

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Limitace metanogeneze v degradovaných rašeliníštích po revitalizaci jejich  
vodního režimu**

Diplomová práce

Bc. Michaela Pocová

Školitelka: RNDr. Zuzana Urbanová Ph.D.

České Budějovice 2016

Pocová, M., 2016: Limitace metanogeneze v degradovaných rašeliništích po revitalizaci jejich vodního režimu. [Limitation of methanogenesis in degraded peatlands after revitalization their water regime. Mgr. Thesis, in Czech.] – 47 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

#### Annotation

The aim of this thesis was to determine limitation of methanogenesis in restored peatlands and effect of different substrates on potential methane production in restored bog and spruce swamp forest soil. Study sites were located in Šumava National Park in the Czech Republic.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala 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 diplomové 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 13. 12. 2016

Michaela Pocová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Zuzaně Urbanové, Ph. D. za odborné i stylistické vedení při psaní mé diplomové práce a také hlavně za velkou pomoc při celém experimentu a zpracování dat. Dále děkuji Mgr. Haně Petráskové za pomoc s molekulární analýzou a velkou ochotu pomoci. Velké poděkování patří mé rodině za velkou podporu.

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| 1. Úvod .....   | 1  |
| 1.1. Rašeliniště .....  | 1  |
| 1.2. Cíl práce .....  | 2  |
| 1.3. Hypotézy .....   | 2  |
| 2. Literární rešerše .....  | 3  |
| 2.1. Charakteristika ekosystému rašelinišť .....  | 3  |
| 2.2. Metanogeneze .....   | 3  |
| 2.3. Metanotrofie .....   | 5  |
| 2.4. Transport metanu do atmosféry .....  | 6  |
| 2.5. Faktory prostředí .....  | 7  |
| 2.6. Dostupnost substrátu a interakce s ostatními mikroorganismy .....  | 9  |
| 2.7. Vliv odvodnění na metanogenezi, metanogeny, kvalitu organické hmoty .....                                    | 11 |
| 2.8. Vliv revitalizace .....  | 12 |
| 3. Metodika .....   | 15 |
| 3.1. Charakteristika lokalit .....  | 15 |
| 3.2. Odběr a zpracování vzorků .....  | 16 |
| 3.3. Stanovení potenciální produkce CH <sub>4</sub> .....   | 17 |
| 3.4. Kvantitativní analýza metanogenního společenstva .....   | 18 |
| 3.5. Laboratorní experiment s přidavky různých substrátů .....  | 19 |
| 3.6. Statistické vyhodnocení dat .....  | 21 |
| 4. Výsledky .....   | 23 |
| 4.1. Potenciální produkce metanu a počet metanogenů na přirozeném, odvodněném a revitalizovaném rašeliništi ..... | 24 |
| 4.2. Anaerobní produkce CO <sub>2</sub> na přirozených, odvodněných a revitalizovaných rašeliništích .....        | 28 |
| 4.3. Produkce CO <sub>2</sub> a CH <sub>4</sub> z revitalizovaných rašelinišť po přidavku různých substrátů ..... | 30 |
| 5. Diskuze .....  | 33 |
| 5.1. Potenciální produkce metanu a počet metanogenů na přirozeném, odvodněném a revitalizovaném rašeliništi ..... | 33 |
| 5.2. Anaerobní produkce CO <sub>2</sub> na přirozených, odvodněných a revitalizovaných rašeliništích .....        | 35 |
| 5.3. Produkce CO <sub>2</sub> a CH <sub>4</sub> z revitalizovaných rašelinišť po přidavku různých substrátů ..... | 36 |
| 6. Závěry .....   | 39 |
| 7. Literatura .....   | 40 |

## Seznam zkratek

|                      |                         |
|----------------------|-------------------------|
| CO <sub>2</sub>      | oxid uhličitý           |
| H <sub>2</sub>       | vodík                   |
| CH <sub>4</sub>      | metan                   |
| H <sub>2</sub> O     | voda                    |
| CH <sub>3</sub> COOH | acetát                  |
| Fe <sup>3+</sup>     | železité ionty          |
| O <sub>2</sub>       | kyslík                  |
| C                    | uhlík                   |
| N                    | dusík                   |
| A                    | svrchní horizont        |
| B                    | spodní horizont         |
| GLC                  | glukóza                 |
| ETOH                 | etanol                  |
| SUCH                 | suchopýr                |
| RAS                  | rašeliník               |
| Vrch                 | vrchoviště              |
| Rsm                  | rašelinná smrčina       |
| P                    | přírozené lokality      |
| D                    | odvodněné lokality      |
| R                    | revitalizované lokality |

## 1. Úvod

### 1.1. Rašeliniště

Rašeliniště jsou jedním z typů terestrických mokřadních ekosystémů, kde dochází k akumulaci nerozložené nebo jen částečně rozložené organické hmoty – rašeliny (Rydin and Jeglum et al., 2006). Děje se tak díky dlouhodobě zvýšené hladině podpovrchové vody, která je příčinou anaerobních podmínek v rašeliništi, při kterých je produkce biomasy větší než její rozklad.

Podle odhadů se největší plocha rašelinišť nachází v severní boreální zóně, kde zauímají plochu kolem 5,8 miliónů km<sup>2</sup> a tvoří hlavní úložiště uhlíku v biosféře (Strack, 2008). K akumulaci uhlíku v rašeliništích dochází, když rostliny odeberou více uhlíku z atmosféry (fixace do biomasy), než je uvolněno zpět při respiraci rostlin a dekompozici (Huttunen et al., 2003). Rašeliniště hrají tedy důležitou roli v globálním cyklu uhlíku a zároveň jsou velkým zdrojem atmosférického metanu. Severská rašeliniště uvolní ročně 10-65 x 10<sup>12</sup> g metanu, který je druhým nejvýznamnějším skleníkovým plynem. (Strack, 2008). Většina atmosférického metanu pochází z mikrobiálního metabolismu metanogenních archeí. Metanogeni produkují metan v místech, kde je organická hmota rozkládána bez přístupu kyslíku a jiných oxidantů jako jsou sulfáty, nitráty a železitany (Conrad, 2009).

Vlivem lidské činnosti mnohá rašeliniště degradují a to nejčastěji důsledkem předchozího odvodnění rašelinišť pro lesnické, či zemědělské účely nebo kvůli těžbě rašeliniště. Odtěžená rašelina je dále využívána jako palivo nebo pro zahradnické účely, což způsobuje další uvolnění uhlíku do atmosféry a narušení celkového toku uhlíku na Zemi. Tyto důvody představují obrovskou výzvu, proč se zabývat revitalizací rašelinišť se souvislostí s globálním oteplováním (Bortoluzzi et al., 2006).

Odvodněním rašelinišť dochází k poklesu a k celkovému rozkolísání vodní hladiny, což vede k provzdušnění a rychlejšímu rozkladu rašeliny (Bortoluzzi et al., 2006). Je známo, že vysoušení rašelinišť způsobuje snížení emisí metanu a to zejména kvůli provzdušněním původně anaerobních vrstev půdy a tím dochází k poklesu počtu a diverzity metanogenů (Yrjälä et al., 2011). S poklesem emisí souvisí také zhoršení kvality substrátu a jeho dostupnosti pro metanogeny a zvýšení oxidace metanu (Roulet and Moore, 1995).

Emise metanu dlouhou dobu po zaplavení stále nedosahují takových hodnot, jaké mají přirozená rašeliniště a to kvůli změněné vegetační struktuře a také metanogennímu společenstvu, jehož diverzita i početnost je stále redukována následkem dlouhodobého vysušení (Tuittila et al., 2000).

### *1.2 Cíl práce*

- Zjistit vliv managementu (odvodněné, revitalizované) na potenciální produkci metanu a počet metanogenů v rašelinných smrčínách a vrchovištích ve srovnání s přirozenými lokalitami.
- Zjistit zda je aktivita metanogenních společenstev limitována nedostatkem substrátu na revitalizovaných rašelinných smrčínách a vrchovištích.
- Otestovat vliv přídavku různých substrátů na potenciální produkci metanu na revitalizovaných rašelinných smrčínách a vrchovištích se zaměřením na vliv šíření původních rašeliništních druhů rostlin na obnovu metanogeneze.

### *1.3. Hypotézy*

- Předpokládám, že na odvodněných rašelinných smrčínách a vrchovištích bude potenciální produkce metanu i počet metanogenů výrazně nižší ve srovnání s nenarušenými rašeliništi. Po revitalizaci očekávám zvýšení produkce metanu i počtu metanogenů, ale hodnoty nebudou ještě srovnatelné s nenarušenými lokalitami.
- Předpokládám limitaci aktivity metanogenních společenstev nedostatkem substrátu.
- Přídavek substrátu ke vzorkům z revitalizovaných lokalit ve formě sušených rostlin přirozeně vyskytujících se na konkrétních rašelinných smrčínách a vrchovištích bude zdrojem snadno dostupného substrátu pro metanogeny a povede ke zvýšení potenciální produkce metanu.

## 2. Literární rešerše

### 2.1. Charakteristika ekosystému rašelinišť

Rašeliniště je termín používaný pro území, které je pokryté rašelinou. Množství rašeliny, které musí na ploše být, aby se jednalo o rašeliniště, je například na základě International Mire Conservation Group stanoveno na 30cm (Joosten and Clarke, 2002). Obecně lze rašeliniště rozdělit do dvou typů na základě zdroje vody a živin na: ombrotrofní a minerotrofní.

Pro minerotrofní rašeliniště je typické, že přísun vody a živin mají z podzemních vod. Hloubka rašeliny je obvykle více než 40 cm, ale někdy může být méně. Dominantními druhy rostlin na rašeliništích jsou mechorosty, ostřicovité rostliny a nízké keře (Rydin and Jeglum, 2006).

Ombrotrofní jsou izolované od minerálně bohatších podpovrchových vod a jsou závislé pouze na srážkách. Proto jsou to velmi živinově chudá a kyselá rašeliniště (povrchová voda má cca pH =4). Rašelina je obvykle více než 40 cm hluboká (Rydin and Jeglum, 2006).

Minerotrofní rašeliniště mají vždycky vyšší emise metanu než ombrotrofní vrchoviště a to hlavně z důvodů rozdílné vegetace a dostupnosti substrátu. Na vrchovištích jsou hlavní dominantou mechy rodu *Sphagnum* a naopak minerotrofní rašeliniště jsou typické dominancí ostřic, které poskytují snadno dostupný substrát pro metanogeny a zároveň umožňují transport metanu přes aerenchym, což způsobuje vyšší emise metanu (Nykänen, 1998).

### 2.2. Metanogeneze

Mokřady jsou ekosystémy, které charakterizuje vysoká hladina podzemní vody a díky ní se v půdě nachází rozhraní aerobního a anaerobního prostředí, což přináší specifické podmínky tohoto prostředí. Primární produkce zde často převyšuje dekompozici a dochází k ukládání organické hmoty. Dekompozice je procesem, kdy ze složitých organických komplexů vznikají jednoduché molekuly. Každá dekompozice probíhá ve třech základních krocích: fyzikální rozpouštění a fragmentaci, extracelulární enzymová hydrolýza a aerobní a anaerobní katabolická aktivita heterotrofních organismů. Jelikož aerobní prostředí je jen v povrchové části mokřadní půdy, proto ve většině tohoto prostředí dominují anaerobní mikrobiální společenstva a procesy. Tyto anaerobní organismy získávají energii z oxidace různých organických i anorganických redukováných substrátů a užívají jiné elektronové



akceptory než kyslík např.:  $\text{NO}_3^-$ , Mn (IV), Fe (III),  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_2$  a jednoduché organické sloučeniny (Reddy and DeLaune, 2008).

Mikroorganismy hydrolyzují polymery na monomery, které jsou pak při fermentaci konvertovány na mastné kyseliny, organické kyseliny, alkoholy,  $\text{H}_2$  a  $\text{CO}_2$ . (Le Mer and Roger, 2001). Konečné produkty z fermentace se využívají k produkci acetátu. Syntrofické bakterie rozkládají mastné kyseliny a alkoholy na acetát a  $\text{CO}_2$ . Homoacetogenní bakterie jsou schopny rozkládat monomery rovnou na acetát (Conrad, 1999). Až po těchto všech krocích přichází na řadu metanogeneze. Metan může být produkován z acetátu,  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ , alkoholů nebo z jednoduchých metylovaných sloučenin (Garcia et al., 2000).

Metanogenní archea jsou obligátní anaerobové, proto tedy produkují  $\text{CH}_4$  pouze v prostředí bez kyslíku. Jsou schopni růst při redoxním potenciálu nižším než  $-200$  mV. Metanogenní bakterie patří do skupiny Archeobakterií a jsou děleny do pěti řádů: *Methanopyrales*, *Methanobacteriaceae*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* a *Methanosarcinales* (Garcia et al., 2000). Celkem existují tři hlavní fyziologické skupiny metanogenních organismů rozlišované na základě substrátu, který jsou schopni využívat: acetotrofní, hydrogenotrofní a methylotrofní metanogeni.

První skupina využívá acetát jako substrát a při reakci vzniká  $\text{CH}_4$  a  $\text{CO}_2$ .



Druhá skupina metanogenů jsou autotrofní hydrogenotrofové, kteří přetváří  $\text{CO}_2$  s  $\text{H}_2$  na  $\text{CH}_4$  (Conrad, 1999).



Třetí skupina umí využívat metylové sloučeniny jako např.: metanol, metylaminy nebo dimetylsulfidy a ty přeměňují na metan a  $\text{CO}_2$ . Organismy, které využívají tuto reakci pro získání energie, patří do řádu *Methanosarcinales* (Jones et al., 1987). Energeticky nejvýnosnější reakcí je redukce  $\text{CO}_2$  vodíkem a naopak oxidace acetátu je nejméně výnosná. Toto vedlo k tomu, že často převažují hydrogenotrofní metanogeni nad acetátotrofními. Je nutno zmínit, že ne všichni metanogeni musejí využívat pouze jeden druh substrátu, ale většina z nich dokáže využít několik druhů substrátů např.: většina hydrogenotrofů je schopná využít formát (Garcia et al., 2000).

Jelikož pro většinu metanogenů přesně neznáme podmínky, které vyžadují k životu, je velmi obtížné, je kultivovat v laboratoři a využívat k jejich studiu běžné laboratorní metody. Kultivaci navíc komplikuje i jejich pomalý růst a přítomnost syntrofních mikroorganismů. Proto jsou pro jejich studium vhodnější molekulární metody, které jsou založeny na detekci jejich jedinečného genu - methyl coenzymM reduktáza (*mcrA*). Všechny skupiny metanogenů obsahují stejný klíčový enzym - methyl-CoM reduktázu, která katalyzuje redukci metylové skupiny vázané na koenzym M a současně se uvolňuje metan. Tento fakt je velice užitečný při detekci metanogenů podle genu (*mcrA*) pro tento enzym (Lueders et al., 2001). To, že můžeme detekovat tento jedinečný gen, nám umožňuje rozvíjet spousta metod založených na analýze mRNA. MCR operon (sekvence nukleotidů na DNA, které uvozují několik genů, které jsou transkribovány společně) existuje ve dvou formách, MCRI a MCRII, což se dá využít k rozlišování různých skupin metanogenů. Forma MCRI je pravděpodobně přítomná ve všech metanogenech, zatímco MCRII je přítomná pouze u členů řádu *Methanobacteriales* a *Methanococcales*. Jeden peptid komplexu MCRI, který je kódován genem *mcrA*, byl vybrán jako vhodný pro detekci metanogenů pomocí PCR (Polymerase Chain Reaction) (Springer et al., 1995). Pomocí moderních molekulárních metod můžeme zjistit nejen přítomnost metanogenů v půdě, ale i jejich kvantitu a diverzitu metanogenního společenstva.

### 2.3. Metanotrofie

Aerobní metanotrofní bakterie používají metan jako zdroj uhlíku a energie. Tyto mikroorganismy jsou nedílnou součástí rašelinišť, kde je metan zároveň produkován. Metanotrofové udržují rovnováhu atmosférického metanu a hrají klíčovou roli v globálním cyklu metanu. Část metanu produkovaného metanogeny je oxidována metanotrofy a při této reakci vzniká CO<sub>2</sub> a voda. Proto množství metanu uvolněného do atmosféry ještě závisí na aktivitě a početnosti metanotrofů, které nacházíme naopak v aerobních podmínkách (Hanson and Hanson, 1996). Výsledný tok metanu do atmosféry je součtem protichůdných reakcí archeí a bakterií, které jsou zahrnuty do cyklu metanu (Sundh et al., 1994). Nejvyšší metanotrofní aktivita v rašeliništích je obvykle omezena na zónu blízko hladiny podzemní vody. To odpovídá hranici mezi aerobní a anaerobní zónou, kde je poměr substrátu a kyslíku pro metanotrofy optimální (Dedysh, 2002). Metanotrofové se také mohou nacházet ve větších hloubkách půdy, například v okolí kořenových systémů rostlin, kam je kyslík transportován aerenchymatickými pletivy (Larmola et al., 2010).

Bakterie, které oxidují metan, jsou rozdělovány do dvou taxonomických skupin z kmene *Proteobacteria*. Do první skupiny patří rody *Methylobacter* a *Methylomicrobium*, které patří do třídy *Gammaproteobacteria*. Do druhé skupiny řadíme *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylocella* a *Methylocapsa*, které patří do třídy *Alphaproteobacteria*. Na základě fylogeneze můžeme rozdělit metanotrofy do třech skupin podle morfologie membrán a jiných fyziologických charakteristik: typ I, typ II a typ X (Kamal and Varma, 2008). Do skupiny typu I řadíme řád *Methylococcaceae* z třídy *Gammaproteobacteria*, které mají intracytoplazmatické membrány (ICM) v lamelových útvarech, formaldehyd produkují cestou přes ribulosomonofasfát a obsah guaninu a cytosinu (G+C) na DNA je v rozmezí 45-55 mol%. Na rozdíl od typu I je typ II, do kterého řadíme řád *Methylocystaceae* z *Alphaproteobacteria*. U nich se ICM obecně nachází na periferii buňky, mají vyšší obsah G+C v DNA a asimilují formaldehyd přes serinové dráhy. Do skupiny typu X rody *Methylococcus* a *Methylocaldum* z *Gammaproteobacteria*. Jedná se o termofilní nebo teplotolerantní zástupce, které mají ICM podobné jako u typu I, ale mají vyšší obsah G+C v DNA 55-65 mol%. Metanotrofy můžeme také rozdělit podle afinity k metanu, tedy zda jsou schopni využívat metan při nízkých koncentracích, které jsou blízké atmosférickým (<12ppm) či vysokých koncentracích, které jsou vyšší než 40 ppm. (Le Mer and Roger, 2001). Metanotrofní bakterie využívají jedno uhlíkaté sloučeniny redukovanější než je kyselina mravenčí k energetické produkci a asimilují formaldehyd jako zdroj uhlíku pro svůj růst (Hanson and Hanson, 1996). Oxidace metanu probíhá postupně na metanol, formaldehyd, formiát a případně CO<sub>2</sub> (Whalen, 2005). Pro všechny metanotrofní bakterie je však společná přítomnost enzymu metan-monooxygenázy, která zajišťuje navázání molekuly metanu a pro svou funkci vyžaduje přítomnost O<sub>2</sub> (Murrell et al., 2000). Reakce je zahájena rozbitím vazby O-O v molekule kyslíku, první kyslík je redukován na H<sub>2</sub>O a druhý na CH<sub>3</sub>OH za účasti metanu (Hanson and Hanson, 1996). Druhý kyslík slouží jako koncový akceptor elektronů při oxidaci metanu pro vytvoření CO<sub>2</sub> (Whalen, 2005).

#### 2.4. Transport metanu do atmosféry

Metan, vyprodukovaný v anaerobní části půdního profilu, se do atmosféry dostává třemi různými způsoby: difúzí, ebulicí a pomocí provětrávacích pletiv rostlin. Kvůli velkému množství metanu produkovaného v anaerobní vrstvě vzniká koncentrační gradient, díky kterému se metan může uvolňovat do atmosféry difúzí (Walter and Heimann, 2000). Právě při difúzi může docházet k oxidaci metanu metanotrofními bakteriemi a tedy i snižování emisí metanu z půdy. Celkem 80 % metanu, který prochází aerobní zónou v rýžových polích

je oxidováno metanotrofy, což ukazuje, že metanotrofové mají významný vliv na celkové emise metanu (Conrad et al., 1999). Produkce a oxidace metanu spolu pozitivně korelují, stejně tak jako počty metanogenů a metanotrofů, to znamená, že čím větší produkce metanu bude, tím větší bude oxidace (Joulian et al., 1997). Druhým procesem, kterým dochází k uvolňování metanu do atmosféry je ebulice, při níž je metan uvolňován do atmosféry ve formě plynových bublin. Bubliny se vytváří za předpokladu, že parciální tlak všech rozpuštěných plynů je větší než hydrostatický tlak v rašelině (Chanton and Whiting, 1995). Tyto plynové bubliny se často uvolňují do atmosféry kvůli změnám tlaku, což je děj nepravidelný a nepredikovatelný (Kellner et al., 2005). Bubliny uvolňují velké množství metanu a přispívají k celosvětovému toku metanu z 50-60%, dle výsledků měření na severských rašeliníštích (Tokida et al., 2007). I přestože bubliny procházejí aerobní zónou, většina metanu jde z bublin rovnou do atmosféry a nedochází k jeho oxidaci (Boone, 2000).

Třetí cestou, kterou se metan dostává do atmosféry, je transport pomocí provětrávacích pletiv rostlin. Rostliny v mokřadech se musely přizpůsobit podmínkám, kdy jsou jejich kořeny zaplavené vodou v anaerobním prostředí. Vytvořily speciální pletivo aerenchym, díky kterému mohou přivádět kyslík ke svým kořenům (Rydin and Jeglum, 2006). Aerenchym ale slouží i k obrácenému toku metanu od kořenů do atmosféry a díky tomu se metan vyhne oxidaci metanotrofy v aerobní vrstvě půdy (Whalen, 2005). Celý tento mechanismus (přívod kyslíku ke kořenům a vedení metanu do atmosféry), je založený na koncentračních gradientech a dalších fyzikálně-chemických vlastnostech (Joabsson et al., 1999). Tok metanu přes aerenchym přispívá jednoznačně k celkovým emisím metanu např.: v rýžových polích až 90% emisí metanu pochází z této cesty (Holzapfel-Pschorn et al., 1986). Většina mokřadních rostlin má aerenchym (např.: ostřicovité). Mezi rašeliníštní druhy, které aerenchym nemají, patří stromy, keřky a orchideje (Rydin and Jeglum, 2006). Tam, kde jsou ostřicovité rostliny a ostatní rostliny s aerenchymem, tak tam jsou emise metanu vyšší, proto je můžeme považovat za prediktory vyšších emisí metanu (Le Mer and Roger, 2001).

## 2.5. Faktory prostředí

Metanogenní a metanotrofní mikroorganismy a jejich aktivita jsou ovlivněny mnoha faktory prostředí. Jsou jimi: výška vodní hladiny, oxidačně-redukční potenciál půdy, pH, složení vegetace, chemické vlastnosti půdy a teplota.

Výška vodní hladiny ovlivňuje podobu celého ekosystému a závisí na ní i ostatní faktory. Je to velmi důležitý faktor, který zajišťuje metanogenům nezbytné anaerobní podmínky. Pokud je hladina podzemní vody vysoko, tak anaerobní podmínky umožňují rozvoj metanogenního společenstva i jejich aktivity a naopak potlačuje aktivitu metanotrofů, díky zmenšení aerobní vrstvy (Le Mer and Roger, 2001). Hladina podzemní vody také určuje charakter vegetace. Pokud je hladina podzemní vody nízko, ekosystému mohou dominovat stromy, ale pokud je hladina podzemní vody vysoko, tak převládají mokřadní rostliny jako ostřice, suchopýry a rašeliníky (Rydin and Jeglum, 2006). Hladina podzemní vody určuje množství kyslíku v půdě a s tím souvisí redoxní potenciál (Eh). Redoxní potenciál vyjadřuje míru schopnosti redoxního systému převést jednoho z reakčních partnerů do oxidovaného stavu. Hodnota Eh, při které začíná probíhat metanogeneze je -200mV. Čím více hodnota Eh klesá, tím se dále několikanásobně zvyšuje produkce metanu a i jeho emise. (Kludze et al., 1993). Eh ovlivňuje tedy produkci metanu, a mimo jiné také ovlivňuje vedení metanu rostlinou (Kludze et al., 1995). Při nízkých hodnotách Eh v kořenech dochází ke zvětšování aerenchymu (Kludze et al., 1993). Metanogeni jsou striktní anaerobové a kyslík je pro ně toxický. Již při velmi nízké koncentraci kyslíku (10 ppm), může dojít k nevratným změnám na jejich enzymových komplexech (Schönheit et al., 1981).

Aktivita metanogenů má obvykle optimum kolem neutrálního nebo lehce alkalického pH v hodnotách 5,5 - 7 a je citlivá ke změnám pH v půdě (Dunfield et al., 1993). Obecně je pH v rašelinistích kyselé, což nejsou ideální podmínky pro jakékoliv organismy. Metanogeni se dobře přizpůsobili kyselým podmínkám, ale samozřejmě se to odráží na jejich nižší aktivitě a nižší produkci metanu např.: acidotolerantní metanogeni jsou schopni růst a produkovat metan při pH 4,7 (Horn et al., 2003).

Chemické vlastnosti půdy také značně ovlivňují metanogenezi. Mezi chemické vlastnosti půdy se řadí: elementární složení půdy, minerální složení půdy, složení půdního roztoku a vzduchu, obsah a složení půdní organické hmoty, stav půdních koloidů. Chemické vlastnosti půdy mohou mít vliv například na dostupnost živin pro rostliny a tedy jejich produktivitu a kvalitu opadu (Aerts et al., 2006). Mezi základní živiny pro rostliny řadíme uhlík (C), dusík (N) a fosfor (P). Ekologické procesy jsou závislé na dostupnosti N a P rovněž i dekompozice, která závisí na obsahu N a P v rostlinném materiálu (Wardle et al., 2004). V ekosystému s omezenou dostupností živin bude i pomalejší rozklad opadu a nižší aktivita mikroorganismů. To znamená, že ve výsledku se k metanogenům dostane méně substrátu v porovnání s ekosystémem s dobrou dostupností základních živin a kvalitním

substrátem. Můžeme to jasně vidět na ombrotrofních vrchovištích, kde jsou emise metanu nízké, na rozdíl od minerotrofních rašelinišť, které mají více živin, tudíž vyšší emise metanu.

Metanogeneze má i své teplotní optimum, které se nachází mezi 30 – 40 °C. Nízké teploty půdy potlačují aktivitu metanogenů, ale také i ostatních bakterií, které se účastní rozkladných procesů (Conrad et al., 1987).

Složení vegetace na rašeliništích je jeden z nejdůležitějších faktorů ovlivňující toky uhlíku. Složení vegetace ovlivňuje hodnoty fotosyntézy, rostlinou respiraci, kvalitu a kvantitu substrátu vstupujícího do půdy. Rostliny zajišťují zdroj C pro metanogeny, což dokazuje i fakt, že byla nalezena pozitivní korelace mezi emisemi metanu a produkcí biomasy rostlin. Okolo 3% C, který je za den fixován fotosyntézou, je emitováno ve formě metanu (Dacey et al., 1994). Na substrátu závisí rozsah a charakter mikrobiálních procesů v půdě. Vlivem rozdílného složení vegetace jsou i významné rozdíly v produkci metanu. Na minerotrofních rašeliništích jsou emise metanu vyšší než na chudých vrchovištích a to zejména díky ostřicovitým a ostatním rostlinám s aerenchymem. Například suchopýr pochvatý (*Eriophorum vaginatum* L.) je široce rozšířená rostlina, která obývá chudá stanoviště, jako jsou vrchoviště, rašeliniště a mokřady v arktických, boreálních a temperátních oblastech (Wain, 1973). *E. vaginatum* zvyšuje emise metanu pomocí transportu aerenchymem, což bylo dokázáno v mnoha studiích (Greenup et al., 2000; Saarnio et al., 1998). Naopak na vrchovištích jsou spíše rašeliničky, které jsou prakticky nerozložitelné a poskytují velmi málo dostupného substrátu (Nykänen, 1998). Toto potvrzuje i výzkum v Quebecu, kde byly významně vyšší emise metanu naměřeny na minerotrofních rašeliništích během celého roku ve srovnání s vrchovišti (Moore and Knowles, 1990).

## 2.6. Dostupnost substrátu a interakce s ostatními mikroorganismy

Substrátem pro metanogenezi jsou jednoduché sloučeniny, které jsou metanogenům přístupné až na konci dekompozičního řetězce. Využívají tedy konečné produkty metabolické aktivity jiných mikroorganismů a jsou na nich závislé (Boone, 1991). I Podle zákonů termodynamiky jsou nejprve využívány jako konečné akceptory elektronů nitráty, následují mangany, pak železitany, sulfáty a až úplně naposledy CO<sub>2</sub> a metylové skupiny (Ponnamperuna, 1977). Proto probíhají všechny reakce v tomto pořadí podle dostupnosti akceptorů, z toho plyne, že produkce metanu je úplně poslední krok v celém dekompozičním řetězci. Jako zdroje organického uhlíku jsou v rašeliništích rostliny, jejichž opad a kořenové exsudáty se stávají součástí dekompozičního řetězce a substrátem pro mikroorganismy.

Organický uhlík pochází zejména ze dvou hlavních zdrojů 1) kořenové a nadzemní zbytky rostlin, které dále prochází dekompozicí. 2) kořenové exsudáty a jiné látky vylučované kořeny během růstu (Kuzyakov a Domanski, 2000). Exsudáty, nevyužitelné přímo pro metanogeny, mohou také být potenciálními substráty, ale až po rozkladu na jednodušší látky ostatními mikroorganismy (Conrad, 1999). Ve studii Saarnia et al. (2004) byly zkoumány sezónní změny v kvalitě a kvantitě exudátů *E. vaginatum*, se zaměřením na exsudáty využívané metanogeny. Výsledky prokázaly, že původní rostliny rašelinišť výrazně podporují metanogenezi produkcí exudátů v rhizosféře, přestože je množství C v exsudátech mnohonásobně nižší než množství C pocházejícího z rozkladu odumřelé biomasy rostlin. Dále že *E. vaginatum* stejně jako ostatní ostřicovité rostliny je zdrojem acetátu, a proto podporuje metanogenezi v jeho rhizosféře (Saarnia et al., 2004). Pro metanogenezi je bezesporu důležitá kvalita substrátu. Ta stojí za vznikem rašelinišť v tropických oblastech, kde není limitujícím faktorem teplota, ale kvalita substrátu. Pokud je opad tvořený hlavně z ligninu nebo z jiných těžko rozložitelných látek a není zde skoro žádný snadno dostupný substrát pro mikroorganismy, tak nedochází k rozkladu a dochází k hromadění opadu v podobě rašeliny (Couteaux et al., 1995).

Metanogeni jsou součástí velkého společenstva mikroorganismů, se kterými si mohou konkurovat, ale mohou být pro ně i přínosné. Bakterie, které tvoří partnerský vztah s metanogeny se nazývají syntrofní. Tyto bakterie oxidují různé látky a jako vedlejší produkt vzniká vodík, který je potřebný pro metanogeny (Garcia et al., 2000). Celkově 11 druhů bakterií může tvořit partnerský vztah s metanogeny. Tyto bakterie oxidují různé substráty např.: alkoholy (*Pelobacter*), mastné kyseliny (*Syntrophobacter*), fruktózu (*Syntrophococcus*). Syntrofní bakterie potřebují, aby vznikající vodík z reakce byl spotřebován metanogeny, aby mohly dále růst a oxidovat substrát (Garcia et al., 2000). S jinými bakteriemi si mohou konkurovat například o vodík (H<sub>2</sub>) produkovaný fermentačními bakteriemi, který dále využívají sulfát-redukující bakterie a homoacetogenní bakterie. (Abram and Nedwell, 1978). O substrát si také mohou konkurovat se železo-redukujícími bakteriemi, které konsumují acetát, který je klíčovou složkou v anaerobní degradaci organické hmoty.

Produkty z acetogeneze (acetát) slouží jako substrát pro metanogeny, ale i pro další možné kompetitory a to sulfát-redukující bakterie. To zda sulfát redukující-bakterie vykonkurují metanogeny, závisí na přítomnosti sulfátů jako elektronových akceptorů. Pokud je dostatečná koncentrace sulfátů, sulfát-redukující-bakterie vytlačí homoacetogenní

bakterie, protože umí lépe využít běžně dostupný substrát. Vše je řízeno termodynamickými zákonitostmi a kinetickými vlastnostmi substrátů (Ward and Winfrey, 1985).

Dominantním rodem železo-redukujících bakterií v anaerobních půdách a sedimentech je *Geobacter*. Druhy rodu *Geobacter* jsou v anaerobních podmínkách schopni oxidovat acetát, který je klíčovou složkou v anaerobní degradaci organické hmoty a primární donor elektronů při produkci metanu. Kvůli kompetici o běžné donory elektronů (acetát) mezi železo-redukujícími bakteriemi a metanogenními archei, dochází často k potlačení metanogeneze (Teh et al., 2008). Železo-redukující bakterie jsou schopni růst i při nižších koncentracích substrátu než metanogeni. Metanogeneze také může být úplně inhibována, pokud v půdě bude velké množství  $\text{Fe}^{3+}$  (Lovley and Phillips, 1986).

### 2.7. Vliv odvodnění na metanogenezi, metanogeny, kvalitu organické hmoty

Přírozená rašeliniště jsou nositelem významných ekosystémových funkcí, kterými jsou především dlouhodobé ukládání uhlíku, ale významně přispívají i k biodiverzitě a zadržování vody v krajině. Odvodněním dojde k poklesu a většímu kolísání vodní hladiny, což vede k rozšíření aerobní vrstvy a tedy zredukování životního prostoru pro metanogeny (Kettunen et al., 1999). Metanogeni musí ustoupit do větších hloubek, kde je omezená dostupnost substrátu. To vše má za následek pokles počtu metanogenů a jejich diversity (Yrjälä et al., 2011). Mění se i celkové složení mikrobiálního společenstva a tedy i případné interakce metanogenů s ostatními mikroorganismy. Dochází k rychlejšímu rozkladu rašeliny díky jejímu provzdušnění nad hladinou podzemní vody a změně jejich fyzikálních a hydrodynamických vlastností. Povrchová rašelina se stane kompaktnější a dochází ke zvýšení objemové hmotnosti a snížení propustnosti a pórovitosti (Price et al., 2003). Celkově se mění celý ekosystém, ustupují mokřadní druhy rostlin a dochází ke změně vegetačního pokryvu, a tudíž i ke změně kvality a kvantity substrátu (Laiho et al., 2003).

Přítomnost kyslíku způsobuje, že převládne aerobní dekompozice a anaerobní společenstva jsou potlačena. Dochází ke změnám chemismu rašeliny, který pak může mít vliv na dostupnost živin. Zrychlí se mineralizace živin a to pak může mít vliv na dostupnost živin jako uhlíku, dusíku a fosforu (Olde Venterink et al., 2002).

Vlivem odvodnění a všech následných změn v dekompozici a vegetačním složení dochází i ke změnám v cyklu uhlíku rašeliniště. S odvodněním a následnou zvýšenou dekompozicí organické hmoty je spojováno zvýšení emisí  $\text{CO}_2$ . Naopak je dobře známo, že



se sníží produkce a emise metanu, kvůli poklesu aktivity, abundance a diverzity metanogenů, dále kvůli snížené dostupnosti změnám organického substrátu pro metanogeny a kvůli zvýšené oxidaci metanu (Nykänen et al., 1998).

Vysušení rašelinišť způsobí změnu ve vegetačním složení rašelinišť, kdy rostliny dobře adaptované na podmínky zaplavené vodou např.: ostřice, nahradí suchomilnější druhy rostlin například keříčky z čeledi vřesovitých či brusnicovitých. Dochází k šíření dřevin a ústupu rašeliníků, které jsou nahrazeny lesními druhy mechorostů (Laiho et al., 2003). Toto vše má důsledky pro metanogenezi a emise metanu jak z důvodu změny kvalitu substrátu tak v důsledku úbytku rostlin s aerenchymem, které uvolňují metan do atmosféry. Změny ve složení rostlinných zbytků mohou významně ovlivnit uhlíkovou bilanci v rašeliništi po odvodnění, protože po odvodnění dochází k vyšším emisím uhlíku do atmosféry v podobě CO<sub>2</sub>, ale celkové emise metanu se sníží (Minkinen et al., 1999).

## 2.8. Vliv revitalizace

Při revitalizaci narušených rašelinišť je primárním cílem vrátit ekosystém do původního stavu a obnovit jeho ekosystémové funkce. Toto zahrnuje obnovení hydrologického režimu, biogeochemických cyklů, původní rašelinotvorné vegetace a hlavně obnovení schopnosti akumulace rašeliny (Foster and Wright, 1990). Jsou i názory, že by se rašeliniště neměla obnovovat, jelikož uvolňují velké množství metanu do atmosféry (Aselman and Crutzen, 1989). Než se však navrátí všechny ekosystémové funkce po revitalizaci, bude trvat mnoho let, takže obavy z extrémního nárůstu emisí metanu jsou zbytečné.

Revitalizace rašeliniště začíná zvýšením hladiny podzemní vody. Zvýšení hladiny podzemní vody je naprosto zásadním krokem k vytvoření vhodných podmínek pro rostliny tvořící rašelinu (jakými jsou mechy rodu *Sphagnum* a ostřice). Na revitalizovaných rašeliništích po těžbě rašeliny bylo pozorováno rychlé šíření druhů jako je *Eriophorum vaginatum* a *Carex rostrata*, čímž usnadňují i následné šíření mechů (Tuittila et al., 2000). Kolonizace klíčových druhů je zcela zásadní pro úspěšnou revitalizaci. Tento proces lze urychlit, především u rašelinišť po těžbě, reintrodukcí rostlin, která může zvýšit počet jedinců i celkové pokrytí. Celá revitalizace může být také urychlena hnojením, orbou a přidáváním mulče pro ochranění diaspor rašeliníků před vysušením (Rocheport et al., 2003).

Hydrologická revitalizace rašelinišť může být provázena zvýšením respirace ekosystému z důvodu odumření části vegetace, ale i vyšší akumulací CO<sub>2</sub> do systému kvůli rozvíjejícímu rostlinnému pokryvu. Také produkce metanu se zvýší po zvýšení vodní hladiny, ale většinou nedosahuje hodnot, které můžeme naměřit na přirozených rašeliništích (Tuittila et al., 2000). Může to být způsobeno mnoha faktory například: nedostatečným vegetačním pokryvem, odlišným druhovým složením vegetace, než které je charakteristické pro přirozené ekosystémy, změnou metanogenních společenstev, změnou v celkovém složení mikrobiálního společenstva nebo změnou vlastností rašeliny (Basiliko et al., 2004).

Vlivu revitalizace na metanogenní společenstva a emise metanu se věnovalo několik studií (např.: Komulainen et al., 1998; Tuittila et al., 2000; Urbanová et al., 2013; Wilson et al., 2009). Jejich výsledky shodně poukazují na velmi pomalou obnovu metanogeneze po revitalizaci, která pravděpodobně úzce souvisí s obnovou původní rašeliništní vegetace a poukazuje na fakt, že pouze obnovení hydrologických podmínek není jediným faktorem řídícím emise metanu. Proto doba potřebná k obnově přirozených toků metanu v rašeliništi je výsledkem obnovy všech těchto základních faktorů společně (Urbanová et al., 2013).

Jak již bylo výše uvedeno, tak cévnaté rostliny hrají v produkci metanu naprosto klíčovou roli, protože velká část vyprodukovaného metanu je výsledkem rozkladu recentně vytvořeného C z kořenových exsudátů a čerstvého opadu (Saarnio et al., 2004). Navíc aerenchymatické rostliny transportují metan do atmosféry a tím přispívá ke zvýšeným emisím metanu. Byla pozorována jasná souvislost mezi rostoucími emisemi po revitalizaci a šířením *Eriophorum vaginatum* (Komulainen et al., 1998). Výsledky mnoha studií převážně z odtěžených rašelinišť jasně prokazují důležitost šíření vegetace po revitalizaci pro obnovu přirozených toků metanu na rašeliništích, avšak emise metanu byly stále nižší než na nenarušených rašeliništích (Waddington and Day, 2007; Komulainen et al., 1998; Tuittila et al., 2000). To může být způsobeno jak ne zcela obnovenou vegetací tak i redukováným společenstvem metanogenů po dlouhotrvajícím odvodnění či těžbě (Basiliko et al., 2004). Studie z revitalizovaného vrchoviště na Šumavě ukazuje, že v prvních třech letech po revitalizaci nenastaly žádné změny v početnosti a diverzitě metanogenního společenstva a byly srovnatelné s odvodněnými lokalitami (Urbanová et al., 2013). Práce Juottonen et al., 2012 ukazuje, že k obnově metanogenního společenstva nedošlo ani po 10-12 letech po revitalizaci. Předpokládají, že nízké počty a aktivita metanogenů jsou výsledkem špatné kvality substrátu ovlivněného odvodněním. Zároveň byla pro metanogenní společenstvo charakteristická velká prostorová heterogenita, která odráží různorodé složení vegetace,

v jejímž druhovém složení je stále patrný vliv původního odvodnění. Důležitost dostupnosti substrátu pro metanogeny dokazuje například i studie z Finska, kde emise metanu zůstaly stále nízké dva roky po revitalizaci na rozdíl od emisí na přirozených rašeliništích. Studie poukazuje na to, že dokud nekolonizuje rašeliniště typicky rašeliništní vegetace, která poskytuje dostupný substrát pro metanogeny a přispívá k vedení metanu do atmosféry, tak emise zůstanou stále na nízkých hodnotách (Tuittila et al., 2000).

Naopak v některých případech po revitalizaci může dojít k extrémním zvýšením emisí metanu a to především v případě revitalizace živinami bohatších stanovišť využívaných k zemědělským účelům. Po zaplavení dojde k odumírání veškeré vegetace, která původně odvodněné rašeliniště kolonizovala, proto je pro metanogeny najednou dostupné velké množství substrátu. Extrémně vysoké emise se v průběhu času stabilizují na přirozené hodnoty (Hahn-Schöfl et al., 2010). Revitalizace rašelinišť vede k rekolonizaci původně odvodněných nebo odtěžených rašelinišť různými druhy rostlin, které se liší primární produkcí, kvalitou organické hmoty a schopnostmi transportovat metan. Velká variabilita v mikrohabitátech na revitalizovaných rašeliništích může také vést ke vzniku takzvaných „hot-spots“ v produkci a emisích metanu v místech s příhodnými podmínkami pro produkci a emise metanu (Wilson et al., 2009). To všechno poukazuje na to, že dostupnost substrátu hraje pravděpodobně klíčovou roli v aktivitě metanogenů a produkci a emisích metanu.

### 3. Metodika

#### 3.1. Charakteristika lokalit

Všechny studované lokality se nacházejí na Šumavě a jsou součástí Národního parku Šumava. Pro studium byly vybrány dva typy rašelinišť a to vrchoviště a rašelinné smrčiny, pro které byly vybrány lokality v přirozeném stavu, dlouhodobě odvodněné (cca 50 let) a revitalizované (7-16 let). Každá varianta rašeliniště byla zastoupena dvěma lokalitami. Celkem tedy bylo sledováno 12 lokalit pro základní stanovení potenciální metanogeneze a počtu metanogenů a pro samotný laboratorní experiment byly použity vzorky pouze z revitalizovaných lokalit. Všechny studované lokality jsou součástí dlouhodobých výzkumných projektů se zaměřením na vliv revitalizace. Lokality se nachází na šumavských pláních v nadmořské výšce 1100 – 1260 m.n.m., kde panují chladné a vlhké klimatické podmínky. Průměrná roční teplota je 3,2 - 4 °C (Český hydrometeorologický ústav, 1961 - 1990) a roční srážky dosahují kolem 1000 – 1200 mm.

Přirozené rašelinné smrčiny jsou charakteristické mozaikovou vegetací s dominantním suchopýrem pochvatým (*Eriophorum vaginatum*) a rašelínkem na vlhčích místech a borůvkou na sušších vyvýšených místech. Vegetaci odvodněných smrčín zcela dominuje borůvka (*Vaccinium myrtillus*) a převažují lesní mechorosty. Vegetace na rašelinných smrčinách je po revitalizaci stále podobná odvodněným lokalitám, avšak dochází k postupnému šíření suchopýru pochvatého a některých druhů ostřic a s tím i k šíření rašelínku. Na studovaných revitalizovaných a odvodněných rašelinných smrčinách došlo k významnému odumření stromového patra (40 – 100%) v důsledku rozšíření kůrovce. Vybrané lokality nenarušených rašelinných smrčín se nachází v blízkosti Filipovi Huti a Kvildy. Odvodněné smrčiny jsou reprezentovány lokalitou Nová slat' v blízkosti Filipovi Huti a lokalitou Nad Rokytou v blízkosti Rokyteckých slatí. Cikánská slat' a lokalita Na Ztraceném představují dvě revitalizované lokality.

Vegetace přirozených vrchovišť je charakteristická střídáním bultů, šlenků a trávniček s typickými druhy pro každý mikrohabitat. Jako kontrolní nenarušené lokality byly vybrány Blatenská a Rokytecká slat'. Na dlouhodobě odvodněných rašeliništích byly vlhkomilnější druhy šlenků a trávniček nahrazeny *Vaccinium myrtillus*, *V. uliginosum* a *Eriophorum vaginatum*. Na některých odvodněných plochách jsou stále dominantní porosty *Trichophorum caespitosum* charakteristického pro vlhčí trávničky. Odvodněná vrchoviště jsou reprezentována lokalitou Ptačí slat' a částí Rokyteckých slatí, která byla ovlivněna

odvodněním. Kamerální slat' a Schachtenfilz představují dvě revitalizovaná vrchoviště. Po revitalizaci došlo zatím pouze k pozvolným změnám ve vegetační struktuře, nejčastěji došlo k odumření suchomilné keříčkovité vegetace či dřevin (*P. abies*, *Pinus x pseudopumilio*) v okolí zaplavených odvodňovacích kanálů a naopak zde dochází k šíření *E. vaginatum* a rašeliníků.

Rašeliniště této oblasti byly odvodňovány zejména kvůli přeměně na lesní plochy. Odvodňovalo se zejména v průběhu posledních 50 let pomocí odvodňovacích rýh s hloubkou až 2 m a šířkou 3,5 m. Vzdálenosti mezi jednotlivými příkopy se pohybovaly kolem 25-40 m. Revitalizace probíhala metodou přehrazení odvodňovacích rýh dřevěným přehradami a také částečným vyplněním příkopů organickým materiálem jako jsou například větve a zbytky dřeva. Revitalizace na vrchovištích, ze kterých byly odebrány vzorky, byla provedena před 7 a 14 lety. V případě rašelinných smrčín jsou lokality 7 a 10 let po revitalizaci.

### 3.2. Odběr a zpracování vzorků

Odběr vzorků proběhl v červnu 2015. Vzorky byly odebrány pomocí finského odběráku (finish box corer) vždy v transektu kolmém na odvodňovací rýhu. První vzorek byl odebrán 1m od odvodňovací rýhy a dále 10m a 20m od rýhy. Na každé lokalitě byly dva tyto transekty. Vzorky byly odebrány z hloubky 0-30 cm a následně rozděleny na svrchní vrstvu (A) 0-10cm a spodní vrstvu (B) 10-30cm. Celkem bylo získáno 144 vzorků.

Druhý den po odběru byly pro molekulární analýzu metanogenních společenstev odebrány vzorky z neporušeného půdního kóru. Ten byl sterilním nožem podélně rozříznut a z vnitřní nově rozříznuté strany bylo lžičkou odebráno cca 2 g půdy po celé délce profilu. Počet vzorků byl redukován vytvořením směsných vzorků vždy ze stejného transektu a vrstvy, tedy jsme získali výsledných 48 směsných vzorků. Odebrané vzorky byly v mirkozumavkách Eppendorf okamžitě po odběru zamrazeny v -80 °C do doby zahájení analýz.

Následně byly vzorky ručně promíchány (homogenizovány) a skladovány při 4°C do dalších laboratorních prací. Všechny 144 vzorků bylo použito pouze pro stanovení potenciální produkce metanu a oxidu uhličitého. Pro samotný experiment s přísadkami substrátů, byly použity vzorky pouze z revitalizovaných lokalit a to vždy pouze z jednoho ze dvou transektů na lokalitě, tedy 6 vzorků z každé revitalizované lokality.

Pro všechny vzorky byla stanovena suchá hmotnost vzorku, která představuje, suchý podíl půdy na 1 g čerstvého vzorku. Navážila jsem 5-8 g půdy do hliníkových váženek, zvažila je a dala sušit na 5h při 105 °C. poté jsem váženky opět zvažila a vypočetla podíl suché hmotnosti vzorku podle vzorce:

$$S = \frac{m_s - m_v}{m_1 - m_v}$$

$m_s$  hmotnost váženky se suchou půdou (g)

$m_v$  hmotnost váženky (g)

$m_1$  hmotnost váženky s vlhkou půdou (g)

U všech vzorků bylo změřeno pH rašeliny. Bylo naváženo 10 g rašeliny do sérovek a následně zalito 10ml vody. Takto připravené vzorky se nechaly ustálit a následovně se změřilo pH přístrojem Ph-metrem.

Podkladová data o studovaných lokalitách a fyzikálně chemické charakteristiky rašeliny (Tab. 1 a 2; data použitá pro korelační matice) byla získána z dosavadních dlouhodobých sledování těchto lokalit v rámci projektu: *Vliv revitalizace dlouhodobě odvodněných rašelinišť na funkční diverzitu půdních mikroorganismů ve vztahu ke kvalitě organické hmoty* (Z. Urbanová).

### 3.3. Stanovení potenciální produkce CH<sub>4</sub>

Potenciální produkce CH<sub>4</sub> a CO<sub>2</sub> byla stanovena v laboratoři v anaerobních podmínkách. Pro tento pokus bylo použito všech 144 vzorků. Do sérovek bylo naváženo 10g homogenizované přirozeně vlhké půdy. Sérovky jsme uzavřeli špuntem a víčkem a profoukli dusíkem. Vzorky byly inkubovány při 10 °C po dobu 50 dnů. Koncentrace CH<sub>4</sub> a CO<sub>2</sub> byla měřena pomocí plynového chromatografu (HP 6890 a HP 6850 Agilent, USA) v týdenních intervalech. Pro kontrolu anaerobních podmínek byla měřena i koncentrace O<sub>2</sub>.

Výpočet kumulativní anaerobní respirace CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub>

Množství CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub>, vyprodukovaného při anaerobní respiraci bylo vypočítáno následovně:

1) Objem CO<sub>2</sub> v headspace sérovky

$$G = \frac{C_{CO_2} \cdot V_g}{1000} \text{ [}\mu\text{l CO}_2\text{]}$$

$C_{CO_2}$  Koncentrace  $CO_2$  změřená na plynovém chromatografu (ppm)

$V_g$  objem headspace sérovky (ml)

2) Objem  $CO_2$  rozpuštěného v půdním roztoku

$$L = \frac{1,1940 \cdot G \cdot V_L}{V_G} \text{ [}\mu\text{l CO}_2\text{]}$$

$V_L$  objem půdního roztoku v sérovce ( $\mu\text{l}$ )  $V_L = (1 - \text{suchá hmotnost}) \cdot \text{navážka} + \text{dodaná voda}$

1,1940 koeficient rozpustnosti  $CO_2$  ve vodě o  $10^\circ\text{C}$

3) Celkový objem  $CO_2$  vyprodukovaný na 1 g půdy

$$T = \frac{(G+L)}{\text{navážka} \cdot \text{suchá hmotnost}} \text{ [}\mu\text{l CO}_2 \text{ g}^{-1}\text{]}$$

4) Celková hmotnost uhlíku vyprodukovaného na 1 g půdy

$$Y = 0,536 \cdot T \text{ [}\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}\text{]}$$

koeficient 0,536 je přepočtem z  $\mu\text{l CO}_2$  na  $\mu\text{g C-CO}_2$

Kumulativní anaerobní respirace byla stanovena jako celková hmotnost  $C-CO_2$  vyprodukovaného na 1 g půdy za celou dobu inkubace 50 dnů.

Stejný postup výpočtu byl použit pro stanovení celkové hmotnosti  $C-CH_4$  vyprodukovaného na 1 g půdy za dobu inkubace, kde byl použit koeficient rozpustnosti  $CH_4$  ve vodě pro  $10^\circ\text{C}$  0,0418.

#### 3.4. Kvantitativní analýza metanogenního společenstva

Ze vzorků byla vyizolována DNA pomocí Power Soil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Inc). Navážka každého směsného půdního vzorku pro izolaci byla 0.25g. Účinnost extrakce byla ověřena gelovou elektroforézou (1% gel, 100V, 50 min). Kvantifikace DNA byla provedena fluorometricky použitím kitu QuantiFluor dsDNA Systém (Promega).

Dále byl stanoven ve vzorcích půdy pomocí kvantitativní PCR počet kopií genu *mcrA*, za účelem kvantifikace metanogenních archaeí. Každá 20 -  $\mu\text{l}$  reakce obsahovala: 5.86  $\mu\text{l}$  vody, 10  $\mu\text{l}$  FastStart Universal SYBR Green Master (Rox), 0.12  $\mu\text{l}$  primeru ME1 (5'- GCM ATG CAR ATH GGW ATG TC-3'), 0.12  $\mu\text{l}$  primeru MCR1R (5'-ARC CAD ATY TGR TCR TA-3') (Hales et. al., 1996), 0.4  $\mu\text{l}$  BSA (albumin z hovězího séra), 0.5  $\mu\text{l}$  DMSO (dimetylsulfoxid) a 3  $\mu\text{l}$  DNA templátu. Koncentrace primerů v reakci byla 0.3  $\mu\text{M}$ . qPCR probíhala na přístroji StepONE RealTime PCR System (Applied Biosystems) ve 48-jamkových destičkách. Každá destička obsahovala pětibodovou standardní křivku, negativní kontrolu a měřené vzorky (vše ve dvou opakováních). Standardní křivka byla připravena desítkovým ředěním purifikovaného PCR produktu (*mcrA* gen amplifikovaný z DNA Archaea *Methanosarcina*), pro reakci bylo použito ředění od  $10^{-3}$  do  $10^{-7}$ . Reakční podmínky kvantifikace *mcrA* genu jsou uvedeny v tabulce 1:

**Tab. 1:** Reakční podmínky kvantifikace *mcrA* genu.

|                             | teplota (°C) | čas (s) | počet cyklů |
|-----------------------------|--------------|---------|-------------|
| <b>Počáteční denaturace</b> | 95           | 600     | 1           |
| <b>Denaturace</b>           | 95           | 30      | 35          |
| <b>Nasedání primerů</b>     | 50           | 60      |             |
| <b>Elongace</b>             | 72           | 60      |             |

Na konci každého cyklu byla měřena fluorescence. Pro ověření specificity primerů byla po posledním cyklu proměřena křivka tání. Amplifikace produktů byla ověřena gelovou elektroforézou (1% gel, 100V, 60 min). Očekávaná velikost produktu byla 280 bp. Účinnost reakce se pohybovala mezi 95-97%. Pro zpracování výsledků byl použit program StepOne Software v2.3 a Microsoft Excel. Počty metanogenů byly přepočteny na gram suché hmotnosti půdy.

### 3.5. Laboratorní experiment s přidavky různých substrátů

Z vybraných vzorků z revitalizovaných lokalit bylo naváženo 10 g vlhkého vzorku do sérovek v pěti opakování. Sérovky byly uzavřeny špuntem a víčkem a následně byla atmosféra v sérovkách profouknuta  $\text{N}_2$  pro vytvoření anaerobních podmínek. Takto připravené vzorky byly šest dní předinkubovány při teplotě 10 °C.



Bylo připraveno 5 různých variant substrátů (roztoků), které byly po 6 dnech předinkubace přidány do každé sady vzorků. Ke každému vzorku bylo přidáno 30 ml daného roztoku. Po přidání roztoku byly sérovky opět ihned uzavřeny a profouknuty dusíkem a inkubovány při 10 °C. Použité roztoky byly následující: destilovaná voda (H<sub>2</sub>O) (sloužila jako kontrola), roztok glukózy (GLC), roztok etanolu (ETOH), namletý suchopýr (SUCH), namletý rašeliník (RAS).

Roztoky substrátu byly připraveny následovně. Každý roztok byl připraven tak, abychom dodali stejné množství uhlíku v různých formách. Roztoky jsme naředili tak, abychom přidali 50 mg uhlíku ke každému vzorku v různých formách. U sušených a namletých substrátů byla navážka sušeného vzorku vypočtena podle obsahu uhlíku tak, abychom přidali 50 mg uhlíku ke vzorku. Uvažovali jsme pětinasobek předpokládaného množství uhlíku v mikrobiální biomase, dle toho jsme připravovali roztoky a navážky daných substrátů. Láhve pro roztoky a ostatní vybavení bylo vysterilizováno v autoclavu či pod UV. Připravené roztoky byly profouknuty dusíkem.

Přímo na studovaných lokalitách byly nasbírány rostliny pro přípravu mletých sušených substrátů. Nasbírali jsme vždy dominantní druh ostřicovité rostliny a rašeliníku pro smrčinu (*Eriophorum vaginatum*, *Sphagnum flexuosum*) a vrchoviště (*Trichophorum caespitosum*, *Sphagnum rubellum*). Sběr ostřic proběhl před začátkem pokusu, kdy se utrhané rostliny a ponechaly 10 dní na místě rozprostřené v síťce (částečná simulace odumření). Po 10 dnech se zvadlé rostliny sesbíraly. Z rostlinek rašeliníku byly odebírány pouze odumřelé nezelené části cca 5 cm pod hlavičkou rašeliníku. Ostřice i rašeliníky byly vysušeny při teplotě 60 °C několik dní. Usušené rašeliníky a ostřice byly umlety na kulovém mlýnu. V těchto namletých substrátech bylo stanoveno celkové množství C, N pomocí Micro-cube elementar analyser (Elementar, Germany). Celkový P byl stanoven metodou rozpouštění v kyselině chloristé (Sommers and Nelson, 1972). Výsledky měření jsou zaznamenány v tabulce 2. Na základě stanovené koncentrace C, jsme dopočetli potřebnou navážku substrátu.

**Tab 2:** Poměry a procenta živin v rostlinných substrátech z vrchoviště a rašelinné smrčiny.

| Substrát             | Celkové obsahy živin |      |      | Poměry živin |         |       |
|----------------------|----------------------|------|------|--------------|---------|-------|
|                      | C%                   | N%   | P %  | C/N          | C/P     | N/P   |
| Vrch<br>Trichophorum | 45,69                | 2,30 | 0,13 | 19,89        | 365,56  | 18,38 |
| Vrch<br>Sphagnum     | 44,96                | 0,95 | 0,04 | 47,35        | 1119,16 | 23,64 |
| Rsm<br>Eriophorum    | 45,04                | 1,92 | 0,25 | 23,45        | 182,09  | 7,77  |
| Rsm<br>Sphagnum      | 43,90                | 0,60 | 0,04 | 72,76        | 1002,38 | 13,78 |

Od uzavření sérovek byla měřena koncentrace CO<sub>2</sub> v headspace pomocí plynového chromatografu (HP 6850 Agilent, USA) v časech: 4h, 8h, 12h, 24h, 48h, 7den, 15den, 22den, 36den, 51den od založení inkubace. Koncentrace CH<sub>4</sub> byla měřena pomocí plynového chromatografu (HP 6890 Agilent, USA) až od 7. dne dále ve stejných intervalech jako CO<sub>2</sub>. Pro kontrolu anaerobních podmínek byla měřena i koncentrace O<sub>2</sub>.

### 3.6. Statistické vyhodnocení dat

Rozdíly v potenciální produkci CH<sub>4</sub> a CO<sub>2</sub> a počtu metanogenů mezi plochami s různým managementem (přírodní, odvodněné a revitalizované) byly testovány pomocí jednocestné ANOVY s následným Tukey HSD testem. Tato analýza byla provedena samostatně pro každou vrstvu (A, B) a typ (vrchoviště a rašelinná smrčina). To zda má vliv management rašeliniště na potenciální produkci CH<sub>4</sub> a CO<sub>2</sub> a počty metanogenů byl testován jednocestnou ANOVOU a pro zjištění, zda se od sebe liší jednotlivé managementy, byl následně použit Tukey HSD test. Data počtu metanogenů byla nejprve zlogaritmována a data produkce CH<sub>4</sub> byla upravena pomocí odmocninové transformace pro přiblížení k normálnímu rozdělení, toho však i přesto dosaženo nebylo.

Dále byl hodnocen vliv přídatku substrátu na produkci CH<sub>4</sub> a CO<sub>2</sub> ve srovnání s kontrolou (H<sub>2</sub>O) pomocí Dunnettova testu. Dunnettovým testem se porovnávaly vzorky pouze s přídatkem H<sub>2</sub>O se vzorky kam se přidával substrát pro zjištění, jestli se produkce průkazně zvýšila. Na vyhodnocení souvislostí mezi fyzikálně-chemickými vlastnostmi půdy, počtem metanogenů a potenciální produkcí CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> byly použity korelační matice. Pro

statistické hodnocení naměřených dat byl použit program Statistica 12 (Stasoft, Inc.). Vše bylo testováno na hladině významnosti  $p=0,05$ .

#### 4. Výsledky

Základní fyzikálně-chemické charakteristiky půdy a hladina vody na jednotlivých rašeliništích jsou uvedeny v tabulce 3 a 4. Na přirozených vrchovištích i rašelinných smrčínách je hladina podzemní vody nejvýše cca 8 cm pod povrchem. Naopak na odvodněných lokalitách je hladina až o 12 až 25cm nižší. Na revitalizovaných lokalitách hladina podzemní vody ještě není ustálená, ale hodnoty už se blíží přirozeným plochám. Hodnoty pH jsou na vrchovištích nižší než na rašelinných smrčínách. Hodnoty pH se příliš neliší mezi vrchovišti s různým managementem, avšak na rašeliných smrčínách je patrný pokles pH na odvodněných lokalitách a nárůst na revitalizovaných lokalitách. Objemová hmotnost je nejnižší na přirozených lokalitách, odvodněné a revitalizované plochy se od sebe příliš neliší.

**Tab. 3:** Hladina vody a fyzikálně-chemické charakteristiky rašeliny (průměr ± směrodatná odchylka) z vrstvy A (0-10 cm) a vrstvy B (10-30 cm) na vrchovištích (přirozených: VrchP, odvodněných: VrchD, revitalizovaných: VrchR).

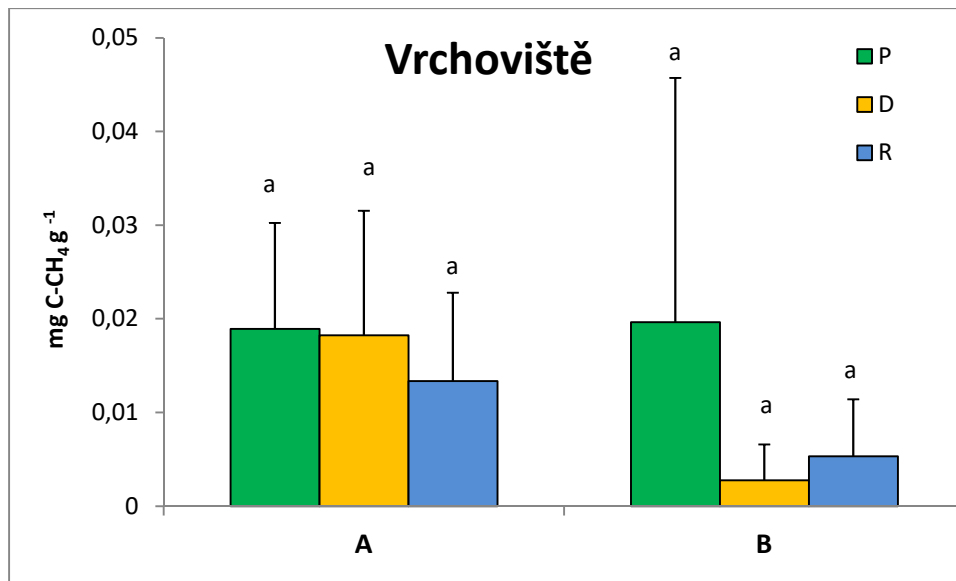
| Typ rašeliniště a management            | VrchP     |           | VrchD     |           | VrchR     |           |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|   | A         | B         | A         | B         | A         | B         |
| Hladina podzemní vody (cm)              | -8,38±2   | -8,38±2   | -19,96±8  | -19,96±8  | -11,98±5  | -11,98±5  |
| pH (půdy)                               | 3,95±0,05 | 3,93±0,07 | 3,96±0,12 | 4,07±0,27 | 3,91±0,18 | 3,94±0,07 |
| Objemová hmotnost (g cm <sup>-3</sup> ) | 0,07±0,02 | 0,06±0,02 | 0,09±0,03 | 0,07±0,03 | 0,10±0,02 | 0,06±0,01 |
| C %                                     | 48,16±1   | 47,72±1   | 48,55±1   | 48,85±3   | 48,18±1   | 47,64±1   |
| N %                                     | 1,88±0,2  | 1,44±0,5  | 1,65±0,2  | 1,18±0,3  | 1,90±0,3  | 1,15±0,3  |
| P (mg g <sup>-1</sup> )                 | 0,68±0,1  | 0,44±0,1  | 0,67±0,1  | 0,39±0,2  | 0,74±0,2  | 0,38±0,1  |

**Tab. 4:** Hladina vody a fyzikálně-chemické charakteristiky rašeliny (průměr ± směrodatná odchylka) z vrstvy A (0-10 cm) a vrstvy B (10-30 cm) na rašelinné smrččině (přirozených: RsmP, odvodněných: RsmD, revitalizovaných: RsmR).

| Typ rašeliniště a management            | RsmP      |           | RsmD      |           | RsmR      |           |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|   | A         | B         | A         | B         | A         | B         |
| Hladina podzemní vody (cm)              | -8,97±6   | -8,97±6   | -33,99±13 | -33,99±13 | -13,88±8  | -13,88±8  |
| pH (půdy)                               | 4,01±0,28 | 4,20±0,21 | 3,78±0,13 | 3,85±0,18 | 4,39±0,17 | 4,08±0,24 |
| Objemová hmotnost (g cm <sup>-3</sup> ) | 0,05±0,03 | 0,06±0,04 | 0,12±0,03 | 0,12±0,04 | 0,11±0,09 | 0,10±0,06 |
| C %                                     | 45,57±2   | 45,57±2   | 46,98±5   | 46,98±4   | 46,93±9   | 46,93±7   |
| N %                                     | 1,27±0,3  | 1,43±0,4  | 1,76±0,3  | 1,60±0,2  | 1,66±0,4  | 1,44±0,2  |
| P (mg g <sup>-1</sup> )                 | 0,75±0,2  | 0,66±0,2  | 1,01±0,3  | 0,81±0,2  | 0,84±0,1  | 0,68±0,3  |

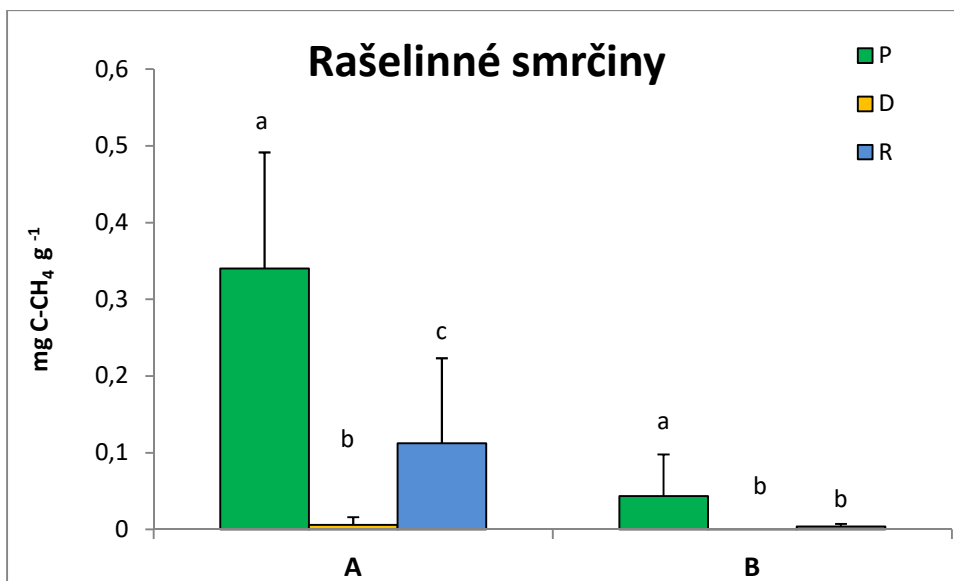
#### 4.1. Potenciální produkce metanu a počet metanogenů na přirozeném, odvodněném a revitalizovaném rašeliništi

Z měření potenciální produkce metanu vyjádřené jako kumulativní respirace mg C-CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> za 50 dnů vidíme, že produkce metanu byla odvodněním ovlivněna především v hlubším horizontu na vrchovištích. Došlo zde k jejímu poklesu vlivem odvodnění (Obr. 1), avšak kvůli velké variabilitě v měřené potenciální produkci na přirozených vrchovištích nebyl rozdíl statisticky průkazný. Na revitalizovaných vrchovištích je sice patrné mírné zvýšení produkce CH<sub>4</sub> ve vrstvě B ve srovnání s odvodněnými lokalitami, ale i přes to nedosahuje hodnot jako na přirozených lokalitách. Naopak produkce metanu ve svrchním horizontu A nebyla odvodněním a revitalizací téměř ovlivněna.



**Obr 1:** Potencionální produkce metanu na vrchovištích ve svrchní (A) a spodní (B) vrstvě půdy (průměr ± směrodatná odchylka), P- přirozená, D- odvodněná, R- revitalizovaná vrchoviště. Malá písmena nad sloupečky ukazují výsledky Tukey HSD testu. Pokud se písmena liší, byl rozdíl mezi lokalitami s různým managementem průkazný, testováno pro každou vrstvu půdy samostatně.

Odlišnou situaci než na vrchovištích můžeme pozorovat na rašelinných smrčínách (Obr. 2). Nejvyšší hodnoty produkce metanu byly naměřeny na opět v přirozených lokalitách a to především ve svrchním A horizontu. Naopak na odvodněných lokalitách byla naměřena velmi nízká potenciální produkce, kdy v mnoha vzorcích nebyla naměřena žádná produkce metanu v obou horizontech. Na revitalizovaných lokalitách smrčín byla pozorována vyšší produkce metanu ve svrchním horizontu A ve srovnání s odvodněnými lokalitami, avšak produkce zde nedosahovala hodnot jako na přirozených lokalitách. Naopak ve spodním B horizontu byla produkce metanu na revitalizovaných lokalitách velmi nízká, srovnatelná s odvodněnými.

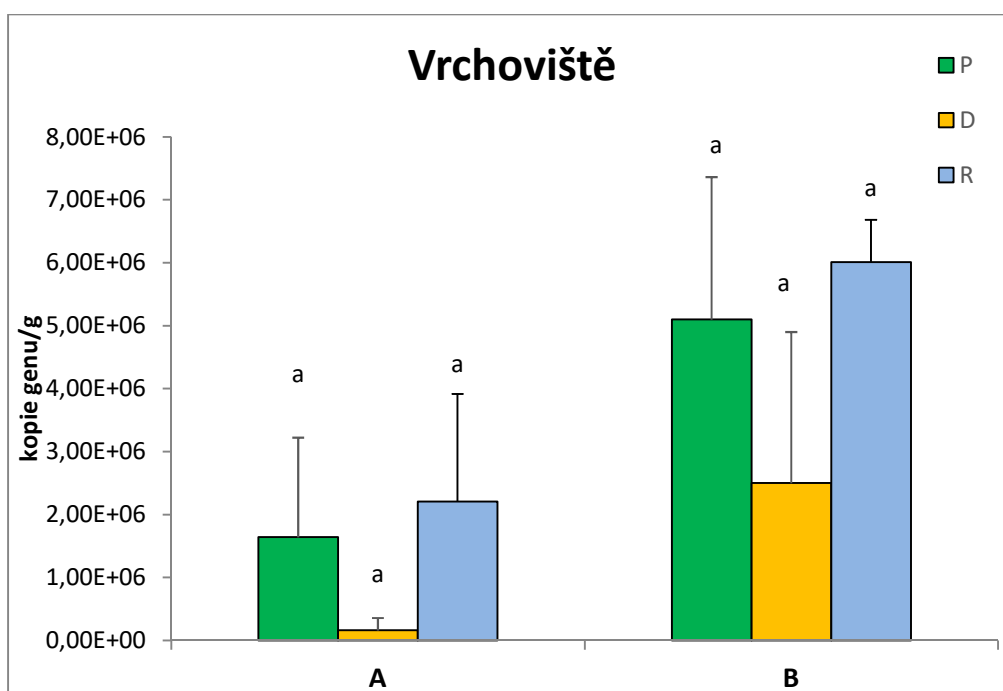


**Obr 2:** Potencionální produkce metanu na rašelinných smrčínách ve svrchní (A) a spodní (B) vrstvě půdy (průměr  $\pm$  směrodatná odchylka), P- přirozené, D- odvodněné, R- revitalizované rašelinné smrčiny. Malá písmena nad sloupečky ukazují výsledky Tukey HSD testu. Pokud se písmena liší, byl rozdíl mezi lokalitami s různým managementem průkazný, testováno pro každou vrstvu půdy samostatně.

Na obrázku 3 a 4 vidíme výsledky z kvantitativní analýzy počtu metanogenů v jednotlivých rašelinných smrčínách a vrchovištích ovlivněných různým managementem. Výsledky ukazují, že počty metanogenů nekorespondují s produkcí metanu. Na nenarušených vrchovištích i na rašelinných smrčínách se vyšší počet metanogenů nachází ve spodních horizontech. Na vrchovištích byl celkově nalezen vyšší počet metanogenů ve spodní vrstvě rašeliny B než v povrchové vrstvě A. Na vrchovištích byl nejvyšší počet metanogenů detekován na revitalizovaných plochách (R)  $6 \times 10^6$  kopie genu  $g^{-1}$  ve spodním horizontu. Na odvodněných vrchovištích je počet metanogenů nižší ve srovnání s nenarušenými lokalitami, avšak rozdíly jsou kvůli vysoké variabilitě statisticky neprůkazné. Revitalizovaná vrchoviště dosahují podobných nebo mírně vyšších hodnot počtu metanogenů než přirozené lokality.

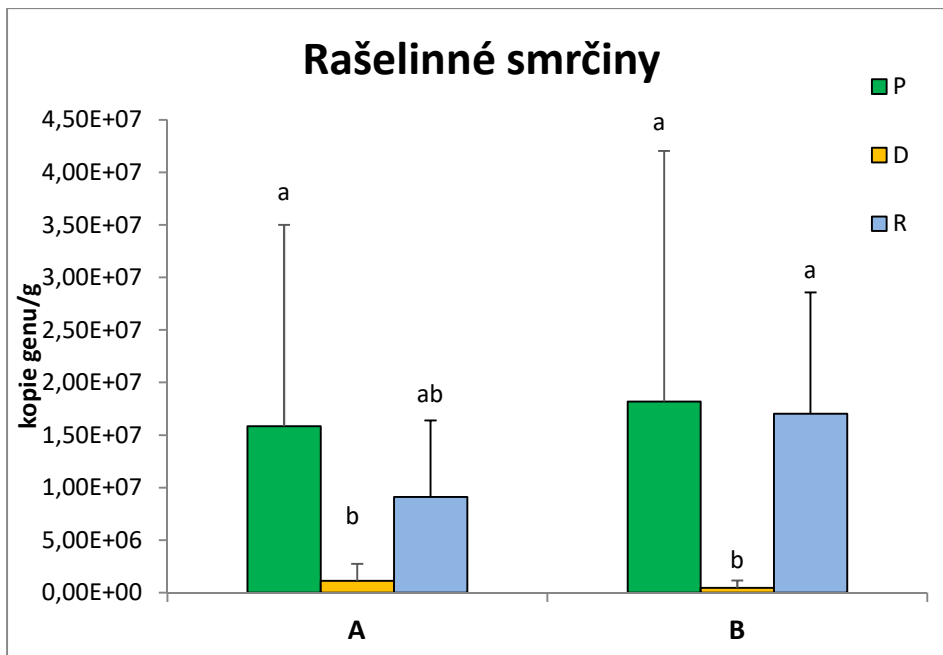
Na rašelinných smrčínách jsou trendy v počtu metanogenů mezi lokalitami s různým managementem podobné jako na vrchovištích. Pokles počtu metanogenů na odvodněných lokalitách je ve srovnání s přirozenými lokalitami průkazný v obou horizontech. Na revitalizovaných smrčínách jsou počty metanogenů srovnatelné s nenarušenými lokalitami v případě B horizontu. Ve svrchním A horizontu došlo také ke zvýšení počtu metanogenů avšak nedosahuje hodnot přirozených smrčín.

Na vrchovištích byla nalezena průkazná pozitivní korelace ( $P < 0,05$ ) mezi počtem metanogenů a hladinou podzemní vody ( $r = 0,43$ ). Naopak počty metanogenů negativně korelují s objemovou hmotností ( $r = -0,6$ ). Na rašelinných smrčínách byla nalezena pozitivní korelace mezi počtem metanogenů a pH rašeliny ( $r = 0,52$ ), které na rašelinných smrčínách pokleslo na odvodněných plochách a na revitalizovaných došlo opět k jeho nárůstu. Korelace mezi počtem metanogenů a potenciální produkcí metanu však nebyla nalezena ani na jednom z typů rašelinišť.



**Obr 3:** Počty metanogenů na vrchovištích ve svrchní (A) a spodní (B) vrstvě půdy (průměr  $\pm$  směrodatná odchylka), P- přirozená, D- odvodněná, R- revitalizovaná vrchoviště. Malá písmena nad sloupečky ukazují výsledky Tukey HSD testu. Pokud se písmena liší, byl rozdíl mezi lokalitami s různým managementem průkazný, testováno pro každou vrstvu půdy samostatně.

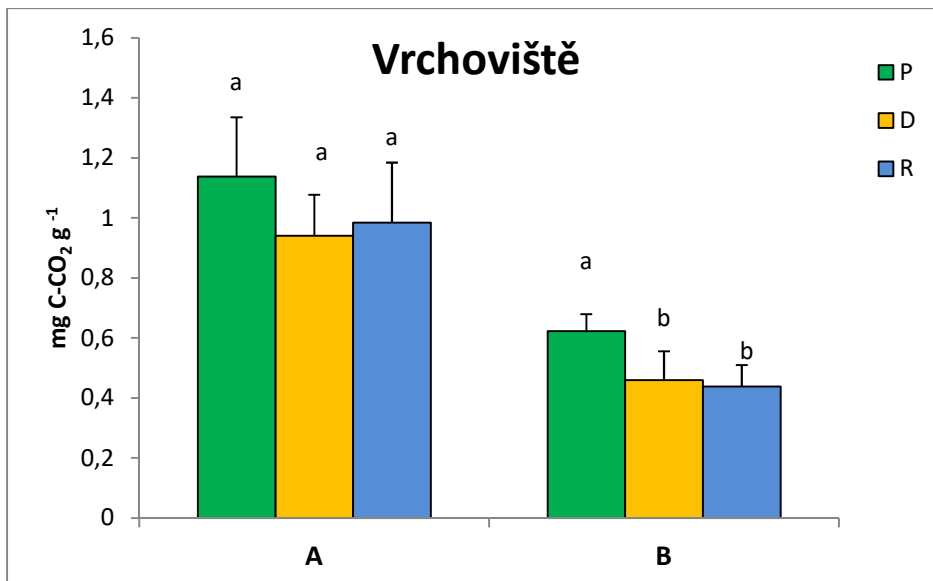




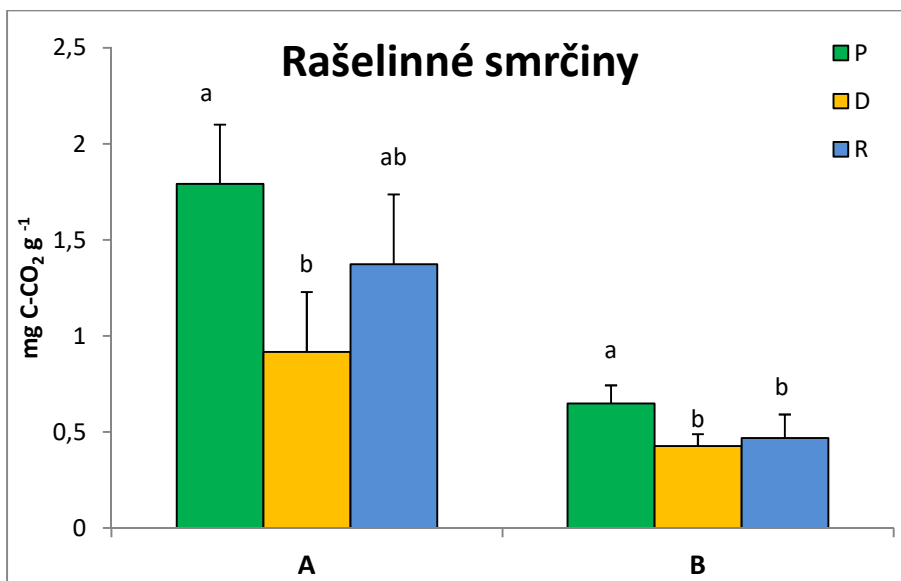
**Obr 4:** Počty metanogenů na rašelinných smrčínách ve svrchní (A) a spodní (B) vrstvě půdy (průměr ± směrodatná odchylka), P- přirozené, D- odvodněné, R- revitalizované rašelinné smrčiny. Malá písmena nad sloupečky ukazují výsledky Tukey HSD testu. Pokud se písmena liší, byl rozdíl mezi lokalitami s různým managementem průkazný, testováno pro každou vrstvu půdy samostatně.

#### 4.2. Anaerobní produkce CO<sub>2</sub> na přirozených, odvodněných a revitalizovaných rašeliništích

Na obrázku 5 a 6 jsou zaznamenány výsledky měření potenciální anaerobní produkce CO<sub>2</sub> ze všech lokalit bez přidavku substrátu. Celkově je anaerobní produkce CO<sub>2</sub> vyšší ve svrchním horizontu než ve spodním horizontu na všech rašeliništích. Na vrchovištích i rašelinných smrčínách dosahuje nejvyšších hodnot ve svrchním horizontu přirozených lokalit (Vrch P = 1,14 mg C-CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>, Rsm P = 1,79 mg C-CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup>). Na vrchovištích je jen malý rozdíl v anaerobní produkci CO<sub>2</sub> mezi odvodněnými a revitalizovanými plochami v obou horizontech, avšak je zde patrný pokles produkce CO<sub>2</sub> na odvodněných a revitalizovaných plochách ve srovnání s přirozenými. Zatímco na rašelinných smrčínách jsou hodnoty anaerobní produkce CO<sub>2</sub> průkazně nižší na odvodněných lokalitách ve srovnání s přirozenými. Na revitalizovaných smrčínách je anaerobní produkce CO<sub>2</sub> vyšší ve svrchním horizontu než na odvodněných, avšak stále nedosahuje hodnot jako na přirozené smrčíně.



**Obr 5:** Potenciální produkce CO<sub>2</sub> na vrchovištích ve svrchní (A) a spodní (B) vrstvě půdy (průměr ± směrodatná odchylka), P- přirozené, D- odvodněné, R- revitalizované rašelinné smrčiny. Malá písmena nad sloupečky ukazují výsledky Tukey HSD testu. Pokud se písmena liší, byl rozdíl mezi lokalitami s různým managementem průkazný, testováno pro každou vrstvu půdy samostatně.

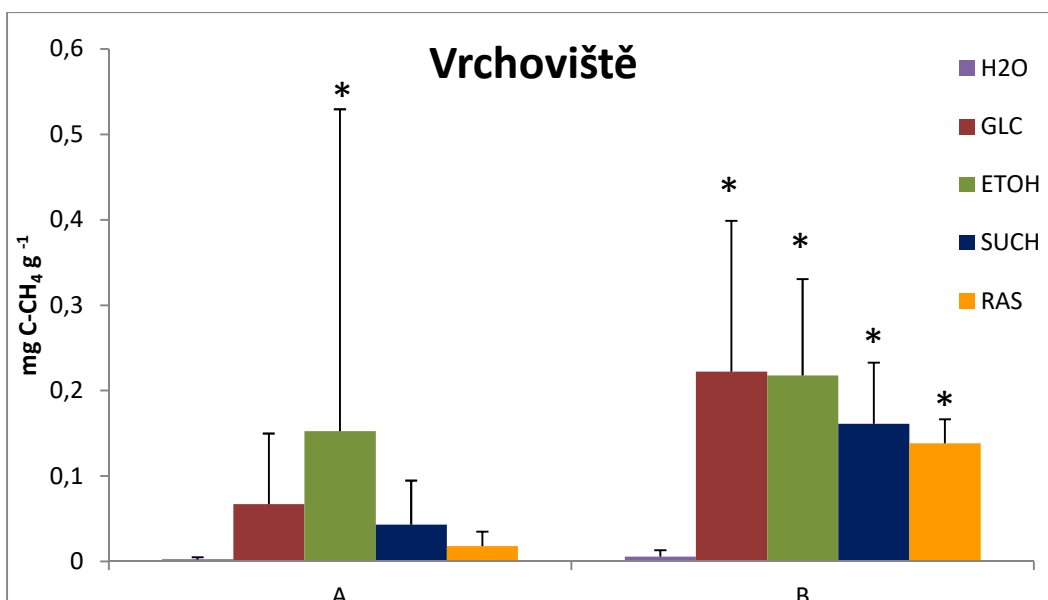


**Obr 6:** Potenciální produkce CO<sub>2</sub> na rašelinných smrčinách ve svrchní (A) a spodní (B) vrstvě půdy (průměr ± směrodatná odchylka), P- přirozené, D- odvodněné, R- revitalizované rašelinné smrčiny. Malá písmena nad sloupečky ukazují výsledky Tukey HSD testu. Pokud se písmena liší, byl rozdíl mezi lokalitami s různým managementem průkazný, testováno pro každou vrstvu půdy samostatně.

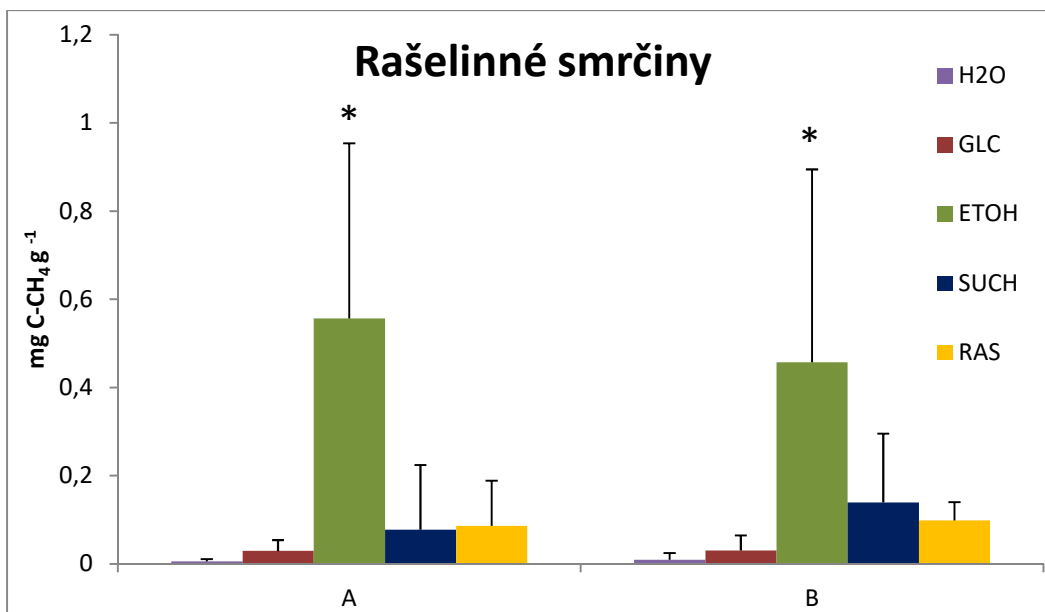
#### 4.3. Produkce CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> z revitalizovaných rašeliníšť po přidavku různých substrátů

Obrázek 7 a 8 zobrazuje celkové množství uhlíku uvolněného v podobě CH<sub>4</sub> za celou dobu inkubace 50 dnů na gram suché půdy. Z grafu je patrné, že přidavek substrátu podpořil metanogenezi ve všech případech ve srovnání s kontrolou (H<sub>2</sub>O). Avšak přidavek suchopýru a rašeliníku vedl k průkaznému zvýšení produkce CH<sub>4</sub> pouze ve spodním horizontu na vrchovišti. Naopak přidavek etanolu vedl k průkaznému zvýšení produkce CH<sub>4</sub> jak na vrchovišti tak i smrčíně v horním (A) i spodním (B) horizontu. Vlivem ostatních substrátů došlo většinou ke zvýšení produkce CH<sub>4</sub>, avšak ne všechny rozdíly ve srovnání s kontrolou byly statisticky významné.

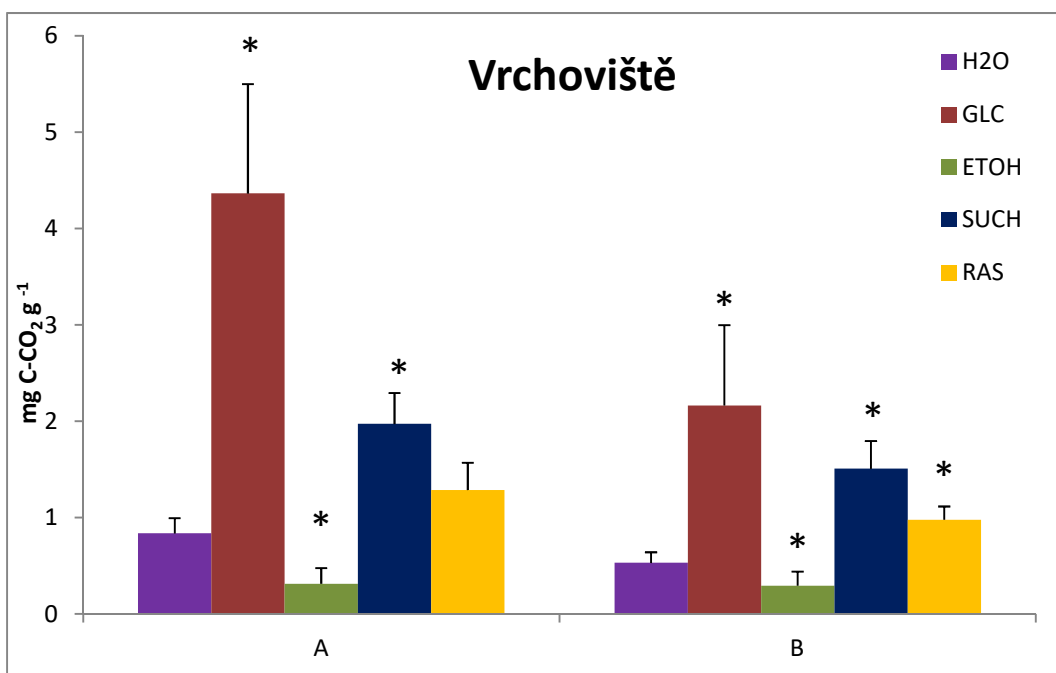
Na obrázku 9 a 10 vidíme vliv přidavku různých substrátů na anaerobní produkci CO<sub>2</sub>, kdy namletá ostřice vedla k průkaznému zvýšení produkce ve srovnání s kontrolou (H<sub>2</sub>O) ve všech případech. Přídavek glukózy se také projevil průkazným zvýšením anaerobní respirace ve všech případech. Přídavek rašeliníku vedl také ke zvýšení anaerobní produkce CO<sub>2</sub> avšak ne statisticky významnému ve srovnání s kontrolou. Opačný efekt na produkci CO<sub>2</sub> měl přidavek etanolu, který vedl k poklesu produkce CO<sub>2</sub> ve srovnání s kontrolou. Anaerobní produkce CO<sub>2</sub> se příliš nelišila mezi vrchovišti a smrčinami, jejich reakce na přidavky substrátu byla velmi podobná.



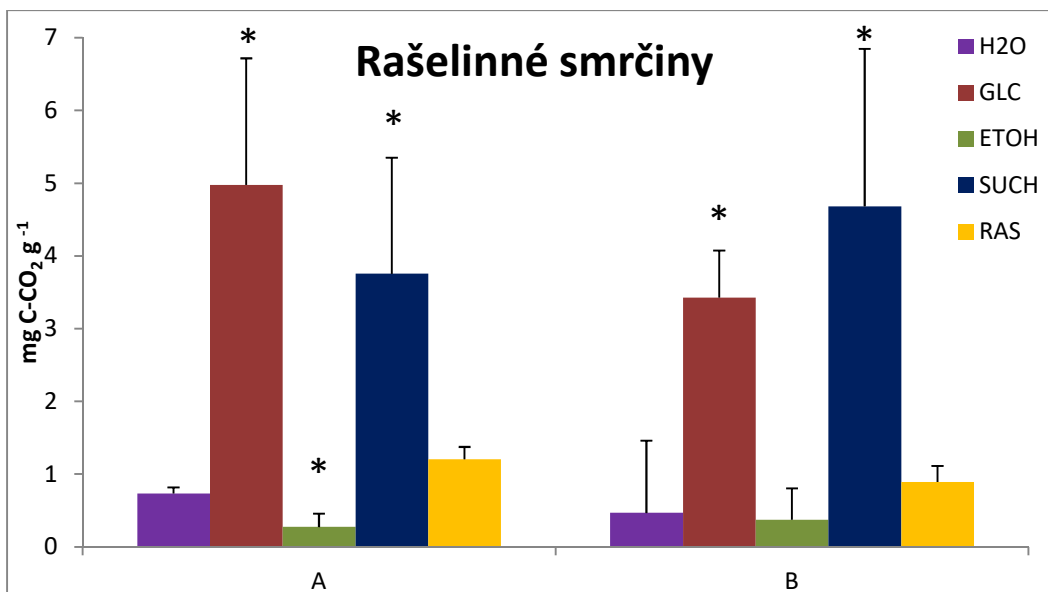
**Obr 7:** Celkový uvolněný C v podobě CH<sub>4</sub> za celou dobu inkubace při přidavku substrátů na revitalizovaných vrchovištích ve svrchní (A) a spodní (B) vrstvě půdy (průměr ± směrodatná odchylka). Hvězdičky nad sloupečky ukazují výsledky Dunnettova testu. Pokud je nad sloupečkem hvězdička, přidavek substrátu průkazně zvýšil produkci ve srovnání s kontrolou (H<sub>2</sub>O), testováno pro každou vrstvu půdy samostatně.



**Obr 8:** Celkový uvolněný C v podobě CH<sub>4</sub> za celou dobu inkubace při přidavku substrátů na revitalizovaných rašelinných smrčínách ve svrchní (A) a spodní (B) vrstvě půdy (průměr ±směrodatná odchylka). Hvězdičky nad sloupečky ukazují výsledky Dunnettova testu. Pokud je nad sloupečkem hvězdička, přidavek substrátu průkazně zvýšil produkci ve srovnání s kontrolou (H<sub>2</sub>O), testováno pro každou vrstvu půdy samostatně.



**Obr 9:** Celkový uvolněný C v podobě CO<sub>2</sub> za celou dobu inkubace při přidavku substrátů na revitalizovaných vrchovištích ve svrchní (A) a spodní (B) vrstvě půdy (průměr ±směrodatná odchylka). Hvězdičky nad sloupečky ukazují výsledky Dunnettova testu. Pokud je nad sloupečkem hvězdička, přidavek substrátu průkazně zvýšil produkci ve srovnání s kontrolou (H<sub>2</sub>O), testováno pro každou vrstvu půdy samostatně.



**Obr 9:** Celkový uvolněný C v podobě CO<sub>2</sub> za celou dobu inkubace při přidavku substrátů na revitalizovaných rašelinných smrčínách ve svrchní (A) a spodní (B) vrstvě půdy (průměr ± směrodatná odchylka). Hvězdičky nad sloupečky ukazují výsledky Dunnetova testu. Pokud je nad sloupečkem hvězdička, přidavek substrátu průkazně zvýšil produkci ve srovnání s kontrolou (H<sub>2</sub>O), testováno pro každou vrstvu půdy samostatně.

V tabulce 5 jsou jednotlivé podíly mezi uhlíkem uvolněným ve formě CH<sub>4</sub> a celkovým uhlíkem uvolněným za celou dobu inkubace. Z tabulky je patrné, že až polovina uhlíku byla uvolněna ve formě CH<sub>4</sub> v případě přidavku etanolu. K mírnému zvýšení podílu CH<sub>4</sub> na celkovém uvolněném ve srovnání s kontrolou došlo v případě přidavku sušeného rašelínku. Ve většině případů představoval uvolněný C-CH<sub>4</sub> pouze jednotky procent z celkového množství uvolněného uhlíku

**Tab. 5:** Podíl uhlíku ve formě C-CH<sub>4</sub> z celkového uvolněného uhlíku za dobu inkubace (50 dnů).

|               | H <sub>2</sub> O | GLC   | ETOH  | SUCH  | RAS   |
|---------------|------------------|-------|-------|-------|-------|
| <b>Vrch A</b> | 0,003            | 0,023 | 0,301 | 0,034 | 0,010 |
| <b>Vrch B</b> | 0,010            | 0,112 | 0,445 | 0,139 | 0,084 |
| <b>Rsm A</b>  | 0,008            | 0,006 | 0,571 | 0,045 | 0,021 |
| <b>Rsm B</b>  | 0,015            | 0,011 | 0,537 | 0,119 | 0,047 |

## 5. Diskuze

### 5.1. Potenciální produkce metanu a počet metanogenů na přirozeném, odvodněném a revitalizovaném rašeliništi

Jedním z hlavních faktorů, kterým je ovlivněn celý proces metanogeneze, je dostupnost substrátu pro metanogeny v anaerobním prostředí. Bylo prokázáno, že dostupnost substrátu klesá s hloubkou (Sergers, 1998). Vlivem odvodnění se rozšíří aerobní vrstva a metanogeni jsou nuceni ustoupit do větší hloubky, kde je menší dostupnost substrátu a tím dojde k poklesu počtu metanogenů a jejich diversity (Yrjälä et al., 2011). Plno studií dokazuje, že revitalizací se metanogeneze obnovuje velmi pomalu a to pravděpodobně úzce souvisí s obnovou původní rašeliništní vegetace (např.: Komulainen et al., 1998; Tuittila et al., 2000; Urbanová et al., 2013; Wilson et al., 2009).

Celkově na přirozené rašelinné smrčíně byla naměřena nejvyšší produkce metanu ve svrchním horizontu ze všech lokalit, což potvrzuje teorii, že rašelinné smrčiny, jakožto zástupci minerotrofních rašelinišť, mají vyšší emise  $\text{CH}_4$  než vrchoviště. Je to díky odlišné vegetaci, kdy na rašelinných smrčínách dominují ostřice, vyšší dostupnosti substrátu a živin a vyššímu pH ve srovnání s vrchovišti (Saarnio et al., 2007).

Odvodnění rašelinišť obecně vede ke snížení emisí  $\text{CH}_4$  (Roulet and Moore, 1995; Komulainen et al., 1998; Nykänen et al., 1998). To je způsobeno pravděpodobně omezením anaerobní zóny, změnami ve vegetačním složení a tedy i v kvalitě organické hmoty vstupující do systému ale i změnami v mikrobiálním společenstvu (Basiliko et al., 2003; Yrjälä et al., 2011; Urbanová and Bárta, 2016).

Mé výsledky měření potenciální produkce metanu na odvodněných rašeliništích potvrzují dosavadní poznatky, tedy pokles produkce  $\text{CH}_4$  po odvodnění. Avšak je zde patrný rozdíl mezi vrchovišti a rašelinnou smrčínou. Kdy na vrchovištích byla negativně ovlivněna produkce metanu odvodněním především ve spodním horizontu, zatímco ve svrchním horizontu jsou změny v produkci  $\text{CH}_4$  minimální. Jiná situace byla zjištěna na rašelinných smrčínách, kde je naopak pokles produkce  $\text{CH}_4$  na odvodněných lokalitách velmi výrazný a v mnoha vzorcích nebyla naměřena žádná produkce  $\text{CH}_4$ . Především v povrchové vrstvě rašeliny, kde je na přirozených smrčínách produkce  $\text{CH}_4$  nejvyšší, je tento trend dobře patrný. Svrchní vrstva rašeliny je nejvíce ovlivněná poklesem hladiny podzemní vody než hlubší vrstvy. Pokles potenciální produkce  $\text{CH}_4$  není pravděpodobně způsoben jen poklesem

hladiny podzemní vody ale i změnou vegetace a sníženou kvalitou substrátu. Pokud klesne hladina podzemní vody, rozšíří se aerobní vrstva, kde začne probíhat aerobní dekompozice a tedy pouze méně kvalitní, těžko rozložitelný substrát se dostane až do anaerobní vrstvy (Basiliko et al., 2003). Po odvodnění dochází k ústupu původních druhů rašeliništních rostlin, a tím dochází ke změně kvality a kvantity opadu (Straková et al., 2010). Zároveň můžeme předpokládat, že se změnami, které probíhají v rašeliništi po odvodnění, dojde i ke změnám ve složení a aktivitě různých mikrobiálních skupin, na jejichž činnosti jsou metanogeny závislé (Urbanová and Bárta, 2016).

Ve vzorcích z revitalizovaných rašelinišť jsem sice zaznamenala zvýšení produkce metanu oproti odvodněným plochám, ale přesto je stále velmi nízká oproti přirozeným plochám. Například na rašelinných smrčínách ve spodním horizontu je produkce  $\text{CH}_4$  skoro stejně nízká jako na odvodněných plochách i téměř 10 let po revitalizaci. To ukazuje na velmi pomalou obnovu přirozené produkce  $\text{CH}_4$  po revitalizaci rašelinišť. Plno studií spojuje nárůst emisí  $\text{CH}_4$  po revitalizaci s šířením původních rašeliništních druhů rostlin (Tuittila et al., 2000; Komulainen et al. 1998). Pro obnovu původních procesů na rašeliništi, tedy i toků metanu je tedy pravděpodobně potřeba obnovení původní vegetační struktury. Na některých revitalizovaných rašeliništích, která byla zemědělsky využívána, byl zaznamenán extrémní nárůst emisí  $\text{CH}_4$  v prvních letech po revitalizaci. To však bylo způsobeno extrémním přísunem čerstvé organické hmoty po odumření původní suchomilné vegetace (Hahn-Schöfl et al., 2010).

Odvodnění po desítky let neovlivňuje pouze aktivitu ale i diversitu a početnost metanogenů (Basiliko et al., 2003). Mé výsledky ukazují, že nejvyšší počty metanogenů se vyskytují ve spodních horizontech přirozených rašelinných smrčín i vrchovišť. Na odvodněných lokalitách rašelinných smrčín i vrchovišť jsou počty metanogenů nižší ve srovnání s nenarušenými plochami, avšak ne vždy statisticky průkazné, opět kvůli velké variabilitě především ve vzorcích vrchovišť. Stejně tak Yrjälä et al. (2011) ve svých studiích ukazují, že v odvodněných lokalitách klesá diversita a početnost metanogenů. K podobným výsledkům došla i Urbanová et al. (2013), kde bylo zjištěno, že vlivem odvodnění klesá diversita i početnost metanogenů ve srovnání s přirozenými místy. Také jejich výsledky dokazují, že změny jsou více viditelné na minerotrofních rašeliništích než na vrchovištích. Práce Urbanová and Bárta (2016) dokazuje vliv biochemických vlastností rašeliny na mikrobiální společenstvo. Studie ukazuje pokles počtu a diversity metanogenů na odvodněných rašeliništích. Dlouhodobé odvodnění vede k poklesu pH a zvýšení objemové

hmotnosti rašeliny, které vede ke snížení mikrobiální aktivity. Naopak na revitalizovaných plochách jsem zaznamenala zcela evidentní nárůst počtu metanogenů. Dokonce nejvyšší počet metanogenů byl naměřen ve vzorcích z revitalizovaného vrchoviště. To, že počet metanogenů nekoresponduje s produkcí metanu, ukazuje fakt, že revitalizované plochy mají podobné počty metanogenů jako přirozené lokality, ale potenciální produkce CH<sub>4</sub> na těchto revitalizovaných plochách zůstává nízká. Z toho lze vyvodit, že na revitalizovaných plochách jsou metanogenní společenstva co do počtu obnovena, ale jejich aktivita je stále něčím limitována pravděpodobně dostupností substrátu. Rašelina po odvodnění se stává kompaktnější a zvětšuje svojí objemovou hmotnost. Vysoká objemová hmotnost a nízká bazální respirace v odvodněných rašeliništích ukazuje, že všechen snadno dostupný substrát už byl rozložen (Glatzel et al., 2003). Po revitalizaci trvá i několik desetiletí, než se nahromadí nová vrstva rašeliny, kde bude dostatek snadno dostupného substrátu pro mikroorganismy a obnoví se původní funkce svrchní vrstvy rašeliny. Aktivita metanogenů může být ovlivněna pH, které klesá po odvodnění. pH je jeden z nejdůležitějších faktorů, který ovlivňuje mikrobiální diversitu a aktivitu ale i složení vegetace. Když po odvodnění klesá pH současně se změní složení vegetace a následně kvality opadu a tím se mění i dostupnost substrátu pro metanogeny. Po revitalizaci ještě je pH stále nízké oproti přirozeným lokalitám, což může metanogenezi ovlivňovat (Peltoniemi et al., 2012). Tento efekt je patrný i z rozdílů mezi rašelinnými smrčínami a vrchovišti, kdy na vrchovištích jsou celkově nižší hodnoty pH a rovněž potenciální produkce metanu je nižší než na rašelinných smrčínách.

## *5.2. Anaerobní produkce CO<sub>2</sub> na přirozených, odvodněných a revitalizovaných rašeliništích*

Podle anaerobní potenciální produkce CO<sub>2</sub> můžeme zjistit, kolik je v rašeliništi okamžitě dostupného organického substrátu z rašeliny nebo čerstvé organické hmoty a odráží tedy i aktivitu mikroorganismů. Anaerobní produkce CO<sub>2</sub> je celkově vyšší ve svrchním horizontu než ve spodním a to jak na rašelinných smrčínách, tak na vrchovištích. Vyšší anaerobní produkci CO<sub>2</sub> ve svrchním horizontu než ve spodním zjistili také Hahn-Schöfl et al. (2011). Je tomu pravděpodobně proto, že ve svrchních vrstvách se nachází čerstvý rostlinný materiál, který je přístupnější dekompozici. Na vrchovištích i rašelinných smrčínách ve svrchním horizontu byly nejvyšší hodnoty anaerobní produkce CO<sub>2</sub> na přirozených lokalitách. Můžeme to vysvětlit tím, že rašelina přirozených lokalit obsahuje velké množství dostupného uhlíku. Naopak na dlouhodobě odvodněných a i revitalizovaných rašeliništích jsem naměřila nižší produkci CO<sub>2</sub> ve srovnání s přirozenými a to především ve svrchním



horizontu rašeliny. Za desetiletí odvodnění rašelinišť se prakticky veškerá hmota, která se mohla snadno rozložit, již rozložila a zbyl pouze těžko dostupný substrát pro mikroorganismy, proto byly naměřeny nízké hodnoty produkce CO<sub>2</sub> (Glatzel et al., 2003). Krátce po revitalizaci převládá na rašeliništích hůře rozložitelný opad z dominantních keříčků a jehličnanů. Postupně se po revitalizaci vracejí původní druhy rostlin (např. rašelínky, ostřice, suchopýry) a s nimi se obnovují původní procesy a dostupnost substrátu pro mikroorganismy. To můžeme pozorovat na revitalizovaných rašelinných smrčínách ve svrchním horizontu, kde byla naměřena vyšší produkce CO<sub>2</sub>, protože zde se už začali šířit rašelínky a suchopýry, které jsou zdrojem dostupnějšího substrátu. Ve spodním horizontu zatím nevidíme výrazné změny, ty ale očekáváme, až se nahromadí postupem času větší vrstva rašeliny. Na revitalizovaných smrčínách je anaerobní produkce CO<sub>2</sub> vyšší než na odvodněných ve svrchním horizontu, ale nižší než na přirozených. Tento trend v mikrobiální aktivitě může do jisté míry souviset i s diverzitou mikrobiálního společenstva, která byla také popsána nejvyšší na přirozených a nejnižší na odvodněných minerotrofních rašeliništích (Urbanová a Bárta, 2016).

### *5.3. Produkce CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> z revitalizovaných rašelinišť po přidavku různých substrátů*

Produkce CH<sub>4</sub> je závislá na okamžité dostupnosti čerstvých a energeticky bohatých substrátů, která se snižuje s hloubkou stejně jako dostupnost organické hmoty (Segers, 1998). Na odvodněných, vytěžených a opuštěných rašeliništích je extrémně nízká produkce CH<sub>4</sub>. Dá se to vysvětlit tím, že rašelina na těchto místech je hodně rozložená a chybí zde dostupnost čerstvých rostlinných zbytků a kořenových exsudátů jako substrátu pro metanogeny (Tuittila et al., 2000). Největší hodnoty produkce CH<sub>4</sub> naměřil Glatzel et al. (2004) po revitalizaci ve vzorcích z vrchní vrstvy s čerstvě nahromaděnou rašelinou na místech, kde byla vysoká hladina podzemní vody. Všechny tyto studie poukazují na klíčovou roli substrátu pro metanogenezi.

Mé výsledky ukazují, že přidavkem substrátu byla metanogeneze podpořena v každém typu vzorku ve srovnání s kontrolou (H<sub>2</sub>O). To ukazuje, že metanogeni jsou v rašelině revitalizovaných ploch přítomní a pokud mají dostupný substrát, jejich aktivita narůstá. K průkaznému zvýšení produkce CH<sub>4</sub> došlo v případě přidavku suchopýru, glukózy a rašelínku pouze ve spodním horizontu na vrchovišti. V případě etanolu došlo k průkaznému zvýšení produkce CH<sub>4</sub> na vrchovišti i rašelinné smrčíně v obou horizontech. Ve studii Godin et al. (2012) dokazovali důležitost dostupného substrátu pro metanogenezi také přidavkem

etanolu (etanol je přeměněn na  $H_2$  a acetát fermentativními bakteriemi). Přídavek etanolu významně podpořil produkci  $CH_4$  po 30 dnech inkubace. Etanol podpořil metanogenezi nejvíce ze všech substrátů ve všech případech a to lze vysvětlit tím, že v dekompozičním řetězci jsou metanogeni až na posledním místě. Etanol je využíván mikroorganismy v podstatě v předposledním kroku dekompozičního řetězce a produkty jeho rozkladu jsou zdrojem substrátu přímo pro metanogeny. Etanol je tedy v dekompozičním procesu jen krok před metanogeny, takže je prakticky rovnou pro ně k dispozici a není spotřebován jinými mikroorganismy (Hines et al., 2008). V případě ostatních substrátů došlo ke zvýšení produkce  $CH_4$ , ale ne tolik jako v případě přídavku etanolu. Komplexní substrát, který jsem dodala ve formě substrátu z rašeliníku a suchopýru, využívají nejprve mikroorganismy, kteří jsou v dekompozičním řetězci nad metanogeny na rozdíl od etanolu (Garcia et al., 2000). Pokud bylo dodáno stejné množství uhlíku v případě etanolu i sušených substrátu, je jasné, že v případě etanolu je téměř všechno využito metanogeny. Při srovnání potenciální produkce  $CH_4$  na přirozených lokalitách s potenciální produkcí na revitalizovaných po přídavku sušených rašeliníků a ostríc vidíme, že tyto substráty podpořily ve všech případech metanogenezi na přibližně stejné hodnoty jako na přirozených lokalitách. Toto dokazuje, že po rozvinutí vegetace na revitalizovaných plochách se produkce metanu pravděpodobně ustálí na hodnotách přirozených lokalit. Zajímavý výsledek byl naměřen při přídavku suchopýru a rašeliníku na revitalizované rašelinné smrčíně, kdy vyšší potenciální produkce  $CH_4$  byla stanovena u přídavku suchopýru. Očekávala jsem, že nejvíce podpoří potenciální produkci  $CH_4$  suchopýr, protože je v literatuře často uváděn jako rostlina, která významně přispívá k vyšším emisím  $CH_4$ . Závěrem můžeme z tohoto usoudit, že na revitalizovaných lokalitách, jsou metanogeni stále ještě limitováni dostupností substrátu a pravděpodobně i aktivitou ostatních anaerobních mikroorganismů, kteří většinu dostupného substrátu využijí. Zároveň tyto výsledky ukazují, že se na těchto typech revitalizovaných rašeliništ' nemusíme obávat extrémního nárůstu emisí metanu po revitalizaci.

Kvalita substrátu může mít velký vliv na dekompozici na rašeliništích (Straková et al., 2012). Zjistila jsem, že anaerobní produkce  $CO_2$  je vyšší na přirozených lokalitách než na revitalizovaných podobně jako v mnoha studiích (Urbanová et al., 2011; Andersen et al., 2006; Basiliko et al., 2007). Na přirozených místech je velká vrstva nerozloženého substrátu, která podporuje vysokou mikrobiální aktivitu na rozdíl od dlouhodobě odvodněných a relativně krátce revitalizovaných rašeliništ'. Stejně Yrjälä et al. (2011) pozorovali nižší diversitu a početnost metanogenů na odvodněných rašeliništích než na přírodních lokalitách.

Studie Urbanová a Bárta (2016) ukazuje stejné výsledky početnosti mikroorganismů na odvodněných lokalitách jako mé. To ukazuje opět na limitaci mikroorganismů dostupností substrátu na člověkem ovlivněných rašeliništích. Přídavek substrátu podpořil produkci CO<sub>2</sub> u všech vzorků. Anaerobní produkci CO<sub>2</sub> podpořil namletý rašeliník a namleté ostřice ve srovnání s kontrolou (H<sub>2</sub>O), z čehož můžeme usoudit, že tento substrát byl přednostně mikroorganismy rozložen na CO<sub>2</sub> a k metanogenům se moc produktů rozkladu tohoto substrátu nedostalo. Dále přídavek glukózy se projevil průkazným zvýšením anaerobní produkce CO<sub>2</sub> ve všech případech. Opačný efekt na anaerobní produkci CO<sub>2</sub> měl přídavek etanolu, který vedl ke snížení produkce CO<sub>2</sub> ve srovnání s kontrolou (H<sub>2</sub>O), z toho vyplývá, že etanol není příliš využíván ostatními mikroorganismy, ale je substrátem pro metanogeny (Hines et al., 2008). Bakterie, produkující etanol jsou například *Clostridium aceticum*, *acetobacterium wodii* a *Clostridium Ljundahlii*. Dále je etanol fermentativními bakteriemi zpracován na acetát, který už metanogeni umí využít jako substrát (Le Mer and Roger, 2001). Bakterie produkují etanol v anaerobních podmínkách a jsou součástí fermentačního řetězce (Kellum and Drake, 1984). Tyto výsledky potvrzuje přepočít v tabulce 3, kde je dle podílů uhlíku uvolněného ve formě C-CH<sub>4</sub> z celkového uvolněného uhlíku za dobu inkubace vidět, že v případě etanolu se polovina uhlíku uvolnila ve formě metanu.

Rašeliník i ostřice podpořili produkci CH<sub>4</sub>, tedy můžeme předpokládat, že jejich šíření na revitalizovaných lokalitách a hromadění jejich opadu povede k pomalé obnově přirozených dekompozičních procesů a tedy i produkci metanu na rašeliništích. Přestože je metan skleníkový plyn, jeho emise jsou přirozenou součástí všech rašelinišť. Emise metanu na rašeliništích jsou obecně nízké a v rámci uhlíkové bilance těchto ekosystémů rozhodně nepřevažují nad akumulací CO<sub>2</sub> do rašelinišť (Le Mer and Roger, 2001).

## 5. Závěry

- Management má zásadní vliv na potenciální produkci metanu. Na přirozených lokalitách byla zaznamenána nejvyšší potenciální produkce metanu a naopak na odvodněných lokalitách nejnižší. Na revitalizovaných lokalitách se produkce metanu mírně zvýšila ve srovnání s odvodněnými, ale zároveň nedosahuje takové produkce, jaká je na přirozených lokalitách.
- Po stanovení počtu metanogenů na gram suché půdy, můžeme usuzovat, že potenciální produkce metanu nezávisí na počtu metanogenů v půdě. Na revitalizovaných lokalitách byly stanoveny podobné počty metanogenů jako na přirozených, v případě vrchovišť dokonce více metanogenů na revitalizovaných lokalitách než na přirozených. Toto zjištění ukazuje, že počet metanogenů není určující pro produkci metanu a že metanogeni jsou na revitalizovaných plochách limitováni pravděpodobně nízkou dostupností substrátu.
- Přídavek substrátu podpořil metanogenezi v každém případě ve srovnání s kontrolou ( $H_2O$ ). Etanol podpořil metanogenezi nejvíce, což svědčí o tom, že pokud je snadno dostupný substrát, produkce metanu se zvýší. Naopak komplexní substráty jako sušený rašeliník a ostrice metanogenezi podpořili méně, jelikož je využívají primárně ostatní mikroorganismy, což vidíme z výsledku anaerobní produkce  $CO_2$ . Potenciální produkce  $CH_4$  po přidavku těchto substrátů z rostlin charakteristických pro přirozená rašeliniště se zvýšila na úroveň srovnatelnou s přirozenými lokalitami.
- Až se na revitalizovaných plochách rozšíří původní rašeliníšní druhy (suchopýr, rašeliník), tak bude metanogeneze pravděpodobně dosahovat zase přirozených hodnot. Nemusíme se obávat extrémního nárůstu emisí metanu z revitalizovaných rašelinišť.
- Stanovení metanogeneze a počtu metanogenů by se mohly využít pro vyhodnocování úspěšnosti revitalizace rašelinišť.

## 6. Literatura

- Aerts R., van Lotestijn R. S. P., Karlsson P. S. 2006. Nitroen supply differentially affects litter decomposition rates and nitroen dynamics of sub-arctic bo species. *Global Change Biol.* 146: 652-658.
- Abram J. W., Nedwell D. B. 1978. Inhibition of methanogenesis by sulfate reduction bacteria competing for transferred hydrogen. *Arch. Microbiol* 117: 89-92.
- Andersen R., Francez A. J., Rocherfort L. 2006. The physicochemical and microbiological status of restored bog in Québec: Identification of relevant kriteria to monitor success. *Soil Biology and Biochemistry* 38: 1375-1387.
- Aselman I., Crutzen P. J. 1989. Global distribution of natural freshwater wetlands and rice paddies, their net primary productivity, seasonality and possible methane emissions. *Journal of Atmospheric chemistry* 8: 307-358.
- Basiliko N., Knowles R., Moore T. R. 2004. Role of moss species and habitat in methane consumption potential in northern peatland. *Wetlands* 24: 178-185.
- Basiliko N., Blodau C., Roehm C., Bengtson P., Moore T. R. 2007. Regulation of decomposition and methane dynamics across natural, commercially mined, and restored northern peatlands. *Ecosystems* 10, 1148-1165.
- Basiliko N., Yavitt J. B., Dees P. M., Merkel S. M. 2003. Methane biogeochemistry and methanogens communities in two northern peatland ecosystems, New York State. *Geomicrobioloy Journal* 20: 563-577.
- Bortoluzzi, E., Epron, D., Siegenthaler, A., Gilbert, D. and Buttler, A. 2006. Carbon balance of European mountain bog at contrasting stages of regeneration. *New Phytologist* 172: 708-718.
- Boone D. R. 1991. Ecology of methanogenesis. *Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases: Methane, Nitrogen Oxides.* (Rogers JE, Whitman WB). American Society for Microbiology. 57-70.
- Boone D. R. 2000. Biological formation and consumption of methane. In *Atmospheric Methane: Its Role in the Global Environment.* Springer – Verlag, Berlin Heidelber: 42-62.

- Chanton, J. P. and Whiting, G. J. 1995. Trace gas exchange in freshwater and coastal marine environments: Ebullition and transport by plants. In Matson, P. A and Harriss, R. C. (eds.) *Biogenic Trace Gases: Measuring Emissions from Soil Water*. Blackwell, Oxford. p. 98-125.
- Conrad, R. 1999. Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28(3): 193-202.
- Conrad R., Lupton F. S., Zeikus J. G. 1987. Hydrogen metabolism and sulfate-dependant inhibition of methanogenesis in a eutrophic lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* (45): 107-115.
- Conrad R. (2009). "The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environ Microbiol Rep* 1(5): 285-292.
- Couteaux M. M., Bottner P., Berg B. 1995. Litter decomposition, climate and litter quality. *Trends Ecol. Evol.* 10, 63-66.
- Dacey J. W. H., Drake B. G., Klug M. J. 1994. Stimulation of methane emission by carbon dioxide enrichment of marsh vegetation. *Nature* 370: 47-49.
- Dedysh, S. N. 2002. Methanotrophic bacteria of acidic Sphagnum peat bogs. *Microbiology*, 71 (6), 638-650.
- Dunfield P., Knowles R., Dumont R., Moore T. R. 1993. Methane production and consumption in temperate and subarctic peat soils – response to temperature and pH. *Soil Bol. Biochem.* (25): 321-326.
- Foster D. R. and Wright H. E. 1990. Role of ecosystem development and climate change in bog formation in Central Sweden. *Ecology* 71: 450-463.
- Garcia, J. L., Patel, B. K. C. and Ollivier, B. 2000. Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic *Archaea*. *Anaerobe.* 6(4): 205-226.
- Glatzel S., Basiliko N., Moore T. 2004. Carbon Dioxide and methane production potentials of fens from natural, harvested and restored sites, Eastern Québec, Canada. *Wetland* 24: 261–267.
- Glatzel S., Kalbitz K., Dalva M., Moore T. 2003. Dissolved organic matter properties and their relationship to carbon dioxide flux from restored peat bogs. *Geoderma* 113: 397-411.

- Godin A., McLauhlin J. W., Webster K. L., Packalen M., Basiliko N. 2012. Methane and methanogen community dynamics across a boreal peatland nutrient gradient. *Soil Biology and Biochemistry* 48: 96-105.
- Greenup A. L., Bradford M A, McNamara N P, Ineson P and Lee J A. 2000 The role of *Eriophorum vaginatum* in CH<sub>4</sub> flux from an ombrotrophic peatland. *Plant Soil* 227: 265–272.
- Hahn-Schöfl M., Zak D., Minke M., Gelbrecht J., Augustin J., Freibauer A. 2010. Organic sediment formed during inundation of a degraded fen grassland emits large fluxes of CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub>.
- Hales B. A., Edwards C., Ritchie D. A., Hall G., Pickup R. W., Saunders J. R. 1996. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Appl. Environ. Microb.* 62: 668-675.
- Hanson, R. and Hanson, T. (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 60, 439-471.
- Hines M. E., Duddleston K. N., Rooney-Varga J. N., Fields D., Chanton J. P. 2008. Uncoupling of acetate degradation from methane formation in Alaskan wetlands: connections to vegetation distribution. *Global Biogeochemical Cycles* 22.
- Holzappel-Pschorn A., Conrad R., Seiler W. 1986. Effects of vegetation on the emission of methane from submerged paddy soil. *Plant and soil* 92 (2): 223-233.
- Horn M. A., Matthies C., Küsel K., Schramm A., Drake H. L. 2003. Hydrogenotrophic methanogenesis by moderately acid-tolerant methanogens of a methane-emitting acidic peat. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 74-83.
- Huttunen, J. T., Nykänen, H., Turunen, J., & Martikainen, P. J. (2003). Methane emissions from natural peatlands in the northern boreal zone in Finland, Fennoscandia. *Atmospheric Environment* 37(1), 147-151.
- Jones, W. J., Nagle, D. P., Whitman, W. B. 1987. Methanogens and the diversity of archaeobacteria. *Microbiol. Rev* 51 (1), 135-177.
- Joabsson, A., Christensen, T. R., Whalen, B. 1999. Vascular plant controls on methane emissions from northern peatforming wetlands. *Trend. Ecol. Evol.* 14(10): 385-388.

- Joosten H. and Clarke D. 2002. Wise use of mires and peatlands. International Mire Conservation Group and International Peat Society.
- Joulian C., Escoffier S., Le Mer J., Neue H. U., Roger P.A. Populations and potential activities of methanogens and methanotrophs in ricefield: Relations with soil properties. *Eur. J. Soil. Biol.* 33: 105-116.
- Juottonen H., Hynninen A., Nieminen M., Tuomivirta T.T., Tuittila E. S., Nousiainen H., Fritze H. 2012. Methane-cycling microbial communities and methane emission in natural and restored peatlands. *Applied and environmental microbiology* 17: 6386-6389.
- Kamal, S. and Varma, A. 2008. Peatland mikrobiology. In Dion, P. and Nautiyal, C. S. (eds.) *Microbiology of Extreme Soils. Soil Biology* 13. Springer – Verlag, Berlin Heidelberg. pp. 177-203.
- Kellner, E., Waddington, J. M., Price, J. S. 2005. Dynamics of biogenic gas bubbles in peat: Potential effects on water storage and peat deformation. *Watwr Resour. Res* 41: WO8417
- Kellum R., Drake H. L. 1984. Effect of cultivation gas phase on hydrogenase of the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol* 160: 466-469.
- Kettunen A., Kaitala V., Lehtinen A., Lohila A., Alm J., Silvola J., Martikainen P. J. 1999. Methane production and oxidation potentials in relation to water table fluctuations in two boreal mires. *Soil Biol Biochem* 31: 1741–1749.
- Kludze H. K., Delaune R. D. 1995. Gaseous exchange and wetland plant-response to soil redox intensity and capacity. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* (59): 939-945.
- Kludze H. K., Delaune R. D., Patrick W. H. 1993. Aerenchyma formativ and methane and oxygen exchange in rice. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* (57): 386-391.
- Komulainen V. M., Nykänen H., Martikainen P. J., Laine J. 1998. Short term effect of restoration on vegetation change and methane emissions from peatlands drained for forestry in Southern Finland. *Canadian Journal of Forest Research- Revue* 28: 402-411.
- Kuzyakov Y., Domanski G. 2000. Carbon input by plants into the soil. *J. Plant Natur. Soil. Sci.* 163: 421-431.



- Laiho R., Vasander H., Penttilä T., Laine J. 2003. Dynamics of plant-mediated organic matter and nutrient cycling following long-term water-level drawdown in boreal peatlands. *Glob Biogeochem Cy* 17: 1053.
- Larmola T., Tuitila E. S., Tiirola, M., Nykänen H., Martikainen P. J. m Yrjälä K., Tuomivirta T., Fritze H. 2010. The role of *Sphagnum moses* in the methane cycling of a boreal mire. *Ecology*, 91 (8), 2356-65.
- Le Mer, J. and Roger, P. 2001. Production, Oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *Eur. J. Soil. Biol.* 37(1): 25-50.
- Lovley, D. R. and Phillips, E. J. P. 1986. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 683—689.
- Lueders, T., Chin, K. j., Conrad, R., Friedrich, M. 2001. Molecular analyse sof methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (mrcA) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of novel archem lineage. *Environ. Microbiol.*3: 194-204.
- Maanavilja L., Riutta T., Aurela M., Pulkkinen M., Laurila T., Tuitila E-S. 2011. Spatial variation in CO<sub>2</sub> exchange at a northern aapa mire. *Biogeochemistry* 104: 325-345.
- Minkinen K., Vasander H., Jauhiainen S., Karisto M., Laine J. 1999. Post-drainage changes in vegetation composition and carbon balance in Lakkaqsuo mire, Central Finland. *Plant and Soil* 207: 107-120.
- Moore T. R., Knowles R. 1990. Methane emissions from fen, bog and swamp peatlands in Québec. *Biogeochemistry* 11: 45-61.
- Murrell, J. C., Gilbert, B., McDonald, I. R. 2000. Molecular biology and regulation of methane monooxygenase. *Archives of microbiology*, 173(5-6), 325-332.
- Nykänen H., Alm J., Silvola J., Tolonen K., Martikainen P. J. 1998. Methane fluxes on boreal peatlands of different fertility and the effect of long-term experimental lowering of the water table on flux rates. *Glob Biogeochem Cy* 12: 53–69.
- Olde Venterink H., Davidson T. E., Kiehl K., Leonardson L. 2002. Impact of drying and rewetting on N, P and K dynamics in a wetlands soil. *Plant Soil* 243: 119-130.
- Ponnamperuma F. N. 1972. The chemistry of submerged soils. *Adv. Agronom.* 24: 29–96,.

- Peltoniemi K., Straková P., Fritze H., Iráñez P. A., Pennanen T., Laiho R. 2012. How water-level drawdown modifies litter-decomposing fungal and actinobacterial communities in boreal peatlands. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 1902-1914.
- Price J. S., Heathwaite A. L., Baird A. J. 2003. Hydrological processes in abandoned and restored peatlands an overview of management approaches. *Wetlands Ecology and Management* 11: 65-83.
- Reddy K. R., DeLaune R. D. 2008. *Biogeochemistry of wetlands: science and applications*. CRC press.
- Rocheffort L., Quinty F., Campeau S., Hohnson K., Maltere T. 2003. North American approach to the restoration of Sphagnum-dominated peatlands. *Wetlands Ecology and Management* 11: 97-107.
- Roulet N. T., Moore T. R. 1995. Methane emissions from Canadian peatlands. *Soils and global change*: 153-164.
- Rydin, H., Jeglum, J. 2006. *The Biology of Peatlands*. Oxford University Press. 343 pp.
- Saarnio S., Alm J., Martikainen P. J. and Silvola J. 1998. Effects of raised CO<sub>2</sub> on potential CH<sub>4</sub> production and oxidation in, and CH<sub>4</sub> emission from, a boreal peat. *J. Ecol.* 86, 261–268.
- Saarnio S., Morer M., Shurpali N. J., Tuittila E.-S., Mäkilä M., Alm J. 2007. Annual CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> fluxes of pristine boreal mires as a background for the lifecycle analyse of peat energy. *Boreal Environmental Research* 12: 101- 113.
- Saarnio S., Wittenmayer L., Merbach W. 2004. Rhizospheric exudation of *E. Vaginatium* L. – Potential link to methanogenesis. *Plant and Soil* 267: 343 – 355.
- Schönheit P., Keweloh H., Thauer R. K. 1981. Factor F<sub>420</sub> degradation in *Methanobacterium thermoautotrophicum* during exposure to oxygen. *FEMS Microbiol. Lett.* 12: 347-349.
- Segers, R. 1998. Methane production and methane consumption: A review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry*, 41 (1), 23-51.
- Sommers L. E., Nelson D. W. 1972. Determination of total phosphorus in soil: a rapid perchloric acid digestion procedure. *Soil Science of America Journal* 36: 902-904.

- Springer E., Sachs M. S., Woese Cyasy. R., Boone D. R.. 1995. Partial gene sequences for the A subunit of methyl-coenzyme M reductase (mcrI) as a phylogenetic tool for family Methanosarcinaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol* 45: 554-559.
- Strack, M. 2008. Peatlands and Climate Change. International Peat Society. 227 pp.
- Straková P., Anttila J., Spetz P., Kitunen V., tapanila T., Laiho R. 2010. Litter quality and its response to water level drawdown in boreal peatlands at plant species and community level. *Plant and Soil* 335: 501-520.
- Straková P., Penttilä T., Laine J., Laiho R. 2012. Disentangling direct and indirect effects of water table drawdown on above and belowground plant litter decomposition: Consequences for accumulation of organic matter in boreal peatlands. *Global Change Biology* 18: 322-335.
- Sundh, I., Nilsson, M., Granberg, G., Svensson, B. 1994. Depth distribution of microbial production and oxidation of methane in northern boreal peatlands. *Microbial Ecology*, 27, 253-265.
- Teh Y. A., Dubinsky E. A., Silver W. L., Carlson C. M. 2008. Suppression of methanogenesis by dissimilatory Fe (III)- reducing bacteria in tropical rain forest soils: implications for ecosystem methane flux. *Global Change Biol* 14: 413-422.
- Tokida T., Miyazaki T., Mizoguchi M., Nagata O., Takakai F., Kagemoto A., Hatano R. 2007. Falling atmospheric pressure as a trigger for methane ebullition from peatland. *Glob. Biogeochem. Cy.* 21: GB2003
- Tuittila E. S., Komulainen V. M., Vasander H., Nykänen H., Martikainen P. J., Laine J. 2000. Methane dynamics of a restored cut-away peatland. *Global Change Biology* 6: 569-681.
- Urbanová Z., Bárta J., Pícek T. 2013. Methane Emissions and Methanogenic Archaea on Pristine, Drained and Restored Mountain Peatlands, Central Europe. *Ecosystems* 16: 664-677.
- Urbanová Z., Bárta J. 2016. Effects of long-term drainage on microbial community composition vary between peatland types. *Soil Biology and Biochemistry* 92: 16-26.

- Urbanová Z., Pícek T., Bárta J. 2011. Effect of peat re-wetting on carbon and nutrient fluxes, greenhouse gas production and diversity of methanogenic archaeal community. *Ecological Engineering* 37: 1017-1026.
- Waddington J., Day S. M. 2007. Methane emissions from peatland following restoration. *Journal of Geophysical Research- Biogeosciences* 112: G03018.
- Waddington J., Rotenberg P. A., Warren F. J. 2001. Peat CO<sub>2</sub> production in a natural and cutover peatland: implication for restoration. *Biogeochemistry* 54: 115-130.
- Wain R, W. 1973. Biological flora of the British Isles. *Eriophorum Vaginatum* L. *J. Ecol.* 61, 601-615.
- Ward D. M., Winfrey M. R. 1985. Interactions between methanogenic and sulfate-reducing bacteria in sediments. *Adv Aquat Microbiol* 3, 141–179.
- Wardle D. A., Walker L. R., Bardgett R. D. 2004. Ecosystem properties and forest decline in contrasting long-term chronosequences. *Science* 305: 509-513.
- Whalen, S. C. 2005. Biogeochemistry of methane exchange between natural wetlands and the atmosphere. *Environ. Eng. Sci*, 22 (1), 73-94.
- Wilson D., Alm J., Laine J., Byrne K. A., Farrell E. P., Tuittila E.-S. 2009. Rewetting of cutway peatlands: Are we re-creating hot spot of methane emissions? *Restoration Ecology* 17: 796-806.
- Walter, B. and Heimann, M. 2000. A process-based, climate-sensitive model to derive methane emissions from natural wetlands: Application to five wetland sites, sensitivity to model parameters, and climate. *Glob. Biogeochem. Cy.*, 14 (3): 745-765.
- Yrjälä K., Tuomivirta T., Juottonen H., Putkinen A., Lappi K., Tuittila A. S., Penttilä T., Minkkinen K., Laine J., Peltoniemi K., Fritze H. 2011. CH<sub>4</sub> production and oxidation process in a boreal fen ecosystem after long-term water table breakdown. *Global Change Biology* 17: 1311-1320.