

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Přírodovědecká fakulta



Společenstvo metanotrofních bakterií v půdách zimoviště skotu

Diplomová práce

Vypracovala: **Bc. Andrea Nitkulincová**

Školitel: **Prof. Ing. Miloslav Šimek, CSc., ÚPB AVČR**

Školitelka – specialista: **RNDr. Alica Chroňáková, Ph.D., ÚPB AVČR**

České Budějovice

2011

Nitkulincová, A., 2011: Společenstvo metanotrofních bakterií v půdách zimoviště skotu. [The methanotrophic community in soils of cattle overwintering area.] – 81 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace:

The long-term cattle impact on soil methanotrophs was investigated at cattle overwintering area located at the ecofarm in the South Bohemia. Four sets of soil samples were sampled in spring and fall of 2009 and 2010. Differences in methanotrophic community structure among experimental sites and were investigated by DGGE and MISA. Real-Time PCR was used for estimation of quantity of Type I methanotrophs. The CARD-FISH method was used to estimate the percentage shared and cell counts of Type I and Type II methanotrophs among all prokaryotic cells. Substantial part of the thesis was focused on optimization of methods used.

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

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

V Českých Budějovicích, 29. dubna 2011

Podpis:.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala zejména svým školitelům, Alici Chroňákové a Miloslavu Šimkovi, za odborné vedení, ochotu, pomoc, cenné rady a trpělivost při řešení této diplomové práce. Děkuji také Andree Bannert a Michaelu Schloterovi za jejich pomoc a rady, které mi ochotně poskytli během mých pobytů v Helmholtz-Zentru v Mnichově. Moje díky patří i Vlastimilu a Marcele Kamírovým - majitelům farmy Borová - za umožnění odběru vzorků. Dále děkuji Ludmile Kahounové a Marii Stehlíkové za významnou pomoc při analýzách metodou CARD-FISH. Děkuji také všem dalším kolegům z ÚPB za skvělou atmosféru a podporu. Děkuji Biologickému centru AV ČR, v. v. i. za poskytnutí zázemí pro vypracování této diplomové práce. Svě rodině a přátelům děkuji za podporu, povzbuzení a trpělivost v průběhu výzkumu a psaní této diplomové práce.

Obsah

1. Úvod a cíle práce	1
2. Literární přehled.....	4
2.1 Význam metanu jako skleníkového plynu a jeho globální produkce a spotřeba	4
2.2 Produkce metanu v půdě	5
2.3 Anaerobní oxidace metanu	6
2.4 Aerobní oxidace metanu.....	6
2.5 Taxonomie aerobních MOB.....	8
2.6 Regulační faktory oxidace metanu	11
2.6.1 Vliv koncentrace metanu a kyslíku v půdě	11
2.6.2 Vliv dusíku	12
2.6.3 Vliv fyzikálních vlastností prostředí	13
2.6.4 Vliv koncentrace mědi	14
2.6.5 Ovlivnění MOB přítomností skotu.....	15
2.7 Použité molekulární metody studia společenstva MOB	16
2.7.1 Izolace bakteriální DNA z půdy.....	17
2.7.2 Detekce a kvantifikace DNA.....	18
2.7.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	19
2.7.4 Nested PCR	20
2.7.5 Real time PCR.....	20
2.7.6 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE).....	21
2.7.7 CARD-FISH.....	21
2.7.8 Analýza délkového polymorfismu intergenové oblasti v operonu pro monooxygenazu (MISA - monooxygenase intergenic spacer analysis)	22
3. Metodika	23
3.1 Pokusná lokalita a uspořádání pokusu	23
3.2 Odběry vzorků a úprava vzorků	24
3.3 Základní charakteristiky půd	25
3.4 Stanovení struktury společenstva MOB v pastevní půdě.....	28
3.4.1 Izolace DNA.....	28
3.4.2 Horizontální agarózová gelová elektroforéza.....	29
3.4.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA.....	29
3.4.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	30
3.4.5 Denaturační Gradientová Gelová Elektroforéza (DGGE).....	32
3.4.6 Analýza délkového polymorfismu intergenové oblasti v operonu pro monooxygenazu (MISA - monooxygenase intergenic spacer analysis)	35
3.4.7 Stanovení relativní četnosti aerobních metanotrofních bakterií pomocí metody CARD-FISH	37
3.4.8 Stanovení abundance společenstva MOB pomocí metody real time PCR.....	40
3.4.9 Statistická analýza	44

4. Výsledky	45
4.1 Analýza rozdílů diversity metanotrofních společenstev metodou DGGE	45
4.2 Hodnocení společenstva MOB metodou MISA.....	48
4.3 Relativní zastoupení metanotrofů typu I a typu II detekované pomocí metody CARD FISH	51
4.4 Kvantifikace metanotrofního společenstva metodou real time PCR.	55
5. Diskuze	57
5.1 Analýza společenstva MOB pomocí metody DGGE.....	57
5.2 Analýza společenstva MOB pomocí metody MISA	59
5.3 Analýza abundance MOB pomocí metody CARD-FISH	60
5.4 Analýza MOB metodou real-time PCR	63
6. Závěry	65
7. Literatura	67
8. Anotace	78
9. Příloha	79

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Tato diplomová práce se věnuje vlivu skotu na společenstvo bakterií oxidujících metan (společenstvo MOB) za aerobních podmínek v půdě zimoviště skotu v podhůří Šumavy. Funkční skupina metanotrofních bakterií je kosmopolitní, nachází se ve vodním i půdním prostředí. Jediným zdrojem energie a uhlíku pro MOB je metan (HANSON & HANSON, 1996). Existenci MOB poprvé potvrdil SÖHNGEN (1906), když izoloval první známou bakterii oxidující metan – *Bacillus metanicus*.

Obecně se předpokládá, že travinné ekosystémy ve vyšších nadmořských výškách, využívané k zemědělským účelům, nehnojené nebo jen s nízkým vstupem živin v rámci extenzivního či ekologického zemědělství, fungují spíše jako *sink*¹ metanu (HÜTSCH A KOL., 1994) než jako zdroje metanu. V těchto půdách je metan pravděpodobně emitován do atmosféry jen v malém množství díky okamžitému využití v metabolismu MOB (HÜTSCH A KOL., 1994). MOB přítomné v půdě travinných a lesních ekosystémů mohou využívat také atmosférický metan (KNIEF A KOL., 2003). Naproti tomu mokřady a půdy dlouhodobě zaplavené s dostatkem živin jsou považované za zdroje metanu - metan je z nich emitován do atmosféry často ve velkém množství (ZHANG A KOL., 2007).

Intenzivní využívání půdy pro zemědělské účely ale významně snižuje potenciál půdního společenstva MOB oxidovat metan (OJIMA A KOL., 1993; MOSIER A KOL., 1998; SEGHERS A KOL., 2003) kvůli změnám ve fyzikálních, biologických a chemických charakteristikách půdy. Tyto změny nastávají asi i na zimovištích skotu. Zimoviště je typ pastevní půdy, kde je na relativně malé ploše koncentrován vysoký počet zvířat, která zde

¹ místo spotřeby

přečkávají zimní období. Zbytek roku tráví dobytek na pastvinách. Do půdy vstupuje močí a exkrementy skotu zvýšené množství živin. Organická hmota v půdě na sebe váže vodu a vzniká tak anaerobní prostředí. Přítomnost skotu způsobuje formování specifického půdního mikrobiálního společenstva. Bylo dokázáno, že spolu s exkrementy dobytka vstupují do půdy vedle jiných mikroorganismů i metanogenní *Archea*, v půdním ekosystému přežívají a zvyšují svojí metabolickou aktivitou produkci metanu v půdě (RADL A KOL., 2007). MOB přítomné v půdě mohou oxidovat v rámci svého metabolismu veškerý vyprodukovaný metan nebo pouze část (VAN HUISSTEDEN, 2004). V zemědělských půdách se vyskytují hlavně MOB typu I a MOB typu II (FJELLBIRKELAND A KOL., 2001). I přes intenzivní výzkumy společenstev MOB v různých ekosystémech nejsou tyto dvě skupiny jasně ekologicky rozlišené a literatuře lze najít odlišné informace (BENDER A CONRAD, 1992; AMARAL A KOL., 1995; KALLISTOVÁ A KOL., 2007). V půdách zimovišť skotu nebyly dosud tyto skupiny zkoumány.

Předložená diplomová práce se zabývá studiem vlivu skotu na strukturu a početnost (abundanci) MOB typu I a typu II v půdě. Výzkum byl proveden na zimovišti skotu, které bylo rozděleno na 4 pokusné plochy s různým typem managementu. Pro studium společenstva MOB byl zvolen molekulárně-biologický přístup. V rámci metod DGGE a MISA (určení struktury společenstva MOB) byl využit jako genový marker funkční gen *pmoA* (viz dále), přítomný v genomu téměř všech dosud známých zástupců MOB (DEDYSH A KOL., 2000). Dále byly použity specifické fluorescenčně značené próby – metoda CARD-FISH – pro zjištění abundance a poměru zastoupení dvou taxonomických skupin MOB, typu I a typu II. Další metoda použitá pro zjištění abundance MOB typu I byla metoda real time PCR, taktéž byl použit gen *pmoA*. Použila jsem více metod, aby bylo možné získané výsledky porovnat.

CÍLE PRÁCE

1. Přispět k poznání společenstva bakterií oxidujících metan a k poznání metanotrofie v půdách zimoviště skotu.
2. Pomocí molekulárně-biologických metod charakterizovat společenstvo bakterií oxidujících metan v několika půdách různě ovlivněných skotem.
3. Porovnat strukturu a abundanci společenstva bakterií oxidujících metan v půdě na jaře a na podzim, tzn. v půdě bezprostředně po vlivu zvířat (jaro) a v půdě po půlroční regeneraci (podzim).
4. Optimalizovat vybrané metody pro použití ve studovaných půdách.

Diplomová práce vznikla za podpory projektů MŠMT ČR (LC06066, Centrum environmentální mikrobiologie), Grantové agentury ČR (206/09/1642 a 526/09/1570) a Výzkumných záměrů Ústavu půdní biologie BC AV ČR, v. v. i. (AV OZ 60660521) a Přírodovědecké fakulty JU (MSM 6007665801). Pro účely této diplomové práce byly použity vzorky půd odebrané na pokusné lokalitě vždy na jaře a podzim v letech 2009 a 2010. Kromě vlastních výsledků jsou v práci uvedeny i výsledky získané v kolektivu školitele a školitelky-specialistky, aby mohly být vlastní výsledky dány do širších souvislostí. Převzaté výsledky jsou v práci vyznačeny.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 VÝZNAM METANU JAKO SKLENÍKOVÉHO PLYNU A JEHO GLOBÁLNÍ PRODUKCE A SPOTŘEBA

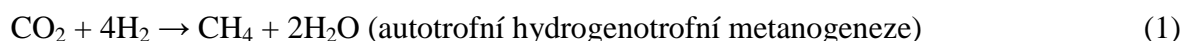
Metan (CH_4) je atmosférický plyn s tzv. skleníkovým efektem, který způsobuje globální oteplování planety Země. Od roku 1750 do roku 2005 stoupla atmosférická koncentrace metanu ze 700 ppb¹ na 1782 ppb (TEITER & MANDER, 2005). Doba zdržení metanu v atmosféře je asi 9 let (TEITER & MANDER, 2005). Celkově je v poslední době emitováno do atmosféry kolem 600 milionů tun metanu ročně (IPPC, 2001), z toho 37 % je produkováno přírodními procesy (ANDERSON A KOL., 2010), hlavně mokřady, které emitují do atmosféry ročně 11 milionů tun metanu (LE MER & ROGER, 2001). Z celkového množství vyprodukovaného metanu je cca 500 milionů tun ročně spotřebováno chemickými reakcemi s hydroxylovými radikály v troposféře, 40 milionů tun je chemicky přeměněno ve stratosféře a 30 milionů tun (tzn. 6 %) podléhá biologické přeměně - mikrobiální oxidaci v půdě (SMITH A KOL., 2000; IPPC, 2001; HÜTSCH, 2001; DALAL & ALLEN, 2008). Nejdůležitější suchozemský *sink* metanu představují lesní půdy (HENCKEL A KOL., 2000A; DUNFIELD, 2007; DALAL & ALLEN, 2008). Travinné ekosystémy jsou druhým největším suchozemským *sinkem* metanu (IPPC, 2001). Pastevní ekosystémy, jako specifický typ využití trvalých travních porostů, mohou působit jako *sink* i jako zdroj metanu. V celkové bilanci metanu, tedy v tom, zda určitý ekosystém, určitá půda, metan spotřebovává nebo uvolňuje ve formě emisí do atmosféry, hraje roli celá řada faktorů (pH půdy, obsah živin, dostupnost kyslíku a metanu, složení

¹ Částic na miliardu.

mikrobiálního společenstva, struktura půdy, typ půdy, typ vegetace atd.) (KELLER A KOL., 2005).

2.2 PRODUKCE METANU V PŮDĚ

Metan je konečným produktem metabolismu metanogenních *Archea*. Produkce metanu (metanogeneze) probíhá v anaerobním prostředí. Metan následně difunduje do aerobní půdní zóny, kde dochází k jeho oxidaci. Zbylý neoxidovaný metan je emitován do atmosféry. Metan je jeden z mnoha substrátů podléhajících mikrobiální oxidaci. To, které substráty budou oxidovány, záleží mj. na redoxním potenciálu - následující redukční procesy jsou seřazené podle poklesu redukčního potenciálu: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$, $\text{Mn}^{4+} \rightarrow \text{Mn}^{2+}$, $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$, $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{S}^{2-}$, $\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4$ (FENCHEL & FINLEY, 1995). Metanogeneze probíhá při nízkých redoxních potenciálech při zhruba $\text{Eh} < -250 \text{ mV}$. Sulfát redukující bakterie a metanogenní bakterie si konkurují o vodík a acetát. Pokud tedy nejsou v prostředí přítomné sulfát redukující bakterie, mají metanogenní *Archea* ideální podmínky pro svůj metabolismus. Substrátem pro jejich katabolismus je oxid uhličitý (Reakce 1) nebo organické látky - kyselina octová (Reakce 2 a 3). Vzhledem k velmi nízkému redoxnímu potenciálu metanogeneze je tento proces konečnou přeměnou organické hmoty v půdě. Optimální teplotní rozpětí pro metabolismus metanogenních *Archea* je $10 - 30 \text{ }^\circ\text{C}$, optimální pH je $5,5 - 7,0$ (LE MER & ROGER, 2001).

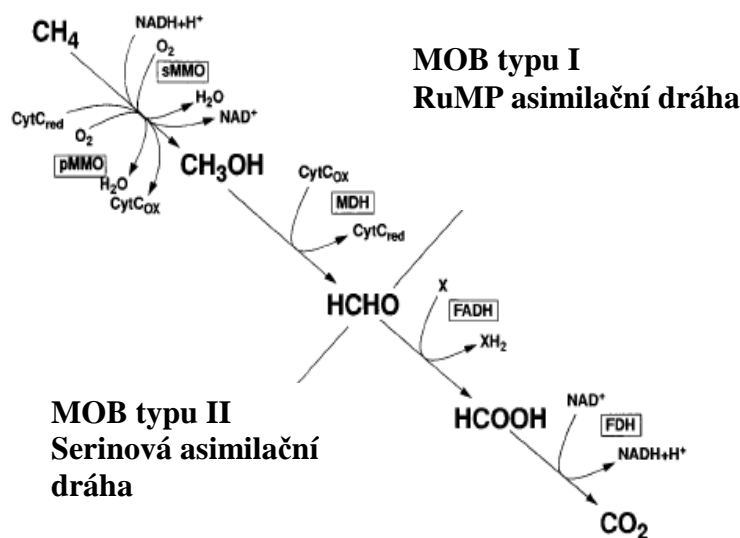


2.3 ANAEROBNÍ OXIDACE METANU

Anaerobně využívají metan anaerobní metanotrofové (tzv. ANME) (NAUHAUS A KOL., 2005). Tato skupina patří do říše *Archea* a je blízce příbuzná metanogenním *Archea* (ORPHAN A KOL., 2002). Tento proces se také nazývá reverzní metanogeneze a byl doposud popsán pouze v mořském prostředí, zejména pak v sedimentech, a je závislý na dostatečné koncentraci sulfátů kvůli spřaženému metabolismu ANME a bakterií redukujících sulfát (NAUHAUS A KOL., 2005). Další anaerobní cesta oxidace metanu je spřažená s denitrifikací a byla popsána u bakterií (WAKI A KOL., 2009). Anaerobní oxidací metanu se nebudu dále zabývat, protože nebyla předmětem výzkumu této práce.

2.4 AEROBNÍ OXIDACE METANU

Metan produkovaný metanogenními mikroorganismy a metan, který difunduje do půdy ze vzduchu, může být metabolizován MOB až na oxid uhličitý a vodu (Reakce 4). Meziprodukty metabolické dráhy oxidace metanu jsou metanol, formaldehyd a formát. Podrobně je metabolismus MOB popsán na Obrázku 1. K aerobní oxidaci metanu je nezbytný dostatek kyslíku v půdě. Největší výskyt MOB by tedy měl být ve svrchní vrstvě půdy, kam difunduje kyslík ze vzduchu. Zároveň je zde i dostatek vzdušného metanu a dostává se sem i metan vznikající v hlubších vrstvách půdy. MOB jsou sice schopné oxidovat až 100 % vyprodukovaného metanu (FRENZEL A KOL., 1992; OREMLAND & CULBERTSON, 1992; VAN HUISSTEDEN, 2004), ale globálně převažuje produkce metanu nad jeho spotřebou (LE MER & ROGER, 2001). Dochází tedy ke zvyšování koncentrace metanu v atmosféře, a to jak přirozenými procesy, tak vlivem lidských zásahů (NEWMAN 1993).



Obrázek 1: Asimilační dráha uhlíku u MOB. MOB typu I a typu II se liší podle molekuly, pomocí které asimilují uhlík. MOB typu I asimilují prostřednictvím ribuloza monofosfátu (RuMP), kdežto MOB typu II pomocí serinu. (Upraveno podle HANSON & HANSON, 1996).

Počáteční krok oxidace metanu spočívá v oxidaci metanu na metanol (Reakce 5) a katalyzují jej dva enzymy – cytoplazmatická (sMMO) a membránově (pMMO) vázaná metan monooxygenáza. Monooxygenáza sMMO se nachází v cytoplasmě buněk, je rozpustná a je součástí enzymatického aparátu pouze u některých druhů MOB, např. *Methylococcus* (SEMRAU A KOL., 2010). Geny pro sMMO jsou exprimovány pouze při nízkých koncentracích mědi v půdě (CONRAD, 2007). Membránově vázaná monooxygenáza (pMMO) je vázaná na cytoplazmatickou membránu buňky a podle současných znalostí je součástí enzymatického aparátu všech druhů MOB (HANSON & HANSON, 1996) kromě rodu *Methylocella*, které obsahují pouze sMMO (DEDYSH A KOL., 2000). Enzym pMMO se skládá z 3 podjednotek (α -, β -, a γ - podjednotky), které kódují jednotlivé geny v genovém klastru (*pmoC*, *pmoA*, *pmoB*) (TAVORMINA A KOL., 2011). Gen *pmoA* se běžně využívá jako genetický marker při výzkumu MOB. Gen *pmoA* je ovšem evolučně, a tím i sekvenčně, příbuzný genu *amoA*, který kóduje homologní podjednotku enzymu amonium monooxygenázy nitrifikačních bakterií, které patří

do třídy *Betaproteobacteria*¹ (HOLMES A KOL., 1995) (taxonomické názvy jsou v této práci uváděny dle Sedláček, 2007). Tento enzym zajišťuje oxidaci amoniaku na hydroxylamin (Reakce 6). Tato podobnost v nukleotidových sekvencích genů může zkreslit výsledky studia kvůli nedostatečné specifitě nasedání primerů, které se mohou vázat jak na sekvenci genu *pmoA*, tak na sekvenci genu *amoA* (HOLMES A KOL., 1995; HORZ A KOL., 2005).



2.5 TAXONOMIE AEROBNÍCH MOB

Bakterie oxidující metan jsou fyziologicky relativně dobře definovanou skupinou. Jsou zvláštní skupinou metylotrofních bakterií a metan využívají jako jediný zdroj uhlíku a energie (HANSON & HANSON, 1996). Najdeme je ve všech suchozemských i vodních ekosystémech. Kromě malého příspěvku nitrifikačních bakterií (JIANG A BAKKEN, 1999) jsou MOB jedinou známou skupinou organismů, která spotřebovává metan za aerobních podmínek (HANSON & HANSON, 1996).

MOB patří do skupiny gram-negativních bakterií, kmen *Proteobacteria*. Od grampozitivních bakterií se liší například přítomností vnější membrány buněčné stěny, přítomností lipopolysacharidů v této membráně a absencí kyseliny teichoové. MOB typu I a MOB typu II byly rozděleny na základě fylogeneze genu pro 16S rRNA, asimilační dráhy

¹ názvy vyšších taxonomických jednotek jsou v této práci formálně uváděny dle Sedláček (2007)

² ($\Delta G^0 = -778 \text{ kJ/mol CH}_4$)

uhlíku (Obrázek 1), profilu mastných kyselin a stavby vnitřní strany buněčné membrány (HANSON & HANSON, 1996).

Skupina MOB typu I patří taxonomicky do třídy *Gammaproteobacteria*, do čeledi *Methylococcaceae* (BOWMAN, 2006). Dále se dělí na podskupinu MOB Ia, do které patří rody *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium*, *Methylospharea*, *Methylosarcina* (KOLB A KOL, 2003), *Methylosoma*, *Crenothrix* (RAHALKAR A KOL., 2007) a *Clonothrix* (VIGLIOTTA A KOL., 2007), a na podskupinu MOB Ib (taktéž nazývané jako typ X), do které patří rody *Methylococcus*, *Methylocaldum*, *Methylothermus* (KOLB A KOL., 2003) a *Methyloholabius* (HEYER A KOL., 2005). MOB Typu Ib jsou výrazně termotolerantní až termofilní druhy (GEBERT A KOL., 2003, 2004). MOB typu I mají rozptýlenou vnitřní cytoplasmatickou membránu (typu I), pro asimilaci uhlíku využívají ribulozu-monofosfát (RuMP), mastné kyseliny mají převážně 14 nebo 16 uhlíků (HANSON & HANSON, 1996).

Druhou skupinu tvoří MOB Typu II (patřící do třídy *Alphaproteobacteria*; čeleď *Methylocystaceae*) (BOWMAN, 2006). Do této skupiny patří rody *Methylosinus* a *Methylocystis*. Naopak, nově objevené rody metanotrofů *Methylocapsa* a *Methylocella* (KOLB A KOL., 2003; DEDYSH A KOL., 2000, 2002, 2004; DUNFIELD A KOL., 2003) patří do čeledi *Beijerinckiaceae* (SEMRAU A KOL., 2010). Tyto rody byly izolovány z rašelinišť a kyselých lesních půd a nejsou pokládány za typické zástupce MOB typu II, přestože využívají serin pro asimilaci uhlíku (SEMRAU A KOL., 2010). MOB typu II mají celistvou vnitřní cytoplasmatickou membránu (typu II), k asimilaci uhlíku využívají dráhu serinu a obsahují mastné kyseliny převážně o délce 18 uhlíků (HANSON & HANSON, 1996).

Výzkum společenstev MOB v různých ekosystémech pomocí genu *pmoA* přinesl objevy nových, dosud nekultivovaných skupin. Nové sekvence genu *pmoA* byly zaznamenány ve vzorcích podhorských půd a půd vrchovin. Jsou to skupiny USC α , USC γ a „Cluster I“ a

„Cluster II“. Má se za to, že tyto skupiny MOB jsou schopné oxidovat přednostně atmosférický metan, protože mají k metanu vysokou afinitu (HENCKEL A KOL, 2000A; KNIEF A KOL., 2003; DUNFIELD, 2007). USC γ patří do třídy *Gammaproteobacteria* a USC α patří do třídy *Alphaproteobacteria* (KNIEF A KOL., 2003). O ekofyziologii těchto bakterií není dosud mnoho známo, například nároky na půdní pH se ale zdají být odlišné. MOB patřící do skupiny USC α preferují pH<6 a MOB patřící do USC γ preferují pH >6 (KNIEF A KOL., 2003). Ovšem detekce genu *pmoA* ještě neznamena, že je metanotrofní bakterie aktivní, proto je ekologický význam těchto skupin prozatím nejasný (KNIEF A KOL., 2003). V práci KNIEF A KOL. (2003) byly skupiny USC α a USC γ nalezeny ve 30 ze 34 lesních a lučních půd, ale nebyly přítomné v žádné ze 4 zemědělsky obdělávaných půd. V půdách zimoviště jsem tedy neočekávala přítomnost těchto skupin, takže ani nebyly zahrnuty do výzkumu na této lokalitě. Zdá se, že schopnost oxidovat atmosférický metan obecně klesá v pořadí: lesní půdy – půdy trvalých travních porostů – orné půdy (WILLISON A KOL, 1995).

Dále byly objeveny MOB z kmene *Verrucomicrobia* (POL A KOL., 2007; ISLAM A KOL., 2008). O těchto bakteriích je zatím také málo informací, ale údajně mohou představovat až 10 % bakteriální populace v půdě (BUCKLEY & SCHMIDT, 2002), mohly by tedy hrát podstatnou roli v globálním toku uhlíku.

2.6 REGULAČNÍ FAKTORY OXIDACE METANU

Proces oxidace metanu je ovlivněn řadou faktorů, např. koncentrací metanu, provzdušněním půdy, půdní vlhkostí, kvalitou a množstvím organického materiálu, pH půdy, teplotou, redoxním potenciálem a typem vegetace (KELLER A KOL., 2005).

2.6.1 VLIV KONCENTRACE METANU A KYSLÍKU V PŮDĚ

Poznatky o ekologii MOB typu I a II jsou zatím značně rozporuplné a není jasné, zda je vůbec možné ekologicky charakterizovat typ I a typ II jako celek. Dle BENDER & CONRAD (1992) mají MOB typu I nízkou afinitu k metanu a žijí tedy hlavně v prostředí s jeho vysokou koncentrací a pro oxidaci metanu nepotřebují vysokou koncentraci kyslíku. Naopak v práci AMARAL A KOL. (1995) autoři uvádějí, že typ I má vysokou afinitu a vyskytuje se v prokysličeném prostředí s nízkou koncentrací metanu. Typ I byl detekován například na povrchu sedimentů s metanogenní aktivitou, v rýžovištích a v zemědělských půdách (HANSON & HANSON, 1996; ZHENG A KOL., 2008). MOB typu I byly detekovány také v lesních půdách a neutrálním pH (KNIEF A KOL., 2003). Tyto bakterie tedy asimilují metan pocházející z půdního či vodního prostředí, kde je jeho koncentrace vyšší nežli v atmosféře. Část zástupců této skupiny je kultivovatelná v laboratorních podmínkách, a tudíž je jejich fylogeneze a biochemie lépe prozkoumána (DUNFIELD, 2007).

MOB typu II převládají dle BENDER & CONRAD (1992) v půdách, které jsou dobře prokysličené. Jsou schopné metabolizovat při nižších koncentracích metanu, mají tedy vysokou afinitu k atmosférickému metanu. Naopak v pracích AMARAL A KOL. (1995) a MOHANTY A KOL., (2006) autoři uvádějí, že typ II má nízkou afinitu a vyskytuje se v prostředí s vysokou koncentrací metanu. HANSON & HANSON (1996) zaznamenali větší podíl typu II ve

vzorcích zemědělských půd, jejichž atmosféra byla obohacena o metan, kdežto FJELLBIRKELAND A KOL. (2001) naopak ve vzorcích obohacených o metan zaznamenali větší podíl typu I. Typ II byl detekován ve vodním sloupci či v rašeliništích (HANSON & HANSON, 1996; HENCKEL A KOL., 1999), v lesních půdách s kyselým pH (KNIEF A KOL., 2003) a v rýžovištích (BODELIER A KOL., 2000). I když jsou zástupci této skupiny obecně obtížně kultivovatelní, u některých druhů se kultivace zdařila (DUNFIELD, 2007). O jejich fylogenezi a biochemii je k dispozici méně informací než o zástupcích typu I (MAXFIELD A KOL., 2008).

Je zřejmé, že ekologické nároky těchto dvou skupin nejsou jasně definovatelné (CONRAD, 2007). Typ I a typ II mohou koexistovat v rámci jednoho ekosystému (HOFFMANN A KOL., 2002). Zdá se, že MOB typu I jsou schopné lépe využít změny podmínek prostředí a rychle se namnožit, kdežto MOB typu II udržují svoji abundanci na stálé úrovni, a to hlavně v půdách, které produkují velké množství metanu (HENCKEL A KOL., 2000B).

2.6.2 Vliv dusíku

Aktivita a růst MOB mohou být zpomaleny přítomností amonných iontů (NH_4^+) v půdě (BORKEN A KOL., 2002). V dobře provzdušněné půdě probíhá intenzivní mineralizace organických látek, a to vede ke hromadění minerálních forem dusíku, zejména formy amoniakální. MOB jsou díky homologii enzymů metan monooxygenáza a amonium monooxygenáza schopné oxidovat vedle metanu i amoniak a naopak nitrifikační bakterie mohou oxidovat i metan. Tato zástupnost enzymů je možná také díky podobné velikosti a konformaci molekul amoniaku a metanu (JIANG A BAKKEN, 1999). Alternativní oxidace CH_4 a NH_4^+ probíhá na oxyklině¹. Po vyčerpání NH_4^+ z prostředí dojde k obnovení oxidace metanu (SITLAULA A KOL., 2000). Amoniak vytěsňuje metan ve vazebném místě enzymu metan

¹ Rozmezí anoxického a oxického prostředí

monooxygenázy. Dojde ke snížení aktivity MOB (SMITH A KOL., 2000) Podle některých zdrojů nedojde ke změně druhového složení MOB (SITULA A KOL., 2000). Naproti tomu existují i názory, že bakterie kvůli blokaci monooxygenázy amoniakem skutečně hynou, jak zmiňují SMITH A KOL. (2000).

MAXFIELD A KOL. (2008) uvádějí jako možný efekt amoniaku zvýšení abundance nespécifikované skupiny bakterií, které jsou schopné metabolizovat metan. Potenciál půd oxidovat metan by tak nebyl ovlivněn. Dalším důvodem inhibice oxidace metanu může být kromě NH_4^+ také toxicita nitritu NO_2^- (BODELIER & LAANBROEK, 2004), který vzniká v půdě jako meziproduct intenzivní denitrifikace (BYKOVÁ A KOL., 2007) či jiných procesů.

O složení společenstva MOB rozhoduje také poměr celkového (organického) uhlíku a dusíku. Pokud se MOB nacházejí v prostředí, kde poměr $C_{\text{org}}/N_{\text{tot}}$ je vysoký, může být jejich aktivita značně inhibována nedostatkem dusíku. V takovém prostředí budou dominovat druhy MOB schopné fixovat vzdušný dusík. Tuto schopnost mají jak některé druhy MOB typu I (AUMAN A KOL., 2001), tak i zástupci MOB typu II (HANSON & HANSON, 1996; BODELIER A KOL., 2000).

2.6.3 VLIV FYZIKÁLNÍCH VLASTNOSTÍ PROSTŘEDÍ

Oxidace metanu je v půdě je ovlivňována i fyzikálními faktory, které řídí difuzi plynů do půdy, z půdy a v půdě. Těmito faktory jsou vlhkost půdy, obsah jílových částic a pórovitost (kompaktnost) půdy (TEMPLETON A KOL., 2006). Pokud je půda příliš zamokřená, je difuze plynů ztížena (pozn.autorky: molekulární difuze plynů ve vodě je 10 000 x nižší než ve vzduchu). V podmínkách zamokřených půd převládají anaerobní procesy. Pokud je půda provzdušněná, probíhají i aerobní procesy – mezi nimi aerobní oxidace metanu. Bylo potvrzeno, že MOB typu I se lépe přizpůsobí výkyvům půdní vlhkosti (HENCKEL A KOL.,

2000B). Se zvýšenou koncentrací kyslíku ale dochází k mineralizaci organické hmoty a tím k vyšší produkci amoniaku, který naopak přispívá k inhibici oxidace metanu. Při extrémním vysušení může dojít až k poškození buněk. Například SCHNELL & KING (1996) uvádějí jako optimum pro lesní půdy vlhkost 20 %. Ovšem nedostatek kyslíku či živin jsou schopné MOB přežít v dormantním stadiu (spora, cysta), přičemž regenerace po nedostatku kyslíku je úspěšnější nežli regenerace po nedostatku živin (ROSLEV & KING, 1995).

Dalším kontrolním faktorem aktivity MOB je teplota a pH. V práci DALAL & ALLEN (2008) autoři uvádějí rozmezí pH 3,5 – 8,0, při kterém jsou MOB obecně aktivní. Teplotní optima jednotlivých druhů se liší. V rámci MOB byly prokázány druhy termofilní, mezofilní i psychrofilní (TROTSENKO & KHMELENINA, 2005). Mezi psychrofilní MOB patří zástupci typu I (GEBERT A KOL., 2003, 2004), termofilní druhy jsou zástupci obou skupin MOB. Teploty prostředí nižší než 10 °C a vyšší než 40 °C mají za následek významnou inhibici oxidace metanu (CHRISTOPHERSEN A KOL., 2000), pravděpodobně kvůli inhibici mezofilních druhů (SEMRAU A KOL., 2010). Dále může mikrobiální společenstvo ovlivnit typ vegetace, a to např. prostřednictvím kořenových exsudátů. Například jehličnaté stromy vylučují svými kořeny monoterpeny, které inhibují oxidaci atmosférického metanu (BORKEN A KOL., 2003). Ve srovnání s opadavými lesy je pak v půdách jehličnatých lesů nižší oxidace metanu (BORKEN A KOL., 2003).

2.6.4 VLIV KONCENTRACE MĚDI

Dalším faktorem ovlivňujícím metabolismus MOB je dostupnost mědi (MURRELL A KOL., 2000). Tento prvek je součástí aktivního místa obou enzymů, sMMO i pMMO (NGUYEN A KOL., 1994). Na dostupnosti mědi záleží exprese genů pro sMMO a pMMO (HANSON & HANSON, 1996). Poměr koncentrace mědi a celkové biomasy určuje, které geny

budou exprimovány. Pokud je poměr nízký, budou pravděpodobně exprimovány geny pro sMMO, při vyšším poměru to budou geny pro pMMO (SEMRAU A KOL., 1995). Ovšem mimo laboratoř nebyl dosud jednoznačně prokázán vztah mezi koncentrací mědi a expresí genu pro pMMO (KNAPP A KOL., 2007).

2.6.5 OVLIVNĚNÍ MOB PŘÍTOMNOSTÍ SKOTU

Půda zimoviště je speciální druh pastevní půdy; vliv zvířat na půdní vlastnosti a tím i na mikrobiální společenstvo je zde velmi výrazný a probíhá hlavně v zimě (respektive od podzimu do jara, po dobu cca 6 měsíců). Kromě přímého a nepřímého vlivu zvířat se samozřejmě může uplatňovat i vliv střídání ročních dob, tedy roční chod teploty a dalších charakteristik, jako v každé jiné půdě.

Zvýšená koncentrace dusíku v zemědělských půdách ovlivňuje aktivitu a abundanci MOB, ale ne strukturu společenstva MOB (MAXFIELD A KOL., 2008). Stav půdy na jaře a na podzim se na zimovišti skotu liší. Na jaře je v půdě přebytek živin z exkrementů a moči skotu, který zde pobýval během zimního období. Živiny nebyly díky nízkým teplotám během zimního období asimilovány a docházelo jen k minimálnímu rozkladu půdní organické hmoty. Na jaře s rostoucí teplotou dochází ke stimulaci dekompozice nahromaděných exkrementů, zintenzivní se mnoho mikrobiálních procesů a dojde k aktivizaci mikrobiálního společenstva. Na zkoumaném zimovišti skotu byla řada těchto jevů zdokumentována, včetně nárůstu denitrifikační a nitrifikační aktivity a zvýšení emisí plyných metabolitů z půdy (ŠIMEK A KOL., 2006).

Na aktivitu MOB mají zásadní vliv fyzikální faktory – difuze vzduchu v půdě, obsah jílových částic a kompaktnost půdy (TEMPLETON A KOL., 2006). Na zimovišti na nejvíce exponovaných lokalitách skot horní vrstvu půdy kopyty kypří a provzdušňuje, zatímco

spodnější vrstvy půdy jsou utužovány. Na druhou stranu horní vrstva půdy je zde promíchána s výkaly. Tak se do půdy dostává organická hmota, která na sebe váže vodu. Dochází k tvorbě anaerobních mikroprostředí a možnému snížení abundance MOB.

2.7 POUŽITÉ MOLEKULÁRNÍ METODY STUDIA SPOLEČENSTVA MOB

Společenstva MOB se dají jako jiná společenstva charakterizovat na dvou základních úrovních - kvalitativně a kvantitativně. Na základě dostupných publikovaných informací byly pro účely této práce zvoleny osvědčené nejmodernější metody k získání relevantních kvantitativních i kvalitativních charakteristik společenstev MOB ve studovaných půdách.

Pro výzkum rozdílů ve struktuře společenstva MOB byla použita fingerprintová technika DGGE¹ (FJELLBIRKELAND A KOL., 2001), založená na detekci rozdílů v sekvencích genu *pmoA* (LIN A KOL., 2005; AIT-BENICHOU A KOL., 2009). Struktura společenstva MOB byla zkoumána také fingerprintovou technikou MISA² (TAVORMINA A KOL., 2010) založenou na analýze délkového polymorfismu intergenové oblasti mezi geny *pmoC* a *pmoA* (TAVORMINA A KOL., 2010, 2011). Pro výzkum abundance MOB typu I byla použita metoda real-time PCR (KOLB A KOL., 2003). Pro detekci aktivních buněk MOB typu I a typu II, stanovení jejich vzájemného poměru a stanovení procentuálního zastoupení MOB v celkovém prokaryontním společenstvu byla použita metoda CARD-FISH (PERNTHALER A KOL., 2002; DEDYSH A KOL., 2003; KALLISTOVÁ A KOL., 2007; EICKHORST & TIPPKÖTTER, 2008). Tímto přístupem byly detekovány buňky MOB pomocí taxonomicky specifických prób vážících se na gen pro 16S rRNA.

¹ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

² Monooxygenase Intergenic Spacer Analysis

2.7.1 IZOLACE BAKTERIÁLNÍ DNA Z PŮDY

Základním předpokladem aplikace molekulárně biologických metod je izolace kvalitní DNA bez příměsi jiných intracelulárních nebo extracelulárních složek. Metody izolace DNA využívají rozdílné rozpustnosti biologických makromolekul, adsorpce na pevný podklad nebo ultracentrifugace v gradientních roztocích (PANTŮČEK & DOŠKAŘ, 2005). Vzorky půdy se nejdříve homogenizují a poté dochází k lyzi buněk a následným krokům, které se liší podle použité metody.

Spolu s DNA jsou z půdy často extrahovány ve vodné fázi také huminové látky, které interferují při detekci i následném využití izolované DNA. Tato kontaminace může například inhibovat činnost *Taq* DNA polymerázy v průběhu PCR. Pokud jsou huminové látky těžko odstranitelné, je nutná purifikace DNA. Purifikace DNA byla v této práci provedena pomocí komerčního kitu Wizzard[®] DNA Clean-Up System (Promega, USA).

• FENOL-CHLOROFORMOVÁ IZOLACE

Tato metoda je velmi rozšířená, relativně jednoduchá a levná a poskytuje kvalitní DNA o vysoké čistotě (modifikace dle GRIFFITS A KOL., 2000). Prvním krokem je homogenizace půdního vzorku v pufru (obsahuje tenzid dodecylsírán sodný, který rozpustí buněčnou stěnu a plazmatickou membránu) v organickém roztoku (směs fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu, která denaturuje a vysráží bílkoviny). Při pH roztoku nad 7,6 je DNA disociována a zůstává ve vodné fázi, zatímco denaturované proteiny zůstávají v organické frakci, která se oddělí centrifugací. Vodná fáze je přečištěna pomocí směsi chloroformu a izoamylalkoholu (v/v 24:1), aby byly odstraněny zbytky fenolu, který by mohl způsobit nežádoucí denaturaci enzymů při následných krocích. DNA je vysrážena ve vysokomolekulárním polyetylen glykolu PEG-8000. Soli obsažené ve vodní fázi se mohou

srážet spolu s DNA, a proto je peleta DNA následně promyta 70 % etanolem. Ten rozpustí soli, ale DNA setrvá i nadále vysrážená. Následuje opět separace centrifugací a rehydratace DNA v roztoku alkalického pufru TE (směs Tris-HCl, pH 7,5 – 8,0) a inhibitoru nukleáz (EDTA).

• **IZOLACE DNA POMOCÍ FASTDNA SPIN KIT FOR SOIL (Q-BIOGENE)**

Výhoda tohoto komerčního kitu spočívá v rychlosti, opakovatelnosti a jednoduchosti provedení, a také není nutné používat jedovatý fenol a chloroform. I zde jsou prvními kroky homogenizace, lyze buněk a precipitace proteinů. Zásadním rozdílem oproti předešlé metodě je použití „binding matrix“, což je mikroporézní membrána tvořená vysoce elektro pozitivním hydrofobním materiálem, který má schopnost na sebe vázat záporně nabitě nukleové kyseliny z roztoku v přítomnosti vysokých koncentrací solí. Vzorek je centrifugován a supernatant se odstraní. DNA navázaná na membráně se promyje puftrem, který odstraní soli. Následně je DNA uvolněna z vazby na membránu promytím vodou nebo TE puftrem v prostředí s nízkou koncentrací solí.

2.7.2 DETEKCE A KVANTIFIKACE DNA

Ke zjištění koncentrace DNA je běžně využívána spektrofotometrie. Absorbance se měří při vlnové délce 260 nm. Roztok dsDNA o koncentraci 50 µg/ml má absorbanci 1. Ovšem údaj může být pozměněn přítomností proteinů či fenolu v roztoku, navíc tato metoda neposkytne informace o integritě DNA.

Další možností je detekce a kvantifikace DNA pomocí gelové elektroforézy. V elektrickém poli migrují nabitě molekuly a částice směrem k opačně nabitě elektrodě (v případě DNA od katody k anodě). Díky rozdílné velikosti a konformaci putují molekuly DNA agarózovým gelem, který slouží jako molekulární síto, různou rychlostí a jsou rozdělovány na

jednotlivé fragmenty (proužky; v případě izolované DNA je to celá škála fragmentů). Agarózový gel je po separaci barven interkalačním¹ fluorescentním barvivem (roztok ethidium bromidu). Produkty jsou viditelné pod UV světlem. Lze použít i modré světlo, které nezpůsobuje degradaci DNA.

2.7.3 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

PCR je metoda umožňující enzymatickou syntézu specifických sekvencí DNA *in vitro*, kterou zavedl Kary B. Mullis v roce 1985 (MULLIS A KOL, 1986). Jedná se o relativně jednoduchou, ale velmi účinnou metodu amplifikace DNA využívanou v molekulární biologii. Metoda je založena na základním molekulárním procesu v živých organismech – na replikaci DNA (PANTŮČEK & DOŠKAŘ, 2005).

Podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza vybraných úseků DNA ve směru 5'- 3' díky činnosti DNA-dependentní polymerázy. Vybrané úseky jsou ohraničeny primery, které se váží na protilehlé řetězce DNA. Po přidání nukleotidů a DNA-polymerázy pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů. Nejčastěji používanou polymerázou je *Taq* DNA-polymeráza izolovaná z organismu *Thermus aquaticus*. Tato polymeráza odolává teplotám, při nichž DNA denaturuje. Díky termostabilitě je možné, aby PCR probíhala v opakujících se cyklech (PANTŮČEK & DOŠKAŘ, 2005). Během těchto cyklů se střídají 3 kroky s odlišnými teplotními nároky:

¹ Inkorporuje se do dvoušroubovice DNA

1. Denaturace - DNA se po dobu 20-30 sekund zahřívá na teplotu 94-98 °C. Při této teplotě dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule dvouvláknové DNA a k jejímu rozvolnění. Vzniká tak *ssDNA*.

2. Nasednutí primerů - teplota se sníží na 50-65 °C, což umožňuje nasednutí primerů na specifická místa *ssDNA*. Na dvouvláknové úseky DNA-primer se váže termostabilní DNA polymeráza.

3. Prodlužování primerů - teplota použitá v této fázi závisí na použité DNA polymeráze. Nejběžnější *Taq* DNA polymeráza má optimum aktivity při 75-80 °C. V tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA. Ve směru od 5' konce k 3' konci je syntetizováno vlákno DNA komplementární k templátovému vláknu DNA. Vznikne tak kopie úseku templátové DNA (část genu, gen, klastr genů).

2.7.4 NESTED PCR

Tato modifikace klasické PCR využívá tzv. vnějších a vnitřních primerů a její výhodou je větší citlivost oproti klasické PCR (PANTŮČEK & DOŠKAŘ, 2005). Nejdříve je připravena amplifikační směs s vnějšími primery. Takto vzniklý produkt je přenesen coby templát do druhé amplifikační reakce, tentokrát s primery specifickými pro sekvenci uvnitř templátu. Dvoustupňovitost umožňuje naředění inhibitorů, ale také s sebou nese riziko kontaminace vzorku.

2.7.5 REAL TIME PCR

Metoda je založena na principu na klasické PCR s tím rozdílem, že termocyklier umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky *dsDNA* během každého cyklu, kdežto u klasické PCR se detekuje až konečný produkt. Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního

substrátu, který se váže na syntetizovanou *dsDNA* a úroveň detekované fluorescence pak odpovídá množství nasyntetizované DNA. Při real time PCR je možné buď používat standardy (komerčně dodávané či připravené přímo v laboratoři) o přesně známém počtu kopií sledovaného úseku DNA nebo porovnávat pouze vzorky mezi sebou bez použití standardu. Srovnáním s fluorescencí standardu je pak možné vypočítat množství kopií daného úseku DNA ve vzorku.

2.7.6 DENATURAČNÍ GRADIENTOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (DGGE)

Metoda umožňuje separaci *dsDNA* v polyakrylamidovém gelu na základě odlišnosti v sekvenci fragmentu DNA. V polyakrylamidovém gelu je vytvořen lineární denaturační gradient zajištěný vzrůstající koncentrací denaturačních činidel - formamidu a močoviny. Dvouvláknová DNA putuje rychlostí danou její molekulovou hmotností až do doby, než vstoupí do té části gelu, kde je taková koncentrace denaturačních látek, která způsobí denaturaci dvouvláknové DNA. Během denaturace nabývají stejně dlouhé, ale sekvenčně odlišné úseky, jiných konformací, a tím mají rozdílnou elektroforetickou pohyblivost. Díky tomu lze touto metodou odlišit rozdíl v sekvenci i v jediném nukleotidu. Částečnou (nikoliv úplnou) denaturaci zajišťuje tzv. „GC-svorka“ (sekvence opakujících se G a C bází o velikosti cca 40 nukleotidů umístěná na 5' konci forward primeru). Touto metodou lze analyzovat fragmenty DNA dlouhé 150 – 1200 bp (PANTŮČEK & DOŠKAŘ, 2005).

2.7.7 CARD-FISH

Metoda FISH je cytogenetická metoda, kterou vyvinul Christoph Lengauer (LENGAUER A KOL., 1992). Tato metoda byla velkým přelomem v mikrobiologii, protože umožňuje určit bakterie bez nutnosti kultivace. Je používána od přelomu 80. a 90. let

(DELONG A KOL., 1990). Používají se k tomu fluorescenčně značené próby, které vysoce specificky hybridizují s cílovou sekvencí, kterou je především molekula rRNA. Využívají se konzervativní úseky genomů, které jsou díky evolučnímu vývoji pro jednotlivé skupiny bakterií unikátní. Metoda FISH se ovšem potýká s problémem nedostatečného signálu, hlavně díky nedostačujícímu počtu ribozomů. To bývá způsobeno nedostatkem živin a nízké růstové rychlosti (STRAŠKRABOVÁ A KOL., 1996). Metoda CARD-FISH byla vyvinuta vylepšením detekce fluorescenčně značených buněk tak, že se nejdříve vysoce specificky naváže na daný úsek DNA či RNA próba a teprve na takto navázanou próbu se naváže fluorescenčně značený tyramid, který amplifikuje signál. Buňky jsou poté pod mikroskopem viditelnější.

2.7.8 ANALÝZA DÉLKOVÉHO POLYMORFISMU INTERGENOVÉ OBLASTI V OPERONU PRO MONOOXYGENAZU (MISA - MONOOXYGENASE INTERGENIC SPACER ANALYSIS)

MOB mají v genetickém kódu pro metan monooxygenázu klastr genů *pmoC*, *pmoA* a *pmoB* (TAVORMINA A KOL., 2008, 2010, 2011). Tento klastr mají také nitrifikační bakterie (NORTON A KOL., 1996). Mezi geny jsou nekódující oblasti, tzv. spacers - nekódující sekvence, které vykazují délkový polymorfismus. Jejich délka je rozdílná pro třídy *Gammaproteobacteria* a *Alphaproteobacteria* a dokonce i pro jednotlivé druhy (TAVORMINA A KOL., 2010).

3. METODIKA

3.1 POKUSNÁ LOKALITA A USPOŘÁDÁNÍ POKUSU

Pokusná lokalita se nachází v předhůří Šumavy v CHKO Blanský les, na úpatí horského masivu Kleti, asi 10 kilometrů severozápadně od Českého Krumlova (48°52′ N, 14°13′ E). Lokalita je součástí ekofarmy Borová, má výměru 4 ha a leží v nadmořské výšce 630 m. Od roku 1992 je využívána jako trvalý travní porost pro pastvu skotu a od roku 1994 funguje jako zimoviště pro zhruba devadesátihlavé stádo skotu zhruba v období od října do dubna včetně. Na lokalitě byly vymezeny 4 plochy (Obrázek 2) s odlišnou dobou zatížení dobyt看em.

Na ploše SI (silná zátěž) je půda nejvíce zatížená, silně ušlapaná skotem, vegetace téměř chybí a svrchní půda je promíchána s výkaly. Na ploše SR (regenerace) byl skot naposledy přítomen na jaře 2008 a půda se od té doby regeneruje ze zátěže shodné s plochou SI. Na ploše BI (začínající silná zátěž) je půda od zimy 2008-2009 zatížena skotem. Plocha CO (bez zátěže) slouží jako kontrola. Půda na zimovišti je charakterizována jako Haplic Phaeozem (WRB; BRŮČEK A KOL., 2009). Více podrobností o výzkumné lokalitě lze nalézt v práci ŠIMEK A KOL. (2006).



Obrázek 2: Letecká fotografie výzkumné lokality - zimoviště skotu. Pokusné plochy jsou na fotografii ohraničeny.

3.2 ODBĚRY VZORKŮ A ÚPRAVA VZORKŮ

V této diplomové práci byly použity k analýzám vzorky z jara a z podzimu z let 2009 a 2010. Vzorky půd byly odebrány 21. 4. 2009, tj. po zhruba 6 měsíčním pobytu skotu na zimovišti, a 21. 10. 2009, tj. po asi 6-ti měsíční letní regeneraci (v letním období se skot pase na letních pastvinách). V roce 2010 byly vzorky odebrány 10.5. a 26.10. Vzorky půd byly odebírány z vrstvy 0-15 cm. Z každé plochy (tzn. SI, SR, BI a CO) bylo odebráno 5 směsných půdních vzorků z náhodně zvolených míst, celkem tedy 20 vzorků. Každý směsný vzorek byl získán smícháním 3 dílčích vzorků, které byly odebrány z míst vzdálených od sebe maximálně 1,5 m. Odebrané půdní vzorky byly ihned po odběru přímo v terénu prosety přes

síto s průměrem ok 2 mm. Získaná homogenizovaná frakce byla uložena do polyetylenových sáčků a část byla uložena do polyetylenových zkumavek. Půdní vzorky byly tentýž den transportovány do laboratoře a uloženy při 4°C pro potřeby mikrobiálních a chemických analýz a analýzu CARD-FISH. Půdní vzorky v polyetylenových zkumavkách byly uloženy při teplotě -20°C pro potřeby molekulárně-biologických analýz vycházejících z izolace půdní DNA.

3.3 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY PŮD

Základní půdní charakteristiky zkoumaných ploch na zimovišti skotu v Borové jsou uvedeny v Tabulce 1.

Půda SI se v charakteristikách pH, obsah organického uhlíku (C_{org}) a uhlík v mikrobiální biomase (C_{mic}) signifikantně liší od zbylých ploch. Pouze v charakteristice celkový dusík (N_{tot}) se neliší od plochy BI. Kontrolní půda CO se také liší od zbylých ploch, a to v charakteristikách N_{tot} a C_{org} . V charakteristikách pH a C_{mic} se neliší od půdy SR. Půdy BI a SR se neliší v charakteristikách N_{tot} , C_{org} a C_{mic} . Hodnoty pro charakteristiky N_{tot} , C_{org} a C_{mic} klesají ve směru SI>BI>SR>CO.

ploch jsou		Odběr	SI	BI	SR	CO
pH (H ₂ O)	jaro		8,86±0,30 ^a	6,49±0,10 ^b	7,64±0,26 ^c	5,27±0,12 ^d
	podzim		8,78±0,16 ^a	6,89±0,15 ^b	7,23±0,05 ^c	5,18±0,17 ^d
C/N	jaro		7,14±1,54	5,22±0,42	6,04±0,86	5,60±0,75
	podzim		5,05±0,81	4,93±0,72	5,65±1,46	7,60±2,25
N _{tot} [mgN/g]	jaro		10,92±1,01 ^a	8,18±1,33 ^{a,b}	6,84±2,94 ^b	3,72±1,07 ^c
	podzim		10,64±1,07 ^a	8,22±2,13 ^{a,b}	6,65±1,58 ^b	2,52±0,77 ^c
C _{org} [mgC/g]	jaro		78,22±19,30 ^a	42,80±7,28 ^b	39,60±14,54 ^b	20,10±2,63 ^c
	podzim		53,15±6,22 ^a	39,64±8,76 ^a	36,01±7,50 ^a	17,71±2,05 ^b
C _{mic} [µg C/g]	jaro		2017,60±299,81 ^a	823,46±138,55 ^b	759,08±239,59 ^{b,c}	425,24±74,01 ^c
	podzim		1312,99±147,65 ^a	722,93±203,07 ^b	701,36±125,47 ^{b,c}	378,68±78,92 ^c

Tabulka 1: Půdní charakteristiky z odběrů z jara a podzimu roku 2009. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky z 10 (pH, N_{tot}, C/N) a z 15 (C_{org} a C_{mic}) opakování. N_{tot}: obsah celkového dusíku, C_{org}: obsah uhlíku v organické formě. C_{mic}: obsah mikrobiálního uhlíku. Signifikantní rozdíly mezi půdami při p=0,05 (Tukey HSD test) jsou znázorněny různými písmeny. (ŠIMEK A KOL., nepublikováno).

V Tabulce 2 jsou uvedeny emise metanu, které byly změřeny *in situ* na jaře 2009. Půda SI vykazuje o 1 řád vyšší emise metanu než půda BI. Na půdách SR a CO docházelo naopak ke spotřebě metanu (záporné hodnoty).

Plocha	Emise metanu [$\mu\text{g C/h/m}^2$]
SI	23727 \pm 10019
BI	1995 \pm 937
SR	-162 \pm 238
CO	-32 \pm 79

Tabulka 2: Emise metanu z půd dne 21.4.2009. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky, n=5. Hodnoty jsou zaokrouhleny na celé jednotky. (ŠIMEK A KOL., nepublikováno)

V Tabulce 3 jsou uvedeny hodnoty sušiny půdy pro jednotlivé odběry a roky 2009 a 2010. Půda SI se ve všech odběrech liší ve vlhkosti (sušině) od půd SR a CO, od půdy BI se liší pouze v obou odběrech v roce 2010.

Odběr	SI	BI	SR	CO
Jaro 2009	0,7482 \pm 0,0148 ^a	0,7763 \pm 0,0221 ^{a,b}	0,8234 \pm 0,0415 ^{b,c}	0,8845 \pm 0,0088 ^c
Podzim 2009	0,6961 \pm 0,0103 ^a	0,7489 \pm 0,0258 ^{a,b}	0,7712 \pm 0,0258 ^b	0,7327 \pm 0,0576 ^{a,b}
Jaro 2010	0,6973 \pm 0,0282 ^a	0,8075 \pm 0,0100 ^b	0,7791 \pm 0,0087 ^b	0,8189 \pm 0,0198 ^b
Podzim 2010	0,6789 \pm 0,0344 ^a	0,7607 \pm 0,0300 ^b	0,7793 \pm 0,0055 ^{b,c}	0,8299 \pm 0,0237 ^c

Tabulka 3: Sušina půd z jednotlivých odběrů. V tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky, n=20. Signifikantní rozdíly mezi půdami při p=0,05 (Tukey HSD test) jsou znázorněny různými písmeny. (ŠIMEK, nepublikováno).

3.4 STANOVENÍ STRUKTURY SPOLEČENSTVA MOB V PASTEVNÍ PŮDĚ

3.4.1 IZOLACE DNA

DNA byla izolována 2 metodami – fenol-chloroformovou izolací dle GRIFFITS A KOL. (2000) a za použití komerčního kitu FastDNA[®] Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Francie). V obou případech byla DNA izolována z 0,5 g vlhké půdy. Nejdříve byla izolována DNA pouze ze vzorků půd z ploch BI a SI. Bylo totiž nutné porovnat kvalitu získaných amplifikačních produktů a včas zachytit přítomnost případných inhibitorů real time PCR. Pro izolaci DNA ze zbylých vzorků pro metodu DGGE byla zvolena metoda dle GRIFFITS A KOL. (2000). Po otestování dvou metod izolace pro metodu real time PCR byla zvolena izolace pomocí kitu FastDNA Spin Kit for Soil (Q-BIOgene), protože výtěžky izolace DNA poskytly robustnější a opakovatelné výsledky.

• FENOL-CHLOROFORMOVÁ IZOLACE DNA

Do Bio-101 Multimix 2 Matrix Tube (Qbiogene, Heidelberg, Germany) bylo naváženo 0.5 g vlhké půdy (uskladněna při -20 °C). K půdě bylo přidáno 0.5 ml roztoku A (viz Přílohy) a 0.5 ml roztoku B (viz Přílohy). Vzorky byly homogenizovány v homogenizéru (FastPrep[®]-24, MP Biomedicals, USA) po dobu 30 s při rychlosti 5,5 m/s. Vzorky byly stočeny v centrifuze (Eppendorf 5415R, USA) po dobu 10 minut při rychlosti 16000xg při 4 °C. Vodní fáze byla přenesena do mikrokumavek (Gilson, Wisconsin) a bylo přidáno 0.5 ml roztoku C (viz Přílohy). Vzorky byly centrifugovány 10 minut při 16000 × g při 4 °C. Byla odebrána vodní fáze a byl přidán 1 ml roztoku D (viz Přílohy). Vzorky byly promíchány opatrným opakovaným otočením dnem vzhůru a uloženy na 2 hodiny do ledu. Vzorky byly opět

centrifugovány 10 minut při rychlosti $16000 \times g$ při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl odstraněn. Pelety byla ponechána 10 minut schnout při laboratorní teplotě (T_{lab}). Peleta byla po oschnutí promyta $700\text{ }\mu\text{l}$ 70 % etanolem. Vzorky byly opět centrifugovány 10 minut při rychlosti $16000 \times g$ při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl odstraněn. Peleta se nechala schnout v otevřených mikrozkuvkách dnem vzhůru po dobu 15 minut při T_{lab} . Peleta byla resuspendována v $50\text{ }\mu\text{l}$ TE pufru. Vzorky byly uloženy přes noc do $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté použity a zamraženy při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další použití.

3.4.2 HORIZONTÁLNÍ AGARÓZOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Pro gelovou elektroforézu byl použit 1 % agarózový gel (Agarose Low EEO, AppliChem, Německo) a $1 \times$ TAE pufr. Gelová elektroforéza probíhala na přístroji APELEX PS 304 II minipac. Bylo nanášeno $5\text{ }\mu\text{l}$ vzorku izolované DNA smíchané s $1\text{ }\mu\text{l}$ $6 \times$ vkladacího pufru (MBI Fermentas, Litva). Spolu se vzorky bylo na gel nanášeno $5\text{ }\mu\text{l}$ 1kb markeru (Fermentas, $0.5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Elektroforéza probíhala 50 minut při stálém napětí 100 V. Agarózový gel byl barven 20 minut v roztoku ethidium bromidu a následně byl vizualizován pod UV/VIS světlem a vyfotografován (Vilber Lourmat, Francie). Digitální snímky byly uloženy ve formátu TIF pro další zpracování.

3.4.3 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ KONCENTRACE DNA

Koncentrace izolované DNA byla měřena na vertikálním UV/VIS spektrofotometru Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) a vyhodnocena pomocí softwaru dodaného s přístrojem. Pro měření byl použit objem $1\text{ }\mu\text{l}$ DNA. Absorbance byla měřena při vlnové délce 260 nm.

3.4.4 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Před samotnou přípravou PCR mixu byl nejprve PCR box (UV4 PCR, Scie-Plas, Velká Británie) na 20 minut vysvícen UV světlem. Pro snížení možné kontaminace byl pro míchání PCR používán plastový materiál certifikovaný pro PCR, tj. špičky s filtry a zkumavky typu Eppendorf (Gilson, Wisconsin). Poté byl připraven „master mix“ (Tabulka 4) z komponent pro PCR. Do 200 μ l tenkostěnných mikrozukumavek byl rozpipetován „master mix“. DNA byla uchována na ledu. Do každé mikrozukumavky byl napipetován příslušný objem templátové DNA – pro vzorky z ploch CO 1 μ l a pro ostatní vzorky 2 μ l. Byla používána vždy negativní kontrola bez templátové DNA. Reakční směs byla krátce stočena a umístěna do termocycleru (TGradient Thermo Cycler, Biometra, Německo), na kterém byl nastaven příslušný teplotní cyklus.

Po skončení reakce byl PCR produkt detekován pomocí gelové elektroforézy.

Cílový gen	Primery	Sekvence 5' – 3'	Délka produktu	Reference
<i>pmoA</i>	A189f(I) ^{1,2}	GGI ¹ GAC TGG GAC TTC TGG	510 bp	AIT-BENICHOU A KOL. (2009)
	mb661R_nd ³	CCG GCG CAA CGT CCT TAC C		LIN A KOL. (2005)
<p><i>ampifikační podmínky:</i> 94 °C/5min; 15x 94 °C/30s, 62-55 °C⁴/30s, 72 °C/45s; 20x 94 °C/30s, 55 °C/30s, 72 °C/45s; 72 °C/5min</p> <p><i>master mix:</i> 1x DreamTaqPuf⁵, 1,5mM MgCl₂⁵, 0,2mM dNTP's, 50µg BSA⁵, 2,5 ml DMSO, 0,5 µM primery, 1U Dream Taq polymeráza⁵, výsledný objem 50 µl</p>				
<i>pmoA/ amoA</i>	A189f (I) ¹	GGI ¹ GAC TGG GAC TTC TGG	525 bp	AIT-BENICHOU A KOL. (2009)
	A682r	GAA S ⁶ GC NGA GAA GAA SGC		HOLMES A KOL. (1995)
<p><i>ampifikační podmínky:</i> 94 °C/5min; 20x 94 °C/30s, 64-54 °C⁴/30s, 72 °C/31s; 10x 94 °C/30s, 54 °C/30s, 72 °C/31s; 72 °C/5min</p> <p><i>master mix:</i> 1x DreamTaqPuf⁵, 1,5mM MgCl₂⁵, 0,2mM dNTP's, 5µg BSA⁵, 1,25ml DMSO, 0,5 µM primery, 1,25 U Dream Taq polymeráza⁵, výsledný objem 25 µl</p>				
<i>pmoA</i>	f325-GC ⁷	TGG GGY ⁸ TGG ACC TAY TTC C	358 bp	FJELLBIRKELAND A KOL. (2001)
	r643	CCG GCR ⁹ CRA CGT CCT TAC C		FJELLBIRKELAND A KOL. (2001)
<p><i>ampifikační podmínky:</i> 94 °C/5min; 30x 95 °C/30s, 55 °C/30s, 72 °C/30s; 72 °C/5min</p> <p><i>master mix:</i> 1x DreamTaqPuf⁵, 1,5mM MgCl₂⁵, 0,2mM dNTP's, 20µg BSA⁵, 0,5 µM primery, 2,5 U Dream Taq polymeráza⁵, výsledný objem 50 µl</p>				

Tabulka 4: ¹ inosin; ² GC-svorka pro DGGE 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3' (AIT-BENICHOU A KOL., 2009); ³ nedegenerovaný primer; ⁴ touch down – v každém cyklu byla teplota snížena o 0,5 °C; ⁵ Fermentas; ⁶ G nebo C; ⁷ GC-svorka 5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC g-3'; ⁸ C nebo T; ⁹ A nebo G

V literatuře je uvedeno více sad primerů použitých pro amplifikaci genu *pmoA* (HORZ A KOL., 2005; BOURNE A KOL., 2001). HORZ A KOL. (2005) zjistili pomocí sekvenace klonových knihoven, že při použití PCR s primery A189f/A682r dochází také k amplifikaci genu *amoA* a při použití primerů A189f/mb661R dochází k amplifikaci nespecifických produktů. Tyto nežádoucí produkty se jim podařilo odstranit pomocí nested PCR. Použila jsem kombinaci postupů podle FJELLBIRKELAND A KOL. (2001) a AIT-BENICHOU A KOL. (2009). Při použití primerů A189(I)/ mb661R_nd se nedařila amplifikace a proto byl zvolen přístup pomocí nested PCR za použití kombinace primerů A189f(I)/A682r, které amplifikují také gen *amoA* a následně byla použita PCR se dvěma sadami výše uvedených primerů - A189(I)GC/mb661R_nd a f325GC/r643. Tyto sady primerů již amplifikují pouze *pmoA*. Nested PCR poskytly kvalitní produkty a vzorky bylo možné analyzovat pomocí DGGE.

3.4.5 DENATURAČNÍ GRADIENTOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (DGGE)

• PŘÍPRAVA DENATURAČNÍCH POLYAKRYLAMIDOVÝCH GELŮ

Byla sestavena aparatura a kazeta ze skla a mezerníku dle návodu výrobce. Podle Tabulky 11 byly namíchaný zásobní roztoky denaturantů a poté byly tyto smíchány podle zvoleného gradientu (např. 35 % pro roztok s nízkou koncentrací denaturantů a 60% pro roztok s vysokou koncentrací denaturantů). V digestoři se k roztokům přidalo 12 μ l TEMEDu (*N,N,N',N'*-tetrametyl-etan-1,2-diamine, Serva). Obsah zkumavky se promíchal otočením dnem vzhůru. Poté se přidalo 70 μ l 20 % APS (amonium persulfát; uchovávan při -20 °C). Nyní začne gel polymerovat a je nezbytné pracovat rychle. Do vnějšího válce zařízení pro vytvoření gradientu se nalije roztok s nízkým obsahem denaturantů, otevře se kohout a nechá

se odtéci pouze tolik roztoku, aby byl vytlačen vzduch ze spojovacího prostoru válců, poté se kohout uzavře. Poté se získaný roztok pomocí pipety přenesse zpět do druhého válce. Nyní se nalije roztok s vysokým obsahem denaturantů do vnitřního válce, postupně se zapne magnetické míchadlo tak, aby nevznikal vír, zapne se peristaltická pumpa a otevře se kohout mezi válci. Gel byl nalit rychlostí 5ml/minutu. Po nalití se gel převrství 2 ml destilované vody. Gel se nechá polymerovat 120 minut. Po ztuhnutí se voda odsaje pomocí filtračního papíru a na gel se pipetou nanese nanášecí gel, ve kterém se vytvoří pomocí hřebínku jamky. Ten se nechá polymerovat 20 minut. Kazeta s gelem se vloží do elektroforetické vany naplněné 1× TAE pufrém, který byl přehřátý na 60 °C. Nyní je gel připraven k nanesení vzorků. Napětí na přístroji bylo vždy nastaveno na 100 V po dobu 16 hodin.

• **BARVENÍ A DOKUMENTACE POLYAKRYLAMIDOVÝCH GELŮ**

Gel byl barven pomocí interkalačního barviva SYBR[®] Green I (Lonza, USA) po dobu jedné hodiny (15 ml 1× TAE pufru + 2 μl SYBRGreen). Snímek byl zdokumentován pomocí Photo-Doc systému (Vilber Lourmat, Francie) a obrázek upraven v elektronické podobě a uložen ve formátu TIFF (Picture Manager, Microsoft Office). Následně byla provedena analýza fingerprintu DNA pomocí softwaru GelCompar II (Applied Math, Belgie). Analýza byla provedena pomocí Pearsonovy korelace, která rozlišuje intenzitu produktů. Čím silnější je proužek, tím početnější je daný segment, potažmo druh a je tedy možné takto analyzovat společenstvo kvalitativně i semi-kvantitativně. Dále bylo společenstvo analyzováno pomocí Jaccardovy korelace, která seskupuje vzorky na pouhé přítomnosti/nepřítomnosti produktů. Korelace byly použity spolu s klastrovacími metodami UPGMA a Ward. Vzorky DGGE fingerprintů byly postupně analyzovány těmito různými metodami a výsledky byly porovnány.

• **OPTIMALIZAČNÍ PROCES PRO METODU DGGE**

• **Experiment 1**

Byla použita metoda nested PCR s primery A189f(I)/A682r a A189f(I)-GC/mb661R_nd. Po každé PCR byly zkontrolovány produkty a bylo testováno několik koncentrací templátové DNA pro každý vzorek. DNA byla ředěna do první PCR v rozmezí 1/2-1/64 a do druhé PCR v poměru 1/10, 1/50 (v případě půdy CO nebyla DNA z první PCR ředěna). Fragmenty byly separovány na 6,5 %-tním akrylamidovém gelu. Denaturační gradient byl zvolen v rozpětí od 35 % do 80 % obsahu denurantů. Bylo naneseno 10 μ l vzorku pro půdy BI, SI a SR a 5 μ l vkladacího pufru, pro půdu CO 20 μ l vzorku 5 μ l vkladacího pufru. **Závěr:** Gradient denaturačních činidel byl široký a jednotlivé proužky nebyly dobře separované.

• **Experiment 2**

Byla použita metoda nested PCR s primery A189f(I)/A682r. Získané produkty byly poté použity pro dvě odlišné PCR: a) A189f(I)-GC/mb661R_nd, b) f325GC/r643. Fragmenty byly separovány na 6,5 %-tním akrylamidovém gelu. Denaturační gradient byl zvolen v rozpětí od 40 % do 65 % a na gely bylo naneseno 5 μ l vzorku (vzorky BI a CO) a 3 μ l vkladacího pufru.

Závěr: Více proužků a jejich lepší separace bylo důvodem pro použití sady primerů b) f325GC/r643 pro další práci.

• **Experiment 3**

Byla použita metoda nested PCR s primery A189f(I)/A682r a f325GC/r643. Fragmenty byly separovány na 8 %-tním akrylamidovém gelu. Denaturační gradient byl zvolen od 45 % do 75 %. Z tohoto polyakrylamidového gelu bylo vyříznuto 7 proužků (ze vzorků CO a SI). Proužky gelu byly přeneseny do mikrozkušavek, propláchnuty 50 μ l

sterilní MilliQ vody. Poté jsem přidala 20 µl sterilní MilliQ vody, vložila na 30 minut do -20 °C, poté rozdrtila výřezy gelu a vložila do -4 °C přes noc. DNA se takto eluovala do vody. Pro amplifikaci jsem vždy použila 2 µl vzorku DNA. Pět z nich bylo po amplifikaci pomocí primerů f325GC/r643 použito jako markery v Experimentu 4.

- **Experiment 4**

Byla použita metoda nested PCR s primery A189f(I)/A682r a f325GC/r643. Produkty PCR byly před nanesením na gel přečištěny za použití komerčního kitu (GenElute™ PCR DNA Purification Kit, Sigma-Aldrich, USA). Následně byla změřena koncentrace PCR produktů za použití přístroje Nanodrop 2000. Fragmenty byly separovány na 8 %-tním akrylamidovém gelu, byl použit 1× TAE a denaturační gradient od 45 % do 75 %. Na gel bylo následně naneseno vždy 150 ng DNA. Výsledky experimentu jsou uvedeny v kapitole 4.1.

3.4.6 ANALÝZA DÉLKOVÉHO POLYMORFISMU INTERGENOVÉ OBLASTI V OPERONU PRO MONOOXYGENAZU (MISA - MONOOXYGENASE INTERGENIC SPACER ANALYSIS)

MOB mají v genetickém kódu pro metan monooxygenázu klastr genů *pmoC*, *pmoA* a *pmoB* (TAVORMINA A KOL., 2011). Mezi geny jsou nekódující oblasti, tzv. spacery - nekódující sekvence, které vykazují délkový polymorfismus. Jejich délka je rozdílná pro *Gammaproteobacteria* a *Alphaproteobacteria* a jednotlivé kultivovatelné druhy se liší v délce intergenové oblasti (TAVORMINA A KOL., 2010). V práci TAVORMINA A KOL. (2010) byly nejdříve určeny sekvence *pmoC* a *pmoA* a poté byly navrženy primery na amplifikaci intergenové oblasti. Byly použity primery spacer_pmoC606f a spacer_pmoA189r a v navazující PCR reakci byly použity primery spacer_pmoC626f a spacer_pmoA189r. Tento

postup byl modifikován s využitím primeru spacer_pmoA191r v první PCR v souladu s osobním doporučením autorky (TAVORMINA, osobní sdělení), za účelem snížit množství amplifikovaných sekvencí pocházejících z nitrifikačních bakterií. Primer spacer_pmoA191r amplifikuje pouze MOB, kdežto primer spacer_pmoA189r může úspěšně nasedat i na sekvenci genu *amoA* nitrifikačních bakterií.

Nejdříve bylo optimalizováno množství templátu DNA pro první PCR. Bylo vyzkoušeno množství 50 ng, 25 ng a 10 ng původní templátové DNA z půd SI, SR, BI a CO odebraných na jaře roku 2009. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při množství 10 ng templátové DNA. Tato koncentrace templátové DNA byla použita pro další postup. Poté byl namíchán „master mix“ pro první PCR reakci (Tabulka 5). Produkty z této reakce byly naředěny tak, že 10 μ l produktu bylo přidáno k 40 μ l sterilní MilliQ vody (MilliQ voda sterilizovaná v autoklávu (Tuttnauer 5075 ELCV, Holandsko) při 120 °C, po dobu 20 minut). Naředěné produkty byly použity jako templát pro druhou reakci PCR (podmínky amplifikace i složení „master mixu“ jsou uvedeny v Tabulce 5. Produkty získané z druhé PCR byly analyzovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (3 % agarózový gel, TopVision, Fermentas). Bylo nastaveno napětí 100 V a elektroforéza probíhala 90 minut. Jako marker molekulových vah byl použit 100 bp vnašecí pufr (Fermentas, Litva). Gel byl následně barven v roztoku ethidium bromidu po dobu 20 minut.

Metoda bude dále aplikována pracovníky ÚPB pro výzkum MOB společenstva a amplifikované cílové intergenové oblasti budou analyzovány pomocí kapilární elektroforézy pro zjištění přesné délky sekvencí a určení druhového složení společenstva.

	Primery	Sekvence 5' – 3'	Reference
MISA I	spacer_pmoC606f	GGG GYC AYR CBT TCT GGT	TAVORMINA A KOL. (2010)
	spacer_pmoA191r	CCA RAA RTC CCA RTC NC	TAVORMINA, ÚSTNÍ SDĚLENÍ
<i>amplifikační podmínky: 94 °C/3min, 20 x 95 °C/30s, 52 °C/45s, 72 °C/30s, 72 °C/5min</i>			
<i>master mix: 1x DreamTaqPuf¹, 2,5mM MgCl₂¹, 0,04mM dNTP's, 0,5 μM spacers, 4 μl Q-solution, 0,5 U Dream Taq polymeráza¹, výsledný objem 20 μl</i>			
MISA II	spacer_pmoC626f*	RCB TTC TGG TKB ATG GAA GA	TAVORMINA A KOL. (2010)
	spacer_pmoA191r	CCA RAA RTC CCA RTC NC	TAVORMINA, ÚSTNÍ SDĚLENÍ
<i>amplifikační podmínky: 94 °C/3min, 5 x 95 °C/1min, 52 °C/1min, 72 °C/1min; 20 x 95 °C/1min, 48 °C/1min, 72 °C/1min, 72 °C/5min</i>			
<i>master mix: 1x DreamTaqPuf¹, 2,5mM MgCl₂¹, 0,04mM dNTP's, 0,5 μM spacers, 4 μl Q-solution, 0,5 U Dream Taq polymeráza¹, výsledný objem 20 μl</i>			

Tabulka 5: Primery, amplifikační podmínky a master mixy použité pro metodu MISA. ¹ Fermentas (Litva)

3.4.7 STANOVENÍ RELATIVNÍ ČETNOSTI AEROBNÍCH METANOTROFNÍCH BAKTERIÍ POMOCÍ METODY CARD-FISH

Postup použitý v této studii vycházel z protokolů, které byly popsány PERNTHALEREM A KOL. (2002) pro mořské bakterie, EICKHORSTEM & TIPPKÖTTEREM (2008) pro půdní bakterie a podle KALLISTOVÉ A KOL. (2007) a DEDYSH A KOL. (2003) pro MOB v půdě.

Před zpracováním byly vzorky půd vytemperovány na laboratorní teplotu. Navážka 5 g půdy byla rozmíchána v 45 ml sterilního roztoku 0,1 % hexametfosforečnanu sodného. Vzorek byl sonifikován 4 minuty v ultrazvukové lázni. 1 ml suspenze byl zředěn 9 ml sterilní MilliQ vody až do ředění 10^{-4} . Do filtrační aparatury s vloženým sterilním polykarbonátovým filtrem (velikost pórů 0,2 μm , průměr filtru 47 mm, GE Water & Process Technologies, USA) byly přidány 4 ml suspenze a 200 μl formaldehydu, po 10 minutách byl obsah přefiltrován. Filtr byl opláchnut 2 ml $1\times$ PBS (fosfátem pufovaný fyziologický roztok). Usušený filtr byl uchováván při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další použití.

Fixace buněk v agaróze: Polykarbonátový filtr s přefiltrovaným vzorkem byl ponořen do připraveného roztoku 0,2 % agarózy (Invitrogen Life Technologies, USA) a usušen buňkami nahoru v hybridizační peci ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min). Filtr byl dehydratován v 96 % etanolu (1min, T_{lab}).

Permeabilizace: Buněčné stěny byly permeabilizovány roztokem lysozymu v hybridizační peci při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 60 minut. Poté byl filtr omyt v MilliQ vodě (1min, T_{lab}), vložen do roztoku achromopeptidázy a inkubován v hybridizační peci při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut. Filtr byl poté omyt v MilliQ vodě (1min, T_{lab}), inkubován při T_{lab} 10 minut v 0,01 M HCl, opět omyt v MilliQ vodě (1min, T_{lab}) a nakonec byl dehydratován v 96 % etanolu (1min, T_{lab}).

Hybridizace: K hybridizaci byly použity oligonukleotidové próby značené na 5' konci enzymem křenovou peroxidázou (ThermoFisher Scientific, Německo) pro amplifikaci fluorescenčního signálu. Pro detekci MOB typu I (ekvimolární směs prób M γ 84 a M γ 705; Tabulka 6) byl použit formamid o koncentraci 20 % (v/v) a pro próbu M α 450 (MOB typ II) byl použit formamid o koncentraci 30 % (v/v) v hybridizačním roztoku. Filtr byl nařezán na výseče (8 výsečí na jeden filtr), které byly vloženy do reakční zkušavky se 400 μl

hybridizačního pufru a 4 µl próby (50 ng/µl). Zkumavka s výsečemi byla vložena do hybridizační pece (120 min, 35 °C). Po uplynutí inkubace byly výseče vloženy do pracovního pufru a inkubovány (10 min, 37 °C). Poté byl pracovní pufr odfiltrován přes Goochův kelímek a výseče byly promývány 1× PBS (15min, T_{lab}).

Próba	Sekvence 5'-3'	Cílové místo 16S rRNA¹	Cílová skupina
<i>Mγ84</i>	CCACTCGTCAGCGCCCGA	84-103	MOB typu I
<i>Mγ705</i>	CTGGTGTTTCCTTCAGATC	705-724	MOB typu I
<i>Mα450</i>	ATCCAGGTACCGTCATTATC	450-470	MOB typu II

Tabulka 6: Sekvence použitých prób a jejich cílové místo dle KALLISTOVÁ A KOL. (2007).

Amplifikace fluorescenčního signálu: Do reakční zkumavky bylo přidáno 400 µl amplifikačního roztoku a do něj byly ponořeny výseče. Zkumavka s výsečemi byla vložena do hybridizační pece a za pomalého otáčení byla inkubována ve tmě (10 minut, 37 °C). Poté byly výseče promývány v 1× PBS (15 minut, T_{lab}), v Milli-Q vodě (1 min, T_{lab}) a v 96 % etanolu (1min, T_{lab}). Během těchto kroků bylo zabráněno přímému dopadu slunečního světla na výseče.

Barvení prokaryotních buněk v DAPI: V připravené směsi oleje s DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol, finální koncentrace 5 µg / ml) byly namáčeny jednotlivé výseče. Z obarvených výsečí byly zhotoveny preparáty, které bylo možno ihned pozorovat pod mikroskopem nebo uskladnit při -20 °C k pozdějšímu vyhodnocení.

¹ Pozice u *E.coli*

Vyhodnocení: K detekci buněk byl použit epifluorescenční mikroskop Olympus BX 60. Buňky byly počítány na 100 náhodně vybraných polích filtru (minimálně však bylo sečteno 500 buněk obarvených v DAPI). Pro vzorky z jara 2009 bylo provedeno 1 sčítání, pro vzorky z podzimu 2009 byla provedena 2 sčítání kvůli zjištění rozdílů při počítání. Sčítání bylo provedeno na stejných výsečích, nikoliv každé sčítání na jiné výseči. Relativní zastoupení MOB typu I a typu II bylo určeno jako poměr hybridizovaných buněk k počtu všech prokaryotních buněk obarvených DAPI. Pomocí přepočtu byly také vypočítány absolutní hodnoty početnosti hybridizovaných buněk ve vlhké půdě, popř. v sušině:
[[1/(obsah půdy ve výseči/(plocha výseče/celková plocha polí)) x počet buněk v polích] x (sušina/100).

3.4.8 STANOVENÍ ABUNDANCE SPOLEČENSTVA MOB POMOCÍ METODY REAL TIME PCR

Metoda je založena na principu klasické PCR s tím rozdílem, že termocykler umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky *dsDNA* během každého cyklu, kdežto u klasické PCR se detekuje až konečný produkt. Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou *dsDNA* a úroveň detekované fluorescence pak odpovídá množství templátové DNA.

Real time PCR byla použita pro kvantifikaci genu *pmoA* u MOB typu I (KOLB A KOL., 2003). Jelikož MOB jsou obtížně kultivovatelné bakterie a nebylo možné získat chromozomální DNA pro účely standardu amplifikace a kvantifikace, museli jsme použít následovný postup: standard byl vytvořen klonováním genu *pmoA* amplifikovaného z půdní DNA a vloženého do vektoru vhodného k transformaci buněk *Escherichia coli* a následně k selekci pozitivních transformantů. Podrobný postup je popsán dále.

- **PŘÍPRAVA STANDARDU PRO REAL TIME PCR**

- **Ligace**

Do linearizovaného plazmidu pCR[®]2.1 (TA Cloning kit, Invitrogen, USA) byl vnesen fragment genu amplifikovaného pomocí primerů A189f(I)-mb661R_nd pomocí ligace T4 DNA ligázou s využitím T/A přesahů na 3' konci (produkt PCR má A přesahy a vektor má T přesahy). Ligační reakce proběhla při 14 °C přes noc v termocykleru. Složení ligační směsi: 6 µl PCR produktu; 1 µl 10× ligační pufr (Biolabs, USA); 3 µl pCR[®] 2.1 vektoru; 1 µl T4 DNA ligáza (BioTech, ČR).

- **Transformace**

Vektor byl vnesen do buněk *E. coli* (TOP 10 *E. coli*, Invitrogen, USA). Buňky byly uchovávány při – 80 °C a rozmrazovány vždy na ledu, aby nedošlo k jejich poškození. K 25 µl buněk *E. coli* bylo přidáno 1,5 µl ligační směsi. Transformace proběhla tzv. „heat-shockem“ (při teplotě 42 °C po dobu 30s). Rekonvalescence buněk proběhla ve 250 µl SOC média při teplotě 37 °C a třepání o rychlosti 180 rpm po dobu jedné hodiny. Poté byly kultury vysety na Petriho misky s LB agarem (viz Přílohy), který byl doplněn o 40 µl kanamycinu (50 mg/ml) a 40 µl X-Gal¹ (40 mg/ml) (Promega, USA) a 40 µl IPTG² (23,83 mg/ml) (Schine Gene, China). Selektce pozitivních transformantů proběhla po inkubaci na základě modro-bílého zabarvení (bílé kolonie obsahují inzert, modré kolonie jsou plazmidy bez inzertu). Bílé kolonie byly přeneseny do 5 ml tekutého selektivního LB média (viz Přílohy) s přídatkem 40 µl (50 mg/ml) kanamycinu. Kultury se přes noc inkubovaly v selektivním kultivačním médiu při 37 °C a rychlosti třepání 225 rpm.

¹5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranosid, ² isopropyl-β-D-thio-galactosid

Z bílých kolonií byly izolovány plazmidy a přítomnost inzertu byla ověřena pomocí vyštěpení fragmentu z plazmidu enzymem *EcoRI* (Fermentas, Litva) a pomocí zjištění sekvence nukleotidů v plazmidu sekvenováním a jejich porovnáním s nejbližší příbuznými sekvencemi v databázi Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

- **Příprava glycerolových konzerv a izolace plazmidové DNA**

Bylo odebráno 700 µl tekuté kultury inkubované přes noc a přidáno 300 µl glycerolu; tyto glycerolové konzervy byly uloženy při -80 °C. Pro izolaci plazmidové DNA byly odebrány 3 ml kultury do plastové Falkonovy zkumavky. Dále bylo postupováno podle návodu výrobce komerčního kitu NucleoSpin[®]Plasmid (Macherey-Nagel, Německo). Principem je uvolnění plazmidové DNA z buňky, vysrážení lyzátu, navázání DNA na silikátovou kolonku a propláchnutí vzorku pufrům, který odstraní soli, metabolity a rozpustné buněčné makromolekuly. Posledním krokem je eluce DNA díky pufru s nízkou iontovou silou (5 mM Tris-HCl, pH 8,5).

- **Štěpení plazmidové DNA**

Byl namíchán „master mix“ (Tabulka 7) v pořadí MilliQ voda, pufr, enzym. Mikrozkušavky s touto směsí byly vloženy do ledu a byla rozpipetována plazmidová DNA. Směs byla krátce promíchána (vortex), stočena a byla inkubována při 37 °C po dobu 3 hodin.

Komponenta	Objem (μl)
plazmidová DNA	5 μl
10 x pufr Tango Yellow	4 μl
enzym EcoRI ¹	1 μl
MilliQ voda	10 μl

Tabulka 7:¹ rozpoznávací místo 5'-3': G↓AATTC, 3'-5': CTAA↑G

- **Příprava standardní křivky pro absolutní kvantifikaci pomocí real time PCR**

Nejdříve byla změřena koncentrace DNA v plazmidu (standardu) a vypočten počet kopií genu na 1 μl podle následujícího vztahu:

$$\frac{\text{koncentrace plazmidové DNA [g/μl]} * 6,022 * 10^{23}}{\text{délka molekuly plazmidu [bp]} * \text{molární hmotnost 1 bp [g/mol]}}$$

Výpočtem bylo zjištěno, že 1 μl plazmidové DNA obsahuje $8,35 * 10^9$ kopií genu *pmoA*. Z tohoto roztoku bylo vytvořeno 10ti-násobné sériové ředění až do koncentrace 8,35 kopií genu *pmoA*/μl.

Amplifikační reakce pro PCR obsahovala 10 μl qMixu (FastStart Universal SYBR Green Master, Roche, Německo); 1,4 μl 10 μM primeru A189f(I) (5'-GGN GAC TGG GAC TTC TGG-3'; HOLMES A KOL., 1995) a mb601R_nd (5'-ACR TAG TGG TAA CCT TGY AA-3'; KOLB A KOL., 2003) doplněno PCR vodou do 18 μl. Nakonec bylo přidáno 2 μl templátové DNA. Podmínky reakce byly následující: 95 °C/5 min, 15 x 95 °C/25s, touchdown 63,5-56,5 °C/20s, 72 °C/45s, 20 x 95 °C/25s, 55 °C/20s, 72 °C/45s, křivka tání: 95-60-90 °C.

• **KVANTIFIKACE DNA METODOU REAL TIME PCR**

Kvantifikace byla provedena ve vzorcích půd ze stanovišť CO1-3 a SI1-3. Nejprve bylo vyzkoušeno ředění ke stanovení inhibice real time PCR. Byla připravena ředění DNA 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 a 1:256. Pro vzorky CO bylo zvoleno ředění 1:16 a pro půdu SI ředění 1:64. V těchto ředěních nedocházelo k inhibici reakce. Podobný výsledek zaznamenali také TÖWE A KOL., (2010), kteří se zbavili inhibičních příměsí z kitu v ředění. Také byly testovány vzorky DNA získané dvěma různými způsoby izolace. Žádaných produktů bylo dosaženo se vzorky DNA izolovanými kitem FastDNA Spin Kit for Soil (Q-Biogene). Tyto vzorky byly dále použity pro kvantifikaci DNA ve vzorcích půd CO a SI z jara a podzimu roku 2010. Každý vzorek byl analyzován ve dvou opakováních, stejně tak i standardy. Byly použity 2 negativní kontroly. Součástí každé reakce byla analýza křivky tání, která sloužila pro kontrolu kvality vznikajících produktů. Délka a kvalita amplifikačních produktů byla následně ověřena pomocí gelové elektroforézy.

Počet kopií genu *pmoA*, který byl získán pro každý vzorek byl přepočítán na gram suché půdy, byly vypočítány průměry a směrodatné odchylky. Dále bylo odhadnuto, kolik buněk MOB se vyskytuje na gram suché půdy, a to za předpokladu, že na genom jedné MOB připadají 2 kopie genu *pmoA* (LIEBERMAN & ROSENZWEIG, 2005)

3.4.9 STATISTICKÁ ANALÝZA

Výsledky byly analyzovány v programu Statistika CZ, verze 9. Všechna data byla analyzována pomocí obecných lineárních modelů s použitím meziskupinové hierarchie (ANOVA) a plně faktoriálních vztahů. Statistická průkaznost pak byla zjišťována pomocí Tukeyho post-hoc testu.

4. VÝSLEDKY

4.1 ANALÝZA ROZDÍLŮ DIVERSITY METANOTROFNÍCH SPOLEČENSTEV

METODOU DGGE

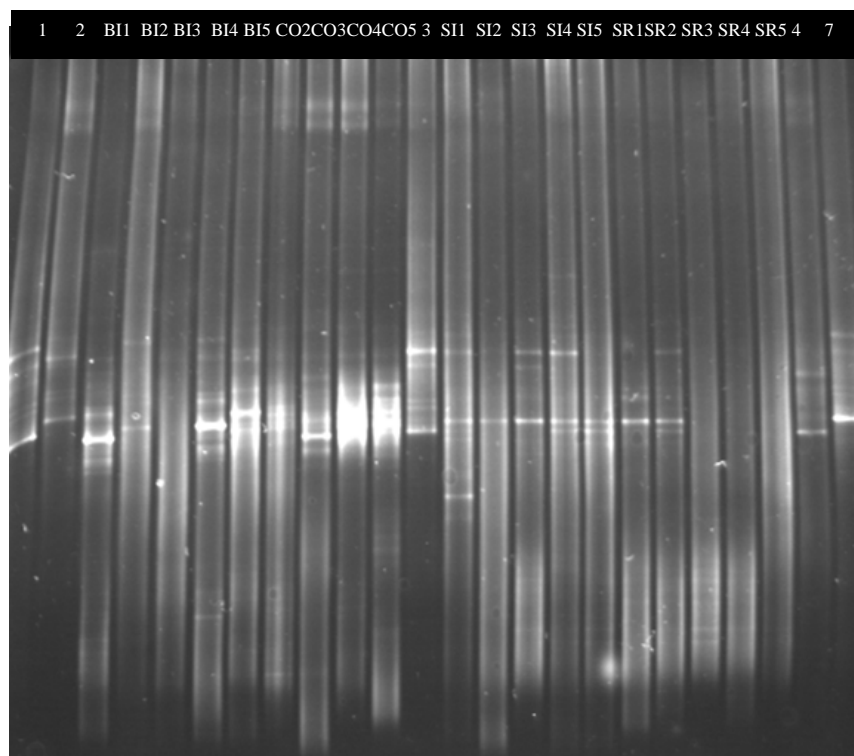
Metodou DGGE byla analyzována společenstva MOB pouze z jarních odběrů z roku 2009. Bylo úspěšně analyzováno 16 vzorků DNA, izolované dle protokolu GRIFFITHS A KOL. (2000). U vzorků SR 3-5 nebyly na polyakrylamidovém gelu znatelné žádné produkty a vzorek CO1 se nezdařilo amplifikovat pomocí nested PCR a nebyl nanesen na polyakrylamidový gel.

Koncentrace všech vzorků jsou uvedeny v Tabulce 8. Koncentrace DNA se pohybovala v rozmezí od 11,2 ng/μl do 47,9 ng/μl.

Vzorek	Koncentrace	
	DNA [ng/μl]	μg DNA/ g suché půdy
BI1	47,9	3,72
BI2	45,8	3,56
BI3	23,0	1,79
BI4	31,6	2,45
BI5	19,5	1,51
CO2	25,2	2,23
CO3	36,4	3,22
CO4	23,7	2,10
CO5	15,3	1,35
SI1	43,8	3,28
SI2	32,5	2,43
SI3	17,8	1,33
SI4	40,5	3,03
SI5	39,2	2,93
SR1	11,2	0,92
SR2	13,7	1,13
SR3	16,5	1,36
SR4	16,2	1,33
SR5	39,5	3,25

Tabulka 8: Koncentrace DNA po druhé PCR a po přečištění komerčním kitem Sigma-Aldrich®, USA.

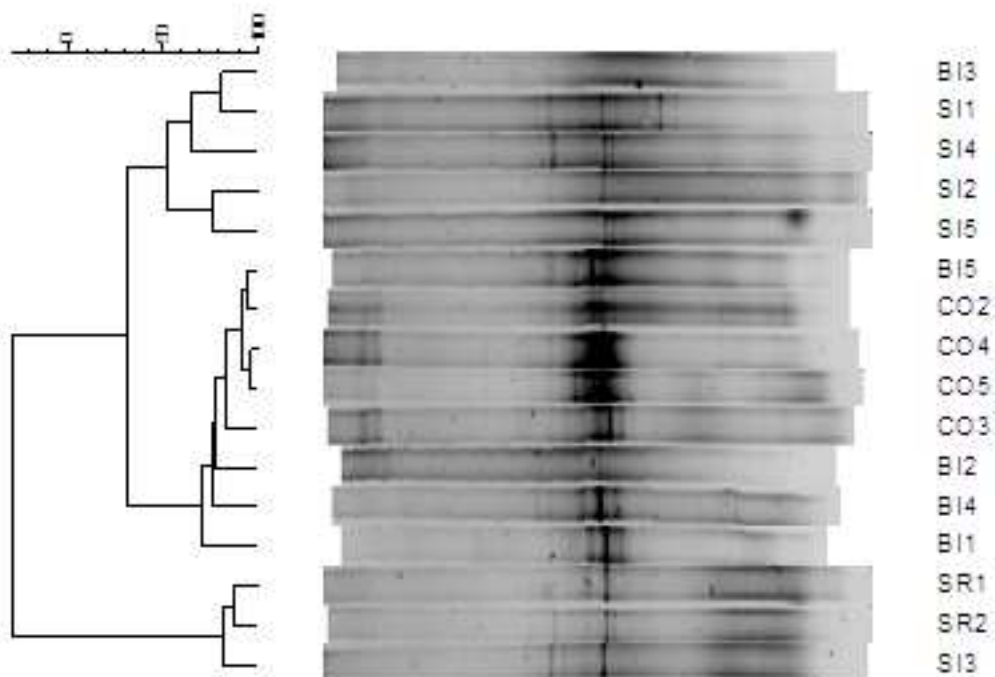
Hodnoty pro množství DNA na gram suché půdy se pohybovaly od 0,92 do 3,72 μg . Jako vnější standardy byly do analýzy zahrnuty standardy číslo 2 a 4 (Obrázek 3). Sloužily ke kalibraci gelu před analýzou.



Obrázek 3: Fotografie výsledného polyakrylamidového gelu. Vzorky označené 1, 2, 3, 4 a 7 jsou standardy.

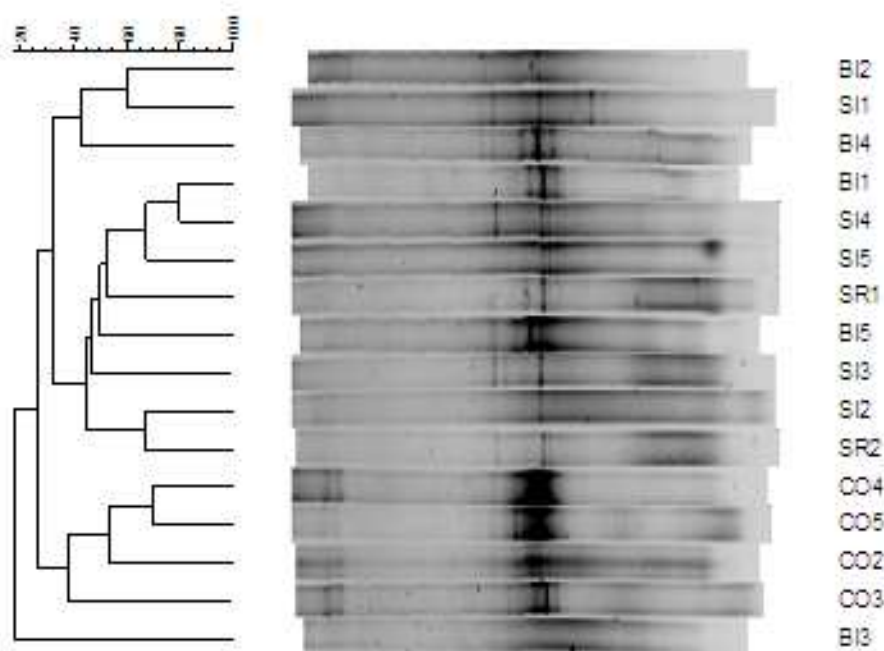
U vzorků CO2-5 a vzorku BI5 byly jednotlivé proužky špatně rozeznatelné (Obrázek 3). U vzorku BI3 byl znatelný pouze 1 proužek, a to velice slabě. U ostatních vzorků se podařilo získat relativně dobře oddělené proužky. Fotografie tohoto gelu byla použita pro analýzu získaného fingerprintu pomocí softwaru GelCompar II. Jednotlivé proužky byly pro účely analýzy označeny manuálně.

Výsledek první analýzy, založené na intenzitě proužků, je zobrazen na Obrázku 4. Vznikly 3 skupiny. Skupina vzorků SR1, SR2 a SI3. Druhá větev se dělí na 2 skupiny. Jednu tvoří vzorky SI1, SI2, SI4, SI5 a BI3. Druhou skupinu tvoří vzorky BI1, BI2, BI4, BI5 a CO2-5. Vzorky se shlukem proužků, které nelze rozeznat, vykazují vysokou podobnost.



Obrázek 4: Analýza na základě intenzity proužků (Pearsonova korelace) a pomocí klastrovací metody Ward. Podobnost v % je uvedena na ose.

Na Obrázku 5 jsou výsledky analýz založených na přítomnosti/nepřítomnosti proužků. Zde vznikly 4 větší skupiny. Samostatně stojí vzorek BI3. Další skupinu tvoří vzorky CO2-5. Na další větvi se nachází vzorky BI2, BI4 a SI1. Na poslední větvi se nachází zbylé vzorky (SI2-5, BI1, BI5, SR1 a SR2)

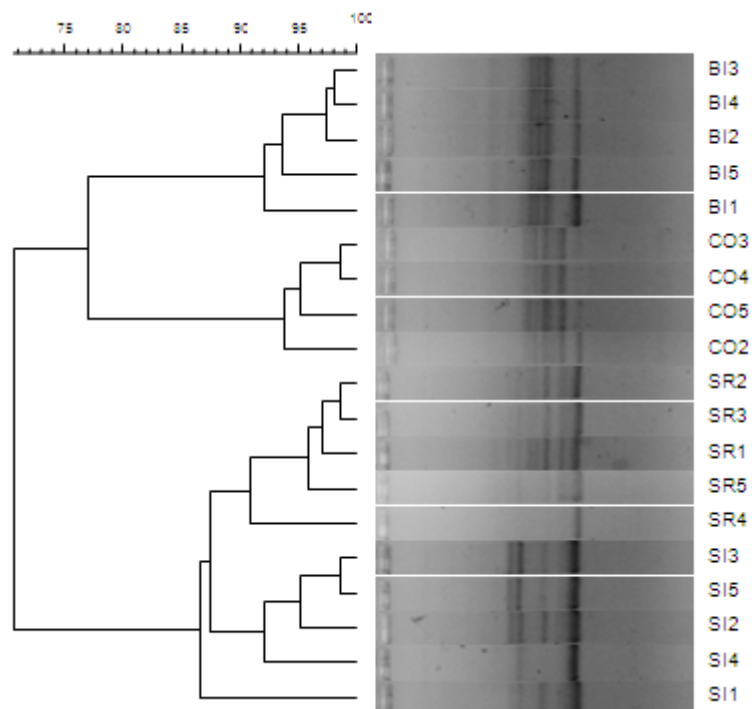


Obrázek 5: Analýza na základě přítomnosti/nepřítomnosti proužků (Jaccardova korelace) a pomocí klastrovací metody UPGMA. Podobnost v % je uvedena na ose (20-100 %)

4.2 HODNOCENÍ SPOLEČENSTVA MOB METODOU MISA

Prostřednictvím této metody bylo dosaženo vypovídajících výsledků pomocí separace fragmentů na horizontální agarózové elektroforéze (3 % gel). Získané fingerprinty společenstev MOB z jarního i podzimního odběru ze všech studovaných půd byly analyzovány pomocí fylogenetických metod. Byly porovnány fingerprinty společenstev MOB mezi jednotlivými půdami, reprezentujícími rozdílný vliv chovu skotu, ve stejné sezoně. Hodnocení mezi sezonami bylo provedeno a nebyl znatelný vliv sezony pro žádnou z ploch. Hodnocení bylo založeno na intenzitě a přítomnosti/nepřítomnosti produktů. Markery byly použity pouze pro kalibraci a v analýzách nebyly zahrnuty a nejsou ani zobrazeny na fotografiích. Opět se nezdařilo amplifikovat vzorek CO1 z jarního odběru z roku 2009.

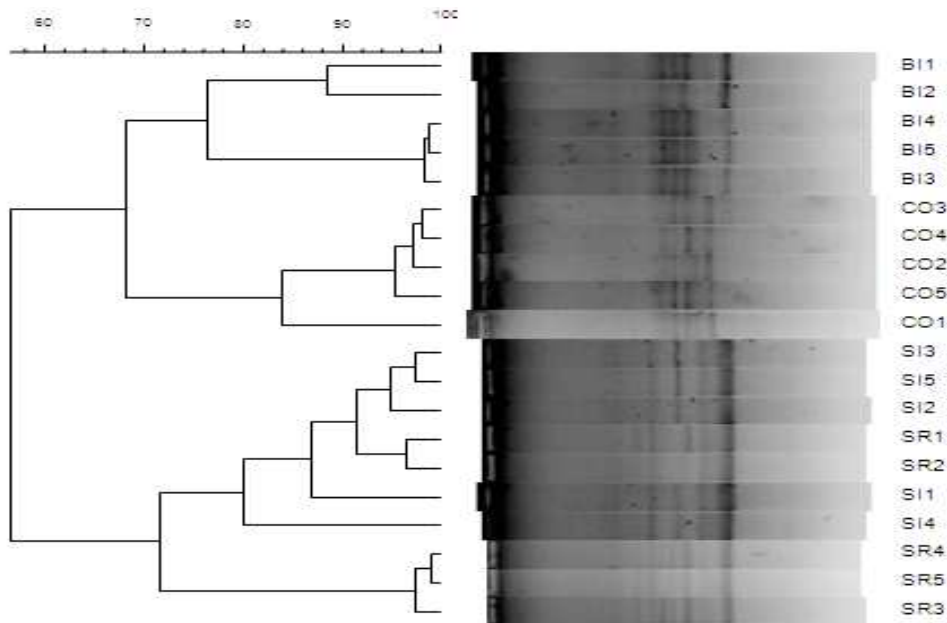
• **POROVNÁNÍ STRUKTURY SPOLEČENSTVA MOB NA JAŘE 2009**



Obrázek 6: Fylogenetická analýza na základě intenzity produktů (Pearsonova korelace) a pomocí klastrovací metody UPGMA.

Výsledky analýzy vzorků z jara 2009 provedené na základě intenzity produktů (Obrázek 6) naznačují podobnost vzorků BI a CO (77 %) a vzorků SI a SR (86 %). Vzniklo 5 skupin: vzorky BI1-5, vzorky CO2-5, vzorky SR1-5, vzorky SI2-5 a samostatně se vyčlenil vzorek SI1.

• **POROVNÁNÍ STRUKTURY SPOLEČENSTVA MOB NA PODZIM 2009**

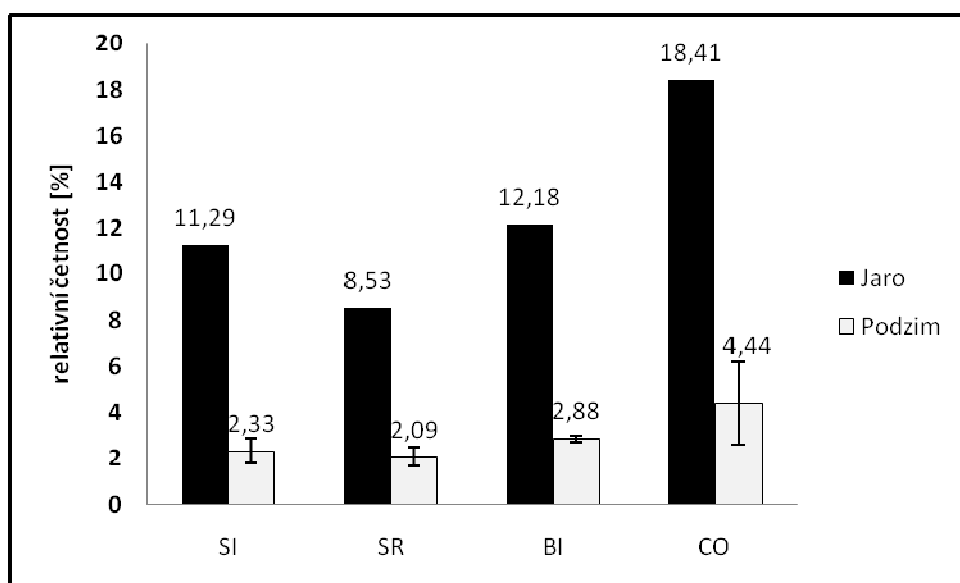


Obrázek 7: Analýza na základě intenzity produktů (Pearsonova a Cosine korelace) a pomocí klastrovací metody UPGMA.

Výsledky analýz vzorků z podzimu 2009 (Obrázek 7) ukazují podobné vztahy jako výsledky z jara 2009 (viz Obrázek 6). Vzorky BI a CO tvoří opět dvě větve, které se spojují (68%). Vzorky SR 3, SR 4 a SR 5 tvoří větev, ke které se připojují zbylé vzorky SR a SI (70%). Vzorky na podzim klastrují do více skupin nežli na jaře 2009., ale je dodržena podobnost v rámci ploch. Vzorky z ploch BI tvoří dvě skupiny – vzorky B11 a B12 a vzorky B13-5. Vzorky CO 2-5 a vzorek CO1 tvoří další větší větev. Další skupinou jsou vzorky SR3-5. Poslední větev tvoří vzorky SR1, SR2, SI2, SI3 a SI5, ke kterým se připojují vzorky SI1 a SI4.

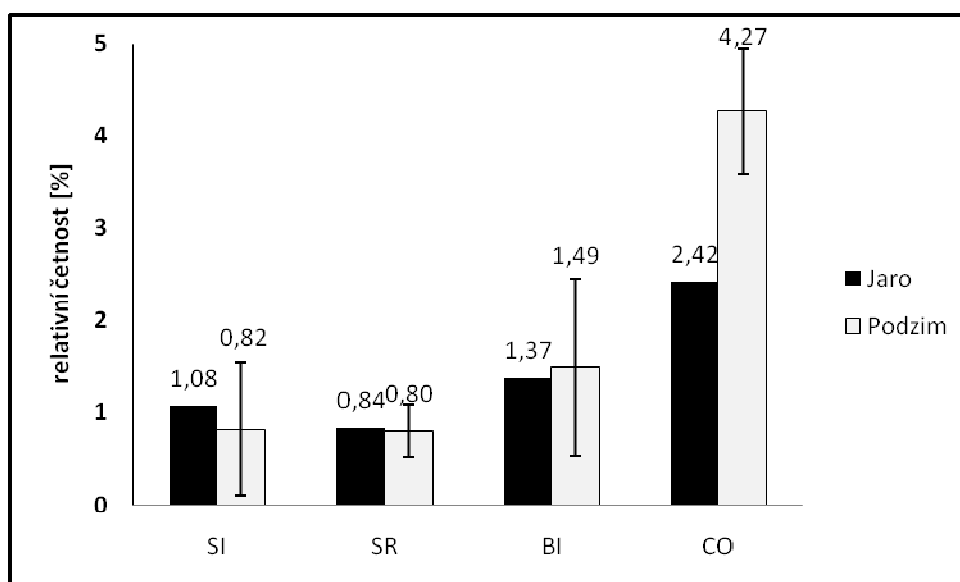
4.3 RELATIVNÍ ZASTOUPENÍ METANOTROFŮ TYPU I A TYPU II DETEKOVANÉ POMOCÍ METODY CARD FISH

Relativní četnosti metanotrofních bakterií typu II z celkového počtu prokaryotních buněk v půdách z jarního a podzimního odběru uvádí Graf 1. Ve vzorcích odebraných na jaře 2009 tvořily MOB typu II 11,29 % (SI), 8,53 % (SR), 12,18 % (BI) a 18,41 % (CO) buněk z celkového prokaryotního společenstva v půdě. Rozdíly mezi půdami v podzimní odběru jsou menší a také relativní zastoupení MOB z celkového počtu prokaryotních buněk v půdách je nižší než v půdách z jarního odběru. Ve vzorcích odebraných na podzim 2009 tvořily MOB typu II 2,33 % (SI), 2,09 % (SR), 2,88 % (BI) a 4,44 % (CO) buněk z celkového prokaryotního společenstva v půdě. Oproti jaru poklesly relativní četnosti MOB typu II na podzim o 79,36 % (SI), 75,49 % (SR), 76,35 % (BI) a o 75,88 % (CO).



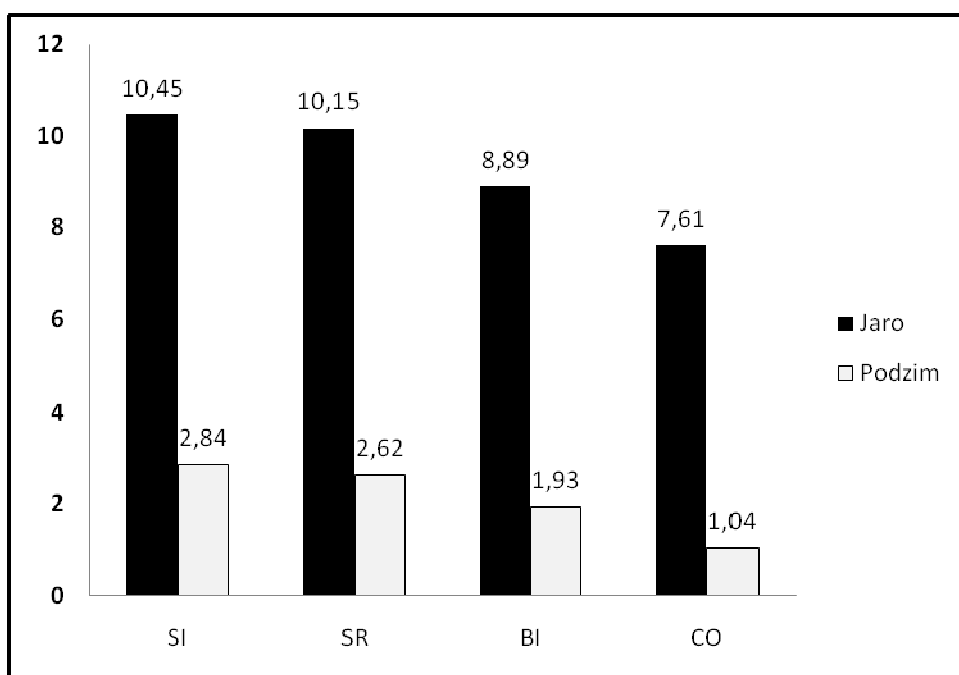
Graf 1: Relativní četnost MOB typu II v % z celkového počtu prokaryotních buněk ve studovaných půdách z jarního a podzimního odběru v roce 2009. U podzimních vzorků jsou vyznačeny směrodatné odchylky. Číselné údaje nad sloupci udávají hodnoty relativního zastoupení.

Relativní četnosti metanotrofních bakterií typu I z celkového počtu prokaryotních buněk v půdách z jarního a podzimního odběru uvádí Graf 2. Ve vzorcích odebraných na jaře 2009 tvořily MOB typu I 1,08 % (SI), 0,84 % (SR), 1,37 % (BI) a 2,42 % (CO) buněk z celkového prokaryotního společenstva v půdě. Ve vzorcích odebraných na podzim 2009 tvořily MOB typu I 0,82 % (SI), 0,80 % (SR), 1,49 % (BI) a 4,27 % (CO) buněk z celkového prokaryotního společenstva v půdě. Výraznější rozdíl na podzim oproti jaru byl zaznamenán pouze u ploch CO, kde stoupla relativní četnost o 76,45 %. U zbylých ploch (SI, SR a BI) nedošlo k výrazným změnám relativního zastoupení.



Graf 2: Relativní četnost MOB typu I v % z celkového počtu prokaryotních buněk ve studovaných půdách z jarního a podzimního odběru v roce 2009. U podzimních vzorků jsou vyznačeny směrodatné odchylky. Číselné údaje nad sloupci udávají hodnoty relativního zastoupení.

Poměr relativního zastoupení MOB typu II ku MOB typu I ukazuje Graf 3. Hodnoty klesají v pořadí ploch SI>SR>BI>CO. Na jaře byl poměr 10,45 % (SI), 10,15 (SR), 8,89 (BI) a 7,61 (CO). Na podzim klesl poměr relativních četností na všech plochách na 2,84 % (SI), 2,62 % (SR), 1,93 % (BI) a 1,04 % (CO).



Graf 3: Poměr abundance MOB typu II/ typu I ve studovaných půdách z jarního a podzimního odběru v roce 2009. Pro výpočet poměru byly použity průměrné hodnoty relativních četností z podzimu 2009. Číselné údaje nad sloupci udávají přesné hodnoty poměru relativního zastoupení.

V Tabulce 9 a v Tabulce 10 jsou uvedeny absolutní počty MOB pro oba odběry. Pro jarní odběr bylo zjištěno nejvíce MOB typu II na ploše SI ($3,07 \times 10^{10}$), naopak nejméně na ploše CO ($9,03 \times 10^9$). Počty MOB typu I byly nižší o jeden řád (SI, BI, CO) a o dva řády (SR). Nejvíce MOB typu I bylo nalezeno na ploše BI ($3,12 \times 10^9$), nejméně na ploše SR ($2,94 \times 10^8$).

Pro podzimní odběr bylo zjištěno nejvíce MOB typu II na ploše CO ($7,43 \times 10^9 \pm 2,15 \times 10^9$), nejméně na ploše SR ($3,29 \times 10^9 \pm 4,71 \times 10^8$). Počty MOB typu I byly nižší, ale u

všech ploch se řádově nelišily od typu II. Nejvíce MOB typu I bylo nalezeno na ploše CO ($7,10 \times 10^9 \pm 8,25 \times 10^8$), nejméně na ploše SR ($1,25 \times 10^9 \pm 3,14 \times 10^8$).

Plocha	Jaro 2009		
	typ II	typ I	typ II + typ I
SI	$3,07 \times 10^{10}$	$2,59 \times 10^9$	$3,33 \times 10^{10}$
SR	$1,15 \times 10^{10}$	$2,94 \times 10^8$	$1,18 \times 10^{10}$
BI	$2,27 \times 10^{10}$	$3,12 \times 10^9$	$2,59 \times 10^{10}$
CO	$9,03 \times 10^9$	$8,20 \times 10^8$	$9,85 \times 10^{10}$

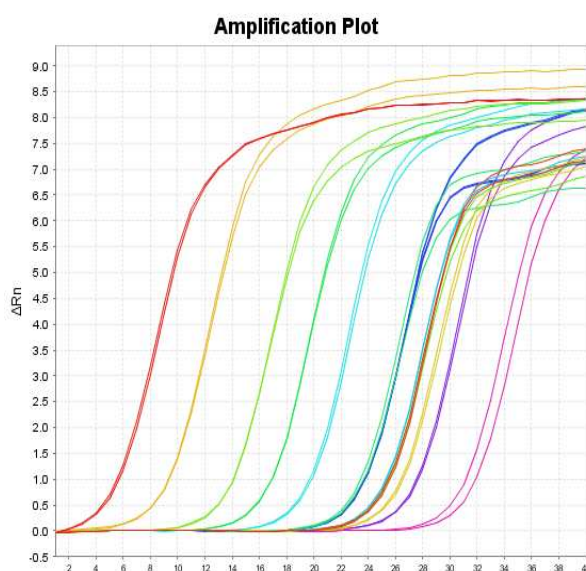
Tabulka 9: Absolutní četnosti buněk MOB na gram suché půdy.

Plocha	Podzim 2009		
	typ II	typ I	typ II + typ I
SI	$5,21 \times 10^9 \pm 3,48 \times 10^8$	$2,09 \times 10^9 \pm 1,39 \times 10^9$	$7,30 \times 10^9 \pm 1,04 \times 10^9$
SR	$3,29 \times 10^9 \pm 4,71 \times 10^8$	$1,25 \times 10^9 \pm 3,14 \times 10^8$	$4,55 \times 10^9 \pm 7,84 \times 10^8$
BI	$5,65 \times 10^9 \pm 1,62 \times 10^8$	$2,42 \times 10^9 \pm 1,13 \times 10^9$	$8,08 \times 10^9 \pm 9,69 \times 10^8$
CO	$7,43 \times 10^9 \pm 2,15 \times 10^9$	$7,10 \times 10^9 \pm 8,25 \times 10^8$	$1,45 \times 10^{10} \pm 2,97 \times 10^9$

Tabulka 10: Absolutní četnosti buněk MOB na gram suché půdy. Uvedeny jsou průměry ze dvou odečtů a směrodatné odchylky.

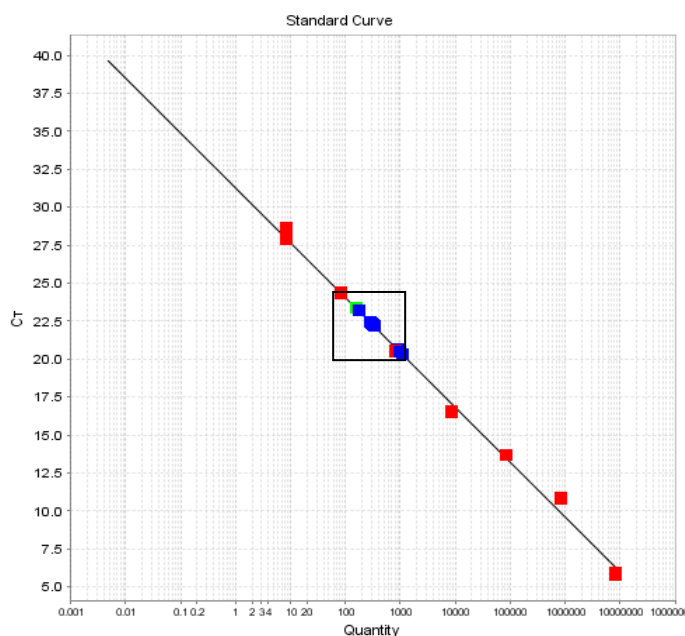
4.4 KVANTIFIKACE METANOTROFNÍHO SPOLEČENSTVA METODOU REAL TIME PCR.

Metodou real time PCR byly získané hodnoty abundance MOB typu I pro vzorky z odběrů jaro a podzim 2010. Na Obrázku 8 jsou zobrazeny amplifikační křivky pro standardy a vzorky SI. C_T hodnota (hodnota odpovídající cyklu, kdy hodnota fluorescence barviva navázaného na vznikající produkt překročí fluorescenci pozadí – tzv. „threshold value“) pro vzorky SI se pohybovala v rozmezí hodnot 20,33 až 23,35. Největší rozdíl v rámci 2 pravých opakování byl 0,11 cyklu. Oproti tomu hodnota C_T pro vzorky CO se pohybovala v rozmezí hodnot od 30,71 do 39,62. Největší rozdíl mezi 2 pravými opakováními byl 0,89 cyklu. Nejkoncentrovanější standard (8,39 kopie/ μ l) měl hodnotu C_T 28,61. Nejbližší vzorek CO byl tedy vzdálen od tohoto standardu 2,1 cyklu. Musela jsem použít poměrně vysoké ředění (1:64) abych se zbavila inhibitorů real-time PCR reakce, které se eluovaly spolu s DNA z roztoků použitého kitu. Pravděpodobně proto byly vzorky CO na hranici detekce. Tyto vzorky nejsou na Obrázku 8 zobrazeny.



Obrázek 8: Amplifikační křivky standardů a vzorků z plochy SI, které se nachází mezi šestým a sedmým standardem.

Na Obrázku 9 je zobrazena standardní křivka pro real time PCR. Hodnota sklonu standardní křivky byla -3,608; hodnota efektivity byla 89,31 % ($E = (10^{1/\text{sklon}} - 1)$; E nabývá hodnot 1,0-2,0 – což odpovídá 0-100%); $R^2 = 0,995$; Y-Intercept = 31,309. Na křivce je vyznačena oblast, kde se nachází vzorky SI. Zbylé body znázorňují standardy.



Obrázek 9: Standardní křivka. Na ose x je vyneseno množství kopií genu *pmoA*. Na ose y jsou vyneseny C_T hodnoty.

Výsledky kvantifikace počtu kopií genu *pmoA* pomocí real time PCR a odhad počtu buněk MOB typu II ve vzorcích jsou shrnuty v Tabulce 11. Hodnoty pro vzorky CO a SI v obou odběrech a hodnoty pro vzorky SI na jaře a na podzim jsou signifikantně odlišné ($p=0,05$, $F=33,06$, Tukey HSD test).

Plocha a termín	Počet kopií genu <i>pmoA</i> /g suché půdy	Počet MOB/ g suché půdy
SI jaro	$4,86 \times 10^6 \pm 1,14 \times 10^6$	$2,43 \times 10^6 \pm 5,72 \times 10^5$
SI podzim	$1,36 \times 10^7 \pm 5,39 \times 10^6$	$6,82 \times 10^6 \pm 2,70 \times 10^6$
CO jaro	$2,68 \times 10^3 \pm 1,50 \times 10^3$	$1,34 \times 10^3 \pm 7,48 \times 10^2$
CO podzim	$9,19 \times 10^3 \pm 1,25 \times 10^4$	$4,59 \times 10^3 \pm 6,25 \times 10^3$

Tabulka 11: Přepočet výsledků na počet kopií genu *pmoA* typu I na gram suché půdy. Uvedeny jsou průměry a směrodatné odchylky, $n=6$.

5. DISKUZE

V souladu s hlavním cílem práce, kterým bylo „přispět k poznání společenstva bakterií oxidujících metan a metanotrofiie v půdě zimoviště skotu“, jsem nejprve provedla literární rešerši problematiky. Ukázalo se, že jsou k dispozici metody vhodné ke studiu společenstva MOB v půdách a mořských sedimentech (např. HENCKEL A KOL., 1999; KHMELENINA A KOL., 2000; FJELLBIRKELAND A KOL., 2001; KOLB A KOL., 2003; KALLISTOVÁ A KOL., 2007; ZHOU A KOL., 2008). Přesto bylo nutné u všech použitých metod postup přizpůsobovat vzorkům ze zkoumané lokality (např. z toho důvodu, že některé zkoumané půdy mají extrémně vysoký obsah organických látek a mezi plochami jsou obecně rozdíly v půdních charakteristikách; Tabulka 1). Tyto nutné optimalizační kroky vyžadovaly nakonec mnohem více času, než jsme odhadovali na počátku výzkumu. Některé plánované analýzy nebyly z časových důvodů provedeny. Shromážděné teoretické informace a praktické zkušenosti získané při hledání vhodných modifikací standardně používaných metod nicméně představují cenný základ pro další výzkum společenstva MOB na molekulární úrovni na vybrané výzkumné lokalitě. Vedle této „metodické“ části mé práce bylo získáno několik výsledků, které naznačují jak, a do jaké míry je společenstvo MOB v zimovištních půdách ovlivněno skotem.

5.1 ANALÝZA SPOLEČENSTVA MOB POMOCÍ METODY DGGE

Metodou DGGE byly analyzovány vzorky z jarního odběru v roce 2009. Výsledky ukazují na rozdílnost ploch SI a CO, což je v souladu se zjištěním ZHOU A KOL. (2008), kteří taktéž použili pro analýzu metanotrofního společenstva v půdě metodu DGGE. V této práci autoři zkoumali aktivitu a strukturu společenstva MOB v půdě v závislosti na přítomnosti

ovcí. Půda v této studii obsahovala 0,5 % C_{org} , kdežto naše půdy obsahovaly 1,5 % (plocha CO) až 8 % (plocha SI) C_{org} .

Výsledek dokládající výraznou odlišnost společenstva MOB v půdě SI od půdy CO jsme vzhledem k výraznému zatížení plochy SI skotem předpokládali. Rozdíly už jsou méně zřetelné při srovnání ploch CO a SI s plochami SR a BI, a odpovídají tomu, že tyto plochy jsou určitými přechodovými stupni v gradientu zatížení CO (nulové) – SI (maximální, každoroční). Na ploše SR dochází po předchozím každoročním zimování skotu k regeneraci půdy. Na plochu BI byl skot vpuštěn poprvé v říjnu 2008. Vzorky z plochy BI se na základě intenzity proužků seskupovaly se vzorky z plochy CO. V případě analýzy na základě přítomnost/nepřítomnosti proužků se ale seskupovaly vzorky BI se vzorky SI a SR. Jednoleté zátěž tedy nezměnila strukturu a abundanci MOB společenstva natolik, aby plocha BI vykazovala shodné znaky s plochou SI, ale jistý posun je zde viditelný. Bohužel výsledek analýzy může být ovlivněn méně kvalitním rozdělením proužků u vzorků z plochy CO a u vzorku BI5. Vzorky z plochy SR při použití analýzy na základě intenzity proužků vytvořily skupinu spolu se vzorkem SI3. U těchto vzorků je pozorovatelný dominantní proužek, díky jehož přítomnosti pravděpodobně došlo k seskupení těchto vzorků. Při analýze na základě přítomnosti proužků se vzorky z plochy SR seskupily se vzorky z plochy BI a SI. V případě vzorků SR může být výsledné zařazení plochy zkresleno ztrátou 3 vzorků SR3-5, u kterých nebyly znatelné žádné produkty, i když na gelové elektroforéze byly produkty správné délky viditelné (neukázáno).

Je tedy na místě se alespoň domnívat, že na ploše SR je ještě stále společenstvo MOB ovlivněno pobytem skotu v minulých letech. Co se týče plochy BI, výsledky naznačují posun ve struktuře MOB již po 1-letém využívání plochy jako zimoviště, byť je výsledek ovlivněn velkou heterogenitou vzorků. Na získaném polyakrylamidovém gelu je vidět, že produkty,

kteřé se objevily u vzorků SI a SR se nevyskytují u vzorků CO, některé se pouze slabě vyskytují u vzorků BI. Jednotlivé produkty by měli značit odlišné druhy, tudíž došlo ke změně ve struktuře MOB společenstva, což je vzhledem ke změně půdních charakteristik ve shodě s literaturou (HANSON A HANSON, 1996; FJELLBIRKELAND A KOL., 2001).

Výsledky analýz se liší podle použitých kritérií. Celkově se jako vhodnější jeví analýza založená na intenzitě produktů, jelikož tato varianta zohledňuje i abundanci dané sekvence genu *pmoA* ve vzorku, potažmo tedy abundanci jednotlivých druhů. Výsledek stanovení ale také mohl být ovlivněn kvalitou získaného DGGE gelu, protože separace produktů nebyla ideální.

5.2 ANALÝZA SPOLEČENSTVA MOB POMOCÍ METODY MISA

Metodou MISA byly analyzovány vzorky z jarního i podzimního odběru v roce 2009. Zde uvedené výsledky jsou založené na separaci fragmentů pomocí horizontální gelové elektroforézy. Tato fingerprintová metoda je nově vyvinutým přístupem pro studium ekologie MOB v prostředí mořských sedimentů (TAVORMINA A KOL., 2008, 2010).

Pro jarní vzorky byla jak metodou analýzy gelu na základě intenzity produktů (Pearsonova korelace, klastrovací metoda UPGMA), tak metodou na základě přítomnosti/nepřítomnosti (Pearsonova korelace, klastrovací metoda UPGMA) potvrzena rozdílnost ploch CO i BI a silně zatížených ploch SI a SR. Anomálií byl vzorek SI 1, který měl poněkud odlišná profil produktů od zbylých vzorků SI. Analýza jarních vzorků naznačuje i vzájemnou rozdílnost všech ploch navzájem. Na Obrázku 6 jsou velmi dobře viditelné jednotlivé produkty i jejich rozdílnost mezi skupinami stejných vzorků. Pro podzimní vzorky je situace podobná. Oproti jaru zde nejsou vzorky SI a SR jasně odděleny. Se vzorky

z podzimu byly komplikace při amplifikaci, která se ale nakonec zdařila. Vliv na výsledek může mít horší kvalita výsledného gelu (což je znatelné ve srovnání s gelem s jarními vzorky).

Ačkoliv byla tato metoda navržena a použita za účelem výzkumu MOB v mořském pelagiálu (příbřežní pás) (TAVORMINA A KOL., 2008, 2010) tak byla zdárně aplikována i na půdní prostředí zimoviště. Získané výsledky indikují opět změnu struktury MOB společenstva v závislosti na gradientu zatížení skotem. V dalším výzkumu je v plánu použít kapilární elektroforézu a dozvědět se tak druhové složení MOB společenstva na plochách.

5.3 ANALÝZA ABUNDANCE MOB POMOCÍ METODY CARD-FISH

Metodou CARD-FISH byly analyzovány vzorky z jarního i podzimního odběru v roce 2009. Metoda byla zvolena na základě úspěšné aplikace ve skryvkové vrstvě půdy komunální skládky odpadu v práci KALLISTOVÁ A KOL. (2007). Byla vybrána práce týkající se půdního prostředí, abychom eliminovali případné potíže při aplikaci metody na mé vzorky půdy. Ovšem ani zde nebyla metodologická část výzkumu bez obtíží, i když jistých výsledků bylo dosaženo, ovšem je nutné na ně pohlížet jako na orientační data, nikoliv je pokládat za naprosto vypovídající.

Jako nejvýraznější výsledek byla zjištěna dominance MOB typu II nad MOB typu I ve všech odběrech, což se shoduje v případě ploch SI a BI s výsledky práce AMARAL A KOL. (1995), kteří potvrdili dominanci typu II na půdách s vyššími koncentracemi metanu a nižšími koncentracemi kyslíku (pozn. autorky: relativní srovnání s MOB typu I), stejně tak tuto informaci potvrzují HANSON A HANSON (1996). Stejně tak práce autorů ZHOU A KOL. (2008) potvrzuje dominanci typu II, tentokrát v mongolské stepi. MOB typu I naopak dominují na

půdách s nižší koncentrací metanu a s vyšší koncentrací kyslíku (HANSON A HANSON, 1996), což by odpovídalo plochám SR a CO (viz údaje v Tabulce 2). Převaha MOB typu I byla při nízké koncentraci metanu potvrzena i v práci KALLISTOVÁ A KOL. (2007). Pro srovnání uvádím práci FJELLBIRKELAND A KOL. (2001). Autoři použili metodu DGGE a zároveň obohatili atmosféru části vzorků z pastviny skotu o metan. Jako charakteristiky lokality uvádějí autoři 53% organického materiálu (ØVREÅS & TORSVIK, 1998). Výsledkem bylo zjištění, že ve vzorcích obohacených o metan převažuje typ I, kdežto ve vzorcích neobohacených převažuje typ II. Opět zde narážíme na rozporuplné údaje o nárocích na koncentraci kyslíku a metanu u MOB typu I a MOB typu II. U typu II bylo prokázáno, že je konkurenčně úspěšnější při „nižší“ množství živin v půdě (HANSON & HANSON, 1996; WISE A KOL., 1999). To by mohlo vysvětlit dominanci MOB typu II na ploše CO, kde je množství živin nejnižší (Tabulka 1). Autoři ovšem přesně nedefinují pojem „nižší“. Co se týče plochy SR, tak dominance MOB typu II může být pouze setrvalý stav z předešlých let, kdy byla plocha využívána jako zimoviště skotu. Společenstvo MOB ještě nemělo dostatek času, aby se zde opět konstituovalo autochtonní (původní) společenstvo MOB, za které pokládáme společenstvo MOB na ploše CO.

Pro MOB typu II byly na jaře zjištěny hodnoty relativního zastoupení v rozsahu 8,53 (SR) – 18,51 (CO), kdežto na podzim došlo k velkému propadu na všech plochách o zhruba 75% (Graf 1). Určitý pokles je možný kvůli poklesu metanu ve srovnání jaro/podzim o řád až dva řády (RADL A KOL., 2007). Tím se ale může vysvětlit pouze pokles na plochách SI a BI, kde byly naměřeny emise metanu v pozitivních hodnotách.

O relativně vysokých hodnotách pro MOB typu II jsme pochybovali a výsledky ze vzorků z podzimu opravdu tyto pochyby potvrdily. Je možné, že došlo k nadhodnocení relativních četností pro MOB typu II v jarních vzorcích. Ovšem byla použita stejná próba i

hybridizační podmínky jako na podzim a je tedy otázkou, jak mohlo k takové chybě dojít. K dispozici jsou již data z jara 2010 (nezahrnuto v této práci)¹. Relativní četnosti pro MOB typu II jsou výrazně nižší a odpovídají spíše relativním četnostem, které jsem zjistila u podzimních vzorků 2009. Je možné, že chybou v protokolu (což je pouze domněnka) došlo k nespecifickému navázání próby pro MOB typu II i na sekvenci pro gen 16S rRNA příbuzných (např. metylotrofních) bakterií. Tak mohlo dojít k nadhodnocení. Ovšem HANSON A HANSON (1996) uvádí pro součet relativních zastoupení (vzhledem ke všem mikrobiálním buňkám) MOB typu I a typu II v půdě tundry hodnoty od 1 % do 23 %. Horní hranici tohoto rozmezí moje výsledky odpovídají, ale vzhledem k výsledkům z roku 2010 považuji jarní vzorky z roku 2009 za nereálné.

Relativní četnosti pro MOB typu I se zdají být reálné a vypovídající o skutečném stavu. Na plochách SI, SR a BI nedošlo k výrazným změnám mezi jarem a podzimem a relativní četnosti byly na plochách vyrovnané. Na ploše CO bylo zjištěny nejvyšší relativní četnosti ze všech ploch v obou odběrech. Na podzim dokonce došlo k nárůstu relativní četnosti oproti jaru o 76,45 %. Domnívám se, že by se mohlo jednat o důkaz sezónního vlivu na MOB typu I. Stav mikrobiálního společenstva je závislý na vlastnostech půdního prostředí (mezi hlavními faktory jsou teplota, pH, vlhkost, množství živin). Je možné, že například momentální situace (teplota, vlhkost) v době odběru způsobila nárůst relativní četnosti MOB typu I. HENCKEL A KOL. (2000B) uvádějí MOB typu I jako adaptabilnější při změně podmínek. Zatím je možné pouze odhadovat a je nutné vyčkat na vzorky z dalších odběrů, aby bylo potvrzeno, že rozdíl mezi jarem a podzimem na ploše CO není náhodnou anomálií.

Pro lepší srovnání s literaturou jsem relativní četnosti přepočítala na absolutní hodnoty pro počet buněk MOB typu I a typu II v půdě (Tabulky 9 a 10). V práci KALLISTOVÁ A KOL.

¹ Teplota při hybridizaci změněna na 37°C a koncentrace formamidu v hybridizačním pufru změněna na 38%.

(2007) autoři uvádějí, že početnost MOB v hloubce 41-68 cm byla v řádu 10^8 na gram suché půdy. Tato práce se zabývala výzkumem krycí vrstvy půdy na skládce odpadů, kde je abundance MOB zvýšená, kvůli intenzivní produkci metanu ve spodních vrstvách. HANSON A HANSON (1996) uvádění pro rozmrzlou vrstvu půdy v tundře absolutní počty MOB v rozmezí $1,5 \times 10^6$ až $2,3 \times 10^7$ na gram suché půdy. DEDYSH A KOL. (2003) zjistili pomocí CARD-FISH v rašeliništní půdě $5,7 \times 10^6$ buněk MOB na gram vlhké půdy a $1,5 \times 10^8$ (Německo) až $4,7 \times 10^8$ (Sibiř) buněk obarvených v DAPI. EICKHORST & TIPPKÖTTER (2008) taktéž použili metodu CARD-FISH a zjistili počet bakteriálních buněk obarvených v DAPI v zemědělských a mokřadních půdách v rozmezí $2,58 \times 10^8$ až $6,42 \times 10^9$ na gram suché půdy. V mých vzorcích půd se počet buněk MOB na gram suché půdy pohyboval od hodnoty $2,94 \times 10^8$ (jaro 2009, typ I, plocha SR) do $3,07 \times 10^{10}$ (jaro 2009, typ II, plocha SI), nejčastěji v řádu 10^9 . Hodnoty pro MOB typu II z jara 2009 se zdají i z tohoto hlediska velmi vysoká. Hodnoty pro MOB typu I na jaře jsou o řád až dva nižší a podzimní hodnoty pro oba typy se již pohybují v řádu 10^9 , což je ale stále poměrně vysoká hodnota. Data považuji pouze za indikační a jejich relevantnost bude pravděpodobně zjištěna až s nashromážděním většího počtu odběrů, které snad povedou k získání důvěryhodnějších dat. Nicméně data indikují převahu MOB typu II na našich plochách a vyrovnané abundance typu I na jaře a na podzim pro plochy SI, SR a BI.

5.4 ANALÝZA MOB METODOU REAL-TIME PCR

Metoda real time PCR byla zvolena jako metoda k analýze abundance MOB typu I. Byly vyzkoušeny 2 metody izolace DNA a vybrána metoda pomocí komerčního kitu. Dále jsem vyzkoušela různá ředění DNA a nakonec jsem získala výsledky pro plochy CO a SI z jarního odběru z roku 2010. Vzhledem ke zdlouhavým úpravám protokolu byly analyzovány

pouze vzorky z ploch CO a SI, které se ukázaly jako nejodlišnější. Tato metoda byla použita také proto, abych měla porovnání pro výsledky získané pomocí metody CARD-FISH.

Podle výsledků získaných pomocí real time PCR se počet kopií genu *pmoA* MOB typu I na gram suché půdy na ploše SI pohybuje v řádu 10^6 až 10^7 . V práci zkoumající ekosystém rýžovišť (KOLB A KOL., 2003) bylo naměřeno řádově 10^6 kopií genu *pmoA* na gram vlhké půdy. Údaje z těchto prací jsou tedy srovnatelné s mými výsledky pro plochu SI.

Ve srovnání s hodnotami získanými metodou CARD-FISH jsou hodnoty řádově nižší. Důvodem může být nadhodnocení výsledků pomocí metody CARD-FISH. V zásadě by se dalo čekat, že pomocí real time PCR zjistím vyšší abundance, jelikož tato metoda by měla detekovat veškeré přítomné buňky, na rozdíl od CARD-FISH, které detekuje pouze buňky aktivní. Nižší hodnoty získané metodou real time PCR mohly být způsobené ztrátou části DNA během izolace DNA a ovlivněné kvalitou izolované DNA, popřípadě mohla být reakce inhibována zbytky roztoků z použitého komerčního kitu, které se spolu s DNA mohly do reakce dostat. Pro metody byly také použité jiné vzorky a to pokládám za nejdůležitější faktor ovlivňující výsledek. Bohužel se nedařily amplifikovat vzorky z roku 2009, takže byly použity vzorky z roku 2010, u kterých byla amplifikace relativně bezproblémová. Dalším důvodem může být vysoké ředění amplifikované DNA (1:64). Podobně ovšem postupovali i TÖWE A KOL. (2010), kteří použili ředění 1:64 z důvodu odstranit inhibitory reakce. Ze stejného důvodu jsem toto ředění použila i já ve své práci.

Nicméně byl opět potvrzen rozdíl mezi plochou SI a plochou CO. Hodnoty pro vzorky z plochy CO byly dokonce na hranici meze detekce. Metoda bude nadále používána pro výzkum společenstva MOB se zahrnutím všech zkoumaných ploch

6. ZÁVĚRY

Závěrem lze konstatovat, že výzkum potvrdil výchozí hypotézu, že přítomnost skotu ovlivňuje půdní společenstvo metanotrofních bakterií, jeho abundanci i strukturu. Struktura společenstva byla studována pomocí dvou metod genetického fingerprintu (DGGE a MISA). Výsledky ukazují na změny ve struktuře půdních metanotrofních bakterií způsobené skotem. Fingerprintové metody ukázaly na příbuznost společenstev metanotrofů v půdách silně zatížených skotem (SI a SR) a druhou skupinu tvořily půda kontrolní a půda pod začínajícím vlivem (CO a BI). Nejvýraznější rozdílnost struktury společenstva metanotrofů od původního autochtonního společenstva (plocha CO) vykazovala silně zatížená půda (SI). Bylo potvrzeno, že víceleté využití plochy pro zimování skotu (půdy SI a SR) mělo zásadní vliv na metanotrofní společenstvo. Jeden rok regenerace (vyjmutí plochy ze zimoviště) nebyl dostatečný pro významnější změnu metanotrofního společenstva. Zároveň bylo zjištěno, že půdní metanotrofní společenstvo reaguje na chov skotu již po prvním přezimování skotu (půda BI). Tyto rozdíly byly pozorovány na jaře i na podzim. Zde pravděpodobně hraje důležitější roli zátěž skotem a z toho vyplývající změny v půdě a ve společenstvu MOB, nežli přirozené rozdíly mezi jarem a podzimem způsobené vnějšími přírodními vlivy a střídáním ročních období.

Relativní abundance metanotrofů typu I byla ve studovaných půdách stanovena v rozmezí hodnot 0,8 – 4,3 %, přičemž byla vyšší v půdě kontrolní než v půdách zatížených. Podobný trend byl pozorován u metanotrofů typu II, kde se relativní četnosti pohybovaly v rozmezí 2,1 – 18,4 %, přičemž byly významně vyšší na jaře, kdy je aktivita celkového mikrobiálního společenstva vysoká. Přesto ale data z jarního odběru považují za nadhodnocená. Poměr metanotrofů typu II / typu I byl v kontrolní půdě na jaře i na podzim

nižší (7,6 respektive 1,0) než u půd zatížených (>8,9 respektive >1,9). Absolutní kvantifikace metanotrofů přinesla rozporuplné výsledky, když byly porovnány výsledky získané *in situ* hybridizací (CARD-FISH) a kvantitativní PCR. Nereálné nadhodnocení počtu metanotrofů typu II s využitím metody CARD-FISH je třeba řešit hledáním vhodné modifikace této (jinak velmi slibné) metody. Podobně je třeba se v další práci zaměřit na kvantifikaci genu *pmoA* pomocí real time PCR. Nicméně obě metody ukázaly na navýšení celkového počtu metanotrofů v silně zatížených půdách, což naznačuje zvýšený potenciál aerobní oxidace metanu v půdách zimoviště.

Všechny použité metody byly podrobně popsány a mohou být (po splnění výše uvedeného) dále použity pro plánované studium společenstva MOB na dané lokalitě.

7. LITERATURA

- AIT-BENICHO, S., JUGLIA, L.B., GREER, C.W., CABRAL, A.R.** (2009) Methanotrophs and methanotrophic activity in engineered landfill biocovers. *Waste Management* 29: 2509-2517.
- AMARAL, J.A., ARCHAMBAULT, C., RICHARDS, S.R., KNOWLES, R.** (1995) Denitrification associated with groups I and II methanotrophs in a gradient enrichment system. *FEMS Microbiology and Ecology* 18: 289-298.
- ANDERSON, B., BARTLETT, K., FROLKING, S., HAYHOE, K., JENKINS, J., SALAS, W.** (2010) Methane and nitrous oxide emissions from natural sources. EPA, Washington, Pennsylvania.
- AUMAN, M.S., SPEAKE, C.C., LIDSTROM, M.E.** (2001) *nifH* sequences and nitrogen fixation in Type I and Type II methanotrophs. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4009-4016.
- BENDER, M., CONRAD, R.** (1992) Kinetics of CH₄ oxidation in oxic soils exposed to ambient air or high CH₄ mixing ratios. *FEMS Microbiology Letters* 101: 261-269.
- BODELIER, P.L.E., ROSLEV, P., HENCKEL, T., FRENZEL, P.** (2000) Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature* 403: 421-424.
- BODELIER, P.L.E., LAANBROEK, H.J.** (2004) Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 47: 265-277.
- BORKEN, W., BEESE, F., BRUMME, R., LAMERSDORF, N.** (2002) Long-term reduction in nitrogen and proton inputs did not affect atmospheric methane uptake and nitrous oxide emission from a German spruce forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1815-1819.
- BORKEN, W., XU, Y.J., BEESE, F.** (2003) Conversion of hardwood forests to spruce and pine plantations strongly reduced soil methane sink in Germany. *Global Change Biology* 9: 956-966.
- BOURNE, D. G., McDONALD, I.R., MURRELL, J.C.** (2001). Comparison of *pmoA* PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3802-3809.

BOWMAN, J. (2006) The Methanotrophs-The Families *Methylococcaceae* and *Methylocystaceae*. In: The Prokaryotes, Volume 5, 3rd edition, Dworkin, M. (ed)., Springer, USA: 266-289.

BRŮČEK, P., ŠIMEK, M., HYNŠT, J. (2009) Long-term animal impact modifies potential production of N₂O from pasture soil. *Biology and Fertility of Soils* 46: p. 27-36.

BYKOVÁ, S., BOECKX, P., KRAVCHENKO, I., GALCHENKO, V., VAN CLEEMPUT, O. (2007) Response of CH₄ oxidation and methanotrophic diversity to NH₄⁺ and CH₄ mixing ratios. *Biology and Fertility of Soils* 43: p. 341-348.

BUCKLEY, D.H., SCHMIDT, T.M. (2002) Exploring the diversity of soil - a microbial rainforest. In: *Biodiversity of Microbial Life: Foundation of Earth's Biosphere*. Staley, J.T., Reysenbach, A.L. (eds). New York: Wiley-Liss: 183–208.

CONRAD, R. (2007) Microbial Ecology of Methanogens and Methanotrophs. *Advances in Agronomy* 96: 1-63.

DALAL, R.C., ALLEN, D.E. (2008) Greenhouse gas fluxes from natural ecosystems. *Australian Journal of Botany* 56: 369-407.

DEDYSH, S.N., LIESACK, W., KHMELLENINA, V.N., SUZINA, N.E., TROTSSENKO, Y.O., SEMRAU, J.D. (2000) *Methylocella palustris* gen. nov., sp. nov., a new methane oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 955-969.

DEDYSH, S.N., KHMELLENINA, V.N., SUZINA, N.E., TROTSSENKO, Y.A., SEMRAU, J.D., LIESACK, W., TIEDJE, J.M. (2002) *Methylocapsa acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel methane-oxidizing and dinitrogenfixing acidophilic bacterium from *Sphagnum* bog. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 251–256.

DEDYSH, S.N., DUNFIELD, P.F., DERAQSHANI, M., STUBNER, S., HEYER, J., LIESACK, W. (2003) Differential detection of type II methanotrophic bacteria in acidic peatlands using newly developed 16S rRNA-targeted fluorescent oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology* 43: 299-308.

- DEDYSH, S.N., BERESTOVSKAYA, Y.Y., VASYLIEVA, L.V., BELOVA, S.E., KHMELENINA, V.N., SUZINA, N.E., TROTSENKO, Y.A., LIESACK, W., ZAVARZIN, G.A.** (2004) *Methylocella tundrae* sp. nov., a novel methanotrophic bacterium from acidic tundra peatlands. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 151–156.
- DELONG, E. F., GIOVANNONI, S.J., SCHMIT, T.M.** (1990) Tangential flow filtration and preliminary phylogenetic analysis of marine picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 2572-2575.
- DUNFIELD, P.F., KHMELENINA, V.N., SUZINA, N.E., TROTSENKO, Y., DEDSYH, S.N.** (2003) *Methylocella silvestris* sp. nov., a novel methanotroph isolated from an acidic forest cambisol. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1231–1239.
- DUNFIELD, P.F.** (2007) The soil methane sink. In: *Green House Gas Sinks*. Reay, D.S., Hewitt, C.N., Smith, K.A., and Grace, J. (eds). Wallingford, UK: 152-170.
- EICKHORST, T., TIPPKÖTTER, R.** (2008) Improved detection of soil microorganisms using fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH). *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1883-1891.
- FENCHEL, T., FINLAY, B.J.** (1995) *Ecology and evolution in anoxic worlds*. 1st edition, Oxford University Press.
- FJELLBIRKELAND, A., TORSVIK, V., ØVREÅS, L.** (2001) Methanotrophic diversity in an agricultural soil as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis profiles of *pmoA*, *mxnA* and 16S rDNA sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 209-217.
- FRENZEL, P., ROTHFUSS, F., CONRAD, R.** (1992) Oxygen profiles and methane turnover in a flooded rice microcosms. *Soil Biology and Fertility* 14: 84-89.
- GEBERT, J., GROENGRÖEFT, A., MIEHLICH, G.** (2003) Kinetics of microbial landfill methane oxidation in biofilters. *Waste Management* 23: 609–619.
- GEBERT, J., GRÖNGFÖRT, A., SCHLOTTER, M., GATTINGER, A.** (2004) Community structure in a methanotroph biofilter as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *FEMS Microbiology Letters* 240: 61–68.

HANSON, R.S., HANSON, T.E (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiology Review* 60: 439-471.

HENCKEL, T., FRIEDRICH, M., CONRAD, R. (1999) Molecular analyses of the methanoxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1980-1990.

HENCKEL, T., JÄCKEL, U., SCHNELL, S., CONRAD, R. (2000a) Molecular analyses of novel methanotrophic communities in forest soil that oxidize atmospheric methane. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1801-1808.

HENCKEL, T., ROSLEV, P., CONRAD, R. (2000b) Effects of O₂ and CH₄ on presence and activity of the indigenous methanotrophic community in rice field soil. *Environmental Microbiology* 2: 666–679.

HEYER, J., BERGER, U., HARDT, M., DUNFIELD, P.F. (2005) *Methylohalobius crimeensis* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, methanotrophic bacterium isolated from hypersaline lakes of Crimea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 1817-1826.

HOFFMANN, T., HORZ, H.P., KEMNITZ, D., CONRAD, R. (2002) Diversity of the particulate methane monooxygenase gene in methanotrophic samples from different rice field soils in China and the Philippines. *Systematic and Applied Microbiology* 25: 267-247.

HOLMES, A.J., COSTELLO, A.J., LIDSTROM, M.E., MURELL, J.C. (1995) Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionary related. *FEMS Microbiology Letters* 132: 203-208.

HORZ, H.P., RICH, V., AVRAHAMI, S., BOHANNAN, B.J.M (2005) Methane-oxidizing bacteria in a California upland grassland soil: diversity and response to simulated global change. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 2642-2652.

HÜTSCH, B.W., WEBSTER, C.P., POWLSON, D.S. (1994). Methane oxidation in soil as affected by land use, soil pH and N fertilization. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 1613-1622.

HÜTSCH, B.W. (2001) Methane oxidation in non-flooded soils as affected by crop production. *European Journal of Agronomy* 14:237-260.

CHRISTOPHERSEN, M., LINDERØD, L., JENSEN, P.E., KJELDSSEN, P. (2000) Methane oxidation at low temperatures in soil exposed to landfill gas. *Journal of Environmental Quality* 29: 1989–1997.

ISLAM, T., JENSEN, S., REIGSTAD, L.J., LARSEN, Ø., BIRKELAND, N.K. (2008) Methane oxidation at 55°C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the *Verrucomicrobia* phylum. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 105: 300–304.

IPCC (2001) Atmospheric chemistry and green house gases. In: Houghton J.T. a kol.,(eds.) (2001) *Climate change. The Scientific Basis.* Cambridge University Press. Cambridge. New York: 239 – 287.

JIANG, Q.Q., BAKKEN, L.R. (1999) Nitrous oxide production and methane oxidation by different ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2679–2684.

KELLER J.K., BRIDGHAM S.B., CHAPIN C.T., IVERSEN C.M. (2005) Limited effects of six years of fertilization on carbon mineralization dynamics in a Minnesota fen. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 1197-1204.

KNAPP, C.W., FOWLE, D.A., KULCZYCKI, E., ROBERTS, J.A., GRAHAM, D.W. (2007) Methane monooxygenase gene expression mediated by methanobactin in the presence of mineral copper source. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 104: 12040-12045.

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.

KOLB, S., KNIEF, C., STUBNER, S., AND CONRAD, R. (2003) Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA* targeted real-time PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2423-2429.

- LE MER J., ROGER P.** (2001) Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils. *European Journal of Soil Biology* 37: 25-50.
- LENGAUER, CH., GREEN, E.D., CREMER, T.** (1992) Fluorescence *in situ* hybridization of YAC clones after *Alu*-PCR amplification. *Genomics* 13: 826-828.
- LIEBERMAN, R.L., ROSENZWEIG, A.R.** (2005) Crystal structure of a membrane-bound metalloenzyme that catalyses the biological oxidation of methane. *Nature* 434: 177-182
- LIN, J. L., JOYE, S. B., SCHOLTEN, J. C. M., SCHÄFER, H., McDONALD, I. R., MURRELL, J. C.** (2005) Analysis of methane monooxygenase genes in Mono Lake suggests that increased methane oxidation activity may correlate with a change in methanotroph community structure. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 6458-6462.
- MAXFIELD, P.J., HORNIBROOK, E.R.C., AND EVERSLED, R.P.** (2008) Acute impact of agriculture on high-affinity methanotrophic bacterial populations. *Environmental Microbiology* 10: 1917-1924.
- MOHANTY, S.R., BODELIER, P.L.E., FLORIS, V., CONRAD, R.** (2006) Differential effects of nitrogenous fertilizers on methane-consuming microbes in rice field and forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1346-1354.
- MOSIER, A.R., DUXBURY, J.M., FRENEY, J.R., HEINEMEYER, O., MINAMI, K., JOHNSON, D.E.** (1998) Mitigating agricultural emissions of methane. *Climatic Change* 40: 39-80.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Springs Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273.
- MURRELL, J.C., McDONALD, I.R., AND GILBERT, B.** (2000) Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions. *Trends in Microbiology* 8: 221-225.
- NAUHAUS, K., TREUDE, T., BOETIUS, A., KRÜGER, M.** (2005) Environmental regulation of the anaerobic oxidation of methane: a comparison of ANME-I and ANME-II communities. *Environmental Microbiology* 7: 98-106.
- NEWMAN, E.I.** (1993) *Applied Ecology*. University of Bristol. England

NGUYEN, H.H., A. K. SHIEMKE, S. J. JACOBS, B. J. HALES, M. E. LIDSTROM, AND S. I. CHAN. (1994) The nature of the copper ions in the membranes containing the particulate methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). The Journal of Biological Chemistry 269:14995-15005.

NORTON, J. M., JACKIE, M. L. & KLOTZ, M. G. (1996). The gene encoding ammonia monooxygenase subunit α exists in free nearly identical copies in *Nitrosospira sp.* FEMS Microbiology Letters 139: 181-188.

OJIMA, D.S., VALENTINE, D.W., MOSIER, A.R., PARTON, W.J, SCHIMEL, D.S. (1993) Effect of land-use change on methane oxidation in temperate forest and grassland soils. Chemosphere 26: 675-685.

OREMLAND, R.S., CULBERTSON, C.W. (1992) Importance of methane-oxidizing bacteria in the methane budget as revealed by the use of a specific inhibitor. Nature 356: 421-423.

ORPHAN, V.J., HOUSE, C.H., HINRICHS, K.-U., MCKEEGAN, K.D., DELONG, E.F. (2002) Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. PNAS 99: 7663-7668.

ØVREÅS, L., TORSVIK, V. (1998) Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. Microbial Ecology 36: 303–315.

PANTŮČEK, R., DOŠKAŘ J. (2005) In: Metody molekulární biologie. Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková J., Masarykova Univerzita, Brno: 73-110.

PERNTHALER, A., PERNTHALER, J., AMANN, R. (2002) Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. Applied and Environmental Microbiology 68: 3094-3101.

POL, A., HELJMANS, K., HARHANGI, H.R., TEDESCO, D., JETTEN, M.S.M., OP DEN CAMP, H.J.M. (2007) Methanotrophy below pH 1 by a new *Verrucomicrobia* species. Nature 450: 874–878.

RADL, V., GATTINGER, A., CHROŇÁKOVÁ, A., NĚMCOVÁ, A., ČUHEL, J., ŠÍMEK, M., MUNCH, J.CH, SCHLOTER, M., ELHOTTOVA, D. (2007): Effects of cattle husbandry on

abundance and activity of methanogenic archaea in upland soils. *The ISME Journal* 1: 443-452.

RAHALKAR, M., BUSSMANN, I., SCHINK B. (2007) *Methylosoma difficile* gen. nov., sp. nov., a novel methanotroph enriched by gradient cultivation from littoral sediment of Lake Constance. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1073-1080.

ROSLEV, P., KING, G.M. (1995) Aerobic and anaerobic starvation metabolism in methanotrophic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1563-1570.

SEDLÁČEK, I. (2007) *Taxonomie prokaryot.* Masarykova Univerzita, Brno.

SEGHERS, D., TOP, E.M., REHEUL, D., BULCKE, R., BOECKX, P., VERSTRAETE, W., SICILIANO, S.D. (2003) Long-term effects of mineral versus organic fertilizers on activity and structure of the methanotrophic community in agricultural soils. *Environmental Microbiology* 5: 867-877.

SEMRAU, J. D., CHISTOSERDOV, A., LEBRON, J., COSTELLO, A., DAVAGNINO, J., KENNA, E., HOLMES, A.J., FINCH, R., MURRELL, J.C, LIDSTROM, M.E. (1995). Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs. *Journal of Bacteriology* 177: 3071-3079.

SEMRAU, J. D., DISPIRITO, A.A., YOON, S. (2010) Methanotrophs and copper. *FEMS Microbiology Reviews* 34: 496-531.

SCHNELL, S., KING, G.M. (1996) Responses of methanotrophic activity in soils and cultures to water stress. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3203-3209.

SITLAULA, B.K., HANSEN, S., SITLAULA, J.I.B, BAKKEN, L. (2000) Methane oxidation potentials and fluxes in agricultural soil: Effects of fertilization and soil compaction. *Biochemistry* 48: 323-339.

SMITH, K.A., DOBBIE, K.E., BALL, B.C., BAKKEN, L.R., SITLAULA, B.K., HANSEN, S., BRUMME, R., BORKEN, W., CHRISTENSEN, S., PRIEMÉ, A., FOWLER, D., MACDONALD, A., SKIBA, U., KLEMEDTSSON, L., KASIMIR- KLEMEDTSSON, A., DÉGORSKA, A. ORLANSKI, P. (2000). Oxidation of atmospheric methane in Northern European soils, comparison with other

ecosystems, and uncertainties in the global terrestrial sinks. *Global Change Biology* 6: 791-803.

SMITH, C.J., NEDWELL, D.B., DONG, L.F., OSBORN, A.M. (2006) Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environmental Microbiology* 8: 804-815.

SMITH, C.J., OSBORN, A.M. (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiological Ecology* 67: 6-20

SÖHNGEN, N.L. (1906) Über bakterien, welche methan als kohlenstoffnahrung und energiequelle gebrauchen. *Centr Bakt Parasitenkd Infectionsk* 15: 513–517.

STRAŠKRABOVÁ, V. A KOLEKTIV (1996). *Mikrobiální ekologie vody*. MŽP ČR, BF JČU, České Budějovice, ČR.

ŠIMEK, M., BRŮČEK, P., HYNŠT, J., UHLÍŘOVÁ, E., PETERSON, 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.

TAVORMINA, P.L., USSLER III, W., ORPHAN, V.J. (2008) Planctonic and sediment-associated aerobic methanotrophs in two seep system along the North American margin. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 3985-3995.

TAVORMINA, P.L., USSLER III, W., JOYE, S.B., HARRISON, B.K., ORPHAN, V.J. (2010) Distributions of stative aerobic methanotrophs in diverse pelagic marine environments. *The ISME Journal* 4: 700-710.

TAVORMINA, P.L., ORPHAN, V.J, KALYUZHAYAYA, M.G., JETTEN, M.S.M., KLOTZ, M.G. (2011) A novel family of functional operons encoding methane/amonia monooxygenase-related proteins in gammaproteobacterial methanotrophs. *Environmental Microbiology Reports* 3: 91-100.

TEITER, S., MANDER, Ü. (2005) Emission of N₂O, N₂, CH₄, and CO₂ from constructed wetlands for wastewater treatment and from riparian buffer. *Ecological Engineering* 25: 528-541.

- TEMPLETON, A.S., CHU, K.H., ALVAREZ-COHEN, L., CONRAD, M.E.** (2006) Variable carbon isotope fractionation expressed by aerobic CH₄-oxidizing bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 70: 1739-1752.
- TROTSSENKO, Y.A., KHMELENINA, V.N.** (2005) Aerobic methanotrophic bacteria in cold ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology* 53: 15-26.
- TÖWE, S., KLEINEIDAM, K., SCHLOTTER, M.** (2010) Differences in amplification efficiency of standard curves in quantitative real-time PCR assays and consequences for gene quantification in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* 82: 338-341
- VAN HUISSTEDEN J.** (2004) Methane emission from northern wetlands in Europe during Oxygen Isotope Stage 3. *Quaternary Science Reviews* 23: 1989-2005.
- VIGLIOTTA, G., NUTRICATI, E., CARATA, E., TREDICI, S.M., DE STEFANO, M., PONTIERI, P., MASSARDO, D. R., PRATI, M.V., DE BELLIS, L., ALIFANO, P.** (2007) *Clonothrix fusca* Roze 1896, a Filamentous, Sheathed, Methanotrophic γ -Proteobacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 3556-3565.
- WAKI, M., YASUDA, T., YOKOYAMA, H., HANAJIMA, D., OGINO, A., SUZUKI, K., YAMAGISHI, T., SUWA, Y., TANAKA, Y.** (2009) Nitrogen removal by co-occurring methane oxidation, denitrification, aerobic ammonium oxidation, and anammox. *Applied and Environmental Technology* 84: 977-985.
- WILLISON, T. W., WEBSTER, C.P., GOULDING, K.W.T, POWLSON, D.S.** (1995) Methane oxidation in temperate soils: Effects of land use and the chemical form of nitrogen fertilizer. *Chemosphere* 30: 539-546.
- WISE, M.G., MCARTHUR, J.V., SHIMKETS, L.J.** (1999) Methanotrophic diversity in landfill soil: isolation of novel type I and type II methanotrophs whose presence was suggested by culture-independent 16S rDNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 205-218.
- ZHANG L., SONG CH., ZHANG X., WANG D. A WANG Y.** (2007) Effects of nitrogen on the ecosystem respiration, CH₄ and N₂O emissions to the atmosphere from the freshwater marshes in northeast China *Environmental and Geology* 52: 529 – 539.

ZHENG, Y., ZHANG, L.M., ZHENG, Y.M., DI, H., HE, J.Z. (2008) Abundance and community composition of methanotrophs in a Chinese paddy soil under long-term fertilization practices. *Journal of Soils and Sediments*, 8: 406-414.

ZHOU, X., WANG, F., HUANG, X., TIAN, J. A HAO, Y. (2008) Effect of grazing intensities on the activity and community structure of methane-oxidizing bacteria of grassland soil in Inner Mongolia. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 80: 145-152.

8. ANOTACE

Během let 2009 a 2010 byl na zimovišti skotu ekofarmy v jižních Čechách zkoumán vliv zvířat na společenstvo půdních bakterií oxidujících metan (MOB). Do výzkumu byly zahrnuty vzorky ze 4 odběrů půd ze 4 ploch různě skotem ovlivněných. Pomocí metod DGGE a MISA byly zkoumány rozdíly ve struktuře společenstva MOB mezi jednotlivými plochami. Pomocí metody real time PCR byla provedena kvantifikace společenstva MOB typu I. Pomocí metody CARD-FISH bylo zjištěno procentuální zastoupení a absolutní počty buněk MOB Typu I a Typu II vzhledem ke všem prokaryontním buňkám. Součástí práce bylo hledání optimální modifikace použitých metod.

The long-term cattle impact on soil methanotrophs was investigated at cattle overwintering area located at the ecofarm in the South Bohemia. Four sets of soil samples were sampled in spring and fall of 2009 and 2010. Differences in methanotrophic community structure among experimental sites and were investigated by DGGE and MISA. Real-Time PCR was used for estimation of quantity of Type I methanotrophs. The CARD-FISH method was used to estimate the percentage shared and cell counts of Type I and Type II methanotrophs among all prokaryotic cells. Substantial part of the thesis was focused on optimization of methods used.

9. PŘÍLOHA

- **Elektroforéza**

50× TAE pufr (zásobní roztok):

Bylo naváženo 242 g Tris (Tris ultrapure; AppliChem, Německo) a rozpuštěno cca v 600 ml MilliQ vody. Po rozpuštění bylo v digestoři přidáno 57,1 ml ledové kyseliny octové (99 %, Chemopol Praha ČSR, Lachemia Neratovice) a 100 ml 0.5 M EDTA (návod výše, pH 8,0). pH roztoku bylo upraveno na 7,4-8,0 a roztok byl doplněn do konečného objemu 1 l.

1× TAE pufr (pracovní roztok):

20ml 50× TAE bylo doplněno do 1 l Milli-Q vodou. Výsledná koncentrace je 40 mM Tris-acetát, 1mM EDTA.

1% agarózový gel:

Byl navážen 1 g agarózy a doplněn do 100 ml 1× TAE pufrem. Agaróza byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě. Poté byl roztok za stálého míchání zchlazen pod tekoucí vodou na cca 50 °C a nalit do vaničky. Po nalití gelu byl ihned vložen hřebínek a gel polymeroval minimálně 20 minut. Poté byl hřebínek vyňat a gel byl vložen do vany s 1× TAE pufrem.

Roztok ethidium bromidu:

Do 0,5 l 1× TAE pufru bylo přidáno 20 µl ethidium bromidu.

- **DGGE**

20% APS (amonium persulfát)

Bylo naváženo 0,2 g APS a doplněno MilliQ vodou do objemu 1 ml. Roztok byl rozpipetován a zamražen při -20°C.

Příprava polyakrylamidu		
	Zásobní roztoky	
	0 %	80 %
Močovina	---	50,4 g
Formamid	---	48 ml
50× TAE	3 ml	3 ml
40% Akrylamid/Bisakrylamid	dle žádané koncentrace	
Doplnit MilliQ do objemu	150 ml	150 ml

Tabulka 12: Příprava polyakrylamidových roztoků pro přípravu polyakrylamidových gelů. 100% denaturátem se rozumí 7M močovina a 40% formamid.

1. 10x PBS

4 g NaCl; 0,1 g KCl; 0,762 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O a 0,1 g K₂HPO₄, doplnit MilliQ na 1 l; pH 7,3

2. 20x PBS

8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,524 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O a 0,2 g K₂HPO₄, doplnit MilliQ na 1 l; pH 7,6

3. roztok agarózy

0,1 g agarózy; 50 ml MilliQ vody

4. roztok lysozymu

100 mg lysozymu; 1 ml 0,5 M EDTA; 1 ml 1M Tris-HCl a 8 ml MilliQ vody

5. hybridizační pufr

3,6 ml 5M NaCl; 0,4 ml 1M Tris-HCl; 2 g dextran sulfátu; 4ml formamidu (pro próby M γ 450 a M γ 705) / 6ml formamidu (pro próbu M α 84); 2 ml blokovacího činidla (Roche, Německo); doplnit do 20 ml MilliQ vodou

6. prací pufr

1350 μ l 5M NaCl (pro próby M γ 450 a M γ 705) / 640 μ l 5M NaCl (pro próbu M α 84); 1ml 1M Tris-HCl; 0,5 ml 0,5M EDTA, 25 μ l 20% SDS, doplnit do 50 ml MilliQ vodou

7. zásobní amplifikační pufr

4 g dextran sulfátu; 16 ml 5M NaCl; 2 ml 20x PBS; 0,4 ml 10 % „blocking reagent“; doplnit do 40 ml MilliQ vodou

8. pracovní amplifikační pufr

2 μ l FITC Tyramidu; 10 μ l 100x H₂O₂ a 1 ml zásobního amplifikačního pufru

9. roztok oleje s DAPI

800 μ l Citifluoru AF-1 (Citifluor Ltd, UK) 200 μ l Vectashieldu H-1000 (Vector Laboratories, UK); 50 μ l roztoku 0,01 % DAPI (konečná koncentrace DAPI 5 μ g/ml; 0,0005 %)

• Příprava standardu pro real time PCR

1. tekuté LB médium (Luria Bretani)

1% Trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 1 % NaCl, pH 7

2. tuhé LB médium

- 1 % Trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 1 % NaCl, 1,5 % agar pH 7