

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Produkce a oxidace metanu v půdách rašelinných smrčín
ovlivněných odvodněním, revitalizací a přísunem dusíku**

Diplomová práce

Bc. Jana Baxová

Školitel: Ing. Tomáš Píček, Ph.D.

České Budějovice 2013

Baxová, J., 2013: Produkce a oxidace metanu v půdách rašelinných smrčín ovlivněných odvodněním, revitalizací a přísunem dusíku [Production and consumption of methane in the spruce swamp forests soils affected by drainage, restoration and nitrogen input. Mgr. Thesis, in Czech.] - 54 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The aim of this thesis was to determine effect of drainage, restoration and addition of mineral and organic nitrogen to spruce swamp forest soil on potential methane production and oxidation. Six study sites (2 pristine, 2 drained and 2 restored) were located in Šumava National Park in the Czech Republic.

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

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

V Českých Budějovicích dne 13.12.2013

Jana Baxová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Ing. Tomáši Pickovi, Ph.D. za odborné i stylistické vedení při psaní mé diplomové práce a velkou trpělivost, kterou se mnou měl. Poděkování patří také Danielu Vaňkovi a Terézii Říhové za změření koncentrace dusíkatých látek v mých vzorcích. Velké poděkování patří také mé rodině a mému příteli za psychickou podporu, kterou mi poskytli při psaní mé diplomové práce. Měřila jsem pouze potenciální produkci a oxidaci metanu. Environmentální data o lokalitách a fyzikálně-chemické charakteristiky půdy jsem získala od Mgr. Zuzany Urbanové, Ph.D.

Obsah

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1. Rašelinné smrčiny – popis ekosystému	3
2.2. Vliv odvodnění a revitalizace na rašelinné smrčiny.....	3
2.3. Produkce a oxidace metanu půdními organismy	4
2.3.1. Produkce metanu (metanogeneze)	4
2.3.2. Oxidace metanu (metanotrofie)	5
2.3.3. Faktory ovlivňující produkci a oxidaci metanu	7
2.4. Vliv dusíku na rychlost metanogeneze a metanotrofie.....	11
2.4.1. Vliv dusíku na produkci metanu	11
2.4.2. Vliv dusíku na oxidaci metanu	11
2.4.3. Hypotézy.....	13
3. METODIKA	15
3.1. Popis lokalit a odběr vzorků.....	15
3.2. Laboratorní pokusy	16
3.2.1. Stanovení optimální koncentrace metanu	17
3.2.2. Potenciální oxidace metanu	17
3.2.3. Potenciální produkce metanu	18
3.2.4. Potenciální oxidace a produkce metanu ovlivněná přísunem minerálního (NO_3^- , NH_4^+) a organického dusíku (aminokyseliny glycinu)	19
3.3. Vyhodnocení dat.....	20
4. VÝSLEDKY	20
4.1. Stanovení optimální koncentrace metanu	20
4.2. Potenciální oxidace metanu	22
4.3. Potenciální produkce metanu	25
4.4. Korelace rychlosti metanogeneze a metanotrofie	29
4.5. Vliv dusíku na potenciální oxidaci a produkci metanu	30
5. DISKUZE	36
5.1. Stanovení optimální koncentrace metanu pro metanotrofní bakterie.....	36
5.2. Potenciální oxidace metanu	36
5.3. Potenciální produkce metanu	38
5.4. Vliv dusíku na potenciální oxidaci a produkci metanu	40
6. ZÁVĚRY	44

7. LITERATURA	45
8. PŘÍLOHY	48

Seznam použitých zkratk

AOM	anaerobní oxidace metanu
C_{mic}	mikrobiální uhlík
CH_4	metan
CO_2	oxid uhličitý
D	dolní vrstvy půdy
H	horní vrstvy půdy
KNO_3	dusičnan draselný
MMO	metan-monooxygenáza
N	dusík
NH_4^+	amonný kationt
NH_2OH	hydroxylamin
NH_4Cl	chlorid amonný
N_{mic}	mikrobiální dusík
NO_3^-	dusičnany
NO_2^-	dusitany
NO	oxid dusnatý
N_2O	oxid dusný
O1	odvodněná lokalita „Filipova huť –odvodněno“
O2	odvodněná lokalita „Nad Rokytou“
P1	přirozená lokalita „Kvilda“
P2	přirozená lokalita „Filipova huť“
R1	revitalizovaná lokalita „Cikánská slat“
R2	revitalizovaná lokalita „Na Ztraceném“
SD	směrodatná odchylka
SR	redukce síranů

1. Úvod

Produkce a oxidace metanu jsou mikrobiální procesy, které zásadně ovlivňují fungování mokřadu (dekompozici organické hmoty a její přeměny), a také koncentraci metanu v atmosféře. Metan je také účinný skleníkový plyn, který je částečně zodpovědný za současné změny klimatu. Mokřady jsou jedním z hlavních zdrojů metanu, avšak současně akumulují uhlík ve formě odumřelé organické hmoty. Proto je důležité znát poměr mezi produkcí organických látek a jejich dekompozicí, a také poměr mezi produkcí metanu a jeho oxidací. Vlivem globálních změn může docházet ke změnám v množství a frekvenci srážek a ke změně teploty a tím ke změně vodního režimu mokřadních ekosystémů. Tyto změny a vliv na fungování ekosystému je možné pozorovat v mokřadech uměle odvodněných v minulosti. Rašeliniště a rašelinné smrčiny byly odvodňovány již od konce 19. století za účelem těžby rašeliny, zemědělskými účely nebo zvýšení produkce dřeva. Od konce 20. století jsou snahy o jejich revitalizaci a znovuoobnovení těchto mokřadních ekosystémů (Bufková, 2013).

Při odvodnění mokřadů (rašelinišť) dochází k urychlení rozkladu organické hmoty a může dojít ke zvýšení koncentrace dusíkatých sloučenin v půdě, které mohou ovlivňovat produkci a oxidaci metanu. Podobně revitalizace dříve odvodněných ekosystémů může vést k jejich eutrofizaci následkem odumření části vegetace a uvolněním dusíkatých látek a fosforu z rozkládané organické hmoty do půdy. V mokřadech může přísun dusíku ovlivňovat jak metanogenezi, tak metanotrofii. Údaje z literatury však nejsou jednoznačné a vliv přísunu dusíkatých látek na aktivity metanogenních a metanotrofních mikroorganismů není dosud vyjasněn, přestože může významně ovlivňovat oba procesy. Nízké koncentrace amoniaku mohou podporovat oxidaci metanu, ale vyšší koncentrace již mohou působit inhibičně. Dusičnany mohou zvyšovat rychlost metanotrofie a současně mohou snižovat rychlost metanogeneze.

V této práci jsem se zaměřila na rychlost metanogeneze a rychlost metanotrofie v půdě odvodněných, revitalizovaných a přirozených rašelinných smrčín na Šumavě a na vliv minerálního a organického dusíku na produkci a oxidaci metanu.

Cíl práce

Zjistit, jaký vliv má odvodnění, revitalizace a přísun minerálního a organického dusíku do ekosystému rašelinných smrčín na produkci metanu mikrobiální skupinou Archaea a na oxidaci metanu metanotrofními bakteriemi.

2. Literární přehled

2.1. Rašelinné smrčiny – popis ekosystému

Rašelinné smrčiny vznikají na silně zamokřených půdách, kde dochází k rašelinění. Mají řídké stromové patro, v němž se kromě smrku (*Picea abies*) vyskytují i břízy (*Betula pendula* a *B. pubescens*). V bylinném patře roste suchopýr pochvatý (*Eriophorum vaginatum*), vložchyně (*Vaccinium uliginosum*), klikva (*Oxycoccus palustris*). Mívají také husté, druhově bohaté mechové patro, které může mít pokryvnost až 70 %. Nejčastější jsou rašelínky (*Sphagnum* spp.), játrovka (*Bazzania trilobata*) a ploník obecný (*Polytrichum commune*) (Šantrůčková, Vrba a kol., 2010).

2.2. Vliv odvodnění a revitalizace na rašelinné smrčiny

Některé rašelinné smrčiny byly v minulosti odvodněny z důvodu zlepšení hospodaření v lesích. Při odvodnění dochází ke snížení hladiny podzemní vody a následkem toho ke zvýšení provzdušnění půdy a k rychlejší dekompozici organické hmoty. Změnu aeračního statusu půdy pak následuje i změna složení vegetace, kdy dochází k posunu k suchomilnější vegetaci (více dřevin a keříčkovité vegetace).

V důsledku odvodnění dochází ke snížení vodní hladiny a tím zvětšení aerobní vrstvy půdy. To ovlivňuje také mikrobiální metanotrofní a metanogenní společenstva žijící v půdě rašelinných smrčin. Metanotrofní bakterie žijí převážně v aerobním prostředí, protože vyžadují kyslík k oxidaci metanu na oxid uhličitý a vodu. Existuje však i anaerobní oxidace metanu, a proto najdeme metanotrofy i v anaerobním prostředí, kde mohou některé druhy přežívat. Metanogenní archaea žijí v anoxických podmínkách. Přestože jsou metanogeni obligátní anaerobové a nejsou pravděpodobně schopni růst v aerobních vrstvách rašeliny, jsou schopni přežít období, kdy půda není zaplavená vodou (Kettunen et. al., 1999).

Při odvodnění a následné zvýšené dekompozici organické hmoty může docházet také ke zvýšení koncentrace dusíkatých sloučenin v půdě, které mohou ovlivňovat produkci a oxidaci metanu. Dusíkaté látky mohou být rovněž z rašeliniště vyplavovány, což může mít negativní vliv na podzemní a povrchové vody, hlavně na eutrofizaci a acidifikaci vod (Olde Venterink et al., 2002).

Revitalizace rašelinných smrčin se provádí z důvodu navrácení mokřadních ekosystémů do původního stavu před odvodněním. Hlavním důvodem je obnova za účelem zachování přirozených ekosystémů, obnovy přirozeného vodního režimu rašelinné smrčiny

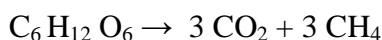
i jejího okolí a především obnova původních mikrobiálních, rostlinných i živočišných společenstev žijících na dané lokalitě.

2.3. Produkce a oxidace metanu půdními organismy

2.3.1. Produkce metanu (metanogeneze)

Metanogeneze je produkce metanu metanogenními mikroorganismy. Metanogeni patří do říše Euryarcheota. Tvoří čtyři třídy a šest řádů skupiny Archeobakterií. Mohou být fylogeneticky zařazeni do pěti řádů, jmenovitě *Methanopyrales*, *Methanobacteriaceae*, *Methanococcales* and *Methanosarcinales* (Lai, 2009).

V anaerobním prostředí s nízkou koncentrací sulfátů a nitrátů nastává kompletní rozklad organické hmoty metanogenezí. Při ní vzniká CH₄ a CO₂ podle reakce:



Metanogeni jsou vázáni na mokřadní půdy s hodnotami oxidačně-redukčního potenciálu (E_h) nižšími než -200mV (Reddy and Delaune, 2008). Mikrobiální proces metanogeneze je poté převážně řízen nepřítomností kyslíku a množstvím snadno rozložitelné hmoty (Segers, 1998). Metanogeni nejsou schopni využívat vysokomolekulární polymery, a proto jsou závislí alespoň na třech skupinách mikroorganismů zahrnujících hydrolytické, fermentativní a acetogenní bakterie. Vodík je získáván například rozkladem organických kyselin (Reddy and Delaune, 2008).

V závislosti na použitém substrátu rozdělujeme metanogeny do 3 skupin:

1. Využívající jako substrát acetát: $CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$
2. Využívající substrát typu CO₂ (CO, CO₂ a HCOOH-formiát) : $CO_2 + H_2 \rightarrow CH_4$
3. Využívající methylové substráty: methanol(CH₃OH), methylmercaptan (CH₃SH) methylamine (CH₃NH₃⁺), dimethylamine((CH₃)₂NH₂⁺), trimethylamine (CH₃)₃NH⁺
 $CH_3-OH + H_2 \rightarrow CH_4$

Metanogeni jsou obligátní anaerobní autotrofní organismy (využívají CO₂ jako zdroj C a jako elektronový akceptor) nebo heterotrofní organismy (používají jako zdroj energie organický substrát). Například autotrofní metanogeni používají CO₂ jako elektronový akceptor a vodík jako dárce elektronů. Heterotrofní metanogeni používají acetát přímo pro biosyntézu a jako zdroj energie. Během tohoto procesu metanogeni přeměňují acetát na CO₂

a metan a využívají při tom jiné biochemické cesty než autotrofní metanogeni. Jak pro autotrofní, tak pro heterotrofní skupiny metanogenů platí, že elektrony a vodíkové kationty jsou přenášeny pomocí přenašečů a tím vzniká protonový gradient přes mikrobiální membránu, která řídí syntézu ATP. Ve sladkovodních mokřadech je metanogeneze často konečným katabolickým procesem v rozložení organické hmoty (Reddy and Delaune, 2008).

2.3.2. Oxidace metanu (metanotrofie)

Metanotrofní bakterie jsou aerobní organismy oxidující metan, kdy oxidací metanu vzniká CO₂ a voda. Patří do podskupiny eubakterií známých jako metanotrofové, kteří využívají jednoduché uhlíkaté sloučeniny pro získání energie a jako zdroj uhlíku pro svůj růst (Lai, 2009).

Metanotrofové patří buď mezi *Gammaproteobacteria* neboli Metanotrofové typu I (10 různých druhů) nebo mezi *Alphaproteobacteria* neboli metanotrofové typu II (druhy *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Methylocella*, *Methylocapsa*). Metanotrofové typu I asimilují uhlík přes ribulózu-monofosfát, zatímco metanotrofové typu II využívají serin (Conrad, 2009).

Dále známe dva hlavní typy metanotrofní aktivity. Prvním typem je vysokoafinitní oxidace, která probíhá při koncentracích metanu blízkých atmosférickým koncentracím metanu (Jaatinen et al., 2005; Lai, 2009). Tento zdroj metanu není energeticky významný, a proto enzymy těchto bakterií mají vysokou afinitu k substrátu (Conrad, 2009). Druhým je nízkoafinitní oxidace, která probíhá při koncentraci metanu vyšší než atmosférické. Nízkoafinitní metanotrofie probíhá především na rašeliníštích, rýžovištích nebo na skládkách (Jaatinen et al., 2005) a je vyvolaná koncentracemi metanu mezi 0,07 až 0,65 mg/l (Lai, 2009). Všichni metanotrofové využívají enzym metan-monooxygenáza (MMO), buď v rozpustné cytoplazmatické, nebo částicové membránově vázané formě, která katalyzuje bakteriální oxidaci metanu (Jaatinen et al., 2005; Lai, 2009). Nejprve MMO rozbije kyslíkatou vazbu O-O a poté slouží jako koncový elektronový akceptor pro vytvoření CO₂ během oxidace metanu (Lai, 2009).

Podle Segers (1998) jsou hlavními faktory řídícími rychlost metanotrofie koncentrace kyslíku a metanu v půdě. Z toho vyplývá, že metanotrofní aktivita na rašeliníštích je obvykle nejvyšší blízko průměrné výšky vodní hladiny, což odpovídá hranici mezi aerobní a anaerobní zónou, kde je množství substrátu (CH₄) a kyslíku optimální (Lai, 2009). Metanotrofové se mohou vyskytovat i v hlubších vrstvách půdy, například se vyskytují v okolí kořenů, kam se dostává kyslík aerenchymatickým pletivem přes rostliny. Rovněž byli nedávno nalezeni uvnitř rašeliníku, kde poskytují rostlinám CO₂ oxidací metanu

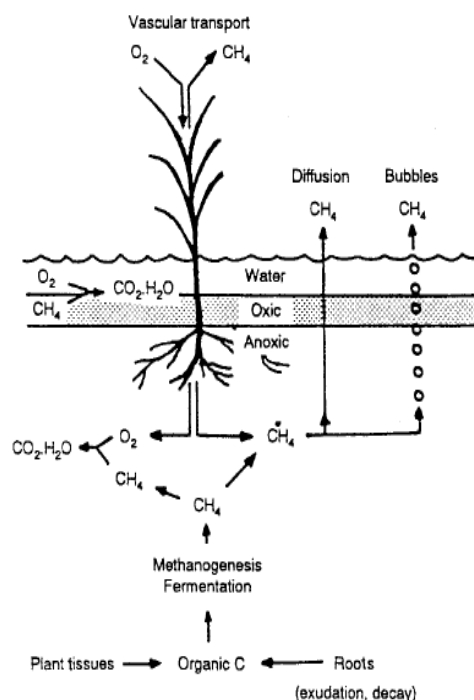
(Larmola et al., 2010). Rychlost metanotrofie může být inhibována také nízkou půdní vlhkostí (Paul and Clark, 1996).

Vznik metanu v půdě a způsob jeho uvolňování do atmosféry

Metan je produkován v anaerobní zóně zaplavených půd metanogenními archaea a je oxidován na CO_2 metanotrofními bakteriemi v aerobní i anaerobní zóně mokřadních půd. K emisím metanu z půdy do atmosféry dochází přes aerenchym mokřadních rostlin, difuzí a ebulicí (vybubláváním) (Lai, 2009) (Obr. 1).

Aerenchymatické pletivo mokřadních rostlin je speciální pletivo umožňující vedení plynů z půdy do atmosféry a naopak. Může být přes něj veden například metan z půdy do atmosféry a kyslík v opačném směru na základě koncentračního spádu. Nedochozí tak k oxidaci metanu v aerobních vrstvách půdy a emise metanu mohou být díky tomuto přenosu větší, než by byly v mokřadním prostředí s jinými druhy rostlin nebo bez vegetace. Zároveň se může kyslík dostat až ke kořenům rostlin a přes ně do hlubších vrstev půdy, kde by mohl být za normálních okolností již anaerobní prostředí. Díky tomuto přenosu může probíhat metanotrofie i v hlubších vrstvách půdy, než by tomu bylo v prostředí bez vegetace nebo s jiným typem vegetace (například keřičky).

K ebulici dochází v případě, když parciální tlak všech rozpuštěných plynů v roztoku je větší než hydrostatický tlak v půdě a tím se vytvářejí bubliny plynu (Lai, 2009). Vybubláváním se může uvolňovat hlavně metan a oxid uhličitý. I když metan nebo oxid uhličitý mohou být uvolňovány ve stejném poměru, bubliny plynu budou obsahovat více CH_4 než CO_2 , protože metan se hůře rozpouští ve vodě než CO_2 a může se tedy vytvářet více bublin CH_4 než CO_2 (Kirk, 2004).



Obr.1: Schéma cyklu metanu ukazující produkci, spotřebu a mechanismy jeho přenosu (Bubier and Moore, 1994).

2.3.3. Faktory ovlivňující produkci a oxidaci metanu

a) Půdní vlhkost

Výška vodní hladiny je klíčovým faktorem řídícím produkci a oxidaci metanu v mokřadech. Le Mer and Roger (2001) zjistili, že v mokřadech na severu USA variabilita emisí CH_4 závisela na výšce hladiny podzemní vody a na množství kořenících rostlin s aerenchymem, kde se oba faktory vzájemně ovlivňovaly.

Podle Kettunen et. al. (1999) se změnou výšky hladiny podzemní vody může souviset i množství substrátu pro metanogeny. Po snížení vodní hladiny se zvýší aerobní degradace v nesaturovaných vrstvách rašeliny a spotřebovávají se organické sloučeniny, které by v anoxických podmínkách podporovaly produkci metanu. Proto pokud dochází k vysychání půdy, dochází také ke snižování koncentrace metanu v půdě. Naproti tomu může dočasné zvýšení vodní hladiny následované jejím poklesem uvolnit metan z hlubokých vrstev rašeliny, takže oxidace metanu může být znovu aktivována v důsledku dočasného zvýšení dostupnosti substrátu.

b) Dostupnost kyslíku a oxidačně-redukční potenciál půdy

Mezi hlavní faktory limitující rychlost metanotrofie patří dostupnost kyslíku (Le Mer and Roger, 2001). Metanotrofové potřebují kyslík, ale jsou schopni přežít i v anaerobních podmínkách. Podobně jako metanotrofové jsou schopni přežít v anaerobních podmínkách, jsou metanogeni po určitou dobu schopni přežít v aerobních podmínkách (Kettunen et. al., 1999). Metanogeni jsou ovlivňováni především hodnotou oxidačně-redukčního potenciálu se kterým souvisí dostupnost elektronových akceptorů (CO_2) vhodných pro metanogeny. Z uvedeného vyplývá, že alternativní elektronové akceptory, například NO_3^- , Fe^{3+} , Mn^{4+} , SO_4^{2-} a možná i huminové kyseliny, potlačují metanogenezi, protože podporují energeticky výhodnější cesty k získávání energie než je využití CO_2 (Segers, 1998).

Existuje také anaerobní oxidace metanu (AOM). AOM je významná především v mořských sedimentech a slaných vodách. Ve sladkovodních ekosystémech probíhá AOM jen omezeně. Byla pozorována především v jezerech, v odpadních kalech a v rýžovištích. V mořských ekosystémech je AOM spojená s mikrobiální redukcí síranů (SR), která pravděpodobně spotřebovává většinu metanu vyprodukovaného v mořských sedimentech, odkud se uvolňuje difúzí (Smemo and Yavitt, 2011). Islas-Lima et al. (2004) a Raghoebarsing et.al (2006) dokázali, že AOM ve sladkovodních ekosystémech je spojena s denitrifikací a denitrifikačními bakteriemi, které poskytují energeticky vhodné alternativy k mořské AOM spojené s mikrobiální redukcí síranů. Další práce navrhuji, že AOM by mohla být uskutečněna denitrifikačními baktériemi v nepřítomnosti archea (Ettwig et al., 2008) a tento proces by mohl být spojován s redukcí dusitanů (NO_2^-) a produkcí kyslíku jako elektronového akceptoru (Ettwig et al., 2010). Probíhal by tedy aerobní metabolismus v anaerobních podmínkách.

Smemo a Yavitt (2006) zpochybňují výše uvedené předpoklady a navrhuji potencionálně důležitou roli AOM v různých typech rašelinišť. Zjistili, že AOM vyskytující se současně s metanogenezí může spotřebovávat významné množství vyprodukovaného metanu. Dále se objevuje AOM v závislosti na akumulaci vyšších koncentrací metanu v pórové vodě v rašelině. AOM může být běžnější, než se předpokládalo, ale vztahy mezi AOM a známými energetickými cestami (SR, denitrifikace nebo redukce železa) jsou stále nejasné. Smemo a Yavitt (2007) poskytli důkaz, že AOM se vyskytuje i v rašelinných půdách, ale nebyl popsán způsob jejich života a jaké využívají elektronové akceptory. SO_4^{2-} jako elektronový akceptor je nepravděpodobný, protože koncentrace těchto iontů jsou v rašeliništích velmi nízké ve srovnání s mořskými ekosystémy. Další možnosti

elektronového akceptoru jsou ionty NO_3^- . AOM mohou využívat NO_3^- jako elektronový akceptor poskytující skoro stejné množství volné energie jako aerobní oxidace metanu, ale tato oxidace probíhá jiným způsobem než AOM spojená s SR (Smemo and Yavitt (2011)). Mechanismy AOM proto zůstávají stále nejasné, i když bylo zjištěno, že AOM zahrnuje dusitanu a oxidy dusíku jako elektronové akceptory pro metanotrofii (Ettwig et al., 2010). I když okysličení povrchu rašeliny během vegetační sezóny může zvyšovat koncentraci dusičnanů v pórové vodě, tento mechanismus se zdá být na rašeliništích méně pravděpodobný. Nižší nitrifikace nebo větší rychlost denitrifikace limituje dostupnost NO_3^- a oxidů dusíku v systému. Obrat dusitanů je v rašelinných půdách velmi rychlý a navíc jsou rychle spotřebovávány oxidy dusíku přes chemodenitrifikaci v kyselých půdních podmínkách. Je zřejmé, že role NO_3^- a NO_2^- v anaerobní oxidaci metanu na rašeliništích vyžaduje další pozornost. Na druhou stranu, ionty NO_3^- a NO_2^- potlačují metanogenezi a tím snižují koncentraci metanu pro metanotrofy. Pokud se snižuje koncentrace dusitanů a dusičnanů, zvyšuje se rychlost metanogeneze a tím i množství substrátu pro metanotrofy a anaerobní oxidaci metanu (Smemo and Yavitt, 2011).

c) Složení půdní organické hmoty

Celkový obsah organické hmoty v rašelinných půdách může být velmi vysoký. Rašelina je tvořena částečně rozloženými zbytky rostlin s obsahem organické hmoty přes 65% a méně než 20-35% tvoří minerální podíl (Charman, 2002). Na rašeliništích složení organické hmoty určuje jak produkci metanu, tak jeho oxidaci. Ve vlhkých rašelinných půdách je významná produkce metanu pouze z podílu organické hmoty s velkou agregací částic, kdy podíl částic větší než 2 mm přispívá až z 90% k celkové produkci metanu. Produkce metanu se silně snižuje s hloubkou, kdy vrstva 0-0,5 cm pod povrchem půdy přispívá ze 70% k celkové produkci metanu. Z výše uvedeného vyplývá, že rostlinné zbytky v půdě jsou hlavním zdrojem substrátu pro metanogeny (Le Mer and Roger, 2001). Podle Lai (2009) také přidání glukózy, etanolu nebo acetátu, jež jsou hlavními živinami pro metanogeny, do vzorků ze slatinišť, vedlo ke zvýšení produkce metanu během několika hodin. To dokazuje, že dostupnost těchto látek je limitujícím faktorem pro metanogenezi.

d) pH

Kyselost rašeliny může limitovat aktivitu metanogenů i metanotrofů. Většina metanogenních archea roste jen v rozsahu pH 6-8, ačkoli studie metanogeneze v terénu

ukázaly, že se vyskytují i v kyselejších prostředích jakými jsou třeba vrchoviště (Garcia et.al., 2000). Metanotrofové jsou tolerantnější k výkyvům pH než metanogeni (Le Mer and Roger, 2001). Většina známých metanogenů má své optimum při pH 7. Nicméně z kyselé rašelinné půdy byli izolováni metanogeni s nižším optimálním pH. Většinou se zvyšujícím se pH se zvyšuje také potenciální produkce metanu v inkubovaných vzorkách (Segers, 1998).

e) Teplota

Optimální teplota pro metanogenezi je mezi 30 a 40°C. Nízká teplota půdy snižuje produkci metanu snižováním aktivity metanogenů, ale také dalších mikroorganismů zahrnutých v metanogenní fermentaci. Například laboratorní studie půdy z mokřadů s dřevinnou vegetací z rašelinišť v Kanadě ukázaly, že emise metanu se zvyšují 6,6 krát, když se inkubační teplota zvýšila z 10°C na 23°C (Le Mer and Roger, 2001).

Z hlediska tolerance k výkyvům teploty se metanotrofové zdají být méně citliví než metanogeni (Tuittilla et.al., 2000), protože produkce a spotřeba metanu v rašeliništích v mírném a subpolárním pásmu byla optimální mezi 20 a 30°C pro obě aktivity, ale se širší tolerancí pro metanotrofii než pro metanogenezi (Le Mer and Roger, 2001)

f) Úloha typu vegetace na rašeliništích a rašelinných smrčínách

Typ vegetace je dalším klíčovým faktorem ovlivňujícím produkci a oxidaci metanu v rašelinných smrčínách.

Například aerenchymatická rašeliništní vegetace pomáhá růstu kořenového systému směrem do hloubky. Kořeny tak pronikají i do anoxické vrstvy rašeliny. Tím se zvyšuje produkce metanu v důsledku uvolňování kořenových exudátů do půdy a zrychluje se transport metanu z půdy do atmosféry aerenchymem rostlin (Lai, 2009). Pokud metan prochází ze spodních vrstev rašeliny půdou k povrchu difúzí, může ho být 0-100% spotřebováno metanotrofy v provzdušněné vrstvě půdy. Pomocí aerenchymu mokřadních rostlin se může metan z půdy do atmosféry uvolňovat jinou než difúzní cestou a mohou se zvyšovat emise metanu. Například na aljašských vlhkých loukách a v travnatých tundrových společenstvech bylo spotřebováno v aerobních vrstvách půdy až 55% metanu vzniklého metanogenezí (Verville et. al., 1998), ale na rýžovištích to bylo až 80% metanu (Le Mer and Roger, 2001).

Aerenchym rostlin umožňuje výměnu plynů mezi atmosférou a půdou (Le Mer and Roger, 2001). V důsledku přenosu kyslíku do půdy dochází k okysličování rhizosféry a tím se zvyšuje aktivita metanotrofů kolem kořenů. Spotřebovává se více metanu a dochází ke snižování jeho emisí.

Závěrem lze říci, že aerenchymatická vegetace nejenže přispívá k emisím metanu vedením metanu přímo z půdy do atmosféry, ale také je může částečně snižovat, protože vede aerenchymem kyslík z atmosféry do půdy a tím přispívá k aktivitě metanotrofů. Konečné emise metanu jsou pak výsledkem těchto protichůdných procesů.

2.4. Vliv dusíku na rychlost metanogeneze a metanotrofie

2.4.1. Vliv dusíku na produkci metanu

Rychlost metanogeneze může být přímo ovlivněna konkurencí metanogenních a denitrifikačních bakterií (Bodelier, 2011). Denitrifikační bakterie snižují dostupnost organického uhlíku a mohou také produkovat pro metanogeny toxické meziprodukty denitrifikace (NO_2^- , NO a N_2O) (Bodelier, 2011; Segers, 1998). Nepřímo může být metanogeneze ovlivněna rostlinami. Růst rostlin může být podporován přísunem amoniaku nebo hnojiv na bázi dusičnanů. Zvýšený růst rostlin může zvyšovat produkci metanu zvyšováním dostupnosti uhlíku pro fermentující mikroorganismy poskytující substrát pro metanogeny. Na druhou stranu, jiný autor uvádí, že jeden metanogenní taxon žijící na rýžovištích je spíše stres tolerantní a jeho metanogenní aktivita není omezena pouze na vysoce redukované podmínky půdy, ale může probíhat také v přítomnosti dalších elektronových akceptorů O_2 , NO_3^- , Fe^{3+} , SO_4^{2-} . To je důvodem tolerance těchto metanogenů k dusíkatým hnojivům a od nich odvozených produktů denitrifikace (Bodelier, 2011).

2.4.2. Vliv dusíku na oxidaci metanu

Například poměr amoniaku a metanu v půdě ovlivňuje rychlost metanogeneze tím, že působí jako kompetitivní inhibitor na enzymatické úrovni. Všeobecně je při nižších dávkách jakýchkoliv dusíkatých sloučenin (< 100 kg N/ha/rok) metanotrofie podporována a při vyšších je metanotrofie inhibována (Bodelier, 2011).

V mokřadech může dusík ovlivňovat oxidaci metanu různým způsobem. Jeho účinky mohou být v různých ekosystémech, při různých formách a koncentracích přídatku dusíku i

protichůdné. Důležitý je také vliv obhospodařování. Obhospodařované mokřady jsou náchylnější ke změnám přídatku dusíku než přirozené mokřady. Rozdílné výsledky přídatku dusíku mohou být objasněny různým složením metanotrofního společenstva a také tím, jaké metanotrofní druhy jsou aktivní a jaké ne. Identifikaci aktivních metanotrofních společenstev lze provést pomocí molekulárních metod a izotopového značení. Bylo zjištěno, že někteří metanotrofové jsou schopni využívat i jiné substráty než metan, například acetát nebo etanol. Je však stále nejasné, jak přídatek dusíku ovlivňuje růst těchto metanotrofů a jaké to má důsledky pro rychlost metanotrofní. Fakultativní metanotrofové využívající acetát nebo etanol zvyšují svoje šance na přežití během zvýšeného přísunu živin. Jedním z možných vysvětlení vlivu přídatku dusíku na metanotrofy je, že dodání dalšího dusíku může napomáhat růstu fakultativních metanotrofů, kteří mohou využívat jak metan, tak acetát nebo etanol současně (Bodelier, 2011).

Podle Paul and Clark (1996) mohou metanotrofové využívat při anaerobní respiraci místo kyslíku také dusičnany a dusitany. Enzym zodpovědný za první krok v oxidaci metanu je monooxygenáza. Ta produkuje methanol, který je dále oxidován na sůl kyseliny mravenčí a na CO_2 . Velká pozornost je také věnována schopnosti metan-monooxygenázy oxidovat amoniak a produkovat hydroxylamin (NH_2OH). Metan tudíž mohou oxidovat také nitrifikátoři. Podle Bodelier and Laanbroek (2004) stimulační efekt přídatku dusíku by mohl být spojený se zvýšenou populací nitrifikátorů a následnou zvýšenou oxidací metanu těmito organismy. Pokud ale metan-monooxygenáza bude vedle oxidace metanu také přeměňovat amoniak na dusitany, bude amoniak snižovat množství metanu spotřebovaného metanotrofy v závislosti na koncentraci daných sloučenin. Meziprodukty a koncové produkty metanotrofní amonné oxidace, tj. hydroxylamin a dusitan, mohou být toxické pro metanotrofní bakterie a mohou vést k inhibici metanotrofní. Inhibiční pro metanotrofy jsou také vysoké přídatky amonných solí, které mohou inhibovat metanotrofní z důvodu osmotického stresu.

Dále bylo zjištěno, že oxidace atmosférického metanu, stejně jako oxidace metanu o vyšší koncentraci než atmosférické, může být zvyšována přídatkem amoniaku i dusičnanů. Záleží především na tom, jestli byly zkoumané půdy limitovány dusíkem, což by mohlo být příčinou nízké metanotrofní. Rozsah půd, ve kterých se zdálo být dostupnost dusíku limitujícím faktorem pro oxidaci metanu, byl stejně velký jako pro půdy, kde byla po přídatku dusíku pozorována inhibice. Vysvětlení pro tyto výsledky je různé. Může to být z důvodu zvýšení oxidace metanu oxidátory amoniaku, změnami ve složení metanotrofního společenstva, všeobecného zlepšení dostupnosti živin nebo zvýšením uvolňování metanu přes vegetaci (Bodelier and Laanbroek, 2004). S podpořením metanotrofní při limitaci půdy

dusíkem souhlasí i Papen et.al. (2001). Tvrdí, že metanotrofové jednoduše potřebují dusík a že pozorované vlivy přidavku dusíku na metanotrofii jsou spíše výsledkem limitace půd dusíkem, než že by byla metanotrofie stimulována přidavky dusíku. Mechanismy stimulace metanotrofie přidavkem dusíku jsou proto stále nejasné.

Jak již bylo řečeno, rychlost metanotrofie může být stimulována přidavkem dusíku prostřednictvím vegetace. Rhizosférní oxidace metanu v přírodních mokřadech kolísá během vegetační sezóny a také se liší mezi druhy mokřadních rostlin. Vysoké rychlosti metanotrofie byly pozorovány na začátku vegetačního období a nižší rychlosti metanotrofie byly naměřeny na konci vegetační sezóny. Mohlo zde docházet k úbytku dostupného dusíku pro metanotrofy. Postupně zmenšující se zdroj dusíku mohl být způsoben zvýšeným příjmem dusíku rostlinami během vegetační sezóny. Případné rozdíly v rhizosférní oxidaci metanu různých druhů rostlin mohou být vysvětleny různými požadavky rostlin na příjem dusíku (Bodelier and Laanbroek, 2004). Obohacení ekosystému dusíkem, které vede ke zvýšenému růstu rostlin, může vést k většímu přísunu kyslíku do půdy přes kořeny rostlin. To může v kombinaci s vyšší dostupností dusíku podporovat metanotrofii (Popp et al., 2000). Větší příjem dusíku vegetací může vést také k větší úživnosti půdy vytvářející lepší podmínky pro mikrobiální růst. Rychlejší mineralizace povede rovněž ke zvýšené dostupnosti uhlíku, dusíku a možná i mikronutrientů (Bodelier and Laanbroek, 2004). To vše může mít pozitivní vliv na rychlost metanotrofie.

2.4.3. Hypotézy

a) Rychlost metanogeneze bude vyšší na přirozených nenarušených lokalitách, než na revitalizovaných. Příčinou bude vyšší hladina vody a mocnější anaerobní vrstva půdy. Metanogeneze na odvodněných lokalitách nebude probíhat nebo bude nízká z důvodu nízké hladiny vody a aerobnímu prostředí v půdě.

b) Větší koncentrace kyslíku v půdě bude podporovat rychlost metanotrofie na revitalizovaných lokalitách a rychlost metanotrofie bude tudíž vyšší na revitalizovaných lokalitách, než na přirozených lokalitách. Na odvodněných lokalitách nebude metanotrofie probíhat z důvodu příliš nízké koncentrace metanu.

c) Přídavek dusičnanů zvýší oxidačně-redukční potenciál a tím bude inhibovat metanogenezi.

3. Metodika

3.1. Popis lokalit a odběr vzorků

Porovnávala jsem dvě odvodněné - Filipova huť (O₁) a Nad Rokytou (O₂), dvě revitalizované - Cikánská slat' (R₁) a Na Ztraceném (R₂) a dvě nenarušené rašelinné smrčiny – Kvilda (P₁) a Filipova huť (P₂). Lokality se nacházejí v Národním parku Šumava na jihozápadě České Republiky (Příloha 1). Zkoumané plochy se nachází v centrální části pohoří s průměrnou nadmořskou výškou 1100 m.n.m. Klima náhorní plošiny je chladné a vlhké s průměrnou roční teplotou 4°C. Dlouhodobý roční průměr srážek je zde 1200 mm (1961-1990, statistika Českého hydrometeorologického ústavu). Na všech lokalitách dominuje smrk ztepilý (*Picea abies*) a dvě revitalizované lokality jsou zahrnuty do projektu „Program revitalizace šumavských mokřadů a rašelinišť“.

Lokalita	Výška vodní hladiny (cm)	Objemová hmotnost půdy (g.cm ⁻³)	pH	Celkový C (%)	Celkový N (%)	Poměr C/N	Celkový P (mg.g ⁻¹)
P1	-9,8±4	0,06±0,01	4,26±0,06	44,27±0,85	1,43±0,19	31,39±4,26	0,8±0,12
P2	-15,1±5,8	0,06±0,02	4,12±0,18	44,74±1,14	1,21±0,3	38,9±9,45	0,59±0,14
R1	-39,75±13,82	0,1±0,04	4,16±0,5	44,71±1,67	1,76±0,19	25,68±3,27	0,74±0,06
R2	-36,33±5,65	0,13±0,02	3,86±0,08	47,34±3,32	1,74±0,26	2753±3,05	0,67±0,12
O1	-68,92±15,04	0,13±0,04	3,75±0,16	45,69±1,29	1,74±0,11	26,31±2,16	0,8±0,12
O2	-50,67±17,11	0,17±0,03	3,66±0,37	43,89±4,28	1,84±0,25	23,97±1,97	0,8±0,08

Tab.1: Fyzikálně-chemické charakteristiky půd (průměr ± směrodatná odchylka) z vrstvy 0-30cm (n = 6) (Maanavilja et al., předložený rukopis).

Rašeliniště byla odvodňována pro lesnické účely od přelomu 19. a 20. století (Bufková, 2013). Nejvíce jich bylo odvodněno v 50. - 60. letech 20. století. Vzdálenost mezi odvodňovacími příkopy je 25- 40 m.

Lokality R₁ a R₂ byly revitalizovány v letech 2005 a 2008 Správou NP Šumava. Revitalizace zahrnuje zablokování odvodňovacích rýh dřevěnými hrázemi. Odvodňovací rýhy jsou také vyplněny organickým materiálem (zbytky dřeva nebo větvemi). Revitalizací bylo dosaženo zvýšení vodní hladiny potřebné pro obnovení rašelinné smrčiny.

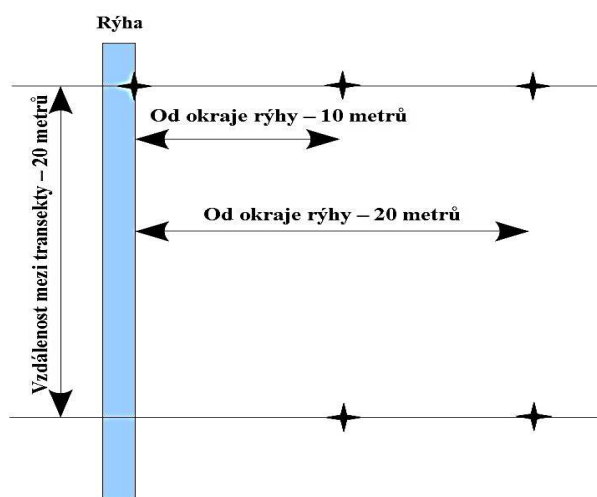
Vegetace na uvedených lokalitách se liší v závislosti na výšce vodní hladiny. Přirozené lokality jsou horská svahová rašeliniště s dominantním suchopýrem pochvatým (*Eriophorum vaginatum*), keříčkovitou vegetací v bylinném patře (*Vaccinium myrtillus*, V.

uliginosum, *V. vitis-idaea*) a rašelínkem (*Sphagnum*) v mechovém patře. Vyskytují se zde i některé druhy ostřic (*Carex rostrata*, *C. nigra*, *C. echinata*) a trav (*Calamagrostis villosa*). Pokryvnost stromového patra je 40-100%.

Na odvodněných rašelinných smrčínách se vegetace odvíjí od stupně degradace stanoviště. V některých částech se zachovala původní vegetace rašelinné smrčiny. Rostou zde například ostřice a na jiných sušších místech se vyskytuje brusnice borůvka (*V. myrtillus*). Mechové patro s dominancí rašelínku je řídké a nachází se pouze ve vlhčích částech dále od odvodňovacích rýh.

Na revitalizovaných lokalitách je vegetace suchomilnější než na přirozených lokalitách. Nicméně na některých místech lze zaznamenat změny ve složení vegetace a posun zpět k vegetaci rašelinné smrčiny. V okolí odvodňovacích rýh se vyskytuje rašelínk.

Vzorky byly odebírány ve dvou transektech kolmých na odvodňovací rýhu. První odběrové místo bylo vždy u okraje odvodňovací rýhy, další 10 m od rýhy a třetí 20 m od rýhy. Druhý transekt byl ve vzdálenosti 20 m od prvního transektu, začínal opět u okraje rýhy a odběrová místa byla ve stejných vzdálenostech jako u prvního transektu (Obr.2). Na přirozených lokalitách byly vzorky odebírány ve stejných vzdálenostech od sebe jako na lokalitách odvodněných a revitalizovaných. Fotografie studovaných lokalit jsou umístěny v Příloze 2.



Obr.2: Schéma transektů na lokalitách

3.2. Laboratorní pokusy

Rychlost metanogeneze metanu byla měřena v laboratorních podmínkách. Půda byla odebrána z horních vrstev půdního horizontu (0-10 cm) a z dolních vrstev (10-30 cm). Po

odběru byla půda přeseta přes síto o velikosti ok 5 mm a uchována v chladicím boxu při teplotě 4°C až do začátku pokusu.

V roce 2011 byly provedeny předběžné pokusy pro zjištění poměru objemu headspace, množství půdy, druhu zkumavek a způsobu uchování vzorků během pokusu.

Po navážení jsem vzorky nechala zregenerovat, podobně jako Jaatinem et al. (2005) a Yrjälä et al. (2010). Vzorky jsem inkubovala při teplotě 12°C po dobu 1 až 2 dnů a poté přidávala různé koncentrace metanu. Tuto teplotu jsem zvolila na základě průměrné teploty vzduchu během vegetační sezóny. Teplota byla podobná té, kterou uváděli Jaatinem et al. (2005) (14°C) a Yrjälä et al. (2010) (15°C).

3.2.1. Stanovení optimální koncentrace metanu

Testovala jsem koncentrace metanu 30 ppm, 100 ppm, 1000 ppm, 10 000 ppm, 50 000 ppm a 100 000 ppm. Používala jsem různé velikosti zkumavek v závislosti na navážce půdy. Při anaerobních inkubacích jsem zkumavky uchovávala ve vodě, abych zabránila úniku metanu ze zkumavek v případě netěsností. Po přidání určité koncentrace metanu ke vzorkům jsem na plynovém chromatografu HP 6850 nebo HP 7820A (Agilent, USA), vybaveným plamenovým ionizačním detektorem, měřila změnu koncentrace metanu za jednotku času (hodiny). Na základě předběžných výsledků jsem stanovila optimální koncentraci metanu, při níž je rychlost metanogeneze nejvyšší. Použila jsem k tomu vztah Michaelis-Mentenové, ukazující závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu, a programu Graph Pad. Na základě K_m jsem pak vypočetla koncentraci metanu, při níž by měla být rychlost metanotrofie největší, podle vztahu:

$$Y = V_{\max} * X / (K_m + X)$$

V_{\max} je maximální rychlost reakce a K_m je koncentrace substrátu při které je reakční rychlost poloviční.

3.2.2. Potenciální oxidace metanu

Nejlepším řešením bylo navážení 1,5g půdy do 12 ml zkumavek (Labco Exetainer). Tato navážka, typ zkumavek i uvedená inkubační teplota byly použity ve všech následujících pokusech, pokud není uvedeno jinak. Poté jsem přidávala 10 000 ppm (1%) metanu k odvodněné lokalitě O₁ (jen spodní vrstva půdy) a části lokality R₁. K ostatním vzorkům jsem přidávala 100 000 ppm (10%) metanu. Na odvodněné lokalitě O₂ mi z předběžných výsledků

nevyšla žádná aktivita metanotrofních bakterií, a proto jsem ji do svých metanotrofních pokusů nezahrnula. Pokusy jsem dělala s horní i dolní vrstvou půdy.

Na plynovém chromatografu jsem měřila koncentraci metanu v headspace zkumavek pomocí odběru vzorku headspace. Koncentraci metanu jsem měřila na začátku inkubace, po přidání určeného množství metanu a ustálení headspace zkumavky. Poté jsem měřila koncentraci metanu za 24 hodin (pro 1% CH₄) a za 72 hodin (pro 10% CH₄). Nakonec jsem vypočítávala rychlost potenciální oxidace metanu jako úbytek koncentrace metanu za čas (hodiny).

3.2.3. Potenciální produkce metanu

Laboratorní pokusy potenciální produkce metanu byly prováděny na podzim roku 2012. Atmosféra ve zkumavkách byla vyměněna za dusík, stejně tak jako v jiných laboratorních pokusech produkce metanu (Nykänen et al., 2002; Sudh et al., 1994; Glatzel et al., 2004 a Juottonen et al., 2008) a byla zde měřena na plynovém chromatografu koncentrace metanu po dobu dvou měsíců. Měření proběhlo v 1,2,3,4,6 a 8 týdnu inkubace. Důvodem byl předpoklad, že maximální rychlosti metanogeneze bude dosaženo přibližně po 3 - 4 týdnech pro přirozené a případně i revitalizované lokality. Poté už rychlost metanogeneze bude přibližně stejná. U odvodněných lokalit a případně i některých částí revitalizovaných lokalit jsem očekávala několikátýdenní regeneraci metanogenního společenstva a až poté i nárůst rychlosti metanogeneze. Vycházela jsem z pokusu Urbanová et al. (2011). Pro ujištění, že ve zkumavkách není aerobní prostředí, jsem měřila zároveň s koncentrací metanu také množství kyslíku ve zkumavkách. Rovněž jsem měřila koncentraci oxidu uhličitého. To bylo z důvodu, že CO₂ vzniká při respiraci a tudíž indikuje aktivitu mikrobiálního společenstva ve vzorcích půdy.

Pro výpočet potenciální produkce metanu jsem také stanovila suchou hmotnost vzorku (sušinu). Sušina je suchý podíl půdy na 1g čerstvého vzorku. Navážila jsem 5-8 g půdy do hliníkových váženek, zvážila je a dala na 5h sušit při 105°C. Poté jsem váženky opět zvážila a vypočítala podíl sušiny podle vzorce:

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

m_s= hmotnost váženky se suchou půdou (g)

m_v= hmotnost váženky (g)

m₁= hmotnost váženky s vlhkou půdou (g)

3.2.4. Potenciální oxidace a produkce metanu ovlivněná přísunem minerálního (NO_3^- , NH_4^+) a organického dusíku (aminokyseliny glycinu)

Pokusy potenciální produkce metanu s přidavkem dusíku jsem prováděla stejným způsobem jako pokusy potenciální produkce metanu bez přidavku dusíku, pouze jsem ke vzorkům přidávala různé formy dusíku. Začala jsem předběžným pokusem. Z revitalizovaných lokalit (R_1 a R_2) a z původních (P_1 a P_2) jsem vybrala vždy jednu, kde byla potencionální produkce metanu nejvyšší (P_1 a R_2).

Destilovanou vodou jsem vyextrahovala půdu z těchto vzorků, abych zjistila koncentraci organického a anorganického dusíku. 10g půdy jsem extrahovala 50 ml destilované vody 45 minut na třepače (KS 501 digital, IKA LABORTECHNIK) při 160ot./min. Poté jsem extrakt centrifugovala v centrifuze (ROTIXA 50 RS, Hettich, Německo) při 4000 ot./min. 10 minut a přefiltrovala přes skleněný filtr (0.45 μm , MN-GF-5, Německo). Filtrát byl zamražen a později analyzován na kontinuálním průtokovém analyzátoru FIA (Flow Injection Analyzer Lachat QC8500, Lachat Instruments, USA) pro stanovení iontů NO_3^- , NH_4^+ . Na základě výsledků z FIA jsem vypočítala koncentraci N- NH_4 a N- NO_3 podle vzorce:

Výpočet koncentrace N- NH_4 (vzorec pro N- NO_3 je stejný):

$$c = \frac{(c_{N-NH_4} - B) * V}{m * s}$$

($\mu\text{g/g}$ suché půdy)

c_{N-NH_4} – koncentrace amonných iontů v extraktu (mg N- NH_4 /l)

B – koncentrace amonných iontů ve slepém vzorku (mg N- NH_4 /l)

V – objem extrakčního činidla (ml)

m – hmotnost půdy (g)

s - sušina

Koncentraci organického dusíku jsem vypočítala na základě změřeného anorganického dusíku a celkové koncentrace dusíku. Celková koncentrace dusíku byla měřena na přístroji LiquiToC II (Elementar, Německo).

Ke vzorkům jsem přidávala NH_4Cl nebo KNO_3 jako minerální formy dusíku nebo glycin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$), který představoval přídavek organického dusíku. Měřila jsem rychlost metanotrofie nebo metanogeneze u vzorků bez přídavku dusíku (kontrola) a dvojnásobný, pětinásobný, desetinásobný a dvacetinásobný přídavek původní koncentrace amoniaku, dusičnanů nebo organického dusíku. Podle literatury měl mít dvacetinásobný přídavek N již inhibující účinek na metanotrofní bakterie (Whalen, 2000). K půdě jsem vždy přidala 0,2 ml roztoku sloučeniny dusíku o dané koncentraci pomocí injekční stříkačky.

Pokus potenciální oxidace metanu ovlivněné přísunem minerálního dusíku jsem dělala se stejnými vzorky a stejnými násobky přídavku dusíkatých sloučenin jako pro potenciální produkci metanu. Bohužel některé hodnoty organického dusíku vyšly záporně (pravděpodobně z důvodu jiné přesnosti přístrojů FIA a LiquiToc). Proto jsem přidala organický dusík ve stejné koncentraci jako amoniakální dusík. Původní koncentrace N- NH_4 a N- NO_3 v používaných vzorcích jsou uvedeny v Příloze 3.

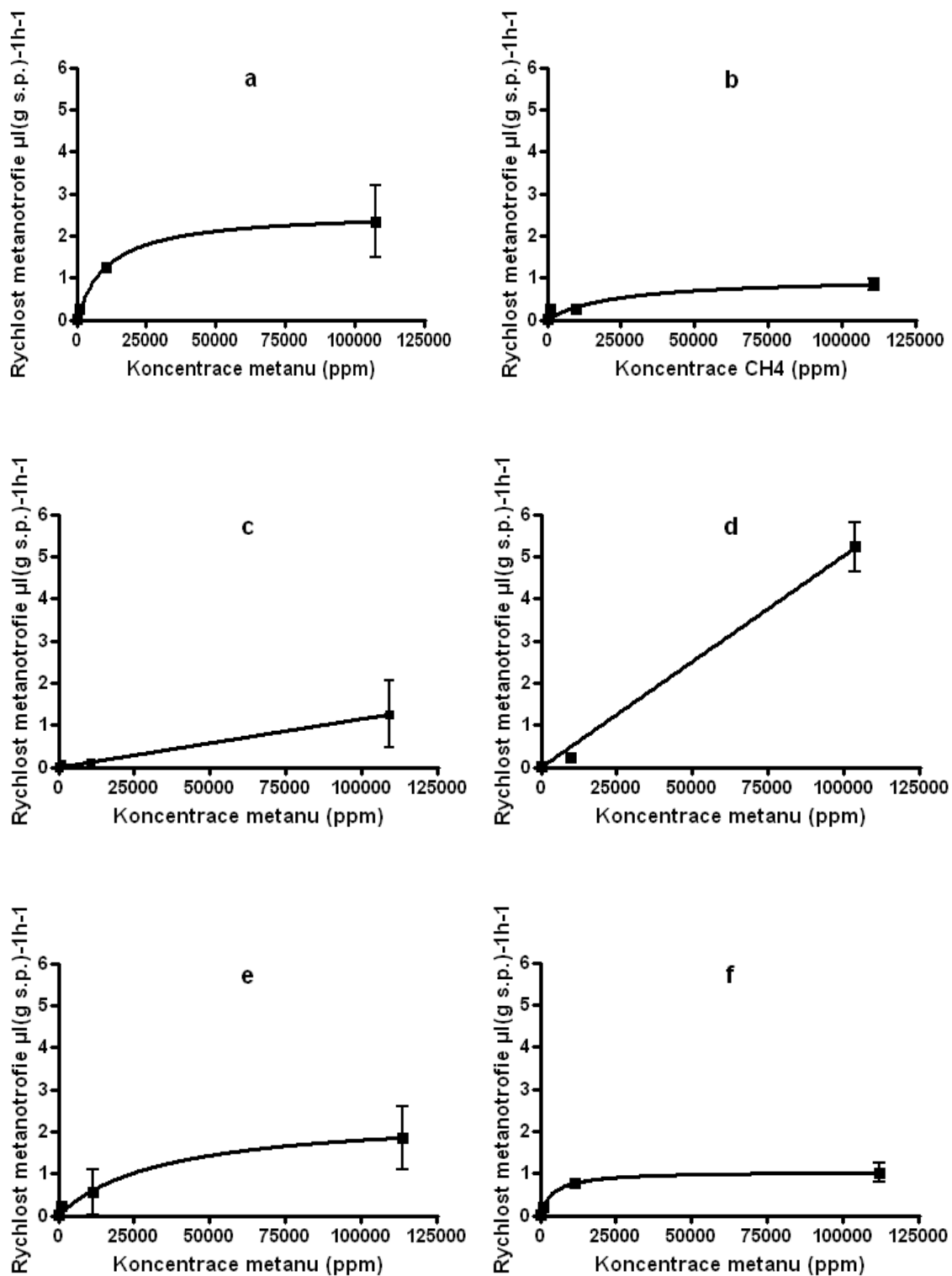
3. 3. Vyhodnocení dat

Ke stanovení optimální koncentrace metanu jsem používala GraphPad (PRISM 4). K výpočtu rychlosti metanogeneze a metanotrofie a k vytvoření některých grafů jsem používala program Excel 2007 (Microsoft). Tento program jsem použila také k výpočtu průměrů a směrodatných odchylek. Statistické hodnocení jsem dělala v programu STATISTICA 10 (StatSoft). Ke srovnání rychlostí metanogeneze a metanotrofie jsem použila test analýzy variance (ANOVA). Používala jsem hierarchickou, jednocestnou a faktoriální ANOVU. Korelace proměnných jsem počítala pomocí korelačních matic.

4. Výsledky

4.1. Stanovení optimální koncentrace metanu

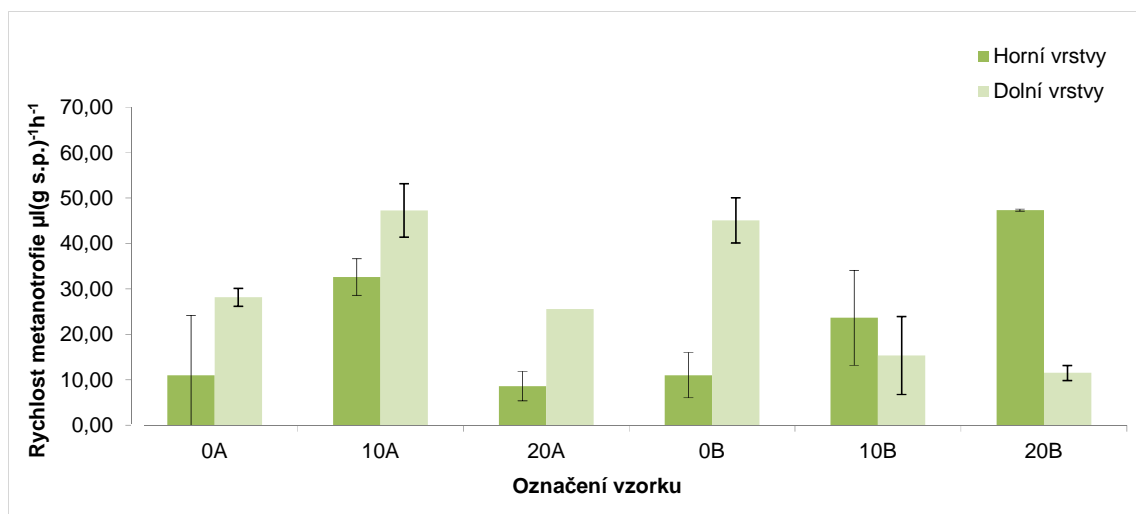
Optimální koncentrace metanu pro nejvyšší rychlost metanotrofie byla kolem 10% metanu. Dosazením hodnot K_m a V_{max} do rovnice vztahu Michaelis-Mentenové jsem vypočetla, že optimální koncentrace metanu je pro většinu lokalit v rozmezí 106498 - 115 623 ppm (10,5-11,5%). Na lokalitách P2, R1 (vz.20A H) a R2 (Vz.0B H) byla již 50% koncentrace metanu inhibiční. V ostatních případech tomu tak nebylo. Důvodem je pravděpodobně nepřesnost při měření 50% koncentrace metanu na plynovém chromatografu. (Graf 1).



Graf 1: Závislost rychlosti metanotrofie na koncentraci metanu. **a)** Lokalita P1 (Km = 11054; V max = 2,58) **b)** lokalita P2 (Km = 23125; V max = 1,02) **c)** lokalita R1, vz.0A H (Km = 368182; V max = 5,459) **d)** lokalita R1, vz. 20A H (Km = 5,122; Vmax = 30938) **e)** lokalita R2, vz.0B H (Km = 34426; Vmax = 2,42) **f)** lokalita R2, vz. 20A H (Km = 4223; Vmax = 1,06). Vzoroky 0A H a 0B H leží přímo u rýhy a vzorek 20A H nejdále od rýhy (n = 3, ± SD).

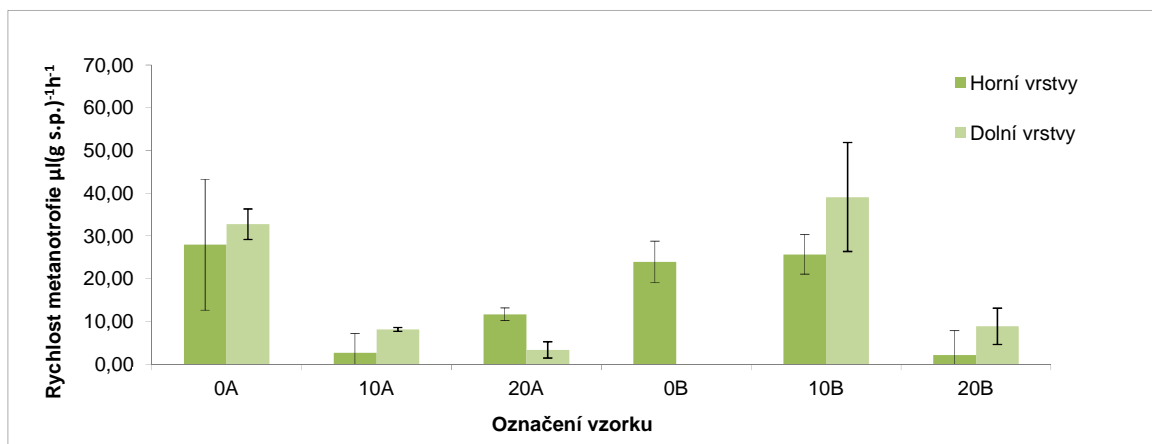
4.2. Potenciální oxidace metanu

Rychlost metanotrofie byla v rozsahu $2 - 47 \mu\text{l}(\text{g s.p.})^{-1}\text{h}^{-1}$ na přirozených lokalitách a $0 - 65 \mu\text{l}(\text{g s.p.})^{-1}\text{h}^{-1}$ na revitalizovaných lokalitách (Grafy 2 až 5). Na odvodněných lokalitách byla rychlost metanotrofie v horních vrstvách pod mezí detekce a v dolních vrstvách odvodněných lokalit byla rychlost metanotrofie měřitelná pouze na lokalitě O1. Na této lokalitě byly rychlosti metanotrofie velmi nízké v porovnání s lokalitami přirozenými a revitalizovanými ($0-2,1 \mu\text{l}(\text{g s.p.})^{-1}\text{h}^{-1}$). Rychlost metanotrofie byla na revitalizovaných lokalitách více variabilní než na přirozených lokalitách a byly zde i větší rozdíly mezi horními a dolními vrstvami půdy. U lokality R1 byl vidět trend ve snižující se rychlosti metanotrofie v horních vrstvách směrem od rýhy (vzorky 0A – 20A a 0B -20B). U lokality R2 žádný trend nebyl.



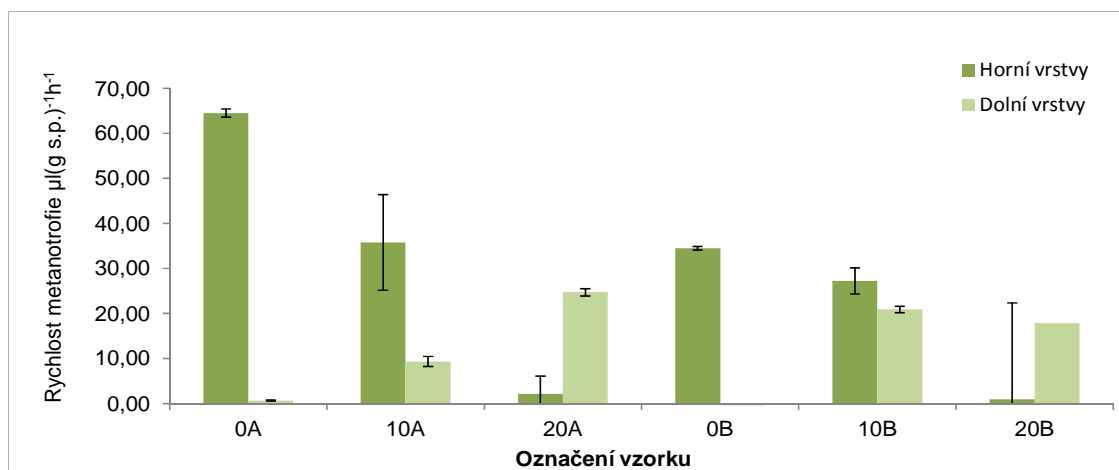
Graf 2: Rychlost metanotrofie na přirozené lokalitě P1 v horní i dolní vrstvě půdy.

Vyneseny jsou průměry ($n = 2, \pm \text{SD}$).

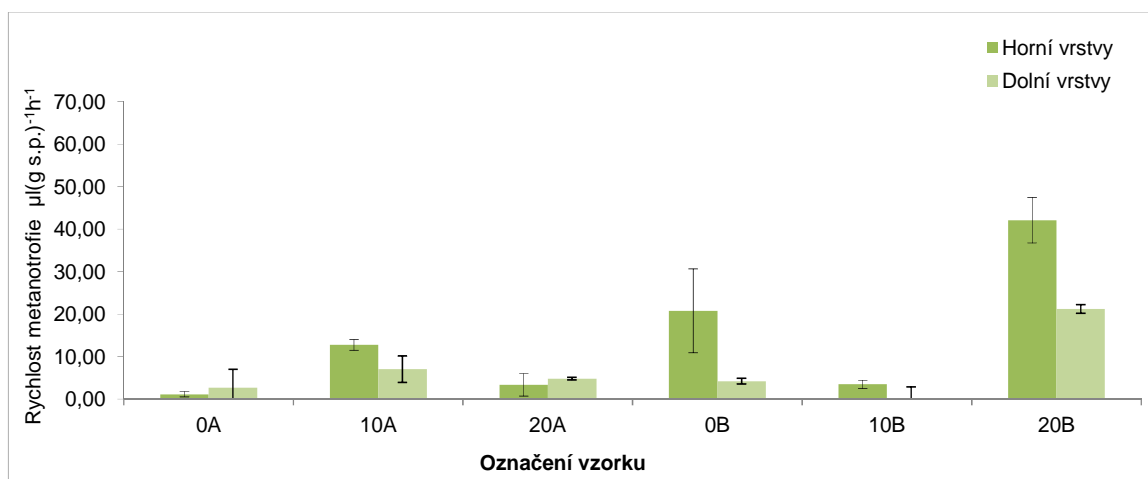


Graf 3: Rychlost metanotrofie na přirozené lokalitě P2 v horní i dolní vrstvě půdy.

Vyneseny jsou průměry ($n = 2, \pm \text{SD}$).



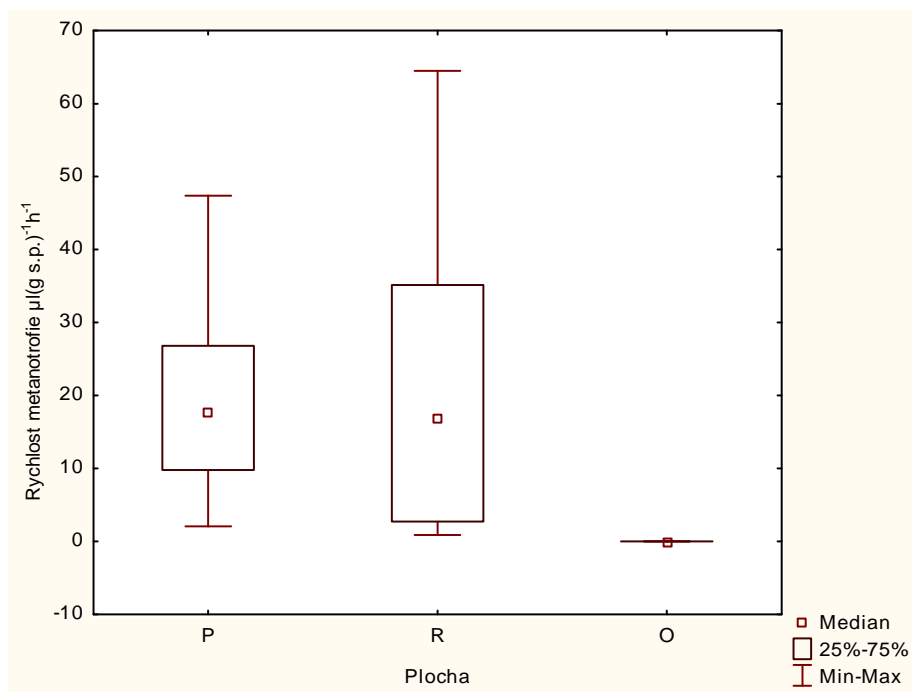
Graf 4: Rychlost metanotrofie na revitalizované lokalitě R1 v horní i dolní vrstvě půdy. Vyneseny jsou průměry ($n = 2$, \pm SD)



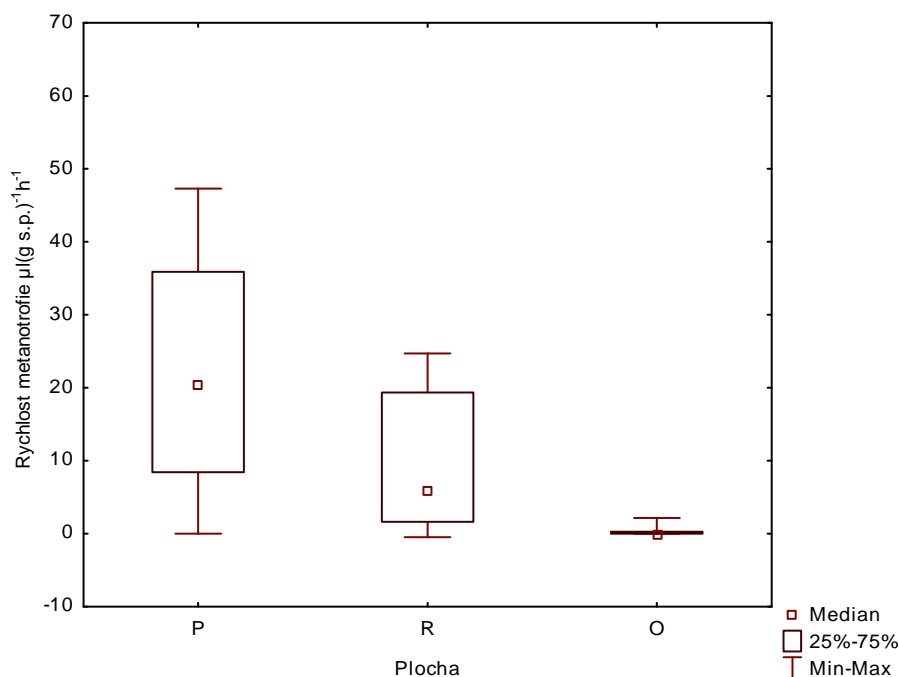
Graf 5: Rychlost metanotrofie na revitalizované lokalitě R2 v horní i dolní vrstvě půdy. Vyneseny jsou průměry ($n = 2$, \pm SD).

Hierarchickou ANOVOU jsem zjistila, že není statisticky průkazný rozdíl v rychlosti metanotrofie mezi dvěma přirozenými lokalitami v horních vrstvách půdy ($p = 0,33$; $F=1,2$). Stejný výsledek mi vyšel i pro horní vrstvy půdy revitalizovaných ploch. Proto jsem dále pracovala se dvěma přirozenými lokalitami dohromady, jako by to byla nezávislá pozorování. Stejně jsem zacházela s revitalizovanými lokalitami v horních vrstvách půdy. Hierarchickou ANOVOU jsem zjistila, že statisticky průkazné rozdíly mezi jednotlivými přirozenými lokalitami a mezi jednotlivými revitalizovanými lokalitami nejsou ani v dolních vrstvách půdy ($p = 0,17$; $F=1,9$). Proto jsem s uvedenými lokalitami v dalších statistických testech pracovala tak, jako kdyby to byla nezávislá pozorování a používala jsem jednocestnou ANOVU.

Rychlost metanotrofie byla v horních vrstvách půdy statisticky průkazně vyšší na přirozených a revitalizovaných lokalitách, než na odvodněných ($p < 0,05$; $F=31,4$). Mezi přirozenými a revitalizovanými lokalitami nebyl v horní vrstvě půdy statisticky průkazný rozdíl ($p = 0,81$; $F=0,05$; Graf 6). Rychlost metanotrofie byla v dolních vrstvách půdy statisticky průkazně vyšší na přirozených a revitalizovaných lokalitách, než na odvodněných ($p < 0,05$; $F=33,3$). Rychlost metanotrofie byla v dolních vrstvách půdy statisticky průkazně vyšší na přirozených lokalitách než na revitalizovaných ($p = 0,03$; $F = 5,4$; Graf 7).



Graf 6: Rychlosti metanotrofie na přirozených (P), revitalizovaných (R) a odvodněných (O) lokalitách v horní vrstvě půdy ($n = 12$).

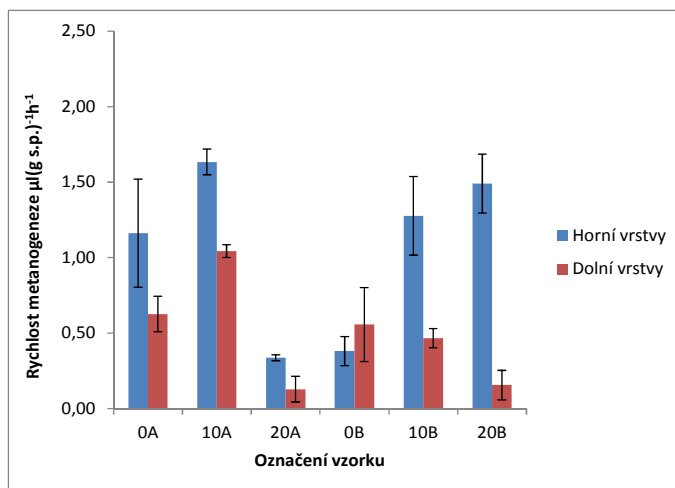


Graf 7: Rychlosti metanotrofie na přirozených (P), revitalizovaných (R) a odvodněných (O) lokalitách v dolní vrstvě půdy (n = 12).

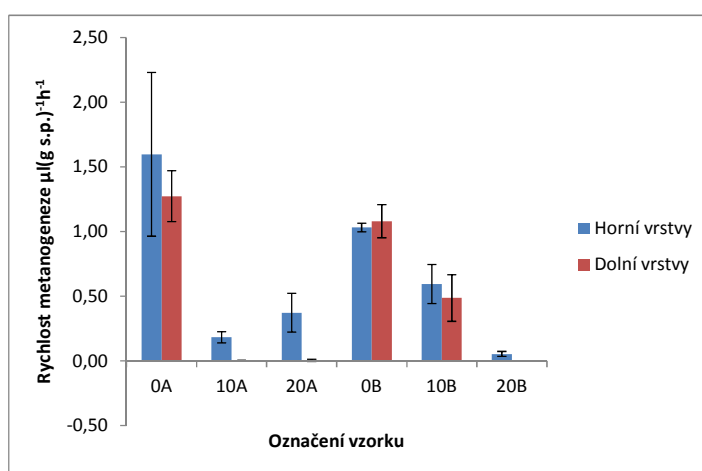
4.3. Potenciální produkce metanu

Pomocí hierarchické ANOVY jsem zjistila, že není statisticky průkazný rozdíl v rychlosti metanogeneze mezi dvěma přirozenými lokalitami v horních vrstvách půdy. Stejný výsledek mi vyšel i pro horní vrstvy půdy revitalizovaných lokalit. Proto jsem dále pracovala se dvěma přirozenými lokalitami dohromady, jako by to byla nezávislá pozorování. Stejně jsem zacházela s horními vrstvami půdy na revitalizovaných lokalitách a testovala jsem dále přirozené a revitalizované lokality pomocí jednocestné ANOVY.

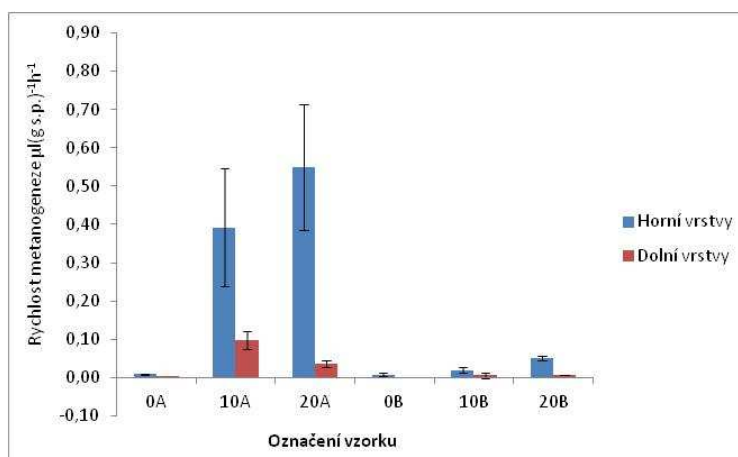
Rychlost metanogeneze na přirozených lokalitách byla v rozsahu 0,004 – 1,6 µl (g s.p.)⁻¹h⁻¹, na revitalizovaných lokalitách v rozsahu 0 – 0,55 µl(g s.p.)⁻¹h⁻¹ (Grafy 8 až 11). U lokality R1 byl trend ve zvyšující se rychlosti metanogeneze směrem od rýhy v prvním transektu (vzorky 0A – 20A) v horních vrstvách půdy. U lokality R2 byl tento trend také, ale rychlosti metanogeneze byly nižší, než v předchozím případě. Na odvodněných lokalitách byla rychlost metanogeneze v horních i dolních vrstvách pod mezí detekce.



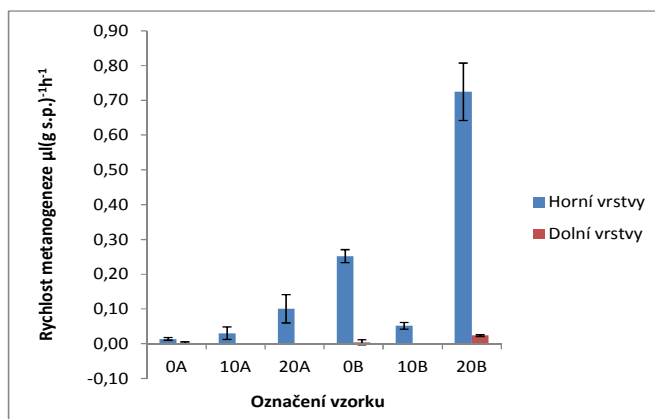
Graf 8: Rychlost metanogeneze na přirozené lokalitě P1 v horní i dolní vrstvě půdy. Vyneseny jsou průměry ($n = 3; \pm SD$).



Graf 9: Rychlost metanogeneze na přirozené lokalitě P2 v horní i dolní vrstvě půdy. Vyneseny jsou průměry ($n = 3; \pm SD$).

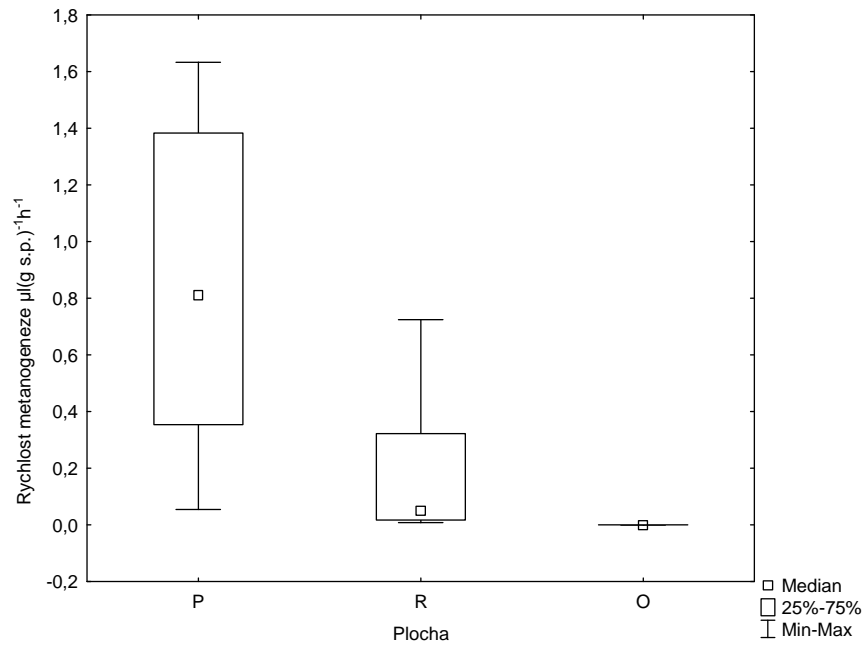


Graf 10: Rychlost metanogeneze na revitalizované lokalitě R1 v horní i dolní vrstvě půdy. Vyneseny jsou průměry ($n = 3; \pm SD$).

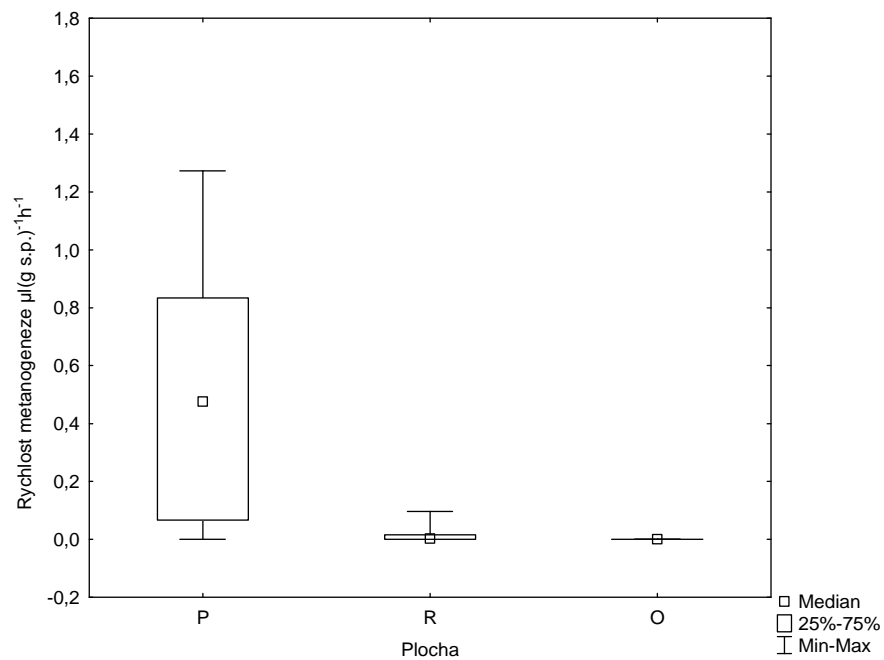


Graf 11: Rychlost metanogeneze na revitalizované lokalitě R2 v horní i dolní vrstvě půdy. Vyneseny jsou průměry ($n = 3, \pm SD$).

Rychlost metanogeneze byla v horních vrstvách půdy statisticky průkazně vyšší na přirozených a revitalizovaných lokalitách, než na odvodněných ($p < 0,05$; $F=31,5$). Rychlost metanogeneze byla v horních vrstvách půdy statisticky průkazně vyšší na přirozených lokalitách než na revitalizovaných ($p < 0,05$; $F= 13$; Graf 12). Rychlost metanogeneze byla v dolních vrstvách statisticky průkazně vyšší na přirozených a revitalizovaných lokalitách, než na odvodněných ($p < 0,05$; $F= 14,6$). Rychlost metanogeneze byla v dolních vrstvách půdy statisticky průkazně vyšší na přirozených lokalitách než na revitalizovaných ($p < 0,05$; $F= 12,96$; Graf 13).



Graf 12: Rychlost metanogeneze na přirozených (P), revitalizovaných (R) a odvodněných (O) lokalitách v horní vrstvě půdy (n = 12).

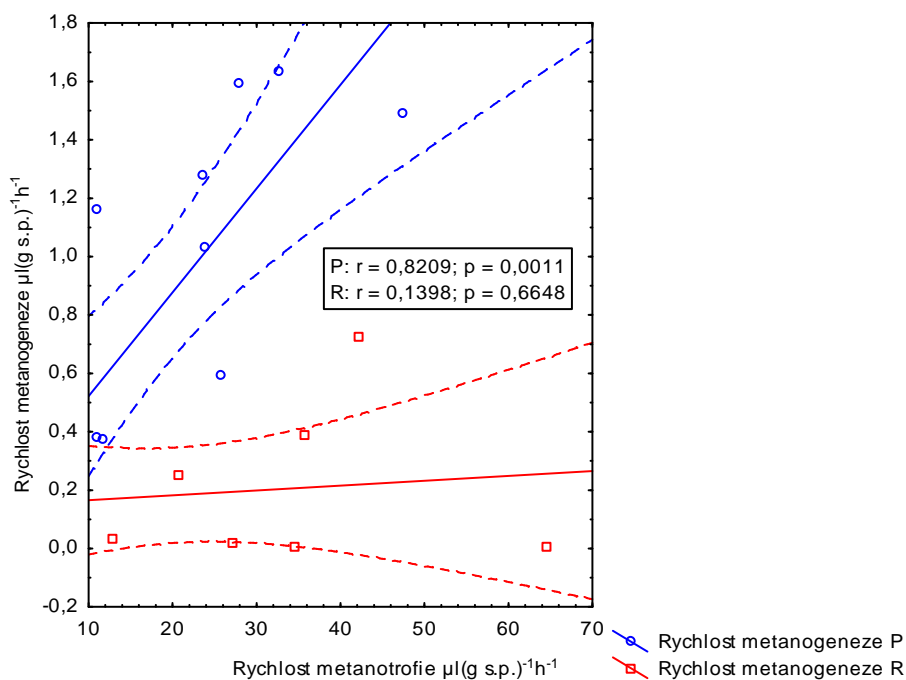


Graf 13: Rychlost metanogeneze na přirozených (P), revitalizovaných (R) a odvodněných (O) lokalitách v dolní vrstvě půdy (n = 12).

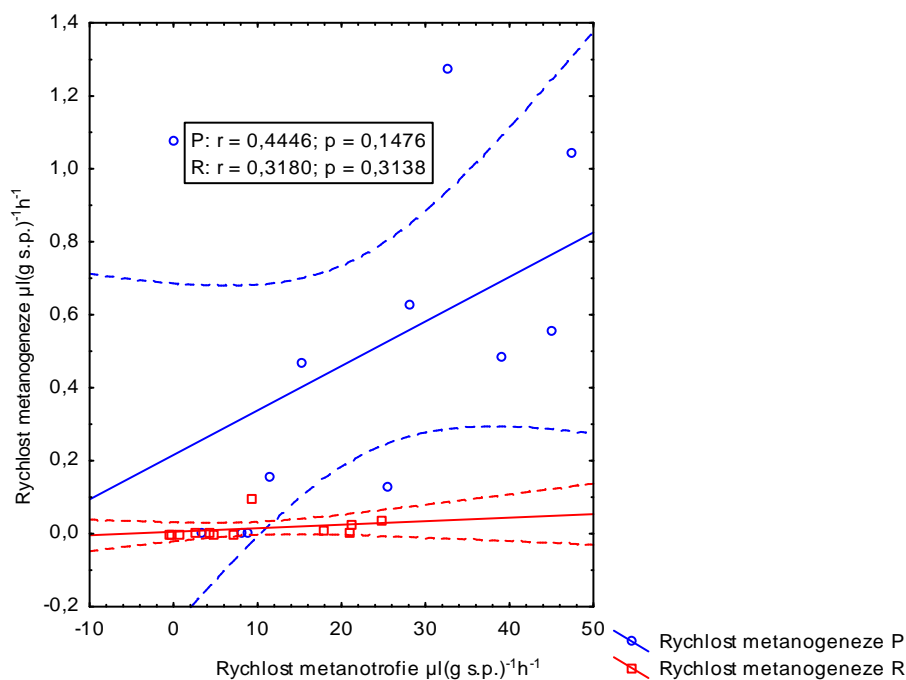
4.4. Korelace rychlosti metanogeneze a metanotrofie

Rychlost metanogeneze byla na přirozených lokalitách statisticky průkazně pozitivně korelovaná s rychlostí metanotrofie ($p < 0,05$) v horních vrstvách půdy. Rychlost metanogeneze na revitalizovaných lokalitách byla korelovaná pozitivně s rychlostí metanotrofie. Tato korelace nebyla statisticky průkazná ($p = 0,66$; Graf 14)).

Rychlost metanogeneze na přirozených lokalitách byla korelovaná pozitivně s rychlostí metanotrofie v dolních vrstvách půdy. Rychlost metanogeneze na revitalizovaných lokalitách byla korelovaná pozitivně s rychlostí metanotrofie. Tyto korelace nebyly statisticky průkazné ($p = 0,15$; $p = 0,31$; Graf 15).



Graf 14: Závislost rychlosti metanogeneze na rychlosti metanotrofie v horní vrstvě půdy na přirozených (P) a revitalizovaných lokalitách (R).



Graf 15: Závislost rychlosti metanogeneze na rychlosti metanotrofie v dolní vrstvě půdy na přirozených (P) a revitalizovaných lokalitách (R).

4.5. Vliv dusíku na potenciální oxidaci a produkci metanu

Vliv dusíku na potenciální oxidaci metanu

Rychlost metanotrofie byla na přirozené lokalitě P1 v horních vrstvách půdy statisticky průkazně inhibována přidávkem minerálního a organického dusíku. Nejvíce se rychlost metanotrofie snížila po přidávku NH_4Cl .

V dolních vrstvách půdy na lokalitě P1 byla rychlost metanotrofie statisticky průkazně inhibována pouze přidávkem NH_4Cl . Přídavek KNO_3 zde inhiboval rychlost metanotrofie více než přídavek organického dusíku (Graf 16 A, B).

Vliv přidávku minerálního a organického dusíku na rychlost metanotrofie nebyl statisticky průkazný v horních ani dolních vrstvách půdy na revitalizované lokalitě. Ve vzorcích u rýhy byl však patrný trend stimulace metanotrofie po přidávku minerálního nebo organického dusíku v horních vrstvách půdy a po přidávku organického dusíku v dolních vrstvách půdy (Graf 17 C, D). Ve vzorcích 20 m od odvodňovací rýhy byl patrný inhibiční trend po přidávku minerálního dusíku v horní i dolní vrstvě půdy. Přídavek organického dusíku měl trend zvýšit rychlost metanotrofie v horní i dolní vrstvě půdy (Graf 18 E, F).

Vzdálenost od rýhy neměla statisticky průkazný vliv na rychlost metanotrofie po přidavku dusíku v horních ani dolních vrstvách půdy.

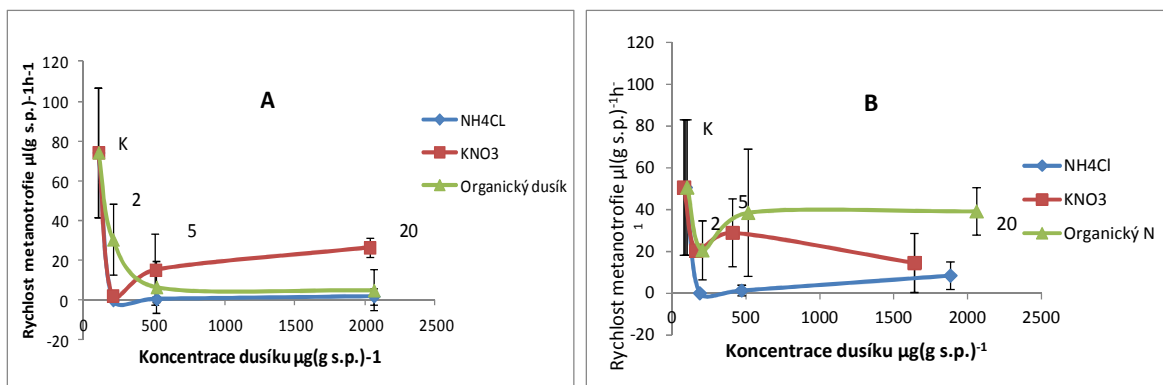
Přehled výsledků vlivu přidavku dusíku na rychlost metanotrofie je uveden v tabulkách 2 a 3.

Vliv přidavku dusíku na rychlost metanotrofie						
Lokalita		NH ₄ Cl		KNO ₃		Organický dusík (Glycin)
P1 H	-	p<0,05 F =19,8	-	p<0,05 F=11,2	-	p<0,05 F =32,7
P1 D	-	p<0,05 F = 8,4	-	p=0,10; F= 2,6	-	p=0,50; 0,83
R2 H	0	p=0,75 F=0,41	0	p=0,45;F=0,97	0	p =0,10; 2,9
R2 D	0	p=0,59 F= 0,7	0	p=0,92 F = 16	0	p=0,73; F =0,44
R2 H; vliv vzdálenosti vzorku od rýhy	0	p= 0,35; F= 1	0	p=0,75 F=0,10	0	p=0,06; F= 5,0
R2 D; vliv vzdálenosti vzorku od rýhy	0	p=0,70; F= 0,16	0	p=0,16; F=2,4	0	p=0,61; F=0,26

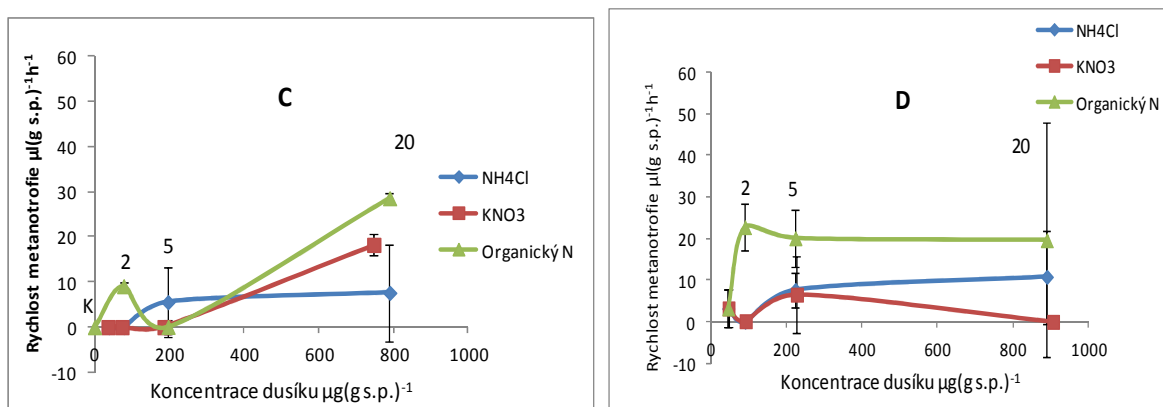
Tab. 2: Přehled vlivu přidavku dusíku na rychlost metanotrofie. 0 označuje žádnou reakci po přidavku N, + označuje stimulaci metanotrofie; – označuje inhibici metanotrofie. Barevně jsou označeny statisticky průkazné vlivy.

Trendy ve vlivu přidavku dusíku na rychlost metanotrofie			
Lokalita	NH ₄ Cl	KNO ₃	Organický dusík (Glycin)
R2 H; vzorek u rýhy	+	+	+
R2 D; vzorek u rýhy	0	0	+
R2 H; vzorek 20m od rýhy	-	-	+
R2 D; vzorek 20m od rýhy	-	-	+

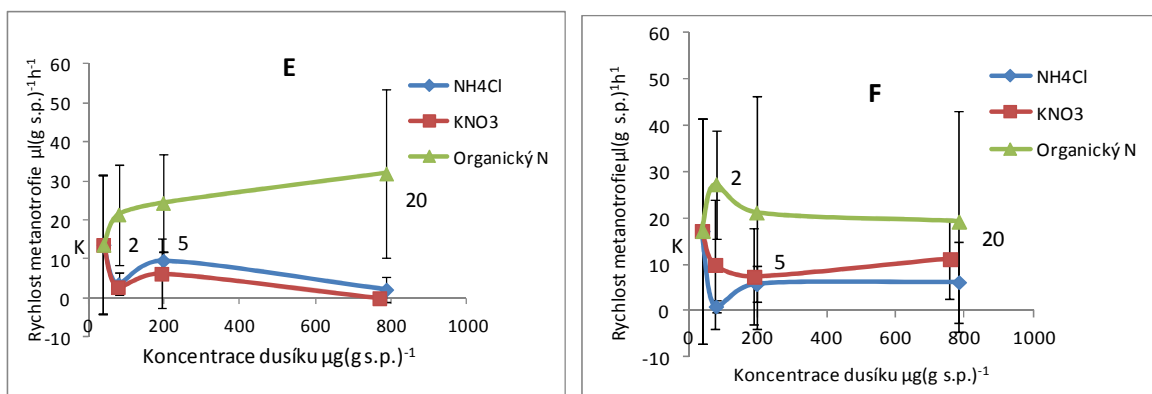
Tab. 3: Přehled trendů vlivu přidavku dusíku na rychlost metanotrofie. 0 označuje neovlivnění přidavkem N, + označuje stimulační trend rychlosti metanotrofie; – označuje inhibiční trend rychlosti metanotrofie. Pro tyto vlivy nebyla dělána statistika pro nedostatek dat.



Graf 16: Rychlost metanotrofie ovlivněná přidavkem NH₄Cl, KNO₃ a organického dusíku (glycinu) na přirozené lokalitě P1 v horní vrstvě půdy (A) a v dolní vrstvě půdy (B). „K“ označuje kontrolu a čísla 2,5,20 označují přidávané násobky původní koncentrace dusíkatých látek. Vyneseny jsou průměry (n = 4; ± SD).



Graf 17: Rychlost metanotrofie ovlivněná přidavkem NH₄Cl, KNO₃ a organického dusíku (glycinu) na revitalizované lokalitě R2 ve vzorcích u odvodňovací rýhy v horní vrstvě půdy (C) a v dolní vrstvě půdy (D). „K“ označuje kontrolu a čísla 2,5,20 označují přidávané násobky původní koncentrace dusíkatých látek. Vyneseny jsou průměry (n = 2; ± SD).



Graf 18: Rychlost metanotrofie ovlivněná přidavkem NH_4Cl , KNO_3 a organického dusíku (glycinu) na revitalizované lokalitě R2 ve vzorcích 20 m od rýhy v horních vrstvách půdy (E) a v dolních vrstvách půdy (F). „K“ označuje kontrolu a čísla 2,5,20 označují přidávané násobky původní koncentrace dusíkatých látek. Vyneseny jsou průměry ($n = 2; \pm \text{SD}$).

Vliv dusíku na potenciální produkci metanu

Přídavek NH_4Cl neměl statisticky průkazný vliv na rychlost metanogeneze na lokalitě P1. Byl však patrný trend zvýšení rychlosti metanogeneze přidavkem dvojnásobku a pětinásobku původní koncentrace amoniaku v horních vrstvách půdy. Dvacetinásobek původní koncentrace amoniaku již měl tendenci rychlost metanogeneze inhibovat. Pět a dvacetinásobek původní koncentrace dusičnanů rychlost metanogeneze statisticky průkazně inhiboval. Přídavek organického dusíku neměl statisticky průkazný vliv na rychlost metanogeneze, ale byl zde patrný trend stimulace metanogeneze. Přídavek NH_4Cl neměl statisticky průkazný vliv na rychlost metanogeneze v dolních vrstvách půdy. Byl zde však patrný trend zvýšení rychlosti metanogeneze po přidavku pětinásobku původní koncentrace amoniaku. Přídavek dusičnanů zvýšil statisticky průkazně rychlost metanogeneze pouze při dvacetinásobném přidavku původní koncentrace dusičnanů, i když trend ve zvýšení rychlosti metanogeneze zde byl i u pětinásobného přidavku dusičnanů. Rychlost metanogeneze byla statisticky průkazně zvýšena pouze dvacetinásobkem původní koncentrace organického dusíku. Již nižší přidávky organického dusíku však měly tendenci rychlost metanogeneze podpořit (Graf 19).

Rychlost metanogeneze nebyla statisticky průkazně ovlivněna přidavkem minerálního ani organického dusíku na lokalitě R2. Přídavek minerálního i organického dusíku statisticky průkazně neovlivnil rychlost metanogeneze. Vzdálenost od odvodňovací rýhy statisticky průkazně neovlivnila rychlost metanogeneze. Přídavek minerálního dusíku v horní vrstvě půdy měl trend rychlost metanogeneze inhibovat. Trend zvýšení rychlosti

metanogeneze po přidavku organického dusíku byl patrný v horní i dolní vrstvě půdy (Grafy 20 a 21). Vzdálenost od rýhy neměla statisticky průkazný vliv na rychlost metanotrofie po přidavku dusíku v horních ani dolních vrstvách půdy.

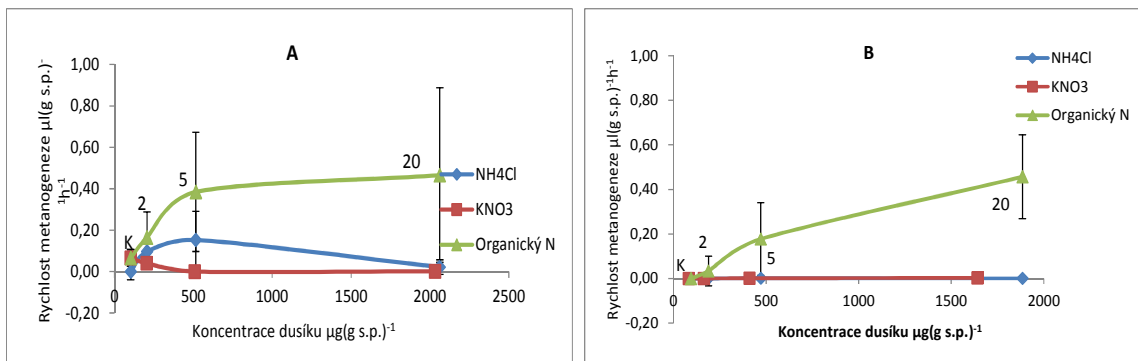
Přehled výsledků vlivu přidavku dusíku na rychlost metanogeneze je uveden v tabulkách 4 a 5.

Vliv přidavku dusíku na rychlost metanogeneze					
Lokalita	NH ₄ Cl		KNO ₃		Organický dusík (glycin)
P1 H	±	p = 0,17; F = 1,9	-	p<0,05; F = 7,7	+ p = 0,16; F = 2
P1 D	+	p = 0,18; F = 1,9	+	p<0,05; F = 4,9*	+ p<0,05; F = 10,4*
R2 H	-	p = 0,56; F = 0,7	-	p = 0,45; F = 1	+ p = 0,18; F = 2,1
R2 D	0	p = 0,21; F = 1,9	0	p = 0,91; F = 0,2	+ p = 0,73; F = 0,44
R2 H; vliv vzdálenosti vzorku od rýhy	0	p = 0,30; F = 1,2	0	p = 0,16; F = 0,2	0 p = 0,14; F = 2,7
R2 D; vliv vzdálenosti vzorku od rýhy	0	p = 0,78; F = 0,8	0	p = 0,16; F = 2,4	0 p = 0,62; F = 0,3

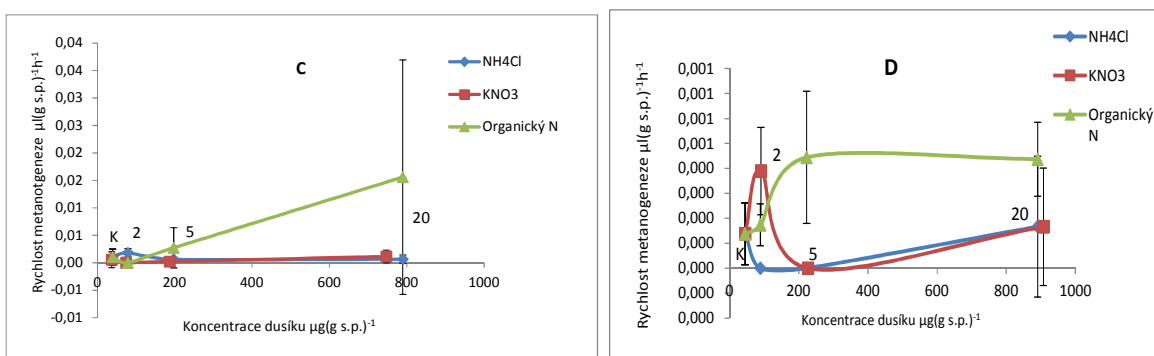
Tab.4: : Přehled vlivu přidavku dusíku na rychlost metanogeneze. 0 označuje žádnou reakci na přidavek N, + označuje stimulaci metanotrofie; – označuje inhibici metanotrofie. Barevně jsou označeny statisticky průkazné vlivy. * statisticky průkazný vliv na rychlost metanogeneze měl pouze dvacetinásobek původní koncentrace N

Trendy ve vlivu přidavku dusíku na rychlost metanogeneze			
Lokalita	NH ₄ Cl	KNO ₃	Organický dusík (glycin)
R2 H; vzorek u rýhy	-	+	+
R2 D; vzorek u rýhy	±	±	+
R2 H; vzorek 20m od rýhy	-	-	+
R2 D; vzorek 20m od rýhy	±	±	+

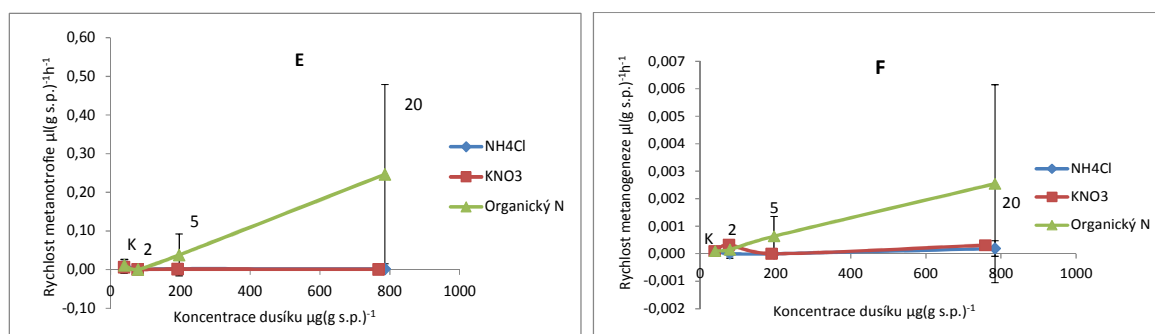
Tab. 5: Trendy ve vlivu přidavku dusíku na rychlost metanogeneze. 0 označuje neovlivnění přidavkem N; + označuje stimulační trend rychlosti metanogeneze; – označuje inhibiční trend rychlosti metanogeneze. Pro tyto vlivy nebyla dělána statistika pro nedostatek dat.



Graf 19: Rychlost metanogeneze ovlivněná přísunem NH₄Cl, KNO₃ a organického dusíku na přirozené lokalitě P1 v horní vrstvě půdy (A) a v dolní vrstvě půdy (B). „K“ označuje kontrolu a čísla 2,5,20 označují přidávané násobky původní koncentrace dusíkatých látek. Vyneseny jsou průměry (n = 4; ± SD).



Graf 20: Rychlost metanogeneze ovlivněná přísunem NH₄Cl, KNO₃ a organického dusíku na revitalizované lokalitě R2 ve vzorcích u odvodňovací rýhy v horní vrstvě půdy (C) a v dolní vrstvě půdy (D). „K“ označuje kontrolu a čísla 2,5,20 označují přidávané násobky původní koncentrace dusíkatých látek. Vyneseny jsou průměry (n = 2; ± SD).



Graf 21: Rychlost metanogeneze ovlivněná přísunem NH₄Cl, KNO₃ a organického dusíku na revitalizované lokalitě R2 ve vzorcích 20 m od rýhy v horních vrstvách půdy (E) a v dolních vrstvách půdy (F). „K“ označuje kontrolu a čísla 2,5,20 označují přidávané násobky původní koncentrace dusíkatých látek. Vyneseny jsou průměry (n = 2; ± SD).

5. Diskuze

5.1. Stanovení optimální koncentrace metanu pro metanotrofní bakterie

Koncentrace metanu používané jinými autory pro měření rychlosti metanotrofie uváděné v literatuře jsou nižší, než mi vyšly při mých pokusech na základě vztahu Michaelis-Mentenové pro stanovení optimální koncentrace metanu. Kettunen et al. (1999) a Jaatinen et al. (2005) uvádějí koncentraci metanu ve vzorcích na začátku svých pokusů 100 ppm. Tato koncentrace je nižší pravděpodobně z důvodu zaměření se na vysokoafinitní oxidaci metanu, kdy je oxidován metan o koncentraci 10-100 ppm. U mých pokusů jde skoro určitě o nízkoafinitní metanotrofii, která probíhá při koncentracích metanu vyšších než 600 ppm (Conrad, 2009). Moore and Dalva (1997) uvádí počáteční koncentraci metanu ve svých pokusech 800-1000 ppm a Eriksson et al. (2010) uvádí dokonce 1500 ppm. Tyto koncentrace metanu by již měly být využívány nízkoafinitními metanotrofy, ale stále nejsou tak vysoké, jako ty, které jsem používala já. Optimální koncentrace metanu pro metanotrofní bakterie v mých pokusech je vyšší, než uvádějí výše zmiňovaní autoři pravděpodobně z důvodu jiných environmentálních podmínek pro metanotrofy na mých lokalitách a na lokalitách výše zmiňovaných autorů (boreální oligotrofní rašeliniště, vrchoviště, odvodněná rašeliniště).

5.2. Potenciální oxidace metanu

Jak již bylo uvedeno, hlavními předpoklady metanotrofie jsou dostupnost kyslíku a dostupnost substrátu (metanu). S tím souvisí i výška vodní hladiny. Na odvodněných lokalitách došlo vlivem odvodnění k velkému snížení aktivity metanotrofních bakterií. Vlivem rychlejší dekompozice půdní organické hmoty došlo ke snížení dostupnosti substrátu pro metanogeny a tudíž nižší rychlosti metanogeneze. To vedlo k nedostatku substrátu (CH_4) pro metanotrofy a rychlost metanotrofie byla velmi nízká nebo neměřitelná pro horní i dolní vrstvy půdy (Graf 6 a 7). Z výsledků měřených v roce 2010 (Maanavilja et al., předložený rukopis) je zřejmé, že na odvodněných lokalitách došlo i k poklesu pH, což mohlo také inhibovat metanotrofii. Navíc došlo ke zvýšení objemové hmotnosti půdy a tím pravděpodobně ke snížení difúze látek důležitých pro metanotrofii (CH_4 a O_2).

Na ostatních lokalitách jsem očekávala rychlost metanotrofie vyšší na revitalizovaných lokalitách než na přirozených, protože na revitalizovaných lokalitách byla větší aerobní vrstva půdy a předpokládaný dostatek živin. Na jedné z revitalizovaných lokalit bylo v roce 2010 naměřeno více celkového uhlíku (C) (%) než na přirozených lokalitách a na obou lokalitách více celkového dusíku (%) než na přirozených lokalitách (Maanavilja et al.,

předložený rukopis). S tím souvisí i naměřený nižší poměr C:N naznačující rychlejší rozklad organické hmoty.

V horních vrstvách půdy se rychlost metanotrofie statisticky průkazně nelišila na přirozených a revitalizovaných lokalitách (Graf 6). Velice podobná rychlost metanotrofie na přirozených a revitalizovaných lokalitách naznačuje jak dostatek kyslíku, tak dostatek metanu pro metanotrofy na přirozených i revitalizovaných lokalitách. V dolních vrstvách půdy byla rychlost metanotrofie statisticky průkazně vyšší na přirozených lokalitách. Tento výsledek pravděpodobně souvisí s průměrnou výškou vodní hladiny. Ta byla na přirozených lokalitách v průměru 12,5 cm pod povrchem půdy. Jelikož vzorky z dolní vrstvy půdy byly odebírány v hloubce 10-30 cm, byly tyto vzorky odebírány z hranice mezi aerobní a anaerobní zónou, kde je množství substrátu (CH_4) a kyslíku optimální (Lai, 2009). Na revitalizovaných lokalitách byla průměrná výška vodní hladiny více než 30 cm pod povrchem půdy. Vzorky půdy pro laboratorní pokusy tedy nebyly odebírány z hranice aerobní a anaerobní zóny a rychlost metanotrofie zde byla tudíž nižší, než rychlost metanotrofie na přirozených lokalitách v dolních vrstvách půdy.

Rychlosti metanogeneze podobné mým výsledkům byly i na mezotrofních slatiništích s porostem borovic. Yrjälä et al. (2010) porovnávali rychlost metanotrofie v přirozených rašelinných lesích (S4) a lesích, kde postupně klesala vlhkost $S_3 > S_2 > S_1$ (S_3 bylo nejvlhčí). Největší rychlost metanotrofie byla naměřena na lokalitě S_3 , $0,54 \mu\text{l}(\text{g s.p.})^{-1}\text{h}^{-1}$, druhá nejvyšší na S_4 , třetí na lokalitě S_2 a na odvodněné lokalitě byla rychlost metanotrofie nejnižší. V uvedených pokusech nebyla rychlost metanotrofie nejvyšší na přirozené lokalitě. Důvodem může být, že na přirozené lokalitě byla výška vodní hladiny o 23 cm výše než na lokalitě S_3 . Pravděpodobně zde tedy nebyl dostatek kyslíku pro metanotrofní bakterie. Moore and Dalva (1997) uvádějí průměrnou rychlost metanotrofie během laboratorních pokusů ze vzorků půdy z vrchovišť, slatinišť a mokřadů s dřevinnou vegetací v boreálních, subarktických regionech a regionech mírného pásu v Kanadě v rozsahu $0,00054 - 4,6 \mu\text{l g}^{-1}\text{h}^{-1}$ s průměrem $0,76 \mu\text{l g}^{-1}\text{h}^{-1}$. Tento rozsah hodnot je několikanásobně menší než rozsah hodnot rychlosti metanotrofie na mých přirozených a revitalizovaných lokalitách. Rozsah hodnot se podobá spíše mým výsledkům z dolní vrstvy odvodněné lokality O1. Musí se brát ale v úvahu, že pokusné plochy zkoumané v tomto článku zahrnují i odvodněné zalesněné vrchoviště a odvodněný zalesněný mokřad s dřevinnou vegetací, a že i na mých revitalizovaných a přirozených lokalitách byly místy rychlosti metanotrofie pod mezí detekce nebo kolem $2 \mu\text{l}(\text{g s.p.})^{-1}\text{h}^{-1}$. Z výše uvedeného je zřejmé, že rychlost metanotrofie ovlivňuje nejvíce opravdu výška vodní hladiny, s níž souvisí aerační status půdy.

5.3. Potenciální produkce metanu

Jedním z hlavních faktorů ovlivňujících produkci metanu je anaerobní prostředí a dostupnost substrátu pro metanogeny (Segers, 1998). Když se vyskytnou v půdě anaerobní podmínky (v mokřadech především z důvodu zaplavení), hlavním limitujícím faktorem pro metanogenezi je dostupnost organického substrátu, která klesá s hloubkou (Segers, 1998).

Rychlost metanogeneze na mých pokusných plochách byla statisticky průkazně vyšší na přirozených než na revitalizovaných lokalitách a to jak v horních, tak dolních vrstvách půdy. Rychlost metanogeneze byla vyšší na přirozených a revitalizovaných lokalitách v horních než v dolních vrstvách půdy, kde byla již pravděpodobně limitace substrátem. To dokazuje i můj pokus s přidavkem organického dusíku (glycinu), kdy po jeho přidání do půdy došlo statisticky průkazně ke zvýšení rychlosti metanogeneze v dolních vrstvách půdy na lokalitě P1 (Graf 19). Při stanovování frakcí půdní organické hmoty v horních vrstvách půdy byl také větší podíl studenovodné (CW) a horkovodné (HW) frakce než v dolních vrstvách (nepublikovaná data J. Mastného), z čehož vyplývá více snadno rozložitelných organických látek v horních vrstvách půdy, které mohou být následně využity metanogeny. V horních vrstvách půdy bylo také více celkového uhlíku a dusíku než v dolních vrstvách půdy na přirozených i revitalizovaných lokalitách. Na přirozených lokalitách bylo také více uhlíku i dusíku v HW a CW než na revitalizovaných lokalitách. To naznačuje více snadno rozložitelných organických látek na přirozených lokalitách, které zde mohou podporovat rychlost metanogeneze více než na revitalizovaných lokalitách. Vliv na rychlost metanogeneze může mít i vegetace. Na přirozených lokalitách bylo dvakrát až čtyřikrát více rostlin z čeledi *Cyperaceae* (%) než na revitalizovaných lokalitách. Tyto rostliny jsou snadno rozložitelnou organickou hmotou poskytující substrát pro metanogeny. Více metanogenního substrátu na přirozených lokalitách pak přispívá k větší rychlosti metanogeneze na přirozených lokalitách než na revitalizovaných. Na přirozených lokalitách bylo také více jak 80% rašeliníku na rozdíl od revitalizovaných lokalit, kde bylo jen okolo 50% rašeliníku. Na přirozených lokalitách díky rašeliníku také souvisle narůstá množství organické hmoty a tento nerozložený substrát podporuje mikrobiální aktivitu (Maanavilja et al., předložený rukopis).

Z mých výsledků je zřejmé, že rychlost metanogeneze závisí především na výšce vodní hladiny a kvalitě substrátu. Na odvodněných lokalitách, kde byla hladina podzemní vody nejnižší, metanogeneze neprobíhala nebo byla pod mezí detekce. Také zde nebyly skoro žádné rostliny z čeledi *Cyperaceae*, které by poskytovaly snadno rozložitelnou organickou hmotu a tím substrát pro metanogeny. Převažovala zde naopak keříčkovitá vegetace a také

byl vyšší počet jehličnatých stromů, jejichž opad není snadno rozložitelnou organickou hmotou.

Na revitalizovaných lokalitách, kde byla vyšší hladina podzemní vody než na odvodněných lokalitách, již metanogeneze probíhala. Pro metanogeny se zde zlepšily životní podmínky. Bylo zde lepší složení vegetace podporující metanogeny (více rostlin z čeledi *Cyperaceae* a více rašeliníku (%), vyšší pH a vyšší hodnoty C_{mic} a N_{mic} než na odvodněných lokalitách (Maanavilja et al., předložený rukopis). Rychlost metanogeneze na revitalizovaných lokalitách však byla nižší, než na přirozených lokalitách (Grafy 9-12).

Rychlosti metanogeneze při anaerobních pokusech na mých lokalitách v roce 2010 byly podobné rychlostem metanogeneze naměřených v mých pokusech. V mých pokusech i v pokusech Maanavilja et al. (předložený rukopis) byly rychlosti metanogeneze vyšší na přirozených lokalitách než na revitalizovaných. Z toho vyplývá, že po revitalizaci vodního režimu se zvyšuje rychlost metanogeneze, ale ani po několika letech (7 v případě lokality R1 a 4 v případě lokality R2) nedosáhne rychlosti metanogeneze na přirozených lokalitách.

Z hlediska vlivu výšky vodní hladiny na rychlost metanogeneze vyšly podobné výsledky i na minerotrofních rašelinistiších s porostem borovic, kde rychlost metanogeneze vzrůstala se zvyšující se hladinou podzemní vody. Na místech stále nad hladinou podzemní vody byla rychlost metanogeneze pod $0,014 \mu\text{l}(\text{g s.p.})^{-1}\text{h}^{-1}$. Ve vrstvě u hladiny podzemní vody byla rychlost metanogeneze až do výše $0,084 \mu\text{l}(\text{g s.p.})^{-1}\text{h}^{-1}$. V saturovaných vrstvách rašeliny byla rychlost metanogeneze vyšší, než ve vrstvě blízko hladiny podzemní vody (rozmezí $0,04 - 1,82 \mu\text{l}(\text{g s.p.})^{-1}\text{h}^{-1}$) (Kettunen et al., 1999). Na mých revitalizovaných lokalitách byla rychlost metanogeneze větší, než v pokusech Kettunen et al. (1999). Na mých přirozených lokalitách bylo rozmezí rychlosti metagenese přibližně o $0,2 \mu\text{l}(\text{g s.p.})^{-1}\text{h}^{-1}$ menší. Výsledky podobné mým výsledkům o vlivu výšky vodní hladiny na rychlost metanogeneze vyšly také Yrjälä et al. (2010) a Moore and Dalva (1997). Hodnoty rychlosti metanogeneze v pokusech Yrjälä et al. (2010) byly nižší (rozmezí $0,0004 - 0,04$) než na mých revitalizovaných i přirozených lokalitách. Hodnoty rychlosti metanogeneze v pokusech Moore and Dalva (1997) se spíše přibližovaly hodnotám rychlosti metanogeneze z revitalizovaných lokalit. Důvodem jiných výsledků výše zmiňovaných autorů budou pravděpodobně odlišné environmentální podmínky zkoumaných lokalit.

5.4. Vliv dusíku na potenciální oxidaci a produkci metanu

5.4.1. Vliv dusíku na potenciální oxidaci metanu

Přídavek amoniaku redukuje všeobecně rychlost metanotrofie v půdě, včetně organických půd (Nesbit and Breitenbeck, 1992; Willison et al., 1995). Bodelier (2011) uvádí, že nižší přídávky amoniaku rychlost metanotrofie podporují a vyšší přídávky amoniaku ji inhibují. Kravchenko (2002) zjistil, že inhibice rychlosti metanotrofie amoniakem závisí také na koncentraci metanu. Při počáteční koncentraci $1 \text{ mg NH}_4^+ \text{- N g}^{-1}$ a $0,5 \text{ nmol CH}_4 \text{ ml}^{-1}$ byla rychlost metanotrofie inhibována z 12% a při stejné koncentraci $\text{NH}_4^+ \text{- N g}^{-1}$ a koncentraci metanu $4,5 \text{ nmol CH}_4 \text{ ml}^{-1}$ byla rychlost metanotrofie inhibována již z 54%. Zřejmě vysoká dostupnost metanu vyvažuje kompetitivní inhibici amoniakem při oxidaci metanu a za inhibici v rašelinných půdách jsou zodpovědné i další fyzikálně-chemické a biologické mechanismy (změny v pH, vodní potenciál půdy, desorpce vázaných iontů a toxicitu meziproductů). Rychlost metanotrofie může být inhibována vyššími přídávky amonných solí (Nykänen et. al, 2002) z důvodu osmotického stresu (Bodelier and Laanbroek, 2004). Přídavek dusičnanů může zvyšovat rychlost metanotrofie přes anaerobní oxidaci metanu (AOM) (Smemo a Yavitt (2006). Metanotrofové mohou využívat při anaerobní respiraci místo kyslíku dusičnany a dusitany. Enzym zodpovědný za první krok v oxidaci metanu je monooxygenáza. Ta produkuje methanol, který je dále oxidován na sůl kyseliny mravenčí a na CO_2 (Paul and Clark, 1996)

Nykänen et. al (2002) zjistili, že rychlost metanotrofie se po přídavku dusičnanu amonného k půdě odebrané 10 cm nad, 10 cm a 20 cm pod průměrnou výškou vodní hladiny statisticky průkazně nelišila. Byl zde pouze trend zvýšené rychlosti metanotrofie po přídavku dusíku. Zatížení prostředí dusíkem nebylo měřeno, ale přirozené zatížení okolního prostředí bylo $6 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ rok}^{-1}$. Přídavek dusíku byl $100 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ rok}^{-1}$. Tyto výsledky jsou podobné mým výsledkům z lokality R2. Zde také nebyl statisticky průkazný vliv přídavku dusíku na rychlost metanotrofie. Ve vzorcích u odvodňovací rýhy byl však patrný trend stimulace rychlosti metanotrofie po přídavku minerálního dusíku v horních vrstvách půdy. Otázkou je, proč vyšel rozdílný vliv minerálního dusíku na rychlost metanotrofie ve vzorcích u odvodňovací rýhy a vzdálených 20 m od rýhy. Limitace dusíkem je zde nepravděpodobná, protože ve vzorcích u odvodňovací rýhy bylo více minerálního dusíku než ve vzorcích vzdálených 20 m od odvodňovací rýhy. Vysvětlením může být koncentrace C_{mic} a N_{mic} . V pokusech z půdy odebírané v roce 2010 na mých lokalitách bylo ve vzorcích u rýhy více C_{mic} a N_{mic} než ve vzorcích vzdálených 20 m od odvodňovací rýhy (vrstva půdy 0 - 30cm)

(Maanavilja et al., předložený rukopis). To znamená větší mikrobiální biomasu ve vzorcích u odvodňovací rýhy a pravděpodobně lepší podmínky pro mikroorganismy. Větší aktivita půdy ve vzorcích u odvodňovací rýhy vyplývá i z rychlostí respirace, která byla větší ve vzorcích u odvodňovací rýhy než vzdálených 20 m od rýhy.

Na lokalitě P1 přídavek minerálního i organického dusíku statisticky průkazně inhiboval rychlost metanotrofie v horních vrstvách půdy. V dolních vrstvách byla statisticky průkazně rychlost metanotrofie inhibována pouze přídavkem NH_4Cl . Co se týče amoniaku, byly přídavky amoniakálního dusíku pravděpodobně již příliš vysoké a mohlo zde docházet k inhibici rychlosti metanotrofie na enzymatické úrovni. Inhibice rychlosti metanotrofie ionty NH_4^+ zahrnuje kompetici o substrát na enzymatické úrovni, kdy NH_4^+ a CH_4 bojují o stejné aktivní místo na enzymu (Wang and Ineson, 2002). Enzym metan-monooxygenáza je pak schopen oxidovat amoniak a produkovat hydroxylamin (Paul and Clark, 1996), který může být toxický pro metanotrofní bakterie (Bodelier and Laanbroek, 2004).

Organický dusík mohl inhibovat rychlost metanotrofie, protože během inkubace mohlo dojít také k přeměně organického dusíku (glycinu) na amoniak, který ve vyšší koncentraci mohl inhibovat metanotrofní bakterie.

Další příčinou inhibice rychlosti metanotrofie může být osmotický stres z důvodu přídavku minerálního dusíku ve formě solí. Navíc původní koncentrace minerálního dusíku byla u většiny vzorků vyšší na přirozené lokalitě P1, než na revitalizované R2. Následně přídavky minerálního dusíku zvýšily celkovou koncentraci dusíku ve vzorku a mohlo zde již docházet k inhibici rychlosti metanotrofie z důvodu osmotického stresu s větší pravděpodobností, než na lokalitě R2. Na lokalitě P1 byly i vyšší rychlosti metanotrofie ve vzorcích bez přídavku dusíku než na lokalitě R2 a rychlost metanotrofie po přídavku NH_4Cl na P1 mohla být inhibována tímto přídavkem více, než lokalita R2. Podobné výsledky měl i Whalen (2000). Stupeň inhibice po přídavku NH_4Cl se zvyšoval se zvyšujícím se přídavkem soli. Přídavek $10^{-5} \mu\text{g N (g s.p.)}^{-1}$ inhiboval oxidaci metanu ve vzorcích půdy z boreálního lesa až na neměřitelné hodnoty. Tyto pokusy však byly prováděny pro vysokoafinitní oxidaci metanu (počáteční koncentrace metanu byla $10 \mu\text{l CH}_4 \text{ l}^{-1}$). Důvodem větší inhibice na P1 než na R2 může být tvrzení Kravchenko (2002). Uvádí, že pokud je přídavek amoniaku ke vzorku stejný, ale je vyšší koncentrace metanu, tak je rychlost metanotrofie inhibována více, než při nižší koncentraci metanu.

5.4.2. Vliv dusíku na potenciální produkci metanu

Produkce metanu je anaerobní proces, proto je tento proces ovlivněn především oxidačně-redukčním potenciálem půdy. S tím souvisí přidavek dusičnanů, který zvyšuje hodnotu oxidačně redukčního potenciálu a tím potlačuje metanogenezi (Nykänen et al., 2002; Segers, 1998). Přídavek dusičnanů statisticky průkazně snížil rychlost metanogeneze na lokalitě P1 v horních vrstvách půdy. Příčinou snížení rychlosti metanogeneze zde může být zvýšení oxidačně-redukčního potenciálu a následně inhibice metanogeneze. V dolních vrstvách půdy zvýšil statisticky průkazně rychlost metanogeneze pouze dvacetinásobný přidavek původní koncentrace dusičnanů. U nižších přídavek dusičnanů mohlo dojít částečně k denitrifikaci, a proto statisticky průkazně inhiboval rychlost metanogeneze pouze dvacetinásobný přidavek dusičnanů.

Přídavek NH_4Cl neměl statisticky průkazný vliv na rychlost metanogeneze v horních ani dolních vrstvách půdy, byl zde však trend ve zvýšení rychlosti metanogeneze nižšími přídávky amoniaku (dvojnásobek a pětinásobek). Tyto výsledky jsou podobné výsledkům Nykänen et.al (2002). Nykänen et.al (2002) zjistili trend zvyšující se rychlosti metanogeneze po přidavku dusičnanu amonného (NH_4NO_3) do půdy z vrchoviště s dominantním *Sphagnum fuscum*. Ve vzorcích z míst 10 cm nad a 10 cm pod průměrnou výškou vodní hladiny byla rychlost metanogeneze stejná ve vzorcích s přidavkem dusíku i v kontrole. Nebyly nalezeny ani statisticky průkazné rozdíly v rychlosti metanogeneze u vzorků s přidavkem dusíku a bez přidavku dusíku odebrané 20 cm pod průměrnou výškou vodní hladiny. Přídavek organického dusíku měl tendenci rychlost metanogeneze zvýšit. V dolní vrstvě půdy bylo zvýšení rychlosti metanogeneze po přidavku dvacetinásobku původní koncentrace organického dusíku statisticky průkazné. Statisticky průkazný výsledek přidavku organického dusíku může být vysvětlen limitací dusíkem. Poměr C:N byl v rámci lokality pro horní i dolní vrstvy půdy dohromady 31,4:1. Tento široký poměr naznačuje limitaci spíše dusíkem, protože koncentrace uhlíku byly na jednotlivých lokalitách podobné.

Na lokalitě R2 nebyl zjištěn statisticky průkazný vliv přidavku dusíku na rychlost metanogeneze. Statisticky průkazný nebyl ani vliv vzdálenosti od odvodňovací rýhy. Vzdálenost mezi vzorky u odvodňovací rýhy a 20 m od odvodňovací rýhy nebyla pravděpodobně dostatečná, aby se zde statisticky průkazně projevil rozdíl ve kvalitě substrátu a dalších podmínkách pro metanogenezi (například ve vzorcích u rýhy byla vyšší průměrná výška vodní hladiny). Přídavek minerálního dusíku v horní vrstvě půdy měl trend rychlost metanogeneze inhibovat. Rychlost metanogeneze může být ovlivněna přidavkem

amoniaku biochemicky, kdy při vysoké koncentraci amoniaku je rychlost metanogeneze inhibována na enzymatické úrovni (Eriksson et al., 2010). To by mohlo být vysvětlením inhibičního trendu rychlosti metanogeneze v mých vzorcích.

Přídavek organického dusíku měl trend zvýšit rychlost metanogeneze pravděpodobně z důvodu limitace dusíkem nebo dalších jednoduchých látek, které mohou metanogenní archea využívat pro metanogenezi. Rychlost metanogeneze byla vyšší v horních vrstvách půdy než v dolních anaerobních vrstvách, což potvrzuje limitaci substrátem v dolních vrstvách půdy. Možnou limitaci dusíkem vysvětluje i to, že koncentrace amonných a dusičnanových iontů v mých vzorcích byla nižší v dolních vrstvách než v horních vrstvách půdy. V dolních vrstvách půdy limitaci substrátem potvrzuje i koncentrace celkového organického uhlíku (TOC), kterého bylo méně než v horních vrstvách půdy.

Rozdílné výsledky vlivu přídavku dusíku na rychlost metagenese u lokality P1 a R2 mohou být vysvětleny dvěma již uváděnými faktory - kvalitou substrátu a oxidačně - redukčním potenciálem půdy. Na lokalitě R2 je nižší průměrná výška vodní hladiny než na lokalitě P1. Také zde byla v roce 2010 při laboratorních pokusech naměřena nižší anaerobní respirace než na lokalitě P1 (Maanavilja et al., předložený rukopis). Vzniká zde tedy méně CO₂, který může být substrátem pro metanogeny. Na lokalitě P1 byl také pomocí kvantitativní PCR detekován větší počet metanogenů než na lokalitě R2 (nepublikovaná data). Rovněž hodnoty C_{mic} a N_{mic} byly na lokalitě P1 dvojnásobně až trojnásobně vyšší než na R2. Všechny tyto výše uvedené rozdíly mezi lokalitami P1 a R2 mohou být jednou z příčin rozdílných výsledků ovlivnění rychlosti metanogeneze přídavkem dusíku.

6. Závěry

1) Na odvodněných lokalitách rašelinných smrčín byly potenciální rychlosti metanotrofie a metanogeneze pod mezí detekce. Pouze na jedné těchto lokalit byla naměřena velmi nízká rychlost metanotrofie v dolních vrstvách půdy (dvanáctkrát nižší hodnoty než na revitalizovaných lokalitách a až dvacetkrát nižší hodnoty než na přirozených lokalitách).

2) Revitalizace vodního režimu odvodněných rašelinných smrčín vedla ke zvýšení potenciální rychlosti metanogeneze i metanotrofie, a to především v horní vrstvě půdy (0-10 cm). Ani několik let po revitalizaci (4 -7 let) však nedošlo k nárůstu rychlosti metanogeneze na úroveň přirozených lokalit (čtyřikrát nižší hodnoty na revitalizovaných oproti přirozeným lokalitám v horních vrstvách půdy). Oproti tomu rychlost metanotrofie na revitalizovaných lokalitách dosáhla hodnot z přirozených lokalit. Dá se tedy očekávat, že revitalizace odvodněných rašelinných smrčín nepovede k nárůstu emisí metanu do atmosféry ve srovnání s přirozenými lokalitami.

3) Reakce metanogenních mikroorganismů na přísun N závisela zejména na jeho formě, méně pak na jeho koncentraci. Po přidavku dusíku v organické formě se zvýšila rychlost metanogeneze nebo nebyl zaznamenán signifikantní vliv, po přidavku dusičnanů nebyla reakce jednoznačná, amonný N neměl signifikantní vliv na rychlost metanogeneze. Rychlost metanotrofie se po přidavku dusíku nikdy nezvýšila, byl zaznamenán inhibiční efekt nebo se rychlost metanotrofie nezměnila. Z toho lze odvodit, že zvýšený přísun N v organické formě do ekosystému rašelinných smrčín může zvýšit aktivitu metanogenů a naopak snížit aktivitu metanotrofů. To může vést k nárůstu emisí metanu do atmosféry.

7. Literatūra

Bodelier P.L.E. 2011. Interactions between nitrogenous fertilizers and methane cycling in wetland and upland soils. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 3:379–388

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

Bubier J.L., Moore T.R. 1994. An ecological perspective on methane emissions from northern wetlands. *Trends in Ecology and Evolution* 9 (12) : 460-464

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

Ettwig K. F., Shima S., van de Pas-Schoonen K. T., Kahnt J., Medema M. H., op den Camp H. J. M., Jetten M. S. M. and Strous M. 2008. Denitrifying bacteria anaerobically oxidize methane in the absence of Archaea. *Environmental Microbiology* 10 : 3164–3173

Ettwig K. F., Butler M. K., Le Paslier D., Pelletier E., Mangenot S., Kuypers M. M. M., Schreiber F., Dutilh B. E., Zedelius J., de Beer D., Gloerich J., Wessels H., van Alen T., Luesken F., Wu M. L., van de Pas-Schoonen K. T., den Camp H., Janssen-Megens E. M., Francoijs K. J., Stunnenberg H., Weissenbach J., Jetten M. S. M. and Strous M. 2010. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464 : 543–548

Eriksson T., Öquist M. G., Nilsson MB. 2010. Production and oxidation of methane in a boreal mire after a decade of increased temperature and nitrogen and sulphur deposition. *Global Change Biology* 16: 2130-2144.

Garcia J.L., Patel B.K.C., Olliver B. 2000. Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* 6 (4) : 205-226

Glatzel S., Basiliko N., Moore T. 2004. Carbon Dioxide and methane production potentials of peats from natural, harvested and restored sites, Eastern Quebec, Canada. *Wetland* 24 (2) : 261-267

Charman D. 2002. Peatlands and environmental change. Chichester, 301p.

Islas-Lima S., Thalasso F. and Gómez – Hernandez J. 2004. Evidence of anoxic methane oxidation coupled to denitrification . *Water Research* 38 : 13-16

Jaatinen K., Tuittila E.- S., Laine J., Yrjala K., Fritze H. 2005. Methane-oxidizing bacteria in a Finnish raised mire complex: effects of site fertility and drainage. *Microbial Ecology* 50 : 429–439

Juottonen H., Tuittila E.-S., Juutinen S., Fritze H., Yrjälä K. 2008. Seasonality of rDNA- and rRNA-derived archaeal communities and methanogenic potential in a boreal mire. *The ISME Journal* 2: 1157-1168

Kettunen A., Kaitala V., Lehtinen A., Lohila A., Alm J., Silvola J., Martikainen P.J. 1999. Methane production and oxidation potentials in relation to water table fluctuations in two boreal mires. *Soil biology and Biochemistry* 31: 1741-1749

- Kirk G. J. D. 2004. The biochemistry of Submerged Soils. *John Wiley & Sons Ltd.* Chichester. 291p
- Kravchenko I. K. 2002. Methane oxidation in boreal peat soils treated with various nitrogen compounds. *Plant and Soil* 242: 157–162.
- Larmola T., Tuittila E.S., Tirola M., Nykänen H., Martikainen P.J., Yrjälä K., Tuomivirta T., Fritze H. 2010. The role of Sphagnum mosses in the methane cycling of a boreal mire. *Ecology* 91(8): 2356-65.
- Lai D.Y.F. 2009. Methane dynamics in northern peatlands: A review. *Pedosphere* 19 (4) : 409-421
- Le Mer J., Roger P. 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *European Journal of Soil Biology* 37 : 25-50
- Maanavilja L., Urbanová Z., Pícek T., Bárta J., Laiho R., Tuittila E-S. Submitted manuscript. Effect of hydrological restoration on peat biogeochemistry in spruce swamp forests.
- Moore T. R. and Dalva M. 1997. Methane and carbon dioxide exchange potentials of peat soils in aerobic and anaerobic laboratory incubations. *Soil biology and biochemistry* 29: 1157-1164
- Nesbit S. P. and Breitenbeck G. A. 1992. A laboratory study of factors influencing methane uptake by soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 41: 39-54
- Nykänen H., Kasander H., Huttunen J.T., Martikainen P.J. 2002. Effect of experimental nitrogen load on methane and Nitrous oxide fluxes on ombrotropic boreal peatland. *Plant and soil* 242 : 147-155
- Olde Venterink H., Davidson T. E., Kiehl K., Leonardson L. 2002. Impact of drying and rewetting on N, P and K dynamics in a wetlands soil. *Plant and Soil* 243: 119–130.
- Paul E.A., Clark F.E. 1996. *Soil microbiology and biochemistry*. Vyd.2. Academic Press, San Diego, 340p.
- Papen H., Daum M., Steinkamp R. and Butterbach-Bahl K. 2001. N₂O a CH₄ – fluxes from soils of a N-limited and N-fertilized spruce forest ecosystem of the temperate zone. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 75: 159 - 163
- Popp T.J., Chanton J.P., Whiting G.J. and Grant N. 2000. Evaluation of methane oxidation in rhizosphere of a *Carex* dominated fen in north central Alberta, Canada. *Biochemistry* 51: 259-281
- Raghoebarsing A. A., Pol A., van de Pas-Schoonen K. T., Smolders A. J. P., Ettwig K. F., Rijpstra W. I. C., Schouten S., Sinninghe Damsté J. S., Op den Camp H. J. M., Jetten M. S. M. and Strous M. 2006. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature* 440 : 918–921
- Reddy K. R., Delaune R.D. 2008. *Biogeochemistry of wetlands*. CRC/Taylor & Francis, Boca Raton, 774p.

Segers R. 1998. Methane production and methane consumption: A review of processes underlying wetland methane fluxes. *Biogeochemistry* 41(1) : 23–51

Smemo K. A. and Yavitt J.B. 2006. A multi-year perspective on methane cycling in a shallow peat fen in Central New York State, USA. *Wetlands* 26 : 20-29

Smemo K. A. and Yavitt J.B. 2007. Evidence for anaerobic CH₄ oxidation in freshwater peatlands. *Geomicrobiology Journal* 24: 583-597

Smemo K. A. and Yavitt J.B. 2011. Anaerobic oxidation of methane: an underappreciated aspekt of methane cycling in peatland ecosystems? *Biogeosciences* 8: 779-793

Sudh I., Nilsson M., Granberg G., Svensson B.H. 1994. Depth distribution of Microbial Production and Oxidation of Methane in Boreal Peatlands. *Microbial ecology* 27: 253-265

Šantrůčková H., Vrba J., Křenová Z., Svoboda M., Benčoková A., Edwards M., Fuchs R., Hais M., Hruška J., Kopáček J., Matějka K. a Rusek J. 2010. *Co vyprávějí šumavské smrčiny*. 1. Vyd. Správa Národního parku a Chráněné krajinné oblasti Šumava. Vimperk. 153s

Tuittila E.-S., Komulainen V.-M., Vasander H., Nykänen H., Martikainen P.J., Laine J. 2000. Methane dynamics of a restored cut-away peatland. *Global Change biology* 6 : 569-581

Urbanová Z., Pícek T., Bárta J. 2011. Effect of peat re-wetting on carbon and nutrient fluxes, greenhouse gas production and diversity of methanogenic archaeal community. *Ecological Engineering* 1737 : 1017– 1026

Verville J.H., Hobbie S.E., Chapin III F.S., Hooper D.U.1998. Response of tundra CH₄ and CO₂ flux to manipulation of temperature and vegetation. *Biogeochemistry* 41: 215-235

Wang Z.- P. and Ineson P. 2003. Methane oxidation in a temperate coniferous forest soil: effects of inorganic N. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 427- 433

Whalen S.C.2000. Influence of N and non-N salts on atmospheric methane oxidation by upland boreal forest and tundra soils. *Biology and Fertility of soils* 31: 279–287

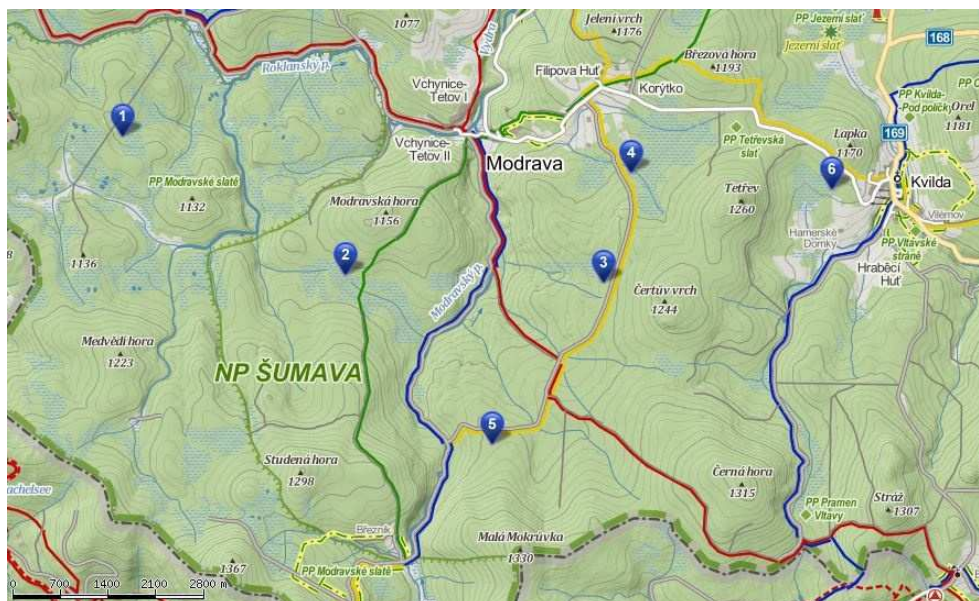
Willison T. W., Webster C B, Goulding K.W.T. and Powlson D. S. 1995. Methane oxidation in temperate soils: Effects of land use and the chemical form of nitrogen fertilizer. *Chemosphere* 30 : 539–546.

Yrjälä K., Tuomivirta T., Ijuottonen H., Putkinen A., Lappi K., Tuittila E.-S., Pentilla T., Minkinen K., Laine J., Peltoniemi K., Fritze H. 2010. CH₄ production and oxidation processes in a boreal fen ecosystem after long-term water table drawdown. *Global Change Biology*

Elektronické zdroje

Bufková I. 2013. Náprava narušeného vodního režimu rašelinišť. *Ochrana přírody* 2/2013. 21. 6. 2013 [Online časopis] Dostupné z WWW: <http://www.casopis.ochranaprirody.cz/Pece-o-prirodu-a-krajinu/naprava-naruseneho-vodniho-rezimu-raselinist.html> (cit.11.12.2013)

8. Přílohy

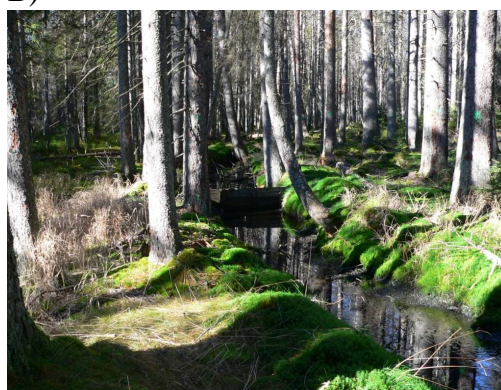


Příloha 1: Mapa zkoumaných lokalit. Body 1-6 označují jednotlivé lokality. 1) O2; 2) R1; 3) O1; 4) P2; 5) R2; 6) P1

A)



B)



C)



Příloha 2: Vybrané fotografie zkoumaných lokalit A) odvodněná lokalita O2

B) revitalizovaná lokalita R1 C) přirozená lokalita P1

Vzorek	Koncentrace N-NH₄ (ug/g suché půdy)	Koncentrace N-NO₃ (ug/g suché půdy)
P1 0A H	108,492	107,645
P1 20A H	110,218	107,889
P1 0B H	108,352	107,810
P1 20B H	84,92	82,724
R2 0A H	93,655	82,967
R2 20A H	29,249	28,203
R2 0B H	110,141	109,384
R2 20B H	84,459	83,074
P1 0A D	75,857	68,861
P1 20A D	109,739	91,367
P1 0B D	100,361	91,497
P1 20B D	75,173	62,239
R2 0A D	62,687	70,190
R2 20A D	30,68	31,692
R2 0B D	103,604	97,307
R2 20B D	67,817	62,523

Příloha 3: Původní koncentrace N-NH₄ a N-NO₃ ve vybraných vzorcích používaných pro pokusy vlivu přídatku dusíku na rychlost metanotrofie nebo metanogeneze