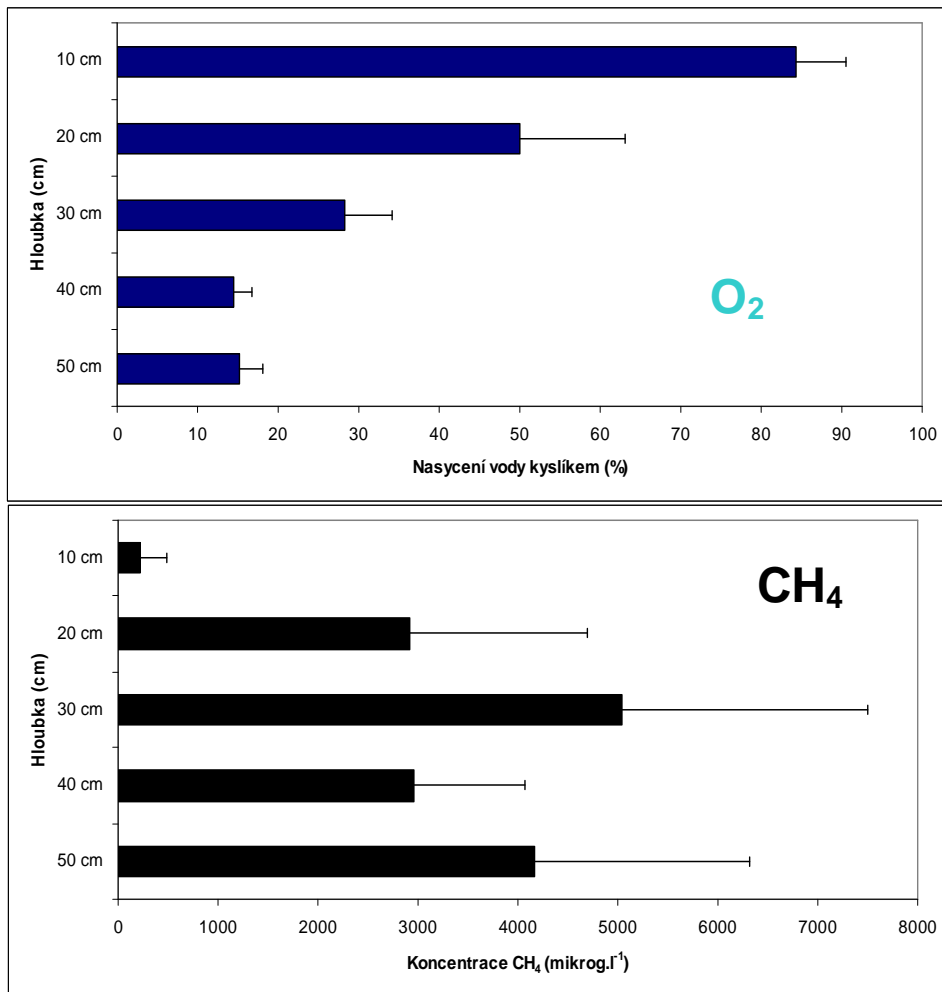
	0-1 mm	1-3 mm	3-6mm
<i>Eubacteria</i>	15 %	9 %	5 %
<i>Gammaproteobacteria</i>	14 %	9 %	8 %
<i>Alfaproteobacteria</i>	19 %	12 %	6 %
Metanotrof typ I	30 %	10 %	9 %
Metanotrof typ II	55 %	47 %	31 %
<i>Methylobacter</i>	4 %	4 %	5 %
<i>Methylocystis</i>	21 %	25 %	14 %

Tab č. 4. Pocentuální zastoupení detekovaných skupin ve vzorcích na jednotlivých lokalitách

	Lokalita 1	Lokalita 2	Lokalita 3	Lokalita 4	Lokalita 5
<i>Eubacteria</i>	14 %	16 %	10 %	15 %	15 %
<i>Gammaproteobacteria</i>	15 %	19 %	8 %	12 %	11 %
<i>Alfaproteobacteria</i>	21 %	18 %	20 %	13 %	10 %
Metanotrof typ I	27 %	28 %	29 %	23 %	18 %
Metanotrof typ II	58 %	58 %	45 %	73 %	32 %
<i>Methylobacter</i>	6 %	6 %	4 %	2 %	3 %
<i>Methylocystis</i>	11 %	32 %	32 %	10 %	14 %

8.2. Vertikální distribuce kyslíku a metanu

Ve vertikálním profilu byly již dříve měřeny jak hodnoty kyslíku, tak hodnoty metanu v jednotlivých hloubkách (Obr. č. 6). Množství kyslíku klesá s hloubkou, zatímco množství metanu s hloubkou více méně stoupá.

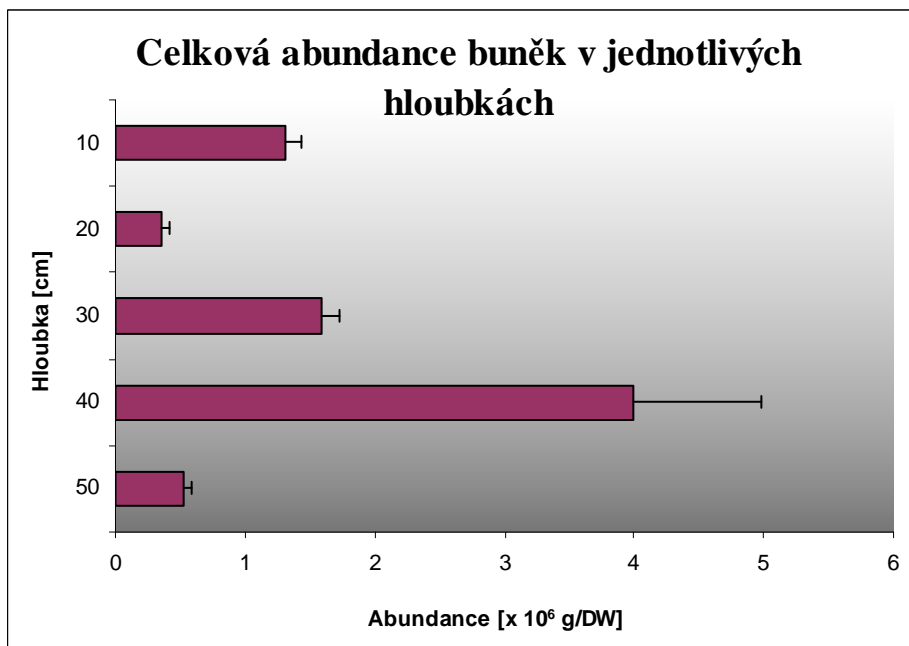


Obr. č. 6: Množství kyslíku a metanu naměřené v jednotlivých hloubkách na lokalitě č. 4

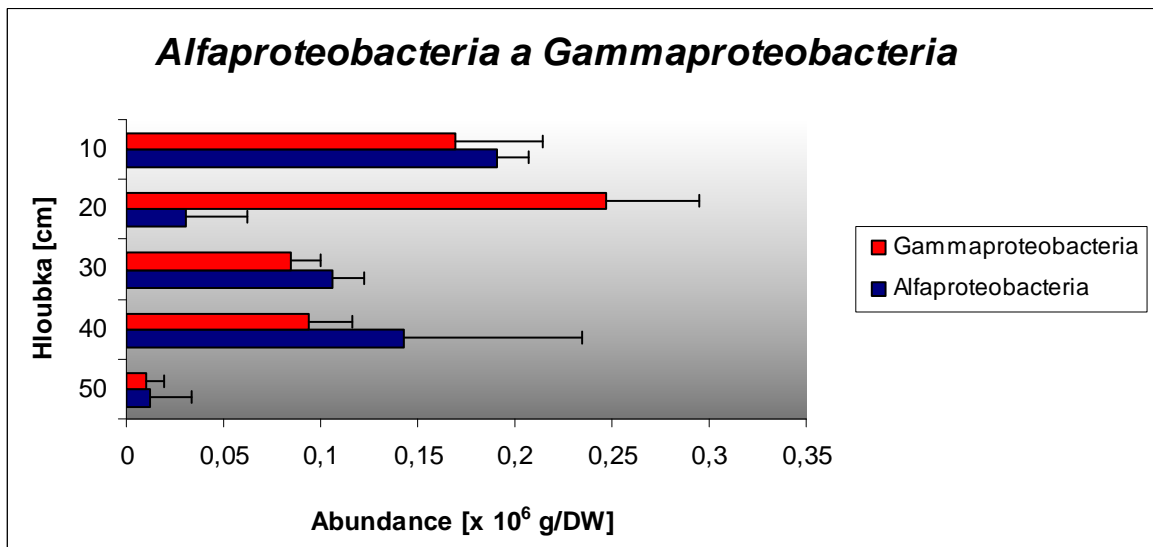
8.3. Abundance bakterií ve vertikálním profilu sedimentu na lokalitě č. 4

Na lokalitě č. 4 jsme odebírali vzorky z hloubek 0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm, 30-40 cm a 40-50 cm. Z celkového počtu buněk (graf č. 9) v jednotlivých hloubkách jsem poté určovala abundance jednotlivých skupin v různých hloubkách sedimentu (grafy č. 10, 11 a 12).

Největší abundance jednotlivých skupin byla většinou v horní vrstě sedimentu, tj. hloubce 0-10 cm. Výjimku tvořila skupina *Gammaproteobacteria*, která měla největší zastoupení v hloubce 10-20 cm (graf č. 10) a rod *Methylobacter*, který měl největší abundance v hloubce 30-40 cm (graf č. 12).

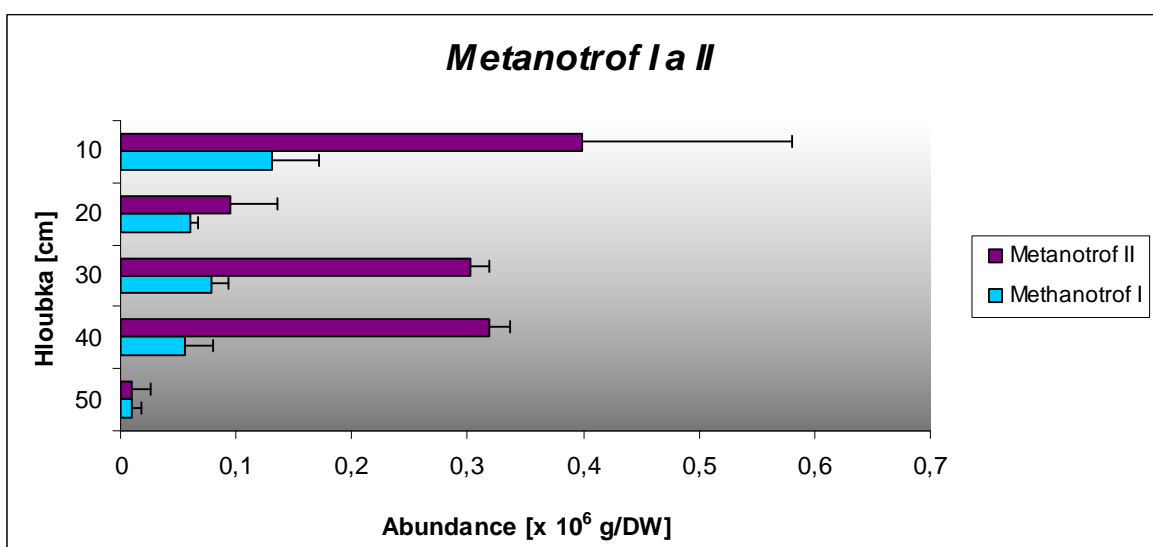


Graf č. 9: Průměrný celkový počet buněk ve vzorcích v jednotlivých hloubkách sedimentu, na lokalitě č.4, chybová úsečka značí směrodatnou odchylku



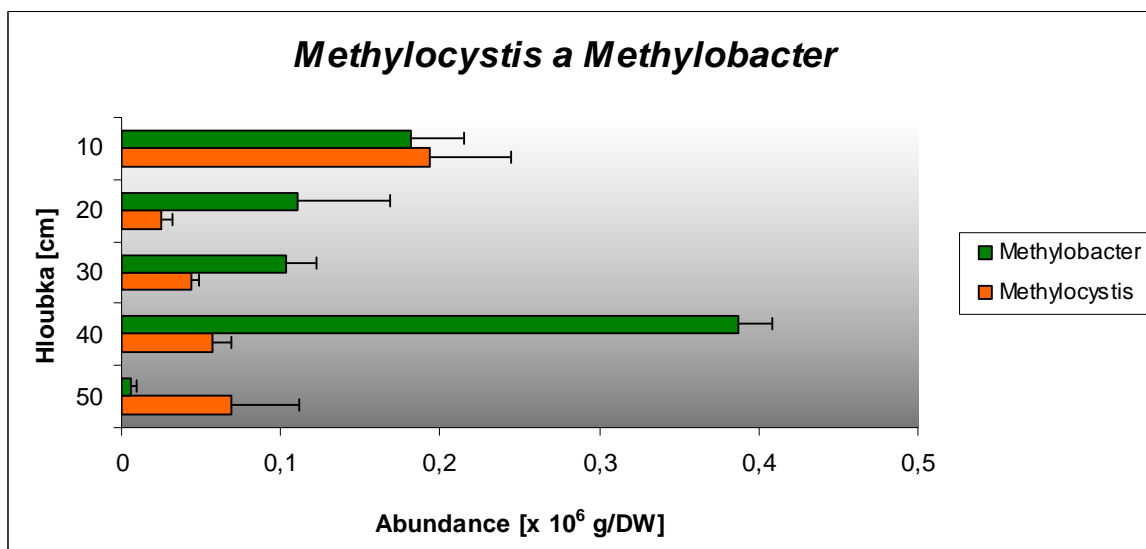
Graf č.10: Průměrné počty buněk skupin *Gammaproteobacteria* a *Alfaproteobacteria* v jednotlivých hloubkách sedimentu na lokalitě č. 4, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku

Procentuální zastoupení skupiny *Gammaproteobacteria* z celkového počtu buněk ve vzorcích (DAPI) bylo přibližně 8 %. Zastoupení této skupiny mezi jednotlivými hloubkami kolísalo mezi 2-68 % (tab. č. 5). Skupina *Alfaproteobacteria* tvořila přibližně 6 % a zastoupení této skupiny kolísalo mezi 2-15 % u jednotlivých hloubek (tab. č. 5).



Graf č.11: Průměrné počty buněk metanotrofních bakterií typu I a II v jednotlivých hloubkách sedimentu na lokalitě č. 4, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku

Procentuální zastoupení metanotrofních bakterií typu I z celkového počtu bakterií ve vzorku (DAPI) bylo přibližně 4%, zastoupení v jednotlivých hloubkách kolísalo mezi 1-16 % (tab. č. 5). Zastoupení metanotrofních bakterií typu II z celkového počtu bakterií ve vzorku (DAPI) bylo přibližně 14% a zastoupení kolísalo mezi hloubkami mezi 2-30 %.



Graf č.12: Průměrné počty buněk rodu *Methylobacter* a rodu *Methylocystis* v jednotlivých hloubkách sedimentu na lokalitě č. 4, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku

Procentuální zastoupení metanotrofních bakterií typu I rodu *Methylobacter* ve vzorcích bylo přibližně 10%. Zastoupení metanotrofních bakterií typu II rodu *Methylocystis* bylo přibližně 5% z celkového počtu buněk (DAPI) (tab. č. 5).

Kolísání procentuálního zastoupení rodu *Methylobacter* mezi jednotlivými hloubkami bylo 1-30 % a u rodu *Methylocystis* 1-15 % (tab. č. 5).

Tab. č. 5. Procentuální zastoupení jednotlivých detekovaných skupin bakterií v jednotlivých hloubkách a průměrný počet jejich zastoupení z celkového počtu buněk ve vzorcích (DAPI).

Skupina bakterií/hloubka [cm]	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	Průměr
<i>Eubacteria</i>	30 %	21 %	22 %	11 %	4 %	16 %
<i>Gammaproteobacteria</i>	13 %	68 %	5 %	2 %	2 %	8 %
<i>Alfaproteobacteria</i>	15 %	8 %	7 %	4 %	2 %	6 %
Metanotrof typ I	10 %	16 %	5 %	1 %	2 %	4 %
Metanotrof typ II	30 %	26 %	19 %	8 %	2 %	14 %
<i>Methylobacter</i>	14 %	30 %	6 %	10 %	1 %	10 %
<i>Methylocystis</i>	15 %	7 %	3 %	1 %	13 %	5 %

9. DISKUZE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit jaká je abundance vybraných fylogenetických skupin a metanotrofních bakterií na různých velikostních frakcích sedimentu na 5 zvolených lokalitách v podélném profilu toku Sitka a ve vertikálním profilu sedimentu na lokalitě č.4

Pro detekci celkového počtu jsem použila metodu fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), která mi umožnila analyzovat počty u jednotlivých fylogenetických skupin bakterií. Celkem jsem použila 12 oligonukleotidových sond, a to pro *Eubacteria* EUB 338I, EUB 338 II a EUB 338II, *Alfaproteobacteria* ALF1B, *Gammaproteobacteria* GAM 42a a cGAM42a, metanotrof typ I My705 a My 84, metanotrof typ II Am 455b, *Methylobacter* Mlb662 a *Methylocystis* Mcyst-1432. Výsledky jsem vyhodnocovala v programu NIS Elements.

Proto se na tekoucích vodách výzkumy metanotrofních bakterií nedělaly, musela jsem pro oba typy metanotrofních bakterií vybrat jednotlivé zástupce rodů, vyskytující se nejběžněji ve sladkých stojatých vodách.

Jako zástupce pro metanotrofních bakterií typu I jsem vybrala rod *Methylobacter*. Při dřívějších výzkumech byla na toku Sitka nalezena, pomocí PCR metody, přímou extrakcí z DNA, sekvence 16S rRNA genu, která je úzce příbuzná rodu *Methylobacter* (Brablcová, 2009). Tento rod se také hojně vyskytoval jako nejběžnější zástupce při výzkumech ve sladkovodním prostředí. Jako nejdůležitějšího zástupce ho ve svých pracích uvádí například Hanson a Hanson (1996), Conrad (2007), Miguez (1999), Costello (2002), Pester (2004) nebo Singh 2007.

Na základě publikací jsem jako zástupce pro metanotrofní bakterie typu II zvolila rod *Methylocystis*, který byl uváděn jako nejhojnější zástupce pro sladkovodní prostředí například u Dedysh (2003), Roslev (1995), Singh (2007), Costello (2002) nebo Buckley (2008) a Bushmann (2004).

9.1. Abundance metanotrofních bakterií na velikostních frakcích sedimentu

V této práci jsem zjišťovala, jestli existují rozdíly mezi třemi velikostními frakcemi sedimentu, který jsme odebírali na všech pěti lokalitách na toku Sitka. Zastoupení jednotlivých skupin bakterií na různých velikostních frakcích sedimentu jsem určovala z celkového počtu bakterií (DAPI).

Celkově se nejvíce buněk vyskytovalo na nejmenších frakcích sedimentu, tj. 0-1 mm.

Procentuální zastoupení jednotlivých skupin na nejmenších frakcích sedimentu je také největší. Výjimku tvoří pouze rody *Methylobacter* a *Methylocystis*, jejichž procentuální zastoupení z celkového počtu bakterií je největší na větších velikostech zrn.

Conrad (1994) ve své studii tvrdí, že vyšší aktivita bakterií v oxidaci metanu je na větších frakcích sedimentu. Ale to, že je aktivita větší, ještě nemusí znamenat, že je tam i více buněk. Santmiere a Leff (2007) prokázali, že na menších částicích je více prokaryot než na větších frakcích sedimentu a to proto, že malé částice obsahují více uhlíku. Auman (2000) zase prokázal, že tam kde je dostatek kyslíku a metanu dominují metanotrofní bakterie.

V rámci studií Wi (2009), Wrong (2007) nebo Conrad (2007), bylo zjištěno, že na lokalitách s nízkým obsahem kyslíku a vysokým obsahem metanu dominují metanotrofní bakterie typu I. I přes to se na lokalitě č. 4, která má vysoký obsah metanu a málo kyslíku vyskytují hojněji metanotrofní bakterie typu II.

To může být např. způsobeno tím, že v těchto studiích byly použity častěji metody založené na PCR, než metoda FISH. Metoda FISH neobjeví nečinné nebo pomalu rostoucí buňky, zatímco PCR je založena na DNA a detekuje i buňky neaktivní (Rahalkar, 2009).

Navíc dřívější výzkumy na toku Sitka prokázaly, že koncentrace metanu během roku vykazuje závislost na teplotě, maximální jsou v létě a v zimě minimální, což znamená, že při zvýšení koncentrace metanu v závislost na teplotě může bakteriální biomasa v létě extrémně narůst, zatímco v zimě může být složení zcela jiné. S jným názorem se setkáme u Lin (2005), který tvrdí, že oba typy metanotrofních bakterií mají více méně stabilní množství u obou typů a u 95% vzorků dominují metanotrofní bakterie typu I.

Dalším problémem v porovnání výsledků je, že studie, které dokazují výskyt těchto bakterií, probíhaly převážně v půdách, rašeliništích nebo sladkých stojatých vodách, proto není možno výsledky porovnat s jinou tekoucí lokalitou.

V rámci porovnávání procentuálního zastoupení jednotlivých lokalit mezi sebou, se ukázalo, že podél celého toku metanotrofní bakterie typu I tvoří zhruba 18-29% (tab č. 4), přičemž největší hojnost byla na lokalitě 3. Metanotrofní bakterie typu II měly v podélném profilu toku větší procentuální zastoupení a to na lokalitě č. 4. Zde tvořily až 73% z celkového počtu bakterií na této lokalitě.

V rámci porovnání rodů mezi sebou se opět vyskytoval hojněji rod *Methylocystis*, zástupce metanotrofních bakterií typu II.

9.2. Abundance metanotrofních bakterií ve vertikálním profilu sedimentu

Na základě dřívějších výzkumů byla pro určení abundance jednotlivých skupin bakterií ve vertikálním profilu dna určena lokalita č. 4, která se od ostatních odlišuje složením substrátu, množstvím kyslíku a také koncentrací metanu. Dřívější měření na této lokalitě ukázaly, že směrem do hloubky kyslík klesá a metan více méně stoupá.

Dle procentuálního zastoupení se všechny tři skupiny *Gammaproteobacteria*, metanotrofní bakterie typu I a zástupce těchto bakteriálních skupin *Methylobacter* vyskytovaly nejhojněji v hloubce 10-20 cm. *Alfaproteobacteria*, metanotrofní bakterie typu II a jejich zástupce *Methylocystis* byly nejvíce procentuálně zastoupení ve vrchní vrstvě sedimentu, tj. 0-10 cm. I Buriánková (2012) uvádí, že největší zastoupení je v horních površích sedimentu, tj. 0-25 cm a stejně tak i největší metabolická aktivita.

Nejvíce dominantní skupinou v horní vrstvě sedimentu, v závislosti na množství kyslíku a metanu by měly být metanotrofní bakterie typu II, což prokazují i naše hodnoty, že typ II i jeho zástupce *Methylocystis* je nejhojnější ve svrchní vrstvě sedimentu a postupně s hloubkou klesá.

Opakem by měl být metanotrof typu I, který by měl směrem s rostoucí hloubkou narůstat, což ale z našich výsledků patrné není, neboť jeho procentuální zastoupení je největší v hloubce 10-20 cm, kde množství kyslíku výrazně kleslo a množství metanu výrazně narostlo, ale i při stále se snižujícím množství kyslíku a narůstajícím množstvím metanu se abundance těchto dvou skupin dále snižuje. Což může být způsobeno tím, že v horních vrstvách se koncentrace metanu díky početnosti bakterií a jejich spotřebě metanu neustále snižuje.

Z celkové abundance bakterií je největší zastoupení bakterií ve vrstvě 30-40 cm, což dokazuje, že činnost metanotrofních bakterií v říčních sedimentech nemusí být nutně omezena pouze na povrch sedimentů jako tomu je u jezerních systémů.

Pester (2004), Buriánková et al. (2012) tvrdí, že celkově se největší množství metanotrofních bakterií vyskytuje v horních vrstvách sedimentu. Což dokazuje i to, že metanotrofní bakterie typu I i II byly nejpočetnější ve vrstvě 0-10 cm a postupně do hloubky se jejich počty snižovaly.

U rodu *Methylocystis* se také celkový počet buněk v jednotlivých hloubkách směrem dolů snižoval. Výjimku tvořil rod *Methylobacter*, jehož počty se sice snižovaly, ale celkový počet buněk v 30-40 cm extrémně vzrostl, což mohlo být způsobeno relativně nízkým množstvím kyslíku a poměrně vysokým množstvím metanu.

Nejvíce metanotrofních bakterií se tedy nachází ve svrchní vrstvě, neboť oxidace metanu vyžaduje jak přítomnost metanu, tak přítomnost kyslíku, kterého je v horní vrstvě nejvíce. Stejně tak Pester (2004) uvádí, že největší rozmanitost metanotrofních bakterií typu I a II je v nejsvrchnější okysličené vrstvě sedimentu. Pester (2004) prokázal, že struktura napříč gradientem je víceméně neměnná. Rahalkar (2009) zase prokázal, že v hlubinách jezerního sedimentu je až čtyřikrát více metanotrofních bakterií typu I než II. Bushmann (2004) zase tvrdí, že v pobřežních vodách jezera se vyskytují oba typy metanotrofních bakterií a celkově nejvíce dominuje typ I.

Lin (2005) tvrdí, že absolutní množství metanotrofních bakterií se nemění a je víceméně stabilní u obou druhů. Mění se pouze jejich oxidační aktivity. Většinou dominují metanotrofní bakterie typu I, což se ale mění v hlubinách, kde dominuje typ II.

10. ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce jsem se zabývala abundancemi metanotrofních bakterií na různých velikostních frakcích sedimentu a ve vertikálním profilu sedimentu na lokalitě č. 4 a toku Sitka. Abundance jsem zjišťovala pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a vyhodnocovala v programu Nis Elements.

Na velikostních frakcích sedimentu jsem určovala abundanci jednotlivých metanotrofních bakterií a současně i jejich procentuální zastoupení. Procentuální zastoupení se určovalo jak pro jednotlivé velikostní frakce sedimentu, tak i pro jednotlivé lokality.

Z výsledků vyplývá, že metanotrofní bakterie preferují více menší velikosti sedimentu. Největší počty bakterií se vyskytovaly na frakcích sedimentu o velikosti 0-1 mm. Jejich počty značně převyšovaly počty na jiných velikostech sedimentu.

Stejně tak i procentuální zastoupení jednotlivých určovaných skupin na velikostních frakcích prokázalo, že *Gammaproteobacteria*, *Alfaproteobacteria*, metanotrofní bakterie typu I i II preferují velikost sedimentu 0-1 mm. Pouze zástupce jednotlivých rodů měly vyšší procentuální zastoupení na větších frakcích. *Methylobacter* preferoval frakce sedimentu o velikosti 3-6 mm a *Methylocystis* 1-3 mm.

Ve vertikálním profilu lokality č. 4 byly odebrány vzorky z 5 různých hloubek pomocí freeze-core metody a pracovalo se pouze s velikostmi sedimentu 0-1 mm.

Z výsledků vyplývá, že největší procentuální zastoupení bylo v prvních dvou vrstvách sedimentu. *Gammaproteobacteria*, metanotrofní bakterie typu I a *Methylobacter* měly největší procentuální zastoupení v hloubce 10-20 cm. *Alfaproteobacteria*, metanotrofní bakterie typu II a *Methylocystis* měly největší procentuální zastoupení v hloubce 0-10 cm. Z celkových počtů bakterií byly největší počty bakterií v hloubce 30-40 cm.

V rámci těchto výsledků se ukázalo, že v řece na jednotlivých lokalitách, velikostních frakcích sedimentu i ve vertikálním profilu sedimentu lokality č. 4, bylo procentuálně zastoupeno více metanotrofních bakterií typu II. A i přes to, že literatura uvádí, že preferují půdní prostředí. Jejich počty byly daleko vyšší než u metanotrofních bakterií typu I, které by ve vodním prostředí měly dominovat.

Poznatky této diplomové práce není možno porovnat s výsledky jiných řek, neboť výzkumy na metanotrofní bakterie v řekách nebyly prováděny. Proto jsem většinu

poznatků a výsledků porovnávala pouze s výzkumy na metanotrofních bakteriích ve sladkých stojatých vodách. Z těchto důvodů by bylo dobré uskutečnit další opakování testů a upřesnit tak získané poznatky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ARNDS J., KNITTEL K., BUCK U., WINKEL M. a AMANN R. (2010): Development of a 16S rRNA-targed probe set for *Verrucomicrobia* and its application for fluorescence *in situ* hybridization in a humic lake. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 139-148.
- AUMAN A. J., SPEAKE C. C. a LIDSTROM M. E. (2001): nifH Sequences and Nitrogen Fixation in Type I and Type II Methanotrophs. *Applied and Environmental Microbiology* 67, No. 9: 4009-4016.
- AUMAN A. J., STOLYAR S., COSTELLO A. M. a LIDSTROM M. E. (2000): Molecular Characteriazation of Methanotrophic Isolates from Freshwater Lake Sediment. *Applied and Environmental Microbiology* 66, No. 12: 5259-5266.
- BORREL G., JÉZÉQUEL D., BIDERRE-PETIT C., MOREL-DESROSIERS N., MOREL J.-P., PEYRET P., FONTY G. a LEHOURS A.-C. (2011): Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Research in Microbiology* 162: 832-848.
- BOURNE D. G., HOLMES A. J., IVERSEN N. a MURRELL J. C. (2000): Fluorescent oligonucleotide r DNA probes for specific detection of methane oxidising bacteria. *Federation of European Microbiological Societies* 31: 29-38.
- BOURNE D. G., McDONALD I. R. a MURRELL J. C. (2001): Comparison of PmoA PCR Primer Sets as Tools for Investigating Methanotroph Diversity in Three Danish Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 67, No. 9: 3802-3809.
- BUCKLEY D. H., HUANGYUTITHAM V., HSU S.-F. a NELSON T. A. (2008): ¹⁵N₂-DNA-stable isotope probing of diazotrophic methanotrophs soil. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1272-1283.

- BURIÁNKOVÁ I., BRABLCOVÁ L., MACH V., HÝBLOVÁ A., BADUROVÁ P., CUPALOVÁ J., ČÁP L. a RULÍK M. (2012): Methanogens and methanotrophs distribution in the hyporheic sediments of a small lowland stream. *Fundam. Appl. Limnol.* 181, No. 2: 87-102.
- BUSSMAN I., PESTER M., BRUNE A. a SCHINK B. (2004): Preferential cultivation of type II methanotrophic bacteria from littoral sediments (Lake Constance). *Federation of European Microbiological Societies* 473: 179-189.
- CÉBRON A., BODROSSY L., CHEN Y., SINGER A. C., THOMPSON I. P., PROSSER J. I. a MURRELL J. C. (2007): Identity of active methanotrophs in landfill cover soil as revealed by DAN-stable isotope probing. *Federation of European Microbiological Societies* 62: 12-23.
- CONRAD R. (2007): Microbiological Ecology of Methanogens and Methanotrophs. *Advances in Agronomy* 96: 1-63.
- CONRAD R. a BENDER M. (1994): Methane oxidation activity in various soils and freshwater sediments: Occurrence, characteristic, vertical profiles, and distribution on grain size fraction. *Journal of geophysical research* 99, No. 8: 531-540.
- COOLEN M. J. L., HOPMANS E. C., RIJPSTRA W. I. C., MUYZER G., SCHOUTEN S., VOLKMAN J. K. a DAMSTÉ J. S. S. (2004): Evolution of the methane cycle in Ace Lake (Antarctica) during the Holocene: response of methanogens and methanotrophs to environmental change. *Organic Geochemistry* 35: 1151-1167.
- COSTELLO A. M. a LIDSTROM M. E. (1999): Molecular Characterization of Functional and Phylogenetic Genes from Natural Populations of Methanotrophs in Lake Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 65, No. 11: 5066-5074.

- COSTELLO A. M., AUMAN A. J., MACALADY J. L., SCOW K. M. a LIDSTROM M. E. (2002): Estimation of methanotroph abundance in a freshwater lake sediment. *Environmental Microbiology* 4, No. 8: 443-450.
- DEDYSH S. N., DUNFIELD P. F., DERAKSHANI M., STUBNER S., HEYER J. a LIESACK W. (2003): *Federation of European Microbiological Societies 43*: 299-308.
- DUBEY S. K., PADMANABHAN P., PUROHIT H. J. a UPADHYAY S. N. (2003): Tracking of methanotrophs and their diversity in paddy soil: A molecular approach. *Current Science* 85, No. 1: 92-95.
- DUMESTRE J. F., GUÉZENNEC J., GALY-LACAUX C., DELMAS R., RICHARD S. a LABROUE L. (1999): Influence of Light Intensity on Methanotrophic Bacterial Activity in Petit Saut Reservoir, French Guiana. *Applied and Environmental Microbiology* 65, No. 2: 534-539.
- DURISCH-KAISER E., KLAUSER L., WEHRLI B. a SCHUBERT C. (2005): Evidence of Intense Archaeal and Bacterial Methanotrophic Activity in the Black Sea Water Column. *Applied and Environmental Microbiology* 71, No. 12: 8099-8106.
- EASTMOND D. A., SCHULER M. a RUPA D. S. (1995): Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. *Mutation research* 348: 153-162.
- GENETIKA – BIOLOGIE [online]. <http://www.genetika-biologie.cz/prokaryota>. Autor stránek: Šípek jr., 2013. cit. 15.2.2013.
- GULLEDGE J., AHMAD A., STEUDLER P. A., POMERANTZ W. J. a CAVANAUGH C. M. (2001): Family- and Genus-Level 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for Ecological Studies of Methanotrophic Bacteria: *Applied and Environmental Microbiology* 67, No. 10: 4726-4733.

- HANSON R. S. a HANSON T. E. (1996): Methanotrophic Bacteria. *Microbiological reviews* 60, No. 2: 439-471.
- HENCKEL T., JÄCKEL U a CONRAD R. (2001): Vertical distribution of the methanotrophic community after drainage of rice field soil. *Federation of European Microbiological Societies* 34: 279-291.
- HEYER J., GALCHENKO V. F., DUNFIELD P.F. (2002): Molecular phylogeny of type II methane-oxidizing bacteria isolated from various environments. *Microbiology* 148: 2831-2846.
- HOLMES A. J., ROSLEV P., McDONALD I. R., IVERSEN N., HENRIKSEN K. a MURRELL J. C. (1999): Characterization of Methanotrophic Bacterial Populations in Soils Showing Atmospheric Methane Uptake. *Applied and Environmental Microbiology* 65, No. 8: 3312-3318.
- HORZ H.-P., RICH V., AVARAHAMI S. a BOHANNAN B. J. M. (2005): Methane-Oxidizing Bacteria in a California Upland Grassland Soil: Diversity and Response to Simulated Global Change. *Applied and Environmental Microbiology* 71, No. 5: 2642-2652.
- HORZ H.-P., YIMGA M. T. a LIESACK W. (2001): Detection of Methanotroph Diversity on Roots of Submerged Rice Plants by Molecular Retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and Ribosomal DNA, Including *pmoA*-Based Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profiling. *Applied and Environmental Microbiology* 67, No. 9: 4177-4185.
- CHEN Y. a MURRELL J. C. (2009): Ecology of aerobic methane oxidizing bacteria. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* 51: 3068-3076.

- CHEN Y., DUMONT M. G., CÉBRON A. a MURREL J. C. (2007): Identification of active Methanotrophs in a landfill cover soil through detection of expression of the 16S rRNA and functional genes. *Environmental Microbiology* 9, No. 11: 2855-2869.
- JOOS S., FINK T. M ., RÄTSCH A. a LICHTER P. (1994): Mapping and chromosome analysis: the potential of flueorescence in situ hybridization. *Journal of Biotechnology* 35: 135-153.
- KALUZHAYAYA M., KHMELENINA V., ESCHINIMAEV B., SUZINA N., NIKITIN D., SOLONIN A., LIN J. L., McDONALD I., MURREL C. a TROSENKO Y. (2001): Taxonomic Charakterization on New Alkaliphic and Alkalitolerant Methanotrophs from Soda Lakes of the Southeastern Transbaikal Region and description of *Methylomicrobium buryatense* sp. nov..*Systematic and Applied Microbiology* 24: 166-176.
- KALYUZHAYAYA M. G., LIDSTROM M. E. a CHISTOSERDOVA L. (2004): Utility of Environmental Primers Targeting Ancient Enzymes: Methylo-troph Detection in Lake Washington. *Microbial Ecology* 48: 463-472.
- KALYUZHAYAYA M. G., ZABINSKY R., BOWERMAN S., BAKER D. R., LIDSTROM M. E a CHISTOSERDOVA L. (2006): Fluorescence In Situ Hybridization-Flow Cytometry-Cell Storing-Based Method for Separation and Enrichment of Type I and Type II Methanotroph Populations. *Applied and Environmental Microbiology* 72, No. 6: 4293-4301.
- KUMARESAN D., HÉRY M., BODROSSY L. SINGER A. C., STRAILS-PAVESE N., THOMPSON I. P. a MURREL J. C. (2011): Eathworm activity in a simulated landfill cover soils shifts the community composition of active methanotrophs. *Research in Microbiology* 162: 1027-1032.

- LAU E., AHMAD A., STEUDLER P. A. a CAVANAUGH C. M. (2007): Molecular characterization of methanotrophic communities in forest soils that consume atmospheric methane. *Federation of European Microbiological Societies* 60: 490-500.
- LIN J.-L., JOYE S. B., SCHLTEN J. C. M., SCHÄFER H., McDONALD I. R. a MURRELL J. C. (2005): Analysis of Methane Monooxygenase Genes in Mono Lake Suggests That Increased Methane Oxidation Activity May Correlate with a Change in Methanotroph Community Structure. *Applied and Environmental Microbiology* 71, No. 10: 6458-6462.
- McDONALD I. R. a MURRELL J. C. (1997): The Methanol Dehydrogenase Structural Gene *mxoF* and Its Use as a Functional Gene Probe for Methanotrophs and Methylotrophs. *Applied and Environmental Microbiology* 63, No. 8: 3218-3224.
- McDONALD I. R., BRODSSY L., CHEN Y. a MURRELL J. C. (2008): Molecular Ecology Techniques for the Study of Aerobic Methanotrophs. *Applied and Environmental Microbiology* 74, No. 5: 1305-1315.
- McDONALD I. R., KENNA E. M. a MURRELL J. C. (1995): Detection of Methanotrophic Bacteria in Environmental Samples with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 61, No. 1: 116-121.
- MIGUEZ C. B., SHEN CH. F., BOURQUE D., GUIOT S. R. a GROLEAU D. (1999): Monitoring Methanotrophic Bacteria in Hybrid Anaerobic-Aerobic Reactors with PCR and a Catabolic Gene Probe. *Applied and Environmental Microbiology* 65, No. 2: 381-388.
- MOTER A. a GÖBEL U. B. (2000): Fluorescence insitu hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 41: 85-112.

- MURRELL J. C., McDONALD I. R. a BOURNE D. G. (1998): Molecular methods for the study of methanotroph ecology. *Federation of European Microbiological Societies* 27: 103-114.
- PESTER M., FRIEDRICH M. W., SCHINK B. a BRUNE A. (2004): *pmoA*-Based Analysis of Methanotrophs in a Litoral Lake Sediment Reveals a Diverse and Stable Community in a Dynamic Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 70, No. 5: 3138-3142.
- RAHALKAR M., DEUTZMANN J., SCHINK B. a BUSSMANN I. (2009): Abundance and Activity of Methanotrophic Bacteria in Littoral and Profundal Sediments of Lake Constance (Germany). *Applied and Environmental Microbiology* 75, No. 1: 119-126.
- RIVKINA E., SCHERBAKOVA V., LAURINAVICHIOUS K., PETROVSKAYA L., KRIVUSHIN K., KRAEV G., PECHERITSINA S. a GILICHINSKY D. (2007): Biochemistry of methane and methanogenic archaea in permafrost. *Federation of European Microbiological Societies* 61: 1-15.
- ROSLEV P. a KING G. M. (1995): Aerobic and Anaerobic Starvation Metabolism in Methanotrophic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61, No. 4: 1563-1570.
- ROSYPAL S., DOŠKAŘ J., FRYNTA D., HOMOLA J., HORAČEK I., HŮRKA K., KALINA T., KUBIŠTA V., KVAČEK Z., LINCL T., LOSOS B., MAZURA I., MLADA J., et. al, (2003): Nový přehled biologie, nakladatelství Scientia, spol. s.r.o., pedagogické nakladatelství, Praha.

- BRABLCOVÁ L., RULÍK M., MACH V., BURIÁNKOVÁ I. a CUPALOVÁ J. (2009): Fylogenetická analýza metanogenních archeí a metanotrofních bakterií v hyporheickém sedimentu pomocí klonování a sekvenace genů *mcrA* a 16S rRNA genů. In: Sborník příspěvků (L. Kröpfelová, J. Šulcová et al.) pp. 31-32. XV konference české limnologické společnosti a Slovenskej limnologickej spoločnosti, Třeboň, 22.-26.6.2009
- SANTMIERE J. A a LEFF L. G. (2007): The influence of stream sediment particle size on bacterial abundance and community composition. *Aquat Ecol* 41:153-160.
- SEDLÁČEK I. (2006): Taxonomie prokaryot, Masarykova univerzita, Brno.
- SCHUBERT C. J., COOLEN M. J., NERETIN L. N., SCHIPPERS A., ABBAS B., DURISCH-KAISER E., WEHRLI B., HOPMANS E. C., DAMSTE J. S., WAKEHAM S. a KUYPERS M. M. (2006): Aerobic and anaerobic methanotrophs in the Black Sea water column. *Applied and Environmental Microbiology* 8, No. 10: 1844-1856.
- SINGH B. K., TATE K. R., KOLIPAKA G., HEDLEY C. B., MACDONALD C. A., MILLARD P. a MURRELL J. C. (2007): Effect of Afforestation and Reforestation of Pastures on the Activity and Population Dynamics of Methanotrophic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 73, No. 16: 5153-5161.
- SMITH T. J., TROSENKO Y. A. a MURRELL J. C. (2009): Physiology and biochemistry of the aerobic methane oxidising bacteria. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* 2: 768-779.
- TRAVIS B. J. a ROSENBERG N. D. (1997): Modelling *in situ* Bioremediation of TCE at Savannah River: Effects of Product Toxicity and Microbial Interactions on TCE Degradation. *Environmental Science and Technology* 31: 3093-3102.

- TROTSSENKO Y. A. a KHMELENINA V. N. (2002): Biology of extremophilic and extremotolerant methanotrophs. *Arch Microbiol* 177: 123-131.
- TURISTIKA.CZ [online]. <http://www.turistika.cz/mista/sitka-pramen>. Autor stránek: Kolektiv fytických osob, 2013. cit. 1.5.2013.
- WANG H., EINOLA J., HEINONEN M., KULOMAA M. a RINTALA J. (2008): Group-specific quantification of methanotrophs in landfill gas-purged laboratory biofilters by tyramide signal amplification-fluorescence *in situ* hybridization. *Bioresource Technology* 99: 6426-6433.
- WU L., MA K. a LU Y. (2009): Rice roots select for type I methanotrophs in rice field soil. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 421-428.
- YUN J., MA A., LI Y., ZHUANG G., WANG Y. a ZHANG H. (2010): Diversity of methanotrophs in Zoige wetland soils under both anaerobic and aerobic conditions. *Journal of Environmental Sciences* 22, No. 8: 1232-1238.

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. č. 1:** Tři domény organismů (Collins, 1999)
- Obr. č. 2:** Stavba bakterie (Šípek jr. [online], cit. 15.2. 2013)
- Obr. č. 3:** Různé cesty oxidace metanu u obou typů metanotrofních bakterií (Hanson a Hanson, 1996)
- Obr. č. 4:** Jednotlivé lokality na řece Sitka
- Obr. č. 5:** Vlevo navrstvení vzorku po přidání Nycodenz a vpravo navrstvení vzorku po hustotní centrifugaci
- Obr. č. 6:** Množství kyslíku a metanu naměřené v jednotlivých hloubkách na lokalitě č. 4

SEZNAM TABULEK

- Tab. č. 1:** Charakteristika jednotlivých lokalit a u nich naměřené hodnoty
- Tab. č. 2:** Typy používaných prób
- Tab. č.3:** Procentruální zastoupení detekovaných skupin bakterií ve vzorcích na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu
- Tab. č. 4:** Pocentuální zastoupení detekovaných skupin bakterií ve vzorcích na jednotlivých lokalitách
- Tab. č. 5:** Procentuální zastoupení jednotlivých detekovaných skupin bakterií v jednotlivých hloubkách a průměrný počet jejich zastoupení z celkového počtu buněk ve vzorcích (DAPI).

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1: Průměrný počet buněk (DAPI) na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu ve vzorcích na 5 lokalitách, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku

Graf č. 2: Průměrné počty buněk skupiny *Eubacteria* na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu, na 5 lokalitách, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku

Graf č. 3: Průměrné počty buněk skupiny *Gammaproteobacteria* na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu, na 5 lokalitách, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku

Graf č. 4: Průměrné počty buněk skupiny *Alfaproteobacteria* na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu, na 5 lokalitách, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku

Graf č. 5: Průměrné počty buněk metanotrofních bakterií typu I na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu, na 5 lokalitách, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku

Graf č. 6: Průměrné počty buněk metanotrofních bakterií typu II na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu, na 5 lokalitách, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku

Graf č. 7: Průměrné počty buněk metanotrofních bakterií typu I rodu *Methylobacter* na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu, na 5 lokalitách, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku

Graf č. 8: Počty buněk metanotrofních bakterií typu II rodu *Methylocystis* na jednotlivých velikostních frakcích sedimentu, na 5 lokalitách, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku

Graf č. 9: Průměrný celkový počet buněk (DAPI) ve vzorcích v jednotlivých hloubkách sedimentu, na lokalitě č.4, chybová úsečka značí směrodatnou odchylku

Graf č. 10: Průměrné počty buněk skupin *Gammaproteobacteria* a *Alfaproteobacteria* v jednotlivých hloubkách sedimentu na lokalitě č. 4, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku

Graf č. 11: Průměrné počty buněk metanotrofních bakterií typu I a II v jednotlivých hloubkách sedimentu na lokalitě č. 4, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku

Graf č. 12: Průměrné počty buněk rodu *Methylobacter* a rodu *Methylocystis* v jednotlivých hloubkách sedimentu na lokalitě č. 4, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku