

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

2014

Adéla Kráčmarová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Fyziologie a ekologie metanotrofních a metylootrofních
bakterií**

Bakalářská práce

Adéla Kráčmarová

Školitel: Ing. Jiří Bárta, Ph.D

Konzultant: Mgr. Petra Straková, D.Sc

České Budějovice 2014

Kráčmarová A. (2014): Fyziologie a ekologie metanotrofních a metylotrofních bakterií [Physiology and ecology of methanotrophic and methylotrophic bacteria. Bc. Thesis, in Czech.]- 35 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this study was to quantify methanotrophic bacteria from various types and depths of peatlands. By the qPCR method, the presence or absence of methanotrophic bacteria was detected in the peatlands and also the effects of drainage and revitalization on abundance of these bacteria.

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

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

.....
Adéla Kráčmarová

V Českých Budějovicích, 23. 4. 2014

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu bakalářské práce Ing. Jiřímu Bártovi, Ph.D. a konzultantce Mgr. Petře Strakové, D.Sc. za jejich ochotu, trpělivost, cenné připomínky a rady. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Haně Boškové za pomoc během práce v laboratoři a RNDr. Alici Chroňákové, Ph.D. za půjčení laboratorního materiálu. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu během celého studia.

Obsah

1. ÚVOD	1
2. CYKLUS UHLÍKU	2
3. METAN.....	4
4. METYLOTROFNÍ A METANOTROFNÍ BAKTERIE.....	6
4.1. Obecná charakteristika metylotrófních a metanotrófních bakterií	6
4.2. Ekologie metanotrófních a metylotrófních bakterií	8
5. KLASIFIKACE METYLOTROFNÍCH A METANOTROFNÍCH BAKTERIÍ.....	9
6. ENZYMY.....	11
7. METODY KVANTIFIKACE METANOTROFNÍCH BAKTERIÍ	12
7.1. Kvantifikace DNA.....	12
7.2. Stanovení počtu metanotrófních bakterií pomocí kvantitativní real-timePCR (qPCR)	12
8. MATERIÁLY A METODY	14
8.1. Popis lokality a metody odběru vzorků.....	14
8.2. Kvantitativní real-time PCR (qPCR).....	18
9. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	21
9.1. Vliv různých hloubek, typů rašelinišť a lokalit na počet metanotrófních bakterií	21
9.2. Vliv revitalizace a odvodnění na počet metanotrófních bakterií.....	22
10. ZÁVĚRY	25
11. SEZNAM LITERATURY	26
12. SEZNAM ZKRATEK.....	31
13. PŘÍLOHY	32

1. ÚVOD

Stejně jako oxid uhličitý i metan je jeden z nejdůležitějších skleníkových plynů. Značná část metanu může být oxidována metanotrofními bakteriemi, a tudíž může docházet ke snížení emise metanu.

Metanotrofní bakterie patří mezi gram-negativní *Proteobacteria* obsahující vnitřní membránové systémy, které umožňují oxidaci metanu. Tyto bakterie můžeme rozdělit na dvě hlavní skupiny, a to typ I, který se řadí do třídy *Gammaproteobacteria*, a typ II, který se řadí do třídy *Alfaproteobacteria*. Metanotrofní bakterie jsou v přírodě velice rozšířené, lze je najít jak ve vodě, tak v půdě.

Jedním z hlavních zdrojů metanu je rašeliniště. Je to ekosystém, který je trvale zaplaven vodou, a je domovem pro mnoho živočichů a rostlin. Metanotrofní bakterie se v rašeliništi vyskytují zejména na hranici dvou zón. Zóny s dostatkem kyslíku a méně metanu a zóny s nedostatkem kyslíku a více metanu. Avšak na výskytu těchto bakterií v rašeliništi může mít vliv např. typ rašeliniště, chemické složení půdy nebo hloubka půdy.

Cíl práce:

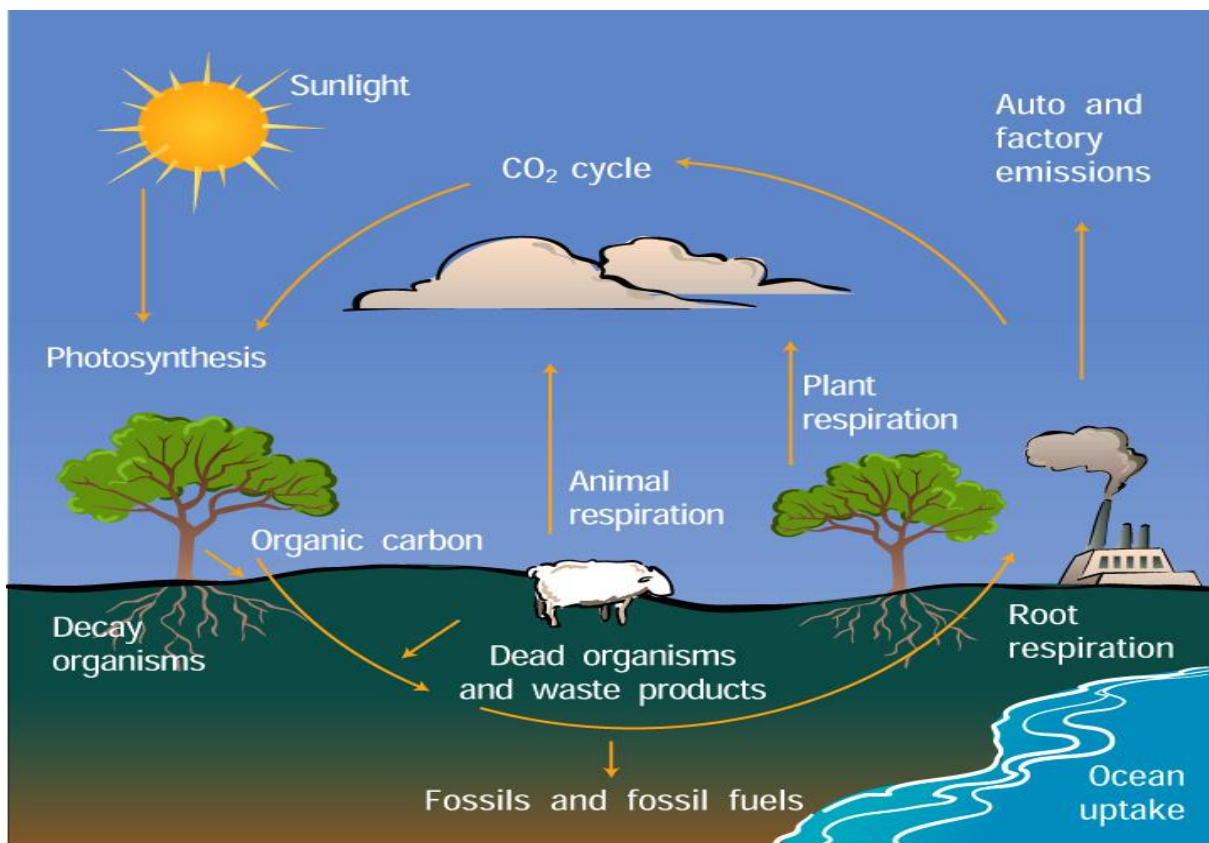
- Provést rešerši o metanotrofních bakteriích
- Kvantifikovat metanotrofní bakterie
 - V různých typech rašelinišť
 - V různých hloubkách rašelinišť
- Zjistit vliv odvodnění a revitalizace v různých typech rašelinišť

2. CYKLUS UHLÍKU

Nejdůležitějším prvkem v biosféře je uhlík, který tvoří základ organických sloučenin a představuje přibližně 40 – 50 % sušiny tkání živých organismů. Nejvíce uhlíku je na Zemi uloženo ve formě fosilních paliv, jako je ropa, uhlí, přírodní plyn nebo rašelina. Zbývající část připadá na živé nebo odumřelé organismy, atmosférický oxid uhličitý (CO_2) nebo rozpuštěný oxid uhličitý ve formě např. normálních a kyselých uhličitany (Klaban, 1999). Globální cyklus uhlíku řídí dva základní procesy, a to fotosyntéza a dýchání. Suchozemské rostliny používají jako zdroj uhlíku pro fotosyntézu atmosférický oxid uhličitý, zatímco vodní rostliny rozpuštěné uhličitany (Townsend et al., 2010).

Biologicky fixovaný uhlík je degradován saprotrofními mikroorganismy až na dvě hlavní plynné formy uhlíku, a to metan (CH_4) a oxid uhličitý (Madigan et al., 2012). Většina půdního uhlíku je přítomna v odumřelém organickém materiálu. CO_2 je z atmosféry fixován především fotosyntézou rostlin a mořských mikroorganismů a vrací se zpět dýcháním zvířat (Obr. 1) a chemoorganotrofními mikroorganismy (Madigan et al., 2012). Metan je v anoxickém prostředí produkován redukcí oxidu uhličitého s vodíkem a z některých organických sloučenin jako je acetát. V tomto prostředí je metan nerozpustný a proudí k oxickému prostředí, kde je oxidován na CO_2 metanotrofními mikroorganismy (Madigan et al., 2012).

Výměna uhlíku mezi atmosférou a vodním prostředím probíhá difúzí přes vodní hladinu, a to vždy ve směru rozdílu relativních koncentrací CO_2 . Uhlík do tohoto prostředí vstupuje i jako hydrogenuhličitán, který se tvoří při zvětrávání hornin bohatých na vápník, jako jsou vápence a křída (Rajchard et al., 2002).



Obr. 1: Schéma cyklu uhlíku

(http://www.windows2universe.org/earth/Water/co2_cycle.html).

Lidská činnost významně přispívá ke vstupu živin (hlavně snadno dostupných zdrojů dusíku a fosforu) do ekosystémů a narušuje místní i globální biogeochemické cykly (Townsend et al., 2010). V posledních 50 letech se zvýšila hladina CO₂ v atmosféře o téměř 20% především spalováním fosilních paliv. Tento nárůst CO₂, hlavního skleníkového plynu, může vést ke zvyšování teploty a ke globálním změnám klimatu (Madigan et al., 2012).

3. METAN

Metan je chemicky poměrně stabilní molekula, ale specifická skupina bakterií, tzv. metanotrofní, ho mohou snadno oxidovat (Madigan et al., 2012). Asi 25% metanu je spojováno s těžbou a spalováním fosilních paliv a biomasy. 69% je výsledkem mikrobiálních procesů a dalších 6% je způsobeno chemickou výrobou metanu z rostlinného materiálu. Většina atmosférického metanu pochází tedy z mikrobiálního metabolismu (Conrad, 2009).

Metan se vyskytuje ve velkém množství v přírodě, je produkován v prostředí bez kyslíku metanogenními *Archaea* a je to jeden z hlavních plynů uvolňující se z močálů, rašelinišť, jezer a intestinálního traktu savců. Velká ložiska metanu se nacházejí na dně moří ve formě hydrátů metanu (Madigan et al., 2012).

Rašeliniště jsou typickým zdrojem metanu. Cyklus metanu v rašeliništích zahrnuje řadu biochemických procesů, které se řídí podle různých chemických, fyzických a biologických faktorů (Lai, 2009). Ekosystém rašelinišť je unikátní v tom, že vrstva rašeliny je více jak 30 cm hluboká. Nejvyšší metanotrofní aktivita v rašeliništích je obvykle v zónách nacházejících se na hranici mezi aerobní a anaerobní zónou, kde poměr substrátu (tedy CH_4) a kyslíku je optimální. Ve větších hloubkách metanotrofní bakterie trpí nedostatkem kyslíku k zahájení oxidační reakce, zatímco v mělkých hloubkách je k dispozici méně metanu pro metanotrofní bakterie. Metanotrofní mikroorganismy mohou oxidovat značnou část metanu, který k nim proudí z anoxických zón, a tudíž výrazně omezit množství metanu uvolněného do atmosféry (Lai, 2009). Tok metanu je řízen několika vzájemně se ovlivňujícími faktory, mezi něž patří i poloha hladiny podzemní vody, která určuje zóny anaerobní a aerobní oxidace. Odvodnění půdy je závažná věc pro celý ekosystém rašelinišť, vedoucí ke změně ve vegetaci, rychlosti rozkladu organické hmoty, ale také ke snížení emisí metanu kvůli změně v kvalitě a kvantitě organického substrátu pro metanogenní *Archaea* a zvýšené oxidaci metanu metanotrofními bakteriemi. Produkce metanu je po odvodnění půdy snížena, neboť s hloubkou rašeliny klesá kvalita uhlíku. Na druhou stranu při zaplavení rašelinišť je emise metanu zvýšená (Urbanová, 2013).

Většina metanu, produkovaného ve vodních sedimentech, oxiduje na povrchu sedimentu nebo ve vodním sloupci aerobními metanotrofními bakteriemi a malé množství metanu uniká do atmosféry. Metan může být důležitým zdrojem energie pro metanotrofní bakterioplankton a potravní řetězec. Studie z posledních deseti let ukazují, že mnoho

metanotrofních organismů slouží jako důležitý zdroj potravy pro zooplankton a larvy hmyzu (Conrad, 2009).

4. METYLOTROFNÍ A METANOTROFNÍ BAKTERIE

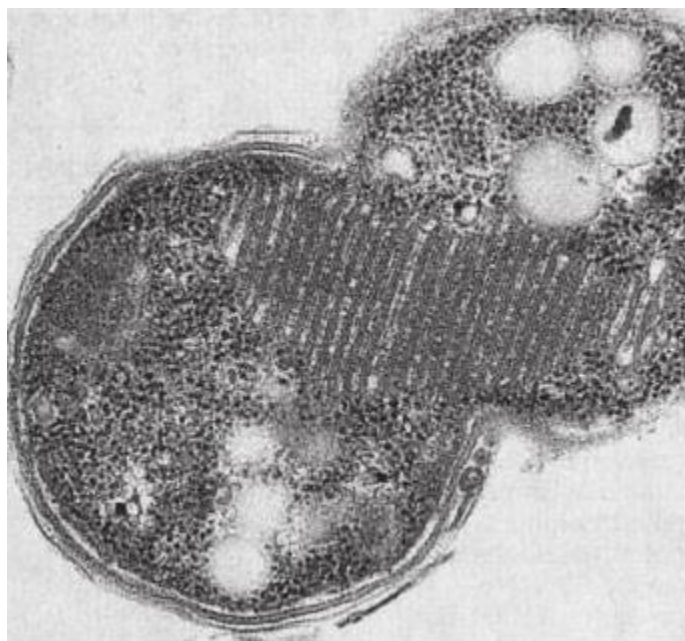
4.1. Obecná charakteristika metyloforních a metanoforních bakterií

Metanoforní bakterie jsou skupinou gram-negativních mikroorganismů, které mají schopnost využívat metan jako jediný zdroj uhlíku a energie. Podskupinou metanofornů jsou metyloforní bakterie, které jsou významné růstem na metanolu a dalších metylovaných sloučeninách, ale ne na metanu (Lidstrom, 2006).

Podobně jako metanoforní bakterie, jsou metyloforní bakterie hojně rozšířené a lze je najít jak v suchozemském, tak i vodním prostředí (King, 1992).

Velké množství známých kmenů metyloforních bakterií jsou obligátně metyloforní druhy, které nejsou schopné růst na sloučeninách s C-C vazbou. Avšak, zejména skupina bakterií rostoucích na metanolu a fakultativně metyloforní organismy mohou růst na víceuhlíkatých sloučeninách jako je cholin nebo pesticid karbofuran (Hanson and Hanson, 1996).

Metanoforní bakterie jsou charakteristické přítomností specifického vnitřního membránového systému (Hanson and Hanson, 1996). Membrány u metanoforních bakterií typu I jsou uspořádány jako svazky diskově tvarovaných váčků umístěných po celé buňce (Obr. 2). Na druhou stranu zástupci typu II mají membránu podél periferie buňky. Klíčový enzym pro metanofory, metan monooxygenáza, se nachází právě v těchto membránách (Medigan et al., 2012). Obsahují také metan oxidující organelu, což je cytoplasmatický prostor ohraničený membránou, kde se nachází enzymy. Zde také probíhá přenos elektronů v systému specifických enzymů pro katabolismus metanu (<http://biograph.be/concept/graph/C2752521/C1166869>).



Obr. 2: Zástupce metylotrofních bakterií *Methylococcus capsulatus* (typ I) charakteristickým svým unikátním membránovým systémem (Madigan et al., 2012).

Metylotrofní bakterie jsou určitým způsobem blízké chemolitotrofním bakteriím, hlavně nitrifikačním bakteriím. Bylo také např. prokázáno, že metylotrofové oxidují i CO na CO₂, což pro ně ale nemá fyziologický význam, a vysvětlením může být, že metanová monooxygenáza neodlišuje CO od CH₄ (Kaprálek, 1986).

Metanotrofní bakterie jsou schopné oxidovat amoniak, avšak nemůžou růst chemolitotroficky užitím amoniaku jako jediným elektronovým donorem. Oxidací amoniaku navíc metanotrofní bakterie převádějí toxický amoniak na nitrát, který posléze mohou využít jako zdroj dusíku (Madigan et al., 2012).

Tyto bakterie a určité druhy mořských škeblí a hub vytváří symbiotický vztah. Některé škeble žijí na mořském dnu, v místě, kde je metan uvolňován v malém množství. Izolované tkáně ve škeblích konzumují metan vysokou rychlostí v přítomnosti kyslíku. V těchto tkáních se nachází bakterie ve tvaru koku ve velkém množství. Bakteriální symbionti obsahují vnitřní membránový systém bakterií typu I (Madigan et al., 2012).

4.2. Ekologie metanotrofních a metylotrofních bakterií

Metanotrofní bakterie jsou aerobní bakterie využívající jedno uhlíkaté sloučeniny (Hanson and Hanson, 1996).

Metylotrofní bakterie jsou poměrně rozšířené v přírodě (King, 1992). Obývají širokou škálu vodních i suchozemských prostředí různé teploty, salinity a pH (Trotsenko and Khmelenina, 2002). Vyskytují se např. v močálech, řekách, rýžových polích, rašeliništích, oceánech, rybnících, skládkách a půdách (Hanson and Hanson, 1996). Metanotrofní bakterie se také vyskytují jako symbionti ve škeblích a *Pogonophora* (Distel and Cavanaugh, 1994).

Metylotrofní mikroorganismy se podílejí i na cyklu uhlíku v přírodě, kde je přeměněný CO₂ na metan metanogenními bakteriemi oxidován zpět na CO₂ (Klaban, 1999).

Je dokázáno, že metanotrofní bakterie typu I se vyskytují zejména ve vodním prostředí, zatímco typu II v půdách (Singh, 2007). Podle Hansona a Hansona (1996), jsou obě skupiny bakterií přizpůsobeny k přežití v různých podmínkách. Metanotrofní bakterie typu I jsou nejlépe přizpůsobeny růstu při nízké koncentraci metanu, na druhou stranu růst metanotrofních bakterií typu II je upřednostňován při vysoké koncentraci metanu a nízké hladině dusíku, kyslíku a mědi.

Bakteriální symbionti se nachází ve vakuolách živočišných buněk, kde je zajišťována výměna plynů a mořské vody (Madigan et al., 2012).

Většina metanotrofních bakterií je mezofilních a neutrofilních. Znamená to, že optimální teplota pro růst je 25°C a pH 6-7. Avšak mnoho z těchto bakterií je schopno odolat a přizpůsobit se různým extrémním podmínkám. U extrémních zástupců rozlišujeme zástupce extremofilní, kteří extrémní podmínky vyžadují, a extremotolerantní, kteří jsou schopni jim odolat, ale nevyžadují je (Trotsenko a Khmelenina, 2002). Příkladem extremotolerantních je např. kmen *Methylococcus capsulatus*, který roste za aerobních podmínek na minerálních půdách v teplotním rozmezí 30-50 °C. Růstové optimum je při 37°C (Rosypal a kol., 1981). Opačným případem jsou bakterie psychrofilní a psychrotolerantní, které se vyskytují v prostředí s nízkými teplotami (Trotsenko a Khmelenina, 2002).

5. KLASIFIKACE METYLOTROFNÍCH A METANOTROFNÍCH BAKTERIÍ

Většina metanotrofních bakterií spadá do kmene *Proteobacteria* (Dunfield et al., 2007). Dnes jsou metanotrofní bakterie klasifikovány do dvou hlavních skupin na základě jejich vnitřní buněčné struktury, fylogeneze a asimilační uhlíkové cesty. Typ I asimilují jedno-uhlíkaté sloučeniny přes ribuloso monofosfátový cyklus a fylogeneticky se řadí do třídy *Gammaproteobacteria*. Do této skupiny patří druhy jako *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylomicrobium*, *Methylosphaera* a *Methylocaldum*. Oproti tomu metanotrofní typu II asimilující C₁ meziprodukty přes serinový cyklus a patří do třídy *Alphaproteobacteria* (Tab. I). Do této skupiny patří např. druhy *Methylosinus*, *Methylocystis* a *Methylocella* (Madigan et al., 2012). V tabulce I jsou ukázány některé druhy metanotrofních bakterií a jejich charakteristika.

Tab. I: Vybrané druhy metanotrofních bakterií a jejich vlastnosti (Madigan et al., 2012).

Organismus	Fylogenetická skupina	Vnitřní membrány	Asimilační cesta	N ₂ fixace
<i>Methylomonas</i>	<i>Gama</i>	I	Ribuloso monofosfátová	Ne
<i>Methylomicrobium</i>	<i>Gama</i>	I	Ribuloso monofosfátová	Ne
<i>Methylobacter</i>	<i>Gama</i>	I	Ribuloso monofosfátová	Ne
<i>Methylococcus</i>	<i>Gama</i>	I	Ribuloso monofosfátová a Kelvinův cyklus	Ano
<i>Methylosinus</i>	<i>Alfa</i>	II	Serinová	Ano
<i>Methylocystis</i>	<i>Alfa</i>	II	Serinová	Ano
<i>Methylocella</i>	<i>Alfa</i>	II	Serinová	Ano
<i>Methylacidiphilum</i>	<i>Verrucomicrobiaceae</i>	Membránové váčky	Serinová a Kelvinův cyklus	Ano

Obě skupiny metanotrofních bakterií obsahují rozsáhlé vnitřní membránové systémy pro oxidaci metanu (Madigan et al., 2012).

Metanotrofní bakterie typu I jsou také charakterizovány absencí enzymu α -ketoglutarát dehydrogenázy v citrátovém cyklu, zatímco organismy typu II tento enzym nepostrádá. Nepřítomnost tohoto enzymu vede ke zmenšení schopnosti organismu růst chemoorganotrofně, a v důsledku toho zabraňuje růstu mnoha organických sloučenin,

protože reakce cyklu jsou velmi důležité pro tvorbu NADH. To by mohl být hlavní důvod, proč metanotrofní bakterie typu I jsou obligátně metylotrofní bakterie (Madigan et al., 2012).

Před několika lety byl objeven nový druh metanotrofní vláknité bakterie *Crenothrix polyspora* (Stoecker et al., 2006). Stejně tak *Clonothrix fusca* byla popsána jako metanotrofní bakterie (Vigliotta et al., 2007). Jednalo se o překvapivé objevy, jelikož vláknité bakterie konzumující metan nebyly známy. Tyto nově objevené bakterie jsou úzce podobné bakteriím typu I (McDonald et al., 2008). Nedávno byl objeven i kmen *Verrucomicrobia* v horkých oblastech (Dunfield et al., 2007; Pol et al., 2007; Islam et al., 2008), který je schopen oxidace metanu v extrémě acidofilním prostředí. *Verrucomicrobia* byla zjištěna u 99% analyzovaných vzorků půdy a představuje v průměru 23% ribosomální RNA (rRNA) sekvence (Freitas et al., 2012). Další nově objevená denitrifikační metanotrofní bakterie *Candidatus methylomirabilis oxyfera* ve sladké vodě s obohacenými kulturami (Wu et al., 2012) vyvinula nový způsob, jak žít na metanu. Kombinuje anaerobní oxidaci kyslíku denitrifikací s normálním dýcháním přes nově objevené vnitřní aerobní cesty pro výrobu kyslíku (Wu et al., 2012).

6. ENZYMY

Enzym, který oxiduje metan na metanol u metanotrofních bakterií, je nazýván metan monooxygenáza (MMO). Jsou známy dva druhy enzymů, a to membránová MMO (pMMO), která představuje formu vázající se na membránu, a cytoplasmatická MMO (sMMO), která se nachází v cytoplasmě buněk (Lidstrom, 2006).

SMMO byla nalezena pouze u několika metylotrofních kmenů (např. u kmene *Methylosinus*, *Methylococcus*, *Methylomonas*, *Methylomicrobium* a *Methylocystis*) (Lidstrom, 2006), u metanotrofních bakterií je nejlépe prostudována u zástupce *Methylococcus capsulatus* (Medigan et al., 2012). SMMO byla purifikována z metanotrofů I i II. Tato MMO se skládá ze tří složek: hydroxylázy (obsahuje tři polypeptidy), komponent B a reduktázu, která obsahuje flavin adenin dinukleotid- FAD (Lidstrom, 2006).

pMMO je vysoce nestabilní a vyskytuje se ve všech dosud známých kmenech metanotrofních bakterií (Lidstrom,2006).

U metanotrofních bakterií, které obsahují pMMO i sMMO, je exprese každého enzymu regulována mědí. Při dostatku mědi je vyjádřena pMMO a při nedostatku sMMO. Např. u *Methylococcus capsulatus* a *Methylosinus trichosporium* bylo prokázáno, že tato regulace se již vyskytuje na úrovni transkripce (Nielsen et al., 1997).

7. METODY KVANTIFIKACE METANOTROFNÍCH BAKTERIÍ

7.1. Kvantifikace DNA

Kvantifikace DNA, tedy stanovení jejího množství v izolátu, je žádoucí zejména tehdy, pokud pracujeme se vzorky, u nichž je někdy velmi obtížné množství přítomné DNA odhadnout. Přesné stanovení je často důležité pro úspěšnost další analýzy. Kvantifikační metody můžeme rozdělit na nespecifické a specifické. Pomocí nespecifických metod lze stanovit množství veškeré DNA v izolátu, tedy tzv. celkovou DNA. Specifickými metodami lze kvantifikovat pouze určitý typ DNA (Rak a kol., 2008).

7.2. Stanovení počtu metanotrofních bakterií pomocí kvantitativní real-timePCR (qPCR)

Polymerázová řetězová reakce je *in vitro* metoda, která se využívá pro enzymatickou syntézu specifické DNA sekvence. Tato metoda využívá opakovaných cyklů denaturace templátu, nasednutí primerů a polymerázu k amplifikaci specifické sekvence DNA, stanovenou oligonukleotidovými primery (Landre et al., 1995). Oligonukleotidové primery hybridizují vlákna na opačných stranách a vyznačují oblasti cílové DNA. Tyto oligonukleotidy nasedají na oddělené templátové DNA vlákno (Erlich, 1989). Použití termostabilní DNA polymerázy, jako je *Taq* z *Thermus aquaticus*, umožňuje opakovat cykly zahřívání při vysokých teplotách nutné pro denuraci bez přidávání většího množství enzymů v každém cyklu (Landre et al., 1995). *Taq* DNA polymeráza má také relativně vysoké teplotní optimum pro DNA syntézu (75°C- 80°C) (Landre et al., 1995).

Kvantitativní real-time PCR (qPCR) je přesná a vysoce propustná metoda. QPCR je detekce a měření produktů vytvořených během každého cyklu PCR. Užívá se fluorescenční barvivo. To se váže pouze na dvouvláknovou DNA vyzařující po excitaci fluorescence, kterou lze detekovat. QPCR je široce rozšířená metoda používaná v biologii k přesné kvantifikaci specifických genů nebo jejich exprese (Grinzinger, 2002). U metanotrofních bakterií se používá specifický gen *pmoA* pro metan monooxygenázu.

Při kvantifikaci např. denitrifikačních genů se využívají zpravidla degenerované primery, tím roste pravděpodobnost tvorby primerových dimerů při fluorescenčním vyhodnocování po každém cyklu, které mohou ovlivňovat míru fluorescence produktů reakce (Brownie et al., 1997). Protože primery jsou přítomny při vysokých koncentracích,

mohou mezi nimi vznikat slabé interakce. Primerové dimery mohou vytvářet směsi artefaktů, které se často zaměňují s výtěžkem specifické PCR, tedy vedou k zakrytí skutečných výsledků kvantitativních metod PCR (Brownie et al., 1997).

8. MATERIÁLY A METODY

8.1. Popis lokality a metody odběru vzorků

Porovnávali jsme půdy z různých lokalit. Jednou z lokalit je Lakkasuo, vrchovištní komplex nacházející se ve Středním Finsku (61°48'N, 24°19'E) v nadmořské výšce 150 m n.m.. Tento komplex zahrnuje minerotrofní lagg-okrajovou část rašeliniště. Ročně v této oblasti spadne 710 mm srážek, z toho asi 1/3 ve formě sněhu. Půda byla odebrána z těchto částí (Jaatinen et al., 2007):

- BOG P-přirozené ombrotrofní vrchoviště
 - BOG L-dlouhodobě odvodněné vrchoviště
 - BOG S-krátkodobě odvodněné vrchoviště
- FEN P-přirozené minerotrofní (mezotrofní) slatiniště
 - FEN L- dlouhodobě odvodněné slatiniště
 - FEN S- krátkodobě odvodněné slatiniště

V původní ombrotrofní části jsou významné zástupci mechu jako např. *Pleurozium schreberi* nebo *Aulacomnium palustre*. V původní minerotrofní části lze nalézt zástupce jako např. *Sphagnum flexuosum* nebo *Carex rostrata* (Jaatinen et al., 2007). Dlouhodobé odvodnění způsobilo změny ve vegetaci. Ombrotrofní vrchoviště pokrývají stromové porosty jako např. *Pinus sylvestris* a mezotrofní slatiniště např. *Betula pubescens* a *Picea abies*.

V tabulce II jsou znázorněny fyzikálně-chemické vlastnosti rašeliny ve Finsku.

Tab. II: Fyzikálně-chemické vlastnosti rašeliny přirozené a dlouhodobě odvodněné ve Finsku (Peltoniemi, 2010).

	BOG P	BOG L	FEN P	FEN L
Celkem C (%)	48,97	50,40	44,70	48,80
Celkem N (%)	0,87	1,48	2,11	1,52
Celkem P (%)	0,017	0,081	0,085	0,070
Podzemní voda (cm)	-10,0	-23,0	5,0	-27,0
pH vody	4,4	3,7	5,9	3,6

Další druhy vzorků pocházejí z rašelinišť z Národního parku Šumava v České republice. Tato lokalita se skládá ze dvou typů rašelinišť, které byly ovlivněny antropogenními vlivy (Urbanová et al., 2012):

- BOG P-přirozené vrchoviště
 - BOG L-odvodněné vrchoviště
- FEN P-přirozené minerotrofní slatiniště
 - FEN L-odvodněné minerotrofní slatiniště

BOG P (48° 58' 34" N, 13° 27' 24" E) se nachází 1200 m n.m. na centrální náhorní plošině Šumavy. Klima náhorní plošiny je studené a vlhké s průměrnou roční teplotou 3,2°C a součtem srážek 1300 mm/rok. Ostatní tři místa (BOG L-49° 10' 59" N, 13° 19' 6" E; FEN P- 49° 9' 19" N, 13° 22' 8" E; FEN L-49° 10' 46" N, 13° 19' 22" E) se nachází v nadmořské výšce 900 m n.m. v údolí řeky Křemelná. Klima v této lokalitě je mírnější. Průměrná teplota se pohybuje cca 4°C/rok a spadne zde cca 1000 mm/rok (Urbanová et al., 2012).

V původním vrchovišti rostou zástupci jako např. *Vaccinium uliginosum* nebo *Sphagnum rubellum*. Původní minerotrofní slatiniště tvoří zástupci jako *Carex rostrata*. Po odvodnění vrchoviště *Betula pubescens* pokrývá celou plochu. Dále se v odvodněném prostředí vyskytují zástupci mechu *Polytrichum strictum* a *Sphagnum russowii*. V odvodněném minerotrofním slatiništi se vyskytuje *Carex rostrata* nebo *Molina caerulea* (Urbanová et al., 2012).

V tabulce III jsou znázorněny fyzikálně-chemické vlastnosti rašeliny ze Šumavy.

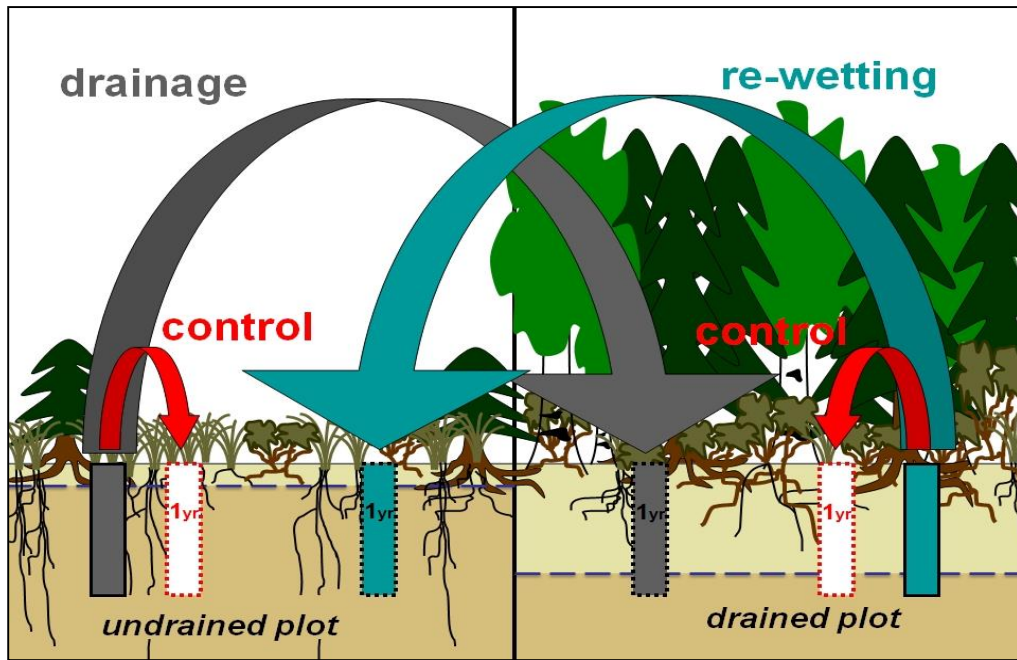
Tab. III: Fyzikálně-chemické vlastnosti rašeliny přirozené a odvodněné na Šumavě (Urbanová et al., 2012).

	BOG P	BOG L	FEN P	FEN L
Celkem C (%)	47,90	48,40	43,40	32,80
Celkem N (%)	1,86	1,42	1,72	1,50
Celkem P (%)	0,06	0,06	0,10	0,13
Podzemní voda (cm)	-9,4	-21,2	-6,5	-30,6
pH vody	4,2	4,2	5,7	4,6

Manipulativní experimenty ve Finsku a České republice byly provedeny v rámci projektu Petry Strakové. Pro bakalářskou práci bylo mým úkolem provedení kvantifikace DNA a qPCR z této půdy. Byly odebrány profily rašeliny do hloubky 50 cm. Po nasekání plátků rašeliny po 10 cm (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 cm) byl každý plátek zvážen a vložen do speciálního sáčku z jemné síťoviny (tzv. dekompoziční experiment). Připravené sáčky s rašelinou byly zandány zpět do stejné hloubky, ze které byla rašelina vytažena. Odběr vzorků se tedy vztahoval jak na oxickou tak anoxickou vrstvu půdy. Jeden soubor sáčků byl vytažen po roce-podzim 2013, druhý soubor sáčků bude vytažen další rok podzim 2014 (Straková, 2013).

V České republice byl použit následující experimentální návrh (Obr. 3):

- Rašelina z původního (neodvodněného) rašeliniště byla přenesena do odvodněného rašeliniště = Drainage effect
- Rašelina z odvodněného rašeliniště byla přenesena do původního (neodvodněného) = Re-wetting
- Rašelina ponechána v původních podmínkách pro kontrolu

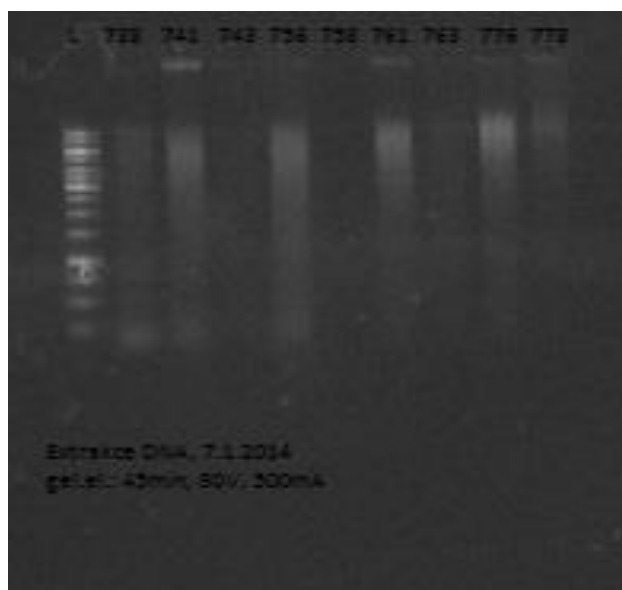


Obr. 3: Experimentální návrh pro Šumavu (©Straková, 2013).

8.2. Kvantitativní real-time PCR (qPCR)

Extrakce DNA z půdy byla provedena podle postupu Urich et al. (2008). Práce obsahovala i menší modifikace. Lyofilizované vzorky byly naváženy v rozmezí 0,045-0,055g. Po přidání 700 μ l extrakčního pufru byly vzorky dány do třepačky (Labnet Vortex VX 100) na 30 minut. Vzorky byly zkontrolovány a k těm, které byly nedostatečně navlhčené, bylo přidáno opět cca 200 μ l extrakčního pufru. Po napipetování 700 μ l fenol chloroformu (pH 6,7) byl přidán krok zahrnující 30 sekund bead-beatingu (Mini Bead Beater, Biospec Products, USA). Další kroky byly provedeny podle publikovaného postupu.

Gelovou elektroforézou, metodou pro separaci a analýzu makromolekul a jejich fragmentů na základě jejich velikosti a náboji, byla zjištěna úspěšnost izolace DNA (Příloha1). Elektroforéza probíhala na 1% agarosovém gelu 45 minut při 90 V a 500mA (Obr. 4). Množství izolované DNA bylo kvantifikováno fluorescenčně pomocí SybrGreen podle postupu Leininger et al. (2006).



Obr. 4: Příklad extrahované DNA z vybraných vzorků na agarosovém gelu. Pořadí vzorků: L-marker, vzorek 738-778.

Pomocí qPCR byl stanoven obsah genu *pmoA*, přítomný u metanotrofních bakterií. Po neúspěšném pokusu vytvoření PCR standardů z bakterie *Methylobacter luteus*, byl pro

stanovení kalibrační křivky pomocí gradientové PCR použit standard, environmentální klon, který byl připraven Alicí Chroňákovou v rámci projektu (GACR 526/09/1570: Spots of methane production and consumption in terrestrial ecosystem: key for understanding methane turnover, 2009-2013) klonováním (TA Cloning kit, Invitrogen) genu pmoA amplifikovaného z DNA pastevní půdy, za pomoci primeru A189-F a Mb661-R, do linearizovaného plazmidu pCR 2.1-Invitrogen (Nítkulincová, 2011). Kalibrační křivka standardu byla vytvořena pomocí klasické PCR, která probíhala za těchto podmínek: iniciační fáze denaturace při 95°C po dobu 3 minut, 35 cyklů denaturace při 95°C po dobu 25 sekund, nasedání primerů při 57°C po dobu 20 sekund, syntéza řetězců při 72°C po dobu 45 sekund a elongace při 72°C po dobu 8 minut. Úspěšnost amplifikace a velikost produktu byla ověřena gelovou elektroforézou. Z produktu byly desítkovým ředěním vytvořeny standardy (10^{-1} - 10^{-8}). Po otestování kalibrační křivky qPCR byla zkontrolována velikost požadovaného produktu gelovou elektroforézou. Na základě výsledků bylo vybráno vhodné ředění, které se využívalo pro kvantifikaci reálných vzorků.

Postup metody qPCR byly převzaty z práce Kolb et al., (2003) s malými odchylkami. V MasterMixu qPCR (Tab. III) byly použity degenerativní primery (5'-3'): A 189-F primer (GGNGACTGGGACTTCTGG) a Mb661-R primer (GGTAARGACGTTGCNCCGG). Koncentrace použitých primerů byla 50uM. Složení MasterMixu je v tabulce IV.

Tab. IV: Složení MasterMixu qPCR pro jeden vzorek.

	MasterMix (μl)
voda	7,62
FastStartSybrGreenMix	10,00
Primer A189-F (50uM)	0,24
Primer Mb661-R (50uM)	0,24
BSA	0,40
DMSO	0,50

Do jedné destičky (48 vzorků) bylo postupně rozpipetováno 19 μl MasterMixu, poté do dvou vzorků byl přidán 1 μl PCR vody (negativ), do dalších vybrané standardy (10^{-1} - 10^{-5}) a do ostatních vzorků 1 μl DNA templátu. Vše bylo napipetováno ve dvou opakováních. Amplifikace úseků DNA byla prováděna na přístroji StepONE RealTime PCR System

(AppliedBiosystems, USA). Velikost požadovaného produktu byla ověřena gelovou elektroforézou.

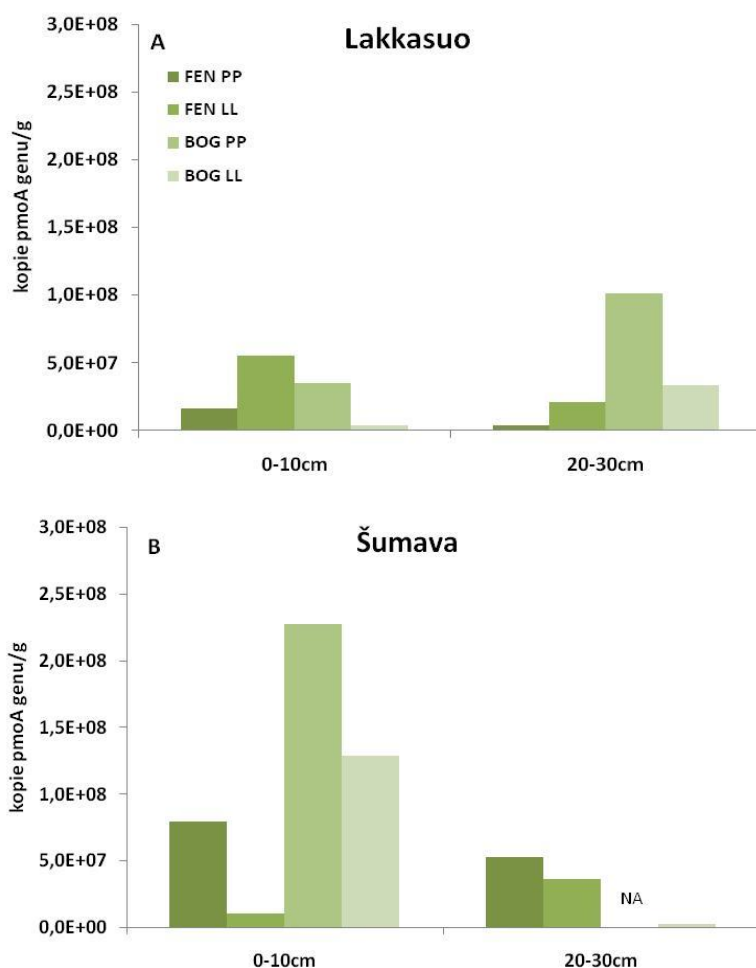
Pro shrnutí a vyhodnocení naměřených dat při kvantifikaci a qPCR byly využity softwary Microsoft Office Excel a StepOne Software v2.3.

9. VÝSLEDKY A DISKUSE

9.1. Vliv různých hloubek, typů rašelinišť a lokalit na počet

metanotrofních bakterií

Na Obr. 5A,B je znázorněno průměrné zastoupení metanotrofních bakterií ve dvou typech rašeliniště ze dvou lokalit (Lakkasuo, Šumava) a dvou hloubek. Vzorky z přirozeného rašeliniště (PP) byly vloženy zpět do přirozeného prostředí a vzorky z odvodněné rašeliny do odvodněného prostředí (LL). Tyto varianty tedy sloužily jako kontrola.



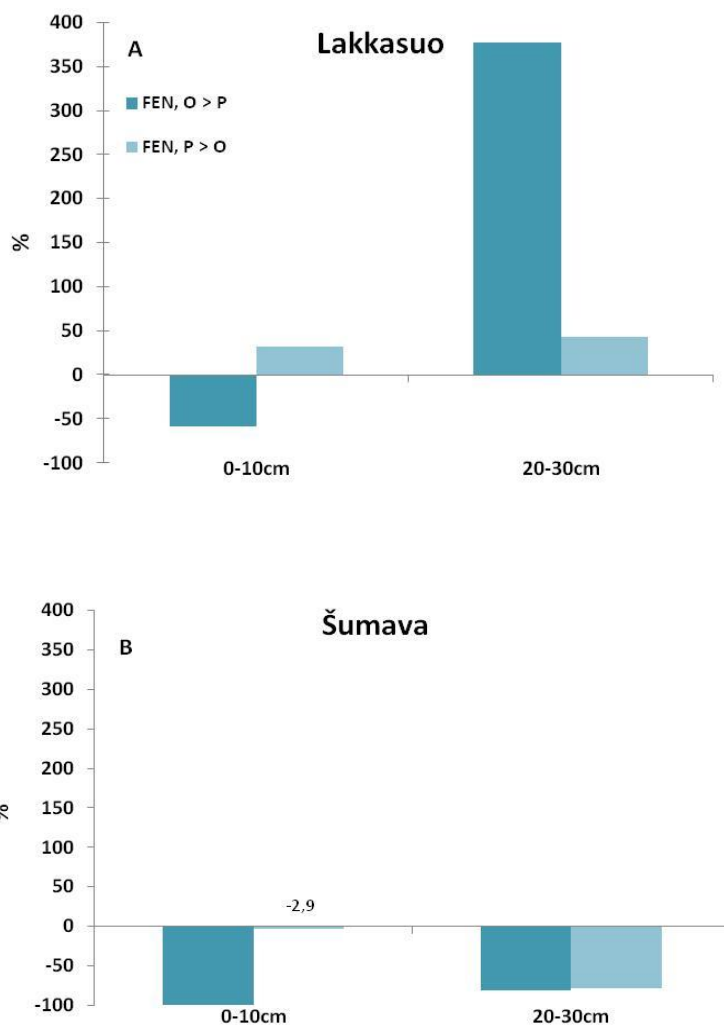
Obr. 5: Počet metanotrofních bakterií vyjádřený v kopiích genu pmoA na gram půdy v lokalitě Lakkasuo a Šumava. PP-přirozené rašeliniště, LL-dlouhodobě odvodněné rašeliniště, NA-neanalyzováno.

Metanotrofní bakterie potřebují více kyslíku, měly by se tedy pohybovat ve větším množství na rozmezí mezi aerobní a anaerobní zónou, tj. zhruba na úrovni hladiny spodní vody. Na Obr. 5A můžeme vidět, že se v Lakkasuo metanotrofní bakterie nachází v obou hloubkách. V přirozeném minerotrofním (mezotrofním) rašeliništi (FEN PP) a dlouhodobě odvodněném rašeliništi (FEN LL) počet metanotrofních bakterií konzistentně klesá s hloubkou, zatímco v přirozeném vrchovišti (BOG PP) a dlouhodobě odvodněném vrchovišti (BOG LL) je počet metanotrofních bakterií vyšší ve větší hloubce (20-30 cm).

Na šumavských lokalitách (Obr. 5B) je ve FEN rašeliništi hladina vody nižší (cca 10 cm) než na finské lokalitě Lakkasuo, tedy v přirozeném rašeliništi (FEN PP) množství metanotrofních bakterií pokleslo s hloubkou, naopak u dlouhodobě odvodněného rašeliniště (FEN LL) se zvýšil počet bakterií ve větší hloubce. V BOG rašeliništi se počet metanotrofních bakterií snížil ve větší hloubce. Více metanotrofních bakterií se vyskytuje ve svrchní části rašeliniště, bakterie nebyly detekovány ve spodní vrstvě. Důvodem může být větší kolísání hladiny vody.

9.2. Vliv revitalizace a odvodnění na počet metanotrofních bakterií

Na Obr. 6A,B je znázorněn relativní úbytek či nárůst množství metanotrofních bakterií po manipulaci s půdou z odvodněného prostředí do přirozeného nebo z přirozeného prostředí do odvodněného. Porovnávala se pouze minerotrofní rašeliniště (FEN), pro která byla dostupná naměřená data.



Obr. 6: Vliv revitalizace a odvodnění na relativní změnu v počtu metanotrofních bakterií. O-odvodněné rašeliniště, P-přirozené rašeliniště, O > P-přenesení z odvodněné plochy na přirozenou, P > O-přenesení z přirozené plochy na odvodněnou.

Na Obr. 6A můžeme pozorovat, že na lokalitě Lakkasuo po přenesení z odvodněného prostředí do prostředí přirozeného ve svrchní vrstvě počet metanotrofních bakterií ubyl (o 59%), zatímco ve spodní vrstvě se množství metanotrofních bakterií výrazně zvýšilo (o 378%). Při přenosu půdy z přirozeného prostředí do prostředí odvodněného se počet metanotrofních bakterií ve svrchní a spodní vrstvě zvýšil.

Na lokalitě na Šumavě (Obr. 6B) po přenosu půdy z odvodněného prostředí z vrchní vrstvy do vrchní vrstvy přirozeného rašeliniště, metanotrofní bakterie vymizely (úbytek o 100 %) a i ve spodní vrstvě došlo k výraznému úbytku počtu bakterií o 80%. Po přenosu

půdy z přirozeného prostředí do odvodněného množství metanotrofních bakterií pokleslo jak ve svrchní (2,9%), tak ve spodní vrstvě (78%).

Můžeme tedy říci, že množství metanotrofních bakterií v obou lokalitách výrazně ubylo po přenesení z odvodněného na přirozené rašeliniště. Po přenesení rašeliny z přirozené plochy na odvodněnou plochu ve svrchní vrstvě finského i šumavského rašeliniště by mohlo dojít k nárůstu počtu metanotrofních bakterií okysličením půdy po odvodnění, avšak k nárůstu došlo pouze na finském rašeliništi. Pokles metanotrofních bakterií v šumavském rašeliništi může být způsoben např. kolísáním hladiny spodní vody, která může mít vliv i na metanogenní Archaea, které byly studovány v bakalářské práci Lísalová, (2014). Počet těchto Archaeí ve svrchní vrstvě šumavského rašeliniště poklesl o 63% i v důsledku okysličení půdy.

10. ZÁVĚRY

Metanotrofní bakterie se většinou vyskytují ve svrchních vrstvách půdy díky větší potřebě kyslíku, a nejvíce na rozhraní spodní vody, protože potřebují přísun metanu od metanogenních Archeae. Ovšem naše data ukazují, že mohou být poměrně početné i ve spodních vrstvách rašelinišť. Výskyt metanotofních bakterií může být významně ovlivněn chemickým složením půdy, hloubkou a typem rašeliniště.

11. SEZNAM LITERATURY

Brownie, J., Shawcross, S., Theaker, J., Whitcombe, D., Ferrie, R., Newton, C., Little, S. (1997). The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Research* 25, 3235-3241.

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

Distel, D.L., Cavanaugh, C.M. (1994). Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbioses in marine bivalves. *Journal of Bacteriology* 176, 1932-1938.

Dunfield, P.F., Yuryev, A., Senin, P., Smirnova, A.V., Stott, M.B., Hou, S., Ly, B., Saw, J.H., Zhou, Z., Ren, Y., Wang, J., Mountain, B.W., Crowe, M.A., Weatherby, T.M., Bodelier, P.L.E., Liesack, W., Feng, L., Wang, L., Alam, M. (2007). Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum Verrucomicrobia. *Nature* 450, 879-882.

Erlich, H.A. (1989). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Immunology* 9 (6), 437-438.

Freitas, S., Hatosy, S., Fuhrman, J.A., Huse, S.M., Welch, D.B.M., Sogin, M.L., Martiny, A.C. (2012). Global distribution and diversity of marine Verrucomicrobia. *The ISME Journal* 6, 1499-1505.

Grinzinger, D.G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30, 503-512.

Hanson, R.S., Hanson, T.E. (1996). Methanotrophic Bacteria. *Microbiological Reviews* 60, 439-471.

Islam, T., Jensen, S., Reigstad, L.J., Larsen, O., Birkeland, N.K. (2008). Methane oxidation at 55°C and pH 2 by a thermoacidophilic bacterium belonging to the Verrucomicrobia phylum. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 105, 300–304.

Jaatinen, K., Fritze, H., Laine, J. & Laiho, R. (2007). Effects of short- and long-term water-level drawdown on populations and activity of aerobic decomposers in a boreal peatland. *Global Change Biology* 13, 491-510.

Kaprálek, F. (1986). Vstup ostatních organických látek do katabolismu. Energetický metabolismus chemoorganotrofních bakterií. Státní pedagogické nakladatelství. Praha.

King, G.M. (1992). Ecological aspects of methane oxidation, a key determinant of global methane dynamics. *Microbial Ecology* 12, 431-474.

Klaban, V. (1999). Cyklus uhlíku v přírodě. Svět mikrobů-Malý mikrobiologický slovník. Gaudeamus. Hradec Králové.

Kolb, S., Knief, C., Stubner, S., Conrad, R. (2003). Quantitative Detection of Methanotrophs in Soil by Novel pmoA-Targeted Real-Time PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (5), 2423-2429.

Lai, D.Y.F. (2009). Methane Dynamics in Northern Peatlands: A review. *Pedosphere* 19 (4), 409-421.

Landre, P.A., Gelfand, D.H., Watson, R.M. (1995). The use of cosolvents to enhance amplification by the polymerase chain reaction. PCR strategies. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. (Eds). Academic Press. California.

Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W. et al. (2006). Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442, 806-809.

Lidstrom, M.E. (2006). Aerobic Methylophilic Prokaryotes. *The Prokaryotes Volume 2* (Third Edition). Dworkin, M., et al. (Eds). Springer. New York.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. (2012). Brock biology of Microorganisms (13th edition). Pearson Education (Ed). San Francisco.

McDonald, I.R., Bodrossy, L., Chen, Y., Murrell, J.C. (2008). Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs. Applied and Environmental Microbiology 74, 1305-1315.

Nielsen, A.K., Gerdes, K., Murrell, J.C. (1997). Copper-dependent reciprocal transcriptional regulation of methane monooxygenase on *Methylococcus capsulatus* and *Methylosinus trichosporium*. Molecular Biology 25, 399-409.

Nitkulincová, A. (2011). Společenstvo metanotrofních bakterií v půdách zimoviště skotu. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta. Jihočeská univerzita. České Budějovice.

Peltoniemi, K. (2010). Aerobic carbon-cycle related microbial communities in boreal peatlands: responses to water-level drawdown. Dissertationes Forestales, 101. Finnish Society of Forest Science. Faculty of Biological and Environmental Sciences. Helsinki.

Pol, A., Heijmans, 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.

Rajchard, J., Balounová, Z., Květ, J., Šantrůčková, H., Vysloužilová, D. (2002). Biochemické cykly nejdůležitějších prvků. Biochemické cykly. České Budějovice.

Rak, R., Matyáš, V., Říha, Z., Bitto, O., Daughman, J., Hennebert, J., Porada, V., Seigová, D., Stenzl, V., Straus, J., Svobodová, M., Šimková, H. (2008). DNA. Biometrie a identita člověka ve forenzních a komerčních aplikacích. Grada Publishing. Praha.

Rosypal, S., Huďák, K., Mertinec, T., Kocur, M. (1981). Obecná bakteriologie. Státní pedagogické nakladatelství. Praha.

Singh, B.K., Tate, K.R., Kolipaka, G., Hedley, C.B., Macdonald, C.A., Millard, P. a Murrell, J.C. (2007). Effect of Afforestation and Reforestation of Pastures on the Activity and Population Dynamics of Methanotrophic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5153-5161.

Stoecker, K., Bendinger, B., Schöning, B., Nielsen, P.H., Nielsen, J.L., Baranyi, C., et al. (2006) Cohn's *Crenothrix* is a filamentous methane oxidizer with an unusual methane monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103, 2363–2367.

Straková, P. (2013). Carbon dynamics in drained peatlands: What is the future of the huge carbon reservoir under human impact?. Research plan (Postdoctoral Research Project). University of Helsinki. Department of Forest Sciences. Helsinki.

Townsend, C.R., Begon, M., Harper, J.L. (2010). Tok energie a hmoty v ekosystémech. *Základy ekologie*. Univerzita Palackého. Olomouc.

Trotsenko, Y.A., Khmelenina, V.N. (2002). Biology of extremophilic and extremotolerant methanotrophs. *Arch Microbiology* 177, 123–131.

Urbanová, Z., Bárta, J., Pícek, T. (2013). Methane Emissions and Methanogenic Archaea on Pristine Drained and Restored Mountain Peatlands, Central Europe. *Ecosystems* 16, 664-677.

Urbanová, Z., Pícek, T., Hájek, T., Buřková, I., Tuittila, E.S. (2012). Vegetation and carbon gas dynamics under a changed hydrological regime in central European peatlands. *Plant Ecology and Diversity* 5, 89-103.

Urich, T., Lanzén, A., Qi, J., Huson, D.H., Schleper, C., Schuster, S.C. (2008). Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the metatranscriptome. *PLoS ONE* 3, 2527.

Vigliotta, G., Nutricati, E., Carata, E., Tredici, S.M., DeStefano, M., Pontieri, P., et al. (2007). *Clonothrix fusca* Roze 1896, a filamentous, sheathed, methanotrophic gamma-proteobacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 3556–3565.

Wu, M.L., Teeseling, M.C. F, Willems, M.J.R., Donselaar, E.G., Klingl, A., Rachel, R., Geerts, W.J.C., Jetten, M.S.M., Strous, M., Niftrik, L. (2012). Ultrastructure of the Denitrifying *Methylomirabilis oxyfera*, "a Novel Methanotroph "Candidatus Polygon-Shaped Bacterium. *Journal of Bacteriology* 194 (2), 284.

Internetové zdroje

http://www.windows2universe.org/earth/Water/co2_cycle.html

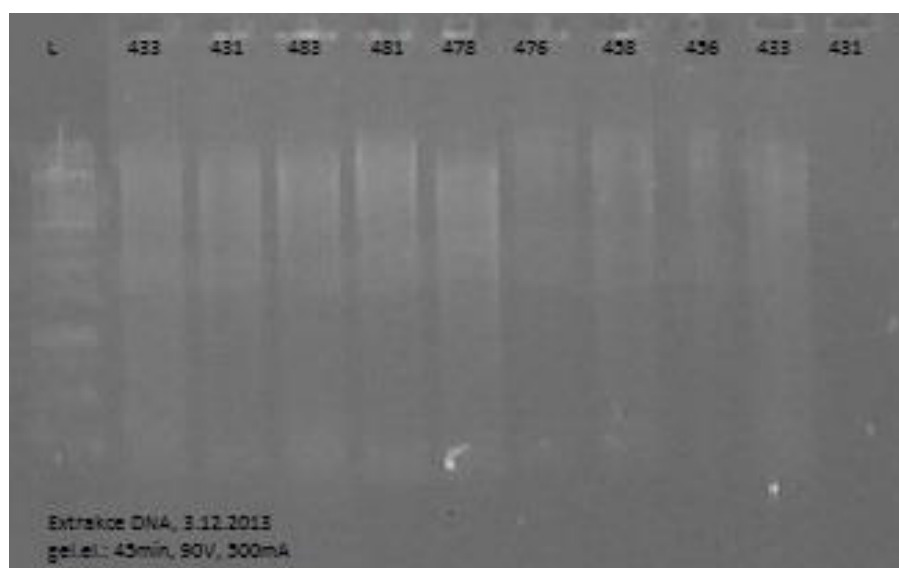
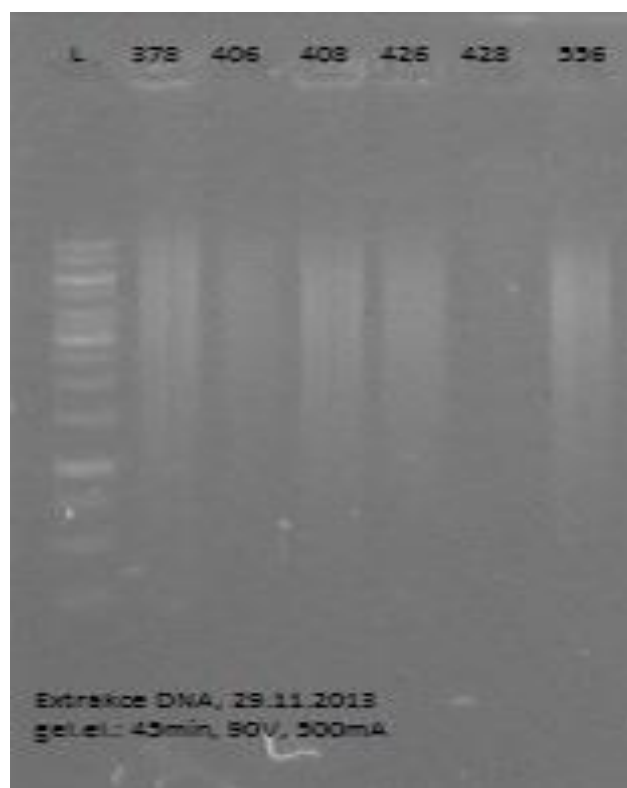
<http://biograph.be/concept/graph/C2752521/C1166869>

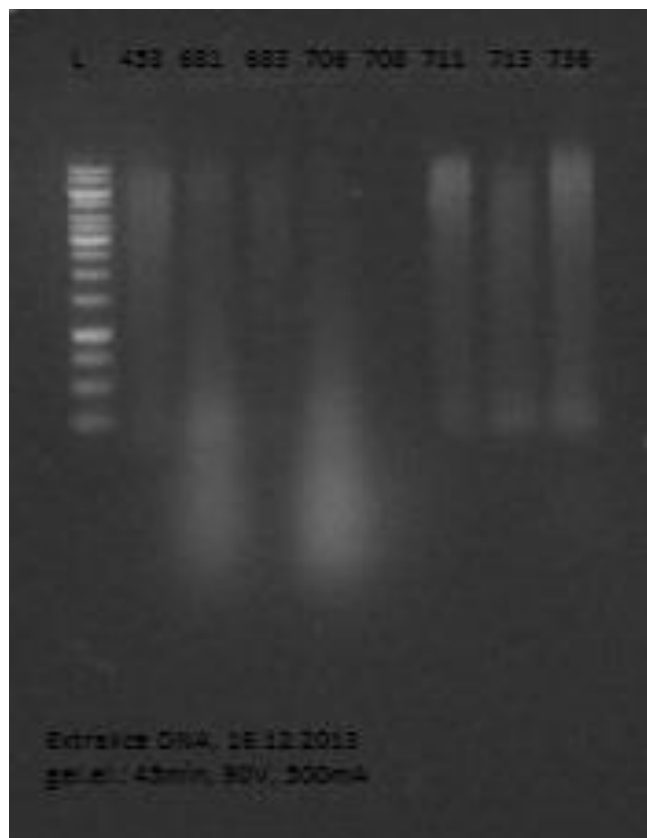
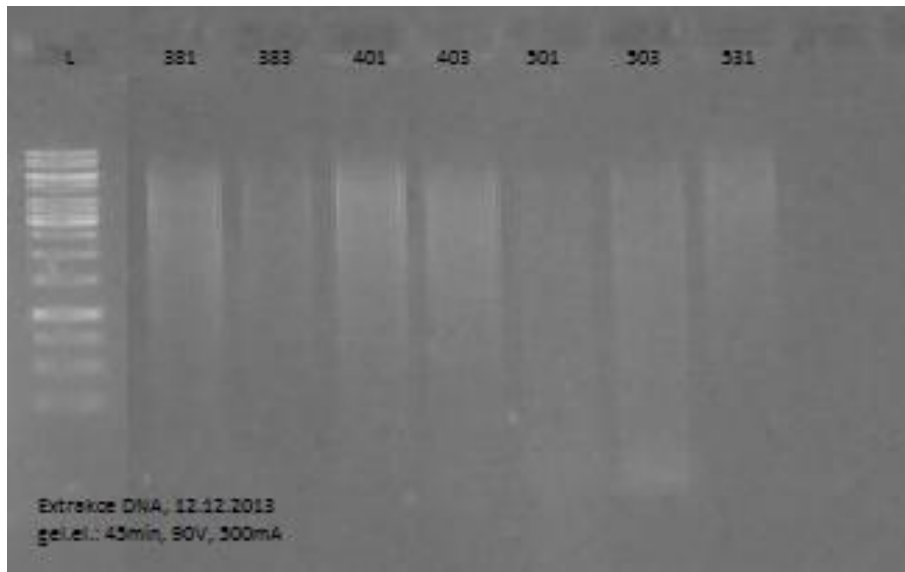
12. SEZNAM ZKRATEK

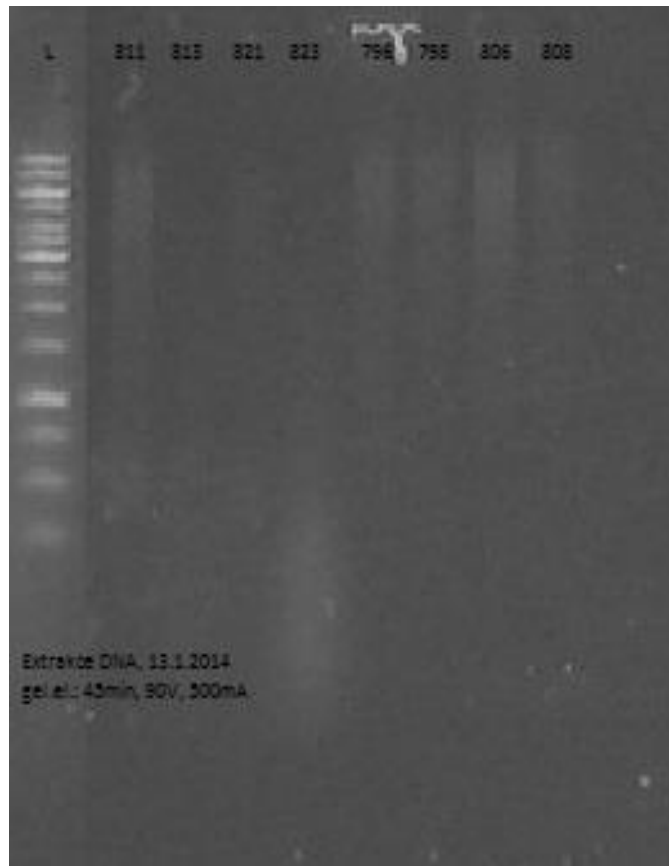
BOG L	dlouhodobě odvodněné vrchoviště
BOG P	přírozené vrchoviště
BOG S	krátkodobě odvodněné vrchoviště
BSA	bovine serum albumin
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FAD	flavinadenindinukleotid
FEN L	dlouhodobě odvodněné rašeliniště
FEN P	přírozené rašeliniště
FEN S	krátkodobě odvodněné rašeliniště
MMO	metan monooxygenáza
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid dehydrogenáza
PCR	polymerázová řetězová reakce
pMMO	membránová metan monooxygenáza
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
sMMO	cytoplasmatická metan monooxygenáza
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>

13. PŘÍLOHY

Příloha 1: Gelová elektroforéza při kvantifikaci DNA.







Příloha 2: Vyhodnocení kvantifikace DNA v různých lokalitách, typech a hloubkách rašelinišť.

Vzorek	Vrstva (cm)	Lokalita	Typ rašeliniště	Místo odběru	Místo přenosu	Kopie genu/g suché půdy
281	0-10	Lakkasuo	FEN	P	P	1,52E+07
301	0-10	Lakkasuo	FEN	P	P	1,81E+07
306	0-10	Lakkasuo	FEN	S	S	4,88E+07
326	0-10	Lakkasuo	FEN	S	S	5,69E+05
331	0-10	Lakkasuo	FEN	L	L	6,35E+07
351	0-10	Lakkasuo	FEN	L	L	4,70E+07
356	0-10	Lakkasuo	BOG	P	P	3,53E+07
376	0-10	Lakkasuo	BOG	P	P	neanalyzováno
381	0-10	Lakkasuo	BOG	S	S	1,04E+08
401	0-10	Lakkasuo	BOG	S	S	6,04E+06
406	0-10	Lakkasuo	BOG	L	L	2,99E+06
426	0-10	Lakkasuo	BOG	L	L	4,28E+06
581	0-10	Sumava	FEN	P	P	1,21E+08
606	0-10	Sumava	FEN	P	P	3,84E+07
611	0-10	Sumava	FEN	L	L	1,45E+07
636	0-10	Sumava	FEN	L	L	6,62E+06
641	0-10	Sumava	BOG	P	P	5,20E+07
656	0-10	Sumava	BOG	P	P	4,03E+08
661	0-10	Sumava	BOG	L	L	2,35E+08
676	0-10	Sumava	BOG	L	L	2,21E+07
431	0-10	Lakkasuo	FEN	L	P	3,97E+07
451	0-10	Lakkasuo	FEN	L	P	5,66E+06
456	0-10	Lakkasuo	FEN	P	S	4,45E+06
476	0-10	Lakkasuo	FEN	P	S	3,94E+07
481	0-10	Lakkasuo	FEN	S	L	4,13E+07
501	0-10	Lakkasuo	FEN	S	L	3,46E+06
531	0-10	Lakkasuo	BOG	P	S	1,10E+07
551	0-10	Lakkasuo	BOG	P	S	neanalyzováno
556	0-10	Lakkasuo	BOG	S	L	1,60E+07
576	0-10	Lakkasuo	BOG	S	L	5,25E+06
681	0-10	Sumava	FEN	L	P	nedetekováno
706	0-10	Sumava	FEN	L	P	nedetekováno
711	0-10	Sumava	FEN	P	L	9,22E+07
736	0-10	Sumava	FEN	P	L	6,23E+07
741	0-10	Sumava	BOG	L	P	nedetekováno
756	0-10	Sumava	BOG	L	P	2,16E+08
761	0-10	Sumava	BOG	P	L	1,33E+08
776	0-10	Sumava	BOG	P	L	3,04E+07
283	20-30	Lakkasuo	FEN	P	P	4,58E+06
303	20-30	Lakkasuo	FEN	P	P	2,80E+06
308	20-30	Lakkasuo	FEN	S	S	1,23E+06

328	20-30	Lakkasuo	FEN	S	S	1,36E+06
333	20-30	Lakkasuo	FEN	L	L	1,98E+07
353	20-30	Lakkasuo	FEN	L	L	2,19E+07
358	20-30	Lakkasuo	BOG	P	P	8,34E+07
378	20-30	Lakkasuo	BOG	P	P	1,20E+08
383	20-30	Lakkasuo	BOG	S	S	6,81E+07
403	20-30	Lakkasuo	BOG	S	S	2,41E+08
408	20-30	Lakkasuo	BOG	L	L	4,61E+07
428	20-30	Lakkasuo	BOG	L	L	2,12E+07
583	20-30	Sumava	FEN	P	P	5,77E+06
608	20-30	Sumava	FEN	P	P	9,98E+07
613	20-30	Sumava	FEN	L	L	3,66E+07
638	20-30	Sumava	FEN	L	L	nedetekováno
643	20-30	Sumava	BOG	P	P	neanalyzováno
658	20-30	Sumava	BOG	P	P	neanalyzováno
663	20-30	Sumava	BOG	L	L	3,19E+06
678	20-30	Sumava	BOG	L	L	2,49E+06
433	20-30	Lakkasuo	FEN	L	P	4,53E+06
453	20-30	Lakkasuo	FEN	L	P	1,95E+08
458	20-30	Lakkasuo	FEN	P	S	5,60E+06
478	20-30	Lakkasuo	FEN	P	S	4,95E+06
483	20-30	Lakkasuo	FEN	S	L	7,65E+07
503	20-30	Lakkasuo	FEN	S	L	3,22E+06
533	20-30	Lakkasuo	BOG	P	S	1,62E+08
553	20-30	Lakkasuo	BOG	P	S	3,97E+08
558	20-30	Lakkasuo	BOG	S	L	1,24E+07
578	20-30	Lakkasuo	BOG	S	L	3,20E+08
683	20-30	Sumava	FEN	L	P	7,12E+06
708	20-30	Sumava	FEN	L	P	nedetekováno
713	20-30	Sumava	FEN	P	L	2,16E+07
738	20-30	Sumava	FEN	P	L	8,14E+05
743	20-30	Sumava	BOG	L	P	7,00E+06
758	20-30	Sumava	BOG	L	P	3,11E+06
763	20-30	Sumava	BOG	P	L	4,09E+06
778	20-30	Sumava	BOG	P	L	9,87E+06

P-přirozené rašeliniště, L-dlouhodobě odvodněné rašeliniště, S-krátkodobě odvodněné rašeliniště.