

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Jsou pikoplanktonní sinice schopny
produkovat metan?**

Bakalářská práce

Jakub Psohlavec

Školitelka: RNDr. Jitka Jezberová, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Anna Matoušů, Ph.D.

České Budějovice 2020

Psohlavec, J., 2020: Jsou pikoplanktonní sinice schopny produkovat metan? [Are picoplanktonic cyanobacteria able to produce methane? Bc. Thesis, in Czech.] – 37 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Cílem bakalářské práce je provést literární rešerši na téma souvislost mezi pikoplanktonními sinicemi (popř. sinicemi) a produkcí metanu v oxické vodě. Dále pak na vybraných kmenech pikoplanktonních sinic z různých oblastí a z českých hypertrofních rybníků otestovat jejich schopnost metan tvořit, a zjistit, za jakých podmínek k případné tvorbě dochází. K pokusům jsou použity kmeny pikoplanktonních sinic ze sbírky mikroorganismů HBÚ AVČR. Výzkum přichází s výsledky, které potvrzují nízký vzrůst produkce metanu, nicméně, kromě jedné kultury, nepotvrzují přímou metanogenezi pikoplanktonními sinicemi.

The aim of the bachelor thesis is to conduct a literature review on the topic of the connection between picoplanktonic cyanobacteria (or cyanobacteria) and methane production in oxic water. Furthermore, on selected strains of picoplanktonic cyanobacteria from various areas and from Czech hypertrophic ponds to test whether they are able to produce methane and to indicate the conditions under which this gas can be produced. Strains of picoplanktonic cyanobacteria from the collection of microorganisms IH Biology Centre CAS are used for the experiments. The research results prove a low increase in methane production, however, except one of the strains, do not prove direct methanogenesis by picoplanktonic cyanobacteria.

Klíčová slova:

Pikoplanktonní sinice, sinice, české rybníky, aerobní produkce, metan

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 09. 12. 2020

.....

Jakub Psohlavec

Poděkování

Ze všeho nejvíce děkuji mé vedoucí bakalářské práce RNDr. Jitce Jezberové Ph.D. za její cenné rady a ochotu pomoci kdykoli bylo potřeba. Děkuji mé konzultantce Mgr. Anně Matoušů, Ph.D. za užitečné rady v otázce týkající se metanu a jeho tvorby. Dále bych rád poděkoval profesorovi RNDr. Jaroslavu Vrbovi CSc. a Mgr. Vojtěchu Kasalickému Ph.D. V neposlední řadě bych rád poděkoval Biologickému centru Akademie věd České republiky a Přírodovědecké fakultě JU za poskytnutí možnosti provést svůj výzkum a Mgr. Jiřímu Mastnému Ph.D. za ochotu a pomoc s obsluhou přístroje. Na konec bych rád poděkoval mé rodině a přítelkyni za jejich podporu a pevné nervy.

Obsah

Úvod.....	6
Literární rešerše.....	7
1. Sinice.....	7
1.1. Morfologie a funkce buněk.....	7
1.2. Ekologie a význam sinic.....	7
1.3. Pikoplanktonní sinice.....	8
1.3.1. Taxonomie a morfologie pikoplanktonních sinic.....	8
1.3.2. Ekologie a význam pikoplanktonních sinic.....	9
2. Metan.....	10
2.1. Vznik metanu v anoxickém prostředí.....	11
2.2. Vznik metanu v oxickém prostředí.....	14
2.2.1. Metan a eukaryotní organismy.....	14
2.2.2. Metan a prokaryotní organismy.....	15
Materiály a metody.....	16
3. Produkce metanu pikoplanktonními sinicemi.....	16
3.1. První pokus — příprava kultur.....	16
3.1.1. Odběr plynné frakce a detekce metanu.....	17
3.2. Druhý pokus — příprava kultur.....	18
3.2.1. Odběr plynné frakce a detekce metanu.....	18
3.3. Optická denzita a počet buněk.....	19
3.4. Statistika.....	19
4. Výsledky.....	20
4.1. Odběr plynné frakce a detekce metanu.....	20
4.2. Optická denzita a počet buněk.....	21
4.3. Statistika.....	21
5. Diskuze.....	22
6. Závěr.....	23
Seznam použitých zdrojů.....	24
Seznam příloh.....	33

Úvod

Metan je skleníkový plyn, jehož studium nabývá v poslední době na významu a mnoho vědeckých pracovišť se zabývá jeho přirozenou produkcí v přírodě. Dle nejnovějších poznatků patří mezi významné producenty metanu ve vodním prostředí nejen bakterie a *Archea*, ale také sinice. Hlavním důvodem pro psaní bakalářské práce na toto téma jsou předběžné výsledky z projektu zaměřeného na studium mikrobiální diverzity a funkce jihočeských rybníků (Mgr. Anna Matoušů, Ph.D., nepublikovaná data), které poukazují na významné korelace mezi metanem a pikoplanktonními sinicemi (drobnými sinicemi o velikosti do 2 μm).

Cílem této práce je obsáhnout informace o produkci metanu pikoplanktonními sinicemi (popř. sinicemi) z publikovaných vědeckých článků a následně provést vlastní výzkum na to, zda-li vybrané kmeny pikoplanktonních sinic produkují metan a za jakých podmínek se tak děje.

Pro kvalitní realizaci mého pokusu bylo důležité nejdříve zpracovat kapitulu teoretické části, kde se zabývám základní charakteristikou sinic a pikoplanktonních sinic. Popisuji zde jejich morfologii, výskyt a ekologický význam. Následuje kapitola zabývající se původem metanu ve vodním prostředí. Tato kapitola obsahuje stručné představení samotného plynu, dále způsoby jeho vzniku v anoxickém a oxickém prostředí. Zaměřuji se zde na vědecké články popisující prokaryotické a eukaryotické organismy, které za určitých podmínek v rámci různých metabolických procesů tvoří metan jako vedlejší produkt reakce.

V návaznosti na teoretickou část mé bakalářské práce jsou popsány pokusy s cílem prokázat produkci metanu pikoplanktonními sinicemi za určitých podmínek. V praktické části se věnuji popisu přípravy kultur, odběru plynné frakce a vyhodnocení jeho koncentrace. Poslední kapitolou praktické části je diskuze, ve které porovnávám zjištěné hodnoty metanu ve vlastních pokusech s již publikovanými výsledky.

Literární rešerše

1. Sinice

1.1. Morfologie a funkce buněk

Sinice jsou autotrofní prokaryotické organismy, schopné fotosyntézy rostlinného typu za vzniku kyslíku. Stélky mají jednobuněčnou nebo vláknitou podobu, mohou žít jednotlivě nebo utvářet kolonie. Od eukaryotických buněk se odlišují absencí buněčného jádra, dále neobsahují buněčné organely, jako jsou chloroplasty, mitochondrie a diktyozomy.

Protoplast rozlišujeme na dvě části, jedná se o povrchovou chromatoplazmu a středovou oblast — centroplazmu. V chromatoplazmě se nachází thylakoidy (fotosyntetické membrány). V thylakoidech jsou uloženy proteinové komplexy fotosystémů I a II, kde se ze světelné energie vytváří energie chemická. Kromě fykobiliproteinů, nacházejících se ve fykobilizomech, jsou asimilační barviva (chlorofyl a, b, c, d) obsaženy ve fotosyntetických membránách, které jsou uloženy v cytoplazmě (Kalina a Váňa 2005). Pro sinice je charakteristická chromatická adaptace, tzn. změna zastoupení fykobiliproteinů (fykocyanin a fykoerytrin) ve fykobilizomu za účelem posunutí spektra využitelného světla (Tandeau de Marsac 1977; Bennett a Bogobad 1973). Při tomto procesu dochází ke změně barvy. Škála barev se pohybuje od ocelově šedé přes zelenou až po červenou.

Hlavní zásobní látkou sinic je sinicový škrob. Sinice se dělí nepohlavním způsobem pomocí plazmidových molekul, kdy u sinic dochází k rekombinaci a transformaci DNA (Kalina a Váňa 2005).

1.2. Ekologie a význam sinic

Jsou nejstarším fotoautotrofním organismem na Zemi, o čemž svědčí například primitivní stavba buňky. První důkazy o jejich existenci pocházejí z doby před 3,2 miliardami let. V minulosti se sinice značně podílely na zvyšování koncentrace kyslíku v atmosféře. Kromě toho jsou původcem vzniku chloroplastů u eukaryotních organismů.

Sinice jsou kosmopolitními organismy, respektive jsou rozšířeny prakticky po celém zemském povrchu. Vyskytují se ve vodním prostředí, v půdě i v oblastech s extrémními podmínkami. Jsou schopny přežít v oblasti s vulkanickou aktivitou, kde lze zaznamenat velice vysoké teploty a hodnoty pH. V opačném případě se často vyskytují

v polárních oblastech, kde jsou dominantními fotoautotrofními organismy (Kalina a Váňa 2005). Sinice se také významně podílejí na tvorbě toxického vodního květu (Adámek et al. 2010). Velký význam mají i v potravinářském průmyslu, kde se biotechnologicky zpracovávají pro svůj vysoký obsah bílkovin, vitamínů a minerálů (Kalina a Váňa 2005).

1.3. Pikoplanktonní sinice

Sinice, které velikostně odpovídají rozmezí 0.2–2.0 μm , nazýváme pikoplanktonní sinice (Jasser a Callieri 2017). Přestože rozmezí velikosti je specifikováno, může dojít k překročení horní hranice. Pikoplanktonní sinice se vyskytují téměř všude, ve sladkovodních i mořských prostředích, termálních pramenech i v polárních oblastech. V mořích a oceánech hrají velice důležitou roli v potravních řetězcích a v produkci kyslíku (Stockner 1988). Pikoplanktonní sinice rodu *Synechococcus* a *Prochlorococcus* tvoří nejvíce studovanou skupinu mořských modelových organismů.

Pikoplanktonní sinice přispívají velkou měrou také k biomase a primární produkci jak v mořských, tak ve sladkovodních ekosystémech. Mají mnoho znaků, které jim umožňují přežít v oligotrofních podmínkách a podmínkách s nízkým světlem. Malá velikost a velký poměr plochy k objemu jim zajišťují výhodu v získávání živin oproti větším organismům (Agawin et al. 2000). Mimo jiné malá velikost má také minimální výdaje na chod buňky (Callieri a Stockner 2002).

Pikoplanktonní sinice tvoří spolu s bakteriemi základnu vodního mikrobiálního potravního řetězce a jsou hlavním energetickým zdrojem v mikrobiální smyčce (Callieri a Stockner 2002).

1.3.1. Taxonomie a morfologie pikoplanktonních sinic

Na základě molekulárních metod, například analýzy 16S ribozomální DNA, jsou pikoplanktonní sinice ve formě jednotlivých buněk rozděleny do 6 rodů. Jedná se o rody *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, *Cyanobium*, *Synechocystis*, *Cyanothece*, *Cyanobacterium* a *Vulcanococcus* (Di Cesare et al. 2018; Jasser a Callieri 2017). Rod *Prochlorococcus* je striktně mořský. *Synechococcus* se může vyskytovat jak ve slané, tak ve sladké vodě, zbytek rodů je sladkovodních.

Některé rody pikoplanktonních sinic zůstávají po rozdělení v blízkosti mateřské buňky díky schopnosti vytvářet sliz. Takové druhy utvářejí mikrokolonie a kolonie (Komárková 2002; Callieri et al. 2012). Mezi nejběžnější mikrokoloniální a koloniální rody se řadí *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Chroococcus*, *Coelosphaerium*, *Cyanobium*, *Cyanodictyon*, *Merismopedia*, *Romeria*, *Snowella* a *Tetracercus* (Jasser a Callieri 2017). Kolonie tvořící pikoplanktonní sinice jsou sice součástí vodního květu, ale na rozdíl od rodů nekoloniálních toxiny neprodukuje (Komárková 2002; Komárková a Šimek 2003).

Pikoplanktonní sinice mají specifickou strukturu buněčné stěny. Prokaryotické buňky se dělí podle vlastností buněčné stěny na gram-negativní a gram-pozitivní na základě rozdílného obarvení peptidoglykanové vrstvy krystalovou violetí (Gramovo barvení; Beveridge 1990). Zajímavostí pikoplanktonních sinic je jejich kombinace obou vlastností. Jak přítomnost vnější membrány složené z lipopolysacharidů (LPS), lipidů, proteinů a karotenoidů, která je znakem gram-negativním, tak silná a vysoce peptidoglykanová síť s navázaným polysacharidem, která je znakem gram-pozitivním (Hoiczky a Hansel 2000). Mezi další anatomické znaky pikoplanktonních sinic patří parakrystalická povrchová vrstva tvořená glykoproteinem, která zajišťuje ochrannou a pohybovou funkci buňky (Jasser a Callieri 2017).

Na základě množství fykocyaninu (PC) a fykoerytrinu (PE) obsaženého v buňkách pikoplanktonních sinic rozlišujeme dva typy. K určení množství fykobilinů je využívána jejich autofluorescence, která je pozorovatelná například při fluorescenční mikroskopii nebo průtokové cytometrii. Prvním typem jsou buňky červeně fluorescentní, které jsou bohaté na fykocyanin (PC-rich). Buňky, ve kterých převládá fykoerytrin (PE-rich) fluoreskují žlutě. Pikoplanktonní sinice s fykocyaninem obývají více mělká jezera s vyšší eutrofizací, jelikož dokáží pohltit oranžovo-červené světlo při ~625nm. Na rozdíl od buněk obsahující fykoerytrin, které se vyskytují spíše v hlubších a čistších jezerech, a to díky své schopnosti pohlcovat zelené světlo při ~560 nm (Callieri et al. 2012).

1.3.2. Ekologie a význam pikoplanktonních sinic

V přírodě se vyskytují ve formě jednotlivých buněk, mikrokolonií, případně kolonií. Pikoplanktonní sinice představují všude přítomné primární producenty v sladkovodním a mořském prostředí. V mírném podnebném pásu se obvykle vyskytují v oligotrofních, mezotrofních i eutrofních přehradních nádržích, jezerech ale také hypertrofních rybnících.

Rozvoj pikoplanktonních sinic závisí především na abiotických faktorech vodních ploch. U nás pozorujeme sezónní vývoj obvykle s vrcholy během pozdního jara a léta. Vrchol jarního rozvoje lze obvykle pozorovat v mělkých, eutrofních, hypertrofních nebo dystrofních jezerech (Callieri et al. 2012).

Pikoplanktonní sinice mají významný dopad na ostatní organismy zvyšováním tvorby uhlíku v mikrobiální smyčce, respektive v koloběhu látek (Callieri et al. 2002). Sinice využívají organické látky a ty dále slouží k potravě protozooplanktonu a metazooplanktonu. Mezi největší konzumenty patří heterotrofní bičíkovci, mixotrofní bičíkovci a nálevníci (Jürgens a Matz 2002; Salcher et al. 2005; Pernthaler et al. 1996). Požíráním zooplanktonu rybami se uhlík a ostatní látky dostávají až k vrcholu potravního řetězce ve vodě (Sommer et al. 2012). Následně se minerální látky díky rozkladu mrtvé organické hmoty navracejí zpět k pikoplanktonním sinicím (Callieri et al. 2002).

2. Metan

Metan (CH_4) je nejjednodušší uhlovodík, za běžných podmínek bezbarvý, bez zápachu a netoxický plyn. Vyskytuje se v atmosféře (atmosférický plyn) a pod povrchem země (zemní plyn). Co se týče množství, největším zásobníkem metanu je mořské dno, kde se plyn nachází ve formě pevného metan-hydrátu ($4 \text{CH}_4 \cdot 23 \text{H}_2\text{O}$; Sánchez et al. 2018)

Metan v atmosféře je po oxidu uhličitém (CO_2) druhým nejvýznamnějším skleníkovým plynem. Bylo zjištěno, že jeho účinek globálního oteplování je až 34krát vyšší než účinek oxidu uhličitého. Metan totiž díky struktuře své molekuly pohlcuje infračervené záření mnohem efektivněji (Bridgham et al. 2013; Hu et al. 2016; Yan et al. 2009). V atmosféře teplo dokáže zadržet až 100 let (IPCC 2014). Emise metanu představují zhruba 20 % z celkového množství polutantů, které přispívají k tzv. skleníkovému jevu (Kirschke et al. 2013).

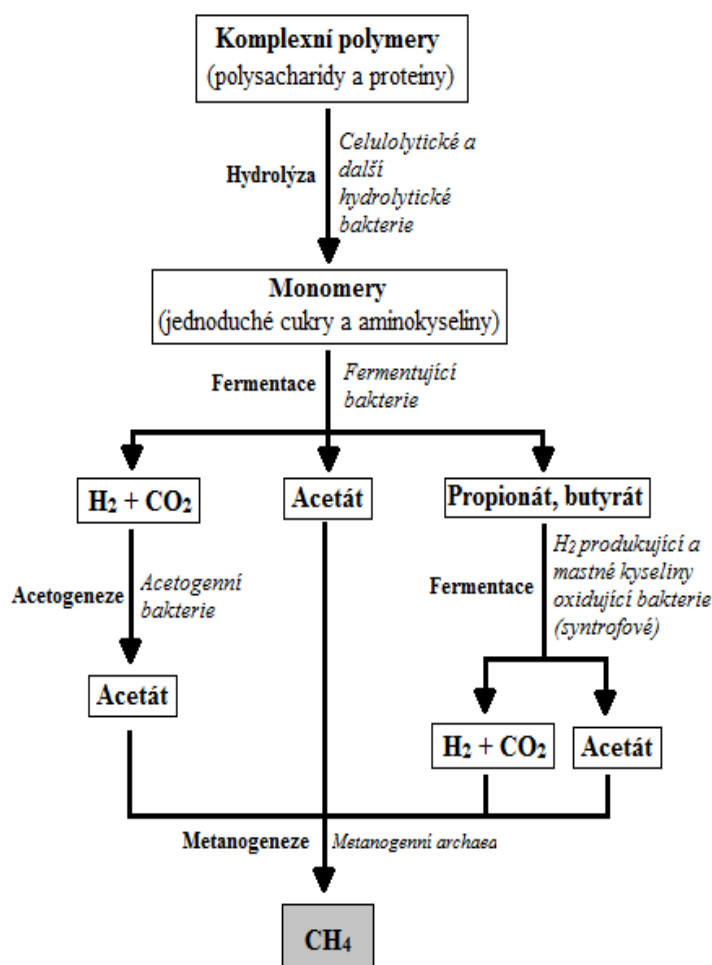
Původce atmosférického metanu dělíme na ty, které jsou způsobené lidskou činností (antropogenní) a ty přirozené. Na celkových emisích metanu se přírodní zdroje účastní přibližně ze 30 % a antropogenní ze 70 %. Nárůst množství antropogenního metanu v atmosféře zapříčinil rozmach zemědělství, zejména chov dobytka (Bridgham et al. 2013), pěstování rýže (Alpana et al. 2017), těžba fosilních paliv a hospodaření s odpadem (Denman et al. 2007). Nejpodstatnější přírodní zdroje jsou zamokřené půdy (Bridgham et al. 2013),

oceány a termiti žijící v symbióze s mikroorganismy, které pomáhají štěpit lignocelulózu (Brune 2014).

2.1. Vznik metanu v anoxickém prostředí

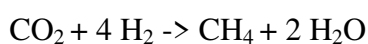
Téměř 70 % emisí metanu pochází z biologické produkce metanogenních *Archea* (fylogeneticky odlišné od eukaryot i bakterií; Rulík et al. 2013). Z hlediska taxonomie je doména *Archea* rozdělena do 8 kmenů – *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Korarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Aigarchaeota*, *Parvarchaeota* a *Bathychaeota* (Brochier-Armanet et al. 2008; Huber et al. 2002). Přičemž původcem metanu jsou *Archea* kmenu *Euryarchaeota* (Woese et al. 1990). Metan je produkován zejména v zamokřených půdách, rýžovištích, rašeliništích a v sedimentech vodních ekosystémů. Zde dochází k procesu štěpení komplexních rostlinných polymerů (celulózy, jiných polysacharidů a proteinů) na monomery (cukry, aminokyseliny) hydrolytickými mikroorganismy. Vzniklé monomery jsou dále štěpeny fermentujícími mikroorganismy na vodík (H_2) a acetát (CH_3COOH ; Rulík et al. 2013).

Produkce metanu, tzv. metanogeneze, probíhá za přísně anoxických podmínek, tedy bez přítomnosti kyslíku nebo jiných alternativních elektronových akceptorů. Může se jednat o dusičnany, trojmocné železo a sulfáty (Conrad 2007). Dojde-li například vlivem respirace k vyčerpání těchto oxidantů, konečné produkty fermentace jsou metanogeny přeměněny v procesu metanogeneze na metan a další vedlejší produkty.

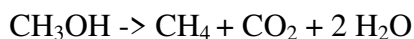


Obrázek 1: Schéma shrnující anaerobní dekompozici a metanogenezi (zdroj: Madigan et al. 2012).

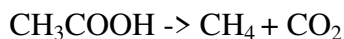
Existují tři základní skupiny substrátů, na jejichž základě rozlišujeme odlišné druhy metanogenů. Autotrofní a hydrogentrofní metanogeni využívají k tvorbě metanu oxid uhličitý (CO_2), kyselinu mravenčí (HCOOH) a oxid uhelnatý (CO). Typickým donorem elektronů pro redukci oxidu uhličitého (CO_2) je vodík (H_2). Až na několik málo výjimek jsou metanogeni schopni vodík využívat.



Další řadou metanogenů jsou ti, kteří generují metan redukcí metylové skupiny (CH_3) v metanolu (CH_3OH) a metylaminech (CH_3NH_3^+).



Posledním typem je acetoklastická (acetotrofní) metanogeneze, ve které je substrátem acetát (CH_3COOH).



Produkce metanu v mořských sedimentech je ve srovnání se sladkovodními nižší – jedním z důvodů jsou sulfát redukující bakterie, které jsou úspěšnější v konkurenci o substrát. Jejich úspěch tkví v energeticky výhodnější redukci síranů oproti energeticky náročnější metanogenezi (Rulík et al. 2013).

Přirozeným filtrem metanu je jeho odbourávání prostřednictvím specializovaných mikroorganismů tzv. metan-oxidujících bakterií (MOB). Metan pro ně představuje jediný zdroj uhlíku a energie. Uhlík pocházející z metanu tyto bakterie částečně zabudují do své biomasy a částečně prodýchají (za vzniku oxidu uhličitého a vody) (Utsumi et al. 1998; Bastviken et al. 2008).



Tyto mikroorganismy jsou sice schopné zmetabolizovat většinu vyprodukovaného metanu, nicméně globální produkce metanu převyšuje jeho spotřebu (Rulík et al. 2013).

Mikroorganismy nezmetabolizovaný metan z oblastí hlubinných a pobřežních stojatých vod, oceánů, moří, jezer a rybníků se k povrchu dostává skrz vertikální a laterální sloupce (Michmerhuizen et al. 1996; Rudd a Hamilton 1978; Murase et al. 2003; Bastviken et al. 2004). Existuje několik možností transportu metanu, například prostřednictvím jednoduchého difúzního proudění nebo proudění vytvořené rostlinami. Při velmi vysoké koncentraci metanu se ze sedimentu uvolňuje v podobě bublin (např. Goodrich et al. 2011; Bussmann 2005; Bastviken et al. 2004; Whiting a Chanton 1996). To platí pro vodní ekosystémy, kde je povrchová vrstva v relativně těsném kontaktu se sedimenty (Michmerhuizen et al. 1996; Murase et al. 2003; Bastviken et al. 2004). Nicméně i přes tento fakt se setkáváme s hromaděním velkého množství metanu v povrchových vrstvách mnoha jezer (Utsumi et al. 1998; Murase et al. 2003; Grossart et al. 2011; Tang et al. 2014; Yao et al. 2016; Wang et al. 2017) a oceánů (Karl et al. 2008; Damm et al. 2010; Bogard et al. 2014). Koncentrace metanu ve střední vrstvě, tzv. metalimniu, je řádově vyšší než

koncentrace ve spodní vrstvě, tzv. hypolimnium, a horní vrstvě, tzv. epilimniu (Bogard et al. 2014; Blees et al. 2015; Luysaert et al. 2012; Schulz et al. 2001). Tento jev se nazývá metanovým paradoxem (Repeta et al. 2016; Reeburgh 2007). Z toho vyplývá, že kromě anoxické metanogeneze je zde přítomna tvorba metanu i v prostředí s výskytem kyslíku a oxidantů (Peeters et al. 2019; DelSontro et al. 2018; Bogard et al. 2014; Schulz et al. 2001).

2.2. Vznik metanu v oxickém prostředí

Kromě již relativně dobře probádané metanogeneze za přísně anoxických podmínek, přibývají v posledních letech studie o tvorbě metanu za oxických podmínek, tedy za přítomnosti kyslíku nebo jiných alternativních akceptorů elektronu v místech produkce. Je známo, že eukaryotní organismy, jako jsou například řasy (Klintzsch et al. 2019; Lenhart et al. 2016), rostliny (Keppler et al. 2006), houby (Lenhart et al. 2012), lišejníky (Lenhart et al. 2015), zvířata (Tuboly et al. 2013) a v poslední řadě také člověk (Keppler et al. 2016) jsou rovněž původci metanu.

2.2.1. Metan a eukaryotní organismy

Vodní květ způsobený skupinou řas *Coccolithophorida* uvolňuje do atmosféry velké množství dimethylsulfidu (Holligan et al. 1993). Mezi nejznámější zástupce této skupiny patří právě jednobuněčná řasa *Emiliana huxleyi*, u které Lenhart et al. (2016) popisují procesy fixace uhlíku, během kterých dochází k tvorbě metanu. V těchto procesech využívají hydrogenuhličitanu a methylové skupiny vázané na sirné sloučeniny. Hydrogenuhličitan je absorbován a dále využíván k tvorbě organických sloučenin během různých fází metabolismu, kde je využit jako nesespecifický zdroj uhlíku (Kanehisa et al. 2014). Kromě hydrogenuhličitanů řasy využívají sloučeniny síry a methylových skupin, jako jsou například thioestery, sulfoxidy a sulfoniové soli. Po absorbování jsou sloučeniny zapojeny do řady metabolických cest a trans-methylačních reakcí (Bruhn et al. 2012; Stefels 2000). Řasy používají část sloučenin pro syntézu proteinů. V *E. huxleyi* se podílejí na syntéze dimethylsulfoniopropionátu (DMSP), hlavního prekurzoru dimethylsulfidu (Lenhart et al. 2016). Míra uvolňování plynu řasou *E. huxleyi* se rapidně zvyšuje při teplotě v rozmezí od 10 °C do 21,5 °C, naopak při dalším zvyšování teploty (až 23,8 °C) dochází ke snížení produkce. Vyjma teploty má vliv na tvorbu metanu také intenzita světla, a právě proto během letního období v subpolárních a mírných oblastech dochází k rozvoji vodního květu

této řasy (Klintzsch et al. 2020). Kromě výše zmíněné skupiny řas se v mořích vyskytují další planktonní společenstva jednobuněčných fotosyntetizujících mikroorganismů, které svou činností produkují sloučeniny metanu. V takových společenstvech se nacházejí dominantní druhy řas, kterými jsou například *Phaeocystis globosa* a *Chrysochromulina* sp. Ty, stejně jako *Emiliana huxleyi* tvoří metan při získávání uhlíku z hydrogenuhličitanů (Klintzsch et al. 2019).

2.2.2. Metan a prokaryotní organismy

Zvýšené koncentrace metanu bylo možné detekovat také v okysličených vrstvách vod jezer i moří, za což jsou pravděpodobně zodpovědné fotosyntetizující gramnegativní bakterie. Studie Bižić et al. (2020) a Khatun et al. (2019) potvrzují, že někteří zástupci sinic jsou schopni v těchto podmínkách metan produkovat.

Fotoautotrofní bakterie potřebují k růstu fosfáty, které se v prostředí často vyskytují v nízkých koncentracích. Jelikož právě fosfát je jedním z hlavních růstových faktorů, mají vyvinuté speciální strategie k doplnění i při jeho nedostatku (Ploug et al. 2011; Sundareshwar et al. 2003). Schopnost rychle a efektivně vstřebávat fosfát za nepříznivých podmínek umožňuje vysoce afinní transportní komplex PstABCS, který patří do *pho* regulonu (Santos-Beneit 2015). Geny degradující fosfonáty (*phn*) na fosfáty, které jsou též součástí regulonu *pho*, se skládají z transportního komplexu a podjednotek C-P lyázy, které štěpí vazbu ve fosfonátech. Vlastní je sinice rodu *Synechococcus*, *Trichodesmium*, *Anabaena cylindrica* a *Nodularia spumigena* (Adams et al. 2008; Dyhrman et al. 2006; Forlani et al. 2008; Teikari et al. 2018). Při tomto procesu je metan do prostředí uvolňován jako vedlejší produkt demethylace fosfonových kyselin, např. kyselina methylfosfonová. Setkáváme se i s dalšími methylovými sloučeninami, které jsou prekurzory k produkci metanu. Jsou to například dimethylsulfoniopropionát, trimethylamin a methionin (Damm et al. 2010; Lenhart et al. 2016; Tang et al. 2016).

Dalším vysvětlením přítomnosti metanu v oxickém prostředí je spojení vláknitých sinic s metanogenními *Archea*, které jsou v tomto symbiotickém vztahu schopny využívat uvolňovaný vodík. Sinice jej uvolňují při fixaci atmosférického molekulárního dusíku (Berg et al. 2014). V neposlední řadě Zheng et al. (2018) studovali novou enzymatickou dráhu, tzv. nitrogenázu, využívající pro přenos elektronů pouze železo. Ve své studii popisují tento proces na bakterii *Rhodospseudomonas palustris*, kde je plynný dusík přeměňován na

amoniak, který je dále fixován do organické hmoty a současně je katalyzována přeměna oxidu uhličitého na metan.

Vyvstává otázka, co může být zdrojem metanu v hypertrofních rybnících, kde se neseťkáváme s nedostatkem biogenních prvků. Metan by mohl vznikat díky metanogenním *Archea*, které se nachází jak v sedimentech, tak pravděpodobně i na částicích vyskytujících se ve vodním sloupci. Kromě *Archea* však mohou být zodpovědné za produkci metanu také pikoplanktonní sinice. Hlavním důvodem tohoto tvrzení jsou předběžné výsledky z projektu zaměřeného na studium mikrobiální diverzity a funkce jihočeských rybníků (Mgr. Anna Matoušů, Ph.D., nepublikovaná data), které poukazují na významné korelace mezi metanem a pikoplanktonními sinicemi. V případě tvorby metanu pikoplanktonními sinicemi v hypertrofních rybnících jsou demethylace fosfonových kyselin a nitrogenáza nepravděpodobné, protože k nim dochází pouze během nedostatku fosforu a dusíku. Navíc schopnost štěpit vazbu ve fosfonátech a fixovat dusík mají pouze některé druhy. Studie Bižic et al. (2020) poukazuje na možnou alternativní biochemickou cestu, která by mohla osvětlit produkci metanu mimo jiné i v rybnících. Jedná se o mechanismus, při kterém sinice přeměňují oxid uhličitý na metan. Vzhledem k nárůstu produkce metanu s nástupem světla se domnívají, že princip tohoto procesu úzce souvisí s fotosyntézou — například s elektron-transportním řetězcem.

Materiály a metody

3. Produkce metanu pikoplanktonními sinicemi

Celkem jsme provedli dva pokusy. V prvním bylo testováno deset kmenů pikoplanktonních sinic izolovaných z různých oblastí a pěstovaných v jednom typu kultivačního média a ve dvou různých světelných režimech. Ve druhém pokusu jsme vybrali 12 pikoplanktonních kmenů pouze z českých hypertrofních rybníků, které byly kultivovány ve dvou typech kultivačního média. Cílem bylo získat prvotní informace o možné produkci metanu pikoplanktonními sinicemi z našich sinicových kultur. Dosud jsme tento parametr u našich kultur neměřili a nestudovali.

3.1. První pokus — příprava kultur

Ze sbírky fotoautotrofních organismů (Jezberová, BC AVČR – HBÚ) bylo pro výzkum vybráno deset kultur pikoplanktonních sinic z různých oblastí (**Tab. I**). Bylo připraveno třicet erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml, do kterých bylo pomocí odměrného válce přidáno 50 ml předem připraveného živného roztoku. Jako živný roztok bylo použito WC kultivační médium (Guillard a Lorenzen 1972), které je obohacené o vitamíny, nezbytné pro růst pikoplanktonních sinic. Chemické složení WC kultivačního média je popsáno v **Tab. II**. Za přísně aseptických podmínek bylo ve flow boxu postupně naočkováno všech 30 erlenmeyerových baněk. Z každé kultury bylo pomocí nakalibrované mikropipety odebráno 0,5 ml narostlé kultury a následně přidáno do třech erlenmeyerových baněk s WC médiem. Vznikly tak triplikáty všech kultur pikoplanktonních sinic o stejné koncentraci a objemu. Triplikáty kultur byly zavřeny uzávěrem z buničité vaty, která umožňuje výměnu plynů mezi kulturou a okolím. Triplikáty byly umístěny do kultivační místnosti, kde je konstantní teplota 19 °C a pravidelný světelný režim 16h světlo / 8h tma. Intenzita světla dosahovala v průměru 22,23 $\mu\text{mol fotonů/m}^2/\text{s}$.

Po uplynutí necelého měsíce, kdy takto připravené kultury rostly v kultivační místnosti, byly za přísně aseptických podmínek ve flow boxu přepipetovány do skleněných lahviček o objemu 100ml uzavřené butylovými septy a hliníkovými krimpovacími zátkami, aby nedocházelo k výměně plynů s okolím. Před samotným pipetováním byly baňky důkladně promíchány, aby došlo k rovnoměrnému rozprostření buněk. K odebrání 50 ml roztoku z erlenmeyerových baněk byla použita automatická pipeta. Připravilo se deset triplikátů určených k růstu a produkci metanu během světelné fáze a deset triplikátů určených k tvorbě metanu během temnostní fáze. Kromě těchto vzorků byl připraven triplikát obsahující pouze vzduch. Kultury testované na produkci metanu ve světelné fázi byly ponechány v kultivační místnosti při světelném režimu 16h světlo / 8h tma. Triplikáty pro temnostní fázi byly uloženy tamtéž, ale v uzavíratelných boxech bez přístupu světla. Takto připravené vzorky byly po dobu tří dnů uchovány opět v kultivační místnosti za stejných podmínek jako vzorky předešlé. Měření bylo provedeno 3. den.

3.1.1. Odběr plynné frakce a detekce metanu

Měření proběhlo po třech dnech růstu v kultivační místnosti. Z kultivační místnosti byly přemístěny v uzavíratelných boxech, aby nedocházelo k přílišnému výkyvu teploty a

zabránění přístupu světla ke vzorkům určeným k tvorbě metanu během temnostní fáze. Aby se zjistilo množství vyprodukovaného metanu, bylo nutné propíchnout butylové septum injekční jehlou s plastovou stříkačkou a odebrat vzorek plynu, tzv. headspace o objemu 700 μl . Objem odebraného vzorky plynu byl zarovnán na 500 μl a změřen na plynového chromatografu HP 5890 Series II. Přístrojem vygenerované plochy píků reprezentující metan obsažený ve vzorcích byly použity k výpočtu hodnot koncentrace v ppm, pomocí hodnot změřených kalibračních plynů o známé koncentraci.

3.2. Druhý pokus — příprava kultur

Ze sbírky fotoautotrofních organismů (Jezberová, BC AVČR – HBÚ) bylo vybráno 12 kultur pikoplanktonních sinic (**Tab. III**), které pocházely z českých hypertrofních rybníků a byly z nich vytvořeny triplikáty ve dvou odlišných kultivačních médiích — WC (**Tab. II**) a BG11 (**Tab. IV**). Erlenmeyerovy baňky s triplikáty (**Obr. 2**) byly připraveny a kultivovány stejným způsobem jako při prvním pokusu.

Po 30 dnech byly narostlé kultury přepipetovány stejným způsobem a za stejných podmínek jako při prvním pokusu, kromě odebíraného objemu, který činil 45 ml roztoku. Připravilo se 12 triplikátů narostlých ve WC médiu a 12 triplikátů narostlých v BG11 médiu, včetně kontrol obsahujících pouze WC a BG11 médium. Triplikáty, stejně jako v prvním pokusu, byly napipetovány do lahvíček uzavřených butylovými septy a krimpovacími víčky (**Obr. 3**). Takto připravené vzorky byly uchovány po dobu týdne v kultivační místnosti při světelném režimu 16h světlo / 8h tma. Měření proběhlo 3. a 7. den.

3.2.1. Odběr plynné frakce a detekce metanu

Po třech dnech růstu byly vzorky z kultivační místnosti přemístěny opět v uzavíratelných boxech do laboratoře s příslušným vybavením. Stejně jako při prvním pokusu byla použita injekční jehla s plastovou stříkačkou, se kterou se přes butylové septum odebíral vzorek plynu, tzv. headspace. Odebraný vzorek plynu o objemu 500 μl byl zarovnán na 200 μl a změřen na předem zkalibrovaném plynovém chromatografu HP 7820A (Agilent, USA), vybaveném plamenovým ionizačním detektorem. Za určitý retenční čas se vyobrazil pík příslušící metanu a hodnoty jeho koncentrace. Hodnoty koncentrace v ppm

byly zapsány do tabulky v MS Excelu. Tímto způsobem byly proměřeny všechny připravené vzorky.

Po sedmi dnech růstu se postupovalo stejným způsobem a měřilo se na stejném plynovém chromatografu jako během měření po třech dnech.

3.3. Optická denzita a počet buněk

Po odběru plynné frakce a detekce metanu byla změřena optická denzita všech triplikátů z druhého pokusu na přístroji SPEKOL 11 Carl Zeiss Jena. Triplikáty byly měřeny při vlnové délce 760 nm v kyvetě o délce strany 1,002 cm. Naměřené hodnoty byly zapsány do tabulky v Excelu. Následovalo počítání buněk na epifluorescenčním mikroskopu zn. Olympus BX75. V předpřipravených preparátech s kulturou narostlou ve WC médiu a stejnou kulturou narostlou v BG11 médiu byl za použití UV světla a zeleného epifluorescenčního světla (510-560 nm) spočítán počet buněk pikoplanktonních sinic. Poté byl pomocí zjištěné optické denzity a počtu buněk v dané kultuře metodou kalibrační křivky vypočítáný celkový počet buněk v jednotlivých vzorcích.

3.4. Statistika

K otestování produkce metanu během prvního a druhého pokusu byla naměřená data zpracovaná v programu STATISTICA.

Pokus 1: Získané hodnoty koncentrací ze vzorků v temnostní fázi a vzorků narostlých při světelném režimu byly srovnány s hodnotou startovní koncentrace. K zamítnutí nulové hypotézy (H_0 = Koncentrace naměřeného metanu se ve vzorcích z temnostní fáze a vzorcích narostlých při světelném režimu neliší od startovní koncentrace.) byl použitý jednovýběrový t-test.

Pokus 2: Data koncentrací metanu získaná z plynového chromatografu z třetího a sedmého dne během druhého pokusu byla vložena do programu. K zamítnutí nulové hypotézy (H_0 = Koncentrace metanu naměřené po třech a sedmi dnech se neliší.) byl využitý párový t-test. Pro zamítnutí nulové hypotézy (H_0 = Koncentrace naměřeného metanu ve všech kulturách se neliší od startovní koncentrace.) byl použitý jednovýběrový t-test. Kultury, které vykazovaly signifikantní nárůst v produkci metanu, byly samostatně prověřeny vůči startovní koncentraci. K zamítnutí nulové hypotézy (H_0 = Koncentrace

naměřeného metanu v jednotlivých kulturách se neliší od startovní koncentrace.) byl použitý také jednovýběrový t-test.

4. Výsledky

4.1. Odběr plynné frakce a detekce metanu

Hodnoty koncentrace (ppm) metanu získané z plynových chromatografů v prvním a druhém pokusu byly zpracovány a přepočítány na koncentraci plynu ve vodě v nmol/L pomocí koeficientu rozpustnosti z publikace Yamamoto et al. (1976).

Pokus 1: Výsledné hodnoty, které byly naměřeny po třech dnech růstu kultur v lahvičkách s WC médiem bez možnosti výměny vzduchu jsou zpracovány v grafu (**Obr. 4**). V porovnání s množstvím metanu naměřeném ve standartu, zde vidíme jemný nárůst v produkci plynu některými kulturami. Z hlediska celkového pohledu na produkci lze pozorovat nárůst spíše v kulturách, které v kultivační místnosti rostly při světelném režimu 16h světlo / 8h tma. Kultury narostlé v temnostní fázi příliš velký nárůst neprokazují. Nejproduktivnější kulturou pěstovanou při světelném režimu je izolát z Kvítkovického rybníka (KV - Vojta), zatímco v temnostní fázi je to kultura získaná z přehradní nádrže Vír (VIR).

Pokus 2: Výsledné hodnoty naměřené po třech dnech růstu jsou zpracovány společně s daty ze sedmého dne. První graf (**Obr. 5**) popisuje produkci ve WC médiu a druhý graf (**Obr. 6**) tvorbu metanu v BG11 médiu. Porovnáme-li hodnotu koncentrace získanou ze standardů obou médií, dokážeme potvrdit malý nárůst produkce metanu určitými kulturami, nikoliv však přímou metanogenezi pikoplanktonními sinicemi. Množství metanu naměřeného v kontrolním vzorku pouze s WC médiem je 239,02 nmol/L a v kontrolním vzorku pouze s BG11 médiem je hodnota koncentrace metanu 170,13 nmol/L. Největším producentem metanu z kultur narostlých ve WC médiu je vzorek odebraný z rybníka Koclířov (KOC 21/117), jehož koncentrace po odečtení kontroly činí 46,9 nmol/L. Největší množství metanu ze vzorků narostlých v BG11 médiu je opět kultura získaná z Kvítkovického rybníka (KV – Vojta), kde koncentrace po odečtení kontroly činí 101,37 nmol/L.

Výsledné hodnoty naměřené po sedmi dnech růstu jsou zpracovány společně s daty z třetího dne. V **Obr. 5** je porovnána koncentrace metanu ve vzorcích s WC médiem a

v **Obr. 6** s BG11 médiem. Koncentrace naměřená v kontrolních vzorcích se příliš nelišila od měření koncentrace po třech dnech růstu. Ve vzorcích s WC médiem činila 239,44 nmol/L a s BG11 médiem 168,34 nmol/L. Ve srovnání s kontrolními vzorky a údaji, naměřenými po třech dnech růstu, lze pozorovat zvýšení koncentrace metanu určitými kmeny. Ve vzorcích s kmeny narostlými ve WC médiu pozorujeme nárůst koncentrace metanu u dalšího kmene izolovaného z Kvítkovického rybníka KV – S1/14, jehož koncentrace po odečtení kontroly činí 93,19 nmol/L. Zatímco ve vzorcích s kmeny narostlými v BG11 médiu je viditelný nárůst opět u kmene KV – Vojta, jehož koncentrace po odečtení kontroly činí 276,31 nmol/L.

4.2. Optická denzita a počet buněk

Hustota kultur po ukončení pokusu dosahovala řádově 10^8 b/mL. Po sedmi dnech růstu kultur ve WC médiu byl rozsah optické denzity od $0,145 \pm 0,025$ AU do $0,401 \pm 0,198$ AU, což odpovídalo počtu buněk $1,13 - 6,36 \times 10^8$ b/mL. V kulturách s BG11 médiem došlo k výraznějším rozdílům v hodnotách optické denzity. Největší hodnota byla $1,179 \pm 0,045$ AU odpovídající $4,96 \times 10^8$ b/mL, zatímco ta nejmenší pouhých $0,154 \pm 0,028$ AU ($0,62 \times 10^8$ b/mL).

4.3. Statistika

Pokus 1: Z hlediska porovnání startovní koncentrace a koncentrace vzorků uložených v odlišných světelných podmínkách byl prokázán rozdíl jak ve vzorcích v temnostní fázi, tak ve vzorcích narostlých při světelném režimu. Došlo k malému nárůstu metanu, což bylo statisticky průkazné ($p = 0,000001$).

Pokus 2: Celkový pohled na nárůst koncentrací metanu z 3. na 7. den v kulturách narostlých ve WC médiu je s vysokou hladinou významnosti ($p = 0,000051$) průkazný. Zatímco v kulturách narostlých v BG11 médiu je průkazný s nižší hladinou významnosti ($p = 0,039987$). Z hlediska porovnání startovní koncentrace a koncentrace všech vzorků byl rozdíl v hodnotách prokázán u kmenů ve WC médiu s hladinou významnosti $p = 0,003167$ a u kmenů v BG11 médiu s hladinou významnosti $p = 0,000002$. Při vyhodnocování vybraných jednotlivých kultur byly zjištěny následující informace. U kultury z Kvítkovického rybníka (KV – S1/14) narostlé ve WC médiu ($p = 0,069021$) a kultury

z rybníka Dehtář (DH - S1/10N - B5) narostlé v BG11 médiu ($p = 0,137198$) se naměřené koncentrace metanu od startovní hodnoty prokazatelně neliší. Naopak u kultury KV – Vojta narostlé v BG11 se prokázal rozdíl s vysokou hladinou významnosti ($p = 0,001642$).

5. Diskuze

Cílem diskuze je zpracovat data a informace získané z pokusů provedených ve vlastním výzkumném šetření a následně je porovnat s daty již publikovanými. Samotné pokusy se lišily již v jejich provedení. První pokus byl proveden s kulturami pikoplanktonních sinic z různých oblastí z celého světa, které rostly pouze ve WC médiu. Byl to náš pilotní pokus, který měl za cíl zjistit, zda k produkci metanu vůbec dochází a nastínit ideální podmínky pro další studium. Naopak ve druhém pokusu byly použity kmeny pikoplanktonních sinic, izolované pouze z českých hypertrofních rybníků, a kromě WC média byly pěstovány navíc i v BG11 médiu. Další faktor, který ovlivnil výsledky, byly světelné podmínky, které byly u obou pokusů nastaveny odlišně. Vzorky z prvního pokusu byly uchovány jak při světelném režimu, tak v temnostní fázi. Zatímco v druhém pokusu se setkáváme pouze s růstem při režimu světelném. Rozdílná příprava pokusů vedla k odlišným naměřeným hodnotám.

Měření obou pokusů proběhlo po třech dnech růstu. Ve druhém pokusu probíhalo měření navíc i sedmý den. Způsob měření po třech dnech růstu v druhém pokusu byl identický se způsobem, který Bižić et al. (2020) zvolili ve svém pokusu, jenž měl za úkol potvrdit produkci metanu sinicemi a pikoplanktonními sinicemi. Na rozdíl od jejich hodnot se však hodnoty koncentrace vyprodukovaného metanu pikoplanktonními sinicemi v mém pokusu provedeném po třech dnech lišily. Údaje získané z mého měření neprokázaly metanogenezi pikoplanktonními sinicemi, zatímco Bižić et al. (2020) ve svém pokusu metanogenezi prokázali. Odlišnost výsledků z měření koncentrace metanu mohlo zapříčinit složení růstového média, rozdílné podmínky při růstu, počáteční koncentrace sinicových kultur nebo jejich složení. V případě pokusu Bižić et al. (2020) použili kultury pikoplanktonních sinic bez kontaminujících mikroorganismů, tzv. axenické kultury, avšak neuvedli počáteční koncentraci.

K zajímavému údaji se dostáváme až při měření koncentrace metanu po sedmi dnech růstu v kultivační místnosti. U kmenů z Kvítkovického rybníka a rybníka Dehtář narostlých

v BG11 a WC médiu byl zaznamenán zjevný nárůst metanu, což nasvědčuje metanogenezi. Nicméně na základě statistiky byla metanogeneze prokázána pouze v jedné kultuře izolované z rybníka Kvítkovice narostlé v BG11 médiu. Tato kultura KV - Vojta produkovala jako jediná metan i v prvním pokuse. Pro vysvětlení, proč a za jakých podmínek došlo právě v tomto vzorku k nárůstu produkce, bude potřeba další výzkum. Jelikož se nejedná o axenickou kulturu, mohou metan produkovat přítomné bakterie. Další neznámou je otázka, proč došlo k takovému vzrůstu až po týdnu, nikoliv po třech dnech. Během růstu v lahvičkách bez možnosti výměny vzduchu se v rámci dnů mění podmínky, které by mohly vést k zodpovězení otázky proč. Může se jednat o kolísání hodnot kyslíku. Příkladem je shlukování pikoplanktonních sinic, které po určité době vytvoří anoxické podmínky vhodné pro metanogenní *Archea*. Jednou z dalších odpovědí může být například samotná rychlost produkce metanu. Další nevysvětlenou otázkou je fakt, že byl metan produkován v BG11 médiu, a ne ve WC.

V prvním pokusu bylo zjištěno, že produkce metanu při světelném režimu převládá nad produkcí pouze v temnostní fázi. Tento fakt by mohl potvrdit teorii, kde Bižić et al. (2020) navrhuje spojitost tvorby metanu s fotosyntézou. Z celkového vizuálního pohledu na produkci metanu kmeny pikoplanktonních sinic ve druhém pokusu byla v porovnání se vzorky s WC médiem menší než ve vzorcích s BG11 médiem. Celkový vizuální pohled byl následně potvrzen statistickým výpočtem. Jelikož oba druhy vzorků byly kultivovány za stejných světelných a teplotních podmínek, může rozdílnost v hodnotách koncentrací vysvětlit právě rozdílné zastoupení chemických sloučenin v jednotlivých růstových médiích anebo rychlost růstu v daných médiích (Švecová 2019).

Námi naměřené koncentrace metanu dosahovaly hodnot 276,31 nmol/L. V porovnání s jinými publikovanými výsledky jsou to velice nízké hodnoty, např. Günthel et al. (2019) ve své studii udávají koncentraci metanu naměřenou v oxické vodě, která dosahuje 1400 nmol/L. V atmosféře se setkáváme s mnohonásobně větší koncentrací. Poslední naměřená data koncentrace metanu z července 2019, která zveřejnila webová stránka Global Monitoring Laboratory se pohybují v hodnotách řádově tisíckrát větších.

6. Závěr

Metan je jeden z nejvýznamnějších skleníkových plynů, ale i přesto nejsou známy všechny způsoby jeho vzniku. Z literární rešerše vyplývá, že tvorba metanu v anoxickém prostředí je prozkoumána do mnohem větší hloubky, na rozdíl od produkce metanu v prostředí oxickém. Měření metanu po třech dnech růstu vedlo k zjištění mírného nárůstu koncentrace, ale ne tak velkému, aby potvrdilo přímou metanogenezi pikoplanktonními sinicemi. Zatímco údaje získané po týdnu už vedly k lepším výsledkům, na jejichž základě byla potvrzena přímá produkce metanu alespoň u jednoho kmene pikoplanktonní sinice. Kvůli nízké míře publikovaných článků na toto téma je složité diskutovat, proč plyn neprodukuje ve větším měřítku. Je tedy důležité dále pracovat na výzkumech zabývajících se tímto tématem a osvětlit nové procesy, které vedou k produkci metanu, zodpovědnému mimo jiné za globální oteplování planety.

Seznam použitých zdrojů

- ADAMS, M. M., M. R. GÓMEZ-GARCÍA, A. R. GROSSMAN a D. BHAYA (2008): Phosphorus deprivation responses and phosphonate utilization in a thermophilic *Synechococcus* sp. from microbial mats. *Journal of Bacteriology* 190(24), 8171–8184.
- ADÁMEK, Z., J. HELEŠIC, B. MARŠÁLEK a M. RULÍK (2010): Aplikovaná hydrobiologie. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- AGAWIN, N. S. R., C. M. DUARTE a S. AGUSTÍ (2000): Nutrient and temperature control of the contribution of picoplankton to phytoplankton biomass and production. *Limnology and Oceanography* 45(3), 591–600.
- ALPANA, S., P. VISHWAKARMA, T. K. ADHYA, K. INUBUSHI a S. K. DUBEY. (2017): Molecular ecological perspective of methanogenic archaeal community in rice agroecosystem. *Science of The Total Environment* 596-597, 136-146.
- BASTVIKEN, D., J. J. COLE, M. L. PACE a M. C. VAN DE BOGERT (2008): Fates of methane from different lake habitats: Connecting whole-lake budgets and CH₄ emissions. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 113(G2).
- BASTVIKEN, D., J. COLE, M. PACE a L. TRANVIK (2004): Methane emissions from lakes: Dependence of lake characteristics, two regional assessments, and a global estimate. *Global Biogeochemical Cycles* 18(4), 1–12.

- BENNETT, A. a L. BOGOBAD (1973): Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology* 58(2), 419–435.
- BERG, A., P. LINDBLAD a B. H. SVENSSON (2014): Cyanobacteria as a source of hydrogen for methane formation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(2), 539–545.
- BEVERIDGE, T. J. (1990): Mechanism of gram variability in select bacteria. *Journal of Bacteriology* 172(3), 1609–1620.
- BIŽIĆ, M., T. KLINTZSCH, D. IONESCU, M. Y. HINDIYEH, M. GÜNTHEL, A. M. MURO-PASTOR, W. ECKERT, T. URICH, F. KEPPLER a H. P. GROSSART (2020): Aquatic and terrestrial cyanobacteria produce methane. *Science Advances* 6(3).
- BLEES, J., H. NIEMANN, M. ERNE, J. ZOPFI, C. J. SCHUBERT a M. F. LEHMANN (2015): Spatial variations in surface water methane super-saturation and emission in Lake Lugano, southern Switzerland. *Aquatic Sciences* 77(4), 535–545.
- BOGARD, M. J., P. A DEL GIORGIO, L. BOUTET, M. C. G. CHAVES, Y. T. PRAIRIE, A. MERANTE a A. M. DERRY (2014): Oxic water column methanogenesis as a major component of aquatic CH₄ fluxes. *Nature Communications* 5(1), 5350.
- BRIDGHAM, S. D., H. CADILLO-QUIROZ, J. K. KELLER a Q. ZHUANG (2013): Methane emissions from wetlands: Biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales. *Global Change Biology* 19(5), 1325–1346.
- BROCHIER-ARMANET, C., S. GRIBALDO a P. FORTERRE (2008): A DNA topoisomerase IB in Thaumarchaeota testifies for the presence of this enzyme in the last common ancestor of Archaea and Eucarya. *Biology Direct* 3(1).
- BRUHN, D., I. M. MØLLER, T. N. MIKKELSEN a P. AMBUS (2012): Terrestrial plant methane production and emission. *Physiologia Plantarum* 144(3), 201–209.
- BRUNE, A. (2014): Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nature Reviews Microbiology* 12(3), 168-180.
- BUSSMANN, I. (2005): Methane release through resuspension of littoral sediment. *Biogeochemistry* 74(3), 283–302.

- CALLIERI, C., G. CRONBERG a J. G. STOCKNER (2012): Freshwater Picocyanobacteria: Single Cells, Microcolonies and Colonial Forms. In: WHITTON, B. (ed), Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space, Springer, Dordrecht, s. 229–269.
- CALLIERI, C. a J. G. STOCKNER (2002): Freshwater autotrophic picoplankton: A review. *Journal of Limnology* 61(1), 1–14.
- CONRAD, R. (2007): Microbial Ecology of Methanogens and Methanotrophs. *Advances in Agronomy* 96, 1–63.
- DAMM, E., E. HELMKE, S. THOMS, U. SCHAUER, E. NÖTHIG, K. BAKKER a R. P. KIENE (2010): Methane production in aerobic oligotrophic surface water in the central Arctic Ocean. *Biogeosciences* 7(3), 1099–1108.
- DELSONTRO, T., J. J. BEAULIEU a J. A. DOWNING (2018): Greenhouse gas emissions from lakes and impoundments: Upscaling in the face of global change. *Limnology and Oceanography Letters* 3(3), 64–75.
- DENMAN, K. L., G. BRASSEUR a A. CHIDTHAISONG (2007): Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry. – In: Solomon, S., D. Qin, M. Manning (eds), *Climate Change 2007: The Physical Science Basis*. Cambridge University Press, Cambridge, s. 499-587.
- DI CESARE, A., P. J. CABELLO-YEVES, N. A. M. CHRISMAS, P. SÁNCHEZ-BARACALDO, M. M. SALCHER a C. CALLIERI (2018): Genome analysis of the freshwater planktonic *Vulcanococcus limneticus* sp. nov. reveals horizontal transfer of nitrogenase operon and alternative pathways of nitrogen utilization. *BMC Genomics* 19(1), 259.
- DYHRMAN, S. T., P. D. CHAPPELL, S. T. HALEY, J. W. MOFFETT, E. D. ORCHARD, J. B. WATERBURY a E. A. WEBB (2006): Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium*. *Nature* 439(7072), 68–71.
- FORLANI, G., M. PAVAN, M. GRAMEK, P. KAFARSKI a J. LIPOK (2008): Biochemical bases for a widespread tolerance of cyanobacteria to the phosphonate herbicide glyphosate. *Plant and Cell Physiology* 49(3), 443–456.
- Global Monitoring Laboratory - Carbon Cycle Greenhouse Gases. NOAA Earth System Research Laboratories. Dostupné z: https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends_ch4

- GOODRICH, J. P., R. K. VARNER, S. FROLKING, B. N. DUNCAN a P. M. CRILL (2011): High-frequency measurements of methane ebullition over a growing season at a temperate peatland site. *Geophysical Research Letters* 38(7).
- GROSSART, H. P., K. FRINDTE, C. DZIALLAS, W. ECKERT a K. W. TANG (2011): Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(49), 19657–19661.
- GUILLARD, R. R. L. a C. J. LORENZEN (1972): Yellow-green algae with chlorophyllide C². *Journal of Phycology* 8(1), 10–14.
- GÜNTHEL, M., D. DONIS, G. KIRILLIN, D. IONESCU, M. BIŽIČ, D. F. MCGINNIS, H. GROSSART a K. W. TANG (2019): Contribution of oxic methane production to surface methane emission in lakes and its global importance. *Nature Communications* 10(1).
- HOICZYK, E. a A. HANSEL (2000): Cyanobacterial cell walls: News from an unusual prokaryotic envelope. *Journal of Bacteriology* 182(5), 1191-1199.
- HOLLIGAN, P. M., E. FERNÁNDEZ, J. AIKEN, W. M. BALCH, P. BOYD, P. H. BURKILL, M. FINCH, S. B. GROOM, G. MALIN, K. MULLER, D. A. PURDIE, C. ROBINSON, Ch. C. TREES, S. M. TURNER a P. VAN DER WAL (1993): A biogeochemical study of the coccolithophore, *Emiliania huxleyi*, in the North Atlantic. *Global Biogeochemical Cycles* 7(4), 879–900.
- HU, Z., S. WU, Ch. JI, J. ZOU, Q. ZHOU a S. LIU (2016): A comparison of methane emissions following rice paddies conversion to crab-fish farming wetlands in southeast China. *Environmental Science and Pollution Research* 23(2), 1505–1515.
- HUBER, H., M. J. HOHN, R. RACHEL, T. FUCHS, V. C. WIMMER a K. O. STETTER (2002): A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417(6884), 63–67.
- INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (2014): Climate Change 2013 - The Physical Science Basis. Cambridge University Press, Cambridge.
- JASSER, I. a C. CALLIERI (2017): Picocyanobacteria. In: MERILUOTO, J., L. SPOOF a G. A. CODD (eds), Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, s. 19–27.

- JÜRGENS, K. a C. MATZ (2002): Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 1(1–4), 413–434.
- KALINA, T. a J. VÁŇA (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. Praha: Karolinum.
- KANEHISA, M., S. GOTO, Y. SATO, M. KAWASHIMA, M. FURUMICHI a M. TANABE (2014): Data, information, knowledge and principle: Back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research* 42(D1).
- KARL, D. M., L. BEVERSDORF, K. M. BJÖRKMAN, M. J. CHURCH, A. MARTINEZ a E. F. DELONG (2008): Aerobic production of methane in the sea. *Nature Geoscience* 1(7), 473–478.
- KEPPLER, F., J. T. G. HAMILTON, M. BRASS a T. RÖCKMANN (2006): Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions. *Nature* 439(7073), 187–191.
- KEPPLER, F., A. SCHILLER, R. EHEHALT, M. GREULE, J. HARTMANN a D. POLAG (2016): Stable isotope and high precision concentration measurements confirm that all humans produce and exhale methane. *Journal of breath research* 10(1).
- KHATUN, S., T. IWATA, H. KOJIMA, M. FUKUI, T. AOKI, S. MOCHIZUKI, A. NAITO, A. KOBAYASHI a R. UZAWA (2019): Aerobic methane production by planktonic microbes in lakes. *Science of the Total Environment* 696.
- KIRSCHKE, S., P. BOUSQUET, P. CIAIS, et al. (2013): Three decades of global methane sources and sinks. *Nature Geoscience* 6(10), 813–823.
- KLINTZSCH, T., G. LANGER, A. WIELAND, H. GEISINGER, K. LENHART, G. NEHRKE a F. KEPPLER (2020): Effects of Temperature and Light on Methane Production of Widespread Marine Phytoplankton. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* 125(9).
- KLINTZSCH, T., G. LANGER, G. NEHRKE, A. WIELAND, K. LENHART a F. KEPPLER (2019): Methane production by three widespread marine phytoplankton species: Release rates, precursor compounds, and potential relevance for the environment. *Biogeosciences* 16(20), 4129–4144.

- KOMÁRKOVÁ, J. (2002): Cyanobacterial picoplankton and its colonial formation in two eutrophic canyon reservoirs (Czech Republic). *Algological Studies* 154, 605-623.
- KOMÁRKOVÁ J. a K. ŠIMEK (2003): Unicellular and colonial formations of picoplanktic cyanobacteria under different environmental conditions and predation pressure. *Algological Studies* 109, 327-340.
- LENHART, K., M. BUNGE, S. RATERING, T. R. NEU, I. SCHÜTTMANN, M. GREULE, C. KAMMANN, S. SCHNELL, Ch. MÜLLER, H. ZORN a F. KEPPLER (2012): Evidence for methane production by saprotrophic fungi. *Nature Communications* 3, 1046.
- LENHART, K., T. KLINTZSCH, G. LANGER, G. NEHRKE, M. BUNGE, S. SCHNELL a F. KEPPLER (2016): Evidence for methane production by the marine algae *Emiliana huxleyi*. *Biogeosciences* 13(10), 3163–3174.
- LENHART, K., B. WEBER, W. ELBERT, J. STEINKAMP, T. CLOUGH, P. CRUTZEN, U. PÖSCHL a F. KEPPLER (2015): Nitrous oxide and methane emissions from cryptogamic covers. *Global Change Biology* 21(10), 3889–3900.
- LUYSSAERT, S., G. ABRIL, R. ANDRES, et al. (2012): The European land and inland water CO₂, CO, CH₄ and N₂O balance between 2001 and 2005. *Biogeosciences* 9(8), 3357-3380.
- MADIGAN, M. T., J. M. MARTINKO, D. A. STAHL a D. P. CLARK (2012): Brock Biology of Microorganisms, Pearson Education, Inc., San Francisco.
- MICHMERHUIZEN, C. M., Robert G. STRIEGL a M. E. MCDONALD (1996): Potential methane emission from north-temperate lakes following ice melt. *Limnology and Oceanography*. 41(5), 985–991.
- MURASE, J., Y. SAKAI, A. SUGIMOTO, K. OKUBO a M. SAKAMOTO (2003): Sources of dissolved methane in Lake Biwa. *Limnology* 4(2), 91–99.
- PEETERS, F., J. ENCINAS FERNANDEZ a H. HOFMANN (2019): Sediment fluxes rather than oxic methanogenesis explain diffusive CH₄ emissions from lakes and reservoirs. *Scientific Reports* 9(1), 243.
- PERNTHALER, J., K. ŠIMEK, B. SATTLER, A. SCHWARZENBACHER, J. BOBKOVA a R. PSENNER (1996): Short-term changes of protozoan control on autotrophic picoplankton in an oligo-mesotrophic lake. *Journal of Plankton Research* 18(3), 443–462.

- PLOUG, H., B. ADAM, N. MUSAT, T. KALVELAGE, G. LAVIK, D. WOLF-GLADROW a M. M. M. KUYPERS (2011): Carbon, nitrogen and O₂ fluxes associated with the cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea. *ISME Journal* 5(9), 1549–1558.
- REEBURGH, W. S. (2007): Oceanic methane biogeochemistry. *Chemical Reviews* 107(2), 486-513.
- REPETA, D. J., S. FERRÓN, O. A. SOSA, C. G. JOHNSON, L. D. REPETA, M. ACKER, E. F. DELONG a D. M. KARL (2016): Marine methane paradox explained by bacterial degradation of dissolved organic matter. *Nature Geoscience* 9(12), 884-887.
- RUDD, J. W. M. a R. D. HAMILTON (1978): Methane cycling in a eutrophic shield lake and its effects on whole lake metabolism. *Limnology and Oceanography* 23(2), 337–348.
- RULÍK, M., D. BAUDIŠOVÁ, J. RŮŽIČKA a K. ŠIMEK (2013): Mikrobiální ekologie vod. Univerzita Palackého, Olomouc.
- SALCHER, M. M., J. PERNTHALER, R. PSENNER a T. POSCH (2005): Succession of bacterial grazing defense mechanisms against protistan predators in an experimental microbial community. *Aquatic Microbial Ecology* 38(3), 215–229.
- SÁNCHEZ, M., C. SANTAMARINA, M. TEYMOURI a X. GAI (2018): Coupled Numerical Modeling of Gas Hydrate-Bearing Sediments: From Laboratory to Field-Scale Analyses. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth* 123(12), 10326-10348.
- SANTOS-BENEIT, F. (2015): The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in Microbiology* 6.
- SCHULZ, M., E. FABER, A. HOLLERBACH, H. G. SCHRÖDER a H. GÜDE (2001): Themethane cycle in the epilimnion of Lake Constance. *Archiv für Hydrobiologie*, 157-176.
- SOMMER, U., R. ADRIAN, L. DE SENERPONT DOMIS, et al. (2012): Beyond the Plankton Ecology Group (PEG) Model: Mechanisms Driving Plankton Succession. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43(1), 429-448.
- STANIER, R. Y., R. KUNISAWA, M. MANDEL a G. COHEN-BAZIRE (1971): Purification and properties of unicellular blue-green algae (order *Chroococcales*). *Bacteriological reviews* 35(2), 171–205.

- STEFELS, J. (2000): Physiological aspects of the production and conversion of DMSP in marine algae and higher plants. *Journal of Sea Research* 43(3-4), 183-197.
- STOCKNER, J. G. (1988): Phototrophic picoplankton: An overview from marine and freshwater ecosystems. *Limnology and Oceanography* 33(4), 765–775.
- SUNDARESHWAR, P. V., J. T. MORRIS, E. K. KOEPFLER a B. FORNWALT (2003): Phosphorus limitation of coastal ecosystem processes. *Science* 299(5606), 563–565.
- ŠVECOVÁ, M. (2019): Je zooplankton schopn živit se pikoplanktonními snicemi? Bakalářská práce. Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta, České Budějovice. RNDr. Jitka Jezberová Ph.D.
- TANDEAU DE MARSAC, N. (1977): Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *Journal of Bacteriology* 130(1).
- TANG, K. W., D. F. MCGINNIS, K. FRINDTE, V. BRÜCHERT a H. P. GROSSART (2014): Paradox reconsidered: Methane oversaturation in well-oxygenated lake waters. *Limnology and Oceanography* 59(1), 275–284.
- TANG, K. W., D. F. MCGINNIS, D. IONESCU a H. P. GROSSART (2016): Methane production in oxic lake waters potentially increases aquatic methane flux to air. *Environmental Science and Technology Letters* 3(6), 227–233.
- TEIKARI, J. E., D. P. FEWER, R. HRESTHA, et al. (2018): Strains of the toxic and bloom-forming *Nodularia spumigena* (cyanobacteria) can degrade methylphosphonate and release methane. *The ISME Journal* 12(6), 1619-1630.
- TUBOLY, E., A. SZABÓ, D. GARAB, et al. (2013): Methane biogenesis during sodium azide-induced chemical hypoxia in rats. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 304(2), 207-214.
- UTSUMI, M., Y. NOJIRI, T. NAKAMURA, T. NOZAWA, A. OTSUKI, N. TAKAMURA, M. WATANABE a H. SEKI (1998): Dynamics of dissolved methane and methane oxidation in dimictic Lake Nojiri during winter. *Limnology and Oceanography* 43(1), 10–17.
- WANG, Q., J. E. DORE a T. R. MCDERMOTT (2017): Methylphosphonate metabolism by *Pseudomonas sp.* populations contributes to the methane oversaturation paradox in an oxic freshwater lake. *Environmental Microbiology* 19(6), 2366–2378.

- WHITING, G. J. a J. P. CHANTON (1996): Control of the diurnal pattern of methane emission from emergent aquatic macrophytes by gas transport mechanisms. *Aquatic Botany* 54(2–3), 237–253.
- WOESE, C. R., O. KANDLER a M. L. WHEELIS (1990): Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(12), 4576–4579.
- YAMAMOTO, S., J. B. ALCAUSKAS a T. E. CROZIER (1976): Solubility of methane in distilled water and seawater. *Journal of Chemical & Engineering Data* 21(1), 78-80.
- YAN, X., H. AKIYAMA, K. YAGI a H. AKIMOTO (2009): Global estimations of the inventory and mitigation potential of methane emissions from rice cultivation conducted using the 2006 Intergovernmental Panel on Climate Change Guidelines. *Global Biogeochemical Cycles* 23(2).
- YAO, M., C. HENNY a J. A. MARESCA (2016): Freshwater bacteria release methane as a by-product of phosphorus acquisition. *Applied and Environmental Microbiology* 82(23), 6994–7003.
- ZHENG, Y., D. F. HARRIS, Z. YU, Y. FU, S. POUDEL, R. N. LEDBETTER, K. R. FIXEN, Z. YANG, E. S. BOYD, M. E. LIDSTROM, L. C. SEEFELDT a C. S. HARWOOD (2018): A pathway for biological methane production using bacterial iron-only nitrogenase. *Nature Microbiology* 3(3), 281–286.

Seznam příloh

Tabulka I: Seznam kultur pro pokus 1.

Název kultury	Barva	Lokalita
KINNER	zelená	jezero Kinneret (Izrael)
KUTNAR	zelená	rybník Kutnář (CZ)
8 - A6	zelená	přehradní nádrž Žlutice (CZ)
10 - D3	zelená	přehradní nádrž Nová Říše (CZ)
KV - Vojta	zelená	rybník Kvítkovice (CZ)
VÍR	zelená	přehradní nádrž Vír (CZ)
HEJTM 1BY	zelená	rybník Hejtman (CZ)
SYNCOC RED	červená	jezero Constance (Německo)
9 - 2	zelená	přehradní nádrž Stanovice
8809	zelená	jezero Constance (Německo)

Tabulka II: Složení WC média (zdroj: Guillard a Lorenzen 1972).

Složka	Koncentrace v mg/l
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	36,76
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	36,97
NaHCO ₃	12,6
K ₂ HPO ₄	8,71
NaNO ₃	85,01
Na ₂ SiO ₃ . 9 H ₂ O	28,42
Na ₂ . EDTA	4,36
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	3,15
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,01
ZnSO ₂ . 7 H ₂ O	0,022
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,01
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	0,18
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,006
H ₃ BO ₃	1
Thiamine . HCl	0,1
Biotin	0,0005
B ₁₂ vitamin	0,0005

Tabulka III: Seznam kultur pro pokus 2.

Název kultury	Barva	Lokalita
KL – S2/14	zelená	rybník Klec
KOC 21/117	zelená	rybník Koclířov
DH – S1/10N – B5	zelená	rybník Dehtář
RD < 5	zelená	rybník Rod
RD – S2/12	zelená	rybník Rod
RD – S2/13 – C6	zelená	rybník Rod
KV – KV19	zelená	rybník Kvítkovice
KV – Vojta	zelená	rybník Kvítkovice
KV – S1/14	zelená	rybník Kvítkovice
KV – S2/18	zelená	rybník Kvítkovice
KV – KV8 – D3	zelená	rybník Kvítkovice
KV – KV10 – A6	zelená	rybník Kvítkovice

Tabulka IV: Složení BG11 média (zdroj: Stanier et al. 1971).

Složka	Koncentrace v g/l
NaNO ₃	1,5
K ₂ HPO ₄ . 3 H ₂ O	0,04
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,075
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,036
Na ₂ CO ₃	0,02
Kyselina citronová	
EDTA	
Železito-amonný citrát	
Stopové prvky	

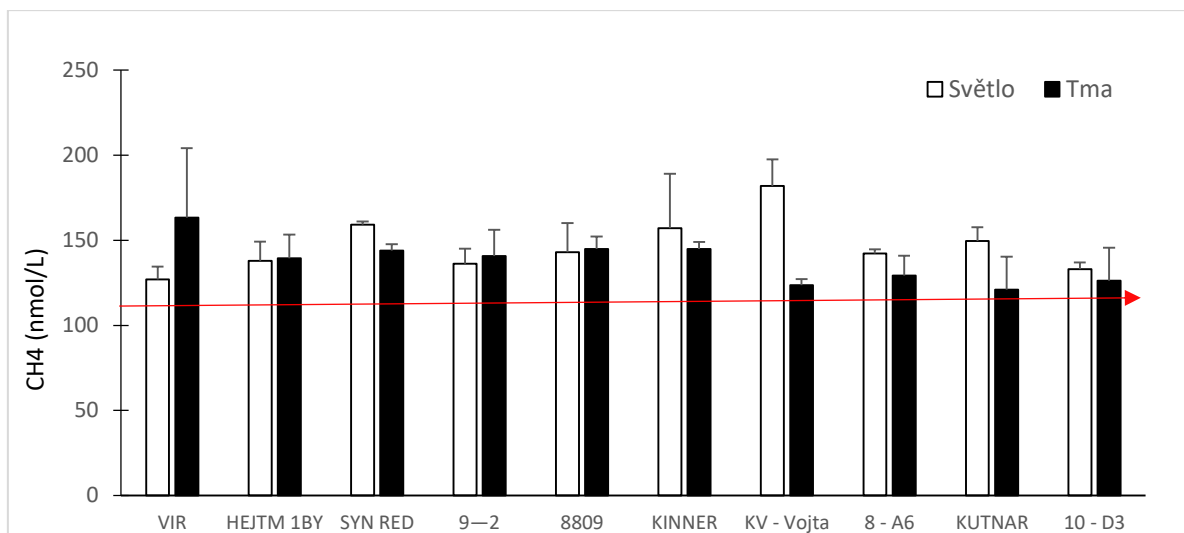
Obrázek 1: viz text str. 12.



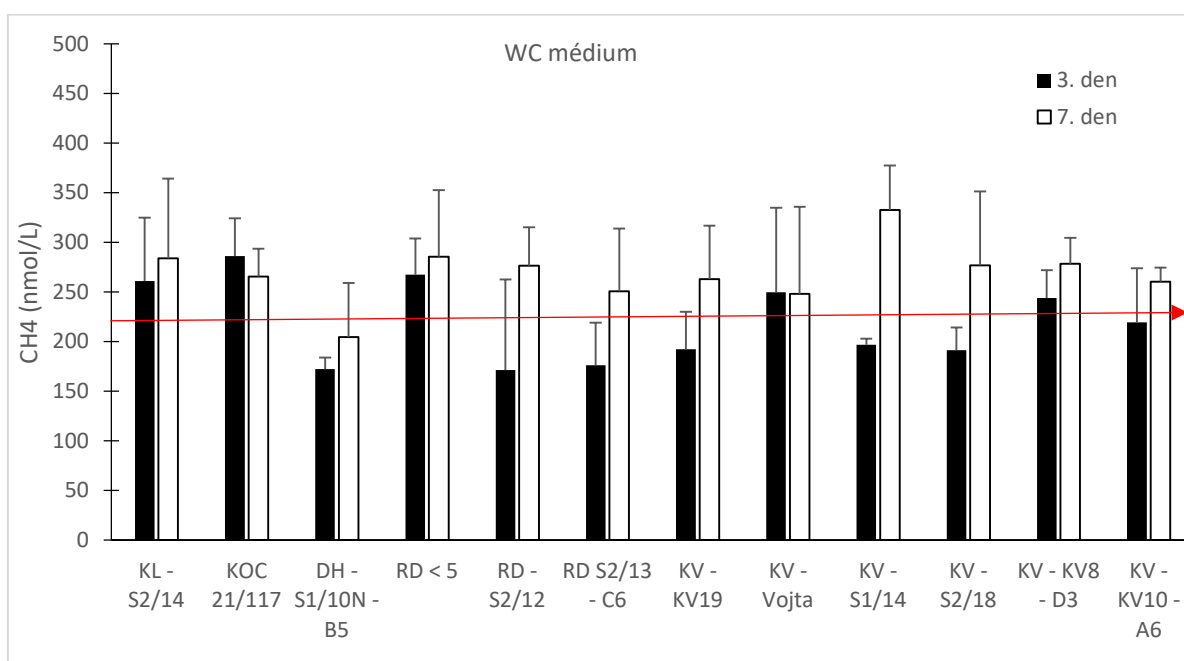
Obrázek 2: Kultury pikoplanktonních sinic v triplikátech v médiu BG11 (vlevo) a WC (vpravo).



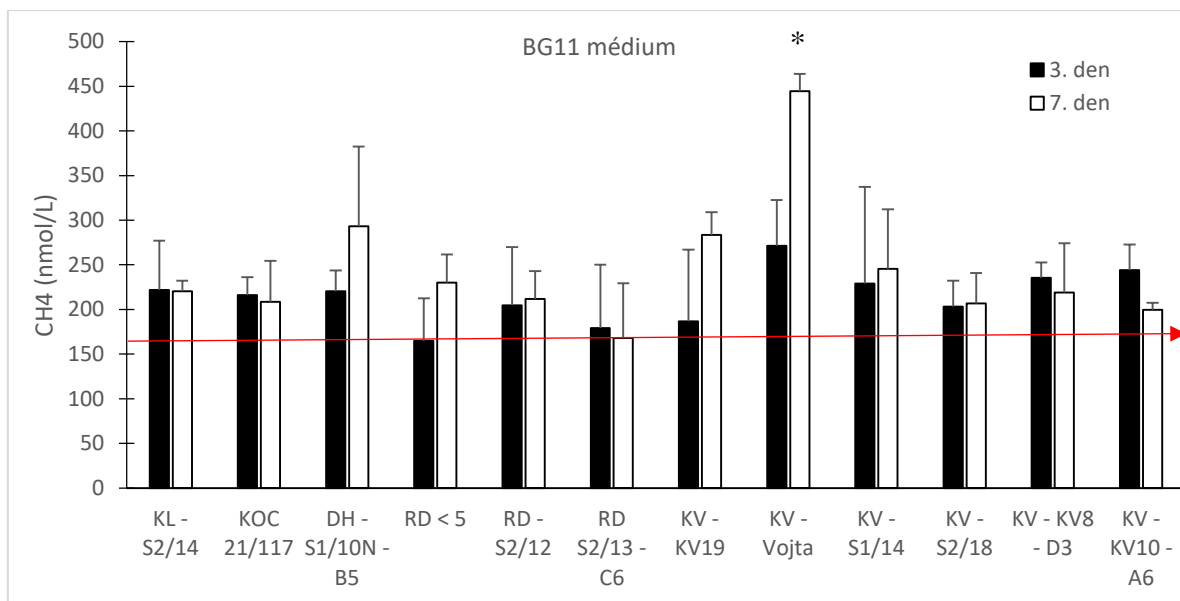
Obrázek 3: Kultury pikoplanktonních sinic v triplikátech ve speciálních lahvičkách s butylovými septy, BG11 médium vlevo a WC médium vpravo.



Obrázek 4: Produkce metanu se směřodatnými odchylkami v prvním pokusu po třech dnech kultivace, kde červená linka znázorňuje startovní koncentraci metanu měřenou v okolním vzduchu v den plnění.



Obrázek 5: Srovnání koncentrace metanu ve vzorcích s kmeny pikoplanktonních sinic ve WC médiu naměřené po třech dnech a po týdnu růstu, kde červená linka znázorňuje startovní koncentraci metanu v plynné fázi nad čistým médiem.



Obrázek č. 6: Srovnání koncentrace metanu ve vzorcích s kmeny pikoplanktonních sinic v médiu BG11 naměřené po třech dnech a po týdnu růstu, kde červená linka znázorňuje startovní koncentraci metanu v plynné fázi nad čistým médiem. (* - statisticky průkazná produkce metanu, $p = 0,002$).