

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Biologická fakulta**



**Struktura mikrobiálního společenstva pastevní půdy ve vztahu  
k vlivu pasených zvířat – s důrazem na skupinu *Archaea***

**Magisterská diplomová práce**

**Bc. Anna Němcová**

**2007**

**Školitelka: RNDr. Dana Elhottová, Ph.D.**

**Školitel specialista: Prof. Ing. Miloslav Šimek, CSc.**

**Němcová, A., 2007. Struktura mikrobiálního společenstva pastevní půdy ve vztahu k vlivu pasených zvířat – s důrazem na skupinu *Archaea* [The structure of microbial community in pasture soil as related to animal impact – with emphasis on the group *Archaea*. Mgr. Thesis, in Czech] – 55 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.**

### **Anotace**

The aim of this thesis was to characterize the group of *Archaea* within the total microbial community in soils from three areas differently impacted by grazing cattle. The size and the structure of the archaeal community were estimated by the analysis of the cell-membrane etherlipids.

Studium mikrobiálního společenstva půdních archeí bylo prováděno v rámci výzkumu v Ústavu půdní biologie BC AV ČR, v.v.i. podporovaného Výzkumným záměrem (AV 0Z60660521) a bylo součástí dvoustranné spolupráce s GSF - Institute of Soil Ecology, Neuherberg, SRN (D-CZ 45:05/06). Práce byla také podpořena z grantu MŠMT (LC 06066) a z výzkumných projektů GA ČR (526/04/0325) a GA AV ČR (IAA 600660605).

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích, 23. dubna 2007

.....

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat především své školitelce Daně Elhottové za odborné vedení, pomoc, cenné rady a trpělivost při řešení této práce. Školiteli specialistovi Miloslavu Šimkovi, Andreasu Gattingerovi a Michaelu Schlotrovi děkuji za odborné vedení a připomínky k práci. Můj dík patří také Ing. Vlastimilu Kamírovi a paní Marcele Kmírové za umožnění terénních experimentů a odběrů vzorků půd, Ing. Lucii Vávrové a Ing. Radce Fabiánové z katedry speciální zootechniky ZF JU za pomoc při odběrech vzorků bachorové tekutiny skotu. Děkuji také Adrianě Škeříkové a Christine Kollerbauer za pomoc při laboratorních experimentech, všem kolegům za podporu a přátelskou atmosféru a především Biologickému centru AV ČR, v.v.i. za poskytnutí zázemí. Svě rodině a přátelům bych chtěla poděkovat za velkou podporu a všestrannou pomoc.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod a cíle práce .....</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Literární přehled .....</b>	<b>3</b>
	2.1. <i>Archaea</i> .....	3
	2.1.1 Obecné charakteristiky archeální buňky .....	3
	2.1.2 Hlavní taxonomické skupiny .....	6
	2.1.3 <i>Archaea</i> v půdním mikrobiálním společenstvu.....	7
	2.2 Metody studia půdních mikrobiálních společenstev <i>in situ</i> .....	8
	2.2.1 Fenotypové metody studia půdních mikrobiálních společenstev.....	8
	2.2.2 Genotypové metody studia archeí.....	11
	2.3 Role půdních mikroorganismů v procesech tvorby, spotřeby a emisí CH <sub>4</sub> .....	12
	2.3.1 Methanogeneze .....	12
	2.3.2 Methylootrofie a methanotrofie.....	13
	2.4 Zimoviště volně paseného skotu jako zdroj emisí skleníkových plynů.....	14
<b>3</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>16</b>
	3.1 Pokusná lokalita .....	16
	3.2 Pokusné uspořádání, odběr a úprava vzorků.....	16
	3.3 Celková metabolická mikrobiální aktivita (FDA).....	19
	3.4 Analýzy membránových lipidických biomarkerů.....	20
	3.4.1 Extrakce lipidů.....	20
	3.4.2 Frakcionace surových lipidů.....	21
	3.4.3 Analýza fosfolipidických etherlipidů (PLEL).....	21
	3.4.4 Analýza fosfolipidických mastných kyselin (PLFA).....	23
	3.4.4.1 Analýza neestericky vázaných fosfolipidických mastných kyselin (NEL-PLFA).....	23
	3.4.4.2 Analýza estericky vázaných fosfolipidických mastných kyselin (EL-PLFA).....	25
	3.5 Analýza methanotrofního společenstva půdy.....	26
	3.6 Statistické hodnocení výsledků.....	27
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>29</b>
	4.1 Celková metabolická mikrobiální aktivita (FDA).....	29
	4.2 Celková mikrobiální biomasa společenstva pastevní půdy.....	30
	4.3 Hodnocení společenstva archeí v pastevní půdě.....	30
	4.3.1 Kvantitativní hodnocení archeí v pastevní půdě.....	30
	4.3.2 Diverzita archeálních PLEL markerů v pastevní půdě.....	31
	4.4 Hodnocení anaerobních mikroorganismů v pastevní půdě.....	33
	4.4.1 Kvantitativní zastoupení NEL-PLFA markerů anaerobních mikroorganismů v pastevní půdě.....	33
	4.4.2 Diverzita NEL-PLFA markerů anaerobních mikroorganismů v pastevní půdě.....	34
	4.5 Kvantitativní hodnocení hlavní složky mikrobiálního společenstva (bakterií a mikroeukaryot) v pastevní půdě.....	35
	4.6 Skladba mikrobiálního společenstva exkrementů skotu.....	36
	4.7 Skladba mikrobiálního společenstva bachorové šťávy skotu.....	36
	4.8 Analýza methanotrofního společenstva půdy.....	39
<b>5</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>Závěry .....</b>	<b>46</b>
<b>7</b>	<b>Anotace.....</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>48</b>

## 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Lidská činnost různými způsoby zasahuje do struktury, diverzity a produktivity ekosystémů. Ekologický výzkum se často zaměřuje na studium nadzemních společenstev, ale jeho nezbytnou součástí musí být také výzkum půdy a zejména role půdních mikroorganismů v tocích látek a energie a v regulačních mechanismech ekosystému. Jedním z prioritních témat půdní mikrobiologie je studium vazeb mezi strukturou a funkcí mikrobiálních společenstev v půdě. Půdní mikrobiální společenstvo má nezastupitelnou úlohu v procesech koloběhu prvků. Transformace uhlíku a dusíku půdními mikroorganismy je spojená také s tvorbou tzv. skleníkových plynů. Poslední výzkumy ukazují, že významnou roli v těchto procesech hraje dosud relativně málo prostudovaná skupina půdních archeí.

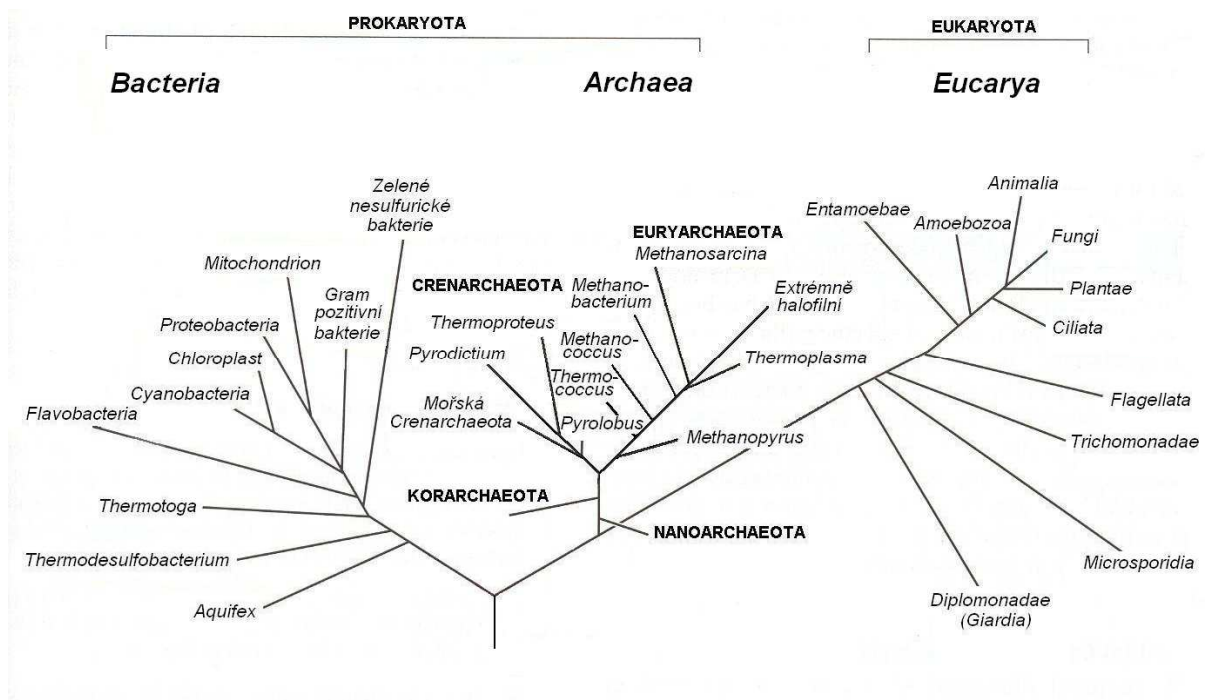
Předložená magisterská práce se zabývá studiem skupiny *Archaea* v rámci celkového mikrobiálního společenstva a jejím vztahem k emisím methanu z půdy pastviny, která je dlouhodobě využívána jako zimoviště skotu. Pro tento účel byly použity techniky založené na unikátních fenotypových vlastnostech archeálních buněk – buněčných membrán a jejich lipidických složek v návaznosti na analýzy lipidických profilů celkového mikrobiálního společenstva.

Cílem práce bylo kvantitativně a kvalitativně charakterizovat společenstvo archeí v celkovém mikrobiálním společenstvu pastevní půdy pomocí buněčných membránových markerů fosfolipidických etherlipidů (PLEL) v kombinaci s technikami analýz komplexního společenstva. Práce byla zaměřena na zhodnocení změn v zastoupení především methanogenních archeí v mikrobiálním společenstvu pastevní půdy v závislosti na stupni zatížení paseným skotem. Součástí práce bylo konfrontovat strukturální změny společenstva týkající se tvorby, spotřeby a emisí methanu z pastevní půdy s dalšími výsledky získanými v rámci výzkumu, který byl zaměřen na studium role mikrobiálních společenstev pastevních půd v procesech produkce, spotřeby a emisí skleníkových plynů. Cílem práce bylo také ověřit, zda jsou přímým zdrojem archeí v půdě exkrementy skotu a zda jsou důsledky vlivu skotu na změny ve struktuře společenstva archeí v půdě dlouhodobé.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Archaea

*Archaea* je evolučně velmi stará skupina prokaryot zcela odlišných od ostatních prokaryotních organismů, která představuje vedle bakterií a eukaryot třetí samostatnou doménu života na Zemi (Obr. 1). Díky aplikaci molekulárních metod, nezávislých na kultivaci, je v současné době již zřejmé, že archea nejsou vázána pouze na podmínky extrémních prostředí, ale jsou schopna koexistovat s ostatními mikroorganismy v běžných terestrických ekosystémech. Výzkum struktury a funkce společenstev archeí v prostředí se provádí na základě zcela unikátních genetických a morfologických vlastností archeální buňky.



Obr. 1 - Fylogenetický strom života (upraveno podle Madigana a Martinka, 2006)

#### 2.1.1 Obecné charakteristiky archeální buňky

Hlavní odlišnosti archeální buňky spočívají v přítomnosti etherových vazeb v lipidech a absenci peptidoglykanu v buněčné stěně. Rozdíl je také v komplexu RNA polymeráz (White, 1995).

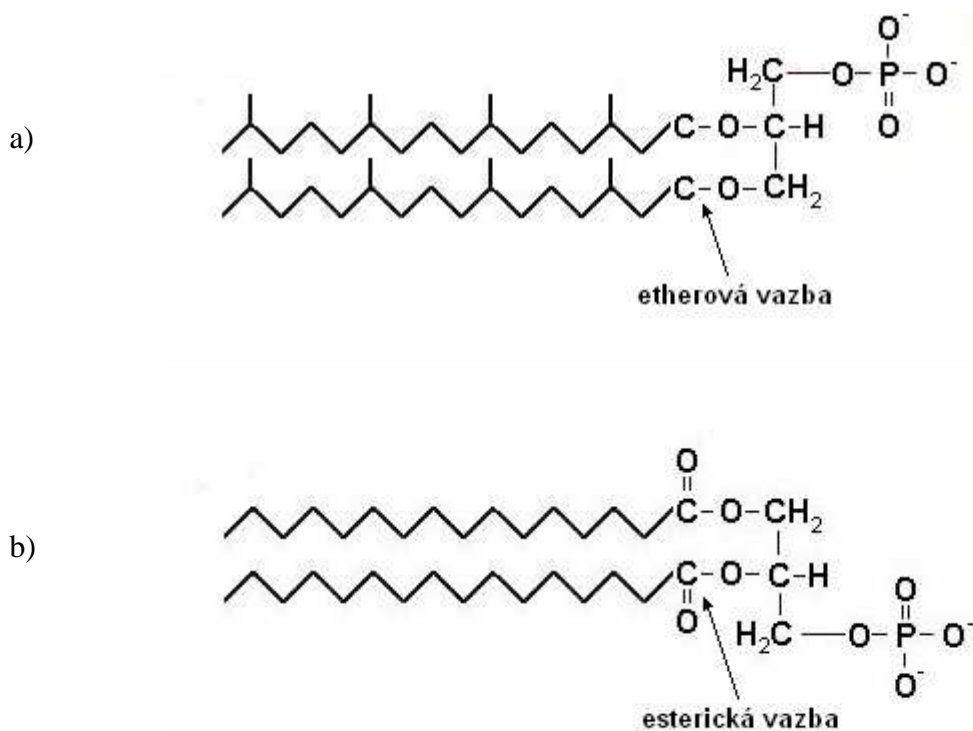
S rozvojem metod hodnocení genetických znaků archeí došlo k velkému pokroku v jejich systematice. V roce 1977 Carl Woese a George Fox díky analýze RNA malé ribozomální podjednotky (16S rRNA) oddělili archea ve fylogenetickém stromu od bakterií (viz Obr. 1) a popsali některé vlastnosti jejich genomu, které se překvapivě shodovaly s vlastnostmi genomu eukaryot. Cyklická struktura chromozomu a uspořádání genů do operonů jsou sice bakteriální znaky, ale např. geny přepisované do tRNA a rRNA obsahují na rozdíl od bakterií introny, jejichž mechanismus sestřihu je podobný mechanismu sestřihu eukaryot. Replikace a transkripce mají společné rysy s replikací a transkripcí eukaryot. Komplex RNA polymeráz sestává z 8-10 podjednotek, zatímco bakteriální polymerázy mívají 4 podjednotky. Translace se vyznačuje jak prvky bakteriální tak eukaryotní translace.

Archea mají buněčnou stěnu, která neobsahuje murein, ale je tvořena pseudopeptidoglykanem (pseudomureinem), heteropolysacharidy a proteiny (White, 1995). Na rozdíl od bakterií jsou archea rezistentní vůči lysozymu i penicilinu.

Největší biochemické rozdíly mezi archeí a ostatními organismy spočívají v buněčné membráně. Archeální membránové etherlipidy se obecně skládají z tzv. jádrových lipidů: glycerol dietheru (archaeolu) nebo glycerol tetraetheru (caldarchaeolu), na něž jsou fosfodiestericky vázány polární skupiny nebo glykosidy. Diethery tvoří základ pro lipidickou membránovou dvojrůst, tetraethery pro velmi stabilní jednorůst, kterou produkují zejména hypertermofilní zástupci (Koga *et al.*, 1993) a která poskytuje efektivní chemickou bariéru kolem buňky. Shodná stavba lipidových komponent je sdílena archeálními druhy náležícími do stejné čeledi (Koga a Morii, 2005). Další odlišností archeí je molekula glycerolu, která je stereoisomerem k molekule glycerolu bakterií a eukaryot. Bakterie a eukaryota tvoří D-glycerol, zatímco archea L-glycerol (Madigan a Martinko, 2006). Uhlovodíkový řetězec je navázán v pozici 2, 3 části glycerolu archeálního lipidu, zatímco lipidy bakterií a eukaryot mají mastné kyseliny na glycerolu navázány v pozici 1, 2. Bakterie mají postranní řetězce mastných kyselin tvořené nejčastěji 16 - 18 atomy uhlíku, postranní uhlovodíkové řetězce archeí jsou tvořeny 15 - 40 uhlíkovými deriváty izoprenu, které mají často rozsáhlá methylová větvení (Mancuso *et al.*, 1985). Další vlastností postranního větvení je schopnost tvořit pětiuhlíkové cykly, což ovlivňuje určitou flexibilitu membrány a její strukturní stabilitu. Na glycerol jsou navázány postranní izoprenoidní řetězce etherovou vazbou, nikoli esterickou jako u bakterií a eukaryot (Obr. 2). To je jednou z příčin odlišných vlastností těchto mikroorganismů umožňujících jim přežít extrémní

podmínky prostředí neslučitelné se životem většiny organismů. Etherlipidy zůstávají stabilní vůči hydrolytickému štěpení na rozdíl od estericky vázaných komponent bakteriálních a eukaryotických lipidů i v kyselém prostředí s výrazně vysokými teplotami (White, 1995). Podmínkou pro život ve vysokých teplotách (až 150°C a za určitých podmínek i vyšších) je nízká permeabilita etherlipidových membrán a liposomů pro látky rozpuštěné v roztocích i při vzrůstající teplotě. Teploty fázových přechodů membránových di- a tetraetherlipidů jsou u archeí mnohem nižší (–15 až –20 °C) než u esterlipidů bakterií a eukaryot (40 až 55 °C) (Koga a Morii, 2005).

Struktura archeálních jádrových lipidů i jejich izoprenoidních řetězců je unikátní charakteristikou archeí a je proto využívána v detekčních a identifikačních technikách založených na analýzách buněčných markerů při studiu těchto mikroorganismů *in situ*.



**Obr. 2** – a) Obecný membránový etherlipid archeí, označena je etherová vazba mezi izoprenoidními řetězci a L-glycerolem; b) obecný membránový fosfolipid bakterií a eukaryot, označena je esterická vazba mezi postranními řetězci mastných kyselin a D-glycerolem



### 2.1.2 Hlavní taxonomické skupiny

Taxonomie archeí byla založena na kultivovatelných izolátech a původně vedla k rozdělení do dvou linií nazývaných *Crenarchaeota* a *Euryarchaeota*. V současnosti se dělí do čtyř linií (Obr. 1): *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota* a *Nanoarchaeota* (Madigan a Martinko, 2006).

*Crenarchaeota* je početná a ekologicky velmi různorodá skupina. Velká část zástupců byla zaznamenána v prostředí s extrémními teplotami, jaké představují horké prameny či geotermálně ohříváné půdy a naopak arktické vody či mořský led. Růstové optimum kultivovatelných druhů, mezi které patří zástupci oxidující síru, se pohybuje kolem 80°C. Mezofilní druhy vyskytující se v lesní i v zemědělské půdě, ve vodě i sedimentech mořských a sladkovodních ekosystémů jsou považovány za nekultivovatelné. Podle současných poznatků je skupina *Crenarchaeota* více zastoupena v mořských než terestrických ekosystémech; v mořském pikoplanktonu reprezentuje průměrně 20 % celkové DNA (Weijers *et al.*, 2004) na rozdíl od volné půdy, kde představuje pouze 0,5 – 3 % bakteriální DNA či 0,42 - 1,42 % celkové 16S rRNA (Ochsenreiter *et al.*, 2003; Buckley *et al.*, 1998).

*Euryarchaeota* je skupina zahrnující fyziologicky odlišné skupiny extrémních halofilů včetně extrémních alkalofilů (většinou obligátně aerobních), striktně anaerobních methanogenů a hypertermofilů vyžadujících extrémně kyselé prostředí. Kultivovatelné druhy ze skupiny *Euryarchaeota* byly izolovány z prostředí s vysokými teplotami nebo vysokou koncentrací solí. Nekultivovatelné druhy byly nalezeny v mořských anoxických prostředích, mokřadech, rašelinných půdách, rýžových polích a v zažívacím traktu živočichů trávících celulózu, především v batoru přežvýkavců (Pesaro a Widmer, 2002).

*Korarchaeota* je jedna z vývojově nejstarších skupin archeí. Jedná se o dosud málo charakterizovanou a málo početnou skupinu extrémních termofilů, kterou nerepresentuje dosud žádný kultivovatelný zástupce.

*Nanoarchaeota* je skupinou zastoupenou jediným druhem *Nanoarchaeum equitans*. Jedná se o parazitické či symbiotické hypertermofily charakteristické velmi malými rozměry buňky (objem představuje pouze 1% buňky *Escherichia coli*), jejichž hostiteli jsou archea z rodu *Ignococcus* ze skupiny *Crenarchaeota* (Madigan a Martinko, 2006).

### 2.1.3 Archea v půdním mikrobiálním společenstvu

Archea zasahují do nejrůznějších půdních procesů s místním i globálním dopadem. Význam archeí v procesech pedogeneze a sukcese půdního mikrobiálního společenstva ukázaly práce Nicol *et al.* (2005) a Merilä *et al.* (2006). Řada studií naznačuje význam archeí pro rhizosféru rostlin (Grosskopf *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 2000; Chelius a Triplett, 2001). Studie Sliwinskeho a Goodmana (2004) ukázala bohatší společenstvo archeí ze skupiny *Crenarchaeota* v rhizosféře ve srovnání s volnou půdou, včetně indikací specifických asociací s fylogeneticky odlišnými rostlinami. Bomberg *et al.* (2003) jako první potvrdili, že *Crenarchaeota* mohou být také součástí mykorhizosféry stromů.

K intenzivně zkoumané problematice patří procesy přeměn dusíku a uhlíku spojené s tvorbou a emisemi skleníkových plynů z půd. Archea mají unikátní postavení v procesech methanogeneze, za něž jsou zodpovědní jejich mezofilní nebo termofilní anaerobní zástupci. Nejnovější poznatky získané studiem archeí v mořských sedimentech naznačují, že archea jsou také schopna methan za anaerobních podmínek a pravděpodobně za součinnosti dalších mikroorganismů oxidovat (Heijs *et al.*, 2006). U půdních archeí tato schopnost prozatím nebyla prokázána. Archea nepochybně hrají významnou úlohu i při tvorbě dalších skleníkových plynů, jako jsou oxidy dusíku (Treusch *et al.*, 2005). Významný poznatek o roli archeí při transformaci půdního dusíku přinesla studie Leininger *et al.*, (2006), kteří zjistili, že za procesy oxidace amoniaku v půdách jsou významněji zodpovědná archea nežli bakterie. Studie naznačuje, že skupina *Crenarchaeota* pravděpodobně představuje nejpočetnější organismy oxidující amoniak v půdním ekosystému na Zemi.

Archea tvoří v půdních mikrobiálních společenstvech jen nepatrný podíl z celkové biomasy, přesto jsou významnou funkční složkou edafonu. V běžných půdách podíl archeí v komplexním mikrobiálním společenstvu většinou nepřesahuje 5 % biomasy (Schleper *et al.*, 2005). V orné polní půdě, podle analýz fosfolipidických etherlipidů, mají archea podíl 0,7 - 1,7 % celkové mikrobiální biomasy (Gattinger *et al.*, 2002a), v půdách permafrostu 0,1 – 1 % (Wagner *et al.*, 2005). Kvantitativní analýzy 16S rRNA odhadly podíl archeí na celkové aktivitě půdního prokaryotického společenstva na 1 % (Buckley *et al.*, 1998). Na rozdíl od běžných minerálních půd představují archea značně vysoký podíl biomasy v půdách rýžových polí, kde jejich biomasa tvoří 15 - 20 %

(Reichardt, 1997) nebo až 37 % (Bai *et al.*, 2000) celkové mikrobiální biomasy, podobně jako v půdách mokřadů a rašelinišť s vysokým obsahem organického uhlíku.

Diverzita půdního mikrobiálního společenstva archeí travinných a pastevních ekosystémů se mění podle množství živin aplikovaných do půd ve formě hnojiv (Nicol *et al.*, 2003). Podle studie Gattingera *et al.* (2007) byla zaznamenána v půdách nehnojených pastvin poměrně vysoká druhová diverzita archeí; byli identifikováni zástupci ze skupiny *Euryarchaeota* i *Crenarchaeota*. V půdách pastvin intenzivně hnojených organickými hnojivy (hlavně s obsahem exkrementů dobytka) vzrostla biomasa methanogenních Euryarchaeot s převládajícími zástupci z rodu *Methanosarcina* (Gattinger *et al.* 2007). S rostoucím vstupem živin do půdy ztrácí pastevní ekosystémy schopnost spotřebovávat methan a naopak se stávají producenty methanu (Conrad, 1996). To je většinou způsobeno nárůstem biomasy methanogenních archeí a omezením schopností methanotrofních bakterií methan oxidovat za přítomnosti amonných složek hnojiva ve vyšší koncentraci (Hütsch *et al.*, 1996).

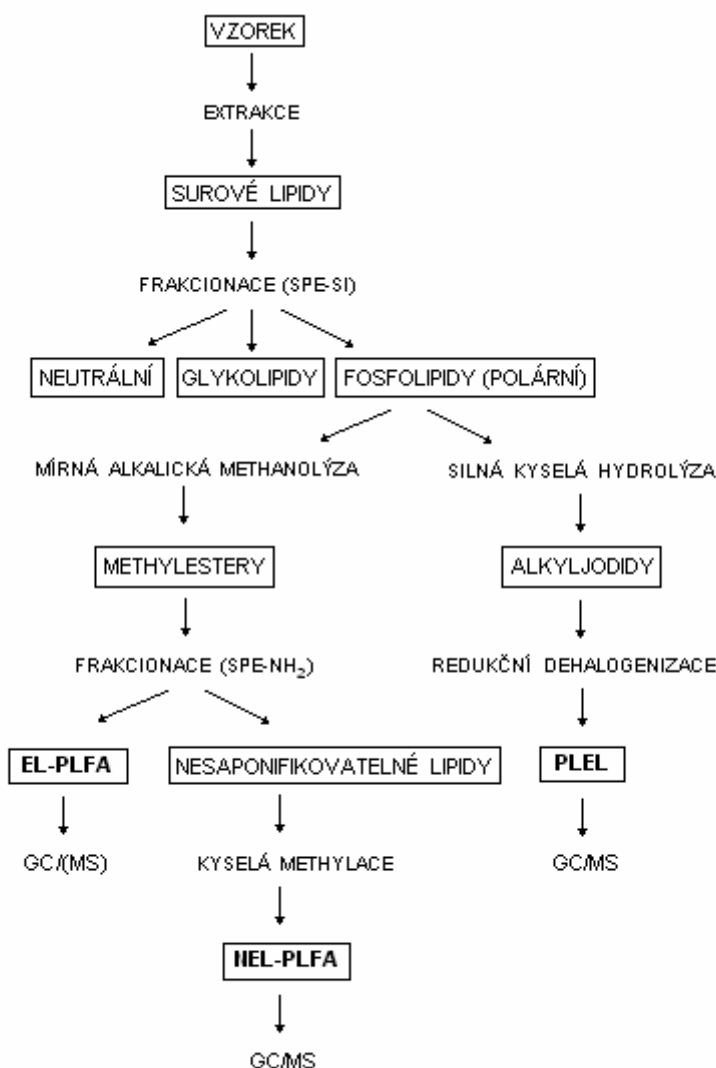
## 2.2 Metody studia půdních mikrobiálních společenstev *in situ*

Většinu půdních mikroorganismů nelze izolovat a následně charakterizovat konvenčními kultivačními technikami. Kultivovatelné mikroorganismy přítomné v prostředí reprezentují podle Amanna *et al.* (1995) pouze asi 1 % počtu buněk mikroorganismů stanoveného přímými mikroskopickými technikami. Na základě této zkušenosti a potřeby získávat více poznatků o funkci, aktivitě a diverzitě mikrobiálních společenstev *in situ* se v poslední době více využívají metody založené na analýze buněčných biomarkerů. Biomarkery jsou biologicky specifické složky živých buněk, produkované omezenou skupinou organismů, které je možno následně identifikovat a kvantifikovat (Zelles, 1999). Metody založené na analýze buněčných biomarkerů je možné rozdělit na fenotypové a genotypové.

### 2.2.1 Fenotypové metody studia půdních mikrobiálních společenstev

Fenotypové metody využívají různé složky živých buněk, především membránové lipidy. Na rozdíl od ostatních komponent buňky se membránové lipidy snadno extrahují z prostředí. Extrakce je nezávislá na kultivačních a izolačních postupech a je možné využít široké spektrum vzorků v mnoha opakováních. Principem extrakce lipidů

z živých buněk obsažených v prostředích jako je půda, je rozpustnost takových komponent v organických rozpouštědlech (methanol, chloroform). Lipidy se snadno separují do základních tříd podle polariry (neutrální lipidy, glykolipidy, fosfolipidy). Následují vlastní štěpící a transformující reakce (Obr. 3), které vedou k získání požadovaných markerů (mastné kyseliny, izoprenoidní uhlovodíky).



**Obr. 3** - Schéma extrakce lipidů ze vzorku, jejich frakcionace a zpracování pro analýzy fosfolipidů jednotlivých biomarkerových metod

Výhodou analýz fosfolipidických biomarkerů je to, že umožňují sledovat změny živé aktivní mikrobiální biomasy, protože fosfolipidy bývají po odumření buňky během několika minut degradovány odštěpením fosfátové skupiny a stávají se neutrálními lipidy. Za podmínek očekávaných v přirozených ekosystémech fosfolipidy tvoří

relativně konstantní podíl biomasy živé buňky organismu a na základě toho je možné velmi dobře společenstvo kvantifikovat. Strukturní diverzita lipidických komponent vypovídá sice poměrně málo o taxonomii druhů, ale je dostatečná pro získání informace o skladbě společenstva na základě fyziologické příbuznosti druhů. Funkční diverzita lipidických skupin umožňuje hodnotit růstový a výživový status a vliv prostředí. Jednou z nejdůležitějších výhod fenotypových metod je citlivá detekce analyzovaných komponent. Analýzy membránových lipidů umožňují zaznamenat rychlé změny v populacích jednotlivých typů mikroorganismů.

### ***Analýza fosfolipidických mastných kyselin (PLFA)***

Analýza membránových fosfolipidických mastných kyselin (PLFA) je jednou z velmi přesných a citlivých biologických metod stanovení mikrobiální biomasy a struktury mikrobiálního společenstva (Zelles a Bai, 1993). Na základě specifity mastných kyselin pro určité mikroorganismy je možné kvalitativně charakterizovat většinu živé mikrobiální biomasy v půdě (Tunlid *et al.*, 1985). Analýza estericky vázaných mastných kyselin (EL-PLFA) umožňuje detekovat největší část společenstva půdní mikrobiální biomasy zahrnující bakterie (včetně jejich specifické skupiny aktinomycet) a mikroeukaryota. Kvantitativní i kvalitativní údaje o skladbě mikrobiálního společenstva se získávají podle základní metody převedením fosfolipidických mastných kyselin na jejich deriváty, které se detekují plynovou chromatografií (White *et al.*, 1979).

Rozšířená metoda spočívá v separaci methylesterů mastných kyselin na více složek těsně po provedení mírné alkalické methanolýzy a umožňuje zahrnout do fingerprintu mikrobiálního společenstva nejen estericky, ale i neestericky vázané mastné kyseliny (hlavně cyklopropanové, hydroxylované a nesaponifikovatelné), které jsou při použití základní metody degradovány pro vysokou citlivost k anorganickým kyselinám (Zelles, 1999). Kvantitativní zastoupení estericky vázaných mastných kyselin se však výrazně neliší při použití základní či rozšířené metody.

Neestericky vázané mastné kyseliny (NEL-PLFA) jsou komponenty sfingolipidů, ornitinových lipidů, plasmalogenů a dalších aminolipidů. Jsou součástí membránových lipidů bakterií, eukaryot i archeí (Gattinger *et al.*, 2002). Sfingolipidy byly zaznamenány u skupiny *Bacterioides*, plasmalogeny jsou přítomné převážně u zástupců rodu *Clostridium* (Zelles, 1999). Mezi základní typy mastných kyselin vázaných

neesterickými vazbami patří nesubstituované a OH-substituované mastné kyseliny. OH-substituované mastné kyseliny se vyskytují převážně ve sfingolipidech, zatímco nesaponifikovatelné nesubstituované mastné kyseliny jsou obsaženy v plasmalogenech. Anaerobní bakterie obsahují relativně velké množství plasmalogenů, které mají jednak esterické a jednak neesterické vazby. Pouze malý počet aerobních a fakultativně anaerobních bakterií obsahuje plasmalogeny. Analýza NEL-PLFA je jednou z perspektivních dosud málo využívaných metod pro získání údajů o anaerobní složce mikrobiálního společenstva.

### **Analýza fosfolipidických etherlipidů (PLEL)**

Archea obsahují v buněčných membránových lipidech izoprenoidní uhlovodíky (viz kap. 2.1.1), které se využívají jako archeální biomarkery k jejich detekci. K rozštěpení etherové vazby, kterou jsou izoprenoidy vázány k polární části lipidu se využívá reakce silné kyselé hydrolýzy za působení silné kyseliny jako je kyselina jodovodíková (HI) a vysoké teploty (100°C). Postranní izoprenoidní řetězce se odštěpí od glycerolfosfátu a vytvoří alkyljodidy. Alkyljodidy se redukují na odpovídající uhlovodíky (deriváty izoprenoidů) redukční dehalogenizací (Gattinger *et al.*, 2003). Detekce těchto derivátů izoprenoidů poskytuje velmi přesné kvantitativní údaje o komplexním archeálním společenstvu (Bai *et al.*, 1997; Wachinger *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2005).

Podle jednotlivých typů izoprenoidních uhlovodíků identifikovaných pomocí plynové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií je možné diferencovat půdní archea do základních taxonomických a funkčních skupin. Pro *Euryarchaeota* jsou typické izoprenoidy *i15:0*, *i20:0*, *i25:0*, *i40:0*, *i20:1*, v menší míře také *i40:0-1cy*, *i40:0-2cy*. U skupiny *Crenarchaeota* převažují C<sub>40</sub> izoprenoidy s postranními cyklickými řetězci *i40:0-1cy*, *i40:0-2cy*, *i40:0-3cy*, *i40:0-4cy*, ale byly u nich zaznamenány též *i20:0* a *i40:0* (Gattinger, 2001). Výhodou metody PLEL je její kompatibilita s analýzou fosfolipidických mastných kyselin (PLFA).

### **2.2.2 Genotypové metody studia archeí**

Genotypové metody využívají molekuly genetického aparátu buněk jako jsou buněčná a ribozomální DNA a různé typy RNA. Při studiu společenstva archeí se zejména využívá fingerprintingová analýza 16S rDNA pomocí T-RFLP (terminal

restriction fragment length polymorphism fingerprinting analysis) s primery Ar109f/Ar912rt-FAM (Lueders *et al.*, 2004). Získané fragmenty lze dále klonovat, sekvenovat a zpracovat až po fylogenetickou analýzu vypovídající o jednotlivých archeálních zástupcích v daném prostředí. Ke studiu funkčních skupin archeí se využívá analýza specifických funkčních genů. Např. kvantitativní analýza (real time qPCR) *mcrA* genu kódujícího methyl-Koenzym M reduktázu je využívána k odhadu velikosti aktivního methanogenního společenstva v půdě a pomocí fylogenetické analýzy tohoto genu lze získat přesné informace o diverzitě methanogenů ve studovaném prostředí (Luton *et al.*, 2002; Friedrich, 2005).

## 2.3 Role půdních mikroorganismů v procesech tvorby, spotřeby a emisí CH<sub>4</sub>

### 2.3.1 Methanogeneze

Methan je druhým nejvýznamnějším skleníkovým plynem, který přispívá ke globálnímu oteplování přibližně 20 % (Bouwman, 1990). Jeho nejvýznamnějšími zdroji jsou biogenní procesy. Mezi přirozené zdroje methanu v atmosféře patří v největší míře methanogenní archea (Conrad, 1996), která specificky obývají anoxická prostředí jako jsou bažiny, rašeliniště, anoxické jezerní zóny, rýžoviště, bacher přezvýkavců a intestinální trakt termitů, ptáků a savců včetně člověka (Madigan a Martinko, 2006; Miller a Wollin, 1982).

Methanogeneze však probíhá také v dobře aerovaném prostředí jako jsou lesní půdy či pastviny, které poskytují za určitých podmínek řadu vhodných anoxických mikroprostředí. Methanogenní archea reprezentují terminální článek mikrobiálního společenstva při přeměnách uhlíkatých látek za anaerobních podmínek. K rozvoji a aktivitě methanogenních archeí dochází v prostředí po vyčerpání výhodnějších terminálních akceptorů elektronů; methanogeneze často uzavírá anaerobní potravní řetězec. Methanogenní archea získávají metabolickou energii konverzí několika substrátů na methan. Většina methanogenních archeí je schopná redukovat CO<sub>2</sub> za přítomnosti H<sub>2</sub> na CH<sub>4</sub>. Při methanogenezi jsou využívány produkty anaerobní dekompozice organické hmoty: formát, acetát, methanol, methylaminy, methylsulfidy, primární a sekundární alkoholy a jiné organické látky (Koga *et al.*, 1993). Na rozkladu složitých organických látek se podílí syntrofní mikroorganismy, jejichž metabolismus je

s methanogenními archei natolik provázaný, že většinou nelze získat čisté kultury zodpovědné za jednotlivé reakce (Madigan a Martinko, 2006).

Klíčovým enzymem v procesu methanogeneze je *methyl koenzym M reduktáza* (Mcr) katalyzující finální krok methanogeneze (Thauer, 1998). Fylogenetické analýzy rRNA a dalších genů ukazují, že methanogenní archea pocházejí z monofyletické linie skupiny *Euryarchaeota*. V současné době lze methanogenní archea rozdělit do tří hlavních tříd: *Methanobacteria* (ř. *Methanobacteriales*), *Methanococci* (ř. *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*) a *Methanopyri* (ř. *Methanopyrales*) reprezentovaných celkem 31 rody (Whitman *et al.*, 2001).

### 2.3.2 Methylootrofie a methanotrofie

Odhady emisí methanu do atmosféry jsou v rozsahu 500-600 Tg CH<sub>4</sub> za rok, nicméně velké množství methanu (pravděpodobně až 700 Tg CH<sub>4</sub> za rok) je zmetabolizováno aerobními i anaerobními oxidátory methanu aniž by se dostalo do atmosféry (Reeburgh *et al.*, 2003). Půdní prostředí je významným místem spotřeby CH<sub>4</sub>, a to zejména půdy výše položených trvalých travních porostů (Conrad, 1996). Methan je metabolizován s několika dalšími jednoduhlíkatými sloučeninami methylootrofními mikroorganismy, kterým je poskytován jako donor elektronů pro získávání energie a jako zdroj stavebního uhlíku. Mnoho, ale ne všechny, methylootrofní mikroorganismy jsou zároveň methanotrofy (schopné asimilovat přímo methan). Mezi dobře prostudované methanotrofy patří zejména aerobní bakterie široce rozšířené ve vodě a půdě, které metabolizují methan za přítomnosti kyslíku.

Podle vnitřní buněčné struktury, fylogenetických znaků a metabolické dráhy asimilace uhlíku lze rozdělit methanotrofy na dvě skupiny. Typ I představuje mikroorganismy, kteří asimilují uhlík přes ribulózo-monofosfátový cyklus (gamma Proteobacteria). Patří k nim rody *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylomicrobium*, *Methylosphaera* a *Methylocaldum*. Methanotrofové typu II asimilují uhlík přes serinovou dráhu (alfa Proteobacteria). Jejich hlavní zástupci jsou *Methylosinus*, *Methylocystis* a *Methylocella*. Methylootrofové ze skupiny beta Proteobacteria nejsou schopni přímo asimilovat methan, patří k nim rody *Methylophilus* a *Methylobacillus*. Kromě obligátních methanotrofů existuje velká řada fakultativních methanotrofů např. zástupci rodů *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Rhodobacter*, *Mycobacterium*, *Acetobacter*, *Xanthobacter*, *Paracoccus* (Madigan a Martinko, 2006).



Klíčovým enzymem methanotrofů je *methan monoxygenáza* (Mmo) zodpovědná za inkorporaci kyslíku do molekuly methanu a jeho konverzi na methanol. Tento enzym oxiduje také amoniak, jehož přítomnost v prostředí vyvolává substrátovou kompetici a potlačuje růst methanotrofů. Kromě methanotrofů je atmosférický CH<sub>4</sub> oxidován také autotrofními bakteriemi oxidujícími amoniak, jedná se však o vedlejší nespecifickou aktivitu, která výrazně ke spotřebě CH<sub>4</sub> nepřispívá (Jones a Morita, 1983).

#### 2.4 Zimoviště volně paseného skotu jako zdroj emisí skleníkových plynů

Zemědělsky využívané půdy jsou významným zdrojem emisí skleníkových plynů, především oxidu dusného (N<sub>2</sub>O), oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>) a methanu (CH<sub>4</sub>) (Šimek *et al.*, 2002). Zemědělské farmy zaměřené na chov masného skotu využívají některé pozemky jako pastviny. Množství emisí methanu z půdy ovlivňuje především intenzita pastvy zvířat. Speciálním typem pastviny je zimoviště, většinou umístěné na vhodném pozemku poblíž stájí a dalšího technického zázemí pro krmení a ošetřování zvířat. Zimoviště je oproti ostatním pastvinám vystavováno mnohem většímu a intenzivnějšímu vlivu skotu. Struktura půdy je v povrchové vrstvě rozrušena a zejména se zde hromadí velké množství tuhých a tekutých výkalů, jejichž živiny nemohou být vzhledem k nízkým teplotám v zimním období a absenci zeleného porostu využity rostlinami, jako se to děje v průběhu vegetační sezóny na běžné pastvině. Důsledky přesycení půd živinami mohou být značné. V takových půdách nastávají díky změnám fyzikálních a chemických vlastností současně změny ve skladbě a funkci mikrobiálních společenstev (Elhottová a Šimek, 2002).

Na zimovišti skotu v Borové se výzkum provádí už od roku 2001. Kromě základních fyzikálních charakteristik a chemických vlastností půd byl dosavadní výzkum zaměřen na studium mikrobiálních aktivit spojených s produkcí stopových plynů (Šimek *et al.*, 2002; Šimek *et al.*, 2006) V souvislosti s cyklem dusíku v půdě a s emisemi oxidu dusného byla podrobně studována denitrifikační a nitrifikační aktivita a fixace N<sub>2</sub>; v souvislosti s cyklem uhlíku byla měřena respirace půdy (emise oxidu uhličitého) a stanovena produkce a oxidace methanu. Jsou známy i celoroční průběhy emisí hlavních skleníkových plynů z půdy (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O) (Hynšt *et al.*, 2007). Pomocí metod molekulární biologie byly v poslední době hodnoceny některé vybrané funkční parametry mikrobiálního společenstva. Struktura společenstva archeí byla zjišťována pomocí analýzy 16 S rDNA. U vybraných funkčních skupin byla provedena

fylogenetická analýza a stanoveny počty kopií genů pro klíčové procesy transformace dusíku a uhlíku v půdě. Byly stanoveny počty kopií genu *mcrA*, který se podílí na produkci CH<sub>4</sub> (Radl, *et al*, nabídnuto k tisku).

Pro účely předložené práce byly stanoveny následující hypotézy:

1. Velikost biomasy i aktivita celkového půdního mikrobiálního společenstva zimoviště závisí na stupni zatížení půdy skotem.
2. Zatížení půdy skotem se projeví na vyšší abundanci archeí, a to zejména methanogenních.
3. Vysoké emise CH<sub>4</sub> na silně zatíženém stanovišti souvisí se změnou abundance methanoogenních archeí a methanotrofních bakterií.
4. Zdrojem zvýšeného zastoupení archeí v půdním společenstvu je pasený skot.
5. Opakovaný silný vliv skotu vyvolává dlouhodobé změny v mikrobiálním společenstvu archeí.

### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Pokusná lokalita

Pokusná lokalita se nachází na úpatí horského masivu Kleti v předhůří Šumavy v Chráněné krajinné oblasti Blanský les. Je součástí zemědělské farmy Borová s chovem masného skotu. Farma Borová leží asi 25 km jihozápadně od Českých Budějovic a asi 10 km severozápadně od Českého Krumlova. Majiteli farmy jsou Marcela Kamírová a Ing. Vlastimil Kamír.

Zvolený pozemek o velikosti asi 4 ha se rozkládá v nadmořské výšce kolem 630 m a je od roku 1992 využíván pro pastvu skotu jako trvalý travní porost. Pozemek těsně přiléhá k hospodářskému stavení, a proto se od roku 1994 každoročně využívá jako zimoviště pro asi 90 kusů krav od poloviny října do konce dubna až poloviny května.

Na lokalitě je patrný gradient vlivu zvířat od nejméně zatížené plochy s poškozeným travním porostem, kde se zvířata zdržují u příkrmíšť a napajedel, až po nejméně zatížené části pastviny na protilehlém konci od hospodářského stavení, kde zvířata pobývají jen výjimečně. V gradientu byla vymezena tři stanoviště s různým stupněm zatížení půdy skotem pro odběry půdních vzorků. Stanoviště „S“ s největším vlivem skotu v blízkosti vstupu na pozemek má velmi silně poškozený travní porost, půda je přesycena výkaly a silně sešlapána pohybem zvířat. Stanoviště „M“ se nachází asi 100 m od kravína. Zvířata se zde vyskytují často, ale nepravidelně, půda je středně zatížena jejich vlivem a porost je částečně poškozený. Stanoviště „C“ s nulovou zátěží skotem má nepoškozený travní porost a nejsou zde patrné žádné pozůstatky exkrementů zvířat. Představuje kontrolní stanoviště.

Půda studované lokality je hlinitopísčítá kambizem s 80 % písku, 14 % prachu a 6 % jílu.

#### 3.2 Pokusné uspořádání, odběr a úprava vzorků

Základem studie byl terénní experiment uskutečněný v roce 2005, který byl zaměřený na zachycení strukturních a funkčních vlastností aktivního mikrobiálního společenstva odpovědného za emise methanu *in situ* na stanovištích S, M a C bezprostředně po odchodu skotu ze zimoviště na jaře (11. květen 2005, tj. po asi šesti měsíčním zatížení půdy skotem) a bezprostředně před návratem skotu na zimoviště na podzim (18. říjen 2005, tj. po asi pětíměsíční absenci skotu na zimovišti). Na každém

ze tří základních stanovišť S, M a C bylo náhodně umístěno devět komor za účelem měření aktuálních emisí půdních plynů bezprostředně před odebráním vzorků (podrobný popis měření emisí uvádí Radl *et al.*, nabídnuto k tisku). Hodnoty emisí CH<sub>4</sub> získané v průběhu obou odběrů udává Tab. 1. Následně byly komory odstraněny a proveden odběr **vzorků půdy** pod každou z komor (z vrstvy 0-20 cm). Odebraná půda z každého mikrostanoviště byla ihned po odběru přímo v terénu přesáta přes síto (průměr ok 5 mm), homogenizována a uložena do 4 °C v transportní chladničce (pro analýzy lipidických markerů) či konzervována v tekutém dusíku (pro analýzu DNA a RNA) a transportována tentýž den do laboratoře. Kromě fenotypové charakteristiky mikrobiálního společenstva prostřednictvím lipidických biomarkerů, kterou se zabývá tato magisterská práce, byla také provedena dalšími pracovníky genotypová analýza diverzity archeálního společenstva (TRFLP 16S rDNA) a kvantitativní analýza genu methyl-koenzym reductázy (real time PCR *mcrA*) a jeho fylogenetická analýza. Tyto výsledky jsou použity v diskusi předložené práce, stejně jako výsledky měření produkce a emisí CH<sub>4</sub> a doprovodných chemických charakteristik odebraných půd všech tří stanovišť (Tab. 1); výsledky těchto měření a analýz byly převzaty od jiných pracovníků podílejících se na výzkumu ekosystému zimoviště v Borové a vesměs nebyly dosud publikovány.

**Tab. 1** - Vybrané charakteristiky půd, emise a produkce CH<sub>4</sub> ze stanovišť s různým stupněm zatížení půdy skotem ve dvou odběrových obdobích (květen a říjen 2005); jsou uvedeny aritmetické průměry výběrů (n=9) a v závorkách směrodatné odchytky výběrů; různá písmena označují průkazně rozdílné hodnoty mezi stanovišti s různým stupněm zatížení půdy ve stejné době odběru vzorků

Doba odběru vzorků	Stupeň zatížení půdy	Obsah sušiny [%]	pH [H <sub>2</sub> O]	C <sub>org</sub> [g C 100 g <sup>-1</sup> sp]	N <sub>tot</sub> [g N 100 g <sup>-1</sup> sp]	Potenciální produkce CH <sub>4</sub> [ng C g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Emise CH <sub>4</sub> [μg C m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> ]
Květen 2005	Silný (S)	<b>66,40</b> (6,80) <sup>a</sup>	<b>9,09</b> (0,13) <sup>a</sup>	<b>5,71</b> (0,37) <sup>a</sup>	<b>1,94</b> (0,29) <sup>a</sup>	<b>74,433</b> (177,27) <sup>a</sup>	<b>30554,00</b> (63659,32) <sup>a</sup>
	Střední (M)	<b>76,77</b> (9,44) <sup>b</sup>	<b>7,26</b> (0,20) <sup>b</sup>	<b>4,04</b> (1,15) <sup>b</sup>	<b>1,21</b> (0,45) <sup>b</sup>	<b>0,243</b> (0,21) <sup>a</sup>	<b>309,65</b> (598,96) <sup>b</sup>
	Kontrolní (C)	<b>80,63</b> (9,31) <sup>c</sup>	<b>5,94</b> (0,11) <sup>c</sup>	<b>2,11</b> (0,28) <sup>c</sup>	<b>0,65</b> (0,24) <sup>c</sup>	<b>0,014</b> (0,03) <sup>a</sup>	<b>-37,61</b> (23,89) <sup>c</sup>
Říjen 2005	Silný (S)	<b>67,99</b> (3,39) <sup>a</sup>	<b>8,84</b> (0,15) <sup>a</sup>	<b>6,28</b> (0,30) <sup>a</sup>	<b>1,69</b> (0,31) <sup>a</sup>	<b>0,143</b> (0,21) <sup>a</sup>	<b>56,47</b> (46,51) <sup>a</sup>
	Střední (M)	<b>85,25</b> (0,94) <sup>b</sup>	<b>7,04</b> (0,29) <sup>b</sup>	<b>1,26</b> (0,09) <sup>b</sup>	<b>0,54</b> (0,30) <sup>b</sup>	<b>0,087</b> (0,09) <sup>a</sup>	<b>28,79</b> (15,37) <sup>a</sup>
	Kontrolní (C)	<b>81,29</b> (1,83) <sup>b</sup>	<b>6,43</b> (0,43) <sup>c</sup>	<b>1,58</b> (0,19) <sup>c</sup>	<b>0,51</b> (0,31) <sup>c</sup>	<b>0,097</b> (0,07) <sup>a</sup>	<b>3,85</b> (19,53) <sup>a</sup>

**Pozn. k Tab. 1** - Obsah tzv. sušiny v půdě byl stanoven gravimetricky po vysušení půdy při 105 °C. Sušina půdy je udána jako hmotnostní % suché půdy z vlhké půdy. Půdní pH bylo měřeno pomocí skleněné elektrody v půdní suspenzi (hmotnostní poměr - půda:voda = 1:2,5). Celkový organický uhlík byl stanoven oxidací na mokré cestě (Jackson, 1958) a celkový obsah dusíku pomocí Kjeldahlovy metody (Zbiral, 1995). Potenciální produkce methanu byla měřena v laboratoři pomocí inkubace 25 g čerstvé půdy v 350 ml tzv. NTS lahvích při teplotě 25 °C. Po 10 minutách a 24 hodinách byl odebrán 1 ml vzorku inkubační atmosféry a koncentrace methanu byla změřena pomocí plynové chromatografie (plynový chromaograf HP 5890, Hewlett Packard, USA). Potenciální produkce methanu byla vypočítána jako přírůstek methanu během 24 hodinové inkubace. Emise methanu byly stanoveny na základě odběru vzorků atmosféry z komor pro měření emisí z půdy těsně po instalaci a po 60 minutách od instalace komor v terénu. Koncentrace methanu byla stanovena plynovou chromatografií (podobně jako potenciální produkce methanu).

Za účelem porovnání charakteru mikrobiálního společenstva půdy a charakteru mikrobiálního společenstva přímých potenciálních zdrojů obohacení půdy mikroorganismy byly analyzovány vzorky exkrementů a bachorové šťávy skotu.

Odběr vzorků **exkrementů** skotu byl proveden 5.5.2005 na nejvíce zatíženém stanovišti zimoviště. Každý z devíti vzorků byl odebrán jako směsný vzorek ze 7 čerstvých exkrementů tak, aby bylo zabráněno kontaktu s půdou. Vzorky byly transportovány do laboratoře a uloženy při 4 °C v plastových krabičkách.

Pro metodické účely byly odebrány vzorky **bachorové šťávy** pokusného zvířete s bachorovou píštělí plemene Holštýn ze Školního zemědělského podniku Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Zvíře bylo krmeno senem (poslední krmení bylo 5 hodin před odběrem vzorků). Vzorky byly odebrány z uzavíratelné bachorové píštěle pomocí hadice s filtrem, skleněné baňky a ruční vakuové pumpy. Vzorky byly přeneseny v předem vyhřátých termoskách k laboratornímu zpracování. Bachorová šťáva zvířete s píštělí byla určena pro návrh metodiky zpracování a měření vzorků. K extrakci lipidů byl využit jednak sediment a supernatant, které byly získány centrifugací bachorové šťávy (4000 rpm, 10 minut), a jednak biomasa usazená na bakteriologickém filtru (s velikostí pórů 0,5 µm) a filtrát. Největší koncentrace estericky vázaných fosfolipidických mastných kyselin (EL-PLFA) byla naměřena v supernatantu, proto byla zvolena pro další analýzy nedělená surová bachorová šťáva. Stručné výsledky analýzy EL-PLFA jednotlivých frakcí jsou uvedeny v Tab. 2. Jako dostatečně velký objem bachorové šťávy pro všechny typy analýz lipidických biomarkerů byl stanoven objem 40 ml.

**Tab. 2** – Koncentrace EL-PLFA (biomasa bakterií a mikroeukaryot) naměřená v různých frakcích bachorové šťávy odebrané z bachoru krávy s píštělí; jsou uvedeny aritmetické průměry výběrů (n=2) a v závorkách směrodatné odchytky výběrů; zkratky: b.š. - bachorová šťáva, s. hm. – suchá hmotnost bachorové šťávy

Analyzovaná frakce	PLFA [nmol PLFA ml <sup>-1</sup> b. š.]	PLFA [nmol PLFA g <sup>-1</sup> s. hm.]
Supernatant po centrifugaci	53,2 (20,0)	3685,9 (1409,7)
Sediment po centrifugaci	17,9 (1,9)	1266,3 (135,2)
Biomasa na filtru	21,3 (13,7)	1505,5 (967,6)
Filtrát	5,5 (1,0)	388,1 (69,7)

Vzorky bachorové tekutiny zvířat pasených na studovaném zimovišti farmy Borová byly získány 10.5.2006 bezprostředně po porážce z bachorů dvou jatečných býků plemene Aberdeen Angus. Býci byli krmeni travní senáží (poslední krmení 15 hodin před porážkou). Stáří zvířat bylo v době porážky 16 měsíců a jejich hmotnosti byly 475 a 457 kg . Vzorky byly odebrány pomocí hadice s filtrem, skleněné baňky a ruční vakuové pumpy. Hadice s filtrem byla zasunuta do části jícnové trubice ústící do bachoru a vzorky přečerpány do skleněné baňky a rychle přeneseny do předem vyhřátých termosek. Vzorek byl odebrán v devíti opakováních od každého zvířete. Pro následující analýzy byla použita bachorová šťáva bez jakýchkoli úprav.

### 3.3 Celková metabolická mikrobiální aktivita (FDA)

Pro stanovení celkové metabolické aktivity mikroorganismů byla použita metoda hydrolyzy fluorescein diacetátu (FDA) popsaná v práci Schnürer a Rosswall (1982).

Fluorescein diacetát (3,6-diacetyl-fluorescein) je půdními mikroorganismy hydrolyzován na fluorescein pomocí enzymů. Zabarví se aktivní buňky mikroorganismů, ale spory a buňky ve stacionární fázi růstu jsou neaktivní vůči transformaci FDA. To umožňuje vypočítat celkovou metabolickou aktivitu mikroorganismů, která se stanovuje měřením koncentrace fluoresceinu spektrofotometricky. Metabolická aktivita byla stanovena u půdních vzorků, jejichž odběr je popsán v kapitole 3.2.

Postup stanovení: Do 100 ml NTS lahví byly naváženy 2 g půdy. Ke vzorkům bylo přidáno 40 ml fosfátového pufru a 0,2 ml FDA (roztok 0,2 g FDA na 100 ml acetonu).

Lahve byly uzavřeny a 1 hodinu za stálého třepání inkubovány při teplotě 28 °C. Po skončení inkubace byly odebrány 4 ml každého vzorku do zkumavek a reakce se zastavila přidáním 2 ml 0,1 % HgCl<sub>2</sub>. Vzorky byly centrifugovány 10 min při 4000 rpm. Spektrofotometricky při vlnové délce 490 nm byla změřena absorbance. Celková metabolická aktivita byla vypočtena jako změna absorbance v čase přepočtená na 1 g suché půdy.

Výpočet celkové metabolické aktivity:

$$\Delta A = (A_v - A_k) / T \cdot w \quad [g^{-1} h^{-1}]$$

A ..... absorbance

A<sub>v</sub> .... absorbance vzorku

A<sub>k</sub> .... absorbance kontroly (slepý vzorek bez půdy)

T ..... doba inkubace (1 h)

w ..... hmotnost suché půdy ve 2 g navážky

### 3.4 Analýzy membránových lipidických biomarkerů

#### 3.4.1 Extrakce lipidů

Principem extrakce je uvolnění lipidů buněk půdních mikroorganismů do organického rozpouštědla (chloroformu). Byla použita modifikovaná extrakční metoda popsaná v práci Bligh a Dyer (1959).

#### *Extrakce lipidů z půdy*

Lipidy byly extrahovány z 15 g vlhké půdy (8-12 g suché půdy) 95 ml extrakční směsí skládající se z fosfátového pufru (pH=7,4), chloroformu a methanolu v poměru (0,8:1:2). Po 2 h třepání byla extrakční směs od půdy oddělena pipetou a přenesena do dělicí nálevky. K extraktu bylo přidáno 25 ml destilované vody a 25 ml chloroformu. Směs byla ponechána v dělicí nálevce a po 24 hodinách byla organická fáze oddělena od vodné. Organická fáze byla odpuštěna přes bezvodý síran sodný a následně její objem redukován na rotační vakuové odparce při 40 °C asi na 100 µl. V této fázi lze vzorky dlouhodobě skladovat při teplotě pod bodem mrazu.

### ***Extrakce lipidů z exkrementů***

Extrakce lipidů z exkrementů byla provedena shodným způsobem jako extrakce lipidů z půdy. Čerstvá navážka byla 5 g a odpovídala 0,76 g suché hmotnosti exkrementů.

### ***Extrakce lipidů z bachorové tekutiny***

Pro extrakci lipidů z bachorové šťávy byla použita surová bachorová tekutina (zbavená hrubých pevných částic filtrací při odběru z bachoru) a modifikovaný extrakční postup. Modifikace spočívala v eliminaci fosfátového pufru z extrakční směsi, který byl nahrazen přímo bachorovou šťávou. Poměr mezi bachorovou šťávou, chloroformem a methanolem byl zachován, tj. 0,8:1:2. Pro jedno opakování bylo použito 40 ml bachorové šťávy.

### **3.4.2 Frakcionace surových lipidů**

Surové lipidy byly rozděleny chromatografií na pevné silikagelové fázi (SPE-SI, Bond Elute, 12 ml, Analytical Chem International, USA). Kolona byla kondicionována 12 ml chloroformu. Koncentrovaný vzorek surových lipidů (100  $\mu$ l) byl po nanesení na separační kolonu postupně dělen vymýváním organickými rozpouštědly o různé polaritě na neutrální lipidy (promývání 12 ml chloroformu), glykolipidy (12 ml acetonu) a polární lipidy (fosfolipidy) (3x12 ml methanolu). Získaný vzorek polárních lipidů byl rozdělen v poměru 28,5:9,5:2 pro účely analýz fosfolipidických etherlipidů (PLEL, reprezentujících společenstvo archeí), neestericky vázaných mastných kyselin (NEL-PLFA - anaerobní společenstvo) a estericky vázaných mastných kyselin (EL- PLFA - majoritní část mikrobiálního společenstva, tj. bakterie a mikroeukaryota).

### **3.4.3 Analýza fosfolipidických etherlipidů (PLEL)**

Společenstvo archeí včetně methanogenních bylo charakterizováno pomocí analýzy fosfolipidických etherlipidů (PLEL) podle metody popsané v práci Gattinger *et al.* (2003). Cílem analýzy bylo získat z extrahovaných fosfolipidů půdních vzorků, exkrementů a bachorové tekutiny izoprenoidní uhlovodíky jako markery archeí a pomocí GC/MS izoprenoidy detekovat a kvantifikovat. Metoda sestává z následujících kroků:



### ***Uvolnění etherově vázaných uhlovodíků silnou kyselou hydrolyzou***

Proudem dusíku byl z příslušného vzorku fosfolipidů odstraněn methanol a byly přidány 2 ml koncentrované kyseliny jodovodíkové (HI) pro uvolnění etherově vázaných uhlovodíků při teplotě 100 °C po dobu 18 hodin. Reakce silné kyselé hydrolyzy byla zastavena přidávkem 4 ml destilované vody a alkyljodidy byly extrahovány přidávkem 5 ml hexanu. Hexanová fáze byla následně promývána v dělicích nálevkách 4 ml destilované vody, 10 ml 10 % roztokem uhličitanu sodného ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 10 ml 50 % roztoku thiosíranu sodného ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) a přefiltrována přes bezvodý síran sodný ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).

### ***Redukční dehalogenizace alkyljodidů vodíkem***

Alkyljodidy se redukuje na odpovídající uhlovodíky (deriváty izoprenoidů) redukční dehalogenizací vodíkem, který vzniká reakcí zinku a kyseliny octové.

Do vysušeného vzorku bylo přidáno 300 mg zinku a 3 ml 100 % kyseliny octové a vzorek byl ponechán 18 hodin při teplotě 100 °C. Deriváty izoprenoidů byly extrahovány hexanem a promývány 10 ml 0,1 M uhličitanem sodným a 8 ml destilované vody. Vysušené vzorky byly rozpuštěny ve 100  $\mu\text{l}$  vnitřního standardu 19:0 (izooktanový roztok methylesteru kyseliny nonadekanové o koncentraci 50  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ ).

### ***Separace a identifikace PLEL pomocí GC/MS***

Izoprenoidní uhlovodíky byly analyzovány v laboratoři Ústavu půdní ekologie (GSF, Institute of Soil Ecology, Neuherberg, SRN) pomocí hmotnostního spektrometru v kombinaci s plynovým chromatografem (Thermo Finigan Trace MS/Trace GC) s HP 5 kapilární kolonou (50 m, 0,2 mm, 0,3  $\mu\text{m}$ ) a hmotnostně selektivním detektorem HP 5971. Nosným plynem bylo helium (rychlost toku 0,8  $\text{ml min}^{-1}$ ). Průběh teplot na koloně byl následující: injekční teplota 70 °C; po 2 min zvýšení na 130 °C (30 °C  $\text{min}^{-1}$ ); 320 °C (4 °C  $\text{min}^{-1}$ ) po dobu 20 min. Celkový čas 1 sekvence byl 74,5 min. Identifikace PLEL byla provedena na základě porovnání dat retenčních časů a hmotnostních spekter získaných z chromatogramů s daty knihovny izoprenoidů archeí získaných z izolátů v laboratoři v Neuherbergu. Názvosloví se řídí podle vzorce  $iA:B-Ccy$  ( $i$  = izoprenoid,  $A$  = počet atomů uhlíku,  $B$  = počet dvojných vazeb,  $C$  = počet cyklopentanových kruhů). Pro stanovení velikosti methanogenního společenstva byla provedena kvantifikace izoprenoidu  $i20:1$ .

### 3.4.4 Analýza fosfolipidických mastných kyselin (PLFA)

#### *Mírná alkalická methanolýza (hydrolýza)*

Mírnou alkalickou hydrolýzou se štěpí esterické vazby mezi glycerolem a mastnými kyselinami polárních lipidů (fosfolipidů) za vzniku methylesterů mastných kyselin.

Koncentrovaný vzorek fosfolipidů byl rozpuštěn v 1 ml směsi methanol:toluen (1:1) a ke vzorku bylo přidáno 5 ml čerstvě připraveného 0,2 M KOH v methanolu. Vzorky byly inkubovány při teplotě 37 °C 15 min. Methylestery mastných kyselin byly extrahovány 10 ml chloroformu a 10 ml vody. Organická fáze byla oddělena centrifugací (2000 rpm, 10 min), odebrána a přefiltována přes bezvodý síran sodný. Zbývající vodná fáze byla ještě jedenkrát reextrahována 8 ml chloroformu. Objem spojených chloroformových fází byl redukován proudem N<sub>2</sub>.

#### *Separace methylesterů mastných kyselin na estericky a neestericky vázané komponenty (EL-PLFA a NEL-PLFA)*

Separace methylesterů mastných kyselin se uskutečňuje chromatografií na pevné fázi pomocí NH<sub>2</sub> kolon (aminopropylová fáze Chromabond, 3 ml, Macherey-Nagel, SRN). Vzorek rozpuštěný v maximálně 0,5 ml chloroformu byl po nanesení na kolonu promýván 1 objemem kolony směsí hexan:dichlormethan (3:1) a byla tak získána frakce estericky vázaných nesubstituovaných mastných kyselin EL-PLFA, poté 1 objemem směsí dichlormethan:ethylacetát (9:1), kde byly získány hydroxysubstituované EL-PLFA. Pro získání neestericky vázaných mastných kyselin (NEL-PLFA) ve frakci nesaponifikovatelných lipidů byl vzorek promýván 2 objemy 2 % kyseliny octové v methanolu.

#### 3.4.4.1 Analýza neestericky vázaných fosfolipidických mastných kyselin (NEL-PLFA)

Neestericky vázané mastné kyseliny (NEL-PLFA) jsou získány kyselou hydrolýzou nesaponifikovatelných lipidů. Jejich nesubstituované formy (UNSFA) poskytují

informaci o velikosti a skladbě anaerobních mikroorganismů ve společenstvu. Metoda sestává z následujících kroků:

***Kyselá methylace nesaponifikovatelných lipidů a separace na nesubstituované mastné kyseliny (UNSFa) a hydroxysubstituované mastné kyseliny (UNOH)***

Vysušená frakce nesaponifikovatelných lipidů získaných separací na  $\text{NH}_2$  kolonách byla rozpuštěna ve 2 ml směsi methanol:chloroform:kyselina chlorovodíková (37 %) (10:1:1). Celá reakce probíhala při 60 °C po dobu 16 hodin. Poté byly přidány ke vzorku 2 ml 2 % chloridu sodného a provedena extrakce 3 x 4 ml směsi hexan:toluen (1:1). Horní fáze byla po centrifugaci (2000 rpm, 10 min) přefiltrována přes bezvodý síran sodný a promyta hexanem.

Separace mastných kyselin na UNSFA a UNOH byla provedena opět pomocí  $\text{NH}_2$  kolon, kdy promýváním vzorku 1 objemem směsi hexan:dichlormethan (3:1) byly získány nesubstituované složky a promýváním 1 objemem směsi dichlormethan:ethylacetát (9:1) byly získány hydroxysubstituované složky nesaponifikovatelných lipidů. UNSFA byly po vysušení proudem dusíku rozpuštěny v 50  $\mu\text{l}$  vnitřního standardu 19:0 (isooktanový roztok methylesteru nonadekanové kyseliny o koncentraci 250  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ ) a převedeny do speciálních vialek pro měření vzorků plynovou chromatografií.

***Identifikace mastných kyselin UNSFA***

UNSFa byly identifikovány v laboratoři Ústavu půdní ekologie (GSF, Institute of Soil Ecology, Neuherberg, SRN) pomocí hmotnostního spektrometru v kombinaci s plynovým chromatografem spojeným s hmotnostním spektrometrem pro stanovení izotopového poměru (GC/MS-c-IRMS, Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Aplikovaný objem vzorku byl 2 - 5  $\mu\text{l}$ . Průběh teplot na koloně byl následující: iniciační teplota byla 50 °C, po 2 minutách teplota vzrostla na 136 °C (55 °C  $\text{min}^{-1}$ ) a následně na 250 °C (2 °C  $\text{min}^{-1}$ ).

Identifikace jednotlivých mastných kyselin (UNSFa) byla provedena na základě porovnání dat retenčních časů a hmotnostních spekter získaných z chromatogramů s daty knihovny mastných kyselin (Agilent 5973 MSD GC/MS – Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Kvantifikace jednotlivých komponent byla provedena pomocí IRMS Software (program ISODAT 2.0).

### 3.4.4.2 Analýza estericky vázaných fosfolipidických mastných kyselin (EL-PLFA)

Pro stanovení estericky vázaných mastných kyselin membránových fosfolipidů, reprezentujících majoritní část mikrobiálního společenstva (bakterií a mikroeukaryot) ve vzorcích půdy, exkrementech a bachorové tekutině lze využít frakcí EL-PLFA, získaných separací na SPE - NH<sub>2</sub> kolonách nebo nefrakcionovaný vzorek methylesterů získaný přímo mírnou alkalickou methanolýzou. V této studii byl použit postup bez frakcionace EL-PLFA na SPE-NH<sub>2</sub> kolonách.

Zakoncentrovaná organická fáze získaná mírnou alkalickou methanolýzou (kap. 3.4.4) byla před identifikací mastných kyselin naředěna 100 µl hexanu obsahujícího vnitřní standard methylester kyseliny nonadekanové (100 ng µl<sup>-1</sup>).

#### *Separace a identifikace EL-PLFA*

Mastné kyseliny ve formě methylesterů byly separovány plynovou chromatografií na přístroji Agilent 6850 (Agilent Technologies, USA) s plamenovým ionizačním detektorem na kapilární koloně (HP 5, 30 m, 0,25 mm, 0,1 µm, Agilent Technologies, USA). Vzorek (1 µl) byl aplikován při injekční teplotě 280 °C. Nosným plynem byl vodík. Průběh teplot na koloně byl následující: 60 °C (20 °C min<sup>-1</sup>); 160 °C po dobu 5 min (5 °C min<sup>-1</sup>); 300 °C po dobu 5 min.

K identifikaci byl použit identifikační program, který je součástí software MIS Sherlock System (MIDI, USA). Mastné kyseliny byly identifikovány pomocí FAME standardů (Sigma Aldrich). Názvosloví PLFA se řídí podle vzorce A:BωC, popsáno v Orawecz *et al.* (2004) (A = počet atomů uhlíku, B = počet dvojných vazeb, C = pozice dvojně vazby od alifatického konce molekuly). Pro účely této práce nebyly využity kvalitativní údaje o skladbě společenstva bakterií a mikroeukaryot, ale pouze kvantita PLFA pro získání informace o velikosti celkového mikrobiálního společenstva. Pro účely této práce byly využity kvantitativní údaje o celkovém množství EL-PLFA pro získání informace o velikosti celkového mikrobiálního společenstva. Z kvalitativních údajů byly využity pouze EL-PLFA specifické pro methanotrofní a methylotrofní bakterie (viz dále kap. 3.5).

Kvantifikace jednotlivých identifikovaných složek (EL-PLFA, NEL-PLFA, PLEL) byla provedena pomocí vnitřního standardu přepočtem velikosti plochy pod píkem

na koncentraci PLFA nebo PLEL v 1 g suché hmotnosti vzorku půdy nebo vzorku z trávicího traktu skotu podle vztahu:

$$c_{FA/EL} = (A_{vz} \cdot V_{vz}) / (f_{is} \cdot w)$$

$c_{FA, EL}$  ..... koncentrace PLFA, PLEL [ $\text{nmol g}^{-1}$  sp]

$A_{vz}$  ..... plocha pod píkem (vzorku)

$V_{vz}$  ..... objem analyzovaného vzorku [ $\mu\text{l}$ ]

$w$  ..... hmotnost suché půdy (sušina) na vzorek

$f_{is}$  ..... faktor vnitřního standardu ( $f_{is} = A_{is}/n_{is}$ )

$A_{is}$  ..... plocha pod píkem (vnitřní standard)

$n_{is}$  ..... látkové množství vnitřního standardu [ $\text{nmol}$ ]

### 3.5 Analýza methanotrofního společenstva půdy

Methanotrofní společenstvo bylo charakterizováno pomocí analýzy EL-PLFA, která byla provedena podle postupu popsaného v kapitole 3.4.4.2. Pro analýzu methanotrofního společenstva byly použity půdy odebrané 15.5.2006 ze tří stanovišť experimentálního zimoviště. Na základě kvantifikace specifických mastných kyselin pro obligátní methanotrofy (*16:1 $\omega$ 8* a *18:1 $\omega$ 8*) a pro fakultativní methanotrofy (*15:1 $\omega$ 6*; *16:1 $\omega$ 11*; *16:1 $\omega$ 9*; *16:1 $\omega$ 7*; *16:1 $\omega$ 5*, *17:1 $\omega$ 8*; *18:1 $\omega$ 9*; *18:1 $\omega$ 7c*; *18:1 $\omega$ 5*) byly získány údaje o velikosti společenstva methanotrofních bakterií (Makula, 1978; Virtue *et al.*, 1996; Gebert *et al.*, 2004).

Pro ověření správného výběru specifických markerů EL-PLFA v celkovém půdním mikrobiálním společenstvu byla provedena kultivace, izolace a analýza EL-PLFA methanotrofních kultur. Byly zjištěny také počty kultivovatelných methanotrofních bakterií na jednotku suché půdy. Kultivace bakterií byla provedena na plotnách se selektivním médiem (methylococcus médium, Atlas, 1993). Ze suspenze 18 ml vody a 2 g vzorku půdy byla připravena ředící řada od  $10^{-2}$  až po  $10^{-7}$  a na plotny bylo aplikováno 0,1 ml suspenze ve třech opakováních od každé půdy ze stanovišť S, M a C pro každé ředění. Petriho misky byly inkubovány při 28 °C ve skleněných konzervách s 30 % methanovou atmosférou. Po 32 dnech byly odečítány počty CFU (*colony forming units*).

Dobře narostlé kolonie byly izolovány, přečištěny a podrobeny analýze fosfolipidických mastných kyselin. Identifikaci methanotrofních bakterií předcházelo tento postup popsany také v práci Elhottová (2004): do tzv. Sherlock zkumavky byla přenesena bakteriální biomasa a saponifikace byla provedena pomocí přídatku 1 ml silné zásady (4M NaOH v methanolu a deionizovaná vodě). Pro lyzi bakteriálních buněk byly vzorky umístěny do varné lázně o teplotě 100 °C na 5 min, po ochlazení byly vzorky na 25 min opět ponořeny do varné lázně o stejné teplotě jako předchozí. Po ochlazení byly přidány ke vzorkům 2 ml roztoku 6N HCl v methanolu a mastné kyseliny byly převedeny na jejich methylestery. Poté byly vzorky zahřívány po dobu 10 min při 80 °C ve vodní lázni a opět ochlazeny na laboratorní teplotu. Ke vzorkům bylo přidáno 1,25 ml směsi hexanu a methyl-tert-butyl etheru (1:1, V/V) a vzorky protřepávány 10 minut na horizontální třepačce. Spodní vodná fáze byla odebrána a k horní fázi byly přidány 3 ml roztoku 0,3M NaOH v deionizované vodě k odstranění zbytků volných mastných kyselin a ještě 5 minut ponecháno třepat. Zcentrifugované vzorky (4000 rpm, 10 min) byly dokončeny odebráním horní fáze a přenesením do speciální vialky k měření plynovou chromatografií. Separace methylesterů mastných kyselin byla provedena pomocí plynového chromatografu 6850 (Agilent Technologies, USA) s kapilární kolonou Ultra 2, 25 m. Teplotní program byl následující: 170°C - 5°C min<sup>-1</sup> - 270°C; 300°C po 2 min pro čištění kolony; nosným plynem byl vodík. Identifikace kultivovatelných methanotrofů byla provedena pomocí MIS Sherlock identifikačního systému (Aerobe Bacterial Library, ver. 4.5, MIDI, Inc. USA). Toto kultivační stanovení bylo provedeno pouze u půd odebraných v květnu, 2006.

### 3.6 Statistické hodnocení výsledků

Při analýzách vzorků byl sledován různý vliv skotu na změny půdního mikrobiálního společenstva v pastevní půdě. Tento vliv byl hodnocen jako porovnání půd ze silně a středně zatížených stanovišť s kontrolou zcela nezatíženou v období těsně po odchodu skotu ze zimoviště. Dlouhodobé změny vlastností a funkcí mikrobiálního společenstva v důsledku vlivu skotu byly studovány v půdách odebraných v říjnu po půlroční regeneraci půdy bez zátěže skotem. Výsledky analýz z podzimního odběru půdních vzorků byly následně porovnány s výsledky jarního odběru.

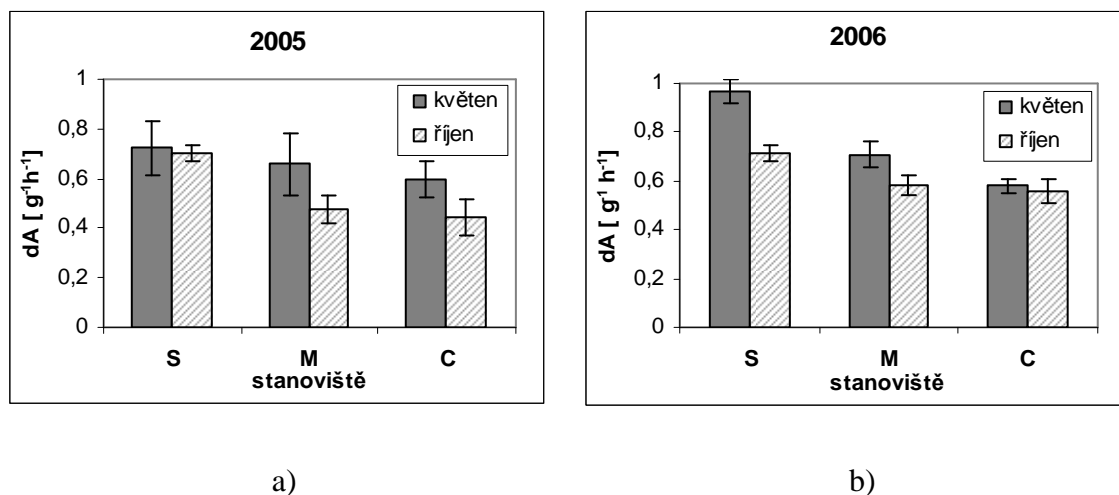
Kvantitativní údaje získané při analýze PLEL, EL-PLFA a NEL-PLFA byly statisticky hodnoceny analýzou variance (ANOVA) a Tukey HSD testem v programu

STATISTICA. Průkazné rozdíly mezi hodnotami byly stanoveny na 5 % hladině významnosti ( $P=0,05$ ); F je hodnota testovacího kritéria.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Celková metabolická mikrobiální aktivita (FDA)

Celková metabolická aktivita (FDA) půdního mikrobiálního společenstva byla stanovena opakovaně v letech 2005 a 2006 (Obr. 4). Její hodnoty s rostoucím zatížením půd vlivem skotu vzrůstaly. Vyšší hodnoty byly zjištěny na konci zimního pobytu zvířat (květen) ve srovnání s hodnotami měřenými po půlroční absenci zvířat na pastvině (říjen); hodnoty FDA vzrůstaly také se zvyšujícím se zatížením jednotlivých stanovišť skotem ( $S > M > C$ ) v obou odběrech. V květnu 2005 se rozdíly FDA mezi jednotlivými stanovišti S, M a C průkazně nelišily ( $P=0,06$ ;  $F=3,25$ ), v říjnu 2005 po letní pauze mikrobiální aktivita ve srovnání s květnem 2005 klesla v půdě se střední (M) a nulovou (C) zátěží, ale hodnoty nebyly průkazně rozdílné ( $P=0,50$ ). V roce 2006 byla FDA vyšší než v roce 2005 a rozdíly mezi půdami jednotlivých stanovišť byly statisticky průkazně odlišné v květnu ( $P < 0,05$ ;  $F=183,6$ ) i v říjnu ( $P < 0,05$ ;  $F=39,48$ ). V říjnu 2006 se hodnoty FDA půdy ze stanovišť M a C průkazně nelišily, i když podobně jako v roce 2005 byly hodnoty ze stanoviště M poněkud vyšší než hodnoty ze stanoviště C.



**Obr. 4** – Celková metabolická mikrobiální aktivita (FDA) naměřená v půdě stanovišť s různým stupněm zatížení skotem (S – silná, M – střední, C – nulová zátěž - kontrola) v době odběru vzorků po odchodu skotu (květen) a před příchodem skotu na zimoviště (říjen) v letech a) 2005, b) 2006



## 4.2 Celková mikrobiální biomasa společenstva pastevní půdy

Celková mikrobiální biomasa byla stanovena pomocí analýz tří základních skupin membránových biomarkerů: estericky vázaných fosfolipidických mastných kyselin (EL-PLFA), neestericky vázaných fosfolipidických mastných kyselin (NEL-PLFA) a složek fosfolipidických etherlipidů (PLEL), které současně reprezentují tři základní skupiny mikrobiálního společenstva, tj. bakterie (a mikroeukaryota), anaerobní mikroorganismy a archea. Jak je uvedeno v Tab. 3, celková mikrobiální biomasa v půdě dosahovala různých hodnot na stanovištích s různým stupněm zatížení skotem. Rozdíly byly zjištěny také mezi hodnotami naměřenými v květnu a v říjnu. V silně zatížené půdě se množství biomasy čtyřikrát zvýšilo v květnu i v říjnu ve srovnání s kontrolou, ve středně zatížené půdě byla v květnu biomasa dvakrát vyšší oproti kontrole, ale v říjnu se celková biomasa ve středně zatížené půdě snížila na úroveň kontroly.

**Tab. 3** – Celková mikrobiální biomasa v půdách s různým stupněm zátěže skotem naměřená po odchodu skotu (květen) a před příchodem skotu na zimoviště (říjen). Jsou uvedeny aritmetické průměry výběrů (n=9) a v závorkách směrodatné odchylky výběrů; různá písmena označují průkazně rozdílné hodnoty mezi různými stanovišti ve stejné době odběru vzorků a \* udává průkazně rozdílné hodnoty mezi stejnými stanovišti v různé době odběru vzorků; zkratka sp – přepočteno na g suché půdy

Doba odběru vzorků	Stupeň zatížení půdy	Celková mikrobiální biomasa [nmol PLFA+PLEL g <sup>-1</sup> sp ]
Květen 2005	Silný (S)	<b>600,8</b> (130,3) <sup>a</sup>
	Střední (M)	<b>310,8</b> (103,5) <sup>b</sup>
	Kontrolní (C)	<b>150,6</b> (32,0) <sup>c</sup>
Říjen 2005	Silný (S)	<b>600,5</b> (108,5) <sup>a</sup>
	Střední (M)	<b>111,6</b> (31,9) <sup>b*</sup>
	Kontrolní (C)	<b>136,8</b> (29,7) <sup>b</sup>

## 4.3 Hodnocení společenstva archeí v pastevní půdě

### 4.3.1 Kvantitativní hodnocení archeí v pastevní půdě

Kvantitativní analýza fosfolipidických etherlipidů (PLEL) ukázala, že zastoupení archeí v půdním mikrobiálním společenstvu se značně zvýšilo v půdách se silným i středním vlivem skotu v porovnání s půdou bez zátěže - kontrolou (Tab. 4). Archea

nepřesahovala v kontrolní půdě průměrně 2 % celkové biomasy mikrobiálního společenstva, ve středně zatížené půdě 2,6 % a v silně zatížené půdě se archea podílela 4,5 %. Statisticky průkazný rozdíl ( $P < 0,05$ ;  $F = 124,1$ ) v koncentracích PLEL mezi všemi třemi odběrovými stanovišti byl nalezen u půd odebraných v květnu. V říjnu se půdy se střední a kontrolní zátěží průkazně nelišily ( $P = 0,98$ ;  $F = 0,96$ ). Po letní pauze bez pobytu skotu se biomasa archeí ve středně zatížené půdě (M) snížila na úroveň kontrolní půdy (C). Množství biomasy archeí v půdách stanoviště M a C v květnu se však průkazně lišilo od množství biomasy archeí v půdách odebraných v říjnu ( $P < 0,05$ ;  $F_{M/M} = 35,7$ ;  $F_{C/C} = 478,3$ ).

**Tab. 4** – Biomasa archeí v půdách s různým stupněm zátěže skotem naměřená po odchodu skotu (květen) a před příchodem skotu na zimoviště (říjen). Jsou uvedeny aritmetické průměry výběrů ( $n = 9$ ) a v závorkách směrodatné odchylky výběrů; různá písmena označují průkazně rozdílné hodnoty mezi různými stanovišti ve stejné době odběru vzorků a \* udává průkazně rozdílné hodnoty mezi stejnými stanovišti v různé době odběru vzorků

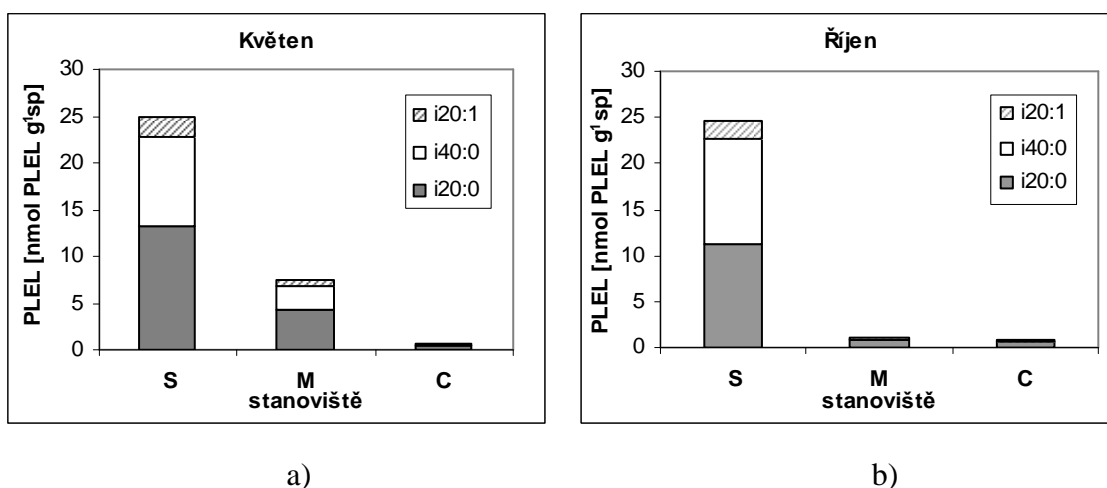
Doba odběru vzorků	Stupeň zatížení půdy	Biomasa archeí [nmol PLEL g <sup>-1</sup> sp]	Podíl archeí v celkové mikrob. biomase [%]
Květen 2005	Silný (S)	<b>24,79</b> (5,01) <sup>a</sup>	<b>4,24</b> (0,92) <sup>a</sup>
	Střední (M)	<b>7,43</b> (2,24) <sup>b</sup>	<b>2,43</b> (0,39) <sup>b</sup>
	Kontrolní (C)	<b>0,56</b> (0,19) <sup>c</sup>	<b>0,38</b> (0,14) <sup>c</sup>
Říjen 2005	Silný (S)	<b>26,58</b> (3,34) <sup>a</sup>	<b>4,52</b> (0,82) <sup>a</sup>
	Střední (M)	<b>2,67</b> (0,24) <sup>b*</sup>	<b>2,59</b> (0,81) <sup>b</sup>
	Kontrolní (C)	<b>2,50</b> (0,17) <sup>b*</sup>	<b>1,90</b> (0,38) <sup>b*</sup>

#### 4.3.2 Diverzita archeálních PLEL markerů v pastevní půdě

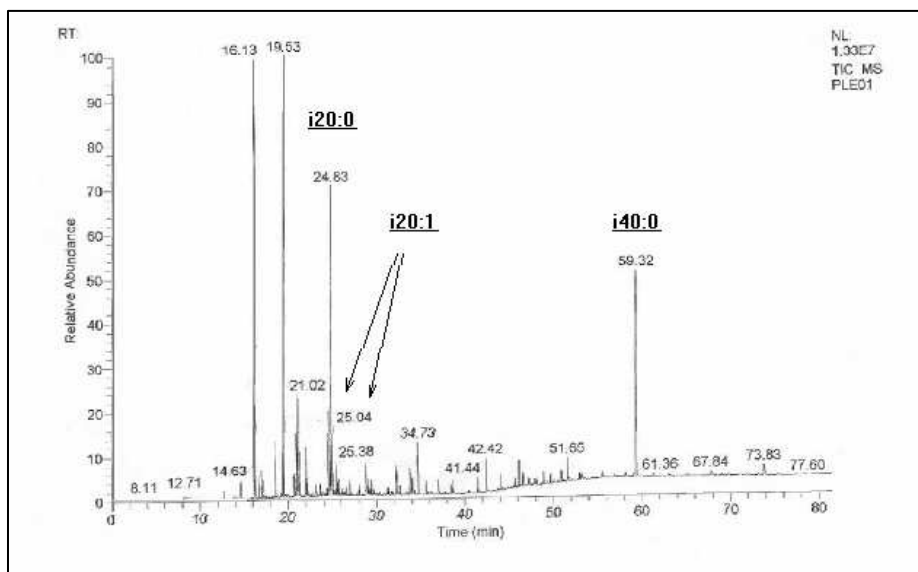
Jako markery archeí v pastevní půdě byly identifikovány 20-uhlíkové izoprenoidy s necyklickým větvením *i20:0*; *i20:1* a 40-uhlíkový izoprenoid *i40:0*, které jsou typické pro *Euryarchaeota*. Nejhojněji zastoupený byl *i20:0*, který se podílel na celkových PLEL z 50 - 90 %. Přítomnost markeru *i20:1* potvrdila obohacení pastevní půdy methanogenními archeí (MA). Zvýšení abundance MA odpovídalo míře zatížení skotem. Maximální hodnoty byly naměřeny v jarním období v době ukončení pobytu skotu na zimovišti. V porovnání s nezatíženou kontrolní půdou bylo v tomto období zjištěno čtyřicetinasobné zvýšení MA na stanovišti se silnou zátěží (S) a jejich čtrnáctinasobné zvýšení na stanovišti se střední zátěží (M). Po půlroční regeneraci půdy

abundance methanogenního společenstva na stanovišti se silnou zátěží zůstala stejně vysoká jako v květnu, avšak na stanovišti se střední zátěží poklesla na stabilně nízkou úroveň kontrolní nezatížené půdy. Koncentrace markeru pro methanogenní archea dosahovaly v květnu na stanovištích S; M a C hodnot 2,11; 0,73 a 0,05 nmol PLEL g<sup>-1</sup> suché půdy a v říjnu 1,85; 0,13 a 0,12 nmol PLEL g<sup>-1</sup> suché půdy. Na Obr. 7 je znázorněna korelace koncentrace methanogenního markeru *i20:1* a emisí methanu z půdy tří sledovaných stanovišť v květnu a říjnu. Z Obr. 7 vyplývá, že emise methanu odpovídají nárůstu biomasy methanogenních archeí.

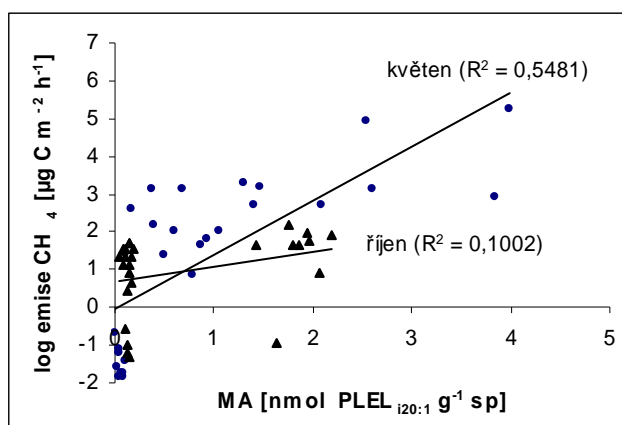
V silně zatížené půdě měl vysoký podíl izoprenoid *i40:0*, ale nebyl identifikován ve vzorcích květnového odběru z kontrolního stanoviště. V půdě nebyly identifikovány žádné markery s cyklickými 40-uhlíkovými izoprenoidními řetězci. Zastoupení jednotlivých izoprenoidů je zobrazeno na Obr. 5 a, b. Na Obr. 6 je příklad chromatogramu PLEL (výstup GC/MS), který znázorňuje abundanci identifikovaných archeálních izoprenoidů v typických retenčních časech.



**Obr. 5** – Koncentrace detekovaných PLEL izoprenoidů (biomarkerů archeí) v půdě stanovišť s různým stupněm zatížení skotem (S – silná, M – střední, C – nulová zátěž - kontrola) v době odběru vzorků a) po odchodu skotu (květen), b) před příchodem skotu na zimoviště (říjen); názvosloví izoprenoidů: předpona *i* značí izoprenoidní větvení, číslo za předponou udává počet atomů uhlíku, číslo za dvojtečkou udává počet dvojných vazeb



**Obr. 6** – Chromatogram (GC/MS) PLEL izoprenoidů v pastevní půdě zimoviště. Byly identifikovány tři markery archeí *i20:0*; *i20:1* a *i40:0*. Izoprenoid *i20:1* pro methanogenní archea byl identifikován při dvou retenčních časech ( $RT_1 \sim 25,0$ ;  $RT_2 \sim 25,4$ ).



**Obr. 7** – Korelace mezi koncentrací methanogenního markeru *i20:1* (MA – methanogenní archea) a emisemi methanu z půdy studované lokality v květnu a v říjnu; rovnice přímky pro květen:  $y=1,43x-0,06$  ( $r=0,74$ ); rovnice přímky pro říjen:  $y=0,39x+0,70$  ( $r=0,31$ )

#### 4.4 Hodnocení anaerobních mikroorganismů v pastevní půdě

##### 4.4.1 Kvantitativní zastoupení NEL-PLFA markerů anaerobních mikroorganismů v pastevní půdě

Velikost anaerobního mikrobiálního společenstva byla odhadnuta na základě analýzy nesubstituovaných neestericky vázaných mastných kyselin (NEL-PLFA).

V půdním mikrobiálním společenstvu anaerobové tvořily podíl 2-4 % celkové mikrobiální biomasy. Největší zastoupení měly v půdě silně zatíženého stanoviště, kde byly naměřeny na jaře 7,5krát a na podzim 5,5krát vyšší hodnoty než v kontrolní půdě. V půdách odebraných v květnu na stanovištích M a C se velikost anaerobního společenstva průkazně nelišila ( $P=0,50$ ), stejně jako v půdách odebraných v říjnu ( $P=0,99$ ). V případě silně a středně zatížené půdy v říjnu se hodnoty průkazně lišily od hodnot ze stejných stanovišť naměřených v květnu ( $P<0,05$ ;  $F_{S/S}=6,81$  a  $F_{M/M}=15,0$ ). Na podzim došlo k poklesu biomasy anaerobů na silně zatíženém stanovišti o třetinu, na středně zatíženém stanovišti více než na polovinu až na úroveň kontroly, zatímco v kontrolní půdě nedošlo k větším změnám a množství biomasy anaerobů bylo v květnu i v říjnu relativně nízké. V Tab. 5 je uvedeno množství biomasy anaerobů. V půdě kontrolního stanoviště bez vlivu skotu bylo zastoupení NEL-PLFA dvakrát vyšší než zastoupení PLEL. S vyšším vlivem skotu se poměr PLEL a NEL-PLFA blížil 1:1.

**Tab. 5–** Biomasa anaerobních mikroorganismů v půdách s různým stupněm zátěže skotem naměřená po odchodu skotu (květen) a před příchodem skotu na zimoviště (říjen). Jsou uvedeny aritmetické průměry výběrů ( $n=9$ ) a v závorkách směrodatné odchytky výběrů; různá písmena označují průkazně rozdílné hodnoty mezi různými stanovišti ve stejné době odběru vzorků a \* udává průkazně rozdílné hodnoty mezi stejnými stanovišti v různé době odběru vzorků

Doba odběru vzorků	Stupeň zatížení půdy	Biomasa anaerobů [nmol NEL-PLFA g <sup>-1</sup> sp]	Podíl anaerobů v celkové mikrob. biomase [%]
Květen 2005	Silný (S)	<b>24,25</b> (7,86) <sup>a</sup>	<b>4,30</b> (1,90) <sup>a</sup>
	Střední (M)	<b>6,80</b> (2,66) <sup>b</sup>	<b>2,34</b> (0,93) <sup>b</sup>
	Kontrolní (C)	<b>3,22</b> (0,56) <sup>b</sup>	<b>2,26</b> (0,64) <sup>b</sup>
Říjen 2005	Silný (S)	<b>16,41</b> (3,24) <sup>a*</sup>	<b>2,76</b> (0,43) <sup>a*</sup>
	Střední (M)	<b>3,05</b> (0,67) <sup>b*</sup>	<b>2,88</b> (0,73) <sup>a</sup>
	Kontrolní (C)	<b>3,01</b> (0,62) <sup>b</sup>	<b>2,28</b> (0,53) <sup>a</sup>

#### 4.4.2 Diverzita NEL-PLFA markerů anaerobních mikroorganismů v pastevní půdě

Na základě analýzy nesubstituovaných mastných kyselin jako součásti neestericky vázaných fosfolipidických mastných kyselin byly identifikovány neestericky vázané mastné kyseliny. Diverzita neestericky vázaných mastných kyselin v pastevní půdě je uvedena v Tab. 8. Mezi identifikované kyseliny patřili zejména nasycené mastné kyseliny s přímým řetězcem, iso-větvené, a anteiso-větvené kyseliny. U všech

studovaných půd s různým stupněm zátěže skotem byly nejčastěji zjištěny mastné kyseliny 16:0 (*palmitová*); 18:0 (*stearová*) a 26:0 (*cerotiová*) a jejich koncentrace klesala s nižším vlivem skotu.

#### 4.5 Kvantitativní hodnocení hlavní složky mikrobiálního společenstva (bakterií a mikroeukaryot) v pastevní půdě

Součástí studia struktury půdního mikrobiálního společenstva byla analýza estericky vázaných fosfolipidických mastných kyselin (EL-PLFA), jejímž cílem bylo stanovit velikost společenstva bakterií a mikroeukaryot, které tvoří majoritní podíl v celkové mikrobiální biomase.

**Tab. 6** – Biomasa bakterií a mikroeukaryot v půdách s různým stupněm zátěže skotem naměřená po odchodu skotu (květen) a před příchodem skotu na zimoviště (říjen). Jsou uvedeny aritmetické průměry výběrů (n=9) a v závorkách směrodatné odchytky výběrů; různá písmena označují průkazně rozdílné hodnoty mezi různými stanovišti ve stejné době odběru vzorků a \* udává průkazně rozdílné hodnoty mezi stejnými stanovišti v různé době odběru vzorků

Doba odběru vzorků	Stupeň zatížení půdy	Biomasa bakterií a mikroeukaryot [nmol EL-PLFA g <sup>-1</sup> sp]	Podíl bakterií a mikroeukaryot v celkové mikrob. biomase [%]
Květen 2005	Silný (S)	551,79 (121,51) <sup>a</sup>	91,46 (2,44) <sup>a</sup>
	Střední (M)	296,53 (94,62) <sup>b</sup>	95,23 (1,04) <sup>b</sup>
	Kontrolní (C)	146,77 (30,35) <sup>c</sup>	97,37 (0,72) <sup>c</sup>
Říjen 2005	Silný (S)	557,47 (98,67) <sup>a</sup>	92,71 (1,06) <sup>a</sup>
	Střední (M)	105,86 (29,66) <sup>b*</sup>	94,53 (1,36) <sup>b</sup>
	Kontrolní (C)	131,27 (27,82) <sup>b</sup>	95,82 (0,81) <sup>b*</sup>

Biomasa bakterií a mikroeukaryot na stanovišti silně zatíženém skotem (S) se čtyřikrát zvýšila oproti kontrole (C) v květnu i v říjnu. Všechna stanoviště S, M a C se v květnu průkazně v množství biomasy lišila ( $P < 0,05$ ;  $F = 40,85$ ). Na stanovišti středně zatíženém skotem (M) se biomasa zvýšila dvojnásobně oproti kontrole pouze v květnu bezprostředně po odchodu skotu ze zimoviště. Na podzim po letní regeneraci půdy bez vlivu skotu se množství biomasy v půdě ze středně zatíženého stanoviště (M) snížilo a dosahovalo nižších hodnot než na kontrole, tudíž se od sebe hodnoty stanoviště M a C statisticky nelišily ( $P = 0,69$ ). V Tab. 6 je uvedeno množství biomasy bakterií

a mikroeukaryot zjištěné analýzou EL-PLFA a jejich podíl v celkové mikrobiální biomase.

#### 4.6 Skladba mikrobiálního společenstva exkrementů skotu

Biomasa archeí, anaerobů, bakterií i mikroeukaryot byla v exkrementech skotu stanovena na základě analýz fosfolipidických etherlipidů a mastných kyselin stejně jako předchozích půdních vzorků. V Tab. 7 je uvedeno kvantitativní hodnocení jednotlivých studovaných složek mikrobiálního společenstva. Biomasa komplexního mikrobiálního společenstva zjištěná v exkrementech byla v přepočtu na hmotnost sušiny třikrát vyšší v porovnání s biomasou půdy nejvíce zatíženého stanoviště (S) v květnu i v říjnu.

Archea v exkrementech měla srovnatelný relativní podíl v celkové mikrobiální biomase (5,2 %) jako archea v silně zatížené půdě odebrané v květnu (v absolutním vyjádření však byly exkrementy 3,5krát bohatší na biomasu archeí než půda.

Diverzita archeálních PLEL markerů v exkrementech byla shodná s diverzitou v pastevní půdě (Obr. 8). Stejně jako v silně zatížené půdě zde tvořily největší podíl *i20:0* a *i40:0* a jejich koncentrace byly v exkrementech vyšší, koncentrace markeru pro methanogenní archea *i20:1* (4,17 nmol PLEL g<sup>-1</sup> s. hm.) byla v exkrementech dvakrát vyšší než v půdě ze stanoviště S na jaře.

Maximální podíl v exkrementech tvořilo anaerobní společenstvo, které zaujímalo více než 50 % celkové mikrobiální biomasy (v půdě nejvýše 4 %). V exkrementech bylo zjištěno téměř desetkrát vyšší zastoupení anaerobů než archeí. V exkrementech byla identifikována mastná kyselina *18:1*, která nebyla nalezena v půdě ani v bachorové šťávě a naopak zde zcela chyběly mastné kyseliny *16:2a*, *cy 19:0*, *21:0*, *25:0*, *d24:x*, které byly identifikovány v půdě.

Biomasa bakterií a mikroeukaryot v exkrementech byla o 35 % vyšší na jednotku sušiny než jejich biomasa v silně zatížené půdě (S). Biomasa bakterií a mikroeukaryot byla však dokonce nižší než biomasa anaerobů a tvořila zde 43,3 % celkové mikrobiální biomasy.

#### 4.7 Skladba mikrobiálního společenstva bachorové šťávy skotu

Skladba mikrobiálního společenstva byla stanovena ve vzorcích bachorové šťávy dvou býků na základě analýz fosfolipidických etherlipidů a mastných kyselin (Tab. 7). Biomasa archeí v bachorové šťávě zaujímala 0,84 % celkové mikrobiální biomasy

a v porovnání s exkrementy se průkazně její hodnoty nelišily ( $P=0,21$ ;  $F=1,71$ ). Kromě izoprenoidů, které byly detekovány v půdě a exkrementech (*i20:0*, *i40:0* a *i20:1*), byly v bachorové šťávě navíc zaznamenány *i15:0* a *i40:0-2cy* (Obr. 8). Koncentrace methanogenního markeru *i20:1* dosahovala u bachorové šťávy  $4,27 \text{ nmol PLEL g}^{-1} \text{ s. hm.}$ , což se statisticky průkazně nelišilo od koncentrace *i20:1* v exkrementech.

Anaerobní společenstvo bachorové šťávy tvořilo 1,32 % celkové mikrobiální biomasy bachorové šťávy a dosahovalo na rozdíl od anaerobního společenstva exkrementů asi osmkrát nižších hodnot. Ve srovnání s archei zaujímali anaerobové o 56,1 % vyšší podíl v mikrobiální biomase bachorové šťávy a o 24,3 % vyšší podíl v biomase exkrementů.

Po kvalitativní stránce nebyly v bachorové šťávě detekovány žádné neestericky vázané mastné kyseliny, které by se nevyskytovaly v exkrementech nebo v půdě. Naopak chyběly mastné kyseliny, které byly detekovány pouze v půdě: *br13:0*, *16:2*, *cy19:0*, *21:0*, *25:0*, *d24:x*. Nebyly detekovány ani mastné kyseliny *18:x*, *23:0*, *24:0*, *28:x+d20:x*, nalezené v exkrementech i v půdě.

Biomasa bakterií a mikroeukaryot byla v bachorové šťávě téměř 10krát vyšší než v exkrementech a zaujímala 98 % celkové mikrobiální biomasy.

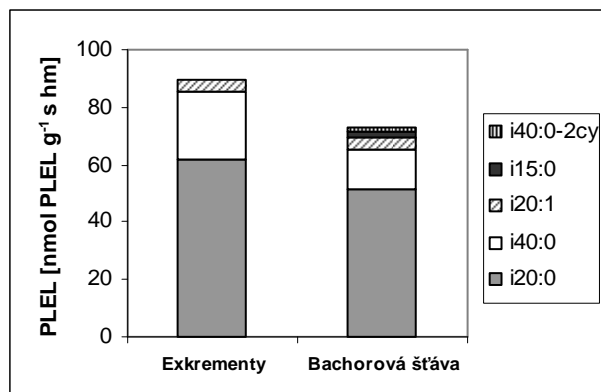
**Tab. 7** – Biomasa archeí, anaerobů, bakterií a mikroeukaryot zjištěná na základě analýz PLEL, EL- a NEL-PLFA exkrementů a bachorové šťávy skotu z experimentální lokality; jsou uvedeny aritmetické průměry výběrů ( $n=9$ ) a v závorkách směrodatné odchylky výběrů; různá písmena označují průkazný rozdíl v mikrobiální biomase exkrementů a bachorové šťávy přepočtené na jednotku suché hmotnosti exkrementů a bachorové šťávy

	Biomasa archeí [nmol PLEL $\text{g}^{-1} \text{ s hm}$ ]	Biomasa anaerobů [nmol NEL-PLFA $\text{g}^{-1} \text{ s hm}$ ]	Biomasa bakterií a mikroeukaryot [nmol EL-PLFA $\text{g}^{-1} \text{ s hm}$ ]	Celková mikrob. biomasa [nmol PLFA+PLEL $\text{g}^{-1} \text{ s hm}$ ]
<b>Exkrementy</b>	<b>89,56</b> (37,08) <sup>a</sup>	<b>883,95</b> (183,38) <sup>a</sup>	<b>745,50</b> (24,99) <sup>a</sup>	<b>1719,01</b> (190,10) <sup>a</sup>
<b>Bachorová šťáva</b>	<b>71,31</b> (22,86) <sup>a</sup>	<b>111,31</b> (38,38) <sup>b</sup>	<b>8280,23</b> (828,07) <sup>b</sup>	<b>8462,85</b> (621,79) <sup>b</sup>



**Tab. 8** – Koncentrace neestericky vázaných (NEL-PLFA) markerů anaerobní složky mikrobiálního společenstva v půdě s různým stupněm zatížení skotem (stanoviště S, M a C pro květen a říjen), v exkrementech a bachorové šťávě skotu; jsou uvedeny aritmetické průměry výběrů (n=9) a v závorkách směrodatné odchylky výběrů; názvosloví mastných kyselin: předpona značí způsob větvení (iso – isovětvené, a – anteisovětvené, cy – cyklopropylové, d – dikarboxylová mastná kyselina, br - typ větvení není známý); číslo za předponou udává počet atomů uhlíku; číslo za dvojtečkou stupeň nenasyčenosti vazeb (x – stupeň není známý)

NEL-PLFA markery	[nmol NEL-PLFA g <sup>-1</sup> sp] Půda - květen 2005			[nmol NEL-PLFA g <sup>-1</sup> sp] Půda - říjen 2005			[nmol NEL-PLFA g <sup>-1</sup> s hm]	
	Silný (S)	Střední (M)	Kontrolní (C)	Silný (S)	Střední (M)	Kontrolní (C)	Exkrementy	Bachorová šťáva
<i>br12:0</i>	<b>0,11</b> (0,13)	<b>0,06</b> (0,03)	<b>0,11</b> (0,16)	<b>0,36</b> (0,12)	<b>0,04</b> (0,03)	<b>0,06</b> (0,03)	<b>9,95</b> (7,40)	<b>1,44</b> (0,85)
<i>12:0</i>	<b>0,52</b> (0,48)	<b>0,13</b> (0,09)	<b>0,07</b> (0,09)	<b>0,28</b> (0,08)	<b>0,12</b> (0,15)	<b>0,11</b> (0,05)	<b>3,33</b> (2,55)	<b>5,52</b> (6,42)
<i>br13:0</i>	-	<b>0,03</b> (0,03)	-	-	-	-	-	<b>1,69</b> (2,94)
<i>iso14:0</i>	-	<b>0,03</b> (0,02)	-	<b>0,07</b> (0,08)	-	-	<b>0,59</b> (1,17)	<b>1,44</b> (0,69)
<i>14:0</i>	<b>1,00</b> (0,22)	<b>0,31</b> (0,16)	<b>0,13</b> (0,16)	<b>0,69</b> (0,11)	<b>0,18</b> (0,07)	<b>0,21</b> (0,06)	<b>17,18</b> (3,63)	<b>7,63</b> (2,60)
<i>iso15:0</i>	<b>0,55</b> (0,13)	<b>0,11</b> (0,05)	<b>0,02</b> (0,05)	<b>0,35</b> (0,08)	<b>0,03</b> (0,00)	<b>0,02</b> (0,01)	<b>6,31</b> (2,56)	<b>8,51</b> (3,26)
<i>a15:0</i>	<b>0,57</b> (0,22)	<b>0,10</b> (0,05)	<b>0,03</b> (0,05)	<b>0,29</b> (0,06)	<b>0,03</b> (0,01)	<b>0,03</b> (0,01)	<b>7,03</b> (2,96)	<b>5,08</b> (1,79)
<i>15:0</i>	<b>0,34</b> (0,10)	<b>0,09</b> (0,05)	<b>0,03</b> (0,05)	<b>0,24</b> (0,09)	<b>0,05</b> (0,04)	<b>0,06</b> (0,03)	<b>46,18</b> (12,9)	<b>4,76</b> (1,77)
<i>iso16:0</i>	<b>0,10</b> (0,12)	<b>0,05</b> (0,03)	-	<b>0,18</b> (0,05)	-	-	-	<b>2,01</b> (0,82)
<i>16:0</i>	<b>5,34</b> (0,96)	<b>1,65</b> (0,71)	<b>0,90</b> (0,71)	<b>3,81</b> (0,62)	<b>0,87</b> (0,14)	<b>0,81</b> (0,14)	<b>267,7</b> (116,61)	<b>36,47</b> (10,7)
<i>16:2</i>	<b>0,08</b> (0,10)	<b>0,02</b> (0,02)	-	-	-	-	-	-
<i>br17:0</i>	<b>0,80</b> (0,54)	<b>0,23</b> (0,13)	<b>0,02</b> (0,01)	<b>0,84</b> (0,23)	-	-	<b>6,54</b> (3,57)	<b>36,99</b> (0,90)
<i>17:0</i>	<b>0,29</b> (0,14)	<b>0,07</b> (0,03)	<b>0,02</b> (0,03)	<b>0,26</b> (0,20)	<b>0,06</b> (0,06)	<b>0,06</b> (0,06)	<b>40,55</b> (11,88)	<b>1,32</b> (0,28)
<i>18:0</i>	<b>6,85</b> (2,93)	<b>1,40</b> (0,74)	<b>0,55</b> (0,74)	<b>3,12</b> (0,46)	<b>0,68</b> (0,09)	<b>0,62</b> (0,17)	<b>173,28</b> (247,7)	<b>25,96</b> (9,20)
<i>18:x</i>	<b>0,57</b> (0,27)	<b>0,19</b> (0,16)	<b>0,13</b> (0,05)	<b>0,29</b> (0,32)	<b>0,17</b> (0,17)	<b>0,16</b> (0,12)	<b>60,19</b> (43,26)	<b>3,87</b> (1,33)
<i>18:1</i>	-	-	-	-	-	-	<b>7,32</b> (4,97)	-
<i>cy19:0</i>	-	-	-	<b>0,07</b> (0,09)	-	-	-	-
<i>20:0</i>	<b>0,54</b> (0,34)	<b>0,21</b> (0,11)	<b>0,11</b> (0,11)	<b>0,43</b> (0,17)	<b>0,14</b> (0,05)	<b>0,12</b> (0,06)	<b>23,66</b> (6,10)	<b>1,73</b> (0,52)
<i>21:0</i>	-	<b>0,04</b> (0,05)	<b>0,01</b> (0,05)	-	-	-	-	-
<i>22:0</i>	<b>0,88</b> (0,34)	<b>0,40</b> (0,25)	<b>0,19</b> (0,25)	<b>0,65</b> (0,16)	<b>0,19</b> (0,03)	<b>0,13</b> (0,02)	<b>23,10</b> (4,92)	<b>1,43</b> (0,57)
<i>23:0</i>	-	<b>0,22</b> (0,14)	<b>0,08</b> (0,14)	<b>0,40</b> (0,39)	<b>0,10</b> (0,04)	<b>0,06</b> (0,05)	-	-
<i>24:0</i>	<b>1,21</b> (0,52)	<b>0,47</b> (0,36)	<b>0,25</b> (0,36)	<b>0,92</b> (0,25)	<b>0,21</b> (0,04)	<b>0,17</b> (0,04)	<b>36,52</b> (10,04)	-
<i>25:0</i>	-	-	<b>0,02</b> (0,09)	<b>0,08</b> (0,19)	<b>0,03</b> (0,04)	-	-	-
<i>26:0</i>	<b>2,88</b> (1,94)	<b>0,50</b> (0,33)	<b>0,14</b> (0,33)	<b>2,02</b> (1,09)	<b>0,03</b> (0,07)	<b>0,10</b> (0,10)	<b>121,54</b> (38,79)	<b>0,55</b> (0,82)
<i>28:x+ d20:x</i>	<b>1,20</b> (0,58)	<b>0,32</b> (0,36)	<b>0,06</b> (0,36)	<b>0,78</b> (0,40)	-	<b>0,02</b> (0,05)	<b>18,58</b> (20,08)	-
<i>30:0</i>	-	<b>0,07</b> (0,11)	-	-	-	-	<b>1,52</b> (4,57)	-
<i>d24:x</i>	-	<b>0,04</b> (0,05)	<b>0,33</b> (0,05)	<b>0,16</b> (0,10)	<b>0,10</b> (0,13)	<b>0,23</b> (0,14)	-	-



**Obr. 8** - Koncentrace detekovaných PLEL izoprenoidů (biomarkerů archeí) v mikrobiálním společenstvu exkrementů a bachorové štávy

#### 4.8 Analýza methanotrofního společenstva půdy

Methanotrofní bakterie (MOB) v půdách třech stanovišť s různým zatížením skotem byly detekovány pomocí specifických EL-PLFA pro methanotrofní bakterie na základě literatury a na základě analýzy EL-PLFA methanotrofních bakteriálních izolátů vykultivovaných za selektivních podmínek. V Tab. 9 je uveden přehled mononenasycených mastných kyselin - markerů methanotrofů, počty kultivovatelných bakterií na jednotlivých stanovištích podle stupně zátěže skotem a hlavní zástupci fakultativně methanotrofních bakterií identifikovaných pomocí MIS Sherlock Systému. V žádném půdním ani bakteriálním vzorku nebyly detekovány mastné kyseliny *16:1 $\omega$ 8* a *18:1 $\omega$ 8*, které jsou specifické pro obligátně methanotrofní bakterie. Počty kultivovatelných methanotrofů byly průkazně vyšší na obou zatížených stanovištích v porovnání s kontrolou. Všechny izolované methanotrofní kmeny reprezentovaly pouze Gram pozitivní bakterie a potvrdily příslušnost ke skupině fakultativních methanotrofů. Abundance methanotrofního společenstva měla stejný trend jako abundance methanogenních archeí (MA). S rostoucí zátěží skotem se zvyšovalo množství biomasy methanotrofů v půdě (viz Tab. 10). Po pětíměsíční regeneraci půdy se abundance methanotrofních bakterií na stanovišti se střední zátěží (M) výrazně snížila dokonce pod úroveň hodnot kontroly (C). Z poměru MOB : MA je zřejmé, že s rostoucím vlivem skotu se v relativním měřítku k archeím abundance methanotrofních bakterií snižovala.

**Tab. 9** - Charakteristiky methanotrofního společenstva studovaných půd s různou zátěží paseného skotu; MOB = methanotrofní bakterie; názvosloví mastných kyselin: první číslo udává počet atomů uhlíku v řetězci mastné kyseliny, číslo za dvojtečkou značí stupeň nenasycenosti vazeb, číslo za  $\omega$  udává pozici dvojných vazeb od alifatického konce molekuly, c značí cis konfiguraci dvojných vazeb; CFU – *colony forming unit* počet kultivovatelných MOB je uveden jako průměrná hodnota výběru (n=3); v závorkách jsou směrodatné odchylky výběrů; různá písmena označují statisticky průkazně rozdílné hodnoty

Stupeň zatížení půdy	MOB markery v půdním profilu	MOB markery v bakteriálních izolátech	Determinované methanotrofní izoláty	Počet kultivovatelných MOB [CFU x 10 <sup>7</sup> g <sup>-1</sup> sp]
Silný (S)	15:1 $\omega$ 6; 16:1 $\omega$ 7; 16:1 $\omega$ 5, 17:1 $\omega$ 8; 18:1 $\omega$ 9; 18:1 $\omega$ 7c; 18:1 $\omega$ 5	16:1 $\omega$ 9; 16:1 $\omega$ 7; 17:1 $\omega$ 8; 17:1 $\omega$ 7; 18:1 $\omega$ 9;	<i>Mycobacterium fallax</i> , <i>Mycobacterium chelonae</i>	432 (35) <sup>a</sup>
Střední (M)	15:1 $\omega$ 6; 16:1 $\omega$ 11; 16:1 $\omega$ 9; 16:1 $\omega$ 7; 16:1 $\omega$ 5, 17:1 $\omega$ 8; 18:1 $\omega$ 9; 18:1 $\omega$ 7c; 18:1 $\omega$ 5	15:1 $\omega$ 5; 16:1 $\omega$ 9; 16:1 $\omega$ 11; 17:1 $\omega$ 8; 18:1 $\omega$ 9; 18:1 $\omega$ 7c	<i>Arthrobacter oxydans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Terrabacter tumescens</i>	578 (93) <sup>b</sup>
Kontrolní (C)	16:1 $\omega$ 11; 16:1 $\omega$ 9; 16:1 $\omega$ 7; 16:1 $\omega$ 5, 17:1 $\omega$ 8; 18:1 $\omega$ 9; 18:1 $\omega$ 7c; 18:1 $\omega$ 5	17:1 $\omega$ 8; 18:1 $\omega$ 9	<i>Arthrobacter oxydans</i> , <i>Kytococcus sp.</i>	342 (38) <sup>c</sup>

**Tab. 10** – Biomasa methanotrofního společenstva v půdě na stanovištích s různým stupněm zatížení skotem (stanovená pomocí EL-PLFA methanotrofních markerů) a poměr biomasy methanotrofních bakterií (MOB) a methanogenních archeí (MA); pro MA byla použita koncentrace methanogenního markeru i20:1; jsou uvedeny aritmetické průměry výběrů (n=9) a v závorkách směrodatné odchylky výběrů; různá písmena označují průkazně rozdílné hodnoty mezi různými stanovišti ve stejné době odběru vzorků a \* udává průkazně rozdílné hodnoty mezi stejnými stanovišti v různé době odběru vzorků

Doba odběru vzorků	Stupeň zatížení půdy	Biomasa MOB [nmol EL-PLFA g <sup>-1</sup> sp]	Poměr MOB : MA
Květen 2005	Silný (S)	<b>107,56</b> (25,20) <sup>a</sup>	51
	Střední (M)	<b>60,75</b> (16,45) <sup>b</sup>	83
	Kontrolní (C)	<b>34,09</b> (9,09) <sup>c</sup>	656
Říjen 2005	Silný (S)	<b>109,09</b> (19,24) <sup>a</sup>	59
	Střední (M)	<b>18,69</b> (5,25) <sup>b*</sup>	146
	Kontrolní (C)	<b>29,96</b> (8,69) <sup>b</sup>	250

## 5 DISKUSE

Zemědělství zaměřené na pastvu skotu specificky ovlivňuje půdu pastevních pozemků zvýšeným přísunem živin v podobě pevných i tekutých exkrementů a mechanickým rozrušením povrchu půdy. Tyto vlivy skotu se především akumulují na zimoviších skotu. Výsledky předložené práce potvrdily, že takové vlivy skotu stimulují celkovou biomasu a metabolickou aktivitu půdního mikrobiálního společenstva a že ovlivňují i jeho skladbu. Práce byla zaměřena na zhodnocení změn v mikrobiálním společenstvu archeí hlavně ve vztahu k ostatním funkčním skupinám v pastevní půdě zimoviště. Změny ve skladbě společenstva bakterií a mikromycet v půdách s různým stupněm vlivu skotu potvrdily již předchozí analýzy fosfolipidických mastných kyselin (Elhottová a Šimek, 2002). Na základě PLFA bylo prokázáno, že v půdách silně ovlivněných skotem existuje specifické společenstvo bakterií které se průkazně odlišuje od společenstva v půdě bez zátěže skotu. Stanovení poměru mikromycet a bakterií v půdě téže lokality pomocí selektivní inhibice substrátem indukované respirace (Němcová, 2005) prokázalo, že v mikrobiálním společenstvu silně zatížené půdy převažují mikromycety nad bakteriemi, zatímco v půdách bez vlivu skotu je to naopak. Také naměřená velmi vysoká potenciální denitrifikační aktivita i vysoké emise  $N_2O$  v půdě se silnou zátěží skotem potvrdila větší aktivitu půdní mikrobiální biomasy stanoviště se silným vlivem skotu (Šimek *et al.*, 2002).

Velikost biomasy archeí zjištěná v pastevní půdě na základě analýzy PLEL měla stejný trend jako celková mikrobiální biomasa a s vyšším vlivem skotu její množství vzrostlo. V půdě bez vlivu zvířat (stanoviště C) biomasa archeí tvořila 0,56 – 2,5 nmol PLEL  $g^{-1}$  s.p., což bylo v souladu s výsledky analýz PLEL v lehce hnojené orné půdě (Gattinger *et al.*, 2002a), ve které biomasa archeí zaujímala 0,26 – 0,95 nmol PLEL  $g^{-1}$  s.p. Biomasa archeí v silně zatížené půdě (S) značně přesahovala hodnoty zjištěné v anoxických mokřadních půdách (Bai *et al.*, 2000; Wachinger *et al.*, 2000). Biomasa archeí v půdě se středním stupněm zátěže (M) naměřená v květnu ( $7,43 \pm 2,24$  nmol PLEL  $g^{-1}$ ) odpovídala biomase zjištěné v silně hnojené polní půdě (Gattinger *et al.*, 2007), kde biomasa archeí tvořila 8,0 nmol PLEL  $g^{-1}$  suché půdy.

Abychom získali informaci o dlouhodobých důsledcích vlivu skotu na změny v mikrobiálním společenstvu archeí, porovnali jsme abundanci archeí v půdách na stanovištích s různým vlivem skotu ve dvou obdobích: těsně po odchodu skotu a po asi půlroční pauze bez jeho vlivu. Silně zatížená půda (S) byla do značné míry přesycená

snadno degradovatelnou organickou hmotou vcházející do půdy s výkaly zvířat, a proto i po asi půlroční „regeneraci“ půdy se abundance společenstva archeí téměř nezměnila. Jinak tomu bylo v půdě se středním stupněm zátěže (M), kde po letní pauze bez přísunu živin v podobě zvířecích výkalů biomasa archeí klesla na hladinu hodnot naměřených v kontrolní půdě. V tomto případě se půdní společenstvo archeí přizpůsobilo nižšímu množství dostupného organického uhlíku (viz kap. 3.2, Tab. 1) a biomasa archeí se zmenšila.

Diverzita identifikovaných izoprenoidních archeálních markerů (*i20:0*, *i40:0*, *i20:1*) pomocí analýzy PLEL potvrdila příslušnost půdních archeí ke skupině *Euryarchaeota*. Problematikou diverzity archeí v půdě trvalých travních porostů včetně pastvin se zabývali Nicol *et al.* (2003), kteří analyzovali 16S rRNA a 16S rDNA půdního archeálního společenstva. Narozdíl od našich výsledků nepotvrdili výskyt *Euryarchaeot* ani methanogenních archeí, ale jako dominantní skupinu zaznamenali netermofilní *Crenarchaeota*. Jinak tomu bylo ve výsledcích práce Gattinger *et al.* (2007), kteří detekovali pomocí analýzy PLEL a analýzy 16S rRNA v půdách hnojených pastvin především *Euryarchaeota* a menší podíl tvořili zástupci ze skupiny *Crenarchaeota*, kteří byli zaznamenáni pouze na základě 16S rRNA.

V souvislosti s emisemi methanu z půdy zimoviště bylo sledováno kvantitativní a kvalitativní zastoupení klíčových funkčních mikrobiálních skupin jako jsou methanogenní archea a methanotrofní bakterie spojené s produkcí a spotřebou methanu. V půdě zimoviště byla prokázána přítomnost methanogenních archeí na základě detekce specifického membránového biomarkeru - izoprenoidu *i20:1*. Methanogenní biomarker projevil stejnou tendenci narůstat s vyšším stupněm zatížení půdy skotem stejně jako celková koncentrace detekovaných markerů archeí. Také po půlroční pauze bez vlivu skotu se methanogenní společenstvo ve středně zatížené půdě snížilo na úroveň kontroly. Koncentrace methanogenního markeru v půdách měla stejný trend jako produkce CH<sub>4</sub>, jejíž hodnoty byly vyšší v květnu těsně po odchodu skotu ze zimoviště v půdách se středním a silným vlivem skotu (viz kap. 3.2, Tab. 1 a kap. 4.3.2., Obr. 7).

Výsledky měření zastoupení methanogenních archeí v půdě pomocí PLEL byly potvrzeny současně kvantitativní analýzou *mcrA* genu (methylkoenzym reduktázy), klíčového genu pro methanogenezi (Radl *et al.*, nabídnuto k tisku). V půdě stanoviště S byly počty kopií tohoto genu 3,8 - 4,2 · 10<sup>6</sup> g<sup>-1</sup> suché půdy. Ve středně zatížené půdě a kontrolní půdě byly hodnoty nižší: 4,9 a 2,3 · 10<sup>5</sup> kopií genu g<sup>-1</sup> suché půdy. Na

podzim se počty kopií genu *mcrA* v půdě stanoviště M a C snížily a dosahovaly pouze kolem 1000 kopií genu g<sup>-1</sup> suché půdy.

Pomocí fylogenetické analýzy genu *mcrA* byly v půdě se silným vlivem skotu (S) identifikovány methanogenní zástupci ze skupiny *Euryarchaeota*. Největší abundanci v půdě stanoviště S měla archea z rodu *Methanosarcina*, která obecně tvoří po rodu *Methanobrevibacter* druhou největší populaci methanogenních archeí v bachoru přežvýkavců (Sharp *et al.*, 1998). Je pravděpodobné, že archea bachorového symbiotického ekosystému skotu vstupující do půdy s výkaly, jsou schopna se adaptovat v půdě s dostatkem živin, zde přežívat a obohacovat tak půdní mikrobiální společenstvo.

Methanotrofní společenstvo bylo hodnoceno pomocí membránových fosfolipidických mastných kyselin specifických pro methanotrofní bakterie. Výsledky nepotvrdily výskyt obligátních methanotrofních bakterií, spíše naznačily význam fakultativních methanotrofů, zejména v půdách zatížených skotem. Příčina limitace růstu obligátních methanotrofů mohla spočívat ve vysoké koncentraci amoniakálního dusíku v půdách zatížených skotem. Jeho negativní účinek na růst obligátních methanotrofů může být přímý, tj. vyvolaný substrátovou kompeticí s klíčovým enzymem *methan monooxygenázou* nebo zprostředkovaný skrze zvýšenou pH reakci, která v půdách zatížených skotem nabývá alkalických hodnot (viz kap. 3.2, Tab. 1). Rozsah pH, ve kterém jsou schopni známí zástupci methanotrofních bakterií růst, se pohybuje od 5,5 do 8,5 (Dedysh, 2002). Kromě fakultativních methylotrófů mohou částečně obligátní methanotrofy nahrazovat také autotrofní nitrifikační bakterie (Jones a Morita, 1983), jejichž aktivita byla v půdách studovaného zimoviště značná, jak uvádějí Chroňáková *et al.* (2007) či půdní kvasinky (Wolf a Hanson, 1979). Hluběji studovat methanotrofní společenstvo by bylo možné např. na základě kvantifikace počtu kopií genu pro enzym *methan monooxygenázu* (Bussmann *et al.*, 2004) a použitím metod značení substrátu stabilními izotopy (Knief *et al.*, 2003).

Poměr methanotrofních bakterií a methanogenních archeí klesal s rostoucím vlivem skotu. Na stanovišti kontrolním (C) byl poměr výrazněji posunut ve prospěch methanotrofů, neboť zde převládla oxidace methanu nad jeho produkci (viz záporné hodnoty emisí uvedené v Tab. 1 v kap. 3.2). Naopak půdy se středním a silným stupněm zatížení se staly zdrojem emisí methanu. V anoxických podmínkách může probíhat také anaerobní oxidace methanu (Conrad, 1996). V mikroprostředích, kde probíhá methanogeneze by spotřebiteli methanu mohly být pravděpodobně vlastní půdní archea.

Schopnost oxidace methanu byla zatím prokázána archeím v mořských sedimentech (Heijs *et al.*, 2006), ale v půdách nebyla zatím tato schopnost archeí dokázána. Anaerobní oxidace probíhá jako reverzní methanogeneze pravděpodobně za nízkého parciálního tlaku  $H_2$ , který je udržován mikroorganismy redukujícími síru a železo (Conrad, 1996). Takové podmínky zřejmě pastevní půda nevytváří.

Údaje o mikrobiálním společenstvu pastevní půdy doplnila analýza neestericky vázaných mastných kyselin. Tato analýza slouží k odhadu anaerobní složky společenstva. Nárůst biomasy anaerobních mikroorganismů na stanovištích s vyšším vlivem skotu by mohl být dán vyšší vlhkostí půdy a také přísunem organického uhlíku a dusíku (viz kap 3.2. Tab. 1), které podporují růst anaerobních mikroorganismů. Poměr anaerobních mikroorganismů a archeí byl v kontrolní půdě vysoký ve prospěch anaerobů, ale s rostoucím stupněm zatížení půdy skotem se poměr anaerobů a archeí snížil až na 1:1. Není známo do jaké míry zjištěná abundance anaerobních mikroorganismů zahrnuje biomasu archeí, ale zřejmě většinu anaerobů zjištěných pomocí NEL-PLFA tvoří bakterie a mikroeukaryota. Gattinger *et al.* (2002b) uvádí, že v čistých kulturách archeí tvořily NEL-PLFA markery mezi 10 a 32 % z celkových detekovaných fosfolipidických markerů. V našem případě by se mohlo jednat o kompetici archeí a ostatních mikroorganismů o anaerobní mikroprostředí v půdách se silným vlivem skotu, kde dokonce v říjnu po pětíměsíční absenci skotu mají archea převahu nad anaeroby.

V exkrementech skotu bylo zaznamenáno mnohonásobně vyšší množství anaerobů (51 % celkové mikrobiální biomasy) než v půdě a bachorové šťávě, což vyplývá z podmínek přirozeného anoxického prostředí intestinálního traktu. V půdách byl dosud zaznamenán podíl biomasy anaerobů, zjištěný na základě NEL-PLFA v rýžových polích, nejvýše 30 % z celkové mikrobiální biomasy (Bai *et al.*, 2000). V exkrementech nebyly zaznamenány kromě neestericky vázané mastné kyseliny 18:1, žádné rozdílné markery anaerobů ani archeí. Kvalitativní shodnost mastných kyselin svědčí o tom, že exkrementy by mohly být významným zdrojem obohacení půdy anaerobními mikroorganismy, které v půdě přežívají. Vysoká koncentrace detekované neestericky vázaná mastné kyseliny 26:0 potvrdila přítomnost sfingolipidů obsažených v membránách mikroorganismů půdy, bachorové šťávy i exkrementů skotu (Nurminen a Suomalainen, 1971).

Podobně jako markery anaerobů detekované v půdě byly i markery archeí více shodné s markery detekovanými v exkrementech než v bachorové šťávě.

Ve fosfolipidech bachorové šťávy byly detekovány PLEL markery - izoprenoidy *i15:0* a *i40:0-2cy*, které nebyly nalezeny v půdě ani v exkrementech. Archea bachorové mikroflory s těmito typy izoprenoidů nejsou schopna zřejmě přežít ani ve střevě trávicího traktu ani v půdě. Naproti tomu byl podle literatury cyklický C<sub>40</sub> izoprenoid *i40:0-2cy* v půdě zaznamenán (Gattinger *et al.*, 2007). Jednalo se o půdu velmi silně hnojenou organickým hnojivem s exkrementy dobytka, pro kterou byl prokazatelný výskyt archeí ze skupiny *Crenarchaeota*.

O skutečnosti, zda bude pastevní půda místem produkce nebo spotřeby methanu rozhoduje více faktorů, hlavně obsah organické hmoty a vodní potenciál (Wachinger *et al.*, 2000). Zatímco půdy s nízkým obsahem organické hmoty se stávají spíše místem spotřeby methanu, pro půdy s vysokým obsahem organické hmoty platí opak (Reichardt *et al.*, 1997). Půdy travinných ekosystémů, většinou v oblastech s vyšší nadmořskou výškou jsou považovány za místo, kde se methan spotřebovává (Conrad, 1996). Za podmínek, které se vytvořily v půdě stanoviště silně a středně zatíženého vlivem skotu na zimovišti v Borové, se půda stala, spíše než místem spotřeby, významným zdrojem methanu.



## 6 ZÁVĚRY

1. S vyšším stupněm zatížení půdy skotem vzrostla celková biomasa i metabolická aktivita mikrobiálního společenstva půdy. Mikrobiální biomasa společenstva v silně zatížené půdě skotem vzrostla na rozdíl od kontroly o 300 %, metabolická aktivita vzrostla o 20-60 %.
2. Velikost společenstva archeí v půdách vzrůstala s vyšším vlivem skotu. Na základě výskytu charakteristických izoprenoidních markerů byla potvrzena příslušnost půdních archeí ke skupině *Euryarchaeota*. Výskyt methanogenního izoprenoidního markeru potvrdil přítomnost methanogenních archeí, jejichž abundance se zvyšovala rovněž s rostoucím vlivem skotu.
3. S vyšším stupněm zatížení půdy vzrostla biomasa methanotrofních bakterií. Poměr methanotrofních bakterií a methanogenních archeí klesal s rostoucím vlivem skotu. Na stanovišti kontrolním, kde převládla spotřeba methanu nad jeho produkcí, byl poměr výrazněji posunut ve prospěch methanotrofů. Naopak půdy se středním a silným stupněm zatížení skotem se staly výrazným zdrojem emisí methanu.
4. Exkrementy skotu přímo přispívají ke zvýšení biomasy archeí v půdě. V exkrementech, batorové štáve skotu i v půdě byly detekovány izoprenoidní markery stejných skupin archeí. V exkrementech převažují anaerobní mikroorganismy, zatímco v batorové štávě dominují bakterie a mikroeukaryota.
5. Pobyt skotu na zimovišti má dlouhodobé důsledky na zvýšení mikrobiálního společenstva archeí na stanovišti se silným stupněm zatížení skotem (S). Zastoupení archeí v mikrobiálním společenstvu středně zatíženého stanoviště (M) se po půlroční absenci skotu snížilo na úroveň biomasy archeí v půdě kontrolní (C).

## 7 ANOTACE

The aim of this thesis was to characterize the group of *Archaea* within the total microbial community in the soils from three areas differently impacted by grazing cattle. The size and the structure of the archaeal community were estimated by the analysis of cell-membrane etherlipids (PLEL). Bacteria, microeucaryota and anaerobic microorganisms were characterized by the analysis of phospholipid fatty acids. The archaeal biomass as well as total soil microbial biomass and activity increased with stronger cattle impact. High biomass of methanogens and relatively low part of methanotrophs in the soil of the strong impacted area was probably the reason of high methane emissions. Cattle excrements directly contributed to the increase of methanogens in soil. Long-term effect on the increase of archaeal community was significant only in the soil of the strong impacted area.

Cílem práce bylo charakterizovat skupinu archeí v rámci celkového mikrobiálního společenstva v půdách ze tří stanovišť s různým stupněm zatížení paseným skotem. Velikost a struktura společenstva archeí byla stanovena pomocí analýzy buněčných membránových etherlipidů (PLEL). Bakterie, mikroeukaryota a anaerobní mikroorganismy byly charakterizovány pomocí analýzy fosfolipidických mastných kyselin (PLFA). S vyšším stupněm zatížení půdy skotem vzrostla biomasa archeí i celková biomasa a aktivita mikrobiálního společenstva půdy. Příčinou vysokých emisí methanu na stanovišti se silným stupněm zátěže skotem bylo vysoké množství methanogenních archeí a poměrně nízký podíl methanotrofních bakterií. Ke zvýšení biomasy methanogenních archeí v půdě přímo přispěly exkrementy skotu. Dlouhodobé důsledky na zvýšení mikrobiálního společenstva archeí v půdě se projeví na silně zatíženém stanovišti.

## **8 LITERATURA**

Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Review* 59, 143-149.

Atlas, R.A., 1993. *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press, Inc. Florida, Boca Raton, USA, 1079 s.

Bai, Q.Y., Zelles, L., 1997. A method for determination of archaeal ether-linked glycerolipids by high performance liquid chromatography with fluorescence detection as their 9-anthroyl derivatives. *Chemosphere* 35, 263-274.

Bai, Q., Gattinger, A., Zelles, L., 2000. Characterization of microbial consortia in paddy rice soil by phospholipid analysis, *Microbial Ecology* 39, 273-281.

Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917.

Bomberg, M., Jurgens, G., Saano, A., Sen, R., Timonen, S., 2003. Nested PCR detection of archaea in defined compartments of pine mycorrhizospheres developed in boreal forest humus microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 163-171.

Bouwman, A.F., 1990. Introduction. In: Bouwman A.F. (Ed.) *Soils and the Greenhouse Effect*. Wiley, Chichester, UK, 25-35.

Buckley, D.H., Graber, J.R., Schmidt, T.M., 1998. Phylogenetic analysis of nonthermophilic members of the kingdom Crenarchaeota and their diversity and abundance in soils. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4333-4339.

Bussmann, I., Pester, M., Brune, A., Schink, B., 2004. Preferential cultivation of type II methanotrophic bacteria from littoral sediments (Lake Constance). *FEMS Microbiology Ecology* 47, 179-189.

Chelius, M.K., Triplett, E.W., 2001. The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecology* 41, 252-263.

Chroňáková, A., Čuhel, J., Radl, V., Elhottová, D., Šimek, M., 2007. Kvantifikace klíčových genů v procesech nitrifikace a denitrifikace. In: *Život v půdě VIII, Mezinárodní seminář 23.-24.1.2007*, Československá společnost mikrobiologická, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Brno, v tisku.

Conrad, R., 1996. Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases. *Microbiological Reviews* 60, 609-640.

Dedysh, S.N., 2002. Methanotrophic bacteria of acidic Sphagnum peat bogs. *Microbiology* 71, 638-650.

Elhottová, D., Šimek, M., 2002. Charakteristika půdního mikrobiálního společenstva na tzv. zimní pastvině. In: *Život v půdě, 3. mezinárodní seminář*, Československá společnost mikrobiologická, Ústav krajinné ekologie SAV, Bratislava 29.1.2002, pp. 87-89.

Elhottová, D., 2004. Fatty acids patterns in characterization of soil microbial community in process of primary succession on post-mining sites. In: Chroňáková, A., Křišťůfek, V., Elhottová, D., Malý, S. (Eds.): *Present method for investigation of microbial community biodiversity in soils and substrates. Proc. 9<sup>th</sup> Methodological workshop*, ISB AS CR, České Budějovice, 17-21.

Friedrich, M.W., 2005. Methyl-coenzyme M reductase genes: Unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing Archaea. *Environmental Microbiology Methods in Enzymology*, 397, 428-442.

Gattinger, A., 2001. Development and application of methods for characterizing microbial communities in oxic and anoxic soil ecosystems based on phospholipid profiling. PhD Thesis. Centre of Life and Food Sciences Weihenstephan, Technical University Munich, 147 s.

Gattinger, A., Ruser, R., Schloter, M., Munch, J.C.H., 2002a. Microbial community structure varies in different soil zones of potato field. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165, 421–428.

Gattinger, A., Schloter, M., Munch, J.C., 2002b. Phospholipid etherlipid and phospholipid fatty acid fingerprints in selected euryarchaeotal monocultures for taxonomic profiling. *FEMS Microbiology Letters* 213, 133-139.

Gattinger, A., Günthner, A., Schloter, M., Munch, J.C., 2003. Characterization of Archaea in soils by polar lipid analysis. *Acta Biotechnologica* 23, 21-28.

Gattinger, A., Höfle, M.G., Schloter, M., Embacher, A., Böhme, F., Munch, J.C., Labrenz, M., 2007. Traditional cattle manure application determines abundance, diversity and activity of methanogenic Archaea in arable European soil. *Environmental Microbiology* 9, 612-624.

Gebert, J., Grongroft, A., Schloter, M., Gattinger, A., 2004. Community structure in a methanotroph by phospholipid fatty acid biofilter as revealed analysis. *FEMS Microbiology Letters* 240, 61-68.

Grosskopf, R., Stubner, S., Liesack, W., 1998. Novel euryarchaeotal lineages detected on rice roots and in the anoxic bulk soil of flooded rice microcosms. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4983-4989.

Heijs, S.K., Aloisi, G., Bouloubassi, I., Pancost, R.D., Pierre, C., Damsté, J.S.S., Gottschal, J.C., van Elsas, J.D., Forney, L.J., 2006. Microbial community structure in three deep-sea carbonate crusts. *Microbial Ecology* 52, 451-462.

Hütsch, B.W., 1996. Methane oxidation in soils of two long-term fertilization experiments in Germany. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 773-782.

Hynš J., Šimek, M., Brůček, P., Petersen, S.O., 2007. High fluxes but different patterns of nitrous oxide and carbon dioxide emissions from soil in a cattle overwintering area. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 120, 269-279.

- Jackson, M.L., 1958. Soil Chemical Analysis. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New York, USA, 498 s.
- Jones, R.D., Morita, R.Y., 1983. Methane oxidation by *Nitrosococcus oceanus* and *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 401- 410.
- Knief, C., Lipski, A., Dunfield, P.F., 2003. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6703-6714.
- Koga, Y., Acagava-Matsushita, M., Ohga, M., Nishishara, M., 1993. Taxonomic significance of the distribution of component parts of polar ether lipids in methanogens. *Systematic and Applied Microbiology* 16, 342-351.
- Koga, Y., Morii, H., 2005. Recent advances in structural research on ether lipids from archaea including comparative and physiological aspects. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69, 2019-2034.
- Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., Schleper, C., 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442, 806-809.
- Lueders, T., Manefield, M., Friedrich, M.W., 2004. Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients. *Environmental Microbiology* 6, 73-78.
- Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., Riley, P.W., 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148, 3521-3530.
- Makula, R.A., 1978. Phospholipid composition of methan utilizing bacteria. *Journal of Bacteriology* 134, 771-777.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., 2006. Brock Biology of Microorganisms. 11th Edition. Pearson Prentice Hall Inc., New York, 992 s.

Mancuso, C.A., Odham, G., Westerdahl, G., Reeve, J.N., White, D.C., 1985. C15, C20, and C25 isoprenoid homologues in glycerol diether phospholipids of methanogenic archaeobacteria. *Journal of Lipid Research* 26, 1120-1125.

Merilä, P., Galand, P.E., Fritze, H., Tuittila, E.S., Kukko-oja, K., Laine, J., Yrjala, K., 2006. Methanogen communities along a primary succession transect of mire ecosystems. *FEMS Mikrobiology Ecology* 55, 221-229.

Miller, T.L., Wolin, M.J., 1982. Enumeration of *Methanobrevibacter smithii* in human feces. *Archives of Microbiology*, 131, 14-18.

Nicol, G.W., Glover, L.A., Prosser, J.I., 2003. Molecular analysis of methanogenic archaeal communities in managed and natural upland pasture soils. *Global Change Biology* 9, 1451-1457.

Nicol, G.W., Tschirko, D., Embley, T.M., Prosser, J.I., 2005. Primary succession of soil Crenarchaeota across a receding glacier foreland. *Environmental Microbiology* 7, 337-347.

Němcová, A., 2005. Využití metody selektivní inhibice pro stanovení poměru biomasy mikromycet a bakterií v pastevní půdě. Bakalářská diplomová práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 37 s.

Nurminen, T., Suomalainen, H., 1971. Occurrence of long-chain fatty acids and glycolipids in the cell envelope fractions of Barker's yeast. *Biochemical Journal* 125, 963-969.

Ochsenreiter, T., Selezi, D., Quaiser, A., Bonch-Osmolovskaya, L., Schleper, C., 2003. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology* 5, 787-797.

Orawecz, O., Elhottová, D., Křišťůfek, V., Šustr V., Frouz, J., Tříška, J., Marialigeti, K., 2004. Application of ARDRA and PLFA analysis in characterizing the bacterial communities of the food, gut and excrement of saprophagous larvae of *Penthetria holosericea* (Diptera: Bibionidae): a pilot study. *Folia Microbiologica* 49, 83-93.

Pesaro, M., Widmer, F., 2002. Identification of novel Crenarchaeota and Euryarchaeota clusters associated with different depth layers of forest soil. *FEMS Microbiology Ecology* 42, 89-98.

Radl V., Gattinger A., Chroňáková A., Němcová A., Čuhel J., Šimek M., Schloter M., Elhottová D., 2007. Effects of cattle husbandry on abundance and activity of methanogenic archaea in upland soils. *ISSME J.*, nabídnuto k tisku.

Reeburgh, W.S., 2003. Global methane biochemistry. In: Keeling R.F. (Ed.) *Treatise on Geochemistry. The Atmosphere* 4, 65-89.

Reichardt, W., Mascariña, G., Padre, B., Doll, J., 1997. Microbial communities of continuously cropped irrigated rice fields. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 233-238.

Sharp, R., Ziemer, Ch.J., Stern, M.D., Stahl, D.A., 1998. Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiology Ecology* 26, 71-78.

Schleper, CH., Jurgens, G., Jonuscheit, M., 2005. Genomic studies of uncultivated Archaea. *Nature Reviews* 3, 479-488.

Schnürer, J., Rosswall, T., 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology* 43, 1256-1261.

Simon, H.M., Dodsworth, J.A., Goodman, R.M., 2000. Crenarchaeota colonise terrestrial plant roots. *Environmental Microbiology* 2, 495-505.



Sliwinski, M.K., Goodman, R.M., 2004. Comparison of crenarchaeal consortia inhabiting the rhizosphere of diverse terrestrial plants with those in bulk soil in native environments. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1821-1826.

Šimek, M., Uhlířová, E., Brůček, P., Elhottová, D., Šantrůčková, H., Kamír, V., 2002. Je tzv. zimní pastvina významným zdrojem emisí N<sub>2</sub>O a CO<sub>2</sub>? In: Život v půdě, 3. mezinárodní seminár, Československá spoločnosť mikrobiologická, Ústav krajinej ekológie SAV, Bratislava 29.1. 2002, pp. 87-89.

Šimek, M., Brůček, P., Hynšt, J., Uhlířová, E., Petersen, S.O., 2006. Effects of excretal returns and soil compaction on nitrous oxide emissions from a cattle overwintering area. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 112, 186-191.

Thauer, R.K., 1998. Biochemistry of methanogenesis. *Microbiology* 144, 2377-2406.

Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.P., Schleper, C., 2005. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology* 7, 1985-1995.

Tunlid, A., Baird, B.H., Trexler, M.B., Olsson, S., Findlay, R.H., Odham, G.H., White, D.C., 1985. Determination of phospholipid ester-linked fatty acids and poly b-hydroxybutyrate for the estimation of bacteria biomass and activity in the rhizosphere of the rape plant *Brassica napus* (L). *Canadian Journal of Microbiology* 31, 1113-1119.

Virtue, P., Nichols, P.D., Boon, P.I., 1996. Simultaneous estimation of microbial phospholipid fatty acids and diether lipids by capillary gas chromatography. *Journal of Microbiological Methods* 25, 177-185.

Wachinger, G., Fiedler, S., Zepp, K., Gattinger, A., Sommer, M., Roth, K., 2000. Variability of soil methane production on the micro-scale: spatial association with hot spots of organic material and Archaeal population. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1121-1130.

Wagner, D., Lipski, A., Embacher, A., Gattinger, A., 2005. Methane fluxes in permafrost habitats of the Lena Delta: effects of microbial community structure and organic matter quality. *Environmental Microbiology* 7, 1582–1592.

Weijers, J.W.H., Schouten, S., van der Linden, M., van Geel, B., Damsté, J.S.S., 2004. Water table related variation in the abundance of intact archaeal membrane lipids in a Swedish peat bog. *FEMS Microbiology Letters* 239, 51-56.

White, D.C., Davis, W.M., Nickels, J.S., King, J.D., Bobbie, R.J., 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* 40, 51-62.

White, D.C., 1995. *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*. Oxford University Press, Inc., Oxford, 378 s.

Whitman, W.B., Boone, D.R., Koga, Y., Keswani, J., 2001. Taxonomy of methanogenic archaea. In: Boone, D.R., Castenholtz, R.W., Garrity, G.M. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer Verlag, New York, 211-213.

Woese, C.R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of prokaryotic domain – primary kingdoms. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5088-5090.

Wolf, H.J., Hanson, R.S., 1979. Isolation and characterization of methane utilizing yeasts. *Journal of General Microbiology* 114, 187-194.

Zbírál, J., 1995. *Analýza půd I*. ÚKZÚZ Brno.

Zelles, L., Bai, Q.Y., 1993. Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 495-507.

Zelles, L., 1999. Fatty acids patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29, 111-129.