

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

2016

Bc. Olga Lísalová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Vliv odvodnění a vegetace na množství a diverzitu metanogenů
v rašeliníštích**

Diplomová práce

Bc. Olga Lísalová

Školitel: Ing. Jiří Bárta, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Petra Straková, D.Sc.

České Budějovice 2016

Lísalová O. (2016): Vliv odvodnění a vegetace na množství a diverzitu metanogenů v rašeliništích. [Effect of drainage and vegetation on quantity and diversity of methanogens in peatlands. Mgr. Thesis, in Czech.] – 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Tato práce se zabývá charakteristikou mikrobiálního společenstva a to především metanogenních Archaeí v přirozených a odvodněných rašeliništích. Metanogenní Archaea jsou striktně anaerobní mikroorganismy žijící v hlubších anoxických vrstvách rašeliniště. Tudiž, cílem této práce bylo zjistit, jak odvodnění ovlivňuje množství a diverzitu metanogenních Archaeí v závislosti na různých hloubkách, typech rašeliniště a typu opadu.

Annotation:

This work deals with attribute of microbial communities, especially methanogenic Archaea in pristine and drained peatlands. Methanogens are strictly anaerobic microorganism thus they live in deeper anoxic layers of peatlands. Therefore, the aim of this study was to determine how the drainage affects the amount and diversity of methanogens depending on different depths, types of peatlands and litter type.

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, 14. 12. 2016

.....

Olga Lísalová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Ing. Jiřímu Bártovi, Ph.D. za cenné rady a veškerou pomoc během laboratorních experimentů a psaní diplomové práce. Velké poděkování také patří Mgr. Haně Petráskové za trpělivost a ochotu vždy poradit a podat pomocnou ruku při práci v laboratoři a Mgr. Petře Strakové, D.Sc. za poskytnuté vzorky a pomoc při dokončování práce. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu při studiu.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	2
2.1.	Metanogenní Archaea	2
2.2	Syntrofie a metanogenní společenstva	3
2.3	Produkce metanu a jeho vliv na životní prostředí	4
2.3.1	Rozdělení metanogenních Archaeí podle tvorby metanu.....	5
2.4	Rašeliniště	7
2.4.1	Metanogenní společenstva a rašeliniště	7
2.4.2	Odvodňování rašelinišť	8
2.5	Vliv typu opadu na složení metanogenních společenstev	8
3	Cíle a hypotézy.....	10
4	Materiál a metody.....	11
4.1	Lokalita Lakkasuo	11
4.2	Vzorky rostlinného opadu	11
4.3	Izolace DNA.....	12
4.4	Kvantifikace celkového množství Archaeí a metanogenů	12
4.5	Gelová elektroforéza	13
4.6	Sekvence a vyhodnocení dat	14
5	Výsledky	15
5.1	Vliv hloubky na metanogenní společenstvo.....	15
5.2	Vliv odvodnění rašeliniště na metanogenní společenstvo.....	18
5.3	Vliv opadu na metanogenní společenstvo	23
5.4	Vliv hloubky a odvodnění na metanogenní společenstvo u kořenů <i>Pinus sylvestris</i>	24
5.5	Syntrofní bakterie v závislosti na hloubce	27
5.6	Syntrofní bakterie v závislosti na odvodnění rašeliniště	28
5.7	Vliv chemických parametrů půdy na abundanci metanogenních čeledí	29
6	Diskuze.....	30
6.1	Vliv hloubky na metanogenní společenstvo.....	30
6.2	Vliv odvodnění rašeliniště na metanogenní společenstvo.....	30
6.3	Vliv opadu na metanogenní společenstvo	31
6.4	Vliv hloubky a odvodnění na syntrofní bakterie	32
6.5	Vliv chemických parametrů půdy na abundanci metanogenních čeledí	32
7	Závěr	34
8	Seznam literatury.....	35

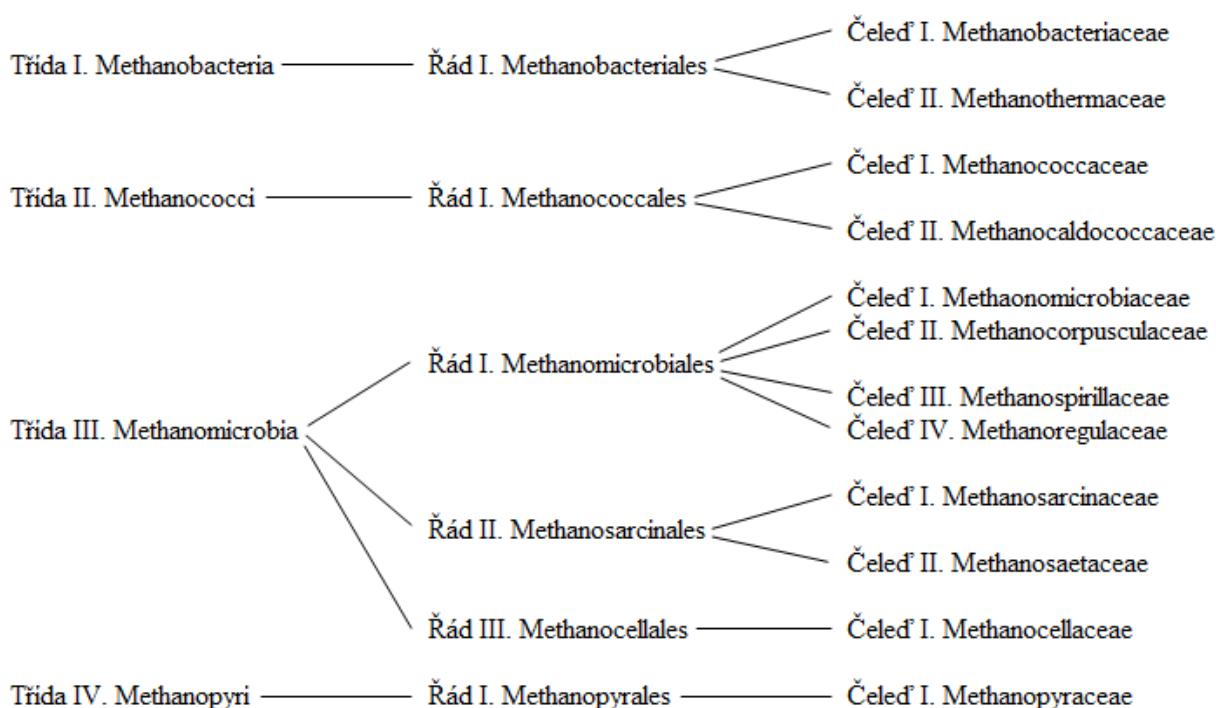
1 Úvod

Stále se po celém světě nacházejí rašeliniště, která byla v minulých stoletích odvodněná pro těžební a lesnické účely. Tímto rozvratem prostředí se snižuje vodní hladina rašelinišť, odrývá se tak dříve vodou nasycená půda a mění se anaerobní prostředí na aerobní. Kvůli větší koncentraci kyslíku v hlubších vrstvách, klesá množství metanogenů obývajících přirozeně anaerobní prostředí a spolu s nimi se snižuje i produkce metanu. Podle tvorby metanu jsou metanogeni rozděleni na hydrogenotrofní, acetoklastické a metylotrofní. Rozložení a diverzita metanogenních čeledí využívající různé dráhy metanogeneze závisí na hloubce a typu rašeliniště. Výrazný vliv má odvodnění také na vegetaci rašelinišť, která souvisí s kvalitou a množstvím organických substrátů dostupných pro metanogeny. Dále na teplotu, pH a změnu půdních chemických látek. Spolu s metanogeny má odvodnění také vliv na syntrofní bakterie, s kterými jsou většinou ve vzájemně prospěšné symbióze.

2 Literární přehled

2.1. Metanogenní Archaea

Metanogenní Archaea jsou striktně anaerobní mikroorganismy patřící do kmene Euryarchaeota, domény Archaea. Tato rozmanitá skupina Archaeí je na základě podobnosti 16S rRNA genů (Angel et al., 2012) rozdělena na čtyři třídy Methanobacteria, Methanococci, Methanomicrobia, Methanopyri (Whitman et al., 2014), které se dělí na šest řádů Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanocellales, Methanosarcinales a Methanopyrales (Obr. 1). Doposud bylo již popsáno dvanáct čeledí, desítky rodů a druhů (Angel et al., 2012).



Obr. 1: Taxonomická klasifikace metanogenních Archaeí (Upraveno podle Tabatabaei et al., 2010).

Metanogenní Archaea produkují velké množství metanu jako konečný produkt jejich energetického metabolismu. V procesu metanogeneze přeměňují substráty na plynný metan (CH_4) a získávají energii potřebnou pro jejich růst (Whitman et al., 2014). Mezi hlavní substráty této přeměny patří $\text{H}_2 + \text{CO}_2$, mravenčan a acetát. Mohou být využívány ale i další jednoduhlíkaté sloučeniny jako např.: metanol, dimethylamin, dimetylsulfát a některé jednoduché alkoholy jako jsou isopropanol, isobutanol a etanol (Conrad, 2007). Než se však tyto jednoduché sloučeniny dostanou k metanogenním Archaeím, musí projít poměrně

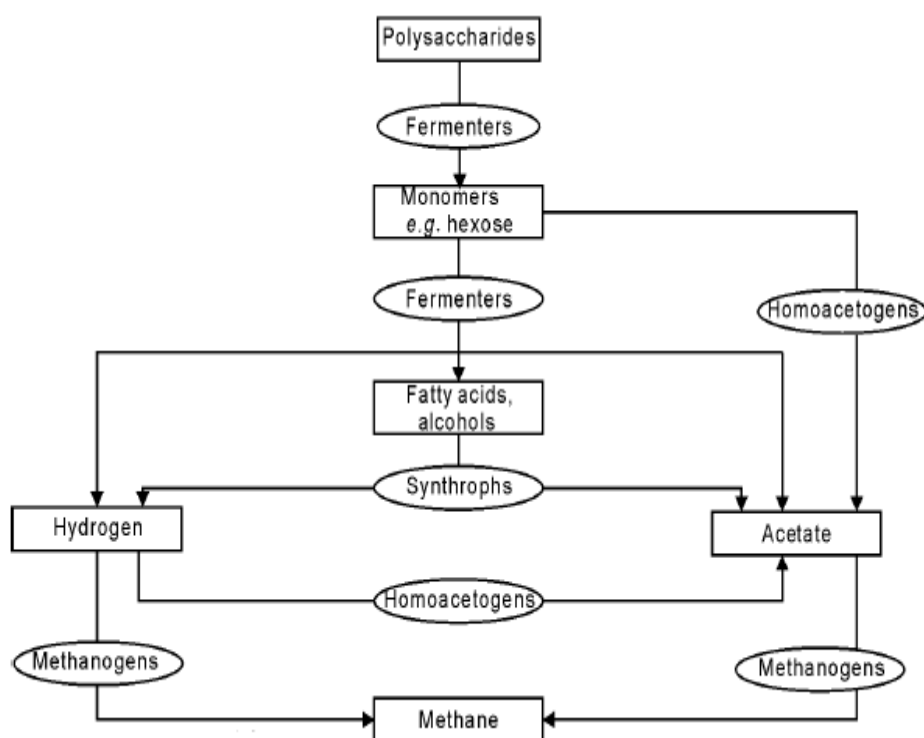
složitým metabolismem dalších mikroorganismů, které osidlují nejbližší okolí. Produkty aerobního metabolismu jsou v hlubších vrstvách půd přeměňovány dále metabolismem anaerobním. Anaerobní degradace organické hmoty (Obr. 2) zahrnuje několik kroků: hydrolýzu polymerů hydrolytickými mikroorganismy, tvorbu kyselin z jednoduchých organických sloučenin pomocí fermentačních bakterií, tvorbu acetátu z fermentačních metabolitů homoacetogenních bakterií (Dubey, 2005) a metanogenezi, která se dělí podle substrátů na tři dráhy. Hydrogenotrofní dráha, ve které je oxid uhličitý (CO_2) + vodík (H_2), případně mravenčan redukován pomocí C1-vazebných meziproductů na metan (Hedderich et al., 2006). Vodík je produktem anaerobní degradace organické hmoty fermentujícími a syntrofními bakteriemi, které jsou často nápomocné metanogenním Archaeím. Druhým typem je dráha acetoklastická, kde je acetát oxidován na oxid uhličitý, který je dále redukován na metan. (Conrad, 1999). Ve třetí metylotrofní dráze je nejprve redukována metylová skupina na metyl-koenzym M, který je v dalším kroku přeměněn na metan. Ačkoliv mají tyto tři dráhy rozdílný začátek, všechny končí stejným enzymatickým krokem katalyzovaným metyl-koenzym M reduktázou (MCR), klíčovým enzymem v metanogenezi (Borrel et al., 2011).

Bylo zjištěno, že se metanogeni vyskytují pouze v anaerobním prostředí s omezeným množstvím elektronových akceptorů dusičnanů, síranů a železitých kationtů (Kamal et al., 2008). Byli nalezeni v tundře, sladkovodních jezerech, mokřadech, rýžových polích, mořských sedimentech, ale i v gastrointestinálním traktu hospodářských zvířat (Singh et al., 2011). Metanogeni jsou převážně mezofilní, schopné fungovat v rozmezí teplot 20 – 40 °C. Také byli nalezeni v extrémních prostředích, jako jsou hydrotermální průduchy, kde prospívají při teplotách 100 °C (Dubey, 2005).

2.2 Syntrofie a metanogenní společenstva

Metanogenní Archaea v procesu metanogeneze dokáží přeměnit fermentační produkty $\text{H}_2 + \text{CO}_2$, mravenčan i acetát na metan (Whitman et al., 2014), ale delší řetězce těkavých mastných kyselin (butyrát, propionát), alkoholů a aromatických mastných kyselin (Schink et al., 2006) musí být nejprve metabolizovány specializovanou skupinou mikroorganismů nazývaných syntrofové (Whitman et al., 2014). Syntrofie je speciální typ symbiotické spolupráce mezi dvěma metabolicky odlišnými mikroorganismy, které však jsou na sobě metabolicky závislé (Schink et al., 2006). Syntrofie hraje klíčovou roli zejména v mikrobiální degradaci organické hmoty v anaerobním prostředí a přímo

ovlivňuje metanogenní společenstvo (Dolfing, 2014). Základem této syntrofní spolupráce je přenos elektronů a vodíku (Chojnacka et al., 2015), při kterém se za optimálních podmínek vytváří nepatrné množství volné energie rovnoměrně rozdělené mezi partnery (McInerney et al., 2008). Syntrofní bakterie (Obr. 2) působící během oxidace alkoholů, mastných kyselin a aromatických sloučenin se podle taxonomického systému na základě sekvenčních podobností 16 rRNA řadí pouze do dvou skupin: Grampozitivní bakterie s nízkým obsahem G + C a δ -Proteobakterie (Schink et al., 2006). Příkladem syntrofní spolupráce je degradace butyrátu syntrofní bakterií *Syntrophomonas wolfei* a metanogenní Archaei *Methanospirillum hungate*. *Methanospirillum hungate* udržuje velmi nízkou koncentraci vodíku a mravenčanu, což umožňuje energeticky příznivou degradaci butyrátu pomocí *Syntrophomonas wolfei* (Sieber et al., 2014).



Obr. 2: Anaerobní degradace organické hmoty zahrnující metanogenní Archaea a syntrofní bakterie (Lai, 2009).

2.3 Produkce metanu a jeho vliv na životní prostředí

Metan, jeden z důležitých stopových plynů v atmosféře, společně s oxidem uhličitým a oxidem dusnatým patří mezi hlavní plyny podílející se na skleníkovém efektu a klimatických změnách (Edwards et al., 1998). Celosvětově jsou emise metanu kolem 500 –

600 Tg ročně (Kirschke et al., 2013), z čehož přibližně 40% je z přírodních zdrojů, převážně rašelinišť. Dalšími zdroji metanu (60%) jsou rýžová pole, střevní fermentace hospodářských zvířat, skládky a spalování fosilních paliv (Abdalla et al., 2016). Hodnoty emisí metanu z přírodních a antropogenních zdrojů během let 2000 až 2009 jsou shrnuty v Tabulce I.

Metan je, jak již bylo řečeno, konečným produktem rozkladu půdní organické hmoty metanogenými Archaei (Bergman et al., 1999). Pouze asi jen jedna třetina vyprodukovaného metanu uniká do atmosféry. Zbylé dvě třetiny metanu jsou oxidovány metanotrofními bakteriemi v aerobních zónách půd a sedimentů (Thauer, 1998). Metan je uvolňován třemi různými mechanismy: difúzí po koncentračním spádu, kypěním (metan ve formě plyných bublinek) nebo přenosem přes kořeny cévnatých rostlin (Galland, 2004). Výsledné množství uvolněného metanu do atmosféry je tedy dáno jednak aktivitou metanogenních Archaeí a metanotrofních bakterií, ale i přítomností různé vegetace (Borrel et al., 2011). Mezi další faktory ovlivňující metanogenezi patří množství a kvalita dostupných substrátů, pH a teplota (Bergman et al., 1999).

Tab. I: Hodnoty atmosférického metanu z období 2000 - 2009 (Ciais et al., 2013).

Emise metanu 2000 - 2009 (Tg yr⁻¹)	
Přírodní zdroje celkem	347
Mokřady a rašeliniště	217
Ostatní zdroje (sladkovodní jezera, termity, oceány, hydráty metanu)	130
Antropogenní zdroje celkem	331
Zemědělství a skládky	200
Ostatní zdroje (fosilní paliva, spalování biomasy)	131
Součet zdrojů celkem	678

2.3.1 Rozdělení metanogenních Archaeí podle tvorby metanu

Přibližně dvě třetiny vyprodukovaného metanu pochází z acetoklastické dráhy metanogeneze, nicméně substráty H₂ + CO₂ jsou dalšími významnými prekurzory metanu (Horn et al., 2003). Bylo zjištěno, že i morfologie metanogenních Archaeí má zásadní vliv na

to, který substrát dokáží využít, příkladem může být čeleď Metanobacteriaceae, u které byly popsány pouze čtyři morfologicky odlišné rody, které však mají zásadní vliv na využívání substrátů (Garcia et al., 2000). Dlouhé nebo krátké tyčky rodu *Methanobacterium* mění $H_2 + CO_2$ nebo mravenčan + alkohol na metan, zatímco koky rodu *Methanospaera* mění pouze $H_2 +$ metanol. Oproti tomu např. tyčky čeledě Methanothermaceae využívají pro metanogenezi hydrogenotrofní dráhu (Whitman et al., 2006). Všichni zástupci z další čeledě Methanosarcinaceae produkují metan acetoklastickou drahou, ale jsou schopni používat i metylové sloučeniny: metanol, trimethylamin (Conrad, 2007), naopak mravenčan není využíván žádným druhem této čeledě (Whitman et al., 2014). To další čeleď Methanosaetaceae obsahuje pouze obligátní acetotrofy (Garcia et al., 2000). Například rod *Methanosaeta* má vysokou afinitu k acetátu, proto jsou tyto metanogenní Archaea schopni růst i při velmi nízké koncentraci acetátu na rozdíl od druhů *Methanosarcina*, kteří vyžadují koncentraci vyšší. Pokud je tedy koncentrace acetátu dostatečně vysoká, mohou růst mnohem rychleji než druhy *Methanosaeta* (Conrad, 2007). Metanogenní Archaea z čeledě Methanocellaceae (Sakai et al., 2014), Methanoregulaceae (Oren, 2014), Methanomicrobiaceae, Methanococcaceae a Methanospirillaceae používají stejné substráty, $H_2 + CO_2$ i mravenčan, avšak některé kmeny Methanospirillaceae jsou schopné navíc využít i 2-propanol nebo 2-butanol (Garcia et al., 2000). V Tabulce II jsou zobrazeny metanogenní čeledě a substráty, které nejčastěji využívají při metanogenezi.

Tab. II: Hlavní substráty metanogeneze.

Čeleď	Substráty	Dráha
Methanobacteriaceae	$H_2 + CO_2$, mravenčan, alkoholy	Hydrogenotrofní
Methanocellaceae	$H_2 + CO_2$, mravenčan	Hydrogenotrofní
Methanococcaceae	$H_2 + CO_2$, mravenčan	Hydrogenotrofní
Methanomicrobiaceae	$H_2 + CO_2$, mravenčan	Hydrogenotrofní
Methanosaetaceae	Acetát	Acetoklastická
Methanosarcinaceae	Acetát, metanol, trimethylamin	Acetoklastická, Metylotrofní
Methanospirillaceae	$H_2 + CO_2$, mravenčan, alkohol	Hydrogenotrofní
Methanoregulaceae	$H_2 + CO_2$ (mravenčan)	Hydrogenotrofní
Methanothermaceae	$H_2 + CO_2$	Hydrogenotrofní

2.4 Rašeliniště

Rašeliniště zaujímají značnou část zemského povrchu a jsou významnou celosvětovou zásobárnou uhlíku (Turunen et al., 2002). Definována jsou jako přechodná prostředí mezi suchozemským a vodním ekosystémem, který zajišťuje základní hydrologické, ekologické a biogeochemické funkce (Rezanezhad et al., 2016). Mezi hlavní funkce rašelinišť patří zadržování vody, biodiverzita a udržování hladiny podzemních vod (Mitra et al., 2005).

Rašelinný ekosystém je rozdělen podle obsahu živin na ombrotrofní vrchoviště (BOG) a minerotrofní slatiniště (FEN). Kvůli umístění a antropogennímu znečištění jsou rašeliniště vystavena rozdílnému příjmu živin, což má velký vliv na rostlinné složení a mikrobiální společenstva (Gore, 1983). Chudší ombrotrofní vrchoviště, široce rozšířena v severních zeměpisných šířkách, získávají vodu a živiny pouze ze srážek. Tato vrchoviště se vyznačují jedinečnou vegetací a faunou, která se přizpůsobila kyselému ($\text{pH} \leq 4$) a chudému prostředí (Martí et al., 2015) s nízkou koncentrací minerálních solí a chladnějšími teplotami (Kotsyurbenko et al., 2007). Převládají zde mechy čeledě *Sphagnaceae*, typické druhy bylinného patra jsou *Calluna vulgaris*, *Eriophorum vaginatum*, masožravé rostliny *Drosera rotundifolia*, *Sarracenia purpurea* a dřevina *Pinus sylvestris* (Andersen et al., 2013). Výživově bohatší minerotrofní slatiniště přijímají vodu a živiny z podzemních vod (Clymo, 1983) a tvoří je převážně zakrslé druhy *Betula* a *Salix*. Pro bylinnou vrstvu je charakteristická čeleď Cyperaceae s dominantními druhy *Carex*, *Trichophorum* a *Scirpus* (Andersen et al., 2013). Podle obsahu živin jsou rozděleny na tři skupiny: oligotrofní ($\text{pH} \approx 4,5$), mezotrofní ($\text{pH} \approx 5,5$) a eutrofní ($\text{pH} 5,5 - 7,5$) slatiniště (Galand, 2004). Větší mikrobiální aktivita a diverzita je pozorována na živinově bohatších slatiništích ve srovnání s chudšími vrchovišti (Urbanová et al., 2015).

2.4.1 Metanogenní společenstva a rašeliniště

Mikrobiální rozmanitost rašelinišť je charakterizována organismy, které jsou fyziologicky i metabolicky adaptované na prostředí s omezenými podmínkami (Andersen et al., 2013). Anaerobní podmínky důležité pro metanogenní Archaea se vyskytují pod úrovní hladiny vody (Kotiaho et al., 2010). Spolu s teplotou, hloubkou půdy a vegetací je hladina vody jeden z hlavních environmentálních faktorů ovlivňující složení metanogenního společenstva (Lin et al., 2015). Rašelinné půdy jsou charakterizované heterogenní strukturou

s menšími póry (Weiss et al. 1998) poskytující vhodné anaerobní mikro-stanoviště metanogenním Archaeím, které jsou díky tomu schopné přežít nepříznivé podmínky (Valentine, 2007).

Ve vrchovištích (BOG) převažuje tvorba metanu hydrogenotrofní dráhou na rozdíl od slatinišť, kde je využívána spíše dráha acetoklastická. Obecně, je acetoklastická dráha upřednostňovaná ve svrchních vrstvách rašeliniště ve spojení s labilním uhlíkem, zatímco metanogenní Archaea využívající hydrogenotrofní dráhu převažují v hlubších vrstvách (Lai, 2009) s méně reaktivními, dále rozložitelnými sloučeninami uhlíku (Juottonen et al., 2005).

2.4.2 Odvodňování rašelinišť

Většina rašelinišť v centrální Evropě byla v minulosti odvodňována pro lesnické účely, nyní je snaha o jejich opětovnou revitalizaci. Odvodňování snižuje vodní hladinu rašelinišť a dříve vodou nasycené organické půdní vrstvy se vystavují aerobní oxidaci (Hiraishi et al, 2014). Dochází tedy ke změně v kvalitě organické hmoty a míře jejího rozkladu (Urbanová et al., 2013). Dále má odvodnění velký vliv na vegetaci, dominantní druhy rašelinišť jsou postupně nahrazovány lesní vegetací, převážně dřevinami (Komulainen et al, 1999; Minkkinen et al., 2006). Odvodňování obvykle vede ke zvyšování emisí oxidu uhličitého (CO₂), zatímco emise metanu díky větší koncentraci kyslíku v hlubších vrstvách prudce klesají (Minkkinen et al., 1999). Hlavním důvodem nižších emisí metanu po odvodnění je změna kvantity a kvality organických substrátů pro metanogenezi (Galand et al., 2005) a také absence jednoduchých uhlíkatých sloučenin v hlubších vrstvách rašelinišť díky potlačení anaerobních fermentačních bakterií (Urbanová et al., 2013). Dlouhodobé odvodňování tedy zeslabuje anaerobní vrstvu, kde je produkován metan a naopak zesiluje vrstvu aerobní (Landry et al., 2012), tudíž se snižuje množství i diverzita metanogenních Archaeí v rašeliništích (Yrjala et al., 2011). Změny jsou výraznější a nastávají mnohem rychleji v živinově bohatších minerotrofních slatiništích oproti chudším ombrotrofním vrchovištím (Laiho et al., 2003, Urbanová et al., 2015).

2.5 Vliv typu opadu na složení metanogenních společenstev

Vegetace je jeden z důležitých faktorů ovlivňující mikrobiální společenstvo rašelinišť (King, 1996). Hraje významnou úlohu při tvorbě a transportu metanu do atmosféry

(Roura et al., 1999), neboť více jak 80% celkových emisí metanu v rašeliništích je zprostředkováno přes listy nebo stonky rostlin (King, 1996). Množství emitovaného metanu se liší podle přítomných charakteristických druhů rostlin, kdy emise ve *Sphagnum*-dominantních vrhovištích jsou nižší oproti *Carex*-dominantním slatiništím (Larmola et al., 2010). V mezotrofních slatiništích navíc pronikají kořeny cévnatých rostlin do anoxické vrstvy a umožňují potenciálním substrátům metanogenních Archaeí jako například acetátu prostoupit do hlubších vrstev rašeliniště, což je přínosem pro acetoklastické metanogeny (Galand et al, 2005).

Odvodňování také výrazně ovlivňuje vegetaci rašelinišť. Ostřice *Carex lasiocarpa* a *Carex rostrata* jsou důležité rostliny pro tvorbu rašeliny na mnoha mezotrofních slatiništích, avšak při poklesu vody relativně rychle mizí. Naopak *Eriophorum vaginatum* je jediným druhem, který může prospívat i v sušších oblastech. Při poklesu hladiny vody se výskyt mechů rodu *Sphagnum* snižuje a nahradily je mechy rodu *Pleuzorium schreberi* (Laiho, 2006).

3 Cíle a hypotézy

Cíle práce:

Vypracovat literární rešerši o metanogenním společenstvu v rašeliništích.

Určit vliv hloubky, typu rašeliniště, opadu a odvodnění na množství a diverzitu metanogenů.

Hypotézy:

Množství metanogenů poroste s hloubkou rašeliniště a bude vyšší na minerotrofním slatiništi. Odvodnění rašeliniště způsobí pokles v množství metanogenů. Množství metanogenů bude různé v různých typech opadu.

4 Materiál a metody

Vzorky rostlinného opadu byly po deseti letech odebrány z finského rašeliniště Lakkasuo v rámci dekompozičního experimentu Petry Strakové (Straková et al., 2012). Vzorky byly následně použity k izolaci DNA a kvantifikaci pomocí kvantitativní PCR v této diplomové práci.

4.1 Lokalita Lakkasuo

Finské rašeliniště Lakkasuo (61° 48' N, 24° 19' E) je v nadmořské výšce 150 m n. m. Roční srážkový úhrn je v této oblasti okolo 710 mm, kdy z jedné třetiny jde o srážky sněhové. Průměrné roční teploty od ledna do července se pohybují v rozmezí od -8,9 do 15,3 °C (Jaatinen et al., 2007). Experiment zahrnoval mezotrofní slatiniště (FEN) a ombrotrofní vrchoviště (BOG) na plochách přirozených (PR), krátkodobě odvodněných (STD) a dlouhodobě odvodněných (LTD), vždy ve dvou opakováních.

Typické rostliny pro původní mezotrofní slatiniště (FEN) jsou *Carex rostrata*, *Potentilla palustris*, *Menyanthes trifoliata* a mechy *Sphagnum fallax* a *Sphagnum magellanicum*. Již po krátkodobém odvodnění slatiniště pokrývají stromové porosty *Pinus sylvestris* a *Betula pubescens*. Dlouhodobé odvodnění může mít dramatický vliv na druhy *Carex*, které úplně vymizí, ale také na mechy, kde po odvodnění dominuje *Pleurozium schreberi*. Pro přirozené ombrotrofní vrchoviště (BOG) jsou charakteristické mechy *Sphagnum balticum*, *Sphagnum fuscum* a bylinné druhy *Eriophorum vaginatum* a *Andromeda polifolia*. Vegetace po krátkodobém odvodnění zůstává stejná, naopak dlouhodobé odvodnění může způsobit velké změny. Odvodněné vrchoviště je tvořeno dřevinou *Pinus sylvestris*, mechy *Pleurozium schreberi* a *Sphagnum russowi* (Jaatinen et al., 2007).

V lokalitě Lakkasuo byly také měřeny chemické parametry půdy, jako například uhlík (C), dusík (N), fosfor (P), hliník (Al), bor (B), vápník (Ca), železo (Fe), draslík (K), hořčík (Mg), nebo popelovina. Také byly měřeny chemické parametry opadu, vzdálenost k vodní hladině rašeliniště, vzdálenost k povrchu rašeliniště nebo pH (Straková et al., 2010).

4.2 Vzorky rostlinného opadu

Tato studie zahrnovala třináct různých typů rostlinného opadu, které reprezentovaly rostlinné druhy typické pro přirozené a odvodněné rašeliniště. Byl zde zahrnut opad mechů

(*Sphagnum angustifolium*, *Sphagnum fallax*, *Sphagnum balticum*, *Sphagnum fuscum*, *Pleurozium schreberi*), listový opad (*Betula nana*, *Carex lasiocarpa*, *Eriophorum vaginatum*, *Ledum palustre*, *Rubus chamaemorus*, *Pinus sylvestris*), dřevitý opad (*Pinus sylvestris*) a kořeny (*Pinus sylvestris*). Vzorčky opadu byly vloženy do opadových sáčků a inkubovány po dobu deseti let ve svých přirozených podmínkách, tj. v podmínkách, kde by byl daný typ rostlinného materiálu přirozeně vyprodukován a následně rozkládán. Opadové sáčky s nadzemními částmi cévnatých rostlin tak byly instalovány na povrchu rašeliniště, do vrstvy opadu daného druhu; sáčky s mechem také na povrchu rašeliniště do mechových „chomáčků“ těsně pod živou (zelenou) vrstvu mechu. Sáčky s kořeny byly instalovány vertikálně v profilu rašeliny do hloubky 0 – 10 cm a 20 – 30 cm pod povrchem. Po uplynutí inkubační doby byly sáčky převezeny do laboratoře, kde byl jejich zbývající obsah vyčištěn od případných přidaných (vrostlých) materiálů, lyofilizován a uchován zamražený pro následné mikrobiální analýzy.

4.3 Izolace DNA

DNA ze vzorků rostlinného opadu byla izolována pomocí kitu MO BIO PowerSoil® DNA Isolation Kit dle protokolu výrobce. Koncentrace izolované DNA ve vzorcích byla měřena pomocí QUANTUS QuantiFluor® dsDNA Systém (Promega) podle přiloženého postupu od výrobce. V této metodě se využívá fluorescenční dvou-řetězcové DNA vazebné barvivo, díky kterému je možno kvantitativně stanovit i malé množství dvou-řetězcové DNA (ds DNA).

4.4 Kvantifikace celkového množství Archaeí a metanogenů

Kvantitativní PCR byla použita ke zjištění obsahu genů 16SrDNA specifických pro celkové Archaea a *mcrA* genu specifického pro metanogeny. Tyto dva geny byly kvantifikovány dle stejného postupu. Standardy byly amplifikovány klasickou polymerázovou reakcí (PCR) a úspěšnost amplifikace byla ověřena gelovou elektroforézou. Produkt byl přečištěn pomocí QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) a byla změřena koncentrace. Dále byly naředěny vzorky s DNA templátem na přibližné množství 10 – 20 ng a připraveny reakční směsi odlišné pro každý gen, ze kterých bylo pro reakci použito 17 μ l MasterMixu a 3 μ l templátu. Kalibrační křivka standardu byla vytvořena desítkovým ředěním a byla pipetována jako pětibodová. Vzorčky byly pipetovány na 48 jamkovou

destičku ve dvou opakováních, jako negativní kontrola byla použita PCR voda. Byla provedena qPCR na přístroji StepONE Real-Time PCR Systém (Applied Biosystems, USA).

Pro kvantifikaci genu celkových Archaeí (ARC) byl použit standard druhu *Pyrococcus furiosus* (DSM 3638), který byl amplifikován pomocí PCR za uvedených podmínek: iniciační fáze denaturace při 94 °C po dobu 10 minut, 45 cyklů denaturace při 94 °C po dobu 10 s, cyklus nasedání primerů při 60 °C po dobu 30 s a syntéza nových řetězců při 72 °C po dobu 30 s. V reakční směsi pro qPCR bylo použito 4,6 µl PCR H₂O, 10 µl FastStart Universal SYBR Green Master (Rox), 1 µl primeru F, 1 µl primeru R a 0,4 µl albuminu z hovězího séra (BSA). Byly použity primery ARC787F (ATTAGATACCCSBGTAGTCC) a ARC1059R (GCCATGCACCWCTC) o koncentraci 0,5 µM, velikost produktu 273 bp (Yu et al., 2005).

Gen *mcrA* se používá jako specifický marker pro detekci a rozlišení metanogenního společenstva (Juottonen et al., 2006), bylo s ním pracováno již v bakalářské práci Lísalová (2014). Pro kvantifikaci tohoto genu byl použit standard rodu *Methanosarcina* amplifikovaného PCR za podmínek: iniciační fáze denaturace při 95 °C po dobu tří minut, 35 cyklů denaturace při 95 °C po dobu 30 s, cyklus nasedání primerů při 50 °C po dobu 60 s, syntéza nových řetězců při 72 °C po dobu 60 s, elongační fáze při 72 °C po dobu 8 minut. V master mixu pro qPCR bylo použito 5,9 µl PCR H₂O, 10 µl FastStart Universal SYBR Green Master (Rox), 0,1 µl primeru F, 0,1 µl primeru R, 0,4 µl albuminu z hovězího séra (BSA) a 0,5 µl dimetylsulfoxidu (DMSO). Byly použity primery ME1 (5'-GCM ATG CAR ATH GGW ATG TC-3') a MCR1R (5'-ARC CAD ATY TGR TCR TA-3') o koncentraci 0,3 µM, velikost produktu 280 bp (Hales et al., 1996).

4.5 Gelová elektroforéza

Vzorky, u kterých byla křivka tání posunuta, byly kontrolovány pomocí gelové elektroforézy. Na 1% agarozový gel bylo napipetováno 4 µl vzorku, 1 µl Loading Dye a 2 µl Syber Green. Pro porovnání velikostí bylo napipetováno 5 µl Gene Ruler DNA Ladder 100 bp spolu s 2 µl Syber Green. Elektroforéza probíhala 50 minut při napětí 90V a proudu 500mA.

4.6 Sekvenace a vyhodnocení dat

Vzorky byly sekvenovány v laboratoři Argonne National Laboratory, Lemont, Illinois. Analýza kvality sekvencí a vytvoření OTU tabulky (vyjadřuje distribuci jednotlivých OTU = “mikrobiálních druhů“ ve vzorcích) byla provedena s pomocí školitele, jelikož vyžaduje hlubší znalosti bioinformatiky. Po odstranění málo kvalitních ($q < \text{PhredScore } 20$) a krátkých sekvencí zbylo pro další analýzy 4 612 932 sekvencí. Vlastní OTU tabulka vytvořena pomocí algoritmu uparse 8.1, taxonomické přiřazení pomocí algoritmu utax s využitím databáze ARB Silva 119. Následně byla data vyhodnocena ve statistickém programu STAMP v. 2.0.6 (Parks et al., 2014). Relativní zastoupení čeledí (%) bylo přepočítáno na absolutní množství pomocí qPCR (kopie genu/g půdy). Absolutní hodnoty byly $\log(x+1)$ transformovány pro získání normální distribuce.

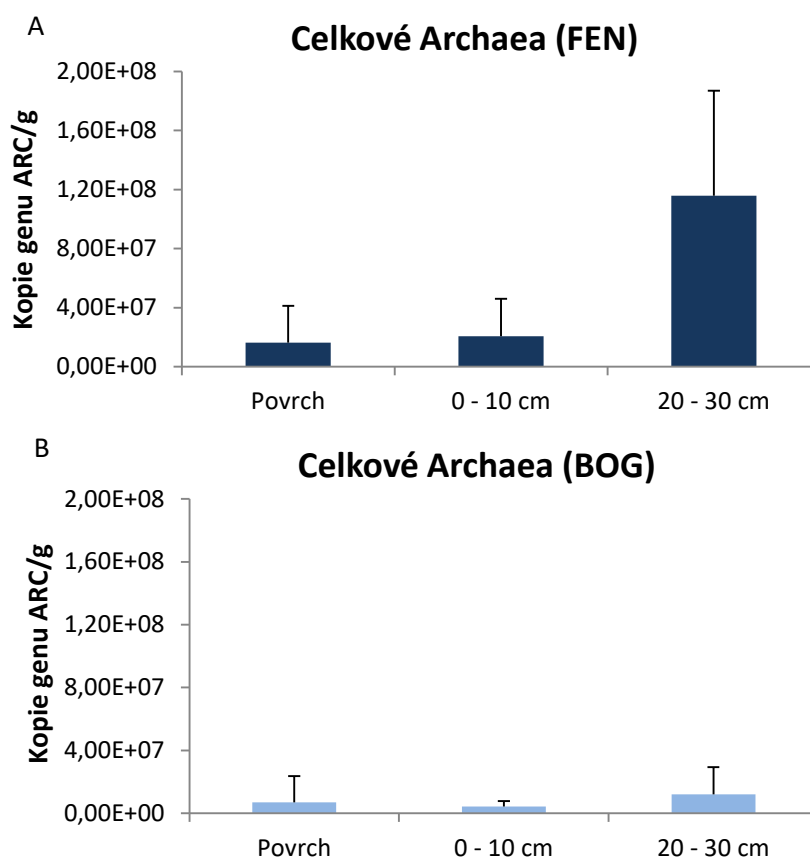
Vliv typu rašeliniště, opadu, odvodnění nebo hloubky na množství a diverzitu metanogenů byl měřen jako rozklad variability pomocí redundanční analýzy (RDA) v programu CANOCO 5 za pomoci konzultanta, odděleně pro opady z povrchové vrstvy a kořeny *Pinus sylvestris*. Pro měření vlivu na množství metanogenů byly jako vysvětlovaná data použity absolutní hodnoty metanogenů, pro měření vlivu na diverzitu metanogenů byly absolutní hodnoty standardizované po vzorcích. Dále byly pomocí metody postupné selekce charakteristik prostředí vybrány jednotlivé parametry prostředí, které nejlépe korelovaly s variabilitou množství a diverzity metanogenů. Signifikance byla testována pomocí Monte Carlo permutačního testu.

5 Výsledky

Množství a diverzita metanogenního společenstva byly porovnávány pro různé hloubky (povrch = 0 cm, svrchní vrstva = 0 – 10 cm, spodní vrstva = 20 – 30 cm). Dále pak pro různé typy rašelinště (FEN = minerotrofní slatiniště, BOG = ombrotrofní vrchoviště) a různé typy opadů, typické pro zkoumané rašelinště. V neposlední řadě byl sledován vliv míry odvodnění (PR = přirozená plocha, STD = krátkodobě odvodněná plocha, LTD = dlouhodobě odvodněná plocha).

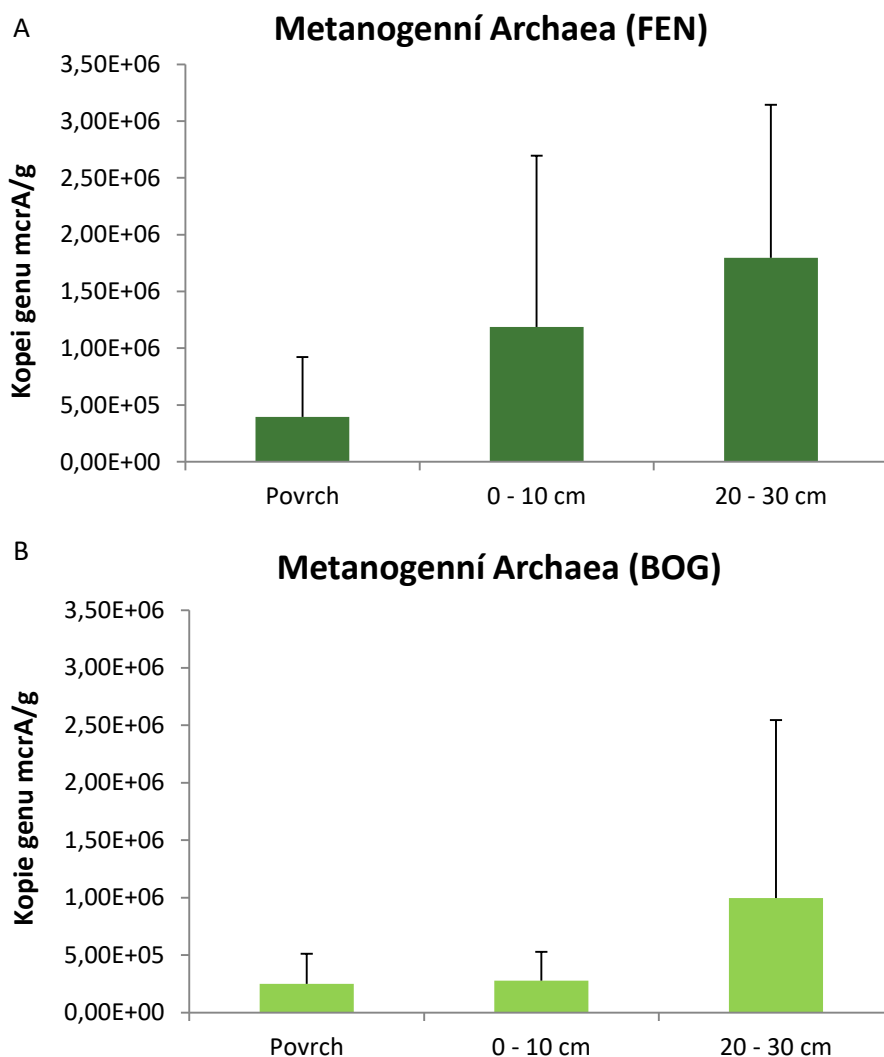
5.1 Vliv hloubky na metanogenní společenstvo

Množství celkových Archaeí bylo vyšší ve všech hloubkách slatiniště oproti vrchovišti. Ve slatiništi (Obr. 3A) se množství celkových Archaeí zvyšovalo s hloubkou, bylo přibližně 8x větší ve spodní vrstvě rašelinště oproti povrchu a vrstvě svrchní. Na vrchovišti (Obr. 3B) neměla oproti slatiništi hloubka na Archaea výraznější vliv.



Obr. 3: Množství celkových Archaeí ve slatiništi (A) a vrchovišti (B) v závislosti na hloubce.

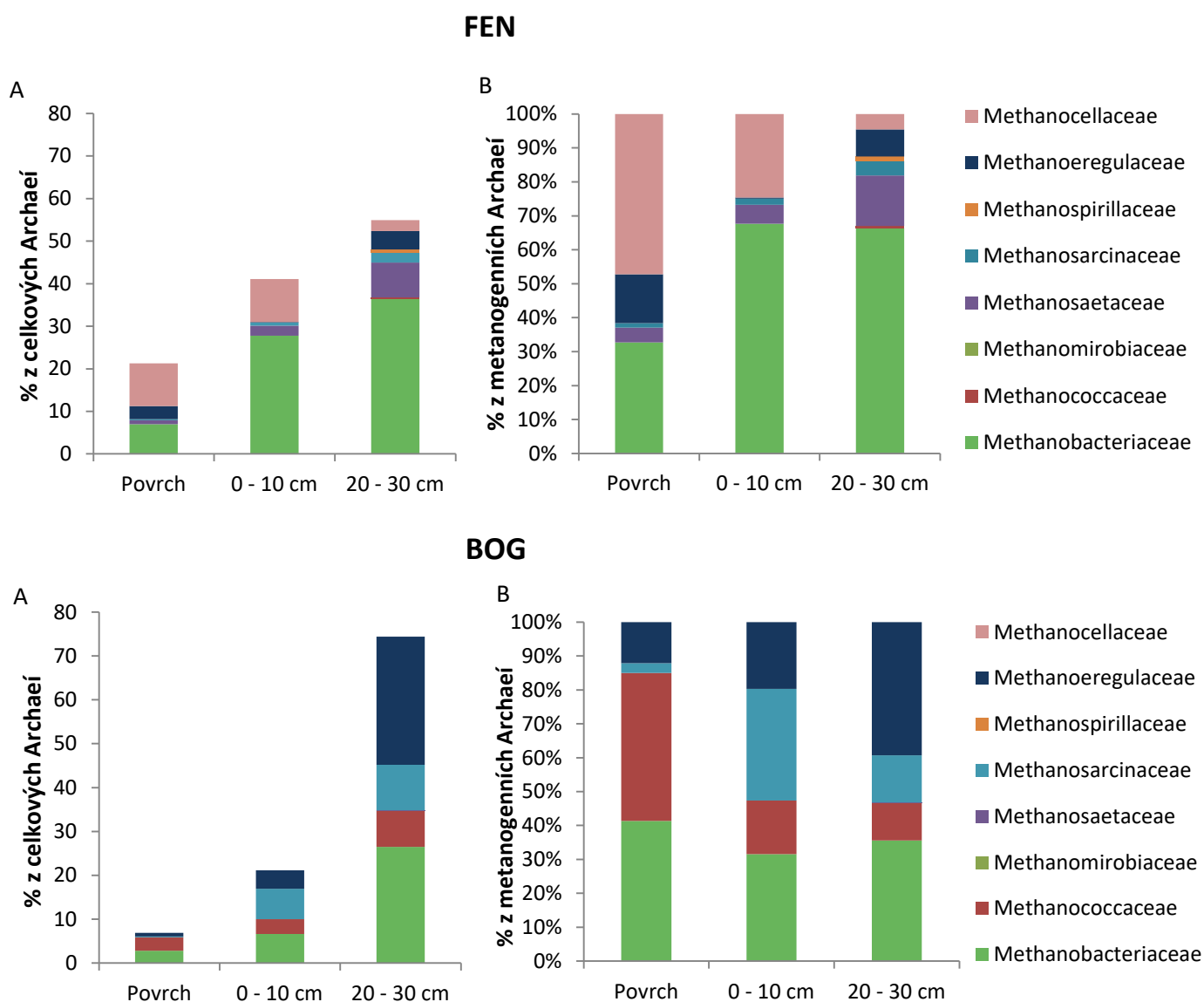
Podobně jako u celkových Archaeí tomu bylo u metanogenů, ve slatiništi bylo zjištěno vyšší množství metanogenů než na vrchovišti. Ve slatiništi (Obr. 4A) se množství metanogenů postupně zvyšovalo s hloubkou, kdy ve spodní vrstvě bylo přibližně 7x více metanogenů oproti povrchu. Množství metanogenů na vrchovišti (Obr. 4B) bylo do hloubky 10 cm přibližně stejné, naopak ve spodní vrstvě výrazně narostlo.



Obr. 4: Množství metanogenů ve slatiništi (A) a vrchovišti (B) v závislosti na hloubce.

Relativní zastoupení metanogenních čeledí se ve slatiništi (Obr. 5, FEN) zvyšovalo s hloubkou, v nejhlubší vrstvě se oproti povrchu objevily navíc čeledě Methanospirillaceae a Methanococcaceae. Relativní zastoupení metanogenních čeledí vrchoviště (Obr. 5, BOG) se naopak vůbec neměnilo. Ve slatiništi byly oproti vrchovišti navíc čeledě Methanocellaceae, Methanospirillaceae a Methanosaetaceae. Relativní množství

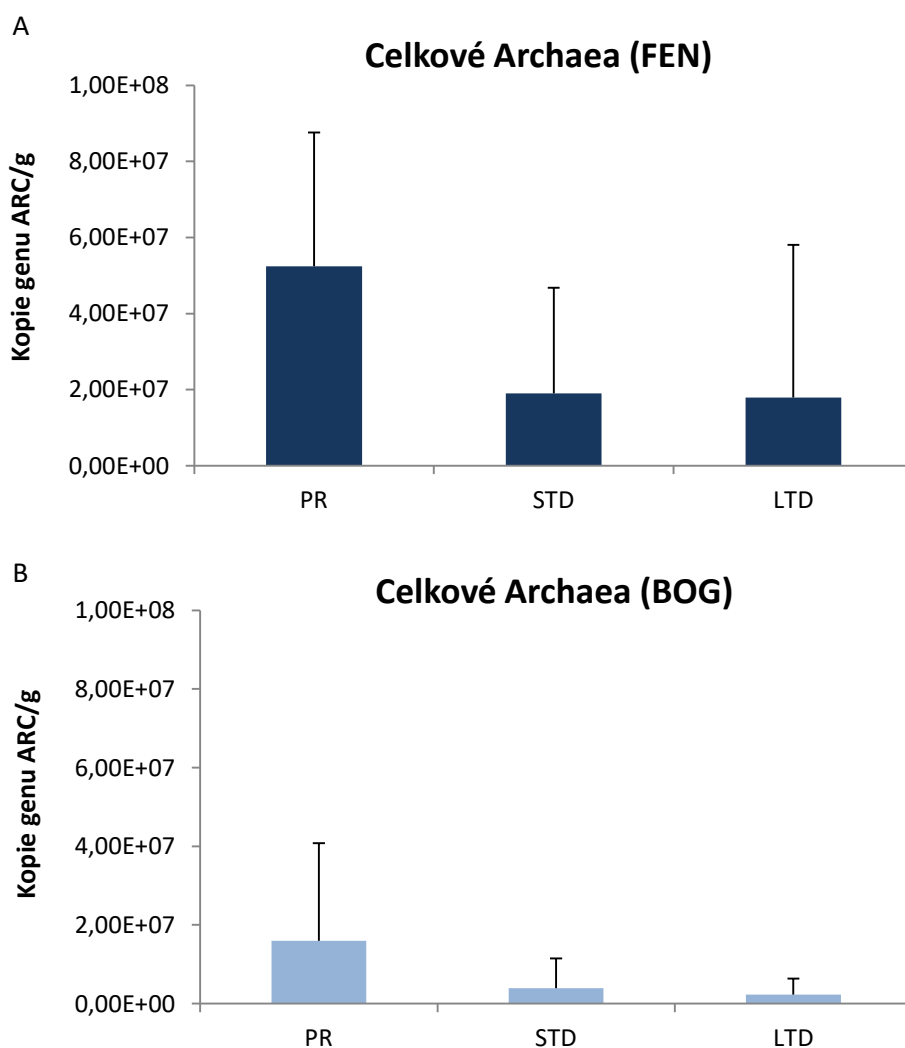
Methanosaetaceae se ve spodní vrstvě slatiniště (Obr. 5B, FEN) zvýšilo oproti povrchu o 10% a Methanobacteriaceae o 35%, naopak relativní množství Methanocellaceae se snížilo o 50%. Čeleď Methanoregulaceae byla na povrchu slatiniště zastoupena přibližně 15%, poté se ve svrchní vrstvě snížila přibližně na 1% a následně se v hloubce 30 cm opět zvýšila a to o 9%. Relativní množství Methanococcaceae se v nejhlubší vrstvě vrchoviště (Obr. 5B, BOG) snížilo oproti povrchu o 35%, naopak počet Methanoregulaceae se zvýšil o 30%. Relativní množství Methanosarcinaceae se snížilo ve spodní oproti svrchní vrstvě o 15%. U čeledě Methanobacteriaceae nebyl zaznamenán žádný větší pokles ani nárůst.



Obr. 5: Relativní zastoupení metanogenních čeledí ve slatiništi (FEN) a vrchovišti (BOG) v závislosti na hloubce. Data jsou prezentována v relativní škále. A - % z celkového Archaeálního společenstva, B - % z metanogenních Archaeí

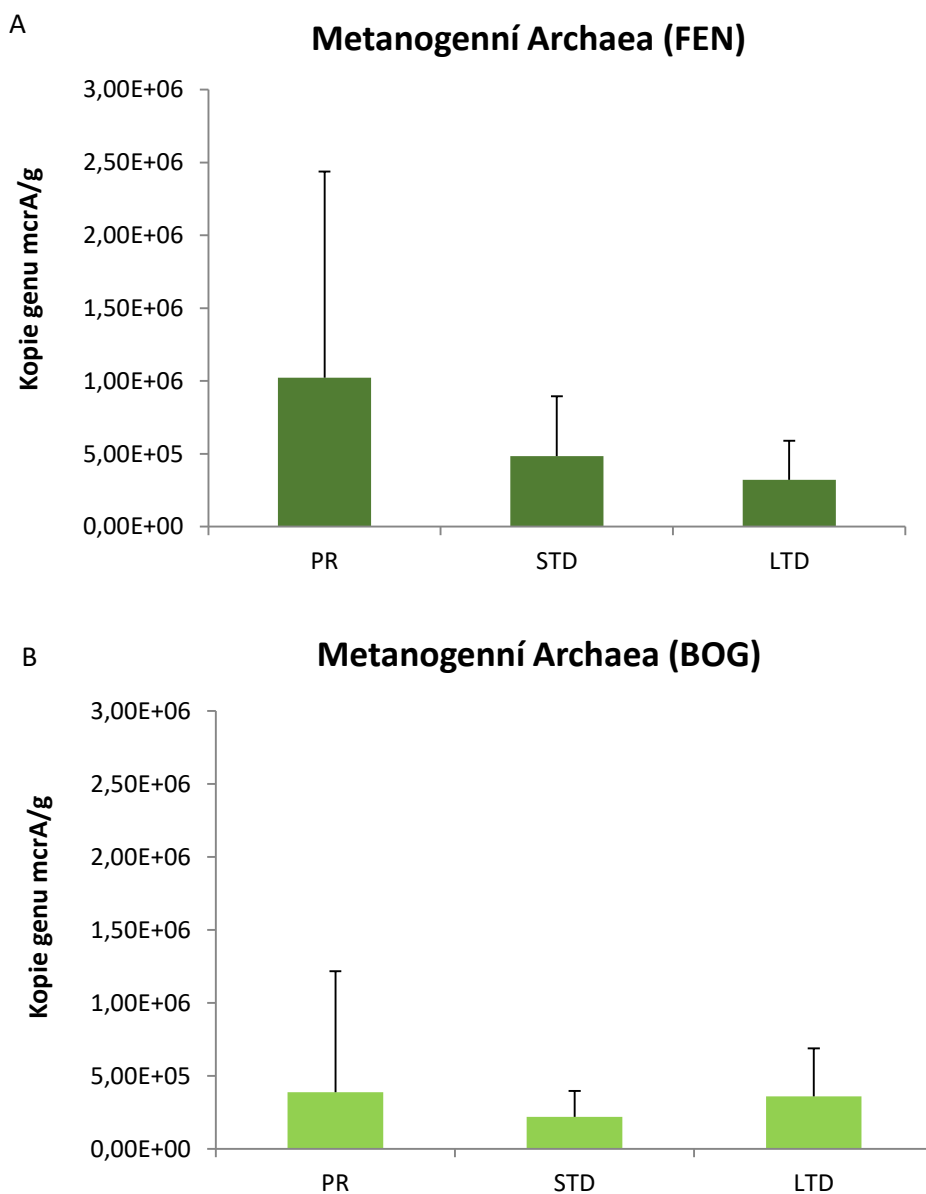
5.2 Vliv odvodnění rašeliniště na metanogenní společenstvo

Množství celkových Archaeí se v obou rašeliništích s odvodněním snížilo a vliv odvodnění byl více patrný na slatiništi (FEN) oproti vrchovišti (BOG). Množství Archaeí ve slatiništi (Obr. 6A) bylo po krátkodobém odvodnění (STD) 3x menší oproti přirozené ploše (PR). Dlouhodobé odvodnění (LTD) už nemělo na metanogeny další výraznější vliv, množství zůstalo odvodnění oproti přirozené ploše také snížilo a množství zůstalo podobné i po dlouhodobém odvodnění.



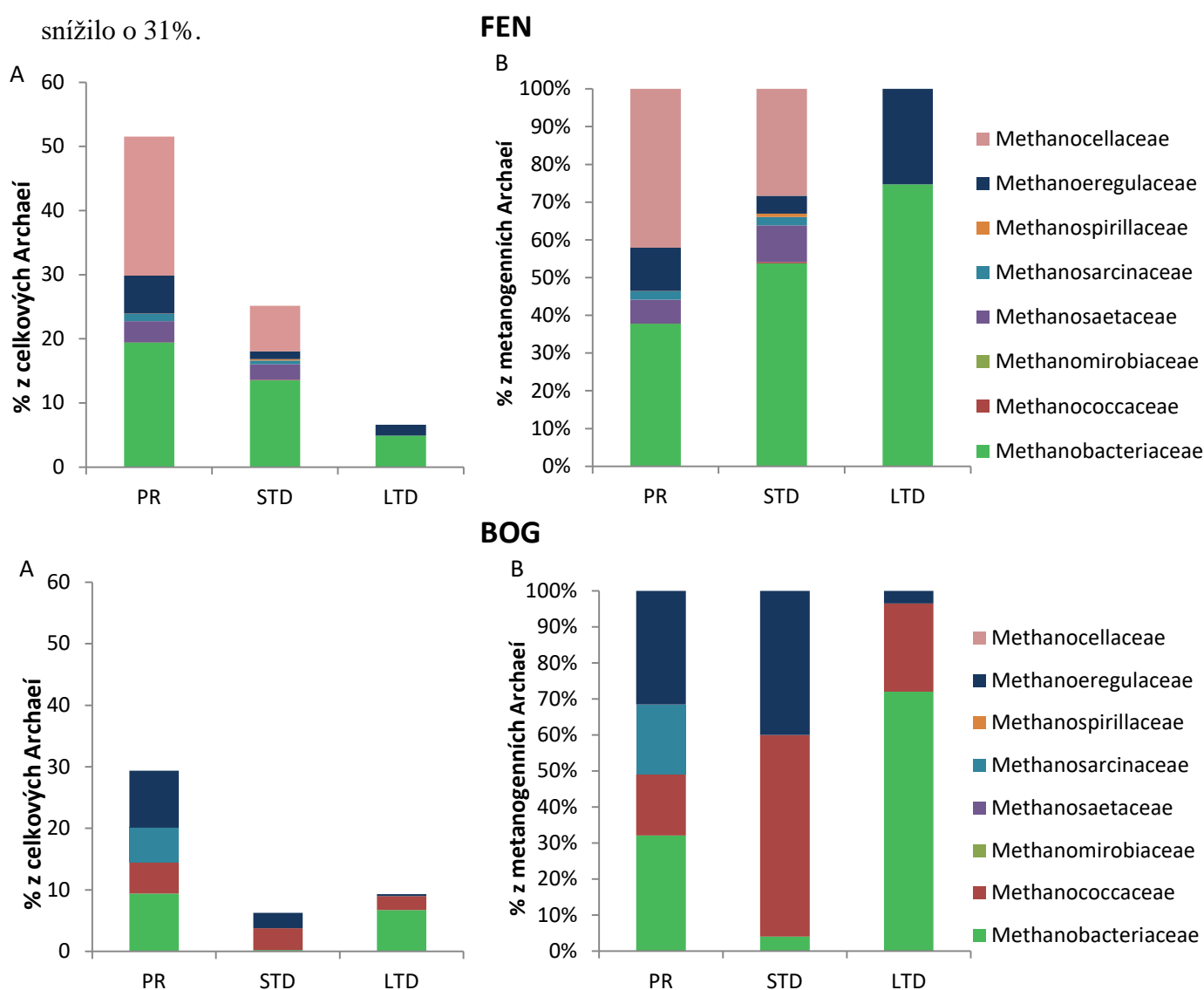
Obr. 6: Množství celkových Archaeí ve slatiništi (A) a vrchovišti (B) v závislosti na odvodnění rašeliniště.

Množství metanogenů ve slatiništi (Obr. 7A) lineárně klesalo s odvodněním, po krátkodobém odvodnění se snížilo 5x a po dlouhodobém odvodnění přibližně 6x oproti přirozené ploše. Množství metanogenů na vrchovišti (Obr. 7B) po krátkodobém odvodnění bylo 2x menší než na přirozené ploše, avšak jejich hodnota po dlouhodobém odvodnění opět narostla.



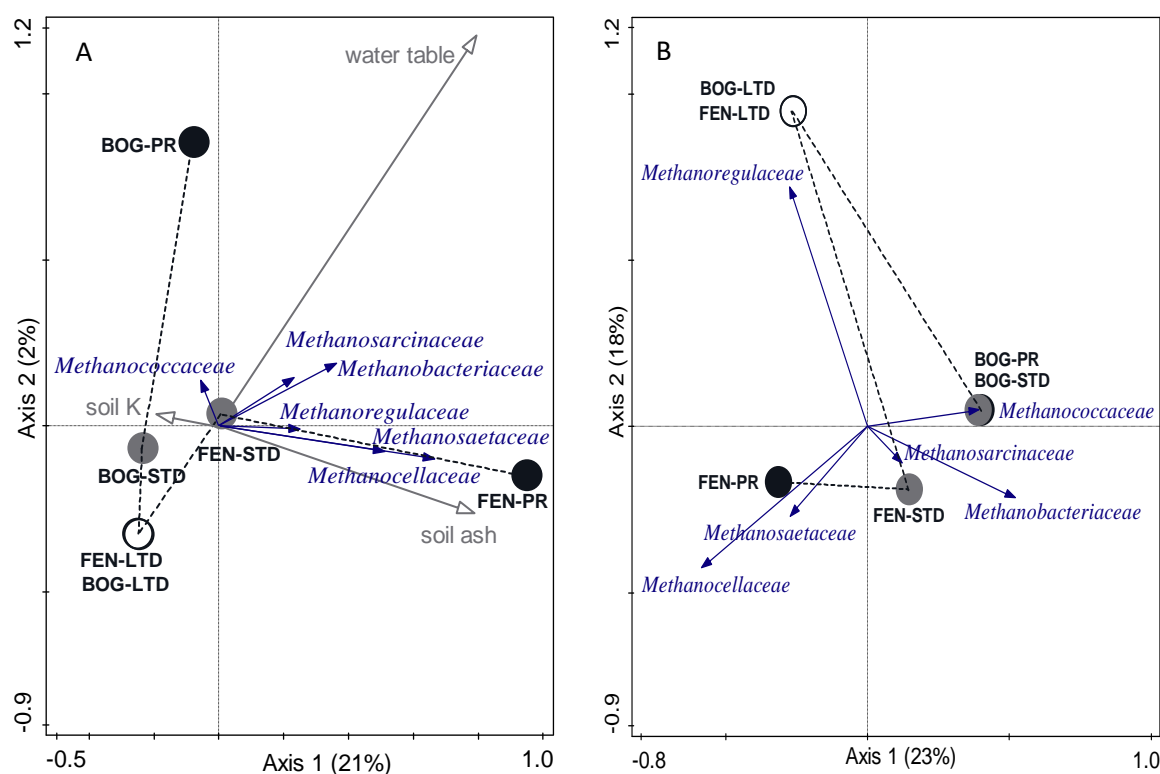
Obr. 7: Množství metanogenů ve slatiništi (A) a vrchovišti (B) v závislosti na odvodnění rašeliniště.

Relativní zastoupení metanogenních čeledí se na slatiništi (Obr. 8, FEN) i vrchovišti (Obr. 8, BOG) snižovalo s odvodněním rašeliniště. Na přirozené ploše slatiniště (PR) bylo bohatší relativní zastoupení metanogenních čeledí na rozdíl od dlouhodobě odvodněné plochy (LTD), kde zůstaly pouze čeledě Methanoregulaceae a Methanobacteriaceae. Čeleď Methanospirillaceae se objevila v malém množství pouze na krátkodobě odvodněné ploše (STD) slatiniště. Na přirozené ploše vrchoviště byly metanogenní čeledě rovnoměrně rozvrstveny, avšak po krátkodobém odvodnění vymizela čeleď Methanosarcinaceae. Relativní množství Methanobacteriaceae se na vrchovišti snížilo z 30% na 4% a následně se po dlouhodobém odvodnění zvýšilo na 70%. Relativní množství Methanococcaceae se naopak po krátkodobém odvodnění zvýšilo o 36% a poté se po dlouhodobém odvodnění snížilo o 31%.



Obr. 8: Relativní zastoupení metanogenních čeledí ve slatiništi (FEN) a vrchovišti (BOG) v závislosti na odvodnění rašeliniště. Data jsou prezentována v relativní škále. A - % z celkového Archaeálního společenstva, B - % z metanogenních Archaeí

Redundanční analýza (RDA) povrchové vrstvy rašeliniště (Obr. 9A) ukázala, že největší vliv na množství metanogenů (Obr. 9A, Tab. III) mělo odvodnění (9,4% vysvětlené variability, $p = 0,002$) a následně typ rašeliniště (4,7% vysvětlené variability, $p = 0,004$), naopak nejméně ovlivňoval množství metanogenů typ opadu (2,8% vysvětlené variability, $p = 0,078$). Vliv odvodnění byl výrazně větší ve slatiništi (18,3% vysvětlené variability, $p = 0,002$) oproti vrchovišti (4,7% vysvětlené variability, $p = 0,03$). Bylo zjištěno, že tato variabilita také souvisela s půdním draslíkem (K), popelovinou (ASH) a výškou vodní hladiny (Tab. IV). Podobné výsledky byly získány pro relativní zastoupení metanogenních čeledí (Obr. 9B, Tabulka III), na které mělo největší vliv odvodnění a typ rašeliniště (13,7% a 13,9% vysvětlené variability, $p < 0,05$), vliv typu opadu nebyl žádný. Vliv odvodnění se zdál být větší ve slatiništi (21,3% vysvětlené variability oproti 7,9% na vrchovišti), ale test nebyl statisticky signifikantní. Ve slatiništi převládaly čeledě Methanocellaceae, Methansaeetaceae a Methanobacteriaceae oproti vrchovišti, kde byla nalezena čeleď Methanococcaceae.



Obr. 9: Ordinační diagram redundanční analýzy (RDA) zobrazující množství a relativní zastoupení metanogenních čeledí povrchové vrstvy slatiniště (FEN) a vrchoviště (BOG) v závislosti na odvodnění rašeliniště. PR – přirozená plocha, STD – krátkodobě odvodněná plocha, LTD – dlouhodobě odvodněná plocha

Tab. III: Výsledky redundanční analýzy (RDA) znázorňující procento celkové variability v množství a relativním zastoupení metanogenních čeledí vysvětlené typem rašeliniště, odvodněním a typem opadu.

Testované zdroje variability	Množství		Relativní zastoupení metanogenních čeledí	
	Vysvětlená variabilita (%)	P	Vysvětlená variabilita (%)	P
Typ rašeliniště	4,7	0,004	13,9	0,01
Odvodnění	9,4	0,002	13,7	0,036
Typ opadu	2,8	NS	0	NS

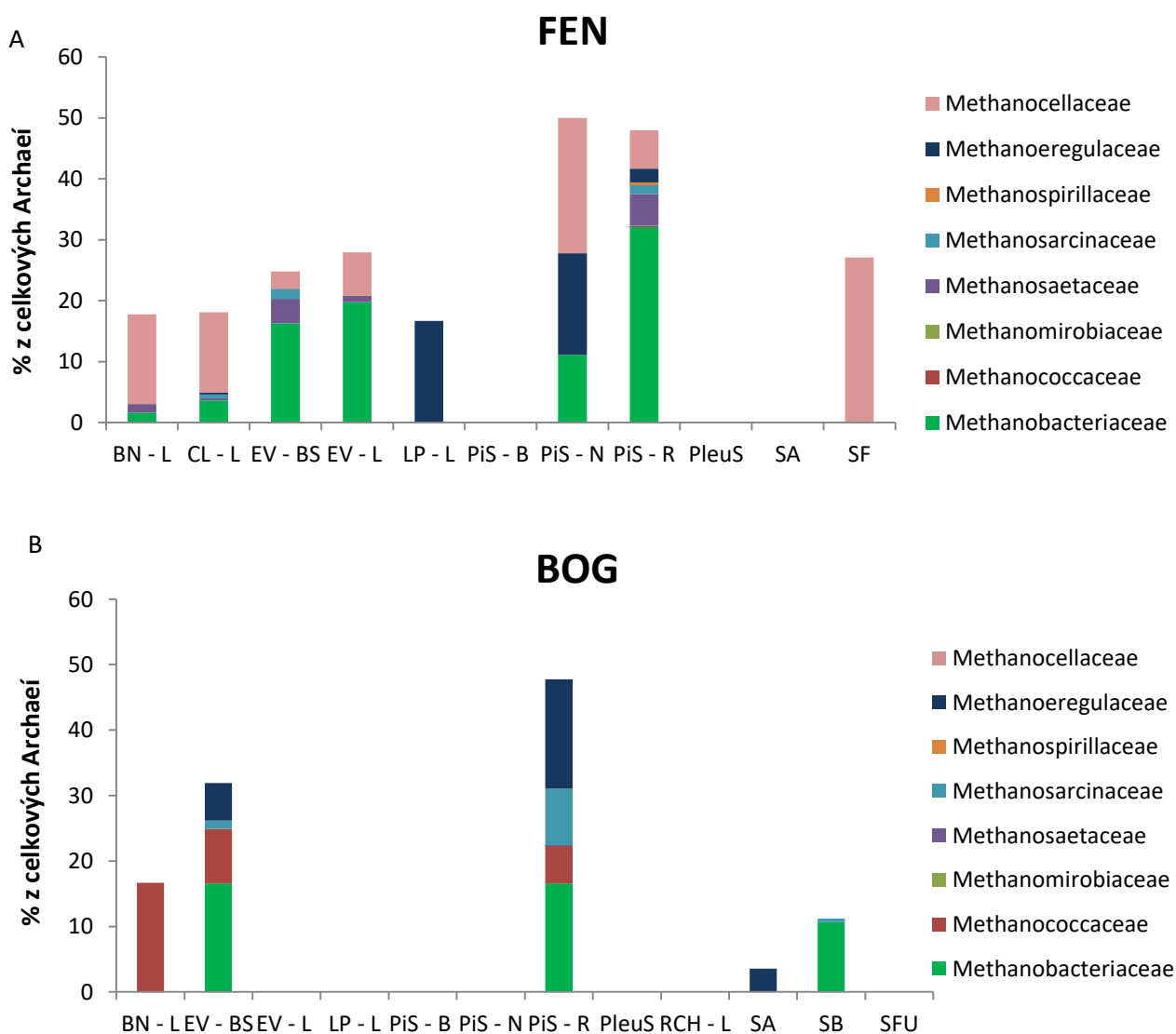
NS - Není signifikantní

Tab. IV: Parametry prostředí v RDA analýze mající signifikantní vliv na množství metanogenů povrchové vrstvy slatiniště a vrchoviště.

Testované zdroje variability	Vysvětlená variabilita (%)	P
Výška vodní hladiny	15,8	0,002
Půdní popelovina	7,9	0,002
Půdní K	4,0	0,002

5.3 Vliv opadu na metanogenní společenstvo

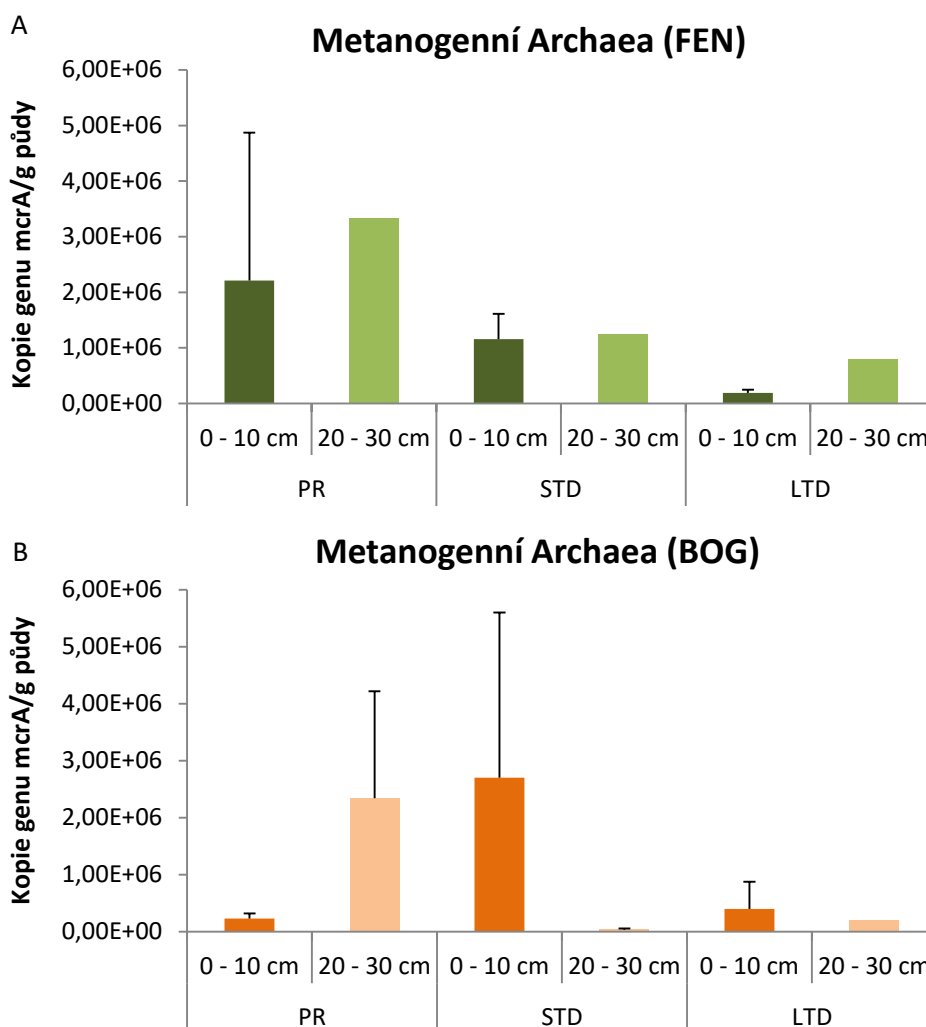
Ve slatiništi (Obr. 10A) bylo oproti vrchovišti (Obr. 10B) více opadů osídlených metanogeny. V obou rašeliništích bylo nejvíce metanogenů na kořenech *Pinus sylvestris*. Relativní zastoupení metanogenních čeledí bylo výraznější ve slatiništi, kde bylo nalezeno 6 čeledí oproti vrchovišti, kde byly nalezeny 4 čeledě. Ve slatiništi byly nejvíce zastoupeny čeledě Methanocellaceae a Methanobacteriaceae, na vrchovišti čeledě Methanobacteriaceae, Methanococcaceae a Methanoregulaceae.



Obr. 10: Relativní zastoupení metanogenních čeledí v závislosti na různých typech opadů ve slatiništi (A) a vrchovišti (B). BN - L: *Betula nana* leaves, CL - L: *Carex lasiocarpa* leaves, EV - BS: *Eriophorum vaginatum* basal sheaths, EV - L: *Eriophorum vaginatum* leaves, LP - L: *Ledum palustre* leaves, PiS - B: *Pinus sylvestris* branches, PiS - N: *Pinus sylvestris* needles, PiS - R: *Pinus sylvestris* roots, PleuS: *Pleurozium schreberi*, RCH - L: *Rubus chamaemorus* leaves, SA: *Sphagnum angustifolium*, SF: *Sphagnum fallax*, SB: *Sphagnum balticum*, SFU: *Sphagnum fuscum*.

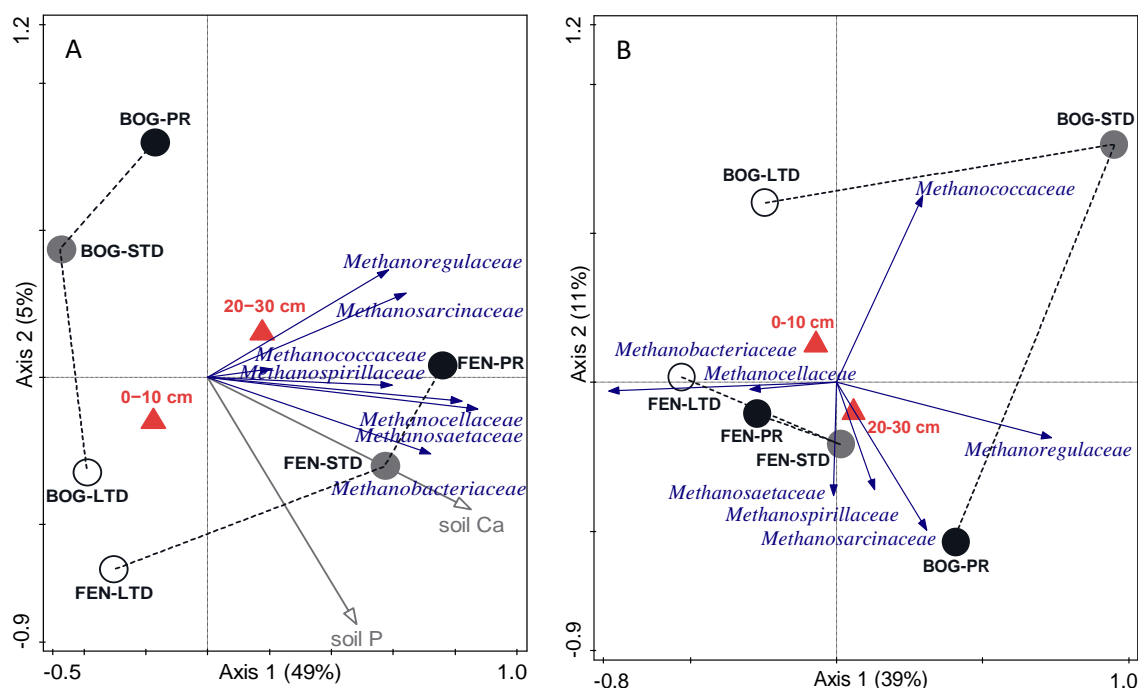
5.4 Vliv hloubky a odvodnění na metanogenní společenstvo u kořenů *Pinus sylvestris*

Množství metanogenů u kořenů *Pinus sylvestris* bylo měřeno ve svrchní (0 – 10 cm) a spodní (20 – 30 cm) hloubce. Ve slatiništi (Obr. 11A) se oproti vrchovišti (Obr. 11B) s odvodněním lineárně snižovalo množství metanogenů u obou hloubek. Na přirozené (PR) a dlouhodobě odvodněné ploše (LTD) slatiniště bylo větší množství metanogenů ve spodní vrstvě, na krátkodobě odvodněné ploše (STD) bylo množství v obou vrstvách podobné. Na vrchovišti se lineárně snižovalo množství metanogenů ve spodní vrstvě, zatímco ve svrchní vrstvě bylo nejvíce metanogenů na krátkodobě odvodněné ploše. Bylo to pravděpodobně způsobeno jedním ze vzorků, který byl řádově posunut. Vzorek byl ve vyhodnocování ponechán, jelikož byla provedena pouze dvě opakování.



Obr. 11: Vliv hloubky a odvodnění na množství metanogenů u kořenů *Pinus sylvestris* ve vrchovišti (A) a slatiništi (B).

Dle RDA analýzy svrchní (0 – 10 cm) a spodní (20 – 30 cm) vrstvy u kořenů *Pinus sylvestris* bylo množství metanogenů (Obr. 12A, Tab. V) nejvíce ovlivněno typem (24,4% vysvětlené variability, $p = 0,002$) a odvodněním (14,3% vysvětlené variability, $p = 0,016$) rašeliniště, nejmenší vliv na ně měla hloubka (5,7% vysvětlené variability, $p = 0,032$). Odvodnění mělo výrazně větší vliv na množství metanogenů ve slatiništi (41,2% vysvětlené variability, $p = 0,018$) oproti vrchovišti (9% vysvětlené variability, NS). Stejně tomu bylo i s vlivem hloubky (slatiniště 26,6% vysvětlené variability, $p = 0,026$ oproti vrchovišti 0% vysvětlené variability, NS). Množství metanogenů klesalo v gradientu přirozené (PR), krátkodobě (STD) a dlouhodobě odvodněné (LTD) rašeliniště. Společenstva metanogenů se v přirozených plochách rašeliniště výrazně lišila, avšak po odvodnění se jejich podobnost pomalu setkávala. Množství půdního vápníku (Ca) a fosforu (P) také souviselo s touto variabilitou (Tab. VI). Podobné výsledky byly získány pro relativní zastoupení metanogenních čeledí (Obr. 12B, Tab. V), na které mělo největší vliv odvodnění a typ rašeliniště (20,8% a 19,2% vysvětlené variability, $p < 0,01$), vliv hloubky byl zanedbatelný. Vliv odvodnění se zdál být o něco větší ve slatiniště (34,4% vysvětlené variability oproti 27,4% na vrchovišti), podobně jako vliv hloubky (11,5% vysvětlené variability na slatiništi oproti 10,1% na vrchovišti), ale testy nebyly statisticky signifikantní.



Obr. 12: Ordinační diagram redundanční analýzy (RDA) zobrazující množství a relativní zastoupení metanogenních čeledí svrchní (0 – 10 cm) a spodní (20 – 30 cm) vrstvy slatiniště (FEN) a vrchoviště (BOG) u kořenů *Pinus sylvestris* v závislosti na hloubce a odvodnění

rašeliniště. PR – přirozená plocha, STD – krátkodobě odvodněná plocha, LTD – dlouhodobě odvodněná plocha

Tab. V: Výsledky redundanční analýzy (RDA) znázorňující procento celkové variability v množství a relativním zastoupení metanogenních čeledí vysvětlené typem rašeliniště, odvodněním a hloubkou.

Testované zdroje variability	Množství		Relativní zastoupení metanogenních čeledí	
	Vysvětlená variabilita (%)	P	Vysvětlená variabilita (%)	P
Typ rašeliniště	24,4	0,002	19,2	0,006
Odvodnění	14,3	0,016	20,8	0,008
Hloubka	5,7	0,032	2,6	NS

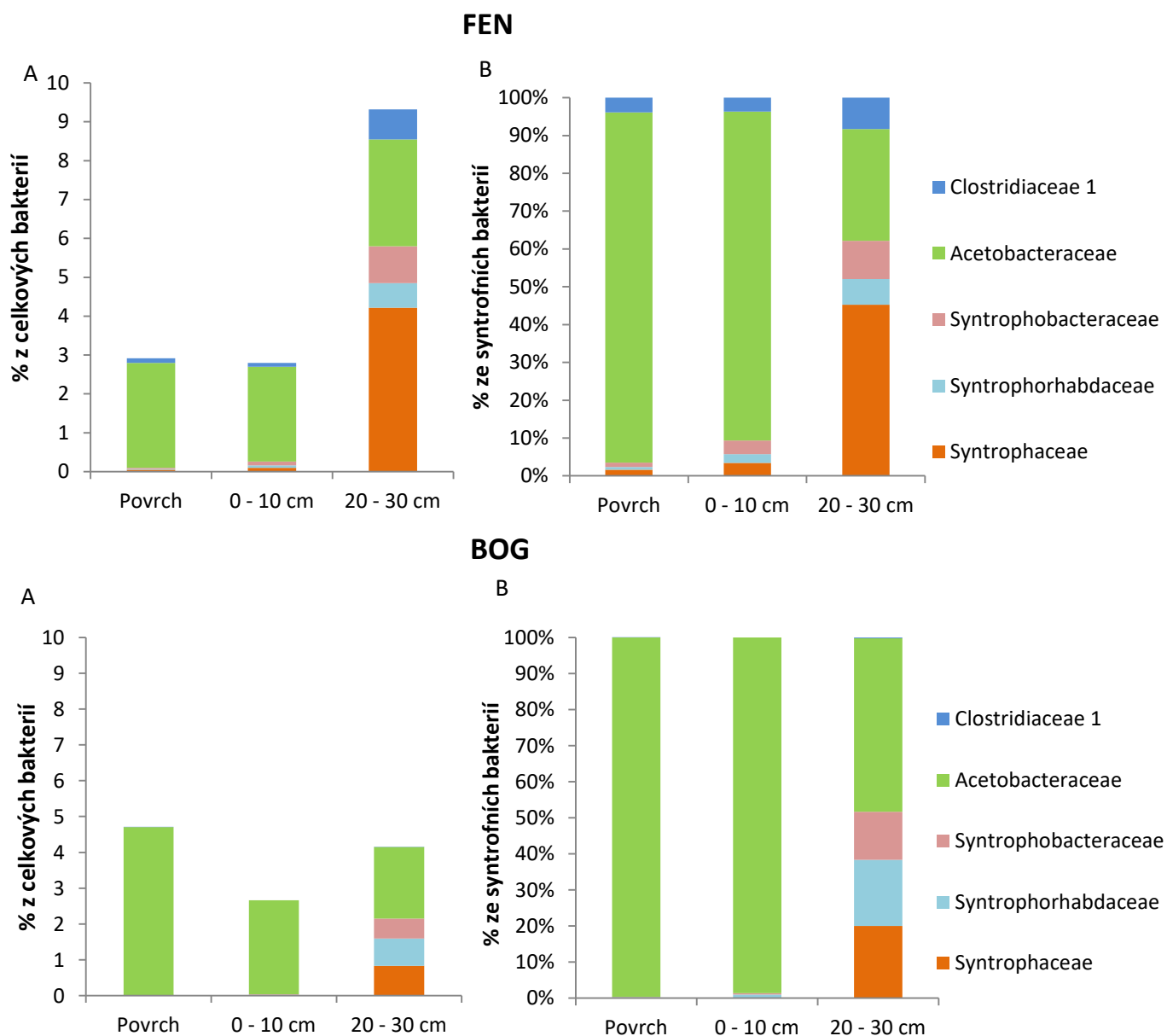
NS = Není signifikantní

Tab. VI: Parametry prostředí v RDA analýze mající signifikantní vliv na množství metanogenů svrchní a spodní vrstvy slatiniště a vrchoviště.

Testované zdroje variability	Vysvětlená variabilita (%)	P
Půdní Ca	36,8	0,026
Půdní P	17,9	0,026

5.5 Syntrofní bakterie v závislosti na hloubce

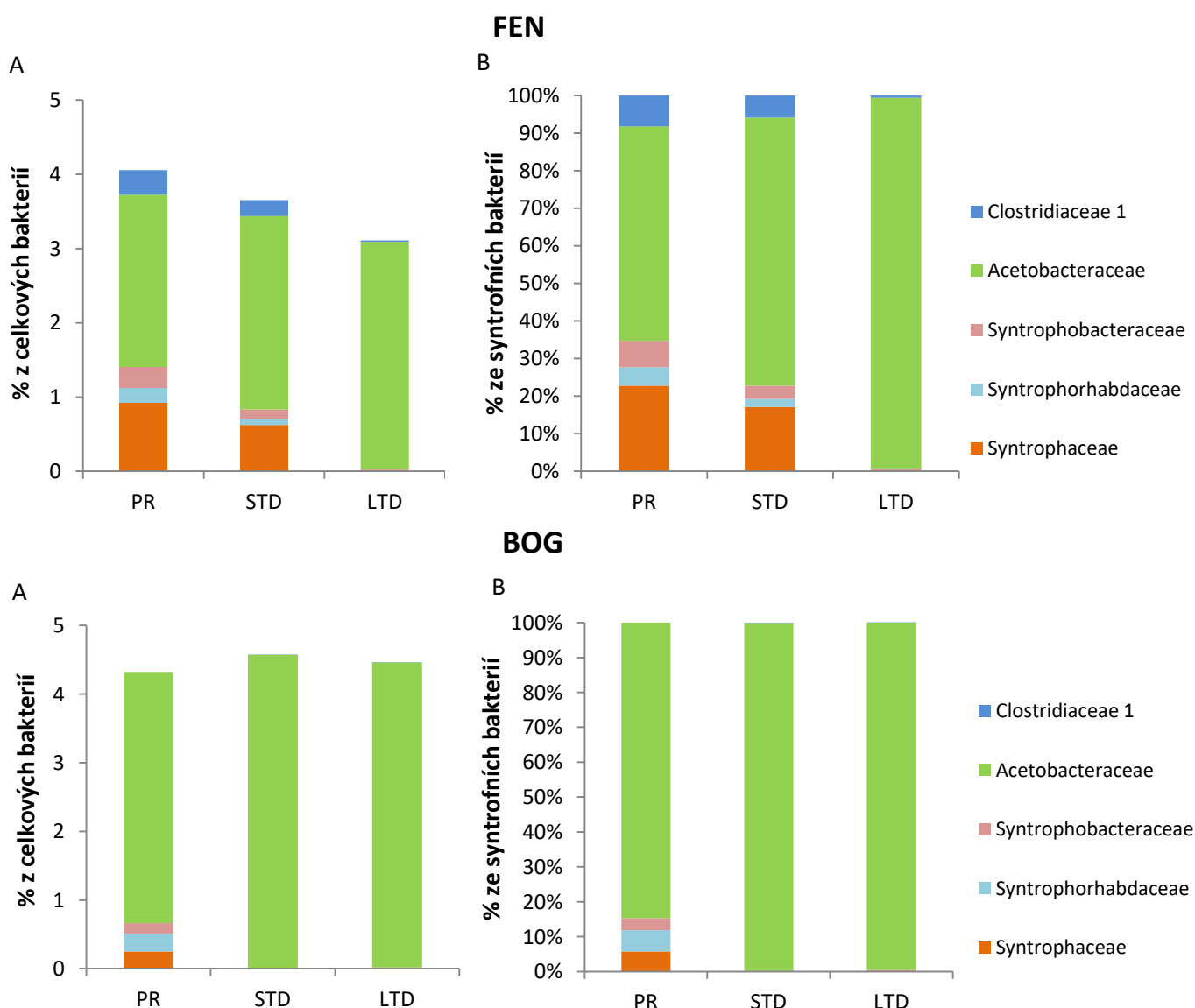
Ve slatiništi i vrchovišti se s hloubkou zvyšovalo relativní zastoupení čeledí syntrofních bakterií. V obou typech rašelinišť převládala čeleď Acetobacteraceae. Ve slatiništi (Obr. 13, FEN) se s hloubkou zvyšovalo relativní množství syntrofních bakterií. Oproti tomu ve vrchovišti (Obr. 13, BOG) k nárůstu nedocházelo. U obou typů rašelinišť bylo největší relativní zastoupení čeledí syntrofních bakterií v nejhlubší vrstvě (20-30cm), což mohlo souviset i s vyšším relativním zastoupením metanogenních čeledí (viz Obr. 5)



Obr. 13: Relativní zastoupení čeledí syntrofních bakterií ve slatiništi (FEN) a vrchovišti (BOG) v závislosti na hloubce. Data jsou prezentována v relativní škále. A - je % z celkového bakteriálního společenstva, B - % z syntrofních bakterií

5.6 Syntrofní bakterie v závislosti na odvodnění rašeliniště

Celkové relativní množství syntrofních bakterií po dlouhodobém odvodnění (LTD) kleslo pouze u slatiniště (Obr. 14, FEN), naopak u vrchoviště (Obr. 14, BOG) se jejich relativní množství téměř nezměnilo. S odvodněním však kleslo množství relativního zastoupení syntrofních čeledí (tj. snížila se jejich diverzita). U slatiniště již po krátkodobém odvodnění (STD) dominovala čeleď Acetobacteraceae a v menší míře byla zastoupena i čeleď Syntrophaceae. Po dlouhodobém odvodnění (LTD) dominovala již pouze čeleď Acetobacteraceae. Ve vrchovišti dominovala na všech plochách čeleď Acetobacteraceae.



Obr. 14: Relativní zastoupení čeledí syntrofních bakterií ve slatiništi (FEN) a vrchovišti (BOG) v závislosti na odvodnění rašeliniště. Data jsou prezentována v relativní škále. A - je % z celkového bakteriálního společenstva, B - % z syntrofních bakterií

5.7 Vliv chemických parametrů půdy na abundanci metanogenních čeledí

Metanogeni byli dále ovlivňováni chemickými parametry půdy. V Tabulce VII je znázorněno jak metanogeni korelovali s různými chemickými látkami, ale také s pH nebo se vzdáleností od povrchu rašeliniště (DS). Nejvýznamněji korelovala čeleď Methanococcaceae a to se všemi vybranými parametry, u ostatních čeledí nebyly korelace signifikantní. Ukázány jsou pouze signifikantní korelace pro vybrané čeledě a chemické parametry půdy ($p \leq 0,05$).

Tab. VII: Vybrané korelační koeficienty chemických parametrů půdy ovlivňující metanogeny.

Čeleď	DS	pH	C	N	P	Ca	Fe	ASH
Methanococcaceae (n = 29)	-0,45	0,58	-0,39	0,47	0,42	0,53	0,49	0,52
Methanocellaceae	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Methanomicrobiaceae	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Methanospirillaceae	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Methanosarcinaceae	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

n = Počet bodů, ze kterých byla korelace počítána

NS = Není signifikantní

6 Diskuze

6.1 Vliv hloubky na metanogenní společenstvo

Hloubka je jedním z důležitých faktorů ovlivňující metanogenní společenstvo v rašeliništích. Metanogeni jsou striktně anaerobní mikroorganismy, tudíž je logické předpokládat, že největší množství bude ve spodní (20 – 30 cm) anoxické vrstvě (Galand et al., 2002) oproti povrchové (0 cm) a svrchní (0 – 10 cm) vrstvě. Z našich výsledků je patné, že množství metanogenů se zvyšovalo s hloubkou, tedy původní hypotéza byla potvrzena. Ve slatiništi (FEN), které je přirozeně více nasycené vodou se množství metanogenů s hloubkou víceméně lineárně zvyšovalo, zatímco na vrchovišti (BOG) výrazně stoupl počet až ve spodní vrstvě (20 – 30 cm). Vhodné podmínky pro metanogeny mohly být u slatiniště díky vyšší hladině vody a lepší dostupnosti substrátů už ve svrchní vrstvě (0 – 10 cm) na rozdíl od vrchoviště, které bývá ve svrchní části sušší, závislé na příjmu vody pouze z dešťových srážek (Galand et al., 2002).

Hloubka a typ rašeliniště měly dále významný vliv i na zastoupení jednotlivých metanogenních čeledí. Největší množství metanogenních čeledí bylo ve spodní vrstvě slatiniště, které je živinově bohatší a vhodnější pro metanogeny oproti živinově chudšímu vrchovišti, kde byla rozmanitost metanoganů o polovinu menší (Urbanová et al., 2013). Acetoklastičtí metanogeni nejvíce osidlují horní vrstvy rašelinišť naopak hydrogenotrofní metanogeni převládají ve spodních vrstvách (Lai et al., 2009). Toto se potvrdilo ve vrchovišti, kde ve svrchní vrstvě bylo nalezeno nejvíce metanogenů čeledě Methanosarcinaceae, kteří mohou tvořit metan i acetoklastickou drahou a ve spodní vrstvě dominovala čeleď Methanomicrobiaceae využívající hydrogenotrofní dráhu. Tato čeleď dominovala také ve spodní vrstvě slatiniště, avšak acetoklastičtí metanogeni čeledě Methanosarcinaceae a Methanosaetaceae byly nalezeny ve svrchní i spodní vrstvě pouze v nepatrném množství, což mohlo být pravděpodobně způsobeno sníženou kvalitou substrátů dostupných pro tyto metanogeny (Urbanová et al., 2015).

6.2 Vliv odvodnění rašeliniště na metanogenní společenstvo

Odvodnění rašelinišť za hospodářským účelem bylo prováděno v minulých stoletích a patří mezi výrazné faktory ovlivňující metanogenní společenstvo v rašeliništích. Odvodnění snižuje vodní hladinu rašelinišť, odkrývá tak vodou nasycenou anaerobní vrstvu,

ze které se postupně stává vrstva aerobní, nevhodná pro růst metanogenů. Metanogeni by měli nejvíce osidlovat přirozeně zavodněné plochy rašelinišť a následně po krátkodobém a dlouhodobém odvodnění by měl počet metanogenů klesat (Urbanová et al., 2013). Výraznější změny by se měly projevit spíše na živinově bohatších slatiništích oproti chudším vrchovištím (Urbanová et al., 2015). Naše data potvrdila obecný trend, že množství metanogenů s odvodněním postupně klesá. Na slatiništi byl po odvodnění pozorován lineární pokles metanogenů. Na vrchovišti se po krátkodobém odvodnění snížilo množství metanogenů na zhruba polovinu, avšak po dlouhodobém odvodnění se počet opět navýšil. Pravděpodobně se metanogeni umí na vodou méně nasycených vrchovištích lépe přizpůsobit podmínkám a tudíž na ně odvodnění nemělo výraznější vliv. Výrazně menší vliv mělo odvodnění vrchovišť i na složení bakteriálního společenstva (Urbanová et al., 2015).

S odvodněním také pokleslo množství metanogenních čeledí. Po dlouhodobém odvodnění zůstali na slatiništi pouze metanogeni tvořící metan hydrogenotrofní drahou a to čeledě Methanobacteriaceae a Methanoregulaceae, na vrchovišti navíc čeleď Methanococcaceae. Hydrogenotrofní metanogeni čeledě Methanomicrobiaceae dominující na obou typech dlouhodobě odvodněných rašelinišť se pravděpodobně umí lépe přizpůsobit chudším podmínkám (Galand, 2004). Redundanční analýza povrchové vrstvy prokázala vliv výšky hladiny vody a typu rašeliniště na variabilitu metanogenů, stejně jako bylo prokázáno ve studii Jaatinen et al. (2007). Bylo také prokázáno, že typ opadu neměl na metanogeny tak velký vliv. S touto variabilitou také koreluje půdní draslík a popelovina. Z výsledků je patrné, že ztráta anaerobního prostředí negativně ovlivňuje metanogeny a díky vyššímu množství metanogenů jsou takové změny znatelnější na živinově bohatších slatiništích.

6.3 Vliv opadu na metanogenní společenstvo

Díky větší rozmanitosti nadzemní vegetace bylo množství metanogenních čeledí v závislosti na typu opadu větší ve slatiništích oproti vrchovištím, což také bylo prokázáno ve studii Andersen et al. (2013). Největší množství metanogenních čeledí bylo zjištěno u kořenů *Pinus sylvestris*, který byl jako jediný typ opadu pod povrchovou vrstvou a tudíž byl více v anaerobních podmínkách vhodných pro růst metanogenů. Dle redundanční analýzy (RDA) vrstvy u kořenů *Pinus sylvestris* byla zjištěna největší variabilita metanogenů v závislosti na typu rašeliniště společně s odvodněním. Bylo zjištěno, že metanogenní společenstva se v přirozených plochách navzájem liší a po dlouhodobém odvodnění se stávají podobnými.

6.4 Vliv hloubky a odvodnění na syntrofní bakterie

V obou typech rašelinišť se množství čeledí syntrofních bakterií zvyšovalo s hloubkou. Nejvíce bylo syntrofních bakterií ve spodní vrstvě, stejně jako tomu bylo u metanogenů, jelikož společně hrají klíčovou roli v degradaci organické hmoty v anaerobním prostředí rašelinišť (Dolfig, 2014). Ve spodní vrstvě měly největší zastoupení čeledě Acetobacteraceae, Syntrophorhabdaceae a Syntrophaceae. Cukr-fermentující bakterie Clostridiaceae 1 anaerobně rozkládají hexosu na acetát a CO₂, které jsou následně využity metanogeny jako substráty pro tvorbu metanu. Metanogeni jim na oplátku pomáhají udržovat parciální tlak H₂ na úrovni 10⁻⁴ až 10⁻⁵ atm a vytváří tak vhodné podmínky pro jejich růst (Morris et al., 2013). Kvůli malému množství hexóz v půdě (Straková et al., 2010) bylo v rašeliništích pravděpodobně nízké množství těchto syntrofních bakterií. Povrchová a svrchní vrstva byla osídlena převážně jen čeledí Acetobacteraceae. Tyto acetát-oxidující bakterie soutěží o substrát s acetoklastickými metanogeny tedy čeledí Methanosarcinaceae a Methanosaetaceae (Morris et al., 2013). Můžeme se domnívat, že ve vrchovišti „vítězí“ syntrofní bakterie Acetobacteraceae, jelikož abundance Methanosaetaceae je tam nulová. Ve slatiništi (FEN) se po odvodnění množství syntrofních bakterií snižovalo, avšak na vrchovišti zůstala abundance poměrně stejná, měnilo se pouze relativní zastoupení čeledí syntrofních bakterií a to na obou typech rašelinišť. Z dostupné literatury nebyl zatím vliv odvodnění na syntrofní bakterie studován.

6.5 Vliv chemických parametrů půdy na abundanci metanogenních čeledí

Statisticky významná korelace v závislosti na množství metanogenů byla zjištěna pouze u čeledě Methanococcaceae. Bylo prokázáno, že čím více bylo půdního dusíku (N), fosforu (P), vápníku (Ca) a železa (Fe), bylo v rašeliništi vyšší množství metanogenů čeledě Methanococcaceae. Dále tato čeleď pozitivně korelovala s pH a popelovinou. Negativně korelovala s celkovým půdním uhlíkem (C) a se vzdáleností k povrchu rašeliniště. Metanogeni čeledě Methanococcaceae jsou hydrogenotrofní, přeměňují CO₂ + H₂ nebo mravenčan na metan a optimální pH pro jejich růst je mezi 6,5 – 8 (Oren, 2014), což mohlo souviset s pozitivní korelací, tedy čím vyšší bylo pH, tím více bylo metanogenů čeledě Methanococcaceae. Podle Vávřová et al. (2009) souvisí půdní popelovina s rychlostí dekompozice, kdy při vyšším obsahu popeloviny v půdě je rozklad organické hmoty rychlejší. Tedy při vyšším obsahu popeloviny (minerálních živin) v půdě mohlo být vyšší

množství metanogenů čeledě Methanococcaceae a tudíž i rychlejší dekompozice organické hmoty. Dále bylo zjištěno, že čím větší bude vzdálenost k povrchu rašeliniště, tím méně bude metanogenů čeledě Methanococcaceae. Toto bylo potvrzeno v našich výsledcích, jelikož s vlivem hloubky čeled' Methanococcaceae postupně klesala (viz Obr. 5, BOG).

7 Závěr

Bylo prokázáno, že největší vliv na množství a diverzitu metanogenů mělo odvodnění rašeliniště související s poklesem hladiny vody a tedy se ztrátou anaerobního prostředí, která měla na metanogeny negativní vliv. Metanogeny také výrazně ovlivnila hloubka a typ rašeliniště. S větší hloubkou byl zjištěn stoupající trend, kdy největší množství a diverzita metanogenů byla ve spodní anaerobní vrstvě (20 – 30 cm). Výraznější změny v množství a diverzitě metanogenů nastaly podle původní hypotézy v živinově bohatších slatiništích. Nejvíce metanogenů bylo u kořenů *Pinus sylvestris*, avšak typ opadu neměl na metanogenní Archaea v rašeliništích až takový vliv. Pravděpodobně byli více ovlivněni okolními mikroorganismy, s kterými bývají často v symbióze. Korelace vybraných chemických parametrů a metanogenů v závislosti na množství ukázala signifikantní výsledek pouze u čeledě Methanococcaceae.

8 Seznam literatury

Abdalla M., Hastings A., Truu J., Espenberg M., Mander U., Smith P. (2016). Emissions of methane from northern peatlands: a review of management impacts and implications for future management options. *Ecology and Evolution*: 1 – 23.

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

Angel R., Claus P., Conrad R. (2012). Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology, Marburg, Germany *The ISME Journal* 6: 847 – 862.

Bergman I., Lundberg P., Nilsson M. (1999). Microbial carbon mineralisation in an acid surface peat: effects of environmental factors in laboratory incubations. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1867 – 1877.

Borrel G., Jézéquel D., Petit C. B., Morel-Desrosiers N., Morel J. P., Peyret P., et al. (2011). Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. *Research in Microbiology* 162: 832 – 847.

Ciais P., Sabine C., Bala G., Bopp L., Brovkin V., Canadell J., et al. (2013): Carbon and Other Biogeochemical Cycles. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Clymo R. S. (1983) Peat. In: Gore A. J. P. (ed.). *Mires: Swamp, Bog, Fen, and Moor (Ecosystems of the world 4A)*. Elsevier, Amsterdam: 159 – 224.

Conrad R. (2007). Microbial Ecology of Methanogens and Methanotrophs. *Advances in Agronomy* 96: 1 – 63.

- Conrad R. (1999). Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 28: 193 – 202.
- Dolfing J. (2014). Syntrophy in microbial fuel cells. *International Society for Microbial Ecology. The ISME Journal* 8: 4 – 5.
- Dubey S. K. (2005). Microbial ecology of methane emission in rice agroecosystem: a review. *Applied ecology and environmental research* 3(2): 1 – 27.
- Edwards C., Hales B. A., Hall G. H., McDonald I. R., Murrell J. C., Pickup R., et al. (1998). Microbiological processes in the terrestrial carbon cycle: methane cycling in peat. *Atmospheric Environment* 32: 3247 – 3255.
- Galand P. E., Saarnio S., Fritze H., Yrjala K. (2002). Depth related diversity of methanogen Archaea in Finnish oligotrophic fen. *FEMS Microbiology Ecology* 42: 441 – 449.
- Galand P. E. (2004). Methanogenic Archaea in boreal peatlands. Academic Dissertation in General Microbiology. Department of Biological and Environmental Sciences Faculty of Biosciences. University of Helsinki.
- Galand P. E., Fritze H., Conrad R., Yrjala K. (2005). Pathways for Methanogenesis and Diversity of Methanogenic Archaea in Three Boreal Peatland Ecosystems. *Applied and environmental microbiology* 71 (4): 2195 – 2198.
- Garcia J. L., Patel B. K. C., Olliver B. (2000). Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe* 6: 205 - 226.
- Gore A. J. P. (1983). *Ecosystems of the World, 4B: Mires: Swamp, Bog, Fen, and Moor. Regional Studies.* Elsevier Scientific Publishing, Amsterdam, The Netherlands.
- Hales B. A., Edwards C., Ritchie D. A., Hall G., Pickup R. W., Saunders J. R. (1996). Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Appl Environ Microb* 62: 668 – 75.

Hedderich R., Whitman W. B. (2006). Physiology and Biochemistry of the Methane-Producing Archaea. The Prokaryotes Volume 2 (Third Edition). Dworkin M. et al. (Eds). Springer. New York: 1050 – 1079.

Horn M. A., Matthies C., Kusel K., Schramm A., Drake H. L. (2003). Hydrogenotrophic Methanogenesis by Moderately Acid-Tolerant Methanogens of a Methane-Emitting Acidic Peat. Applied and environmental microbiology 69(1): 74 – 83.

Chojnacka A., Szczęśny P., Błaszczuk M. K., Zielenkiewicz U., Detman A., Salamon A., Sikora A. (2015). Noteworthy Facts about a Methane - Producing Microbial Community Processing Acidic Effluent from Sugar Beet Molasses Fermentation. PLoS ONE 10 (5): 0128008.

IPCC. (2014). 2013 Supplement to the 2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories: Wetlands. Hiraishi T., Krug T., Tanabe K., Srivastava N., Baasansuren J., Fukuda M., Troxler T. G. (eds). Published: IPCC, Switzerland.

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.

Juottonen H., Galand P. E., Tuittia E. S., Laine J., Fritze H., Yrjala K. (2005). Methanogen communities and *Bacteria* along an ecohydrological gradient in a northern raised bog complex. Environmental Microbiology 7 (10): 1547–1557.

Juottonen H., Galand P. E., Yrjala K. (2006). Detection of methanogenic Archaea in peat: comparison of PCR primers targeting the mcrA gene. Research in Microbiology 157: 914 – 921.

Kamal S., Varma A. (2008). Peatland microbiology. In Dion P., Nautiyal C. S. (eds.) Microbiology of Extreme Soils. Soil Biology 13: 177 – 203.

King G. M. (1996). In Situ Analyses of Methane Oxidation Associated with the Roots and Rhizomes of a Bur Reed, *Sparganium eurycarpum*, in a Maine Wetland. *Applied and environmental microbiology* 62 (12): 4548 – 4555.

Kirschke S., Bousquet P., Ciais P., Saunio M., Canadell J. G., Dlugokencky E. J., et al. (2013). Three decades of global methane sources and sinks, *Nature Geosci.* 6: 813 – 823.

Komulainen V. M., Tuittila E. S., Vasander H., Laine J. (1999). Restoration of drained peatlands in southern Finland: initial effects on vegetation change and CO₂ balance. *Journal of Applied Ecology* 36: 634 – 648.

Kotiaho M., Fritze H., Merila P., Juottonen H., Leppala M. Laine J., et al. (2010). Methanogen activity in relation to water table level in two boreal fens. *Biology and Fertility of Soils* 46: 567 – 575.

Kotsyurbenko O. R., Friedrich M. W., Simankova M. V., Nozhevnikova A. N., Golyshin P. N., Timmis K. N., Conrad R. (2007). Shift from Acetoclastic to H₂-Dependent Methanogenesis in a West Siberian Peat Bog at Low pH Values and Isolation of an Acidophilic *Methanobacterium* Strain. *Applied And Environmental Microbiology* 73 (7): 2344 – 2348.

Lai D. Y. F. (2009). Methane dynamics in northern peatlands: A review. *Pedosphere.* 19 (4): 409 – 421.

Laiho R. (2006). Decomposition in peatlands: Reconciling seemingly contrasting results on the impacts of lowered water levels. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 2011 – 2024.

Laiho R., Vasander H., Penttila T., Laine J. (2003). Dynamics of plant-mediated organic matter and nutrient cycling following long-term water-level drawdown in boreal peatlands. *Global Biogeochem Cycles* 17 (2): 1053.

Landry J., Rochefort L. (2012). The drainage of peatlands: impacts and rewetting techniques. Peatland Ecology Research Group. Université Laval. Québec.

Larmola T., Tuittila E. S., Tirola M., Nykanen H., Martikainen P. J., Yrjala K., Tuomivirta T., Fritze H. (2010). The role of Sphagnum mosses in the methane cycling of a boreal mire. *Ecology*, 91 (8): 2356 – 2365.

Lin Y., Liu D., Ding W., Kang H., Freeman Ch., Yuan J., Xiang J. (2015). Substrate sources regulate spatial variation of metabolically active methanogens from two contrasting freshwater wetlands. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99:10779 – 10791.

Lísalová O. (2014). Fyziologie a ekologie metanogenních Archaeí. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Martí M., Juottonen H., Robroek B. J. M., Yrjala K., Denielsson A., Lindgren P. E., Svensson B. H. (2015). Nitrogen and methanogen community composition within and among three Sphagnum dominated peatlands in Scandinavia. *Soil Biology & Biochemistry* 81: 204 – 211.

McInerney M. J., Struchtemeyer Ch. G., Sieber J., Mouttaki H., Stams A. J. M., Schink B., et al. (2008). Physiology, Ecology, Phylogeny, and Genomics of Microorganisms Capable of Syntrophic Metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 58 – 72.

Minkkinen K., Laine J. (2006). Vegetation heterogeneity and ditches create spatial variability in methane fluxes from peatlands drained for forestry. *Plant Soil* 285: 289 – 304.

Minkkinen K., Vasander H., Jauhiainen S., Karsisto M., Laine J. (1999). Post-drainage changes in vegetation composition and carbon balance in Lakkasuo mire, Central Finland. *Plant and Soil* 207: 107 – 120.

Mitra S., Wassmann R., Vlek P. L. G. (2005). An appraisal of global wetland area and its organic carbon stock. *Current science* 88: 25 – 35.

Morris B. E. L., Henneberger R., Huber H., Eichinger C. M. (2013). Microbial syntrophy: interaction for the common good. *FEMS Microbiology Review* 37: 384 – 406.

Oren A. (2014). The Family Methanococcaceae. *The Prokaryotes, Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea (Fourth Edition)*. Rosenberg E., et al. (Eds). Springer. New York: 253 – 258.

Oren A. (2014). The Family Methanoregulaceae. *The Prokaryotes, Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea (Fourth Edition)*. Rosenberg E., et al. (Eds). Springer. New York: 253 – 258.

Parks D. H., Tyson G. W., Hugenholtz P., Beiko R. G. (2014). STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*.

Rezanezhad F., Price J. S., Quinton W. L., Lennartz B., Milojevic T., Cappellen V. P., (2016). Structure of peat soils and implications for water storage, flow and solute transport: A review update for geochemists, *Chemical Geology*.

Roura C. M., Freeman C. (1999). Methane release from peat soils: effects of Sphagnum and Juncus. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 323 – 325.

Sakai S., Conrad R., Imachi H. (2014). The Family Methanocellaceae. *The Prokaryotes, Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea (Fourth Edition)*. Rosenberg E., et al. (Eds). Springer. New York: 209 – 214.

Schink B., Stams A. J. M. (2006). Syntrophism among Prokaryotes. *The Prokaryotes Vol. 2 (Third Edition)*. *Ecophysiology and Biochemistry*: 309 – 335.

Sieber J. R., Le H. M., McInerney M. J. (2014). The importance of hydrogen and formate transfer for syntrophic fatty, aromatic and alicyclic metabolism. *Environmental Microbiology* 16 (1): 177 – 188.

Singh K. M., Pandya P. R., Parnerkar S., Tripathi A. K., Rank D. N., Kothari R. K., Joshi C. G. (2011). Molecular Identification of Methanogenic Archaea From Surti Buffaloes (*Bubalus Bubalis*), Reveals More Hydrogenotrophic Methanogens Phylotypes. *Brazilian Journal of Microbiology* 42 (1): 132 – 139.

Straková P., Anttila J., Spetz P., Kitunen V., Tapanila T., Laiho R. (2010). Litter quality and its response to water level drawdown in boreal peatlands at plant species and community level. *Plant and Soil* 335: 501 – 520.

Straková P., Penttilä T., Laine J., Laiho R. (2012). Disentangling direct and indirect effects of water table drawdown on above and belowground plant litter decomposition: Consequences for accumulation of organic matter in boreal peatlands. *Global Change Biology* 18: 1354 – 1013.

Tabatabaei M., Rahim R. A., Abdulah N., Wright A. D. G., et al. (2010). Importance of the methanogenic archaea populations in anaerobic wastewater treatments. *Process Biochemistry* 45 (8): 1214 – 1225.

Thauer R. K. (1998). *Biochemistry of methanogenesis : a tribute to Marjory Stephenson*. *Microbiology* 144: 2377 – 2406.

Turunen J., Tomppo, E., Tolonen, K., Reinikainen, A. (2002). Estimating carbon accumulation rates of undrained mires in Finlanddapplication to boreal and subarctic regions. *Holocene* 12: 69 – 80.

Urbanová Z., Bárta J. (2015). Effects of long-term drainage on microbial community composition vary between peatland types. *Soil Biology & Biochemistry* 92: 16 – 26.

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

Vávřová P., Pentilla T, Laiho R. (2009). Decomposition of Scots pine fine woody debris in boreal conditions: Implications for estimating carbon pools and fluxes. *Forest Ecology and Management* 257: 401 – 412.

Valentine D. L. (2007). Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nature Reviews Microbiology* 5: 316 – 323.

Weiss R., Alm J., Laiho R., Laine J. (1998). Modeling moisture retention in peat soils. *Soil Science Society of America Journal* 62 (2): 305 – 313.

Whitman W. B., Bowen T. L., Boone D. R. (2006). *The Methanogenic Bacteria. The Prokaryotes Volume 3 (Third Edition)*. Dworkin M. et al. (Eds). Springer. New York: 165 – 207.

Whitman W. B., Bowen T. L., Boone D. R. (2014). *The Methanogenic Bacteria. The Prokaryotes, Other Major Lineages of Bacteria and the Archaea (Fourth Edition)*. Rosenberg E., et al. (Eds). Springer. New York: 123 – 157.

Yrjala K., Tuomivirta T., Juottonen H., Putkinen A., Lappi K., Tuittila E. S., et al. (2011). CH₄ production and oxidation processes in a boreal fen ecosystem after long-term water table drawdown. *Global Change Biology* 17: 1311 – 1320.

Yu Y., Lee Ch., Kim J., Hwang S. (2005). Group-Specific Primer and Probe Sets to Detect Methanogenic Communities Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Biotechnology and Bioengineering* 89 (6): 670 – 679.