

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

# **Diplomová práce**

**2017**

**Bc. Adéla Kráčmarová**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Množství a diverzita metanotrofních bakterií v rašeliništích v závislosti na typu rašeliniště, rostlinném opadu a odvodnění**

Diplomová práce

**Bc. Adéla Kráčmarová**

Školitel: Ing. Jiří Bárta, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Petra Straková, D.Sc.

České Budějovice 2017

Kráčmarová, A., (2017): Množství a diverzita metanotrofních bakterií v rašeliništích v závislosti na typu rašeliniště, rostlinném opadu a odvodnění. [Quantity and diversity of methanotrophic bacteria in peatlands depending on types of peatland, litter type and drainage. Mgr. Thesis, in Czech.] – 37 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace**

Tato diplomová práce pojednává o charakteristice metanotrofních bakterií a jejich významu v rašeliništích. Zástupci těchto mikroorganismů jsou schopni oxidovat většinu vzniklého metanu na oxid uhličitý, který je následně uvolňován do atmosféry. Metanotrofní bakterie vyžadují pro oxidaci metanu přítomnost kyslíku, ale některé druhy jsou schopné žít i v anoxické zóně. Cílem této práce je porovnání vlivu odvodnění, typu rostlinného opadu a hloubky na množství a zastoupení metanotrofních bakterií v různých typech rašelinišť (slatiništi a vrchovišti).

### **Annotation**

This master thesis deals with the characteristics of methanotrophic bacteria and their importance in peatlands. The members of these microorganisms are able to oxidize most of methane to carbon dioxide which is released to the atmosphere. Methanotrophic bacteria require the presence of oxygen for the oxidation of methane, but some species are able to live in the anoxic zone. The aim of this study is the comparison of effects of drainage, type of litter type and soil depths on the quantity and representation of methanotrophic bacteria in different types of peatlands (fen and bog).

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.

## **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Ing. Jiřímu Bártovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost, cenné rady a připomínky během psaní mé diplomové práce. Chtěla bych také poděkovat Mgr. Haně Petráskové za rady, trpělivost a pevné nervy při práci v laboratoři a školitelce Mgr. Petře Strakové, D.Sc. za poskytnuté vzorky pro laboratorní analýzy, za pomoc při psaní diplomové práce a při vyhodnocování výsledků. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

## Obsah

1. Úvod .....	1
2. Literární přehled .....	2
2.1. Metanotrofní bakterie .....	2
2.2. Oxidace metanu - metanotrofie .....	5
2.3. Metanotrofní bakterie v rašeliništích .....	6
2.3.1. Metan v rašeliništi .....	7
2.3.2. Metanotrofní bakterie a vegetace v rašeliništi .....	7
2.4. Odvodnění rašeliniště a vliv odvodnění na složení vegetace .....	8
3. Metodika .....	9
3.1. Popis lokality .....	9
3.2. Vzorky rostlinného opadu .....	10
3.3. Laboratorní pokusy .....	12
3.3.1 Izolace DNA .....	12
3.3.2 Stanovení množství 16SrRNA genu pro celkové bakterie a <i>pmoA</i> genu pro metanotrofní bakterie .....	12
3.3.3 Vyhodnocení dat .....	13
4. Cíle a hypotézy .....	14
4.1. Cíle práce .....	14
4.2. Hypotézy .....	14
5. Výsledky .....	15
5.1. Vliv odvodnění na množství a diverzitu metanotrofních bakterií .....	15
5.2. Vliv hloubky na množství a diverzitu metanotrofních bakterií .....	17
5.3. Vliv odvodnění a hloubky na metanotrofní bakterie u kořenů <i>Pinus sylvestris</i> .....	19
5.4. Vliv různého typu opadu na množství a diverzitu metanotrofních bakterií .....	21
5.5. Vzájemný vztah metanotrofních bakterií a metanogenních archaeí .....	23
6. Diskuze .....	25

6.1. Vliv odvodnění slatiniště a vrchoviště na metanotrofní bakterie .....	25
6.2. Vliv hloubky na metanotrofní bakterie ve slatiništi a vrchovišti.....	26
6.3. Vliv různého typu opadu na metanotrofní bakterie .....	27
6.4. Vzájemný vztah metanotrofních bakterií a metanogenních archaeí.....	28
7. Závěr.....	29
8. Literární zdroje .....	30

## Seznam použitých zkratek

BSA	bovin serum albumin
C	uhlík
Ca	vápník
CH <sub>4</sub>	metan
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
DMSO	dimethylsulfid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
K	draslík
Mg	hořčík
MMO	metan monooxygenáza
N	dusík
Na	sodík
N <sub>2</sub> O	oxid dusný
OTU	Operation Taxonomic Unit – bakteriální druh definován na základě 97% podobnosti 16SrDNA genu
P	fosfor
PCR	polymerázová řetězová reakce
pMMO	membránová metan monooxygenáza
pmoA	metan monooxygenázová podjednotka A
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RDA	redundanční analýza
RuMP	ribuloso-monofosfátová cesta
sMMO	cytoplazmatická metan monooxygenáza



# 1. Úvod

Rašeliniště představují významné zásobárny uhlíku a ovlivňují množství skleníkových plynů v atmosféře. Jedním z hlavních fyzikálních faktorů rašeliniště, který má vliv na jeho fungování je vysoká hladina podzemní vody. Se změnou vodního režimu rašeliniště nastává změna ve fyzikálních a chemických vlastnostech půdy, složení a produkci vegetace, složení a aktivitě mikrobiálního společenstva (Laiho, 2006, Jaatinen et al., 2007, Peltoniemi, 2010, Straková et al., 2010).

Oxidace metanu metanotrofními bakteriemi v rašeliništi je důležitý děj vedoucí ke snížení emisí metanu. Metanotrofní bakterie je v rašeliništích všudypřítomná, ovšem velmi různorodá skupina gramnegativních bakterií patřící do kmene Proteobacteria. Tyto bakterie mají schopnost oxidovat metan přes meziprodukty až na oxid uhličitý nebo ho zabudovat do biomasy, a to díky specifickému intracelulárnímu membránovému systému obsahující klíčový enzym oxidace metanu, metan monooxygenázu. Aktivní činnost metanotrofních bakterií je největší v aerobní oblasti a na hranici aerobní a anaerobní části půdního profilu. Tedy v částech rašeliniště, kde mají dostatek substrátu pro oxidaci metanu vyrobeného metanogenními archaei. Tyto části rašeliniště obsahují i okysličené povrchové vrstvy a kořeny mokřadních rostlin uvolňujících kyslík. Metanotrofní bakterie se rozdělují podle afinity k metanu, cest asimilace formaldehydu (meziprodukt oxidace metanu) a dalších morfologických a fyziologických znaků na dvě základní skupiny: typ I a typ II. Na jejich množství a diverzitu může mít vliv řada faktorů, např. typ rašeliniště, hladina podzemní vody nebo hloubka půdního profilu (Knief, 2015).

## 2. Literární přehled

### 2.1. Metanotrofní bakterie

Gramnegativní bakterie, které využívají metan jako jediný zdroj uhlíku a energie, se nazývají metanotrofní (Timmis, 2010). Jsou podskupinou metylotrofních bakterií, které rostou na celé řadě různých jedno-uhlíkatých sloučenin (Lai, 2009, Timmis, 2010).

Některé druhy metanotrofních bakterií (např. čeleď Methylocystaceae, Beijerinckiaceae) jsou charakteristické schopností fixovat dusík. Většina metanotrofních bakterií je mezofilní a neutrofilní rostoucí v teplotním rozmezí 20–37 °C a při pH 5–8. Bylo však kultivováno i několik druhů termofilních a termotolerantních rostoucí v teplotách až do 67 °C. Nově byly izolovány také acidofilní metanotrofní bakterie z kyselých geotermálních oblastí Nového Zélandu, Ruska a Itálie (Islam et al., 2015, Mohammadi et al., 2016). Nově objevené rody *Methyloacidiphilum* a *Methylacidimicrobium* představují zcela novou fylogenetickou linii kmene Verrucomicrobia, označovanou jako typ III (Khadem et al., 2012, Knief, 2015, Mohammadi et al., 2016).

Na základě fylogeneze, formaldehydových asimilačních cest, vnitřního uspořádání membrány a dalších biochemických charakteristik lze všechny rody metanotrofních mikroorganismů rozdělit do dvou hlavních skupin: typ I a typ II (Lai, 2009). Typ I je fylogeneticky nejvíce rozmanitou skupinou, patří mezi Gammaproteobacteria (např. čeleď Methylococcaceae), asimilující formaldehyd přes ribuloso-monofosfátový cyklus. Typ II fylogeneticky patří mezi Alphaproteobacteria (čeleď Methylocystaceae, Beijerinckiaceae) asimilující formaldehyd přes serinovou dráhu (Tab. I; Fazli et al., 2013). V současné době je známo 20 rodů aerobních metanotrofních bakterií z kmene Gammaproteobacteria, pokud jsou zahrnuty i nově objevené rody *Candidatus Crenothrix polyspora* a *Candidatus Clonothrix fusca*, které neobsahují kultivované zástupce, a 5 rodů z kmene Alphaproteobacteria. Avšak charakteristika některých nových rodů a druhů v posledních letech zpochybnila zařazení a rozdělení některých původních druhů metanotrofních bakterií. Například taxonomické zařazení určitých druhů čeledě Methylococcaceae (druh *Methylomonas rubra*, *Methylococcus chroococcus*) nebylo ještě validováno (Knief, 2015). K metan oxidujícím bakteriím se řadí také typ X, který byl původně zařazen mezi typ I, ale posléze vyčleněn do samostatné skupiny. Bakterie typu X rostou při jiných teplotách a mají jiný tvar než dva hlavní typy. Řadí se do kmene Betaproteobacteria a asimilují uhlík přes ribuloso-monofosfátovou cestu (Hanson et al., 1996, Gratzová, 2013).

**Tab. I:** Taxonomické a fyziologické vlastnosti vybraných druhů metanotrofních bakterií (upraveno podle Bowman, 2014, Doronina et al., 2014, Kelly et al., 2014, Webb et al., 2014, Knief, 2015).

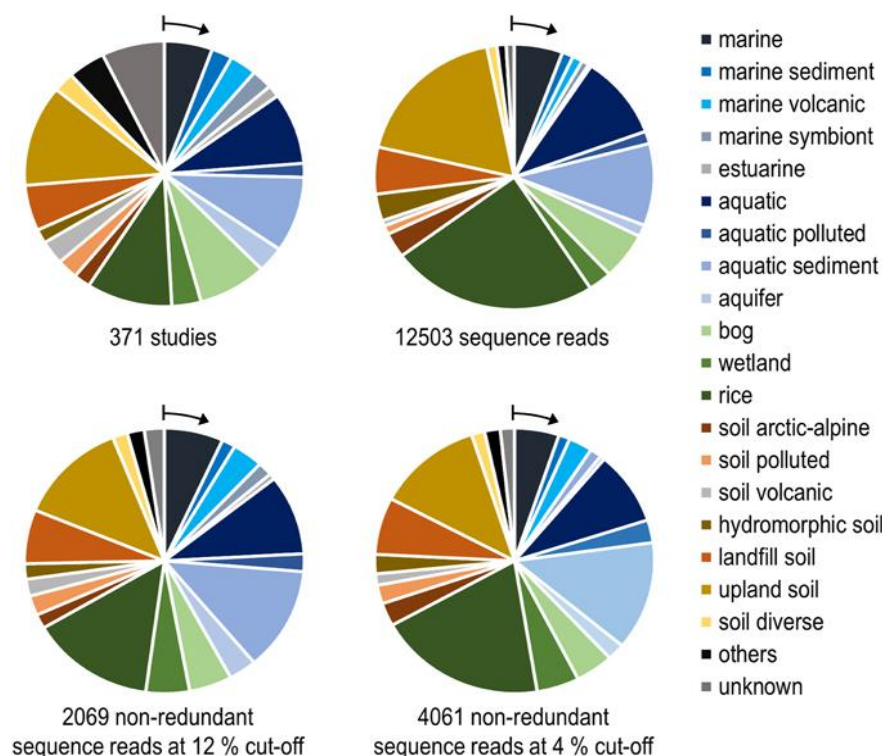
	<b>Třída</b>	<b>Zdroj izolace</b>	<b>pH</b>	<b>Dráha asimilace formaldehydu</b>
<b>Čeleď</b>				
<b>Methylocystaceae</b>				
<i>Methylocystis</i>	Alphaproteobacteria	půda, rašeliniště, flóra	mírně acidofilní	serinová
<i>Methylosinus</i>	Alphaproteobacteria	rýžové pole, vodní sedimenty	mírně acidofilní	serinová
<b>Čeleď</b>				
<b>Beijerinckiaceae</b>				
<i>Methylocapsa</i>	Alphaproteobacteria	lesní půda, rašeliniště	mírně acidofilní	serinová
<i>Methylocella</i>	Alphaproteobacteria	lesní půda, rašeliniště	mírně acidofilní	serinová
<i>Methyloferula</i>	Alphaproteobacteria	rašeliniště	mírně acidofilní	serinová
<b>Čeleď</b>				
<b>Methylophilaceae</b>				
<i>Methylophilus</i>	Betaproteobacteria	vodní sedimenty, rhizosféra	mírně acidofilní	RuMP
<i>Methylotenera</i>	Betaproteobacteria	vodní sedimenty, rhizosféra	neutrální	RuMP
<b>Čeleď</b>				
<b>Methylobacteriaceae</b>				
<i>Methylobacterium</i>	Alphaproteobacteria	půda, flóra	neutrální	serinová
<i>Meganema</i>	Alphaproteobacteria	flóra	neutrální	serinová
<b>Čeleď</b>				
<b>Methylococcaceae</b>				
<i>Methylococcus</i>	Gammaproteobacteria	půda, vodní sedimenty	mírně zásadité	RuMP
<i>Methylomonas</i>	Gammaproteobacteria	vodní sedimenty, rašeliniště	mírně zásadité	RuMP
<i>Methylobacter</i>	Gammaproteobacteria	vodní sedimenty, jezera	mírně zásadité	RuMP

Kmen *Verrucomicrobia* je kmen s velmi málo zástupci a zatím málo popsanou ekologií jednotlivých druhů. Dělí se na sedm skupin zahrnující třídy *Verrucomicrobiae*, *Spartobacteria*, *Opitutae* a skupiny 3, 5, 6 a 7. Pro skupinu 5 a 7 nebyli žádní zástupci ještě kultivováni. Zástupci skupiny 3 a 6 již byli kultivováni, ale zatím většina nebyla pojmenována. Do skupiny 6 patří zejména termoacidofilní izoláty *Candidatus Methylophilum infernorum*, *Candidatus Methylophilum kamchtkensis* a *Candidatus Methylophilum fumarolicum* (Tab II; Qiu et al., 2014, Anders et al., 2015). Všechny tyto izoláty byly nalezeny v kyselých teplých oblastech a vyskytují se při optimálním pH 2–3,5 a teplotě 55–60 °C (Erikstand et al., 2015). Jsou také charakteristické absencí membránové struktury, obsahují odlišné enzymy a využívají vzácné prvky pro oxidaci metanu (Khadem et al., 2012, Mohammadi et al., 2016).

**Tab. II:** Zdroje izolace a fylogenetické vlastnosti nově objevených rodů metanotrofních bakterií z kmene Verrucomicrobia (upraveno podle Knief, 2015).

	<b>Třída</b>	<b>Zdroj izolace</b>	<b>pH</b>
<i>Čeď' Methyloacidiphilaceae</i>			
<i>Methyloacidimicrobium cyclopophantes</i>	III	sopečná půda	acidofilní
<i>Methyloacidimicrobium fagopyrum</i>	III	sopečná půda	acidofilní
<i>Methyloacidimicrobium tartarophylax</i>	III	sopečná půda	acidofilní
<i>Methyloacidiphilum fumariolicum</i>	III	termální bahno	acidofilní
<i>Methyloacidiphilum infernorum</i>	III	geotermální oblast	acidofilní
<i>Methyloacidiphilum kamchatkense</i>	III	horké prameny	acidofilní

Všechny skupiny metanotrofních bakterií byly detekovány v mnoha prostředích, jako jsou půdy, sedimenty, rašeliniště, rýžoviště nebo skládky (Obr. 1; Islam et al., 2007, Knief, 2015). Rašeliniště představují přechody mezi suchozemským a vodním ekosystémem a mohou tedy obsahovat taxony typické pro oba ekosystémy (Knief, 2015). Předpokládá se, že typ II je dominantní v půdě, zatímco oba typy I i II se vyskytují v rhizosféře a povrchových půdách. Metanotrofní bakterie typu I jsou nejspíše odolnější vůči vlivům prostředí, zatímco metanotrofní bakterie typu II vykazují schopnost rychlejší regenerace (Ma et al., 2013). Z hlediska afinity k metanu preferuje typ I spíše menší koncentraci metanu a vyšší množství kyslíku než metanotrofní bakterie typu II (Amaral et al., 1995).



**Obr. 1:** Typické biotopy metanotrofních bakterií na základě analýzy *pmoA* (metan monooxygenázová podjednotka A) genu (převzato z Knief, 2015).

## 2.2. Oxidace metanu - metanotrofie

Metanotrofní bakterie oxidují metan na metanol, formaldehyd, kyselinu mravenčí a oxid uhličitý (Lai, 2009).

Iničiačním krokem oxidace metanu je přeměna metanu na metanol, která je katalyzovaná enzymem metan monooxygenázou (MMO) (Dubey, 2005). Kyslík má při oxidaci metanu důležitou roli. Může dojít k rozbití vazby v molekule kyslíku. Enzym MMO začlení do molekuly metanu pouze jeden atom kyslíku, kdy vznikne metanol, a druhý je redukován za vzniku vody (Hanson et al., 1996, Lai, 2009).

Metan může být metabolizován jak katabolickou (zisk energie), tak anabolickou (růst biomasy) cestou. Katabolická cesta metanové oxidace zahrnuje několik sekvenčních kroků s metabolickými produkty jako metanol, formaldehyd, kyselina mravenčí, metylaminy nebo metylované sloučeniny obsahující síru. Metanol je oxidován na formaldehyd periplasmatickou metanol dehydrogenázou (Hanson et al., 1996, Borrel et al., 2011).

Anabolická cesta může být rozdělena do dvou drah na základě fixace produktu oxidace metanu formaldehydu na: 1. ribuloso–monofosfátovou dráhu (RuMP), 2. serinovou dráhu (Dubey, 2005, Liao et al., 2016). Karboxylové kyseliny a aminokyseliny jsou hlavními

meziprodukty serinové dráhy. V RuMP cestě jsou hlavními meziprodukty fosfoglycerované cukry. Meziprodukty jsou pak využity k tvorbě biomasy metanotrofních bakterií (Dubey, 2005, Orita et al., 2006).

Oxidace metanu obvykle probíhá u metanotrofních bakterií v membránových systémech označovaných jako intracytoplazmatické membrány tvořící řadu intracelulárních membránových záhybů. Tyto membrány se vyskytují ve dvou hlavních intrastrukturálních typech: v metanotrofech typu I jsou tyto váčky ve tvaru disku vyskytující se po celé buňce, naopak u typu II jsou podél periferie buněčné stěny (Bowman, 2006). Metanotrofní bakterie obsahují ve svých membránových systémech klíčový enzym metan monooxygenázu (MMO), zodpovědnou za počáteční oxidaci metanu na metanol (Wu et al., 2012). Enzym MMO je zakotven v intracytoplazmatické membráně a ve většině případů se vyskytuje membránová forma (pMMO) obsahující měď, zatímco pouze malá podskupina metanotrofních bakterií (druhy *Methylocella* a nově popsané druhy z kmene *Verrucomicrobia*) má navíc gen pro cytoplazmatickou formu enzymu (sMMO) (Wu et al., 2012).

### **2.3. Metanotrofní bakterie v rašeliništích**

Rašeliniště představuje typ mokřadního ekosystému, ve kterém dochází k akumulaci organické hmoty poté, co rychlost primární produkce překročí rychlost rozkladu organického materiálu (Whittle et al., 2016). Tato nerovnováha je způsobena vysokou hladinou podzemní vody a následnou anoxií, tedy sníženou dostupností kyslíku, která zpomaluje rozklad a umožňuje tvořit rašelinu. K její tvorbě přispívají i další biologické faktory, jako např. nízká teplota a charakteristická vegetace (Peltoniemi et al., 2012). Mokřady představují jednu z nejdůležitějších globálních zásobáren uhlíku (C) a ovlivňují globální cykly tří hlavních skleníkových plynů – oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>), metanu (CH<sub>4</sub>) a oxidu dusného (N<sub>2</sub>O). Navýšení koncentrace těchto plynů v atmosféře bývá považován za jeden z hlavních důvodů aktuálních změn klimatu (Tanneberger et al., 2011).

Podle hydrologie a bohatosti živin lze rašeliniště rozdělit do dvou hlavních skupin, a to na ombrotrofní a minerotrofní rašeliniště (Urbanová, 2012). Ombrotrofní vrchoviště je typ rašeliniště, kde převládají rašeliníky (*Sphagnum*). Protože je vrchoviště typicky mírně vyklenuté nad okolní krajinu, jeho jediným zdrojem vody a živin jsou srážky. Vrchoviště je tedy chudé na živiny, minerály (Ca, Na, K) a má také zpravidla nižší pH. Oproti tomu minerotrofní slatiniště bývá umístěno naopak pod úrovní okolního terénu. Slatiniště tedy

přijímá vodu jak z atmosférických srážek, tak i z podzemní vody, je na živiny a minerály bohatší a má vyšší pH (Landry et al., 2012).

### **2.3.1. Metan v rašeliništi**

Aktivita metanotrofních bakterií významně přispívá ke globálnímu koloběhu metanu (Knief, 2015). Metan ( $\text{CH}_4$ ) je po  $\text{CO}_2$  druhá nejhojnější uhlíkatá sloučenina v atmosféře (Jaatinen et al, 2005). Asi 25% všech zdrojů  $\text{CH}_4$  je spojeno s těžbou a spalováním fosilních paliv nebo spalováním biomasy, dalších 6% pochází z chemické produkce  $\text{CH}_4$  z rostlinného materiálu. Téměř 70% je však výsledkem mikrobiálních procesů zejména v rašeliništích (Condrad, 2009, Brablcová et. al, 2014).

$\text{CH}_4$  je tvořen v anaerobních podmínkách metanogenními archaei jako konečný produkt anaerobní respirace a fermentace (Condrad, 2009, Brablcová et. al, 2014). Pouze část vyprodukovaného  $\text{CH}_4$  se však dostane z anaerobních vrstev rašeliniště do atmosféry. Velké množství je spotřebováno metanotrofními bakteriemi, které mohou omezit uvolňování metanu do atmosféry (Couwenberg, 2009, Fazli et al., 2013). Rychlost oxidace metanu liší se v různých typech rašelinišť závisí i na složení a množství metanotrofních bakterií, a také na přítomnosti rostlinných druhů, které tuto rychlost ovlivňují (Yrjälä et al., 2011).

### **2.3.2. Metanotrofní bakterie a vegetace v rašeliništi**

V současné době jsou již prokazatelné studie, že metanotrofních bakterie se nevyskytují pouze v půdě, ale byly dokonce identifikovány i v různých částech rostlin, např. v kořenech, stonku nebo listech cévnatých rostlin, ale i přímo v pletivech rašeliníku (Stepniewska et al., 2014) Důvodem rozdílných emisí  $\text{CH}_4$  z různých typů rašelinišť (např. slatiniště vs. vrchoviště), které se liší skladbou vegetace, by tedy mohlo být i odlišné množství a aktivita symbiotických metanotrofních bakterií (Liebner et al., 2011). Symbiotické bakterie rašeliníku jsou regulovány řadou abiotických faktorů a jsou více odolné vůči vnějším vlivům než volně žijící metanotrofní bakterie (Putkinen et al., 2014).

Ve velkém množství se metanotrofní bakterie vyskytují i v rostlinné rhizosféře. Rostliny mnohdy nepřímou podporují metanotrofy zvýšením dostupnosti kyslíku v oblasti kořenů, do kterých se kyslík dostává rostlinnými pletivy. Metanotrofní bakterie pak zde tvoří důležitou složku bakteriálních biofilmů (Calhoun et al., 1997, Stepniewska et al., 2014). Dostupnost kyslíku je tedy pro metanotrofní bakterie klíčová, okysličení rhizosféry se však může výrazně lišit mezi rostlinnými druhy (Calhoun et al., 1997).

## 2.4. Odvodnění rašeliniště a vliv odvodnění na složení vegetace

Odvodnění může stimulovat mineralizaci a drasticky změnit funkci rašeliniště, kterou plní jako úložiště uhlíku. Citlivost a odolnost mikrobiálních komunit se po odvodnění liší v různých typech rašelinišť. Bylo prokázáno, že dlouhodobé odvodnění mění strukturu společenstva bakterií a jejich aktivitu více na živinově bohatších minerotrofních slatiništích (Urbanová et al., 2015). Populace metanotrofních bakterií reagují odlišně na odvodnění rašeliniště. Některé druhy metanotrofních bakterií se vyskytují jak v aerobní tak anaerobní části slatiniště a vrchoviště, jelikož jsou schopny se přizpůsobit podmínkám, kterým jsou vystaveny (Ma et al., 2013). Stále je ale velmi málo informací o tom, které metanotrofní bakterie po odvodnění přetrvávají, nebo jak se složení metanotrofního společenstva po odvodnění změní. První studie naznačují, že na některé druhy např. z čeledě Methylococcaceae má odvodnění velký vliv, avšak určité druhy např. z čeledě Methylocystaceae dominují i po odvodnění (Krause et al., 2015).

Odvodnění rašeliniště způsobí, že horní vrstva rašeliny zvyšuje objemovou hmotnost, stává se těžší a stlačuje spodní vrstvu rašeliniště. Odvodnění snižuje hloubku anaerobní zóny, kde probíhá produkce metanu, a roste aerobní zóna, která vyhovuje aktivní činnosti metanotrofních bakterií (Landry et al., 2012). Nejvyšší činnost metanotrofních bakterií je však v oblasti rozhraní oxické a anoxické části rašeliniště, kde je dostatek kyslíku i  $\text{CH}_4$  (Vecherskaya et al., 1993).

Snížení vodní hladiny vyvolává změny i ve složení vegetace, které se projevují opět výrazněji na minerotrofním slatiništi než na ombrotrofním vrchovišti (Straková et al., 2010). Změny ve složení vegetace mohou mít za následek celkové posuny v produkci a dekompozici organické hmoty, a tím ovlivňují množství a kvalitu rašeliny (Straková et al., 2012).



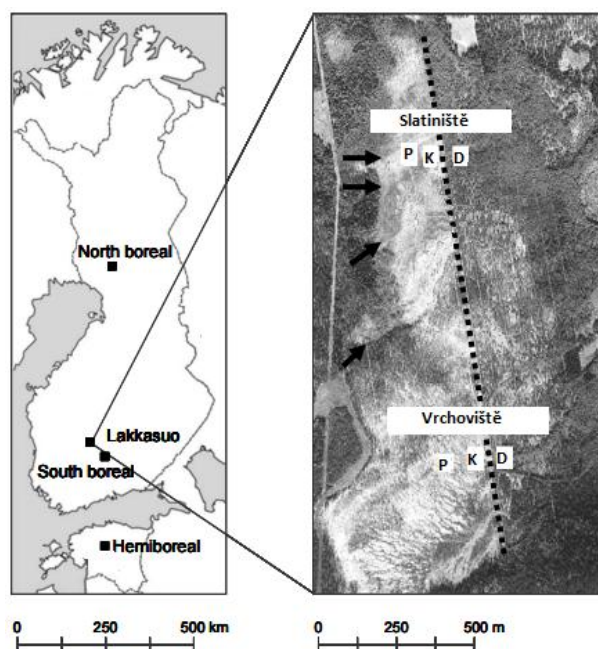
### 3. Metodika

Ve své diplomové práci jsem analyzovala vzorky odebrané na rašeliništi Lakkasuo ve Finsku. Vzorky odebral tým z Helsinské univerzity po deseti letech inkubace v rámci dekompozičního experimentu Petry Strakové (Straková et al., 2012).

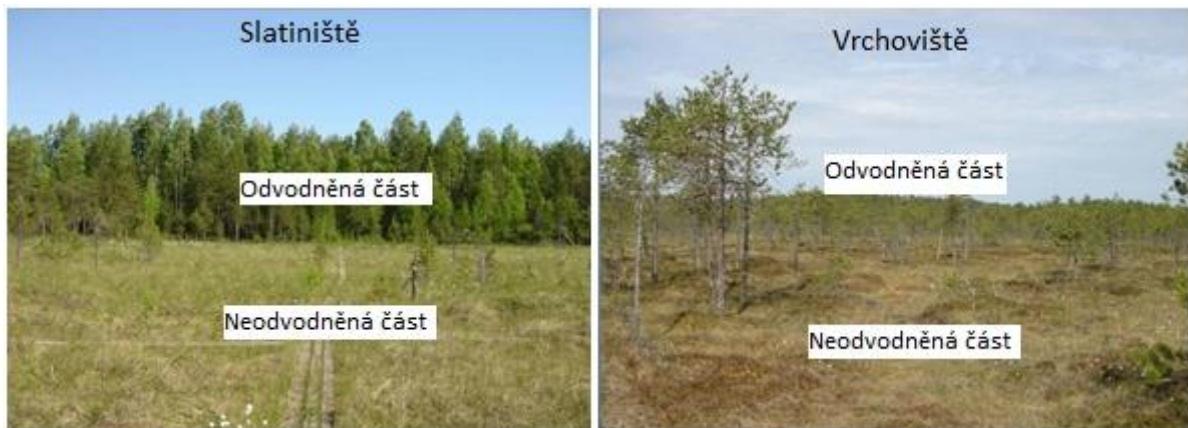
#### 3.1. Popis lokality

Výzkum byl proveden ve finském rašeliništním komplexu Lakkasuo (61 ° 48'N, 24 ° 19'E, cca 150 m n.m.) nacházející se v centrální části Finska. V této oblasti spadne za rok průměrně asi 710 mm srážek, z nichž 1/3 padá jako sníh. Průměrné teploty za leden a červenec se zde pohybují přibližně kolem -8,9 a 15,3 °C (Jaatinen et al., 2007).

Dekompoziční experiment byl proveden na dvou studijních místech odlišujících se bohatostí živin, a to na ombrotrofním vrchovišti a mezotrofním slatiništi (Obr. 2). Obě tyto části zahrnovaly kontrolní přirozené rašeliniště, krátkodobě odvodněné rašeliniště a dlouhodobě odvodněné rašeliniště. Dohromady tyto plochy tvořily přechod ze zavodněného nenarušeného přirozeného rašeliniště k sušším místům a nakonec k lesnímu ekosystému (Obr. 3). Nenarušená a dlouhodobě odvodněná plocha tvořila cca 900 m<sup>2</sup> a krátkodobě odvodněná plocha cca 500 m<sup>2</sup> (Straková et al., 2012).



**Obr. 2:** Lokalita experimentu. *P*= přirozené, *K*= krátkodobě odvodněné, *D*= dlouhodobě odvodněné slatiniště/vrchoviště.



**Obr. 3:** Přejchod z neodvodněného rašeliniště do lesního ekosystému v odvodněném vrchovišti a slatiništi.

Při krátkodobém odvodnění byla průměrná hladina podzemní vody přibližně o 10 cm ve vrchovišti a 20 cm ve slatiništi nižší než v přirozených místech. V dlouhodobě odvodněných plochách byla hladina podzemní vody nižší asi o 15 cm ve vrchovišti a až o 40 cm ve slatiništi než v přirozených plochách (Straková et al., 2012).

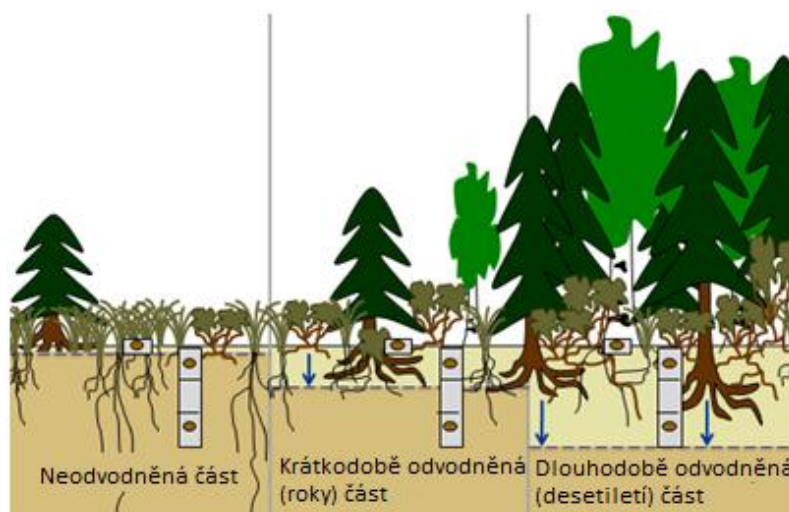
Slatiniště a vrchoviště jsou charakterizována odlišnou vegetací v závislosti na vodní hladině, pH a koncentraci živin (Straková et al., 2012). Pro přirozené vrchoviště i slatiniště je charakteristický růst např., suchopýra pochvatého (*Eriophorum vaginatum*), břízy zakrslé (*Betula nana*) a různých druhů rašeliníků (*Sphagnum fallax*, *Sphagnum fuscum*). Po krátkodobém odvodnění se zvýšila hojnost borovice lesní (*Pinus sylvestris*) a břízy (*Betula nana*) hlavně na slatiništi, na vrchovišti nebyly změny ve vegetaci nějak významné. Rašeliníky vykazovaly známky vysušení, ale jejich abundance se nezměnila (Jaatinen et al., 2007). Po dlouhodobém odvodnění byly změny ve složení vegetace významné (Straková et al., 2012). Ve vrchovišti i slatiništi, kde byly původně hojně rozšířeny rašeliníky a trávy, vyrostl lesní ekosystém, kde dominuje borovice a bříza. Na slatiništi ubyla hojnost rašeliníků, můžeme tam však najít druhy jako *Sphagnum angustifolium*. Na vrchovišti dominují kromě borovice a břízy různé keře a rašeliníky (*Sphagnum angustifolium*, *Sphagnum fuscum*) (Jaatinen et al., 2007).

### 3.2. Vzorky rostlinného opadu

V dekompozičním experimentu bylo získáno 118 vzorků rostlinného opadu z ombrotrofní a minerotrofní části rašeliniště. Vzorky pocházely z rostlin typických pro rašeliniště: trávy (ostřice plstnatoplodá - *Carex lasiocarpa*, suchopýr pochvatý - *Eriophorum*

*vaginatum*), zakrslé keře (bříza zakrslá – *Betula nana*, rojovník bahenní – *Ledum palustre*), stálezelený strom (borovice lesní – *Pinus sylvestris*), opadavý strom (bříza pýřitá – *Betula pubescens*), rašeliníky (*Sphagnum fallax*, *S. angustifolium*, *S. balticum*, *S. fuscum*), lesní mech (travník Schreberův – *Pleurozium schreberi*).

Experiment byl prováděn metodou opadových sáčků, které byly naplněny rostlinným materiálem a vloženy zpět na místo, kde by určitý rostlinný opad byl vyprodukován a byl postupně rozložen v přirozených podmínkách. Sáčky, které obsahovaly nadzemní části rostlin a mechový materiál, byly uloženy horizontálně na povrch (0 cm) vrchoviště a slatiniště k danému druhu rostliny, ze které opad pocházel. Sáčky s kořeny borovice byly vloženy vertikálně k povrchu rašelině do hloubky 0–10 cm a 20–30 cm (Obr. 4). Po desetileté inkubaci v rašelině byly jednotlivé opadové sáčky vytaženy v říjnu roku 2015 z půdy, byly převezeny do laboratoře, obsah sáčků byl očištěn, zvážen ke zjištění zbývající hmotnosti a vysušen mrazem (Straková et al., 2012). Takto připravené vzorky byly dopraveny z Finska do České republiky, kde byly použity k následujícím laboratorním analýzám.



**Obr. 4:** Metoda opadových sáčků v přirozeném, krátkodobě odvodněném a dlouhodobě odvodněném rašelině.

### 3.3. Laboratorní pokusy

#### 3.3.1 Izolace DNA

Protože lyofilizované vzorky obsahovaly různé typy opadů (jehlice, kořeny, listy, atd.), bylo potřeba jednotlivé vzorky před izolací DNA nejdříve rozdrtit v tekutém dusíku. Takto připravené byly vzorky naváženy v rozmezí 0,05 g – 0,1 g (přesná hodnota navážky byla zaznamenána) a k tomuto množství bylo přidáno 400 µl destilované vody a vzorky byly promíchány. Izolaci DNA z půdy byla provedena podle návodu MO BIO PowerSoil® DNA Isolation Kit. Množství DNA bylo stanoveno fluorimetricky pomocí QuantiFluor® dsDNASystem, Promega. Vzorky byly osekvenovány v laboratoři Argonne National Laboratory, Lemont, Illinois.

#### 3.3.2 Stanovení množství 16SrRNA genu pro celkové bakterie a *pmoA* genu pro metanotrofní bakterie

Pomocí kvantitativní real - time PCR (qPCR) byl stanoven gen 16SrRNA pro celkové bakterie a gen *pmoA* charakteristický pro metanotrofní bakterie. Amplifikace standardu pro oba geny byla provedena klasickou polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a velikost produktu amplifikace byla ověřena gelovou elektroforézou. Následně byl přečištěn PCR standard podle protokolu QIAquick® PCR Purification Kit a změřena koncentrace. Vzorky byly naředěny na cca 15-20 ng a poté byl připraven MasterMix v odlišném složení pro oba geny. Pro qPCR do 48 jamkové mikrotitrační destičky bylo napipetováno 17µl reakční směsi a 3µl DNA templátu, jako negativní kontrola byla použita PCR voda, vše ve dvou opakováních. Desítkovým ředěním byla vytvořena pětibodová kalibrační křivka. QPCR probíhala na přístroji StepONE RealTime PCR System, Applied Biosystems, USA. I přes to, že byla křivka tání posunutá jen u některých vzorků, velikost produktu všech vzorků byla ověřena gelovou elektroforézou.

Jako standard při kvantifikaci genu 16SrRNA charakteristického pro celkové bakterie byla použita bakterie *Escherichia coli*. Složení reakční směsi pro jeden vzorek bylo: 5,86 µl PCR vody, 10 µl FastStartSybrGreenMix (ROSCHE), 0,12 µl primer 341–F (CCTACGGGAGGCAGCAG), 0,12 µl primer 534–R (ATTACCGCGGCTGCTGGCA), 0,4 µl bovin serum albumin (BSA), 0,50 µl dimethylsulfid (DMSO). Primery, které byly součástí reakční směsi, byly v koncentraci 0,3 µM. QPCR genu 16SrRNA celkových bakterií probíhala za těchto podmínek: iniciační fáze denaturace 95 °C /10 min, 30 cyklů denaturace při 95 °C /15 s, nasedání primeru 60 °C /30 s, syntéza řetězců 72 °C /30 s. Velikost produktu

(193bp) byla ověřena gelovou elektroforézou. Na 1% gel bylo napipetováno 5  $\mu$ l markeru Ladder (O' Gene Ruler 100 pb) a 2 $\mu$ l Syber Green, a dále směs složená z 1 $\mu$ l Loading Dye, 2 $\mu$ l Syber Green a 4 $\mu$ l vzorku. Gelová elektroforéza probíhala 60 minut, při 90V a 500mA.

Jako standard pro kvantifikaci genu *pmoA* charakteristického pro metanotrofní bakterie byl použit plazmid poskytnutý Alicí Chroňákovou, který byl již použit v bakalářské práci (Kráčmarová, 2014). Složení reakční směsi pro jeden vzorek bylo následovné: 5,62  $\mu$ l PCR vody, 10  $\mu$ l FastStartSybrGreenMix, 0,24  $\mu$ l Primer M661–R (GGTAARGACGTTGCNCCGG), 0,24  $\mu$ l Primer A189–F (GGNGACTGGGACTTCTGG), 0,40  $\mu$ l BSA, 0,50  $\mu$ l DMSO. Primery použité v reakční směsi byly v koncentraci 0,6  $\mu$ M. Podmínky pro qPCR *pmoA* genu metanotrofních byly: iniciační fáze denaturace 95 °C/3 min., 35 cyklů denaturace při 94 °C/25 s, nasedání primeru 57 °C/20 s, syntéza řetězců 72 °C/45 s. Velikost produktu (491bp) byla rovněž ověřena gelovou elektroforézou za stejných podmínek jako při kvantifikaci genu 16SrRNA.

### 3.3.3 Vyhodnocení dat

K vytvoření OTU (Operational Taxonomic Unit) tabulky vyjadřující distribuci jednotlivých mikrobiálních druhů ve vzorcích a analýzy kvality sekvencí jsou nezbytné hluboké znalosti bioinformatiky, proto byla OTU tabulka vytvořena za pomoci školitele. Po odstranění málo kvalitních a krátkých sekvencí ( $q < \text{PhredScore } 20$ ) byl počet sekvencí 4 612 932. Vlastní OTU tabulka byla vytvořena pomocí algoritmu uparse 8.1, taxonomické přiřazení algoritmem utax s využitím databáze ARB Silva 119. Tato data byla zpracována a vyhodnocena ve statistickém programu STAMP v. 2.0.6 (Parks et al., 2014). Relativní zastoupení čeledí v procentech bylo přepočítáno na absolutní množství pomocí qPCR (kopie genu/g opadu). Absolutní hodnoty byly  $\log(x+1)$  převedeny pro získání normální distribuce. Za pomoci konzultanta byl vyhodnocen vliv typu rašeliniště, opadu, odvodnění a hloubky na množství metanotrofních bakterií jako rozklad variability pomocí redundanční analýzy (RDA) v programu CANOCO 5. Měření probíhalo odděleně pro opady z povrchové vrstvy a kořeny *Pinus sylvestris*. Pomocí metody postupné selekce charakteristik prostředí byly vybrány jednotlivé parametry prostředí, které nejlépe korelovaly s variabilitou množství metanotrofních bakterií. Signifikance byla testována pomocí Monte Carlo permutačního testu. Pro vyhodnocení dat jsem používala program STAMP v. 2.0.6, který má v sobě zahrnuté základní výpočty a statistické testy (výpočet směrodatné odchylky, ANOVA, t-test, atd.). Data byla z programu STAMP vyexportována a dále zpracována v Microsoft Office Excel (2007).

## **4. Cíle a hypotézy**

### **4.1. Cíle práce**

Hlavním cílem této práce bylo nejen zpracovat literární rešerše o metanotrofních bakteriích, ale i zjistit vliv odvodnění (krátkodobého a dlouhodobého), hloubky (0 cm, 0–10 cm, 20–30 cm) a vliv různého typu opadu na kvantitu a relativní zastoupení metan oxidujících bakterií ve slatiništi a vrchovišti.

### **4.2. Hypotézy**

Po krátkodobém i dlouhodobém odvodnění dojde k celkovému snížení množství a diverzity metanotrofních bakterií. Tyto změny budou výraznější v živinově bohatším minerotrofním slatiništi.

Vlivem poklesu množství kyslíku s hloubkou rašeliniště dojde i k poklesu množství a diverzity metanotrofních bakterií. Odvodnění bude mít výraznější vliv na spodní vrstvy rašeliny, kde dojde k navýšení množství a diverzity metanotrofních bakterií. Tyto změny budou opět výraznější v minerotrofním slatiništi.

Množství a diverzita metanotrofních bakterií bude ovlivněna i typem rostlinného opadu.

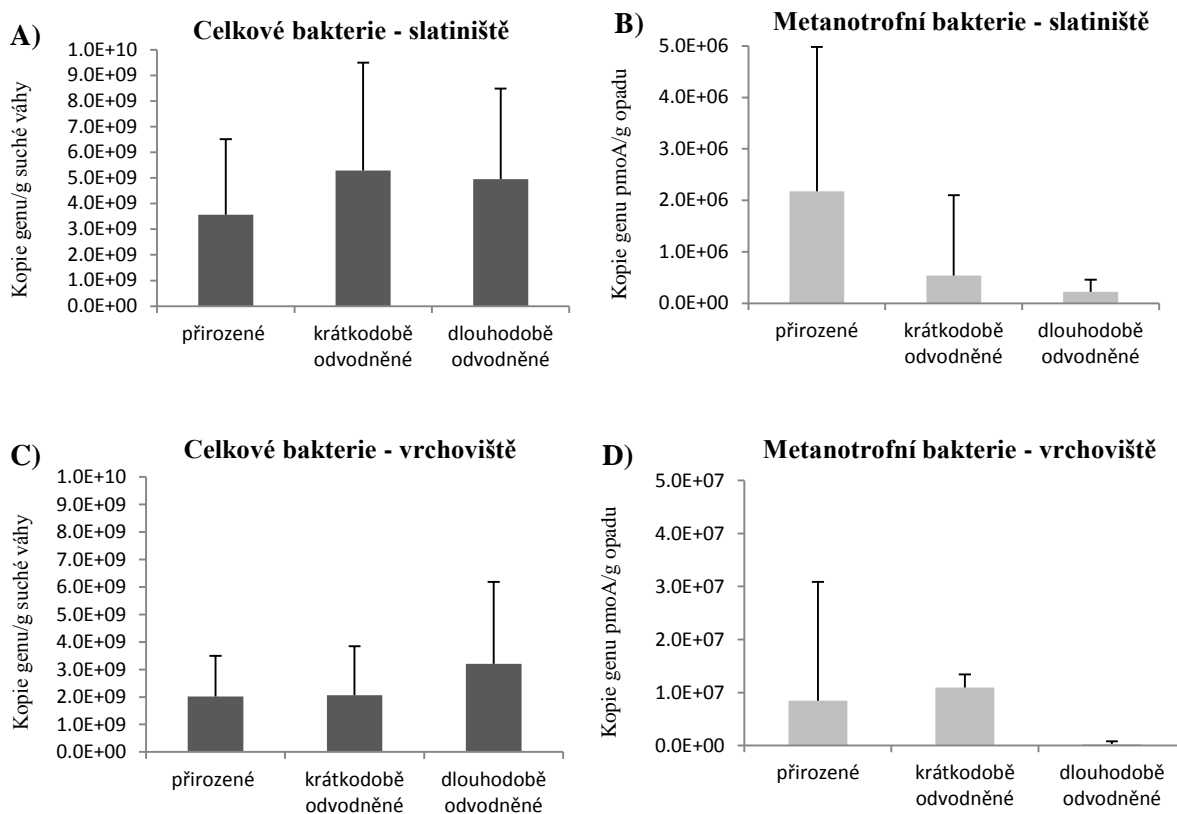
## 5. Výsledky

Množství a zastoupení metanotrofních bakterií bylo porovnáno v důsledku vlivu odvodnění v přirozeném, krátkodobě a dlouhodobě odvodněném slatiništi a vrchovišti, vlivu hloubky na povrchu (0 cm), ve svrchní vrstvě (0–10 cm) a ve spodní vrstvě (20–30 cm). Vliv odvodnění a hloubky byl také porovnán pro kořeny *Pinus sylvestris*. Dále bylo zkoumáno nejen množství jednotlivých čeledí metanotrofních bakterií a rodu *Candidatus Methylophilum* v různých hloubkách, v přirozeném a odvodněném prostředí a v odlišném typu opadu, ale i vzájemný vztah mezi metanotrofními bakteriemi a metanogenními archaei.

### 5.1. Vliv odvodnění na množství a diverzitu metanotrofních bakterií

Na slatiništi došlo po krátkodobém odvodnění k mírnému zvýšení počtu celkových bakterií, které přetrvalo i po dlouhodobém odvodnění (Obr. 5A). Naopak na vrchovišti se zvýšil počet celkových bakterií až po dlouhodobém odvodnění (Obr. 5C).

Množství metanotrofních bakterií kleslo s odvodněním ve slatiništi (Obr. 5B). Krátkodobé odvodnění snížilo množství metanotrofních bakterií o cca 75%. Naopak na vrchovišti vedlo krátkodobé odvodnění k mírnému nárůstu množství metanotrofních bakterií (Obr. 5D). K prudkému poklesu došlo až po dlouhodobém odvodnění na pouze asi 3% původního množství.

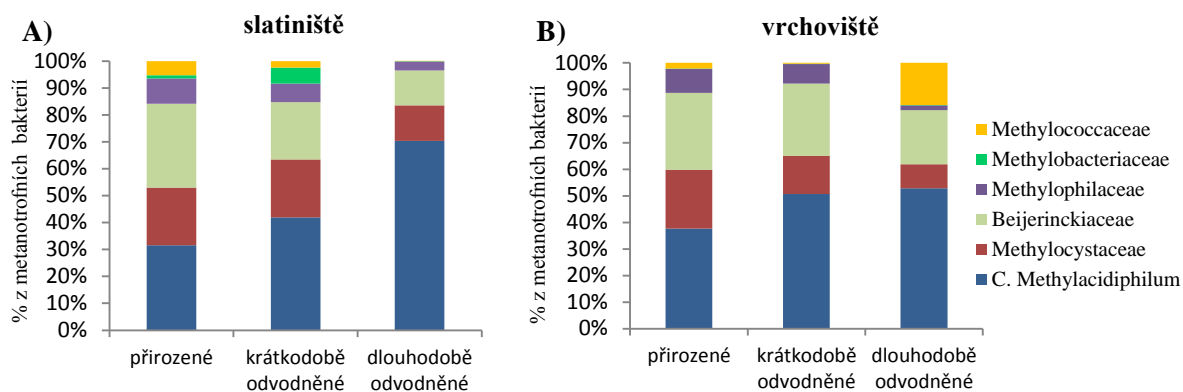


**Obr. 5:** Množství celkových a metanotrofních bakterií na základě kvantifikace genu 16SrRNA a *pmoA* v přirozeném, krátkodobě odvodněném a dlouhodobě odvodněném slatiništi a vrchovišti.

Metanotrofní bakterie tvořily v přirozeném slatiništi přibližně 1,3% a ve vrchovišti asi 2,4% z celkových bakterií.

V přirozeném slatiništi dominoval rod *Candidatus Methyloacidiphilum* a čeleď Beijerinckiaceae v přibližně stejném zastoupení cca 31% (Obr. 6A). Jedinou skupinou, jejíž množství se s odvodněním na slatiništi zvýšilo, je rod *Candidatus Methyloacidiphilum*. Zastoupení tohoto rodu při dlouhodobém odvodnění slatiniště stouplo na asi 70% z celkového počtu metanotrofních bakterií. Naopak počet všech čeledí po odvodnění klesl. Abundance čeledi Beijerinckiaceae se s odvodněním snížila až na cca 12%. Čeleď Methylocystaceae tvořila na přirozeném a krátkodobě odvodněném slatiništi asi 21%, po dlouhodobém odvodnění se množství této čeledi snížilo na cca 12%. Na vrchovišti došlo opět k růstu množství rodu *Candidatus Methyloacidiphilum* a poměrně dost narostla čeleď Methylococcaceae z cca 5% při dlouhodobém odvodnění (Obr. 6B). Naopak zastoupení čeledi Methylocystaceae, Methylophilaceae a Beijerinckiaceae s odvodněním kleslo. Na čeleď Beijerinckiaceae nemělo krátkodobé odvodnění skoro žádný vliv a při dlouhodobém odvodnění se množství metanotrofních bakterií snížilo.



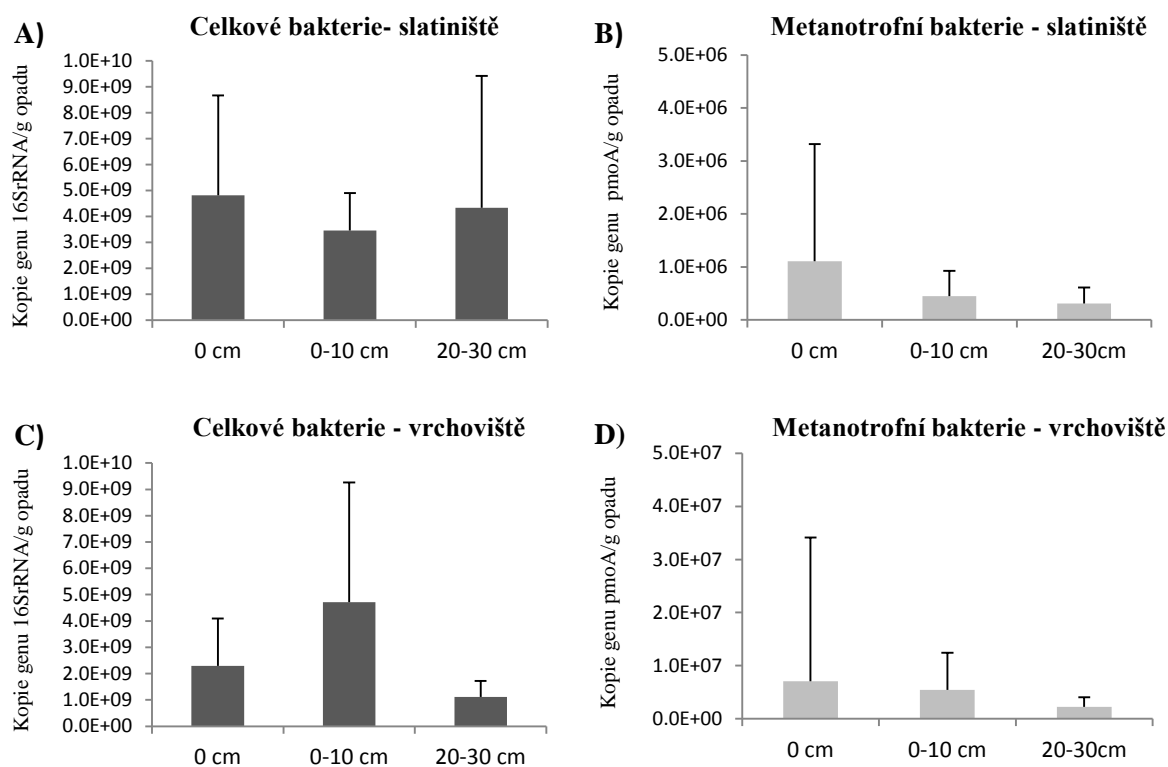


**Obr. 6:** Relativní zastoupení jednotlivých čeledí metanotrofních bakterií ve slatiništi a vrchovišti v přirozených a odvodněných půdách.

## 5.2. Vliv hloubky na množství a diverzitu metanotrofních bakterií

Ve slatiništi neměla hloubka výrazný vliv na celkové bakterie, došlo k malému úbytku bakterií ve svrchní vrstvě rašeliniště, ale ve spodní vrstvě množství celkových bakterií zase nepatrně narostlo (Obr. 7A). Naopak ve vrchovišti ve svrchní vrstvě množství bakterií narostlo zhruba o polovinu oproti povrchu (Obr. 7C). Ve spodní vrstvě se množství celkových bakterií snížilo o cca 76% oproti svrchní vrstvě.

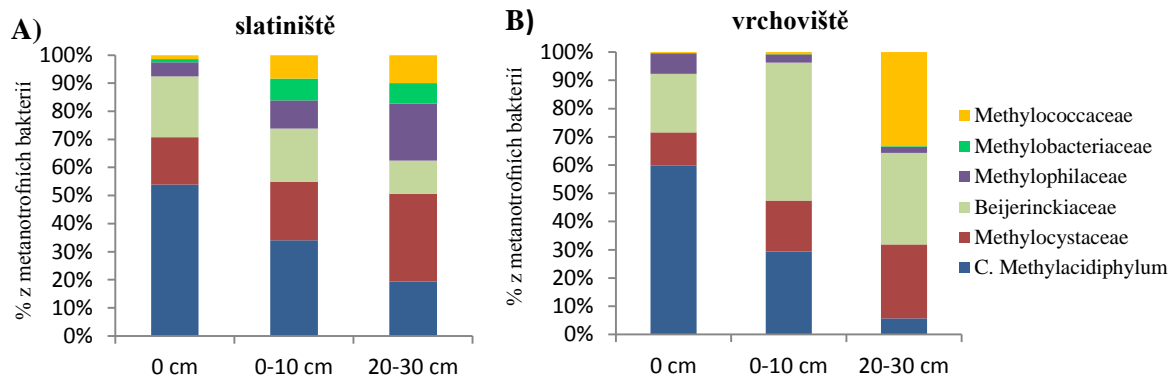
Množství metanotrofních bakterií kleslo s hloubkou ve slatiništi (Obr. 7B). Spodní vrstva obsahovala přibližně 28% oproti množství metanotrofních bakterií na povrchu. Stejně jako na slatiništi, i na vrchovišti množství metanotrofních bakterií kleslo s hloubkou (Obr. 7D). Množství metanotrofních bakterií se i zde snížilo asi na 31% oproti povrchu.



**Obr. 7:** Množství celkových a metanotrofních bakterií na základě kvantifikace genu 16SrRNA a *pmoA* ve dvou odlišných typech rašelinišť v závislosti na různých hloubkách.

Metanotrofní bakterie tvořily ve slatiništi na povrchu asi 1,4% a ve svrchní a spodní vrstvě se množství metanotrofních bakterií snížilo pod 1%. Ve vrchovišti se množství metanotrofních bakterií z celkových bakterií na povrchu a svrchní vrstvě neměnilo, naopak ve spodní vrstvě množství narostlo na asi 4,5%.

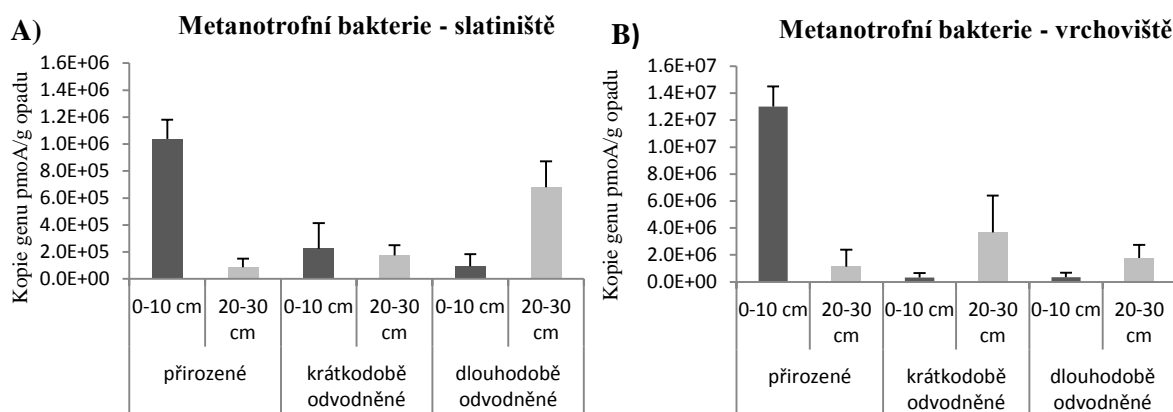
Na přirozeném slatiništi zastoupení čeledi Methylocystaceae, Methylophilaceae, Methylobacteriaceae a Methylococcaceae rostlo s hloubkou (Obr. 8A). Čleď Methylocystaceae na povrchu zaujímala asi 15% metanotrofních bakterií a ve spodní vrstvě došlo k výraznějšímu nárůstu jejího zastoupení na asi 32%. Rod *Candidatus Methylacidiphilum* tvořil na přirozeném slatiništi až cca 54%, a společně s čeledí Beijerinckiaceae klesl s hloubkou. Na vrchovišti se zvýšilo s hloubkou zastoupení čeledě Methylocystaceae a Beijerinckiaceae, která na povrchu tvořila přibližně 18% (Obr. 8B). Ve svrchní vrstvě zastoupení čeledi Beijerinckiaceae narostlo na cca 48% a ve spodní vrstvě nepatrně kleslo asi na 33%. Ke značnému zvýšení došlo u čeledi Methylococcaceae ve spodní vrstvě a to asi z 1% na 33%. Na povrchu vrchoviště dominoval opět rod *Candidatus Methylacidiphilum*, který zaujímal až 60% z metanotrofních bakterií a s hloubkou jeho procentuální zastoupení kleslo až na cca 5% ve spodní vrstvě vrchoviště.



**Obr. 8:** Relativní zastoupení jednotlivých čeledí metanotrofních bakterií ve slatiništi a vrchovišti v různých hloubkách půdního profilu.

### 5.3. Vliv odvodnění a hloubky na metanotrofní bakterie u kořenů *Pinus sylvestris*

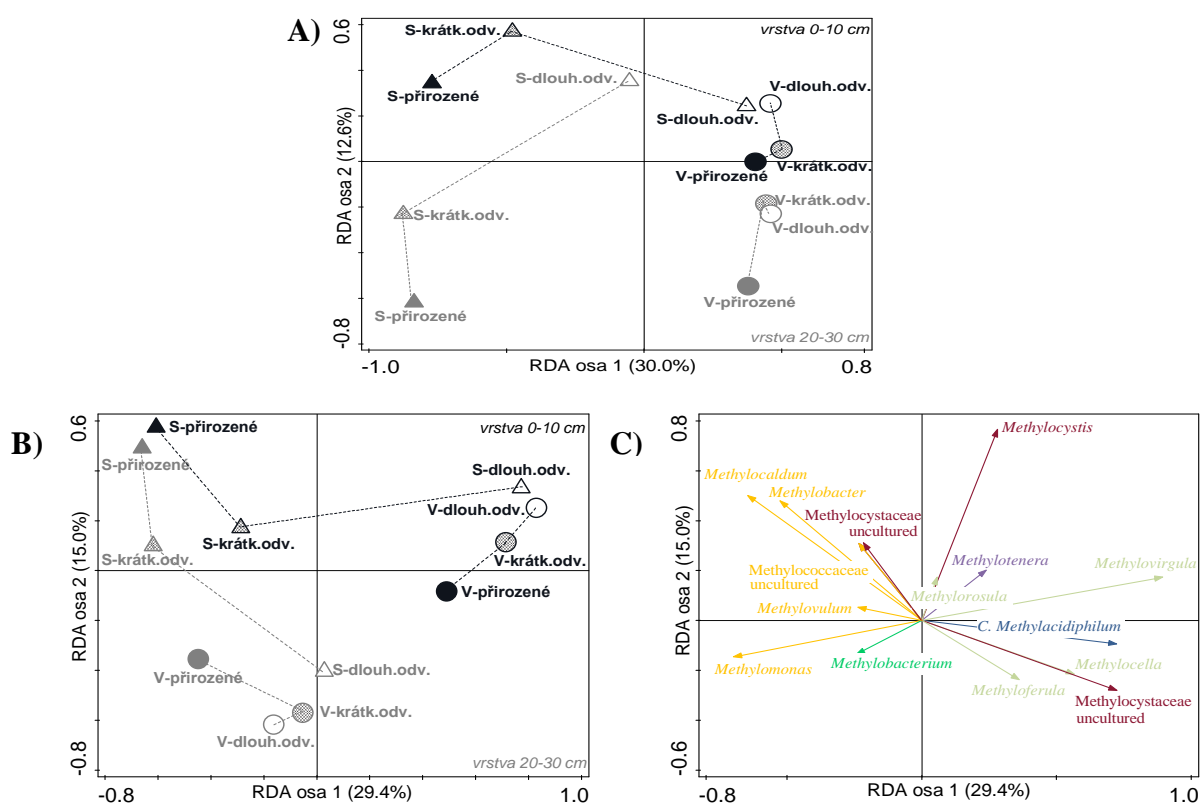
Množství metanotrofních bakterií bylo největší na přirozeném slatiništi ve svrchní vrstvě oproti ostatním vrstvám (Obr. 9A). Ve spodní vrstvě výrazně kleslo množství bakterií. V krátkodobě odvodněném slatiništi došlo k malému poklesu ve spodním půdním horizontu rašeliniště. V dlouhodobě odvodněné části množství metanotrofních bakterií narostlo s hloubkou. Ve vrchovišti (Obr. 9B) bylo zde největší zastoupení metanotrofních bakterií v přirozené svrchní části, ve spodní části opět došlo k výraznému poklesu. Naopak s krátkodobým a dlouhodobým odvodněním ve svrchní vrstvě se množství metanotrofních bakterií snížilo a ve spodní vrstvě došlo k nárůstu množství bakterií.



**Obr. 9:** Vliv odvodnění a hloubky na metanotrofní bakterie u kořenů *Pinus sylvestris* na základě kvantifikace genu *pmoA*.

Redundanční analýza (RDA) u kořenů *Pinus sylvestris* ukázala, že na variabilitu v množství celkových bakterií (Obr. 10A, Tab. III) měl velký vliv typ rašeliniště (21,2% vysvětlené variability,  $P=0,002$ ). Na slatiništi mělo výraznější vliv odvodnění (19,3% vysvětlené variability,  $p=0,01$ ) a menší vliv měla hloubka (9,6% vysvětlené variability), naopak na vrchovišti měla vliv hlavně hloubka (18,3% vysvětlené variability,  $p=0,006$ ) a menší vliv mělo odvodnění (5,5% vysvětlené variability,  $p=0,036$ ).

Na variabilitu v množství metanotrofních bakterií (Obr. 10B,C, Tab. III) mělo podobně jako u množství celkových bakterií na slatiništi výraznější vliv odvodnění (24,8% vysvětlené variability,  $p=0,026$ ) a menší vliv měla hloubka (4% vysvětlené variability,  $p=0,17$ ). Naopak na vrchovišti měla výrazný vliv hloubka (42,0% vysvětlené variability,  $p=0,006$ ) a žádný vliv odvodnění (0% vysvětlené variability,  $p=0,568$ ). Parametry prostředí nejvíce vysvětlující variabilitu metanotrofního společenstva u kořenů *Pinus sylvestris* jsou pH půdy, hladina podzemní vody, koncentrace hořčíku (Mg) a dusíku (N) v půdě (Tab. IV).



**Obr. 10:** Znázornění variability v množství celkových bakterií (A), metanotrofních bakterií (B) a jednotlivých metanotrofních rodů (C) u kořenů *Pinus sylvestris* ve svrchní a spodní vrstvě slatiniště a vrchoviště v závislosti na odvodnění. *S*= slatiniště, *V*= vrchoviště. Rod *C. Methylocidiphilum* – modře, čeled' *Methylocystaceae* – červeně, *Beijerinckiaceae* – šedě, *Methylophilaceae* – fialově, *Methylobacteriaceae* – zeleně, *Methylococcaceae* – žlutě.

**Tab. III:** Testované zdroje variability a % vysvětlené variability v množství celkových bakterií a metanotrofních bakterií u kořenů *Pinus sylvestris*.

Zdroje variability	Slatiniště/vrchoviště	Vysvětlená variabilita (%)	P
<b>Celkové bakterie</b>			
Typ rašeliniště		21,2	0,002
Odvodnění	slatiniště	19,3	0,010
	vrchoviště	5,5	0,036
Hloubka	slatiniště	9,6	0,014
	vrchoviště	18,3	0,006
<b>Metanotrofní bakterie</b>			
Typ rašeliniště		10,8	0,002
Odvodnění	slatiniště	24,8	0,026
	vrchoviště	0	NS
Hloubka	slatiniště	4,0	NS
	vrchoviště	42,0	0,006

NS= *nesignifikantní*

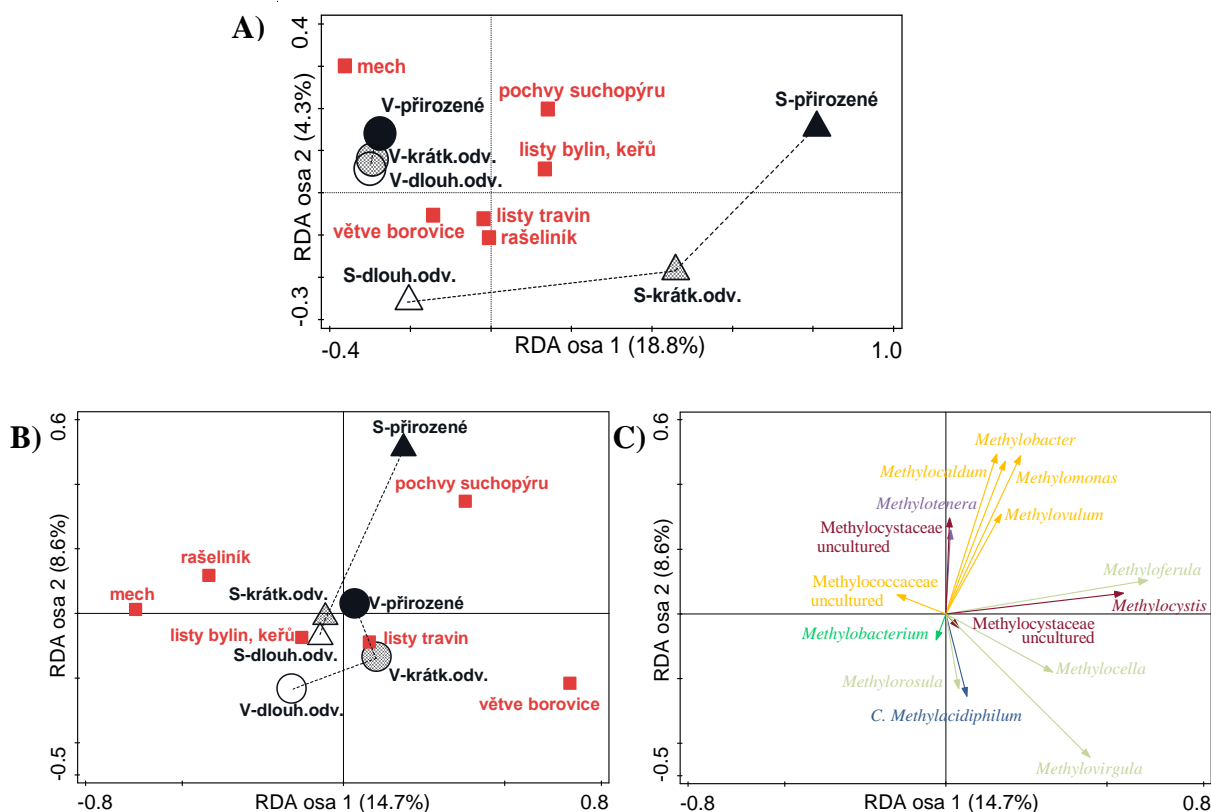
**Tab. IV:** Parametry prostředí nejvíce vysvětlující variabilitu metanotrofního společenstva u kořenů *Pinus sylvestris*.

Parametry	Vysvětlená variabilita (%)	P
pH	18,9	0,014
Vodní hladina	15,0	0,014
Hořčík	7,8	0,037
Dusík	7,8	0,037

#### 5.4. Vliv různého typu opadu na množství a diverzitu metanotrofních bakterií

RDA analýza povrchové vrstvy rašeliniště ukázala, že na variabilitu v množství celkových bakterií (Obr. 11A, Tab. V) měl vliv typ rašeliniště (10,9% vysvětlené variability,  $p=0,002$ ). Na slatiništi mělo výraznější vliv odvodnění (18,3% vysvětlené variability,  $p=0,002$ ), zatímco na vrchovišti měl významný vliv typ opadu (10,9% vysvětlené variability,  $p=0,002$ ).

Na variabilitu v množství metanotrofních bakterií (Obr. 11B,C, Tab. V) převládal vliv typu opadu na slatiništi i vrchovišti (14,2% a 23,4% vysvětlené variability,  $p=0,002$ ). Parametry prostředí nejvíce vysvětlující variabilitu metanotrofního společenstva u povrchové vrstvy rašeliniště je výška hladiny podzemní vody, koncentrace dusík (N) a fosfor (P) a pH půdy (Tab VI).



**Obr. 11:** Znázornění variability v množství celkových bakterií (A), metanotrofních bakterií (B) a jednotlivých metanotrofních rodů (C) v povrchové vrstvě slatiniště a vrchoviště v závislosti na odvodnění a typu substrátu. *S*= slatiniště, *V*= vrchoviště. Rod *C. Methylacidiphilum* – modře, čeleď *Methylocystaceae* – červeně, *Beijerinckiaceae* – šedě, *Methylophilaceae* – fialově, *Methylobacteriaceae* – zeleně, *Methylococcaceae* – žlutě.

**Tab. V:** Testované zdroje variability a % celkové variability v množství a zastoupení celkových a metanotrofních bakterií v povrchové vrstvě rašeliniště.

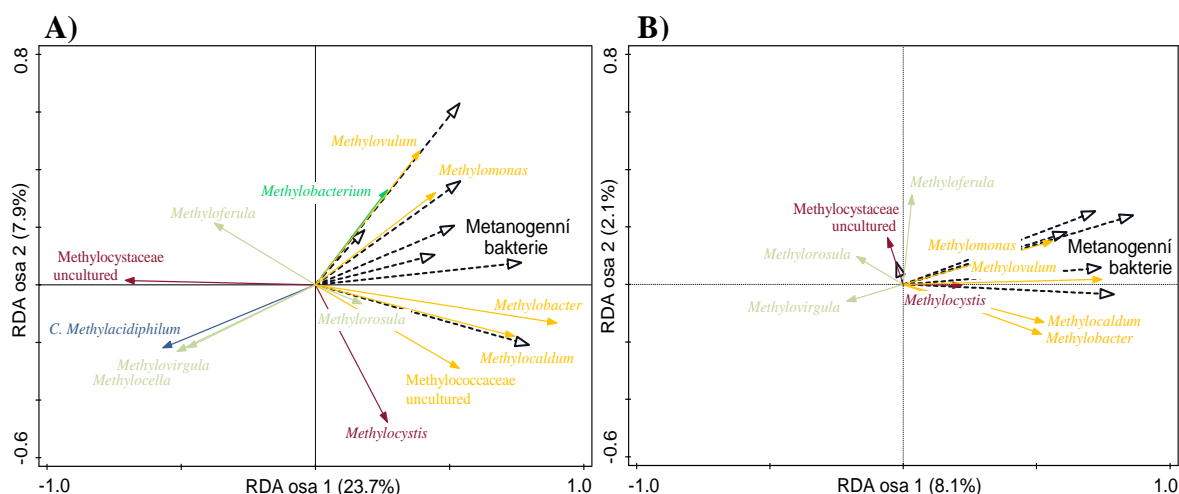
Zdroje variability	Slatiniště/Vrchoviště	Vysvětlená variabilita (%)	P
<b>Celkové bakterie</b>			
Typ rašeliniště		10,9	0,002
Odvodnění	slatiniště	18,3	0,002
	vrchoviště	4,4	0,002
Typ opadu	slatiniště	3,6	0,010
	vrchoviště	10,9	0,002
<b>Metanotrofní bakterie</b>			
Typ rašeliniště		1,7	0,004
Odvodnění	slatiniště	6,3	0,002
	vrchoviště	3,8	0,008
Typ opadu	slatiniště	14,2	0,002
	vrchoviště	23,4	0,002

**Tab. VI:** Parametry prostředí nejvíce vysvětlující variabilitu metanotrofního společenstva.

Parametry	Vysvětlená variabilita (%)	P
Vodní hladina	4,4	0,028
Fosfor	3,3	0,028
Dusík	3,2	0,028
pH	2,6	0,035

### 5.5. Vzájemný vztah metanotrofních bakterií a metanogenních archaeí

RDA analýza metanotrofních bakterií u kořenů *Pinus sylvestris* (Obr. 12A) ukázala, že 23,2% variability v metanotrofním společenstvu může být vysvětleno metanogenním společenstvem. V povrchové vrstvě rašeliniště (Obr. 12B) mohlo metanogenní společenstvo vysvětlit 5,9% variability u metanotrofních bakterií. Pozitivní korelace byla mezi výskytem metanogenních archaeí a metanotrofních bakterií čeledi Methylococcaceae ( $r > 0,5$ ).



**Obr. 12:** Znárodnění vztahu metanotrofních bakterií a metanogenních archaeí u kořenů *Pinus sylvestris* (A) a v povrchové vrstvě rašeliniště (B). Rod *C. Methylacidiphilum* – modře, čeleď *Methylocystaceae* – červeně, *Beijerinckiaceae* – šedě, *Methylophilaceae* – fialově, *Methylobacteriaceae* – zeleně, *Methylococcaceae* – žlutě.

V tabulce VII jsou vybrány korelační koeficienty mezi metanotrofními bakteriemi a metanogenními archaea, které se ukázaly jako statisticky významné ( $p \leq 0,05$ ). Metanotrofní rod *Methylovulum* (čeleď *Methylococcaceae*) významně koreloval s metanogenní čeledí *Methanomicrobiales*. Další pozitivní korelace byla potvrzena mezi metanotrofním rodem *Methylobacter* (čeleď *Methylococcaceae*) a metanogenní čeledí *Methanomicrobiales*. Mezi metanotrofním rodem *Methylomonas* (čeleď *Methylococcaceae*) a metanogenní čeledí *Methanococcales* se ukázala signifikantní negativní korelace.

**Tab. VII:** Statisticky významné korelace mezi metanotrofními bakteriemi a metanogenními archaea v rašeliništi (vybrány korelace, kde  $n > 3$ ).

Čeledě metanogenních archaeí	Rody metanotrofních bakterií					
	Methylocystis	Methylobacter	Methylovulum	Methylomonas	Methylotenera	C.Methylacidi- philum
<b>Methanococcales</b>	NS	NS	NS	-0,52 (n = 17)	NS	NS
<b>Methanomicrobiales</b>	NS	0,75 (n = 9)	0,96 (n = 5)	NS	NS	NS

*n* = počet bodů, ze kterých byla počítána korelace

NS = nesignifikantní



## 6. Diskuze

### 6.1. Vliv odvodnění slatiniště a vrchoviště na metanotrofní bakterie

Předchozí studie ukázaly, že hladina podzemní vody je jeden z nejdůležitějších faktorů ovlivňující složení a funkci mikrobiálních společenstev a s tím i související oxidaci metanu (Kettunen et al., 1999, Jaatinen et al., 2007, Urbanová et al., 2015). Naše data ukazují, že na minerotrofním slatiništi došlo po krátkodobém odvodnění k rychlému zvýšení množství celkových bakterií, které se už dále výrazně neměnilo. Naopak u vrchoviště mělo krátkodobé odvodnění na množství celkových bakterií velmi malý vliv, množství celkových bakterií narostlo až po dlouhodobém odvodnění. To je ve shodě se studií Jaatinen et al., (2007), kde změny mezi přirozeným a krátkodobě odvodněným rašeliništěm byly malé. Odlišnost reakce bakterií na minerotrofním slatiništi a ombrotrofním vrchovišti napovídá, že reakce celkových bakterií na změněné podmínky (přirozené → krátkodobě odvodněné vrchoviště) nejsou zřejmě spojeny pouze se změnou hladiny vody, ale i jinými faktory prostředí. Může spíše souviset se změnou vegetace, která se s odvodněním změnila od trav a rašelínků po lesní vegetaci (Jaatinen et al., 2007).

Podle Yrjälä et al., (2011) je odvodnění a pokles vodní hladiny spojen s vyšší aktivitou aerobních metanotrofních bakterií a naopak se snižuje aktivita metanogenních archaeí. V našich studiích jsme neměřili přímo aktivitu metanotrofních bakterií, ale naše data prokazatelně ukazují, že množství metanotrofních bakterií s odvodněním výrazně klesá. Opět jsme zaznamenali odlišnou odpověď slatiniště a vrchoviště, kdy ve slatiništi nastal pokles již po krátkodobém odvodnění, naopak ve vrchovišti až při dlouhodobém odvodnění. Hlavním důvodem poklesu může být i pokles metanogenních archaeí, tedy hlavních producentů metanu pro metanotrofní bakterie (Lísalová, 2016). Pokud totiž metanotrofní bakterie nemají dostatek substrátu pro oxidaci, většina metanotrofních bakterií umírá bez ohledu na zvýšené okysličení půdy vlivem odvodnění (Juottonen et al., 2012). Jiným důvodem může být i fakt, že slatiniště bývá obecně citlivější ke změnám prostředí po odvodnění, a proto i metanotrofní společenstvo reaguje na odvodnění na slatiništi rychleji a výrazněji než na vrchovišti.

Odvodnění mělo zásadní vliv i na určité skupiny metanotrofních bakterií. Podle našich dat ve slatiništi i vrchovišti dominují metanotrofní bakterie rodu *Candidatus Methyloacidiphilum* a dvě nejhojnější čeledě Beijerinckiaceae a Methylocystaceae. Knief., (2015) uvádí, že bakterie rodu *Candidatus Methyloacidiphilum* a další izoláty byly vyizolovány z kyselých teplých oblastí a mají schopnost adaptace na různé pH a koncentrace

kyslíku. Naše výsledky tato pozorování potvrzují, jelikož se bakterie rodu *Candidatus Methyloacidiphilum* vyskytují v největším množství v dlouhodobě odvodněném slatiništi a vrchovišti, kde jim může vyhovovat jak kyselé pH, které se s odvodněním snížilo (slatiniště pH 5,9–3,8, vrchoviště pH 4,4–3,6), tak vyšší koncentrace kyslíku (Straková et al., 2010). Naopak zastoupení čeledí Methylocystaceae a Beijerinckiaceae po odvodnění výrazně pokleslo. Obě tyto čeledě patří do skupiny metanotrofních bakterií typu II, tedy Alphaproteobacteria. Podle dřívější studie Ma et al., (2013) mají metanotrofní bakterie typu II tendenci být více aktivní v prostředí s nižší koncentrací kyslíku a vyšší koncentrací metanu oproti typu I, což by mohlo vysvětlit jejich pokles v odvodněných okysličených plochách. Oproti tomu bakteriím z čeledě Methylococcaceae (typ I, Gammaproteobacteria) vyšší koncentrace kyslíku nevadí, což mohlo vést k jejímu relativnímu nárůstu v dlouhodobě odvodněném vrchovišti (Amaral et al., 1995).

## **6.2. Vliv hloubky na metanotrofní bakterie ve slatiništi a vrchovišti**

Aktivita metanotrofních bakterií závisí na dostupnosti substrátu v půdě. Činnost metanotrofních bakterií je tedy zpravidla nejvyšší na rozhraní mezi aerobní a anaerobní zónou, která se vyskytuje v horních vrstvách rašeliniště. Metan je produkován v hlubších anaerobních vrstvách rašeliny a vyprodukovaný metan stoupá k povrchu, kde je oxidován. To potvrzují i naše výsledky, které ukazují, že s hloubkou slatiniště i vrchoviště množství metanotrofních bakterií klesá, což se shoduje s výsledky Yrjälä et al., (2011), kde je největší množství metanotrofních bakterií na povrchu rašeliniště vysvětleno korelací mezi metanotrofními bakteriemi a určitými druhy rašeliníků. Pokles metanotrofních bakterií v našich výsledcích má opačný trend než metanogenní archaea, kde se množství metanogenních archaea s hloubkou slatiniště a vrchoviště zvyšovalo kvůli dostatku substrátu a větší anaerobioze (více H<sub>2</sub>, org. kyselin) pro produkci metanu (Lísalová, 2016). Podle našich dat mělo odvodnění výraznější vliv na slatiniště a menší vliv měla hloubka. Naopak na vrchovišti měla větší vliv hloubka a menší vliv mělo odvodnění. Naše výsledky se shodují se studií Urbanová et al., (2017) pro mikrobiální charakteristiky i chemické parametry půdy. To ukazuje větší stabilitu vrchoviště oproti slatiništi, které je citlivé na změnu vodního režimu. Tedy hypotéza větších změn na živinově bohatším slatiništi byla potvrzena.

Hloubka měla zásadní vliv na relativní zastoupení jednotlivých čeledí a rodů metanotrofních bakterií na slatiništi i vrchovišti. Naše výsledky ukazují, že i v anaerobní části (20-30 cm) se malý počet metanotrofních bakterií vyskytuje na slatiništi i vrchovišti,

ale dominují jiné čeledě než na povrchu. To, že výskyt metanotrofních bakterií v anaerobním prostředí rašeliniště není výjimkou, potvrzuje i práce McDonald et al., (1999), kde oxidační aktivita byla detekována v celém půdním profilu s převahou v horní vrstvě půdy. Autor této práce uvažoval, že detekce metanotrofních bakterií v hlubších vrstvách byla způsobena přívodem kyslíku kořeny rostlin.

Podle našich dat mělo odvodnění rašeliniště větší vliv na spodní vrstvu slatiniště i vrchoviště u kořenů *Pinus sylvestris*, kde došlo k nárůstu množství a diverzity metanotrofního společenstva. Kořeny *Pinus sylvestris* jsou zakořeněny hluboko v půdním profilu rašelinišť a můžou dosahovat do anaerobní vrstvy a poskytovat dostatek kyslíku i v anaerobních zónách. Vegetace a kvalita půdní organické hmoty tedy hrají důležitou roli ve výskytu jednotlivých mikrobiálních společenstev (Jaatinen et al., 2007).

Z našich výsledků je patrné, že rodu *Candidatus Methylocandidiphilum* a čeledi Beijerinckiaceae vyhovuje spíše povrchová a svrchní vrstva, kdežto ostatním čeledím vyhovuje spíše vrstva anaerobnější. Nárůst metanotrofních čeledí ve spodních vrstvách rašeliniště může být způsoben tím, že tyto druhy nemusí ke své aktivitě vyžadovat velkou koncentraci kyslíku, ale spíše metanu, a významný vliv může mít také hladina podzemní vody. Dřívější studie ukazují, že oxidace metanu metanotrofními bakteriemi může probíhat i v nepřítomnosti kyslíku nebo při alespoň velmi malých koncentracích kyslíku a velkou koncentrací metanu produkovaného metanogenními archaei (Sundh et al., 2005, Borrel et al., 2011).

Podle některých studií se ve slatiništi vyskytují pouze metanotrofní bakterie typu I, zatímco ve vrchovišti se vyskytuje typ I i typ II (Petoniemi, 2010). Naše data ale ukazují, že typ I a typ II nachází jak ve slatiništi, tak na vrchovišti, i když v různém relativním množství. Můžeme zatím pouze spekulovat, že výskyt metanotrofních bakterií typu II ve slatiništi můžou způsobovat např. některé chemické vlastnosti půdy a jejich fixace, která je větší právě u metanotrofních bakterií typu II, vyšší míra živin nebo určité rostlinné druhy (Larmola et al., 2014).

### **6.3. Vliv různého typu opadu na metanotrofní bakterie**

Již v dřívějších letech bylo prokázáno, že okolo 55–85% emisí metanu z rašelinišť může být zprostředkováno rostlinami (Goraj et al., 2013). Podle našich dat se zdá, že na variabilitu v množství metanotrofních bakterií v povrchové vrstvě měl silný vliv typ opadu na obou typech rašelinišť, což se shoduje se Straková et al., (2011) a Peltoniemi et al.,

(2012). Naše výsledky ukazují, že metanotrofním bakteriím nejvíce vyhovují pochvy suchopýra a překvapivě i větve borovice. Přítomnost metanotrofních bakterií, zejména čeledi *Methylococcaceae*, v pochvách suchopýra může být vysvětlena tvořením trsů, které poskytují příznivé mikroprostředí pro růst, rozklad a koloběh živin (Saarnio et al., 2004). V minulých letech bylo zjištěno, že kromě oxidace metanu v rhizosféře, se metanotrofní bakterie mohou také vyskytovat v rostlinné tkáni, kde využívají metan tekoucí přes rostlinné pletivo (Goraj et al., 2013). V našich datech vysvětlovaly variabilitu metanotrofního společenstva i parametry jako dusík a fosfor, což by mohlo být důvodem vyššího výskytu metanotrofních bakterií v opadu suchopýra (Chapin et al., 1986).

#### **6.4. Vzájemný vztah metanotrofních bakterií a metanogenních archaeí**

Metanogenní archaea jsou skupinou mikroorganismů, které jsou schopny produkovat metan v anaerobní části rašeliniště, který je poté využíván metanotrofními bakteriemi (Lai, 2009). Existuje tedy nějaká korelace mezi určitými druhy metanogenních archaeí a metanotrofních bakterií. Naše výsledky ukazují, že signifikantní pozitivní korelace je mezi metanotrofní čeledí *Methylococcaceae* a metanogenními archaea.

Významné korelace mezi metanotrofními bakteriemi a metanogenními archaea byla potvrzena již v dřívějších studiích (Bao et al., 2014, Nguyen et al., 2015). Naše výsledky ukazují signifikantní pozitivní korelace mezi metanogenní čeledí *Methanomicrobiales* a metanotrofními rody *Methylobacter*, *Methylovulum* (čeleď *Methylococcaceae*), což se shoduje s prací Nguyen et al., (2015). Tyto korelace by mohly vysvětlovat nárůst množství metanotrofní čeledi *Methylococcaceae* ve spodní části vrchoviště (20-30 cm) jak už bylo zmíněno výše. Naše výsledky ukazují na negativní korelaci mezi metanotrofním rodem *Methylomonas* (čeleď *Methylococcaceae*) a metanogenní čeledí *Methanococcales*.

Je třeba ale zdůraznit, že tyto korelace mohou být nepřímé, a to skrze např. změny v kvalitě půdní organické hmoty nebo skrze odlišné substráty produkované jinými mikroorganismy. Pro prokázání přímých vztahů určitých skupin metanotrofních bakterií a metanogenních archaeí by bylo nutné provést např. pokusy s umělými směsnými společenstvy metanotrofů a metanogenů v definovaných podmínkách.

## 7. Závěr

Naše výsledky ukázaly, že odvodnění rašeliniště ovlivňuje jak množství a diverzitu celkových bakterií, tak metanotrofních bakterií na obou typech rašelinišť. Nejspíše v důsledku poklesu metanogenních archaeí odvodněním došlo k poklesu množství metanotrofních bakterií, které tak nemají dostatek substrátu pro oxidaci. Změny v množství a diverzitě metanotrofních bakterií po odvodnění závisí i na typu rašelinišť. Slatiniště se ukazuje jako citlivější na změny prostředí oproti vrchovišti, které je více stabilní.

Hloubka rašeliniště má také výrazný vliv na metanotrofní společenstvo. Metanotrofní bakterie se nejvíce vyskytují v prostředí s velkou koncentrací kyslíku, a tak množství metanotrofního společenstva s hloubkou kleslo. Výsledky také ukázaly, že odvodnění mělo větší vliv na spodní vrstvu rašeliniště, kde se množství metanotrofních bakterií zvýšilo. Jejich přítomnost ve spodní vrstvě může být způsobena kořeny rostlin, které poskytují kyslík, nebo korelací mezi některými druhy metanotrofních bakterií a metanogenních archaeí.

Na variabilitu v množství metanotrofních bakterií v povrchové vrstvě slatiniště a vrchoviště měl v obou případech silný vliv typ opadu. Naše data ukázaly, že významné množství metanotrofních bakterií se vyskytuje i v opadu suchupýra a ve větvích borovice lesní.

## 8. Literární zdroje

Amaral, J. A., Archambault, C., Richards, S. R., Knowles, R. (1995). Denitrification associated with groups I and II methanotrophs in a gradient enrichment system. *FEMS Microbiology Ecology* 18: 289–298.

Anders, H., Power, J. F., MacKenzie, A. D., Lagutin, K., Vyssitski, M., Hanseen, E., Moreau, J. W., Skott, M. B. (2015). *Limisphaera ngatamarikiensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, pink-pigmented coccus isolated from subaqueous mud of a geothermal hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 1114–1121.

Bao, Q. L., Chen, Z., Xiao, K. Q., Yao, H. (2014). Methane production and methanogenic archaeal communities in two types of paddy soil amended with different amounts of rice. *FEMS Microbiology Ecology* 88: 372–385.

Borrel, G., Jézéquel, D., Biderre-Petit, C., Morel-Desrosiers, N., Morel, J. P., Peyret, P., Fonty, G., Lehours, A. C. (2011). Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Research in Microbiology* 162: 832–847.

Bowman, J. (2006). The Methanotrophs - The families Methylococcaceae and Methylocystaceae. *The Prokaryotes, Alpha and Beta Subclasses (Third Edition)*. Dworkin, M., et al (Eds). Springer. New York: 266–289.

Bowman, J. (2014). The family Methylococcaceae. *The Prokaryotes, Gammaproteobacteria (Fourth Edition)*. Rosenberg, E., et al. (Eds). Springer. New York: 411–441.

Brablcová, L., Buriánková, I., Badurová, P., Chaudhary, P. P., Rulík, M. (2014). Methanogenic archaea diversity in hyporheic sediments of a small lowland stream. *Anaerobe* 32: 24–31.

Calhoun, A., King, G. M. (1997). Regulation of root-associated methanotrophy by oxygen availability in the rhizosphere of two aquatic macrophytes. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (8): 3051–3058.

Chapin, F. S., Shaver, G. R., Kedrowski, R. A. (1986). Environmental controls over carbon, nitrogen and phosphorus fractions in *Eriophorum vaginatum* in Alaskan Tussock tundra. *Journal of Ecology* 74: 167-195.

Conrad, R. (2009). The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports* 1 (5): 285–292.

Couwenberg, J. (2009). Methane emissions from peat soils (organic soils, histosols) - facts, MRV-ability, emission factors. Wetlands International. Greifswald University. Bonn.

Doronina, N., Kaparullina, E., Trotsenko, Y. (2014). The family Methylophilaceae. The Prokaryotes, Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria (Fourth Edition). Rosenberg E., et al. (Eds). Springer. New York: 869-880.

Dubey, S. K. (2005). Microbial ecology of methane emission in rice agroecosystem: A review. *Applied Ecology and Environmental Research* 3 (2): 1-27.

Erikstad, H. A., Birkeland, N. K. (2015). Draft genome sequence of *Candidatus Methylacidiphilum kamchatkense* strain Kam1, a thermoacidophilic methanotrophic Verrucomicrobium. *Genome Announcements* 3 (2).

Fazli, P., Man, H. C., Shah, U. K. M, Idris, A. (2013). Characteristics of methanogens and methanotrophs in rice fields: A review. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.* 21 (1): 3-17.

Goraj, W., Kuźniar, A., Urban, D., Pietrzykowska, K., Stępniewska, Z. (2013). Influence of plant composition on methane emission from Moszne peatland. *Journal of Ecological Engineering* 14 (1): 53-57.

Gratzová, K. (2013). Produkce a oxidace metanu v půdách rašelinných smrčín ovlivněných odvodněním, revitalizací a přísunem dusíku. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta. Univerzita Palackého. Olomouc.

- Hanson, R. S., Hanson, T. E. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews* 60 (2): 439–471.
- Islam, T., Jensen, S., Reigstad, L. J., Larsen, Ø., Birkeland, N. K. (2007). Methane oxidation at 55°C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the Verrucomicrobia phylum. *PNAS* (105): 300-304.
- Islam, T., Larsen, Ø., Torsvik, V., Øvreås, L., Panosyan, H., Murrell, J. C., Birkeland, N. K., Bodrossy, L. (2015). Novel methanotrophs of the family *Methylococcaceae* from different geographical regions and habitats. *Microorganisms* 3: 484-499.
- Jaatinen, K., Tuittila, E. S., Laine, J., Yrjälä, K., Fritze, H. (2005). Methane-oxidizing bacteria in a finnish raised mire complex: Effects of site fertility and drainage. *Microbial Ecology* 50: 429-439.
- Jaatinen, K., Fritze, H., Laine, J., Laiho, R. (2007). Effects of short- and long-term water-level drawdown on the populations and activity of aerobic decomposers in a boreal peatland. *Global Change Biology* 13: 491–510.
- Juottonen, H., Hynninen, A., Nieminen, M., Tuomivirta, T. T., Tuittila, E. S., Nousiainen, H., Kell, D. K., Yrjälä, K., Tervahauta, A., Fritze, H. (2012). Methane-cycling microbial communities and methane emission in natural and restored peatlands. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (17): 6386–6389.
- Kelly, D. P., McDonald, I. R., Wood, A. P. (2014). The family Methylobacteriaceae. *The Prokaryotes, Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria (Fourth Edition)*. Rosenberg E., et al. (Eds). Springer. New York: 313-340.
- 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 Biology and Biochemistry* 31: 1741-1749.



Khadem, A. F., Teeseling, M. C. F., Niftrik, L., Jetten, M., Camp, H. J. M. O., Pol, A. (2012). Genomic and physiological analysis of carbon storage in the verrucomicrobial methanotroph “*Ca. Methylophilum fumariolicum*” SolV. *Frontiers in Microbiology* 3: 345.

Knief, C. (2015). Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on *pmoA* as molecular marker. *Frontiers in Microbiology* 6: 1346.

Kráčmarová, A. (2014). Fyziologie a ekologie metanotrofních a metylotrofních bakterií. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta. Jihočeská univerzita. České Budějovice.

Krause, S., Niklaus, P. A., Morcillo, S. B., Franke, M. M., Luke, C., Reim, A., Bodelier, P. L. E. (2015). Compositional and functional stability of aerobic methane consuming communities in drained and rewetted peat meadows. *FEMS Microbiology Ecology* 91 (11): 119.

Lai, D. I. F. (2009). Methane dynamics in northern peatlands: A review. *Pedosphere*. 19 (4): 409–421.

Laiho, R. (2006). Decomposition in peatlands: reconciling seemingly contrasting results on the impacts of lowered water levels. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 2011–2024.

Landry, J., Rochefort, L. (2012). The drainage of peatlands: impacts and rewetting techniques. Peatland Ecology Research Group. Université Laval. Québec.

Larmola, T., Leppänen, S. M., Tuittila, E. S., Aarva, M., Merilä, P., Fritze, H., Tiirola, M. (2014). Methanotrophy induces nitrogen fixation during peatland development. *PNAS* 111 (2): 734-739.

Liao, J. C., Mi, L., Pontrelli, S., Luo, S. (2016). Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. *Nature Reviews Microbiology* 14: 288-304.

Liebner, S., Zeyer, J., Wagner, D., Schubert, C., Pfeiffer, E. M., Knoblauch, C. (2011). Methane oxidation associated with submerged brown mosses reduces methane emissions from Siberian polygonal tundra. *Journal of Ecology* 99 (4): 914-922.

Lísalová, O. (2016). Vliv odvodnění a vegetace na množství a diverzitu metanogenů v rašeliništích. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta. Jihočeská univerzita. České Budějovice.

Ma, K., Conrad, R., Lu., Y. (2013). Dry/wet cycles change the activity and population dynamics of methanotrophs in rice field soil. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (16): 4932–4939.

McDonald, I., Upton, M., Hall, G., Pickup, R. W., Edwards, C., Saunders, J. R., Ritchie, D. A., Murrell, J. C. (1999). Molecular ecological analysis of methanogens and methanotrophs in blanket bog peat. *Microbial Ecology* 38: 225–233.

Mohammadi, S., Pol, A., Alen, T. A., Jetten, M., Camp, H. J. M. O. (2016). *Methylophilum fumariolicum* SoIV, a thermoacidophilic ‘Knallgas’ methanotroph with both an oxygen-sensitive and -insensitive hydrogenase. *The ISME Journal* 9: 1-14.

Nguyen, S. G., Guevarra, R. B., Kim, J., Ho, C. T., Trinh, M. V., Unno, T. (2015). Impacts of initial fertilizers and irrigation systems on paddy methanogens and methane emission. *Water Air Soil Pollut* 226: 309.

Orita, I., Sato, T., Yorimoto, H., Kato, N., Atomi, H., Omanaka, T., Sakai, Y. (2006). The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway in the archaeon *thermococcus kodakaraensis*. *Journal of Bacteriology* 188 (13): 4698-4704.

Peltoniemi, K. (2010). Aerobic carbon-cycle related microbial communities in boreal peatlands: responses to water-level drawdown. Academic dissertation. Faculty of Biological and Environmental Sciences. University of Helsinki. Helsinki.

Peltoniemi, K., Straková, P., Fritze, H., Iráizoz, P. A., Pennanen, T., Laiho, R. (2012). How water-level drawdown modifies litter decomposing fungal and actinobacterial communities in boreal peatlands. *Soil Biology & Biochemistry* 51: 20-34.

Putkinen, A., Larmola, T., Tuomivirta, T., Siljanen, H. M. P., Bodrossy, L., Tuittila, E. S., Fritze, H. (2014). Peatland succession induces a shift in the community composition of Sphagnum-associated active methanotrophs. *FEMS Microbiology Ecology* 88: 596–611.

Qiu, Y. L., Kuang, X. Z., Shi, X. S., Yuan, X. Z., Guo, R. B. (2014). *Terrimicrobium sacchariphilum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium of the class *Spartobacteria* in the phylum Verrucomicrobia isolated from a rice paddy field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64: 1718-1723.

Saarnio, S., Wittenmayer, L., Merbach, W. (2004). Rhizospheric exudation of *Eriophorum vaginatum* L. – Potential link to methanogenesis. *Plant and Soil* 267: 343–355.

Stępniewska, Z., Goraj, W., Kuźniar, A. (2014). Transformation of methane in peatland environments. *Forest Research Papers* 75 (1): 101–110.

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., Niemi, R. M., Freeman, C., Peltoniemi, K., Toberman, H., Heiskanen, I., Fritze, H., Laiho, R. (2011). Litter type affects the activity of aerobic decomposers in a boreal peatland more than site nutrient and water table regimes. *Biogeosciences* 8: 2741–2755.

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., Bastviken, D., Tranvik, L. J. (2005). Abundance, activity, and community structure of pelagic methane-oxidizing bacteria in temperate lakes. *Applied and Environmental microbiology* 71 (11): 6746–6752.

Tanneberger, F., Wichtmann, W. (2011). Carbon credits from peatland rewetting. *Climate – biodiversity – land use*. Schweizerbart Science Publishers. Stuttgart.

Timmis, K. N. (2010). *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Helmholtz Centre for Infection Research. Environmental Microbiology Laboratory. Springer Berlin Heidelberg, Berlin.

Urbanová, Z. (2012). Effect of drainage and restoration on the ecology of peatlands in the Šumava Mountains. Ph.D. Thesis Series, No. 10. Faculty of Science. University of South Bohemia. České Budějovice.

Urbanová, Z., Bárta, J. (2015). Effects of long-term drainage on microbial community composition vary between peatland types. *Soil Biology & Biochemistry* 92: 16–26.

Urbanová, Z., Straková, P., Kaštovská, E. (2017). Response of peat biogeochemistry and soil organic matter quality to rewetting in bogs and spruce swamp forests. Manuscript Details (EJSOBI\_79). Department of Ecosystem Biology. University of South Bohemia. České Budějovice.

Vecherskaya, M. S., Galchenko, V. F., Sokolova, E. N., Samarkin, V. A. (1993). Activity and species composition of aerobic communities in tundra soils. *Current Microbiology* 27 (3): 181–184.

Webb, H. K., Ng, H. J., Ivanova, E. P. (2014). The family Methylocystaceae. *The Prokaryotes, Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria (Fourth Edition)*. Rosenberg E., et al. (Eds). Springer. New York: 341-347.

Whittle, A., Gallego-Sala, A. V. (2016). Vulnerability of the peatland carbon sink to sea level rise. *Scientific Reports* 6: 28758.

Wu, M. L., Teeseling, M. C. F., Willems, M. J. R., Donselaar, E. G., Klingl, A., Rachel, R., GeertsGeer, W. J. C., Jetten, M. S. M., Strous, M., Niftrik, L. (2012). Ultrastructure of the denitrifying methanotroph “*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*,” a novel polygon-shaped bacterium. *Journal of Bacteriology* 194 (2): 284-291.

Yrjälä, K., Tuomivirta, T., Huottonen, H., Putkinen, A., Lappi, K., Tuittila, E. S., Penttilä, T., Minkkinen, K., Laine, J., Peltoniemi, K., Fritze, H. (2011). CH<sub>4</sub> production and oxidation processes in a boreal fen ecosystem after long-term water table drawdown. *Global Change Biology* 17: 1311–1320.