

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

**Složení a funkce mikrobiálního společenstva  
v rašeliništích a jeho změny vlivem odvodnění**

Bakalářská práce

Vypracovala: Lucie Kovářová

Vedoucí práce: RNDr. Zuzana Urbanová Ph.D.

České Budějovice

2016

Kovářová L. (2016): Složení a funkce mikrobiálního společenstva v rašeliništích a jeho změny vlivem odvodnění. [Microbial community composition and function in peatlands and its changes due to drainage., Bc. Thesis, in Czech] – 45p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace**

Tato bakalářská práce shrnuje přehled poznatků o mikrobiálním složení a funkcích v rašeliništích s důrazem na významnější funkční skupiny a změny mikrobiálního společenstva vlivem odvodnění. Součástí této práce je návrh projektu zaměřený na studii složení mikrobiálního společenstva v navrhovaných typech rašelinišť a možnost využití stanovení složení mikrobiálního společenstva pro monitoring úspěšnosti revitalizačních opatření.

### **Annotation**

This bachelor thesis summarizes current knowledge about microbial community composition and function in peatlands with an emphasis on important function guilds of microorganisms and the changes in microbial community structure due to drainage. The thesis includes a project proposal to study microbial community composition among different peatland types and the evaluation of restoration success using microbial community composition determination.

### **Čestné prohlášení:**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 6. 12. 2016

.....  
Lucie Kovářová

## **Poděkování**

Ráda bych zde chtěla poděkovat své vedoucí práce RNDr. Zuzaně Urbanové Ph.D. za odbornou pomoc, vedení práce, vstřícnost při konzultacích, obrovskou trpělivost a ochotu. Velké poděkování patří také mé rodině, přátelům a mému příteli za dlouhodobou podporu při studiu na vysoké škole.

## Obsah

1	Úvod	1
1.1	Úvod do problematiky a cíle	1
2	Současný stav poznání	2
2.1	Obecná charakteristika ekosystému rašelinišť	2
2.2	Mikroorganismy v rašeliništích a jejich funkce	3
2.3	Faktory ovlivňující mikrobiální společenstvo v rašeliništích	4
2.3.1	Půdní vlhkost a dostupnost kyslíku	4
2.3.2	Vegetace a dostupnost živin	6
2.3.3	Teplota	6
2.3.4	pH	7
2.4	Taxonomické skupiny mikroorganismů v rašeliništích	8
2.4.1	Bakterie	8
2.4.1.1	Acidobacteria	9
2.4.1.2	Proteobacteria	9
2.4.1.3	Actinobacteria	10
2.4.2	Archea	10
2.5	Významné funkční skupiny mikroorganismů v rašeliništích	11
2.5.1	Metanogenní archea	12
2.5.2	Metanotrofní bakterie	14
2.5.3	Sulfát redukující mikroorganismy	15
2.5.4	Nitrifikační mikroorganismy	16
2.5.5	Denitrifikační mikroorganismy	17
2.5.6	Acetogenní bakterie	17
2.5.7	Mikroorganismy rozkládající celulózu a lignin	18
2.6	Změny v mikrobiálním společenstvu rašelinišť vlivem odvodnění	19
2.7	Závěry	21
3	Projekt	23
3.1	Cíle projektu	23
3.2	Hypotézy	23
3.3	Návrh projektu	23
3.3.1	Charakteristika lokalit	23
3.3.2	Odběr vzorků	24
3.3.3	Homogenizace a uchování vzorků	25
3.3.4	Izolace DNA	26
3.3.5	Sekvence DNA	26
3.3.6	Doplňující laboratorní analýzy	26
3.3.7	Činnosti v rámci projektu a časový plán projektu	27
3.3.8	Finanční náklady	29
3.4	Očekávané výstupy projektu	30
	Literatura	32

# 1 Úvod

## 1.1 Úvod do problematiky a cíle

Ekosystémy rašelinišť zaujímají přibližně 3–4% zemského povrchu (Vitt, 2008) a představují asi polovinu všech světových mokřadů. Za dobu své existence nahromadily více atmosférického uhlíku než jakýkoli jiný terestrický ekosystém (Bragina et al., 2013). Je odhadováno, že v boreálních rašeliništích je uloženo 200–450 Pg ( $10^{15}$ ) uhlíku, což představuje asi 30% celosvětového půdního organického uhlíku (Gorham, 1991; Gorham & Janssens, 1992; Turunen et al., 2002). Obecnou příčinou těchto poznatků je nerovnováha mezi čistou primární produkcí rostlin a nedostatečnou dekompozicí způsobenou nepříznivými podmínkami prostředí. Klíčovou složkou ekosystémů jsou mikroorganismy, jejichž význam je v planetárním koloběhu živin nenahraditelný. Pro rašeliniště jsou charakteristická společenstva takových mikroorganismů, která se dokázala adaptovat na nepříznivé až extrémní podmínky prostředí. Tyto mikroorganismy žijí v trvale zamokřeném a nutričně chudém prostředí, kde pH dosahuje spíše kyselých hodnot. Mikroorganismy představují nejrozmanitější skupinu organismů žijící na Zemi s nepostradatelnými funkcemi, které zajišťují především rozklad organické hmoty a koloběh uhlíku, dusíku a jiných živin a prvků.

Tato práce si klade za cíl shrnutí dosavadních poznatků o složení a funkcích mikrobiálního společenstva v rašelinných ekosystémech. Dalším z cílů této bakalářské práce je zjistit, jakým způsobem se mikrobiální složení v rašeliništích mění vlivem odvodnění. Projektová část je prostřednictvím návrhu zaměřena na složení mikrobiálního společenstva jakožto nástroje k vyhodnocení degradace vlivem odvodnění či obnově rašeliniště po revitalizaci. Vzhledem k charakteru a rozsahu práce je tato bakalářská práce zaměřena především na významnější skupiny mikroorganismů vyskytujících se v rašeliništích a proto se zaměřují na prokaryotní mikroorganismy - bakterie a archea.

## 2 Současný stav poznání

### 2.1 Obecná charakteristika ekosystému rašelinišť

Rašeliniště jsou unikátní ekosystémy, které se vyznačují akumulací neúplně rozloženého organického materiálu, rašeliny, ve velmi vlhkých podmínkách. Rašelina je definována jako organická hmota pocházející především z vegetace, která má v hmotnosti sušiny 25% či méně anorganické příměsi (Andrejko et al., 1983). Akumulace rašeliny probíhá v řádu několik set až tisíců let. Tento organický materiál se nejdříve hromadí v horním sloupci rašeliniště, v tzv. aerobní vrstvě. Zde je právě díky nasycení kyslíkem v neúplně zamokřených podmínkách poměrně zdatelná rychlost rozkladu. S přibývajícím hloubkou rychlost dekompozice s úbytkem kyslíku rapidně klesá. V prostředí tzv. anaerobní vrstvy, se dekompozice s rostoucí hloubkou snižuje až na extrémně nízkou rychlost. Obecně lze říci, že množství uhlíku, které je uloženo v rašeliništi závisí na fotosyntéze (fixaci uhlíku), aerobním rozkladu ve svrchní provzdušněné vrstvě a následně na anaerobních procesech, probíhajících především ve spodní trvale anaerobní vrstvě rašeliny, jakými jsou například metanogeneze nebo redukce síranů (Vitt, 2008).

Rašeliniště jsou rozšířeny především v chladných oblastech severní polokoule, kde srážky převažují nad evapotranspirací (Mitsch & Gosselink, 2000). Na základě zdroje živin a vody jsou rozdělovány na minerotrofní a ombrotrofní. Jejich charakter je dále určen například odlišným pH a složením vegetace (Rydin & Jeglum, 2006). Ombrotrofní rašeliniště (vrchoviště) jsou na živiny chudé, neboť jediný zdroj živin a vody pochází z atmosférických srážek. Mají kyselý charakter (pH přibližně 4) s velmi nízkými koncentracemi minerálů N a P. Rašeliník (*Sphagnum spp.*) je zde díky poměrně nízkým hodnotám pH půdy dominantní složkou vegetace a tudíž také hlavní složkou mikrobiálního potravního řetězce. Minerotrofní rašeliniště (slatiniště) jsou naopak nutričně bohatší, zejména na minerály Mg, K, P, Ca, jelikož včetně atmosférických depozic přijímají vodu převážně z podzemní vody (Rydin & Jeglum, 2006). Právě díky většímu množství Ca a Mg se zde půda stává méně kyselou a tak se tento typ rašelinišť

stává lépe přístupný pro rostlinstvo, jako jsou například rostliny z čeledi šachorovitých (*Cyperaceae* - např. *Carex spp.*, *Eriophorum spp.*), ale i pro některé stromy (*Salix spp.*, *Betula spp.*) a keře (*Vaccinium spp.*) (Reddy & DeLaune, 2008; Rydin & Jeglum, 2006). Kvůli vyšším hodnotám pH (>4) a většího obsahu živin vykazují minerotrofní rašeliniště aktivnější mikrobiální společenstva, což se kupříkladu projevuje rychlejším rozkladem organické hmoty a vyššími emisemi metanu (Keller & Bridgham, 2007; Mandic-Mulec et al., 2014). V souvislosti s příznivějšími podmínkami prostředí minerotrofních rašelinišť je v nich obecně pozorována vyšší rozmanitost mikrobiálních společenstev (Dobrovolskaya et al., 2012; Jaatinen et al., 2007; Lin et al., 2012; Urbanová & Bárta, 2016).

## 2.2 Mikroorganismy v rašeliništích a jejich funkce

Ačkoli se kvůli extrémním charakteristikám rašelinišť může zdát, že tyto ekosystémy nemají příliš reprezentativní niku, jejich mikrobiocenóza zahrnuje širokou řadu taxonomických a funkčních skupin. Dle současného systému dělení se v rašeliništích nacházejí mikroorganismy všech tří fylogenetických domén *Bacteria* (dále v textu „bakterie“), *Archaea* („archea“) a *Eukaryota (Fungi)* („houby“). Z hlediska stavby buňky patří některé z těchto mikroskopických organismů mezi prokaryota (bakterie a archea), jiné mezi eukaryota (houby a někteří prvoci a řasy).

Mikroorganismy v rašeliništích jsou zvláště důležité, neboť jsou zde téměř jedinými nenahraditelnými klíčovými činiteli ovlivňující toky a přeměny uhlíku, dusíku a jiných důležitých prvků. Eukaryotické houby a prokaryotické bakterie jsou hlavními dekompozitory složitých organických molekul. Tyto dvě skupiny rozkladačů hrají zvláště důležitou roli ve svrchní oxické vrstvě rašeliny, zvláště houby, které jsou v tomto místě považovány za primární dekompozitory. Houby jsou obecně vázány na aerobní vrstvu rašeliny. Ve srovnání s bakteriemi jsou houby lépe přizpůsobeny podmínkám jako je nižší půdní vlhkost, rostou rychleji při nižších teplotách, jsou tolerantnější vůči kyselému prostředí a jsou schopny rozsáhlých symbiotických forem s kořeny rostlin (Peltoniemi et al., 2012; Pietikäinen et al., 2005; Thormann, 2006). Kromě toho produkují specifické extracelulární enzymy, které dokážou rozkládat složitější látky např. taniny, fenoly, celulózu, chitin, pektin a škrob, které jsou zpočátku



pro jiné skupiny dekompozitorů v rašeliništích těžko dostupné (Thormann et al., 2001; 2002; 2003). Nicméně Winsborough & Basiliko (2010) ve své studii uvádí, že v provzdušněné vrstvě rašeliny jsou bakterie více dekompozičně aktivní než houby. Rychlost dekompozice pomocí bakterií je zřejmě vyšší v situacích, kdy houby jsou vystaveny vyšším stresovým faktorům (Wang & D'Odorico, 2013). V rašeliništích představují houby podíl asi 15–30% z přítomných detekovaných mikroorganismů (Tveit et al., 2013).

Bakterie jsou uzpůsobeny k rozkladu celé řady substrátů a představují široké spektrum funkčních a taxonomických skupin. V místě bohatých na živiny jako je například rhizosféra se mohou stát dominantními dekompozitory. Ačkoli jsou bakterie aerobními i anaerobními mikroorganismy, jejich rozmanitost s větší hloubkou v půdě pozvolně klesá (Rydin & Jeglum, 2006). Tento fakt potvrzuje studie Morales et al. (2006) kde bylo zjištěno, že abundance bakterií v anaerobní vrstvě rašeliny byla sice vyšší než ve vrstvě aerobní, avšak společenstvo bakterií zde bylo méně rozmanité. Autoři se domnívají, že vyšší počet bakterií v anaerobní vrstvě koreluje se snížením predace nebo kompetice mikroorganismy přítomných v provzdušněné vrstvě.

Archea jsou považována za extrémofilní mikroorganismy přizpůsobené atypickým podmínkám jako je například vysoká teplota, vysoké koncentrace soli, extrémní kyselost nebo anaerobie (Paul, 2007). V důsledku toho je přítomnost archeí v rašeliništích spíše spojena s anaerobním prostředím, kde se účastní procesu metanogeneze (metanogenní archea). Nicméně v archeální doméně se nacházejí i jiné funkční skupiny organismů jako jsou například amoniak-oxidující nebo sulfát-redukující (Herrmann et al., 2012; Muyzer & Stams, 2008; Paul, 2007).

## **2.3 Faktory ovlivňující mikrobiální společenstvo v rašeliništích**

### **2.3.1 Půdní vlhkost a dostupnost kyslíku**

Rašeliniště jsou stále nebo periodicky zaplavované mokřadní ekosystémy, kde hladina vody určuje hranici mezi aerobními a anaerobními procesy. Rozkladné procesy se v rašeliništích mění v závislosti na hloubce a tedy na dostupnosti kyslíku. Vlivem hromadění dalšího organického materiálu se právě starší organická hmota dostává do

nižších vrstev až do anaerobního prostředí, kde je anaerobními mikroorganismy dále rozkládána. Aerobní dekompozice spočívá v primárním rozkladu, jako je například rozklad vysokomolekulárních látek na látky jednodušší a je z hlediska energetické bilance výnosnější než rozklad anaerobní (Rydin & Jeglum, 2006). Naopak, anaerobní dekompozice má nízký energetický výnos, je často neúplná a v závislosti na redukovaných podmínkách prostředí je závislá na jiných elektronových akceptorech než je kyslík. Mezi elektronové akceptory anaerobní dekompozice patří především nitráty, oxidy  $Mn^{4+}$  a  $Fe^{3+}$ , sulfáty a oxid uhličitý (Reddy & DeLaune, 2008). Anaerobní dekompozice je tedy komplexní systém procesů, které na sebe postupně navazují. Konečným produktem anaerobního rozkladu v nejvíce redukovaných podmínkách může být metan.

Rozdělení půdního profilu v rašelině je děleno na tři základní vrstvy i) akrotelm, ii) mezotelm a iii) katotelm. Nejsvrchnější vrstva rašeliny, akrotelm, dosahuje mocnosti přibližně 0–30 cm, je složena převážně z živoucích rostlin a je zde největší prokořenění. Skrze opad rostlinné produkce zde dochází ke vstupu velkého množství uhlíku do degradačních procesů. Pro tuto vrstvu jsou charakteristické houby a aerobní bakterie, které zde zahajují rozklad. Houby v této vrstvě mohou být lépe přizpůsobeny na nižší vlhkost než bakterie (Peltoniemi et al., 2009). Nicméně většina hub není anaerobní a tak je jejich existence omezena na povrchu rašelině a v okolí kořenů aerenchymatických rostlin. Lin et al. (2014) v této vrstvě rašeliny zaznamenali přítomnost taxonů *Acidobacteria*,  $\gamma$ -*Proteobacteria* (*Sinobacteraceae*),  $\alpha$ -*Proteobacteria* (*Acetobacteraceae*) a *Verrucomicrobia* (*Chthoniobacter*).

Mezotelm představuje přechodovou zónu mezi oxickým akrotelmem a anoxickým katotelmem. Tato přechodová oblast se vyznačuje kolísáním hladiny vody (cca 30–50 cm) a jedinečnou ekologickou nikou reprezentující rozmanitost chemických a fyzikálních vlastností, rychlou výměnou iontů, tudíž jsou zde přítomny jak anaerobní, tak i aerobní mikroorganismy. Pro mezotelm je charakteristický intenzivní rozklad.

Katotelm (cca >50 cm) je bez přístupu kyslíku konstantně saturován vodou a proto je zde nízký a velmi pomalý rozklad organického materiálu. V katotelmu dominují převážně archea, především metanogenní archea (Lin et al., 2014).

### 2.3.2 Vegetace a dostupnost živin

Větší minerální bohatost slatinišť se odráží na vyšších hodnotách pH a následně na jejich druhově bohatší vegetaci. Vrchoviště jsou naopak minerálně chudší a jsou tak obecně limitována živinami N, P ale i Mg a Ca. Kyselá a nutričně chudá vrchoviště bývají převážně pokryta mechy z rodu rašeliníku (*Sphagnum spp.*), které kvůli relativně vysokému obsahu fenolických látek těžko podléhají rozkladu (Rydin & Jeglum, 2006). Naopak, vegetace slatinišť je přizpůsobena na vysokou hladinu vody, a proto jsou zde včetně rašeliníku hluboce kořenící rostliny, zvláště cévnaté rostliny (např. *Carex spp.* a *Equisetum spp.*), jenž jsou na trvale zamokřené podmínky uzpůsobeny speciálním druhem rostlinného pletiva, aerenchymem. Aerenchym umožňuje transportovat kyslík do kořenových částí těchto rostlin, což může vysvětlovat dočasnou přítomnost některých obligátně či fakultativně aerobních mikroorganismů v okolí kořenů (Jaatinen et al., 2005; Reddy & DeLaune, 2008). Nízká intenzita dekompozice může být patrná také u opadu ostřicovitých rostlin a dřevité vegetace. V nepříznivých podmínkách rašeliníšť je tento rostlinný materiál poměrně resistantní a jeho neúplný rozklad trvá v řádu několika desítek let. Zbytky rostlin v rašeliníštích, především v těch, kde jsou limitovány živinami, mají vysoký poměr C:N:P, což ve výsledku vede k nižší rychlosti dekompozice a vyšší akumulaci půdní organické hmoty a celkově se prodlužuje residenční čas opadu. Za normálních podmínek uvolňují rostliny do půdy kořenové exsudáty, jako jsou například sacharidy, aminokyseliny, organické kyseliny a další látky podporující bakteriální růst a aktivitu. Tyto látky jsou zdrojem snadno dostupné energie a zdrojem uhlíku pro půdní mikroorganismy. Složení kořenových exsudátů se liší v závislosti na rostlinném druhu, vývojovém stadiu rostliny a na přírodních podmínkách (Reddy & DeLaune, 2008).

### 2.3.3 Teplota

Většina mikroorganismů v boreálních rašeliníštích jsou psychrotolerantní, tedy adaptované na život při nízkých teplotách, ačkoliv optimální teplota psychrotolerantních

mikroorganismů pro růst se pohybuje kolem 20 °C (Master & Mohn, 1998). Nicméně teplota patří mezi řídicí faktory ovlivňující biogeochemické procesy v mokřadech. Zvýšení teploty obecně vede ke zvýšení mikrobiální aktivity, následně také ke zvýšení spotřeby kyslíku a ke snížení redox potenciálu a ovlivňuje růst, aktivitu a přežití mikroorganismů (Rydin & Jeglum, 2006; Reddy & DeLaune, 2008). Høj et al. (2008) ve své studii zjistili, že zvýšením teploty se snižovala diverzita a množství většiny archeálních mikroorganismů. Ačkoliv je průměr ročních teplot v boreálních rašeliništích relativně nízký, bylo zjištěno, že teplotní optimum pro metanogenezi je blízko 25 °C a pro metanotrofní společenstva 15–20 °C (Dedysh et al., 1998; Metje & Frenzel, 2005). Avšak i při 4 °C vykazují metanogeni relativně vysokou aktivitu (Metje & Frenzel, 2005). Teplota se v rašeliništích mění v průběhu roku v závislosti na lokálních podmínkách klimatického charakteru a zároveň se mění teplota s hloubkou (Vitt, 2008). Například v únoru může teplota v hloubce 20 cm dosahovat teploty 0,1 °C a v srpnu téhož roku 13,5 °C, což může způsobovat (in)aktivaci některých mikroorganismů (Juottonen et al., 2008).

#### **2.3.4 pH**

Obecně pH ovlivňuje řadu procesů jako je například mikrobiální aktivita, rozpustnost a ionizace anorganických a organických sloučenin (Paul, 2007). Nicméně hodnota pH je podle některých studií jedním z řídicích faktorů ovlivňující mikrobiální diverzitu a složení vegetace (Fierer & Jackson 2006; Hartman et al., 2008). Obecně je známo, že slatiniště s vyšším pH mají vyšší mikrobiální diverzitu a aktivitu než vrchoviště s kyselějším charakterem (např. Kim et al., 2008; Lin et al., 2012; Peltoniemi et al., 2009). Optimální pH pro růst a vývoj většiny archeálních metanogenů se pohybuje spíše kolem neutrálních hodnot, avšak optimální pH pro bakterie je v důsledku jejich fyziologické různorodosti širší (Zinder, 1993). Například některé acidobakterie vykazují růstové optimum při pH 3,5–4,5, jiné při 5,5–6,5 (Pankratov et al., 2008). I přestože jsou rašeliniště přirozeně spíše kyselé biotopy, většina mikroorganismů v nich se na nepříznivé podmínky adaptovala a můžeme tak o nich říci že jsou acidotolerantní.

## 2.4 Taxonomické skupiny mikroorganismů v rašeliništích

### 2.4.1 Bakterie

Bakterie v rašeliništích zaujímají asi 70–80% z celkového počtu mikroorganismů (Tveit et al., 2013). Celková diverzita bakteriálního společenstva je obecně vyšší v minerotrofních rašeliništích než ve vrchovištích, zřejmě v důsledku vyššího pH, které je dle některých studií jedním z determinačních faktorů mikrobiální diverzity (Fierer & Jackson 2006; Hartman et al., 2008). Dominantní skupinou v rašeliništích jsou *Acidobacteria* a *Proteobacteria*, jejichž poměrné zastoupení se mění s pH a dostupností živin, což především souvisí s typem rašeliniště. *Acidobacteria* představují 20–50% všech bakterií ve slatiništích (Hamberger et al., 2008; Kraigher et al., 2006; Urbanová & Bárta, 2014) a 60–80% ve vrchovištích (Braginet et al., 2013; Lin et al., 2012; Urbanová & Bárta, 2014). Ve vrchovištích tvoří *Acidobacteria* dominantní skupinu, protože jsou dobře adaptované na kyselé a živinami chudé podmínky rašelinišť. Početnost *Acidobacteria* klesá s rostoucím pH a v bakteriálním společenstvu minerotrofních rašelinišť jsou nahrazovány jinými skupinami. Naopak zastoupení *Proteobacteria* roste od vrchovišť, kde představují 10–35%, k minerotrofním rašeliništím, kde tvoří 15–50% bakteriálního společenstva (Lin et al., 2012; Serkebaeva et al., 2013; Sun et al., 2014; Urbanová & Bárta, 2014; 2016). Další významné skupiny bakterií v rašeliništích jsou *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi* a *Chlamydiae* a jejich procentuální zastoupení v bakteriálním společenstvu se většinou pohybuje od ~1% do 10% (Bragina et al., 2013; Lin et al., 2012; Serkebaeva et al., 2013; Urbanová & Bárta, 2014; 2016). Kmeny, které byly detekovány se zastoupením do 1% a pouze jen v některých studiích jsou např. *Chlorobi* a *Nitrospirae* (Urbanová & Bárta, 2014; Dedysh et al., 2006; Lin et al., 2012).

#### 2.4.1.1 Acidobacteria

*Acidobacteria* představují abundantně nejvýznamnější kmen detekovaný v rašeliništích, což představuje jejich možnou adaptaci na kyselé podmínky. Ačkoliv toho o jejich roli v rozkladných procesech není příliš známo, nedávná studie objevila, že 1/3 detekovaných genů enzymu lakázy (-fenol-oxydázy) náleží kmenu *Acidobacteria*, což může indikovat jejich význam při rozkladu fenolických sloučenin jako je například lignin (Ausec et al., 2011). Rozklad sloučenin aromatického charakteru acidobakteriemi byl potvrzen na základě metagenomických analýz ve studii Lin et al. (2014) a to na základě genů kódujících enzymy lakázy a dioxygenázy. Na základě dalších studií se předpokládá jejich potenciální úloha při degradaci celulózy (Ward et al., 2009; Pankratov et al., 2011a; 2011b). I přestože jsou *Acidobacteria* detekováni různými molekulárními metodami a v rašeliništích se zjevně jedná o jednu z nejvýznamnějších taxonomických skupin, jejich bližší poznání na úrovni nižších taxonomických kategorií je zatím nedostatečné.

#### 2.4.1.2 Proteobacteria

Tento kmen bakterií je obecně dělen na celkem pět tříd  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - a  $\epsilon$ -*Proteobacteria*, přičemž pro rašeliništní ekosystémy jsou charakteristické první čtyři třídy. *Proteobacteria* tvoří velmi metabolicky různorodou skupinu, jenž dokáže metabolizovat širokou škálu substrátů a používat různé sloučeniny jako elektronové donory. Příkladem může být studie z minerotrofního rašeliniště, kde byly nalezeny zástupci proteobakterií širokého metabolického spektra, například bakterie fixující dusík *Bradyrhizobium sp.*, *Devosia sp.*, nitrifikační *Nitrosospira sp.*, denitrifikační *Alcaligenes sp.* či sulfát-oxidující bakterie *Thiobacter* a *Thiobacillus* (Kraigher et al., 2006).

Abundance zástupců třídy  $\alpha$ -,  $\beta$ -, a  $\gamma$ -*Proteobacteria* roste od vrchovišť ke slatiništím (Urbanová & Bárta, 2014). Zástupci třídy  $\alpha$ -*Proteobacteria*, konkrétněji rodů *Methylocella*, *Methylocapsa* a *Methylocystis* jsou známy svou schopností oxidovat metan (Andersen et al., 2013). *Burkholderia bryophila*, zástupce třídy  $\beta$ -*Proteobacteria*, je velmi rozšířený druh v mnoha studovaných rašeliništích, který využívá různé

organické kyseliny, cukry, alkoholy a některé aromatické sloučeniny (Bragina et al., 2013; Morales et al., 2006; Sun et al., 2014). Zástupci třídy *δ-Proteobacteria*, konkrétněji řády *Syntrophobacterales* a *Desulfovibrionales* jsou známi jako sulfát-redukující mikroorganismy (Hanson & Hanson, 1998; Morales et al., 2006). Mimoto je třída *δ-Proteobacteria* díky poměrné metabolické rozmanitosti jednou z klíčových skupin ve vrchovištích (Morales et al., 2006). Zástupci této třídy obsahují kromě sulfát-redukujících i fermentační nebo železo-redukující bakterie. Jako vedlejší produkt jejich metabolismu je H<sub>2</sub>, který využívají metanogenní archea či acetogenní bakterie. Mimo jiné, ve studii Urbanová & Bárta (2014) představoval řád *Syntrophobacterales* ve vrchovištích až 95% mikroorganismů třídy *δ-Proteobacteria*, zatímco ve slatiništi měl zastoupení asi o polovinu nižší.

#### **2.4.1.3 Actinobacteria**

*Actinobacteria* jsou různorodou bakteriální skupinou, avšak většina známých zástupců tohoto kmene jsou aerobní, ale dokáží se přizpůsobit i anoxickým podmínkám (Kotiaho et al., 2013). Serkebaeva et al. (2013) detekovali v anaerobní vrstvě dokonce o něco více *Actinobacteria* (10,7%) než ve vrstvě aerobní (9,5%). V ombrotrofních rašeliništích, kde jsou významnou součástí vegetace mechy rodu *Sphagnum*, patří *Actinobacteria* mezi významnou složku dekompozičních mikroorganismů. Díky produkci extracelulárních enzymů, které mají podobné vlastnosti jako enzymy produkované některými houbami, dokáží rozkládat lignin, chitin, pektin, celulózu a huminové kyseliny, což jim mimo jiné umožňuje přežít v prostředí s nízkou dostupností uhlíku (Paul & Clark, 1996; Peltoniemi et al., 2012).

#### **2.4.2 Archea**

Přestože archea představují pouze 1–2% z celého mikrobiálního společenstva, některé jejich skupiny hrají významnou roli v anaerobním rozkladu. Přítomnost archeí je typická především pro anaerobní vrstvu rašeliny. Tento fakt potvrzuje studie Lin et al. (2014), kde abundance archea rostla s hloubkou a v katotelmu představovala až 60% mikrobiálního společenstva, přičemž v provzdušněné vrstvě

představovala méně než 1%. Diverzita archeí je obecně vyšší ve slatiništích než ve vrchovištích. Dominantní skupinou jsou především metanogenní archea. Avšak nemetanogenní archea mohou představovat metabolicky velmi různorodé skupiny adaptované na anaerobní podmínky. Rozšířené nemetanogenní archea reprezentují zástupci z kmenů *Thermoplasmata*, *Marine Bentic Group A* (MBGA) nebo *Miscellaneous Crenarchaeota group* (MCG). Častými nemetanogenními zástupci na vrchovištích jsou i archea z řádu *Thaumarchaeota*, jenž mohou mít schopnost nitrifikace (Puglisi et al., 2014; Urbanová & Bárta, 2016).

Nejprostudovanější archeální skupinou jsou v současné době metanogenní archea, která se dělí do pěti řádů - *Methanopyrales*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* a *Methanosarcinales* a jejich zastoupení v rašeliništích se liší s měnícími se environmentálními podmínkami jako je pH, teplota či složení vegetace (Garcia et al., 2000; Rooney-Varga et al., 2007). Příkladem je řád metanogenů *Methanomicrobiales*, který se vyskytuje hlavně ve vrchovištích, zatímco *Methanobacteriales* ve slatiništích (Lin et al., 2014; Urbanová & Bárta, 2014; 2016). Podobně jako u bakterií, také diverzita metanogenních archeí roste podél ekohydrologického gradientu od vrchovišť k minerotrofním rašeliništím (Urbanová & Bárta, 2016).

## 2.5 Významné funkční skupiny mikroorganismů v rašeliništích

Ve srovnání s taxonomickou hierarchií jsou do funkčních skupin zařazovány mikroorganismy, které v ekosystému zajišťují podobné nebo stejné procesy, tedy mají podobný metabolismus. Funkční skupiny hrají v rašeliništích nepostradatelnou roli, avšak současné poznání o těchto skupinách v rašeliništích je stále ještě na počátcích. Jsou především studovány metanogenní (např. Juottonen et al., 2005; 2006; 2008; Kotiaho et al., 2010) a metanotrofní mikrobiální specialisté (např. Jaatinen et al., 2005; Gupta et al., 2012) nebo sulfát-redukující bakterie (např. Pester et al., 2012). Navzdory tomu bývají opomenuty nejdůležitější skupiny dekompozitorů, jako jsou například *Acidobacteria*, která tvoří významnou součást mikrobiálního společenstva rašelinišť.

I přestože se tedy zájem o studium mikroorganismů v rašeliništích v posledních dvou desetiletích značně zvýšil, jsou různé skupiny mikroorganismů a jejich specifické



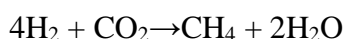
funkce stále nedostatečně prozkoumány. Nejasná například zůstává otázka souvislosti druhové rozmanitosti a funkce v rámci mikrobiálních společenstev (Andersen et al., 2013).

### 2.5.1 Metanogenní archea

Metanogenní archea představují z ekologického hlediska jednu z nejvýznamnějších funkčních skupin mikroorganismů v rašeliništích, jelikož koncovým produktem jejich metabolismu je metan (CH<sub>4</sub>). Metan je po oxidu uhličitým druhým nejvýznamnějším skleníkovým plynem, jenž má o 20–30x vyšší potenciál v absorpci tepla než má oxid uhličitý (CO<sub>2</sub>). Ročně je z rašelinišť do atmosféry uvolněno 30–40 Tg metanu, což z globálního hlediska odpovídá asi 6–7% z celkových emisí metanu vypuštěných do atmosféry za rok (Cicerone & Oremland, 1988; Khalil & Rasmussen, 1983).

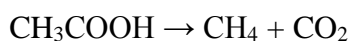
Metanogenní archea jsou obligátně anaerobní mikroorganismy, kteří v rašeliništích zajišťují proces metanogeneze - proces, kterým se rozumí produkce metanu v anoxických podmínkách. Metanogeneze je posledním stupněm anaerobní degradace organické hmoty, kde výslednými produkty jsou CH<sub>4</sub> a CO<sub>2</sub>. Tato specifická funkční skupina mikroorganismů funguje v mokřadních půdách s nízkým redukčním potenciálem (E<sub>h</sub>) < -200 mV (Reddy & DeLaune, 2008; Le Mer & Roger, 2001). Podle metabolických cest a tedy využívaného substrátu jsou metanogenní archea rozdělována do tří skupin (Garcia et al., 2000; Madigan & Martinko, 2006):

i) hydrogenotrofové oxidující H<sub>2</sub> a redukující CO<sub>2</sub>



ii) metylotrofové metabolizující metylové sloučeniny jako metanol (CH<sub>3</sub>OH), metylaminy (CH<sub>3</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), dimethylaminy [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>], trimethylaminy [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>], metylmerkaptan (CH<sub>3</sub>SH) nebo dimetylsulfid [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S]

iii) acetotrofové využívající acetát k tvorbě metanu



Hydrogenotrofové představují 77% známých metanogenních druhů (Le Mer & Roger, 2001). Avšak 2/3 produkce metanu pochází z acetotrofní metanogeneze. Acetát je nejpoužívanějším substrátem pro metanogenezi v mnoha sladkovodních anaerobních ekosystémech (Schulz & Conrad, 1994). S ohledem na typ rašeliniště jsou hydrogenotrofové dominující skupinou v ombrotrofních rašeliništích, zatímco acetotrofové v rašeliništích minerotrofních (Cadillo-Quiroz et al., 2006; Galand et al., 2005). Výskyt acetotrofních metanogenů je ve slatiništích vyšší zřejmě v důsledku přítomnosti ostřicovitých rostlin, které poskytují dostatek substrátu (Ström et al., 2003). Některá rašeliniště však vykazovala opačné výsledky, než jsou obecně uznávané trendy v zastoupení hydrogenotrofních a acetotrofních metanogenů (Bräuer et al. 2004). To může být způsobeno specifickými environmentálními podmínkami daného místa, avšak nejsou pro to zcela jasná vysvětlení. Zajímavý je řád *Methanosarcinales*, který zahrnuje většinu metanogenních acetotrofů a metylotrofů. Jejich přítomnost byla mimo rašeliniště potvrzena ve sladkovodním a mořském sedimentu nebo ve vyhnívacích nádržích (Garcia et al., 2000). Zajímavé je také procentuální zastoupení tohoto řádu v porovnání s některými studii. Ve studii Lin et al. (2014) tvořil dominantní složku archeální komunity, naopak ve studii Urbanová & Bárta (2014) byli jeho zástupci pouze v minoritním zastoupení, tedy méně než 1 %.

Faktor, který výrazně reguluje metanogenezi je hladina podzemní vody a tedy stabilita anaerobních podmínek. S tím souvisí i koncentrace ostatních elektronových akceptorů jako jsou  $\text{NO}_3^-$ ;  $\text{SO}_4^{2-}$ ;  $\text{Fe}^{3+}$ , v jejichž přítomnosti je metanogeneze limitována (Rydin & Jørgensen, 2006). Metanogeni jsou známi jako kompetičně slabé organismy, proto jsou v přítomnosti jiných elektronových akceptorů snadno vykonkurováni jinými skupinami mikroorganismů, které využívají acetát jako substrát či  $\text{H}^+$  ionty (např. acetotrofní, homoacetogenní, síru-redukující či Fe-redukující bakterie). Dalšími faktory jsou dostupnost a kvalita organického materiálu (např. čerstvý opad nebo kořenové exsudáty), na nichž závisí i dostupnost substrátu pro metanogeny a jiné funkční skupiny. Dostupnost substrátu pro metanogeny, a tedy i jejich aktivita, je závislá na pochodech jiných mikroorganismů, konkrétně na hydrolytických, fermentačních a acetogenních bakteriích (Reddy & DeLaune, 2008).

## 2.5.2 Metanotrofní bakterie

Metanotrofní bakterie (metan-oxidující bakterie, MOB) se narušují od metanogenů podílejí na snižování emisí metanu z rašelinišť (mokřadů) jeho oxidací a hrají významnou roli ve výsledných emisích metanu unikajících do atmosféry. MOB patří do skupiny obligátně aerobních gram-negativních bakterií využívající metan jako jediný zdroj uhlíku a energie (Hanson & Hanson, 1996). Podle afinity k metanu jsou MOB rozdělovány na dva typy:

typ I MOB) oxidují metan při koncentracích <12 ppm, což je hodnota blízká koncentraci metanu v atmosféře. Patří sem čeleď *Methylococcaceae* (např. *Methylobacter sp.*, *Methylococcus sp.*, *Methylomonas sp.*) z kmene  $\gamma$ -*Proteobacteria*, jehož zástupci bývají detekováni především v aerobní vrstvě rašeliny (Lin et al., 2012; Serkebaeva et al., 2013). Je odhadováno, že MOB typu I dokáží oxidovat až deset procent z celkového množství mikrobiální spotřeby metanu. MOB tohoto typu jsou nalézány také v některých lesních půdách a v půdách s neutrálním pH (Andersen et al., 2013; Hanson & Hanson, 1996).

typ II MOB) oxidují metan při koncentracích >40 ppm. Patří sem čeleď *Methylocystaceae* (*Methylosinus sp.*) z kmene  $\alpha$ -*Proteobacteria* (Lin et al., 2012). Bývají považovány za významnou a často dominantní skupinu MOB v rašeliništích. Výskyt tohoto typu MOB je typický pro ekosystémy s významnou přítomností metanogenů a tedy vysokou koncentrací metanu, kterým jsou včetně rašelinišť například rýžová pole nebo skládky (Le Mer & Roger, 2001; Urbanová & Bárta, 2014).

V rašeliništích jsou MOB přítomny v provzdušněné vrstvě rašeliny a v aerobní rhizosféře rostlin s aerenchymem (Gilbert & Frenzel, 1995). Nejvyšší aktivita MOB je těsně nad hladinou podzemní vody, kde je dostatečné množství metanu a kyslíku zároveň (Jaatinen et al., 2005; Juottonen, et al., 2012; Sundh et al., 1994). Bylo zaznamenáno, že někteří zástupci MOB dokáží využívat jiné elektronové akceptory, jako jsou nitráty ( $\text{NO}_3^-$ ) (Reddy & DeLaune, 2008) nebo sulfáty ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) (Smemo & Yavitt, 2011). Naopak v přítomnosti amonných iontů  $\text{NH}_4^+$  může být aktivita a růst MOB zpomalena (Le Mer & Roger, 2001).

Z taxonomického hlediska byl v rašeliništích detekován pouze kmen *Proteobacteria*, v třídách  $\alpha$ - a  $\gamma$ -*Proteobacteria*. MOB typu II, *Methylocystaceae* tvořili dominantní složku MOB jak ve vrchovišti, tak ve slatiništi se zastoupením 0,8–1,6% z celkového mikrobiálního společenstva (Lin et al., 2012). Druhové složení MOB se liší mezi vrchovišti a slatiništi v závislosti na pH a vegetačním složení (Jaatinen et al., 2005). Převládajícím rodem ve vrchovištích je MOB rodu *Methylocystis*, který je tolerantní k nízkému pH (Dedysh et al., 2003). Ve studii Urbanová & Bárta (2014) zaujímala čeleď *Methylocystaceae* 1,6% bakteriálního společenstva ve vrchovišti a 2% ve slatiništi, a naopak MOB typu I, čeleď *Methylococcaceae*, tvořili 0,2%. Různé skupiny metanotrofů se mohou lišit v rámci tolerance k dočasnému zaplavení. Zástupci čeledi *Methylocystaceae* (rod *Methylosinus* a *Methylocystis*) byli nalezeni v anaerobní a aerobní vrstvě rašeliny, a předpokládá se, že díky fermentaci zásobní sloučeniny poly- $\beta$ -hydroxybutyrátu mají schopnost snášet dlouhá období nedostatku kyslíku v anaerobních podmínkách (Vecherskaya et al., 2009). Naproti tomu čeleď *Methylococcaceae* byla detekována pouze ve vrstvě aerobní a není schopná tolerovat dlouhodobější období bez kyslíku (Sarkebaeva et al., 2013).

### 2.5.3 Sulfát redukující mikroorganismy

Sulfát redukující mikroorganismy (SRM) jsou součástí koloběhu síry, a proto jsou považovány za důležitou složku substrátových přeměn v ekosystémech, přestože představují velmi malý zlomek mikrobiální populace v rašeliništích (<1%). Taxonomicky jsou řazeny do kmenů *Proteobacteria* (resp.  $\delta$ -*Proteobacteria*) a *Firmicutes* (Bharathi, 2008; Pester et al., 2012). SRM jsou obligátně anaerobní organismy, které oxidují organické sloučeniny na CO<sub>2</sub> a zároveň redukují sulfát (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), který používají jako terminální akceptor elektronu, na sírové sloučeniny, často HS.

V mokřadech tkví důležitost SRM především v mineralizaci síry, ale svými metabolickými cestami se významně podílejí také na cyklu uhlíku a dusíku (Muyzer & Stams, 2008). V anaerobních podmínkách, pro které je charakteristický nízký redoxní potenciál ( $E_h$ ) <-100 mV, kompetují tyto mikroorganismy o substrát především s fermentačními, metanogenními a acetogenními bakteriemi (Muyzer & Stams, 2008;

Reddy & DeLaune, 2008). Metabolická různorodost SRM dovoluje degradovat široké spektrum organických nízkomolekulárních látek jako je například acetát, etanol, malát nebo laktát (Reddy & DeLaune, 2008). V důsledku toho jsou SRM závislí na metabolitech jiných funkčních skupin, zejména některých fermentačních bakterií (Reddy & DeLaune, 2008). Navíc nedokáží syntetizovat hydrolytické enzymy a proto nejsou schopny hydrolyzovat polymery (jako například celulózu či škrob) (Muyzer & Stams, 2008). Při sezonním kolísání hladiny vody dokáží SRM v oxických podmínkách povrchové rašeliny oxidovat redukované sloučeniny síry na  $\text{SO}_4^{2-}$ . Oxidace  $\text{SO}_4^{2-}$  může nastat také kolem kořenů rostlin (Smemo & Yavitt, 2011).

#### 2.5.4 Nitrifikační mikroorganismy

Dusík je významným biogenním prvkem, jenž má stavební, nutriční a esenciální charakter. Prvotním zdrojem půdního dusíku je atmosféra, odkud se pomocí dusík-fixujícími mikroorganismy dostává do půdního prostředí. Působením amonifikačních bakterií je do půdy uvolňován amoniak. V širším měřítku je amoniak jedním z koncových produktů rozpadu organického materiálu a odpadním produktem buněčného metabolismu (Ward, 2008). Procesem nitrifikace, jež je nezbytnou součástí procesu cyklu dusíku, se rozumí oxidace amonného iontu ( $\text{NH}_4^+$ ) na ion dusitanový ( $\text{NO}_2^-$ ) a dusičnanový ( $\text{NO}_3^-$ ). Tento řetězec reakcí probíhá při dostatečném nasycení kyslíkem, v aerobní vrstvě nebo v samotné rašelině v okolí kořenů aerenchymatických rostlin (Rydin & Jeglum, 2006). Z ekologického hlediska je nitrifikace významným procesem v půdě, jelikož jsou do prostředí vypouštěny dusíkaté ionty  $\text{NO}_3^-$ , které rostlinám slouží jako zdroj dusíkaté výživy.  $\text{NO}_3^-$  je však velmi mobilní iont a může docházet k jeho vyplavování z ekosystému a tedy znečištění podzemních a povrchových vod a acidifikaci. Nitrifikační mikroorganismy jsou podle oxidovaného substrátu rozdělovány na dvě skupiny: i) amoniak-oxidující mikroorganismy, které oxidují  $\text{NH}_4^+$  na  $\text{NO}_2^-$  a ii) nitrit-oxidující mikroorganismy, které oxidují  $\text{NO}_2^-$  na  $\text{NO}_3^-$  (Reddy & DeLaune, 2008)

Oxidaci amoniaku zajišťují mikroorganismy z kmene *Proteobacteria*, konkrétněji rody *Nitrosomonas*, *Nitrosospira* a *Nitrosococcus* (Kowalchuk & Stephen, 2001). Bakterie z rodu *Nitrosomonas* a *Nitrosococcus* oxidují  $\text{NH}_4^+$  na  $\text{NO}_2^-$ , zatímco

bakterie rodu *Nitrobacter* zajišťují oxidaci druhé části reakce,  $\text{NO}_2^-$  na  $\text{NO}_3^-$  (Liou & Madsen, 2008). Výjimkou aerobní oxidace amoniaku je jeho oxidace v bezkyslíkatém prostředí (annamox). Na procesu annamox se podílí zejména mikroorganismy z řádu *Planctomycetales* konkrétněji rody *Brocadia*, *Kuenenia*, *Scalindula* a *Anammoxoglobus*. Existence těchto organismů byla zatím prokázána pouze v mořských a pobřežních sedimentech a v ústí některých řek (Francis et al., 2007). Schopnost nitrifikace byla však identifikována i pro zástupce z fylogenetické domény archaea. Příkladem je kmen *Thaumarchaeota*, jehož nitrifikační zástupci se vyskytují nejen v mořských ale i ve sladkovodních terestrických ekosystémech. Konkrétní zástupce tohoto kmene, *Nitrosotalea devanattera*, byl objeven v ombrotrofním a v minerotrofním rašeliništi (Herrmann et al., 2012; Puglisi et al., 2014).

### 2.5.5 Denitrifikační mikroorganismy

Denitrifikace je úzce spojená s nitrifikací, kdy je výsledný produkt nitrifikace,  $\text{NO}_3^-$ , redukován na  $\text{N}_2\text{O}$  nebo na molekulární dvouatomový  $\text{N}_2$  v anaerobních podmínkách. Ve skutečnosti se jedná o vícefázový proces, kdy je  $\text{NO}_3^-$  redukován ve více krocích za přítomnosti specifických enzymů. Prostou difuzí je  $\text{N}_2\text{O}$  vypouštěn do atmosféry, kde se stává součástí skleníkových plynů. Denitrifikační bakterie tak ochuzují rašelinnou půdu o anorganickou dusíkatou výživu, která je důležitá pro růst a vývoj rostlin. Denitrifikace probíhá v podmínkách za nízkého obsahu kyslíku nebo v jeho úplné absenci při redoxním potenciálu ( $E_h$ )  $< -85$  mV (Reddy & DeLaune, 2008). V hlubších vrstvách rašeliny je denitrifikace limitována nedostatkem elektronových akceptorů, hlavně v kyselých ombrotrofních rašeliništích, kde je zásoba  $\text{NO}_3^-$  iontů minimální (Mandic-Mulec et al., 2014; Wieder & Vitt, 2006). Fylogeneticky patří denitrifikační bakterie jak mezi bakterie tak i archaea. Nejvíce denitrifikačních bakterií je řazeno do kmene  $\gamma$ -*Proteobacteria* (např. *Pseudomonas stutzeri*, *P. aeruginosa* a *P. fluorescens*).

### 2.5.6 Acetogenní bakterie

Produktem acetogenních bakterií je acetát ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), který v rašeliništích plní funkci jako výchozí substrát pro některé metanogeny a sulfát-redukující bakterie (Muyzer & Stams, 2008). Naopak acetogenní bakterie si konkurují o  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2$  s hydrogenotrofními metanogeny (Kotsyurbenko et al., 2001). Některé acetogenní bakterie produkují místo acetátu laktát nebo etanol (Drake et al., 2006). Většina izolovaných acetogenů byla nalezena v anoxických podmínkách při pH pohybující se kolem neutrálních hodnot (Drake, 1994). Lin et al. (2014) zaznamenali přítomnost klíčového enzymu acetogenních mikroorganismů formyltetrahydrofolát-syntetázy v mezotelmu a katotelmu, což značí převahu oxidace  $\text{CO}_2$  v anaerobních podmínkách. Taxonomicky se acetogenní bakterie řadí do kmene *Firmicutes*.

### 2.5.7 Mikroorganismy rozkládající celulózu a lignin

V rašeliništích je rostlinný opad tvořen především z těžko rozložitelných látek ligninového charakteru, který je prostřednictvím extracelulárních enzymů bakterií a hub postupně degradován. Rozložitelnost těchto sloučenin klesá v pořadí celulóza > hemicelulóza > lignin (Reddy & DeLaune, 2008). Houby jsou vnímány jako primární dekompozitoři z hlediska produkce některých enzymů jako jsou lignocelulózu-degradující enzymy, lakáza-, lignin-peroxidázy a celulázy (Paul, 2007). Produkce podobných enzymů, především lignin degradujících, byla prokázána u třídy *Actinomycetes* (kmen *Actinobacteria*), avšak efektivita bakteriálních enzymů není tak vysoká jako u hub (Brown & Chang, 2014). Celulolytické enzymy dokáží produkovat některé bakterie, jako jsou například *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* a *Clostridium*. Je předpokládána závislost mezi diverzitou mikroorganismů rozkládajících celulózu a klimatickými podmínkami, jakými jsou množství srážek a teplota (Dobrovol'skaya et al., 2012). V této studii bylo zjištěno, že při srážkově suchém měsíci dominovali *Cytophaga*, *Myxococcales* a *Streptomyces*, zatímco při dlouhotrvajících deštích byli v menšině. Celulolytický zástupce aktinomycet, *Acidothermus cellulolyticus*, je výskytem typický pro prostředí termálních pramenů, avšak na základě sekvenční podobnosti byl detekován i v minerotrofním rašeliništi (Peltoniemi et al., 2009).

## 2.6 Změny v mikrobiálním společenstvu rašelinišť vlivem odvodnění

Odvodněním jsou narušeny fyzikálně-chemické vlastnosti rašeliny, avšak v důsledku odvodnění dochází i k postupným změnám v druhové skladbě vegetace a následně i ve struktuře mikrobiálního společenstva. Narušení přirozeného vodního režimu odvodněním je vážně narušeno fungování rašelinného biotopu a způsobuje především rozkolísání hladiny podzemní vody a její pokles. Následkem toho se rozšiřuje aerobní zóna rašeliny, která poskytuje příznivější podmínky pro aerobní skupiny rozkladačů, jako jsou některá společenstva gram-negativních bakterií a hub (Jaatinen et al., 2008; Peltoniemi et al., 2009). Rozkladem a sesedáním se mění objemová hmotnost rašeliny a dochází tím k jejímu zvyšování (Jaatinen et al., 2005; Urbanová & Bárta, 2016). V důsledku hydrologických změn se obměňuje i přirozená skladba vegetace. Ustupují aerenchymatické rostliny s hlubokými kořeny, jako jsou některé druhy ostřicovitých a šáchorovitých rostlin a jsou tak často nahrazovány lučními či lesními druhy s mělkým zakořeněním. Příkladem suchomilnější vegetace mohou být některé keříčkovité druhy (*Vaccinium uliginosum*, *V. myrtillus*, *Ledum palustre*) či dokonce porosty stromů (*Betula pubescens*, *Picea abies*; *Pinus sylvestris*) a v krajních případech může docházet až k zalesnění (Laine et al., 1995). V mechovém patru jsou rašeliníky nahrazovány jinými druhy mechorostů a dochází k jejich fragmentaci (Jaatinen et al., 2007; Peltoniemi et al., 2009; 2012; Urbanová & Bárta, 2016). Do rašelinného ekosystému se tak dostává vyšší množství aromatických, karboxylových ale i fenolických sloučenin (Blodau & Siems, 2012).

Je nutno zdůraznit, že v současné době existuje velmi malé množství prací, které se zabývají strukturou mikrobiálního společenstva na odvodněných rašeliništích. Další minimum studií, jenž se zabývá touto problematikou, se věnuje určité funkční skupině (např. Jaatinen et al., 2005). Vzhledem k nedostatku studií na tuto problematiku čerpám především z práce Urbanová & Bárta (2016). Tato studie zjistila, že vlivem dlouhodobého odvodnění (>40 let) se snížila mikrobiální rozmanitost ve studovaném slatiništi a naopak, diverzita mikroorganismů na vrchovišti mírně vzrostla. Na vrchovišti k výrazným změnám v bakteriálním složení nedošlo, i po odvodnění zde stále dominovaly bakteriální kmeny *Acidobacteria* (~80%) a *Proteobacteria* (~11%),



minoritní změny se udály pouze v drobném nárůstu kmenů *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* a *Elusimicrobia* (o 0,12–1,55% vlivem odvodnění). Nicméně na slatiništi byly změny patrnější. Abundance dominantního kmene *Acidobacteria* se zvýšila z 51% na 75% vlivem odvodnění a naopak kleslo zastoupení *Proteobacteria* (z 23% na 12%) a *Verrucomicrobia* (z 10,6% na 3,2%). Změna vlivem odvodnění byla pozorována také v nárůstu abundance kmene *Nitrospirae* (z 1,7% na 5%) a méně patrnější nárůst u *Planctomycetes* (z 0,97% na 1,2%). Ostatní taxonomické skupiny kmenů *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Elusimicrobia*, *Chloroflexi* a *Chlorobi* vykazovaly vlivem odvodnění na slatiništi pokles (o 0,6–1,75%). Relativně podobné složení mikrobiálního společenstva na vrchovišti mezi přirozeným a narušeným rašeliništěm může být způsobeno malými změnami biogeochemických vlastností rašeliny. Vrchoviště se tedy zdají být odolnější vůči odvodnění, jelikož jsou přirozeně oligotrofní a kyselé s nízkou dostupností substrátu (Kraigher et al., 2006; Urbanová & Bárta, 2016). Navýšení abundance kmene *Acidobacteria* na minerotrofním slatiništi může být způsobeno jejich degradační schopností aromatických sloučenin, které jsou vnášeny do rašelinného biotopu změnou vegetačního pokryvu.

Naproti tomu významné změny se vlivem odvodnění udály v archeálním společenstvu studovaných rašelinišť. V přirozeném vrchovišti dominovali metanogenní *Methanomicrobia* (68%) a méně zastoupené byly nemetanogenní skupiny *MBGA*, *MCG*, *Thermoplasmata* a *Thaumarchaeota* (9–7%). Odvodněním narostla abundance právě nemetanogenních kmenů *MBGA* (~62%) a *Thermoplasmata* (~29%). Podobný trend vykazovalo i minerotrofní slatiniště, kde v přirozeném stavu dominovali pro slatiniště typické *Methanobacteria* (~48%) spolu s *Methanomicrobia* (~25%). Odvodnění způsobilo výrazný ústup metanogenních skupin (<1%) a vedlo k dominanci nemetanogenních kmenů *Thaumarchaeota* a *MBGA* (Urbanová & Bárta, 2016). V důsledku odvodnění je tedy výrazně snížena produkce CH<sub>4</sub>. Ačkoliv tvoří nemetanogenní archea po odvodnění dominantní skupinu, jejich funkce je v rašeliništích stále nejasná.

Hladina podzemní vody tvoří hranici mezi aerobními a anaerobními procesy a odvodněním se tato hranice posunuje hlouběji do půdního profilu. Metanogenní společenstva jsou snížením hladiny vody zatlačena hlouběji do půdního profilu, a ačkoliv se předpokládá, že jsou schopny přežít v rámci aerobní vrstvy v tzv.

anaerobních mikro-habitatů, jejich aktivita může být z důvodu nedostatku vhodného substrátu pro jejich růst značně limitována. Metanotrofní bakterie jsou životní strategií závislé na přítomnosti metanogenních specialistů, a proto vlivem odvodnění dochází s poklesem metanogenů i k poklesu abundance metanotrofních bakterií v důsledku nedostatku substrátu (Jaatinen et al., 2005). Jaatinen et al. (2005) studovali, jak se MOB mění vlivem odvodnění v ombrotrofním vrchovišti a oligotrofním slatiništi. Ačkoliv byli MOB detekováni v obou typech rašelinišť i po dlouhodobém odvodnění, byl zaznamenán výrazný pokles oxidace  $\text{CH}_4$ , zejména ve slatiništi (o ~ 85%) v porovnání s vrchovištěm (o ~ 30%). Pokles MOB byl zaznamenán také ve studii Urbanová & Bárta (2016) kde četnost MOB klesla o 60–90% v porovnání s neodvodněnými plochami.

## 2.7 Závěry

Mikrobní společenstva se významně podílejí na biodegradaci, substrátových přeměnách, koloběhu prvků a živin, a přestože patří mezi nejmenší známou složku bioty, jejich funkce jsou nenahraditelné. V ombrotrofních a minerotrofních nenarušených rašeliništích se od sebe liší v abundanci a aktivitě, avšak při pohledu na detailnější taxonomickou hierarchii mohou obsahovat i odlišné mikrobiální skupiny. To je způsobeno odlišnými environmentálními podmínkami těchto typů rašelinišť jako je především pH, dostupnost živin či vegetační složení.

Změnou vodního režimu rašeliniště vlivem odvodnění je narušena jeho přirozená schopnost vázat vodu, živiny a akumulovat organickou hmotu. Odvodnění tedy vede ke změně biogeochemických vlastností rašeliny a ke změně rozkladných procesů. Důsledkem je nejen změna uhlíkové bilance ekosystému, ale především změna ve složení společenstva mikroorganismů a jeho fungování. Rozšířená aerobní vrstva umožňuje rozšíření aerobních společenstev, především acidobakterií. Naopak, společenstva anaerobních mikroorganismů, především metanogenů, jsou zatlačena hlouběji do půdního profilu, kde je nižší dostupnost substrátu. Degradace rašelinišť vlivem odvodnění je jedno z aktuálních témat, jehož důsledkem je ztráta cenných ekosystémových funkcí rašelinišť, jakými je právě akumulace uhlíku či důležitá role v hydrologii a biodiverzitě krajiny. Z tohoto důvodu se v posledních několika deseti letech přistupuje k revitalizaci rašelinišť, jejichž cílem je navrácení tohoto cenného

ekosystému do jeho původního stavu. Mikrobní společenstva rašelinišť citlivě reagují na změny environmentálních podmínek a mohou být tak využita k detekci narušení, či obnovy ekosystému po revitalizaci (Nurulita et al., 2016). A proto se mikrobním společenstvem jakožto vhodným nástrojem k vyhodnocení stavu ekosystému zabývám v projektové části této bakalářské práce.

## **3 Projekt**

### **3.1 Cíle projektu**

Projekt navrhuje studium složení mikrobiálního společenstva se zaměřením na bakterie a archea na dlouhodobě odvodněném a revitalizovaném rašeliništi dvou typů. Cílem je nejen vyhodnocení úspěšnosti revitalizace, ale i otestování vhodnosti analýzy složení mikrobiálního společenstva jako indikátoru narušení či obnovy ekosystému. Získané výsledky poslouží k porovnání s mikrobiálním společenstvem na přirozeném rašeliništi stejného typu.

### **3.2 Hypotézy**

Dlouhodobé odvodnění vede obecně ke změnám ve složení mikrobiálního společenstva. Na odvodněných rašeliništích je očekávána celkově nižší bakteriální diverzita a dominance kmene *Acidobacteria*. Vlivem odvodnění dojde k nahrazení metanogenních skupin nemetanogenními zástupci archeí. Po revitalizaci by mělo docházet k postupnému návratu původních metanogenních a metanotrofních společenstev a k obnovení celkové rozmanitosti a početnosti bakteriálních skupin. Předpokládáme, že revitalizovaná rašeliniště budou vykazovat podobnou mikrobiální strukturu jako přirozená rašeliniště stejného typu.

### **3.3 Návrh projektu**

#### **3.3.1 Charakteristika lokalit**

Pro účely projektu byla vybrána vždy jedna odvodněná a jedna revitalizovaná lokalita pro vrchoviště a minerotrofní rašeliniště nacházející se v oblasti Šumavy. Z dosavadních odběrů rašeliny jsou dostupná data o složení mikrobiálního společenstva na přirozených rašeliništích včetně biogeochemických charakteristik rašeliny (např. Urbanová & Bárta, 2014, 2016).

### Zhůřské louky – odvodněné a revitalizované minerotrofní rašeliniště

Lokality se nachází na mírných svazích a okrajích nivy horního toku Křemelné v nadmořské výšce 900 m n.m. (49°10'50 N, 13°19'18 E). Jedná se o rozsáhlý komplex odvodněných minerotrofních rašelinišť poblíž bývalé osady Zhůří západně od Hartmanic. Část rašelinišť byla v roce 2014 revitalizována. Vegetační struktura je různorodá v závislosti na intenzitě odvodnění jednotlivých částí rašeliniště. Na vlhčích lépe zachovaných ploškách se vyskytují porosty ostřice zobénkaté (*Carex rostrata*) s vysokou pokryvností rašeliníků. Naopak na suchých degradovaných částech převažují druhy jako ostřice obecná (*C. nigra*), o. třeslicovitá (*C. brizoides*), bezkolnec modrý (*Molinia caerulea*) a smilka tuhá (*Nardus stricta*) bez mechového patra.

### Ptačí slat' – odvodněné vrchoviště

Odvodněné vrchoviště se nachází poblíž Filipovy Huti v blízkosti bývalé Ptačí nádrže v nadmořské výšce 1130 m n.m. (48°59'11 N, 13°30'38 E). Převládají zde keříčkové formace s dominantní vlochyní bahenní (*Vaccinium uliginosum*), podél odvodňovacích rýh došlo k šíření kleči (*Pinus x rotundata*) a smrku (*Picea abies*). Těleso rašeliniště protíná jedna široká odvodňovací rýha a po obvodu jej obklopují další odvodňovací rýhy.

### Schachtenfilz- revitalizované vrchoviště

Revitalizované vrchoviště se nachází v oblasti Modravských slatí. Leží v nadmořské výšce 1140 m n.m a jeho rozloha činí 1,2 ha (49°1'42 N, 13°24'20 E). Revitalizační opatření byla provedena v roce 2008 přehrazením odvodňovacích rýh. Rašeliniště je pokryto především porosty suchopýrku trsnatého (*Trichophorum caespitosum*) v centrálních částech a keříčkovitou vegetací s dominantní vlochyní bahenní (*Vaccinium uliginosum*) na okrajích a podél původních odvodňovacích kanálů. Vegetace vrchovištních šlenků zcela chybí. Podél zaplavených kanálů dochází k šíření suchopýru pochvatého (*Eriophorum vaginatum*), rašeliníků a naopak zde ustupují keříčky a došlo k odumření jednotlivých stromů smrku.

## **3.3.2 Odběr vzorků**

Na každé lokalitě bude odebrána vrstva rašeliny z hloubky 10–30 cm, která reprezentuje vrstvu s významnou mikrobiální rozmanitostí a aktivitou. Vzorky budou na

každé lokalitě odebírány v náhodném rozmístění, avšak v dostatečné vzdálenosti od odvodňovacích rýh (>10 m) tak, aby byla zachycena heterogenita stanoviště. Z každé lokality bude odebráno 8 vzorků, takže se celkem získá 32 půdních vzorků.

Odběr vzorků bude proveden pomocí finského půdního odběráku (Finnish box corer) pomocí něhož získáme neporušený půdní vzorek z potřebné hloubky s průřezem 6x5 cm. Ihned po odběru budou všechny neporušené půdní vzorky obaleny potravinovou fólií, uzavřeny do plastových sáčků, řádně označeny a transportovány v chladícím boxu na ledu do laboratoře.

Po odebrání těchto půdních vzorků budou zároveň z každé lokality odebrány vzorky pro zjištění objemové hmotnosti rašeliny ( $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Tento krok bude zajištěn pomocí Kopeckého (fyzikálních) válečků o jeho známém objemu (obvykle  $100\text{ cm}^3$ ) a hmotnosti. Ve středové hloubce horizontu půdního profilu (asi 20 cm) bude válečkem odebrán neporušený půdní vzorek v osmi opakováních na každé lokalitě. Závěrem se válečky uzavřou víčky, označí a uloží do plastového pytle. Zpracování vzorků bude započato hned druhý den po dokončení odběru..

Zároveň bude zaznamenáno druhové složení vegetace v místě odběru na ploše  $1\text{ m}^2$ . Bude stanovena procentuální pokryvnost jednotlivých druhů cévnatých rostlin a procentuální pokryvnost mechorostů s rozdělením na rašeliníky a ostatní mechy. Každá plocha bude zdokumentována fotografií. Navrhované lokality jsou součástí dlouhodobých výzkumů (plochy jsou zahrnuty do *Programu revitalizace šumavských mokřadů a rašeliníšť*) a jsou tak vybaveny sondami pro měření výšky podzemní hladiny vody a datalogery pro zaznamenávání meteorologických charakteristik.

### **3.3.3 Homogenizace a uchování vzorků**

Pro analýzu DNA budou vzorky v laboratoři odebírány z neporušeného půdního kóru. Ten bude sterilním nožem podélně rozříznut a z vnitřní nově rozříznuté strany budou lžičkou odebrány cca 2 g půdy po celé délce profilu. Odebrané vzorky budou v eppendorfových zkumavkách okamžitě po odběru zamrazeny v  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  do doby zahájení analýz. Následně bude zbylá část neporušeného vzorku homogenizována ručním promísením a vzorky budou dále skladovány při  $4\text{ }^\circ\text{C}$  do dalších analýz.

### 3.3.4 Izolace DNA

Pro izolaci mikrobiální DNA z půdních vzorků bude použit extraktor Power soil DNA Isolation kit (Mo Bio Laboratories, Inc., USA). Podrobnější postup izolace podléhá samotnému návodu a pokynům výrobce extraktoru s několika následujícími úpravami. K lepšímu narušení gram-pozitivních buněčných stěn bude použit Mini bead-beater (BioSpec Products, Inc., USA) o rychlosti  $6 \text{ m.s}^{-1}$  po dobu 45 vteřin. Kvalita extrahované DNA bude ověřena elektroforézou (1% w/v, 8V/cm po dobu 45 minut) a kvantifikována pomocí technologie SybrGreen. Po dokončení bude každé vyextrahované DNA uloženo do 1,5 ml eppendorfové zkumavky a zmrazeno při teplotě  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.5 Sekvence DNA

Na základě sekvenace získané DNA bude zjištěno relativní zastoupení bakteriálních a archaeálních skupin. Sekvenační analýzu bude prostřednictvím odborné služby zajišťovat profesionální sekvenační laboratoř SEQme. Jelikož tento krok bude zajištěn pomocí servisní služby, není předmětem přesnějšího popisu při navrhování této studie. Následné bioinformatické zpracování dat získaných sekvenací bude také provedeno formou externí služby.

### 3.3.6 Doplnující laboratorní analýzy

V rámci této studie jsou navržena další laboratorní měření, kterými budou zjištěny hodnoty některých biogeochemických parametrů rašeliny, které významně ovlivňují složení a aktivitu mikrobiálního společenstva, anebo jsou přímo odrazem mikrobiální aktivity. Zároveň mohou sloužit jako indikátory úspěšnosti revitalizace. Všechny tyto analýzy budou provedeny v laboratorních podmínkách na KBE, PřF JU.

Ze vzorků odebraných do fyzikálních válečků bude stanovena objemová hmotnost rašeliny ( $\text{g.dm}^{-3}$ ). Válečky se vysuší při teplotě  $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$  do konstantní hmotnosti po dobu 48 hodin, vychladí se, zváží a dopočte se objemová hmotnost rašeliny. Z části neporušených půdních vzorků bude stanoven stupeň humifikace podle

von-Post indexu. Objemová hmotnost rašeliny poukazuje na míru rozloženosti rašeliny, podobně jako von-Post index.

Pro každý vzorek bude stanoveno aktivní pH půdy, jenž má bezprostřední fyziologický význam, jelikož, včetně samotného složení mikrobiálního společenstva, ovlivňuje i aktivitu mikroorganismů, biogeochemické procesy probíhající v půdě a procesy příjmu živin organismy. Do lahvíček o objemu cca 50 ml bude přesně odváženo 5 g homogenizovaného půdního vzorku a bude přidáno 25 ml destilované vody. Půdní suspenze se v uzavřené nádobě krátce intenzivně protřepe a nechá dvě hodiny odstát. Hodnota pH se změří pomocí pH-metru (pH 315i, WTW, Německo).

Za účelem zjištění mikrobiální aktivity bude změřena v laboratorních podmínkách aerobní i anaerobní potenciální produkce CO<sub>2</sub> jako ukazatel aerobní a anaerobní mikrobiální respirace a produkce CH<sub>4</sub> jako ukazatel aktivity metanogenních společenstev či ukazatel dostupnosti a kvality substrátu. Pro stanovení aerobní respirace bude do uzavíratelné skleněné lahve (*sérovky*) umístěno 10 g homogenizované rašeliny, lahvička bude uzavřena vzduchotěsnou gumovou zátkou. Plyný objem (*headspace*) této zkumavky bude tvořen vzduchem pro dodržení aerobních podmínek. Pro stanovení anaerobní respirace bude podobně do skleněné lahve umístěno 10 g homogenizované rašeliny, sérovka bude uzavřena vzduchotěsnou zátkou. Atmosféra v sérovkách bude profouknuta plynem N<sub>2</sub> pro vytvoření anaerobních podmínek. Vzorky budou inkubovány po dobu 30 dní při teplotě 10 °C, přičemž během inkubace bude každý týden zaznamenána koncentrace plynů CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> v headspace sérovky. Koncentrace bude měřena pomocí plynového chromatografu (Agilent, 6850 a 6890, USA).

Pro stanovení celkového obsahu základních živin C, N a P a jejich poměrů v rašelině budou použity vysušené a namleté vzorky. Celkový obsah C a N bude stanoven pomocí Micro-cube Elementar, Německo. Celkový fosfor bude stanoven pomocí mineralizační metody kyselinou chloristou (Kopáček et al., 1995).

### **3.3.7 Činnosti v rámci projektu a časový plán projektu**

Navrhovaný projekt bude probíhat od března prvního roku do února druhého roku. V rámci přípravné fáze projektu probíhající v měsících březen–květen budou



zajištěny materiální potřeby projektu (viz Finanční náklady) a nemateriální potřeby (získání povolení o vstupu do chráněného území, dohoda o zapůjčení automobilu pro pohyb v terénu a zajištění specialistů (pro terénní práce - botanik pro determinaci složení vegetace, dva odborní specialisté v oboru včetně jedné osoby způsobilé řízení automobilu a pro laboratorní pokusy budou zajištěni dva laboratorní specialisté). Vzorkování půdy (viz Odběr vzorků) proběhne ve dvou dnech v polovině června. Následující den po odběrech půdních vzorků se v laboratoři zhomogenizují vzorky (viz Homogenizace a uchování vzorků) a začne se s přípravou vzorků pro izolaci a následné laboratorní měření. Po úspěšné izolaci bude extrahovaná DNA zaslána na suchém ledu do sekvenační laboratoře, kde bude zajištěno její podrobné zpracování. Poté bude následovat bioinformatické zpracování získaných dat bioinformatikem. Laboratorní měření (viz Doplnující laboratorní analýzy) bude probíhat v měsících červenec–srpen.

Zpracování a vyhodnocování výsledků proběhne v měsících říjen–listopad. Následně bude autorem projektu vypracována závěrečná zpráva (prosinec–leden). Výsledky budou v únoru následujícího roku odprezentovány na katedrovém semináři KBE.

**Tab. č. 1:** Časový harmonogram projektu

	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	I	II
příprava projektu												
odběr vzorků												
izolace DNA												
sekvenace DNA												
laboratorní analýzy												
zpracování výsledků												
závěrečná zpráva												
prezentace výsledků												

### 3.3.8 Finanční náklady

Celkové náklady projektu činí 248 tis. Kč. Pro účely projektu bude pořizován drobný dlouhodobý hmotný majetek zahrnující půdní odběrák a fotoaparát. Další potřebný dlouhodobý majetek (plynový chromatograf aj.) bude pro účel projektu zprostředkován pomocí zapůjčení na pracovišti KBE, PřF JU. Pro účely projektu nebude pořizován žádný drobný dlouhodobý nehmotný majetek. Položka materiál obsahuje izolační kit, chladič box na vzorky, sáčky a folie na uchovávání vzorků včetně popisovačů, skleněné sérovky na měření respirace, sterilní nože, fyzikální válečky a drobné laboratorní náčiní jako je laboratorní sklo a ostatní pomůcky (kádinky, lžičky, váženky...) včetně eppendorfových zkumavek a špiček a potřebných chemikálií a plynů. Doplňkové (režijní) náklady činí 15 % z celkových nákladů projektu. Položka služby zahrnuje náklady na sekvenaci (400 Kč/vzorek), včetně transportu vzorků do laboratoře na suchém ledu, stanovení celkového obsahu živin C, N (150 Kč/vzorek) a P (100 Kč/vzorek) včetně externí analýzy dat bioinformatikem. Cestovní náklady zahrnují finance potřebné na pohonné hmoty automobilu a diety trojčlenného týmu v rámci dvoudenního odběru. V položce mzdy jsou zahrnuty mzdy pro laboratorní specialisty, kteří budou zajišťovat zpracování půdních vzorků. Počítáno je s 50% úvazkem a poloviční jednorázovou odměnou za 14-ti denní izolaci DNA (položka OON). Jednorázovou odměnou (též OON) bude taktéž ohodnocena terénní práce trojčlenného týmu. Odměna autora projektu za zpracování závěrečné zprávy a odprezentování výsledků je taktéž zahrnuta v kolonce OON. Povinné zákonné odvody činí 34% z hrubých mezd, do nichž není zahrnuta jednorázová odměna OON pod 10 000 Kč/měsíc.

**Tab. č. 2:** Celkové náklady projektu

	Požadováno (v Kč)
Věcné náklady	
Drobný dlouhodobý hmotný majetek (předměty, přístroje a zařízení do 40 tis. Kč)	10 000
Drobný dlouhodobý nehmotný majetek (např. software do 60 tis. Kč)	0
Materiál	12 000

Doplňkové (režijní) náklady	32 500
Cestovní náklady	3 500
Mzdové náklady	
Mzdy	75 000
Služby	53 000
Ostatní osobní náklady - OON	
Dohoda o provedení práce odběrů vzorků trojčlenného týmu	6 000
Izolace DNA dvojčlenného týmu	15 000
Zpracování zprávy a odprezentování výsledků	15 000
Jiné	
Povinné zákonné odvody	25 500
<b>Celkové náklady projektu</b>	<b>248 000</b>

### 3.4 Očekávané výstupy projektu

Projekt navrhuje studium složení mikrobiálního společenstva na revitalizovaných a odvodněných slatiništích a vrchovištích jakožto vhodného nástroje k vyhodnocení degradace či úspěšnosti revitalizace. Data z kontrolních nenarušených rašelinišť budou získána z předchozích studií, které již na šumavských lokalitách proběhly (Urbanová & Bárta, 2014). Na odvodněných rašeliništích obojího typu je v porovnání s přirozenými plochami přepokládán pokles metanogenních skupin a naopak vzestup acidobakterií. Data získaná ze sekvenace mohou dále sloužit k vyhodnocení degradace těchto odvodněných ploch. Vzhledem k nedostatku studií o vlivu odvodnění a revitalizace na složení mikrobiálního společenstva v rašeliništích budou tyto poznatky přínosné pro rozšíření znalostí v tomto oboru. Předpokládá se, že na revitalizovaných studovaných plochách bude docházet k obnově jeho původního mikrobiálního složení, a pokud se revitalizovanému rašeliništi navrátí tato přirozená skladba, můžeme říci, že revitalizace byla úspěšná.

V souvislosti s navrhovanými pracemi laboratorních analýz budou zjištěny základní charakteristiky rašeliny, které jsou nedílnou součástí pro stanovení aktivity

mikrobního společenstva a podmínek prostředí. Tyto analýzy slouží k determinaci vztahů mezi složením mikrobního společenstva a s důležitými environmentálními faktory prostředí (např. pH, objemová hmotnost,...).

Projekt přispívá k rozšíření znalostí o vlivu odvodnění a revitalizace na ekosystém rašelinišť se zaměřením na změny v mikrobiálním společenstvu. Získané výsledky mohou být použity jako podklad pro další studie a přispět k navržení vhodného monitoringu rašelinišť po revitalizaci.

## Literatura

**Andersen R., Chapman S.J. & Artz R.R.E. (2013).** Microbial communities in natural and disturbed peatlands: A review. *Soil Biology and Biochemistry* **57**, 979–994

**Andrejko M.J., Cohen A.D. & Raymond R.J. (1983).** Origin of mineral matter in peat. In: Raymond R.J. & Andrejko M.J. (Eds). *Mineral matter in peat, its occurrence, form and distribution*. 1. vydání. Los Alamos. Los Alamos National Laboratory, 3–24

**Ausec L., Elsas van J.D. & Mandic-Mulec I. (2011).** Two- and three-domain bacterial laccase-like genes are present in drained peat soils. *Soil Biology and Biochemistry* **43**, 975–983

**Bharathi P.A.L. (2008).** Sulfur cycle. In: Jorgensen S.E. & Faith B. (Eds). *Encyclopedia of ecology*. 1. vydání. Elsevier. Oxford, 3424–3431

**Blodau C. & Siems M. (2012).** Drainage-induced forest growth alters belowground carbon biogeochemistry in the Mer Bleue bog, Canada. *Biogeochemistry* **107**, 107–123

**Bragina A., Berg C., Müller H., Moser D. & Berg G. (2013).** Insights into functional bacterial diversity and its effects on Alpine bog ecosystem functioning. *Scientific Reports* **3**, doi:10.1038/srep01955

**Bräuer S.L., Yavitt J.B. & Zinder S.H. (2004).** Methanogenesis in McLean bog, an acidic peat bog in upstate New York: stimulation by H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> in the presence of rifampicin, or by low concentrations of acetate. *Geomicrobiology Journal* **21**, 433–443

**Brown M.E. & Chang M.C.Y. (2014).** Exploring bacterial lignin degradation. *Current Opinion in Chemical Biology* **19**, 1–7

**Cadillo-Quiroz H., Bräuer S., Yashiro E., Sun C., Yavitt J. & Zinder S. (2006).** Vertical profiles of methanogenesis and methanogens in two contrasting acidic peatlands in central New York State, USA. *Environmental Microbiology* **8**, 1428–1440

**Cicerone R.J. & Oremland R.S. (1988).** Biogeochemical aspects of atmospheric methane. *Global Biogeochemical Cycles* **2**, 299–327

- Dedysh S.N., Dunfield P.F., Derakshani M., Stubner S., Heyer J., et al. (2003).** Differential detection of type II methanotrophic bacteria in acidic peatlands using newly developed 16S rRNA-targeted fluorescence oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology* **43**, 299–308
- Dedysh S.N., Panikov N.S. & Tiedje J.M. (1998).** Acidophilic methanotrophic communities from sphagnum peat bogs. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(3), 922–929
- Dedysh S.N., Pankratov T.A., Belova S.E., Kulichevskaya I.S. & Liesack W. (2006).** Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria community composition in an acidic sphagnum peat bog. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(3), 2110–2117
- Dobrovol'skaya T.G., Golovchenko A.V., Kukhareno O.S., Yakushev A.V., Semenova T.A., et al. (2012).** The structure of the microbial communities in low-moor and high-moor peat bogs of Tomsk Oblast. *Eurasian Soil Science* **45**, 273–281
- Drake H., Küsel K. & Matthies C. (2006).** Acetogenic prokaryotes. In: Dworkin M., Falkov S., Rosenberg E., Schleifer K-H. & Stackebrandt E. (Eds). *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry*. 3. vydání. Springer. Singapore, 354–420
- Drake H.L. (1994).** Acetogenesis, acetogenic bacteria and the acetyl-CoA “Wood/Ljungdahl” pathway: past and current perspectives. In: Drake H.L. (Ed). *Acetogenesis*. 1. vydání. Chapman & Hall. New York, 3–60
- Fierer N. & Jackson R.B. (2006).** The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 626–631
- Francis G.A., Beman J.M. & Kuypers M.M.M. (2007).** New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *The ISME Journal* **1**, 19–27
- Galand P.E., Fritze H., Conrad R. & Yrjölä K. (2005).** Pathways for methanogenesis and diversity of methanogenic archaea in three boreal peatland ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 2195–2198

- Garcia J-L., Patel B.K.C. & Ollivier B. (2000).** Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic archaea. *Anaerobe* **6**, 205–226
- Gilbert B. & Frenzel P. (1995).** Methanotrophic bacteria in the rhizosphere of rice microcosms and their effect on porewater methane concentration and methane emission. *Biology and Fertility of Soils* **20**, 93–100
- Gorham E. & Janssens J.A. (1992).** Concepts of fen and bog re-examined in relation to bryophyte cover and the acidity of surface waters. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **61**, 7–20
- Gorham E. (1991).** Northern peatlands: role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. *Ecological Applications* **1**, 182–195
- Gupta V., Smemo K.A., Yavitt J.B. & Basiliko N. (2012).** Active methanotrophs in two contrasting North American peatland ecosystems revealed using DNA-SIP. *Microbial Ecology* **63**, 438–445
- Hamberger A., Horn M.A., Dumont M.G., Murrell J.C. & Drake H.L. (2008).** Anaerobic consumers of monosaccharides in a moderately acidic fen. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 3112–3120
- Hanson R.S. & Hanson T.E. (1996).** Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews* **60**, 439–471
- Hartman W.H., Richardson C.J., Vilgalys R. & Bruland G.L. (2008).** Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 17842–17847
- Herrmann M., Hädrich A. & Küsel K. (2012).** Predominance of thaumarchaeal ammonia oxidizer abundance and transcriptional activity in an acidic fen. *Environmental Microbiology* **14**, 3013–3025
- Høj L., Olsen R.A. & Torsvik V.L. (2008).** Effects of temperature on the diversity and community structure of known methanogenic groups and other archaea in high arctic peat. *The ISME Journal* **2**, 37–48

- Jaatinen K., Fritze H., Laine J. & Laiho R. (2007).** Effects of short- and long-term water-level drawdown on the populations and activity of aerobic decomposers in a boreal peatland. *Global Change Biology* **13**, 491–510
- Jaatinen K., Laiho R., Vuorenmaa A., Castillo del U., Minkkinen K., et al. (2008).** Responses of aerobic microbial communities and soil respiration to water-level drawdown in a northern boreal fen. *Environmental Microbiology* **10**, 339–353
- Jaatinen K., Tuittila E.-S., Laine J., Yrjälä K. & Fritze H. (2005).** Methane-oxidizing bacteria in a Finnish raised mire complex: effects of site fertility and drainage. *Microbial Ecology* **50**, 429–439
- Juottonen H., Galand P.E. & Yrjälä K. (2006).** Detection of methanogenic Archaea in peat: comparison of PCR primers targeting the *mcrA* gene. *Research in Microbiology* **157**, 914–921
- Juottonen H., Galand P.E., Tuittila E.S., Laine J., Fritze H., et al. (2005).** Methanogen communities and Bacteria along an ecohydrological gradient in a northern raised bog complex. *Environmental Microbiology* **7(10)**, 1547–1557
- Juottonen H., Hynninen A., Nieminen M. & Tuomivirta T.T. (2012).** Methane-cycling Microbial communities and methane emission in natural and restored peatlands. *Applied and Environmental Microbiology* **78(17)**, 6386–6389
- 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
- Keller J. K. & Bridgham S.D. (2007).** Pathways of anaerobic carbon cycling across an ombrotrophic-minerotrophic peatland gradient. *Limnology and Oceanography* **52**, 96–107
- Khalil M.A.K. & Rasmussen R.A. (1983).** Sources, sinks and seasonal cycles of atmospheric methane. *Journal of Geophysical Research* **88**, 5131–5151
- Kim S.Y., Lee S.H., Freeman C., Fenner N. & Kang H. (2008).** Comparative analysis of soil microbial communities and their responses to the short-term drought in bog, fen, and riparian wetlands. *Soil Biology and Biochemistry* **40**, 2874–2880



- Kopáček J., Hejzlar J. & Pechar L. (1995).** Mineralizační postupy pro stanovení celkového fosforu. *Sborník semináře Analytika vody, Česká vědeckotechnická vodohospodářská společnost*, 21–27
- Kotiaho M., Fritze H., Merilä P., Juottonen H., Leppälä M. et al. (2010).** Methanogen activity in relation to water table level in two boreal fens. *Biology and Fertility of Soils* **46**, 567–575
- Kotiaho M., Fritze H., Merilä P., Tuomivirta T., Väiliranta M. et al. (2013).** Actinobacteria community structure in the peat profile of boreal bogs follows a variation in the microtopographical gradient similar to vegetation. *Plant and Soil* **369**, 103–114
- Kotsyurbenko O.R., Glagolev M.V., Nozhevnikova A.N. & Conrad R. (2001).** Competition between homoacetogenic bacteria and methanogenic archaea for hydrogen at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology* **38**, 153–159
- Kowalchuk G.A. & Stephen J.R. (2001).** Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology* **55**, 485–529
- Kraigher B., Stres B., Hacin J., Ausec L., Mahne I., et al. (2006).** Microbial activity and community structure in two drained fen soils in the Ljubljana Marsh. *Soil Biology and Biochemistry* **38**, 2762–2771
- 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
- Lin X., Green S., Tfaily M.M., Prakash O., Konstantinidis K.T., et al. (2012).** Microbial community structure and activity linked to contrasting biogeochemical gradients in bog and fen environments of the Glacial Lake Agassiz Peatland. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 7023–7031
- Lin X., Tfaily M.M., Green S.J., Steinweg J.M., Chanton P., et al. (2014).** Microbial metabolic potential for carbon degradation and nutrient (nitrogen and phosphorus) acquisition in an ombrotrophic peatland. *Applied and Environmental Microbiology* **80**, 3531–3540

- Liou J.S-C. & Madsen E.L. (2008).** Microbial ecological processes: aerobic/anaerobic. In: Jorgensen S.E. & Faith B. (Eds). *Encyclopedia of ecology*. 1. vydání. Elsevier. Oxford, 2348–2357
- Mandic-Mulec I., Ausec L., Danevčič T., Levičnik-Höfferle Š., Jerman V. et al. (2014).** Microbial community structure and function in peat soil. *Food Technology and Biotechnology* **52(2)**, 180–187
- Master E.R. & Mohn W.W. (1998).** Psychrotolerant Bacteria isolated from arctic soil that degrade polychlorinated biphenyls at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* **64(12)**, 4823–4829
- Metje M. & Frenzel P. (2005).** Effect of temperature on anaerobic ethanol oxidation and methanogenesis in acidic peat from a northern wetland. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 8191–8200
- Mitsch W.J. & Gosselink, J.G. (2000).** *Wetlands*. 3. vydání. Wiley. New York, 920p
- Morales S.E., Mouser P.J., Ward N., Hudman S.P., Gotelli N.J., et al. (2006).** Comparison of bacterial communities in New England Sphagnum bogs using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). *Microbial ecology* **52**, 34–44
- Muyzer G. & Stams A.J.M. (2008).** The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 441–454
- Nurulita Y., Adetutu E.M., Gunawan H., Zul D. & Ball A.S. (2016).** Restoration of tropical peat soils: The application of soil microbiology for monitoring the success of the restoration process. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **216**, 293–303
- Pankratov T.A., Ivanova A.O., Dedysh S.N. & Liesack W. (2011a).** Bacterial populations and environmental factors controlling cellulose degradation in an acidic Sphagnum peat. *Environmental Microbiology* **13**, 1800–1814
- Pankratov T.A., Kirsanova L.A., Kaparullina E.N., Kevbrin V.V. & Dedysh S.N. (2011b).** *Telmatobacter bradus* gen. nov., sp. nov., a cellulolytic facultative anaerobe from subdivision 1 of the Acidobacteria and emended description of *Acidobacterium capsulatum* Kishimoto et al. 1991. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **62**, 430–437

- Pankratov T.A., Serkebaeva Y.M., Kulichevskaya I.S., Liesack W. & Dedysh S.N. (2008).** Substrate-induced growth and isolation of *Acidobacteria* from acidic *Sphagnum* peat. *The ISME Journal* **2**, 551–560
- Paul E.A. & Clark F.E. (1996).** *Soil Microbiology and Biochemistry*. 2. vydání. Academic Press. United States of America, 340p
- Paul E.A. (2007).** *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. 3. vydání. Academic Press. Oxford, 514p
- Pester M., Knorr K-H., Friedrich M.W., Wagner M. & Loy A. (2012).** Sulfate-reducing microorganisms in wetlands - fameless actors in carbon cycling and climate change. *Frontiers in Microbiology* **3**, doi: 10.3389/fmicb.2012.00072
- Pietikäinen J., Pettersson M. & Bååth E. (2005).** Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiology Ecology* **52**, 49–58
- Puglisi E., Zaccone C., Cappa F., Cocconcelli P.S., Shotyk W., et al. (2014).** Changes in bacterial and archaeal community assemblages along an ombrotrophic peat bog profile. *Biology and Fertility of Soils* **50**, 815–826
- Reddy K.R. & DeLaune R.D. (2008).** *Biogeochemistry of Wetlands: Science and Applications*. 1. vydání. CRC Press. United States of America, 800p
- Rooney-Varga J.N., Gievat M.W., Duddleston K.N., Chanton J.P. & Hines M. E. (2007).** Links between archaeal community structure, vegetation type and methanogenic pathway in Alaskan peatlands. *FEMS Microbiology Ecology* **60**, 240–251
- Rydin H. & Jeglum J.K. (2006).** *The Biology of Peatlands*. 1. vydání. Oxford University Press. Oxford, 343p
- Serkebaeva Y.M., Yongkyu K., Liesack W. & Dedysh S.N. (2013).** Pyrosequencing-based assessment of the Bacteria diversity in surface and subsurface peat layers of a northern wetland, with focus on poorly studied phyla and candidate divisions. *PLoS ONE* **8(5)**, e63994

- Schulz S. & Conrad R. (1996).** Influence of temperature on pathways to methane production in the permanently cold profundal sediment of Lake Constance. *FEMS Microbiology Ecology* **20**, 1–14
- Smemo K.A. & Yavitt J.B. (2011).** Anaerobic oxidation of methane: an under appreciated aspect of methane cycling in peatland ecosystems? *Biogeosciences* **8**, 779–793
- Ström L., Ekberg A., Mastepanov M. & Christensen T.R. (2003).** The effect of vascular plants on carbon turnover and methane emissions from a tundra wetland. *Global Change Biology* **9**, 1185–1192
- Sun H., Terhonen E., Koskinen K., Paulin L., Kesanen R., et al. (2014).** Bacterial diversity and community structure along different peat soils in boreal forest. *Applied Soil Ecology* **74**, 37–45
- Sundh I., Nilsson M., Granberg G. & Svensson B.H. (1994).** Depth distribution of microbial production and oxidation of methane in northern boreal peatlands. *Microbial Ecology* **27**, 253–265
- Thormann M. (2006).** Diversity and function of fungi in peatlands: A carbon cycling perspective. *Canadian Journal of Soil Science* **86**, 281–293
- Thormann M.N., Bayley S.E. & Currah R.S. (2003).** Succession of microfungi assemblages in decomposing peatland plants. *Plant and Soil* **250**, 323–333
- Thormann M.N., Currah R.S. & Bayley S.E. (2001).** Microfungi isolated from *Sphagnum fuscum* from a southern boreal bog in Alberta, Canada. *Bryologist* **104**, 548–559
- Thormann M.N., Currah R.S. & Bayley S.E. (2002).** The relative ability of fungi from *Sphagnum fuscum* to decompose selected carbon substrates. *Canadian Journal of Microbiology* **48**, 204–211
- Turunen J., Tomppo E., Tolonen K. & Reinikainen A. (2002).** Estimating carbon accumulation rates of undrained mires in Finland - application to boreal and subarctic regions. *Holocene* **12**, 69–80

- Tveit A., Schwacke R., Svenning M.M. & Urich T. (2013).** Organic carbon transformations in high-Arctic peat soils: key functions and microorganisms. *The ISME Journal* **7**, 299–311
- Urbanová Z. & Bárta J. (2014).** Microbial community composition and in silico predicted metabolic potential reflect biogeochemical gradients between distinct peatland types. *FEMS Microbiology Ecology* **90**, 633–646
- Urbanová Z. & Bárta J. (2016).** Effects of long-term drainage on microbial community composition vary between peatland types. *Soil Biology and Biochemistry* **92**, 16–26
- Vecherskaya M., Dijkema C., Saad H.R. & Stams A.J.M. (2009).** Microaerobic and anaerobic metabolism of a *Methylocystis parvus* strain isolated from a denitrifying bioreactor. *Environmental Microbiology Reports* **1**, 442–449
- Vitt D.H. (2008).** Peatlands. In: Jorgensen S.E., Faith B. (Eds). *Encyclopedia of ecology*. Elsevier. Oxford, 2656–2664
- Wang L. & D’Odorico P. (2013).** Decomposition and mineralization. In: Jorgensen S.E. & Faith B. (Eds). *Encyclopedia of ecology*. 1. vydání. Elsevier. Oxford, 838–844
- Ward B.B. (2008).** Nitrification. In: Jorgensen S.E. & Faith B. (Eds). *Encyclopedia of ecology*. 1. vydání. Elsevier. Oxford, 2511–2518
- Ward N.L., Challacombe J.F., Janssen P.H., Henrissat B., Coutinho P.M., et al. (2009).** Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 2046–2056
- Wieder R.K. & Vitt D.H. (2006).** *Boreal Peatland Ecosystems*. 1. vydání. Springer. Berlin, 436p
- Winsborough C. & Basiliko N. (2010).** Fungal and bacterial activity in Northern peatlands. *Geomicrobiology Journal* **27**, 315–320
- Zinder S.H. (1993).** Physiological ecology of methanogens. In: Ferry J.G. (Ed.). *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*. 1. vydání. Chapman & Hall. New York, 128–206