

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

2014

Olga Lísalová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Fyziologie a ekologie metanogenních Archaeí

Bakalářská práce

Olga Lísalová

Školitel: Ing. Jiří Bárta, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Petra Straková, D.Sc.

České Budějovice 2014

Lísalová O. (2014): Fyziologie a ekologie metanogenních Archaeí. [Physiology and ecology of Methanogenic Archaea. Bc. Thesis, in Czech.] – 32 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this study was to obtain the available information about physiology and ecology of methanogenic Archaea. Determine quantity of methanogens in relation to different types of peatlands and different depths of soil. Find out the effect of drainage and revitalization on the number methanogenic Archaea.

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 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, 23. 4. 2014

.....

Olga Lísalová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu práce Ing. Jiřímu Bártovi, Ph.D. za pomoc a rady při psaní bakalářské práce, Mgr. Hance Boškové za pomoc a trpělivost při práci v laboratoři, Mgr. Petře Strakové, D.Sc. za rady a poskytnuté vzorky. V neposlední řadě děkuji mé rodině a příteli za podporu při studiu.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	2
2.1. Archaea	2
2.1.1. Metanogenní Archaea.....	2
2.2. Koloběh uhlíku a role metanu.....	3
2.3. Metanogeneze	4
2.4. Ekologie metanogenních Archaeí.....	7
2.4.1. Rašeliniště a metanogenní Archaea.....	8
2.5. Druhy metanogenních Archaeí	9
2.5.1. Řád Methanobacteriales	9
2.5.2. Řád Methanomicrobiales.....	9
2.5.3. Řád Methanococcales	10
2.5.4. Řád Methanosarcinales.....	10
2.5.5. Řád Methanopyrales	10
2.6. Stanovení počtu metanogenních Archaeí v půdě.....	11
3. Materiály a metody.....	12
3.1. Popis lokalit	12
3.1.1. Šumava	12
3.1.2. Lakkasuo.....	13
3.2. Odběr a zpracování vzorků	14
3.3. Extrakce DNA.....	16
3.4. Kvantifikace metanogenních Archaea pomocí qPCR.....	17
4. Výsledky a diskuze.....	19
5. Závěry.....	23
6. Seznam zkratk	24
7. Seznam literatury.....	25
8. Přílohy	28

1. Úvod

Metanogenní Archaea jsou významnou skupinou mikroorganismů produkující metan a obývající anaerobní prostředí, tedy mořské sedimenty, trávící trakty přežvýkavců a spodní anoxické vrstvy mokřadů. Jsou rozděleny podle různé dráhy metanogeneze na acetoklastické, methylotrófní a hydrogentrofní metanogenní Archaea. Díky metanogenním Archaeím jsou rašeliniště považována za důležité zdroje metanu, významného skleníkového plynu, podílejícího se na koloběhu uhlíku a ovlivnění globálního klimatu. V minulosti byla rašeliniště odvodňována za účelem těžby, v tomto důsledku poklesly emise metanu, tedy i počet metanogenních Archaeí v rašeliništi. V současné době je snaha rašeliniště opět revitalizovat, tudíž se předpokládá zvýšení emisí metanu a návrat metanogenních Archaeí.

Cíle práce:

Zpracovat rešerši o metanogenních Archaea.

Stanovit a porovnat počet metanogenních Archaeí v různých typech rašelinišť a v různých hloubkách pomocí kvantitativní PCR.

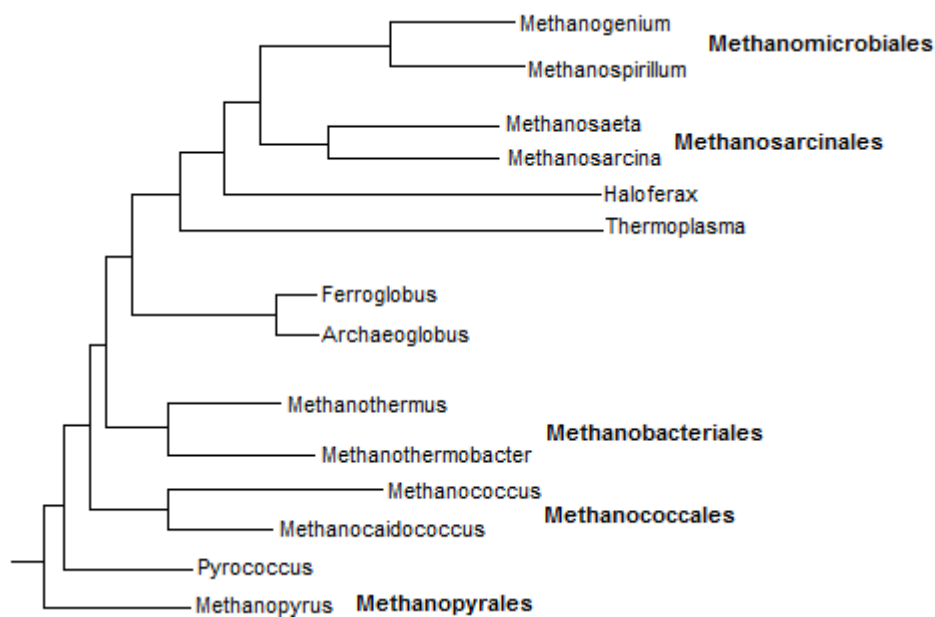
Zjistit vliv odvodnění a revitalizace na počet metanogenních Archaeí.

2. Literární přehled

2.1. Archaea

Doména Archaea je skupina jednobuněčných organismů patřící do prokaryot. V minulosti byly Archaea nazývány spolu s bakteriemi jako archebakterie, ale tato klasifikace je již zastaralá. Nyní jsou klasifikovány, jako jedna samostatná skupina v systému tří domén. V tomto systému jsou odlišné větve evolučního původu, kterými jsou Archaea, Bakterie a Eukaryota (Madigan et al., 2012).

Archaea jsou rozděleny do pěti kmenů. Kmen Crenarchaeota, pro který jsou typická extrémně horká, kyselá prostředí a získávání energie pomocí síry. Kmen Euryarchaeota, do kterého se řadí metanogenní (Obr. 1) a halofilní organismy. Dalšími kmeny jsou Korarchaeota, Nanoarchaeota a Thaumarchaeota (Barker, 2010).



Obr. 1: Fylogenetický vztah metanogenních Archaeí a příbuzných euryarchaeot (Hedderich et al., 2006).

2.1.1. Metanogenní Archaea

Metanogenní Archaea jsou mikroorganismy, patřící do kmene Euryarchaeota, kteří získávají jejich energii potřebnou k růstu z procesu biosyntézy metanu neboli metanogeneze.

Všechny metanogenní Archaea jsou obligátními producenty metanu a jsou jedinečně specializovány pro tento styl života (Hedderich et al., 2006).

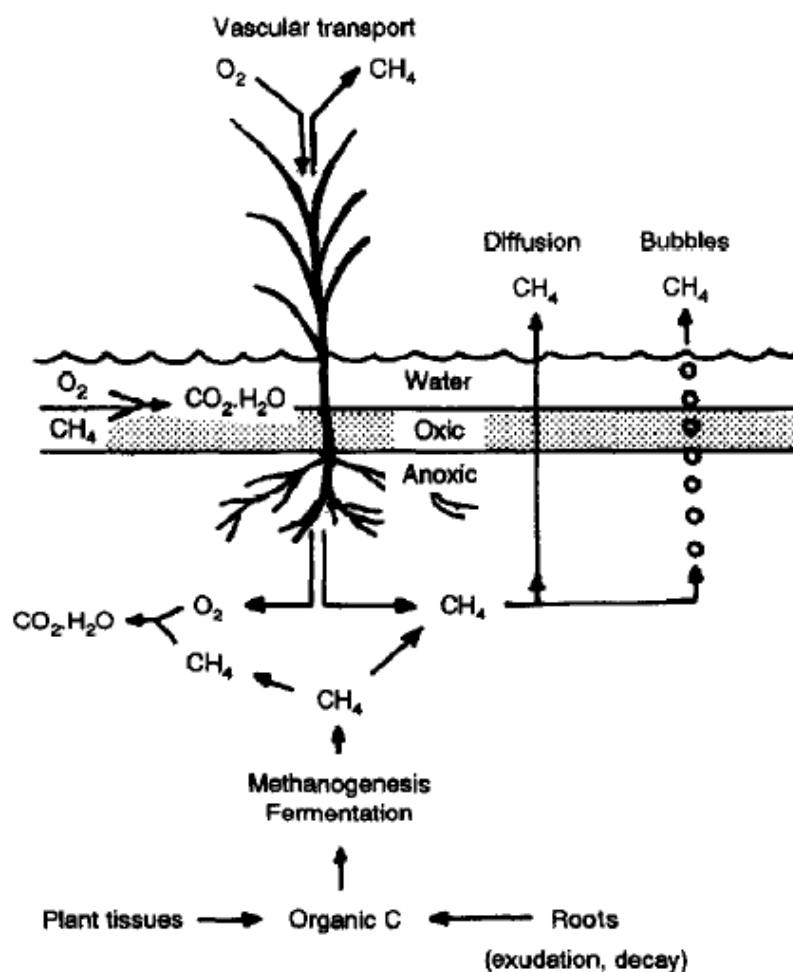
Metanogenní Archaea jsou kosmopolitní, byly nalezeny v rozmanitém anaerobním prostředí po celé zeměkouli. Kromě mnoha mírných stanovišť s průměrnými teplotami, jsou také běžné v prostředí extrémních teplot a salinit (Hedderich et al., 2006). Nejčastěji se vyskytují v zaplavených půdách, anoxických sedimentech a gastrointestinálním traktu zvířat (Whitman et al., 2006).

Metanogenní Archaea mají velmi rozmanité velikosti a tvary buněk, zahrnující tyčinky, pravidelné i nepravidelné koky, spirály a méně obvyklé s plochým tvarem (Garcia et al., 2000).

2.2. Koloběh uhlíku a role metanu

Koloběh uhlíku je biogeochemický cyklus, ve kterém je oxid uhličitý vyměňován mezi atmosférou, hydrosférou a biosférou Země. Uhlíkový cyklus je úzce spojen s koloběhem kyslíku, přes oxidační a redukční reakce cyklů mnoha dalších prvků. Na zemi je oxid uhličitý fixován a uložen v rostlinných a zvířecích tkáních a v půdní organické hmotě (White et al., 1992). Kromě oxidu uhličitého se na koloběhu uhlíku podílí také metan, který je druhým nejvýznamnějším skleníkovým plynem. I přes krátkou dobu životnosti v atmosféře, která je přibližně osm let, je metan 25 krát silnější skleníkový plyn než oxid uhličitý (Nazaries et al., 2013).

Atmosférický metan (CH_4) je ze 70 – 80 % biologického původu, jehož hlavním zdrojem jsou mikrobiální procesy v rašeliništích, rýžových polích a v zažívacím traktu přežvýkavců. Metanogenní Archaea produkují metan v anaerobních oblastech podmáčených půd, který je dále oxidován na oxid uhličitý metanotrofními bakteriemi v aerobních oblastech mokřadů a horských půd (Mer et al., 2001). K přenosu metanu z půdy do atmosféry dochází třemi hlavními způsoby, kterými jsou difuze, kypění a transport prostřednictvím rostlinného pletiva (Obr. 2). Metan, který je vyroben v anaerobní vrstvě půdy, je do atmosféry přenesen difuzí. Druhým způsobem přenosu je kypění, při kterém metan uniká ve formě plyných bublinek (Lai, 2009). K přenosu dochází také přes aerenchym (velké plynové prostory v rostlinné tkáni), který slouží jako „plynové potrubí“, přenášející metan z anoxické oblasti do atmosféry, čímž obchází oxidační zónu. (Bubier et al., 1994).



Obr. 2: Schéma koloběhu metanu znázorňující produkční, oxidační a transportní mechanismy (Conrad et al., 1989).

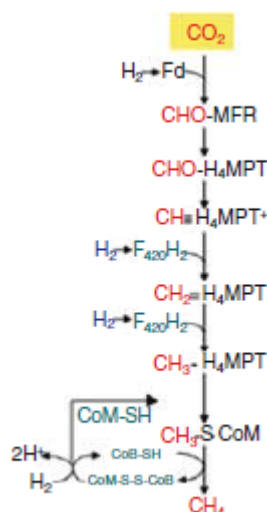
2.3. Metanogeneze

Metanogeneze je unikátní série biochemických reakcí, při kterých jsou využívány specifické koenzymy. Tento proces biologické produkce metanu vykonávají právě striktně anaerobní metanogenní Archaea (Madigan et al., 2012). Metanogenní Archaea se vyskytují v anaerobním prostředí, kde nejsou přítomny sírany, oxidované kovy a dusičnany. V tomto prostředí jsou substráty pro metanogenezi snadno dostupné, jako fermentační produkty bakterií a eukaryot. Metanogenní Archaea katalyzují konečný krok v anaerobním potravním řetězci, kde jsou postupně komplexní biopolymery přeměněny na metan a oxid uhličitý (Hedderich et al., 2006). V tomto potravním řetězci jsou nejprve degradovány polymery na jednoduché cukry, disacharidy, laktát, těkavé mastné kyseliny (VFA) a alkoholy, pomocí

specializovaných mikroorganismů, zahrnující hydrolytické, fermentační, syntropní a acetogenní bakterie (Nazaries et al., 2013). Dále přeměňují jednoduché cukry na těkavé mastné kyseliny a alkoholy, které jsou přeměňovány na acetát, H_2 a CO_2 (Hedderich et al., 2006).

Metanogeneze je rozdělena na tři hlavní způsoby tvorby metanu, kterými jsou hydrogenotrofní, acetoklastická a methylotrófní dráha. Nejdůležitějšími substráty těchto reakcí jsou oxid uhličitý, acetát a sloučeniny obsahující methylovou skupinu (Nazaries et al., 2013). Hlavními donory elektronů jsou H_2 , mravenčan a acetát. Některé metanogenní Archaea používají jako donory elektronů alkoholy, jako jsou 2 – butanol, 2 - propanol, etanol a cyklopentanol (Hedderich et al., 2006).

Přeměna oxidu uhličitého na metan začíná přes transportní vazbu jedno uhlíkatých meziproductů. Do této reakce jsou zapojeny přenašeče, jako je metanofuran (MFR), tetrahydrometanopterin (H_4MPT) a jeho deriváty nebo 2 – mercaptoetansulfonát (koenzym M, CoM–SH). Na Obrázku 3 je reakční schéma hydrogenotrofní dráhy začínající redukcí dvou elektronů oxidu uhličitého a metanofuranu na formyl-MFR, kde je formylová skupina vázána na amino-skupinu koenzymu. Formylová skupina je poté přenesena na N5 tetrahydrometanopterinu, formyl- H_4MPT je cyklizován na methenyl- H_4MPT , který je ve dvou krocích redukován na methyl- H_4MPT . Methyl- H_4MPT je dále přeneseno na thiolovou skupinu koenzymu M. V posledním kroku této dráhy je vytvořený methylthioether přeměněn na metan (Hedderich et al., 2006).

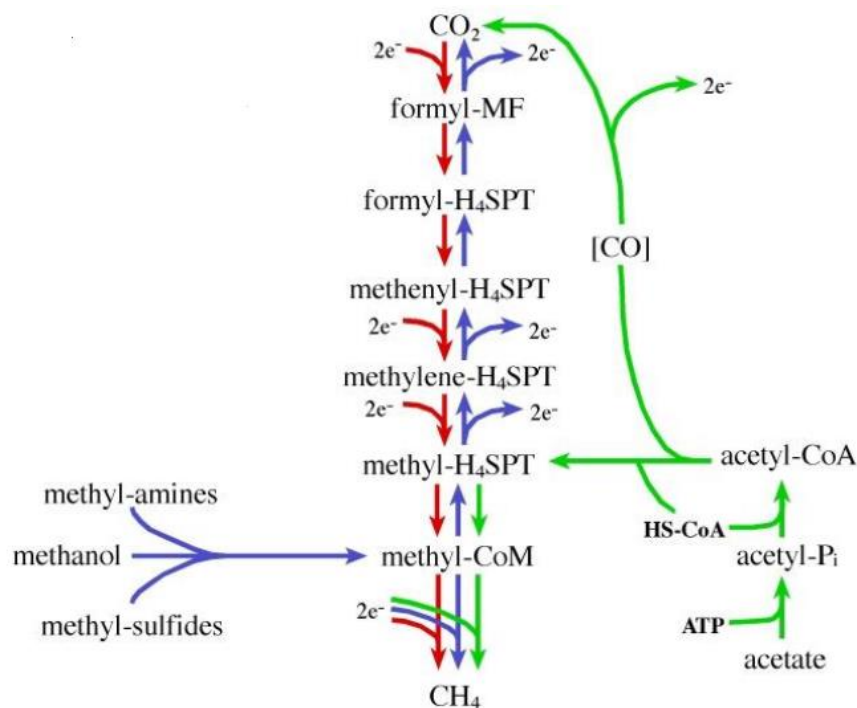


Obr. 3: Schéma redukce oxidu uhličitého na metan (Hedderich et al., 2006).

Druhým způsobem tvorby metanu je acetoklastická dráha (Obr. 4), ve které je hlavním substrátem acetát, který je štěpen na metan a oxid uhličitý. V této reakci je methyl acetát redukován na metan pomocí elektronů získaných z oxidace karboxyl acetátu (Hedderich et al., 2006).

Methylotrofní dráha je třetím typem tvorby metanu, do které patří substráty C₁ sloučenin obsahující methylovou skupinu uhlíku vázající se na kyslík, dusík nebo síru. Sloučeniny tohoto typu zahrnují metanol (Obr. 4), dimethylamin, trimethylamin monomethylamin, dimethylsulfid a metanthiol. Methylová skupina vstupuje do C₁ dráhy na úrovni koenzymu M a je redukována na metan (Hedderich et al., 2006).

Ačkoliv, každá dráha začíná rozdílně, všechny končí shodným krokem, reakcí methyl koenzymu M (CH₃-S-CoM) se sekundárním thiolovým koenzymem, nazývaným koenzym B (CoB-SH) na metan a smíchané disulfidy koenzymu M a koenzymu B. Tato reakce je katalyzována methyl-koenzym M reduktázou (Mcr), jež je klíčovým enzymem v metanogenezi. V aktivním místě tohoto enzymu je unikátní prostetická skupina, porfinoid niklu, nazývaný koenzym F₄₃₀ (Hedderich et al., 2006).



Obr. 4: Acetoklastická (zelená), methylotrofní (modrá) a hydrogenotrofní (červená) dráha metanogeneze (Galagan et al., 2002).

2.4. Ekologie metanogenních Archaeí

Metanogeneze je dominantní proces v mnoha anaerobních prostředích, které obsahují velké množství snadno odbouratelných organických látek. Většinu atmosférického metanu produkují metanogenní Archaea (Hedderich et al., 2006), které jsou obvykle nalezeny v místech, kde se organická hmota rozkládá za nepřítomnosti kyslíku nebo jiných oxidačních činidel jako jsou dusičnany nebo sírany (Conrad, 2009).

V Tabulce I jsou ukázány hlavní zdroje atmosférického metanu. Průměrná celková hodnota atmosférického metanu se pohybuje v řádu 500 – 600 Terragramů za rok. Za biogenní zdroje jsou považovány mikrobiální procesy v mokřadech, rýžových polích, tundrách a v zažívacím traktu hospodářských zvířat. Mezi antropogenní zdroje patří těžba uhlí, spalování fosilních paliv či biomasy.

Tab. I: Zdroje atmosférického metanu (převzato z Tyler, 1991 a Reeburgh, 2003).

Zdroje metanu		Metan (Terragram CH ₄ / rok)*
Biogenní zdroje	Přírodní mokřady	92
	Rýžová pole	88
	Hospodářská zvířata	81
	Rozklad hnoje	14
	Termiti	25 - 150
	Skládky	15 - 81
	Oceány	38 - 308
	Tundra	42
Mezisoučet		395 - 856
Jiné zdroje	Spalování biomasy	50
	Uhelné doly	10 - 35
	Odvzdušnění a zapalování	15 - 30
	Průmyslové a potrubní ztráty	15 - 45
	Hydráty metanu	5
Mezisoučet		95 - 165
Součet		600 (490 - 1021)

* 1Tg = 10¹²g

Největším samostatným zdrojem mikrobiálního metanu jsou mokřady a rýžová pole. Podobně velké množství metanu je vypuštěno z trávicího traktu hospodářských zvířat. Střevní fermentace termitů, produkce metanu v oceánech nebo uvolnění metanu z plynných hydrátů jsou poměrně malé, ale významné zdroje atmosférického metanu. (Conrad, 2009).

Ne všichni biologicky vyrobený metan je spotřebován nebo uvolněn do atmosféry. Velké množství metanu z mikrobiálních procesů je zachyceno hydráty metanu, které se tvoří, když je metan přítomen v prostředí s vysokým tlakem a nízkými teplotami (Madigan et al., 2012).

2.4.1. Rašeliniště a metanogenní Archaea

Rašeliniště jsou trvale zaplavené ekosystémy, ve kterých jsou odumřelé části rostlin přeměněny v anaerobním prostředí na rašelinu. Díky metanogenním Archaeím obývající tyto ekosystémy jsou rašeliniště považována za významný zdroj metanu, který se podílí na globálním koloběhu uhlíku. V minulosti se rašeliniště vysušovala pro účely lesního hospodářství a těžby, avšak v dnešní době se tyto ekosystémy začaly opět obnovovat. Při odvodnění rašelinišť dochází ke snížení emisí metanu, kvůli změně počtu organických substrátů pro metanogenní Archaea. Dlouhodobé odvodnění může mít vliv na snížení počtu metanogenních Archaeí a jejich diverzitu v důsledku toxicity kyslíku. Obnovení vodního režimu je v současné době běžná metoda s cílem zastavit degradaci rašelinišť způsobenou odvodňováním. (Urbanová et al., 2013). Otázkou stále zůstává jak na vysušení a případné opětovné zamokření rašelinišť zareagují metanogenní Archaea. Zda se např. po opětovném zaplavení obnoví původní metanogenní společenstvo a pokud ano, jak dlouhou dobu k tomu bude potřebovat.

2.5. Druhy metanogenních Archaeí

Metanogenní Archaea mohou být fylogeneticky rozděleny do pěti řádů: Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Methanococcales, Methanosarcinales a Methanopyrales (Garcia et al., 2000). V současné době je známo asi dvacet šest rodů a více než šedesát druhů těchto Archaeí (Mer, 2001).

2.5.1. Řád Methanobacteriales

Metanogenní Archaea patřící do řádu Methanobacteriales mají obvykle tyčinkovitý tvar tvořící dlouhé řetězce. Jejich buněčná stěna obsahuje pseudomurein a buněčná membrána je tvořena lipidy zahrnující caldarchaeol a myo-inositol. Spolu s ostatními metanogenními Archaei obývají striktně anoxická prostředí, jako jsou mořské a sladkovodní sedimenty, rýžová pole a trávicí trakt zvířat. Zástupci tohoto řádu jsou převážně hydrogenotrofní, k redukci oxidu uhličitého na metan využívají H_2 . Někteří zástupci využívají jako donory elektronů mravenčan, oxid uhelnatý nebo sekundární alkoholy. Řád methanobacteriales se dělí na dvě čeledě, kterými jsou Methanobacteriaceae a Methanothermaceae (Bonin et al., 2006). Archaea z čeledě Methanothermaceae obývají prostředí geotermálních vod, kde se teplota vody pohybuje mezi 80 – 90 °C (Whitman et al., 2006).

2.5.2. Řád Methanomicrobiales

Zástupci řádu Methanomicrobiales mají tvar malých tyčinek a nepravidelných koků, u většiny z nich se vyskytuje také bičík. Buněčná membrána obsahuje lipidy, jako jsou galaktóza, glukosa, glycerol a aminopentanetetrol. Buněčná stěna je tvořena speciálním krystalicky uspořádaným glykoproteinem nazývaným S-vrstva. Všechny metanogenní Archaea tohoto řádu redukují metan hydrogenotrofní dráhou $H_2 + CO_2$, někteří v této dráze využívají také mravenčan nebo sekundární alkoholy. Do řádu Methanomicrobiales patří tři čeledě: Methanomicrobiaceae, Methanocorpusculaceae a Methanospirillaceae (Garcia et al., 2006).

2.5.3. Řád Methanococcales

Archaea z řádu Methanococcales jsou asi 1 – 3 μm velké nepravidelné koky vyskytující se v mořském a přímořském prostředí. Buňky se pohybují pomocí bičíků uspořádaných v chomáčcích nebo svazcích. Buněčná stěna je tvořena proteinovou S-vrstvou. Jako elektronový akceptor využívají při metanogenezi oxid uhličitý a elektronovými donory bývají H_2 a mravenčan. Pro optimální růst vyžadují přísun mořské soli a selenu. Tento řád zahrnuje čeledě Methanococcaceae a Methanocaldococcaceae (Whitman a Jeanthon, 2006). Vyskytují se zde mezofilní i termofilní organizmy, tedy snesou teplotu mezi 18 – 94 °C (Garcia et al., 2006).

2.5.4. Řád Methanosarcinales

Metanogenní Archaea řádu Methanosarcinales mají tvar nepravidelných koků nebo tyčinek. Jejich buněčná stěna je tvořena glykoproteinovou S-vrstvou a metanochondrocinem. Cytoplazmatická membrána obsahuje lipidy, jimiž jsou etanolamin, myo-inositol a glycerol. Při tvorbě metanu využívají všechny tři hlavní dráhy, při kterých se redukuje oxid uhličitý, acetát nebo sloučeniny s methylovou skupinou na metan. Tento řád má dvě čeledě: Methanosarcinaceae a Methanosaetaceae (Kendall et al., 2006).

2.5.5. Řád Methanopyrales

Řád Methanopyrales zahrnuje čeleď Methanopyraceae, do které patří jediný druh *Methanopyrus kandleri*. Tento hypertermofilní organismus tyčinkovitého tvaru roste při teplotě kolem 110 °C v hydrotermálních mořských sedimentech. Buněčná stěna je tvořena pseudomureinem a cytoplazmatická membrána obsahuje galaktózu a manózu. Pro tvorbu metanu využívají hydrogenotrofní dráhu (Garcia et al., 2000).

Zástupci těchto řádů mají rozmanité vlastnosti, jejich buněčné stěny a cytoplazmatické membrány obsahují různé chemické látky a liší se také tvorbou metanu. V Tabulce II jsou zobrazeny hlavní energetické substráty potřebné při metanogenezi a optimální teploty vybraných čeledí.

Tab. II: Hlavní energetické substráty metanogeneze u vybraných čeledí (Hedderich et al., 2006).

Čeď	Hlavní energetické substráty	Optimální teplota (°C)
Methanobacteriaceae	H ₂ , (mravenčan, alkoholy)	37 - 65
Methanothermaceae	H ₂	80 - 88
Methanococcaceae	H ₂ , mravenčan	35 - 65
Methanocaldococcaceae	H ₂	80 - 88
Methanomicrobiaceae	H ₂ , mravenčan (alkoholy)	15 - 57
Methanospirillaceae	H ₂ , mravenčan (alkoholy)	30 - 37
Methanocorpusculaceae	H ₂ , mravenčan (alkoholy)	30 - 40
Methanosarcinaceae	Metanol, MeNH ₂ , H ₂ + Metanol, H ₂ + MeNH ₂ , Acetát, H ₂	23 - 60
Methanosaetaceae	Acetát	35 - 60
Methanopyraceae	H ₂	98

2.6. Stanovení počtu metanogenních Archaeí v půdě

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) je metoda, používaná k přesné kvantifikaci určitého zájmového genu v prostředí. Dojde při ní k namnožení daného úseku DNA, který je syntetizován podle tzv. templátové DNA. K této reakci je zapotřebí enzym DNA-polymeráza, nukleotidy dNTP a specifické primery, které jsou zacílené na sledovaný gen. V případě metanogenních Archaeí je to gen *mcrA*, který kóduje methyl koenzym M reduktázu, která je charakteristická pouze pro metanogenní Archaea. Během reakce se pomocí fluorescenčního barviva (např. barvivo SYBR Green vázající se na dvouřetězcovou DNA) detekuje množství produktu přítomného v reakční směsi v reálném čase. Mezi jednotlivými cykly je měřena fluorescence, jejíž intenzita je přímo úměrná množství amplifikovaného produktu ve vzorku.

3. Materiály a metody

3.1. Popis lokalit

Vzorky půdy byly odebrány ze šumavských, třeboňských a finských rašelinišť, půda byla následně zpracována a analyzována.

3.1.1. Šumava

Národní park Šumava se nachází v jihozápadní části České republiky a představuje dva hlavní typy rašelinišť: ombrotrofní vrchoviště a minerotrofní slatiniště. Vrchoviště je chudé na živiny, přijímá vodu a živiny pouze srážkami, má nižší hladinu vody a také nízké pH. Slatiniště je živinami bohaté, přísun vody a živin má z okolní minerální půdy, má vyšší hladinu vody a také vyšší pH. Experiment byl proveden na původním vrchovišti (BOGP), původním minerotrofním slatiništi (FENP), odvodněném vrchovišti (BOGL) a odvodněném minerotrofním slatiništi (FENL), která byla odvodněna dlouhodobě. Vrchoviště (48° 58' 34" N, 13° 27' 24" E) v nadmořské výšce 1200 m n. m. se nacházejí v centrální výšině Šumavy s ročními teplotami okolo 3,2 °C a ročními srážkami 1300 mm. Odvodněná vrchoviště (49° 10' 59" N, 13° 19' 6" E), minerotrofní slatiniště (49° 9' 19" N, 13° 22' 8" E) a odvodněná minerotrofní slatiniště (49° 10' 46" N, 13° 19' 22" E) se rozprostírají v nadmořské výšce 900 m n. m. v údolí řeky Křemelné s ročními teplotami okolo 4 °C a ročními srážkami 1000 mm (Urbanová et al., 2012). Odběrová místa se liší chemickým složením půdy, výškou vodní hladiny a hodnotou pH (Tab. III).

Původní vrchoviště je zastoupeno horskými stráněmi, které pokrývají vlhké kotliny, sušší pahorky a trávníčky s otevřenou centrální částí, kde se vyskytují *Pinus x pseudopumilio*, *Vaccinium uliginosum* a *Eriophorum vaginatum*. Mechová vrstva je tvořena *Sphagnum rubellum* a *S. cuspidatum*. Odvodněné vrchoviště je pokryto v sušších místech *Vaccinium uliginosum* a *Molinia caerulea*, zatímco *Betula pubescens* pokrývá celou plochu. Mechy *Polytrichum strictum* a *Sphagnum russowii* pokrývají povrch vrchoviště. Původní minerotrofní slatiniště je pokryto *Carex rostrata* a *Sphagnum flexuosum*. V odvodněném minerotrofním slatiništi se ve vlhčích místech vyskytuje *Carex rostrata*, naopak v místech sušších nalezneme *Carex nigra* a *Molinia caerulea* (Urbanová et al., 2012).

Tab. III: Charakteristické vlastnosti šumavských odběrových míst (Urbanová et al., 2012).

	BOGP	BOGL	FENP	FENL
Celkový C (%)	47,9	48,4	43,4	32,8
Celkový N (%)	1,86	1,42	1,72	1,50
Celkový P (%)	0,06	0,06	0,10	0,13
Výška vodní hladiny (cm)	-9,4	-21,2	-6,5	-30,6
pH	4,2	4,2	5,7	4,6

P – přirozené rašeliniště, L – dlouhodobě odvodněné rašeliniště

3.1.2. Lakkasuo

Rašeliniště Lakkasuo se nachází ve středním Finsku (61° 48' N, 24° 19' E) s nadmořskou výškou 150 m n. m, zahrnující rozsáhlou zamokřenou minerotrofní obvodovou zónu - lagg. V této oblasti jsou průměrné roční teploty pro leden a červenec okolo -8,9 °C a 15,3 °C. Roční úhrn srážek se pohybuje okolo 710 mm, z nichž 1/3 jsou srážky sněhové. Experiment zahrnoval původní minerotrofní (mezotrofní) slatiniště (FENP), původní vrchoviště (BOGP), odvodněné minerotrofní (mezotrofní) slatiniště (FENL) a odvodněné vrchoviště (BOGL), která byla odvodněna dlouhodobě a krátkodobě (Jaatinen et al., 2007). Ve výsledcích jsou porovnávány pouze dlouhodobě odvodněné plochy.

Pro původní mezotrofní slatiniště jsou charakteristické *Carex rostrata* a bylinné druhy jako *Potentilla palustris* a *Menyanthes trifoliata*. Mechová vrstva je pokryta *Sphagnum fallax* a *Warnstorfia exannulata*. Nejhojnějšími druhy původního vrchoviště jsou *Eriophorum vaginatum*, *Rubus chamaemorus* a *Sphagnum balticum*. Dlouhodobé odvodnění způsobilo velké změny ve vegetaci, mezotrofní slatiniště pokrývají především husté stromové porosty *Pinus sylvestris*, *Betula pubescens* a *Picea abies*. Vrchoviště je tvořeno *Pinus sylvestris*, *Pleurozium schreberi* a *S. angustifolium* (Jaatinen et al., 2007). Odběrová místa se liší chemickým složením půdy, výškou vodní hladiny a hodnotou pH (Tab. IV).

Tab. IV: Charakteristické vlastnosti finského rašeliniště Lakkasuo (Peltoniemi, 2010).

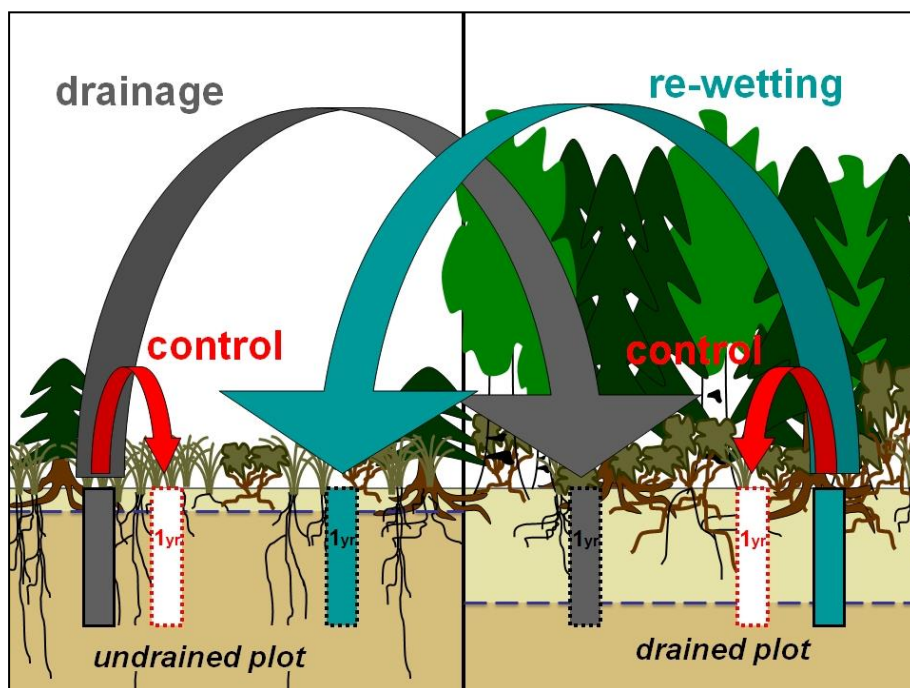
	BOGP	BOGL	FENP	FENL
Celkový C (%)	48,97	50,40	44,70	48,80
Celkový N (%)	0,87	1,48	2,11	1,52
Celkový P (%)	0,0170	0,0814	0,0851	0,0704
Výška vodní hladiny (cm)	-10	-23	5	-27
pH	4,4	3,7	5,9	3,8

P – přirozené rašeliniště, L – dlouhodobě odvodněné rašeliniště

3.2. Odběr a zpracování vzorků

Manipulativní experiment v rámci projektu Petry Strakové probíhá na rašeliništi Lakkasuo ve Finsku, na šumavských a třeboňských rašeliništích v České republice. Pro bakalářskou práci jsem z těchto experimentálních vzorků extrahovala DNA a provedla kvantifikaci pomocí kvantitativní PCR.

V rašeliništích byly naprofilovány vzorky půdy, kdy byla půda odebrána do hloubky 50 cm. Takto odebraná půda byla „nasekána“ po 10 cm, každý nasekaný kvádrík byl rozporcován na menší kusy a následně dále využíván: lyofilizace vzorků na analýzy, měření sušiny, využití pro dekompoziční experiment. Při tomto experimentu byl zvážený plátek rašeliny zastrčen do speciálního sáčku a vrácen zpět do stejné hloubky, ze které byl vzorek odebrán. Návrh experimentu (Obr. 5): Rašelina z původního (mokrého) rašeliniště byla přenesena do rašeliniště odvodněného. Rašelina z odvodněného rašeliniště byla přenesena do původního rašeliniště. Rašelina byla pro kontrolu ponechána v původních podmínkách: původní rašelina v původním rašeliništi, odvodněná rašelina v odvodněném rašeliništi (Straková, 2013).

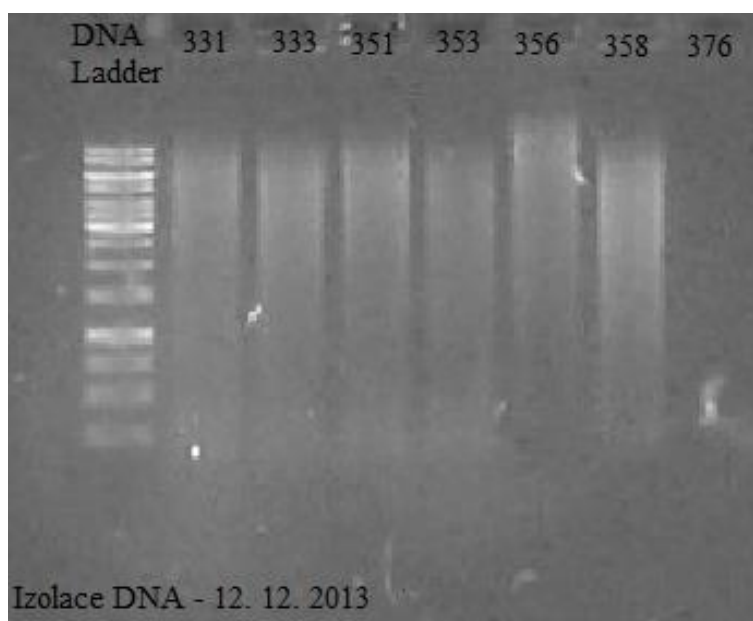


Obr. 5: Design transplantačného experimentu (©Straková, 2013).

3.3. Extrakce DNA

Extrakce DNA z půdy byla provedena podle postupu publikovaného Ulrich et al. (2008) s menšími modifikacemi. Ke vzorkům, jejichž navážené množství bylo v rozmezí 0,045 – 0,055 g, bylo přidáno 0,7 ml extrakčního pufru. Poté byly vzorky vloženy cca na 30 min do třepačky (Labnet Vortex Mixer VX – 100). Během třepání byly vzorky kontrolovány, k některým vzorkům bylo přidáno cca 0,2 ml extrakčního pufru z důvodu lepšího promíchání s půdou. Následující kroky byly provedeny dle postupu. Úspěšnost izolace byla ověřena 1% agarozovým gelem při gelové elektroforéze za podmínek 90 V, 500 mA a 45 min (Obr. 6).

Množství izolované DNA ve vzorku bylo kvantifikováno fluorescenčně pomocí SybrGreen na přístroji StepONE Real-Time PCR Systém (Applied Biosystems, USA) podle postupu Leininger et al. (2006).

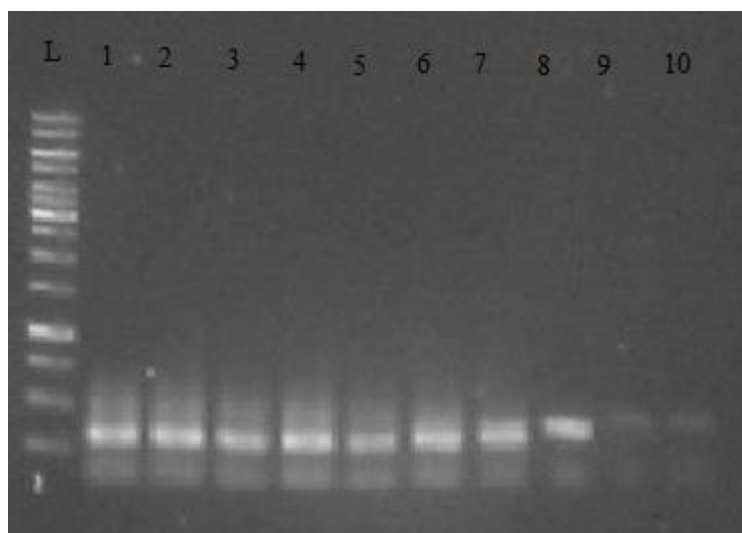


Obr. 6: Ukázkový gel (1% agarosa, $8V \cdot cm^{-1}$, 45min) extrahovaných vzorků (výsledky zbývajících vzorků, viz příloha č. 1).

3.4. Kvantifikace metanogenních Archaea pomocí qPCR

Ve vzorcích půdy byl pomocí kvantitativní PCR stanoven obsah genu *mcrA* kódující koenzym M, specifický pro metanogenní Archaea.

Kalibrační křivka standardu byla vytvořena pomocí klasické PCR, při které byl gen *mcrA* rodu *Methanosarcina* amplifikován za těchto 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. Na destičku bylo pipetováno 24 µl Master Mixu, do jedné jamky byl přidán 1 µl PCR vody jako negativní kontrola, do dalších bylo přidáno postupně 1 µl DNA metanogenní Archaea rodu *Methanosarcina*. Vše bylo pipetováno ve dvou opakováních. Úspěšnost amplifikace byla ověřena gelovou elektroforézou. Produkt byl přečištěn pomocí QIAquick PCR Purification Kit a naředěn desítkovým ředěním v poměru 1 : 9 (10^{-1} – 10^{-8}). Kalibrační křivka standardů byla testována qPCR a výsledek byl opět ověřen gelovou elektroforézou (Obr. 7).



Obr. 7: Ověření kalibrační křivky standardu na agarozovém gelu.

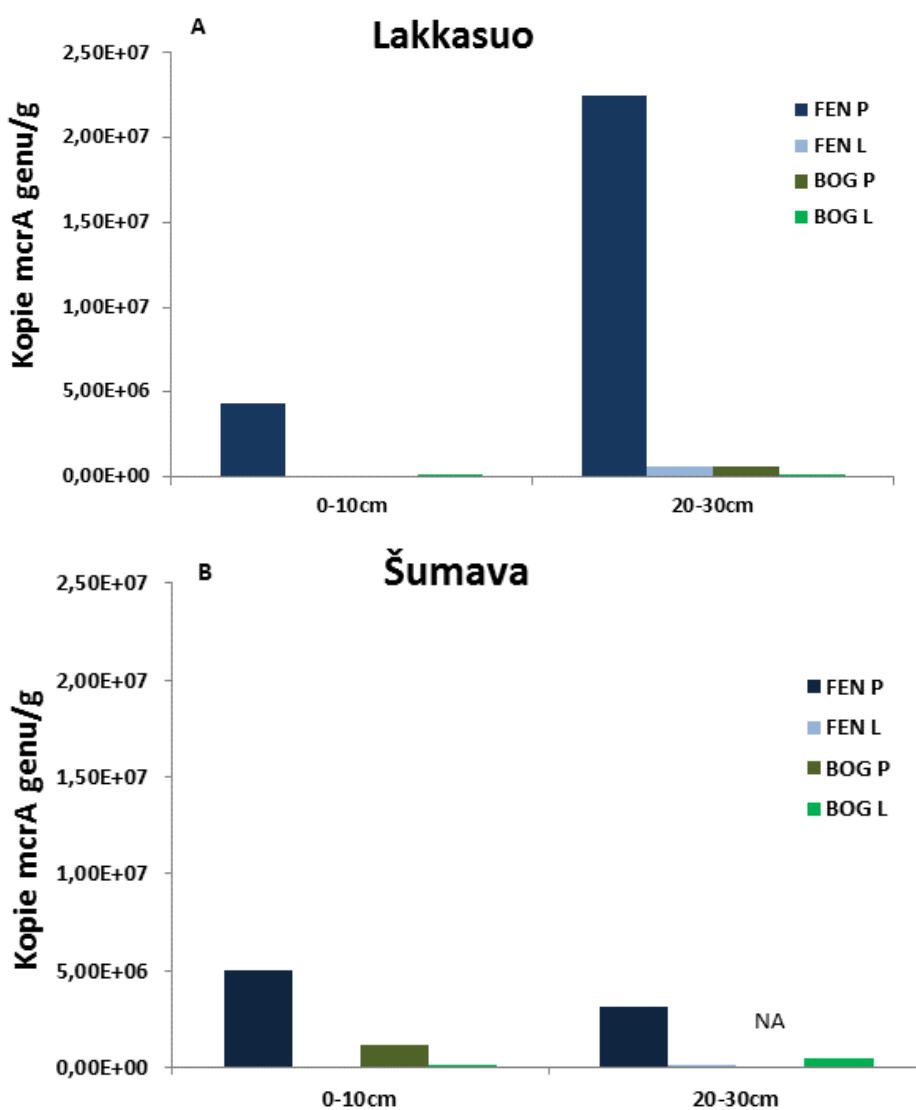
Pořadí vzorků: L - DNA Ladder 1 kb, 1 – ředění 10^{-1} , 2 – ředění 10^{-2} , 3 - ředění 10^{-3} , 4- ředění 10^{-4} , 5 - ředění 10^{-5} , 6 - ředění 10^{-6} , 7 - ředění 10^{-7} , 8 - ředění 10^{-8} , 9,10 – negativní kontrola.

Metodika qPCR s menšími úpravami a použité primery ME1 (5'-GCM ATG CAR ATH GGW ATG TC-3') a MCR1R (5'-ARC CAD ATY TGR TCR TA-3') byly převzaty z publikace Hales et al. (1996).

Pro qPCR bylo použito 19 μ l reakční směsi obsahující 7,9 μ l PCR H₂O, 10 μ l Fast Start SybrGreen Mix, 0,1 μ l primeru F (ME1), 0,1 μ l primeru R (MCR1R), které byly odebrány ze zásobního roztoku 50 μ M. Dále 0,4 μ l albuminu z hovězího séra (BSA) a 0,5 μ l dimetylsulfoxidu (DMSO). K 19 μ l reakční směsi (Master Mix) byl přidán 1 μ l DNA templátu. Templáty byly podle potřeby ředěny PCR vodou. Kvantitativní PCR byla provedena na přístroji StepONE Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

4. Výsledky a diskuze

Při vyhodnocování výsledků byly porovnávány dva různé druhy rašelinišť: minerotrofní/mezotrofní slatiniště (FEN) a vrchoviště (BOG), dva různé horizonty půdy: vrchní aerobní vrstva 0 - 10 cm a spodní anaerobní vrstva 20 - 30cm (Obr. 8).



Obr. 8: Počet metanogenních Archaea vyjádřených kopií genu *mcrA* na gram půdy v lokalitě Lakkasuo (A) a v šumavské lokalitě (B).

NA – not analysed, P – přirozené rašeliniště, L – dlouhodobě odvodněné rašeliniště

Obecně lze říci, že v přirozeném rašeliništi Lakkasuo (FENP) byl výrazně větší počet metanogenních Archaeí, než v šumavském přirozeném rašeliništi. Ve finských i šumavských odvodněných rašeliništích byly výrazně potlačeni oproti rašeliništím přirozeným (Obr. 8A, B).

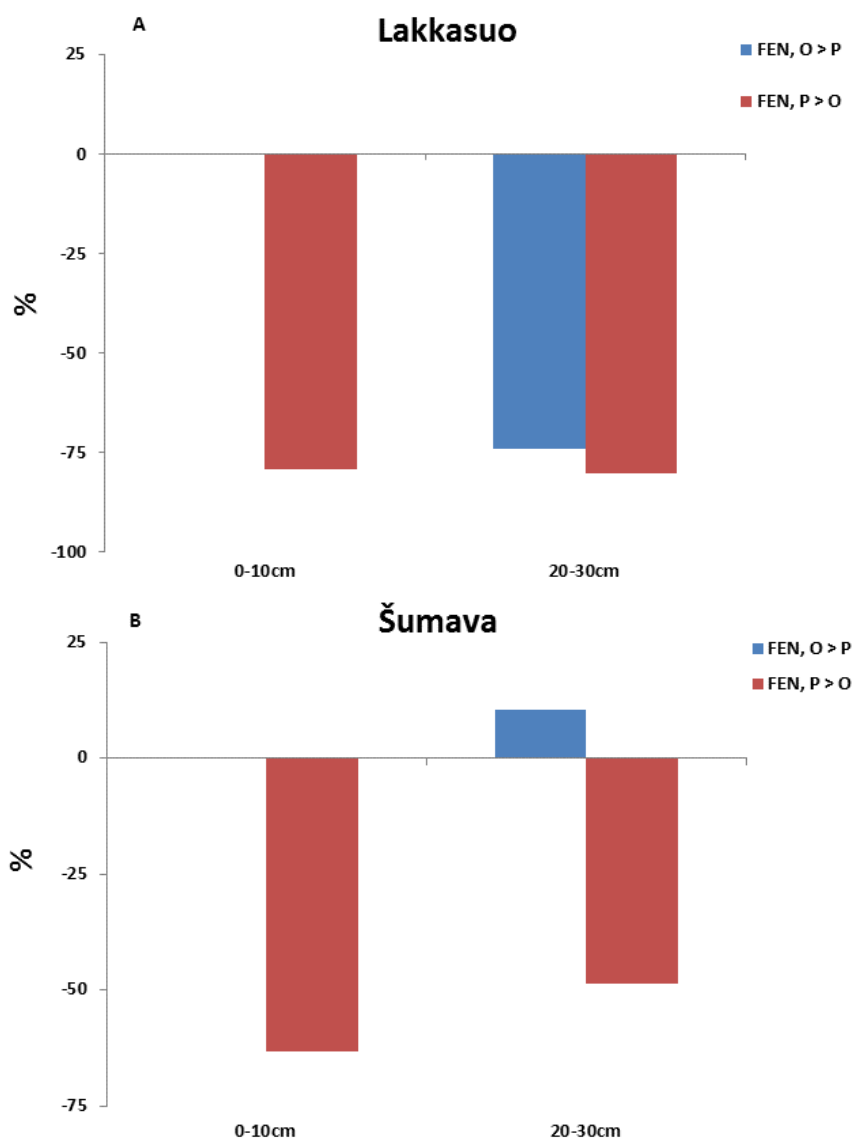
Ve finské lokalitě FEN bylo ve spodní vrstvě rašeliniště (20 - 30 cm) výrazně více metanogenů oproti svrchní vrstvě (0 - 10 cm). Tento trend byl dán tím, že spodní vrstva rašeliniště je anaerobní, tudíž místem, kde by se metanogenní Archaea měly pravděpodobně vyskytovat.

V lokalitě přírodního šumavského rašeliniště (FENP) byl větší počet metanogenních Archeí ve svrchní vrstvě oproti vrstvě spodní, bylo to dáno pravděpodobně výškou hladiny vody nebo chemickým složením rašeliniště. V lokalitě BOGP byly nalezeny ve svrchní vrstvě rašeliniště, bohužel spodní vrstva nemohla být pro malé množství izolované DNA analyzována. V odvodněném rašeliništi (FENL, BOGL) byly objeveny ve větším množství pouze ve spodní vrstvě rašeliniště (Obr. 8B).

Dále byly porovnávány dva typy manipulace s půdou: z odvodněné plochy byla rašelina přenesena na plochu přirozenou (O>P), z plochy přirozené byla rašelina přenesena na plochu odvodněnou (P>O) v minerotrofním/mezotrofním slatiništi (FEN). Byl tedy porovnán vliv odvodnění a revitalizace rašeliniště (Obr. 9).

Počet metanogenních Archaeí by měl při přenosu z odvodněné plochy na přirozenou plochu vzrůst, měla by se opět obnovit jejich metanogeneze a tím i emise metanu. Ve svrchní vrstvě nebyly metanogenní Archaea před manipulací detekovány na finském ani na šumavském rašeliništi. Ve spodní vrstvě v lokalitě Lakkasuo byl však zaznamenán výrazný úbytek metanogenních Archaeí o cca 74 %, z toho vyplývá, že „simulovaná revitalizace“ neměla pozitivní vliv na tyto Archaea. Mohlo to být způsobeno vlivem manipulace s půdou, krátkým časovým úsekem mezi odběry, kdy přenesené metanogenní Archaea nebyly ještě adaptovány na nové podmínky (např. různé chemické složení, Tab. III, IV). Důvodem mohla být i rozdílná hladina spodní vody v době odběru před přenesením a po přenesení do nového prostředí (Obr. 9A). Na rozdíl od finské plochy byl v šumavské lokalitě ve spodní vrstvě rašeliniště nárůst po přenesení do přirozeného rašeliniště o 10 %, zde měla „simulovaná revitalizace“ pozitivní vliv na metanogenní Archaea (Obr. 9B).

Při přenosu rašeliny z přirozené plochy na odvodněnou plochu se dal předpokládat pokles metanogenních Archaeí vlivem odvodnění, tedy poklesu vody a tím ztráty anaerobního prostředí. Výsledky potvrzují tento předpoklad, ve spodní i svrchní vrstvě finského rašeliniště byl úbytek metanogenních Archaeí kolem 80 % (Obr. 9A). V šumavských rašeliništích byl úbytek ve spodní vrstvě okolo 49 %, ve svrchní vrstvě okolo 60 % (Obr. 9B).



Obr. 9: Vliv odvodnění a revitalizace na počet metanogenních Archaea ve finském (A) a šumavském (B) rašeliništi.

FEN - minerotrofní/mezotrofní rašeliniště, O>P – přenesení z odvodněné plochy na přirozenou, P>O – přenesení z přirozené na odvodněnou plochu

Po přenesení rašeliny z přirozené plochy na odvodněnou plochu ve svrchní vrstvě finského i šumavského rašeliniště byl zaznamenán úbytek metanogenních Archaeí v důsledku okysličení půdy. V porovnání s metanotrofními bakteriemi, které byly studovány v bakalářské práci Kráčmarová (2014), byl počet metanotrofních bakterií ve svrchní vrstvě lokality Lakkasuo zvýšen o cca 32 % v důsledku provzdušnění půdy. Naopak ve svrchní vrstvě šumavského rašeliniště byl zaznamenán pokles metanotrofních bakterií a to pravděpodobně kolísáním hladiny vody v tomto rašeliništi.

5. Závěry

Dle výsledků je patrné, že hodnocení závisí na typu rašeliniště, chemickém složení půdy, hloubce půdy a výšce vodní hladiny. Větší nárůst metanogenních Archaeí byl zaznamenán v minerotrofních/mezotrofních slatiništích, také jich bylo nalezeno více ve fínských rašeliništích oproti šumavským rašeliništím. Dalo se předpokládat, že více metanogenních Archaeí bude nalezeno ve spodní anaerobní vrstvě rašeliniště. V odvodněném rašeliništi, kde klesla hladina vody, ubyl výrazně počet metanogenních Archaeí ve fínském i šumavském rašeliništi. „Simulovaná revitalizace měla pozitivní vliv na metanogenní Archaea pouze v šumavském rašeliništi.

6. Seznam zkratk

BOGP	přirozené vrchoviště
BOGL	odvodněné vrchoviště
BSA	albumin z hovězího séra
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxynukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleosidtrifosfát
FENP	přirozené minerotrofní/mezotrofní rašeliniště
FENL	odvodněné minerotrofní/mezotrofní rašeliniště
H ₄ MPT	tetrahydrometanopterin
mcrA	methyl-koenzym M reduktáza A
m n. m.	metrů nad mořem
MFR	metanofuran
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
VFA	těkavé mastné kyseliny

7. Seznam literatury

Barker D. M. (2010). *Archaea: Salt-lovers, Methane-makers, Thermophiles, and Other Archaeans*. Crabtree publishing company. Canada.

Bonin A. S., Boone D. R. (2006). The Order Methanobacteriales. *The Prokaryotes Volume 3 (Third Edition)*. Dworkin M. et al. (Eds). Springer. New York: 231 - 243.

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

Conrad R. (1989). *Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere*. J. Wiley & Sons. Chichester.

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

Galagan J. E., Nusbaum C., Roy A., Endrizzi M. G., et al. (2002). The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Research* 12 (4): 532 - 42.

Garcia J. L., Ollivier B., Whitman W. B. (2006). The Order Methanomicrobiales. *The Prokaryotes Volume 3 (Third Edition)*. Dworkin M. et al. (Eds). Springer. New York: 208 - 230.

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

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.

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.

Kendall M. M., Boone D. R. (2006). The Order Methanosarcinales. *The Prokaryotes Volume 3 (Third Edition)*. Dworkin M. et al. (Eds). Springer. New York: 244 - 256.

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

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

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

Mer L. J., Roger P. (2010). Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review: *European Journal of Soil Biology* 37: 25 – 50.

Nazaries L., Murrell J. C., Millard P., Baggs L., Singh B. K. (2013). Methane, microbes and models: fundamental understanding of the soil methane cycle for future predictions. *Environmental Microbiology* 15 (9): 2395 – 2417.

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

Reeburgh, W. S. (2003). Global methane biogeochemistry. *Treatise on Geochemistry, Volume 4: The Atmosphere*. R. F. Keeling (Ed.) Elsevier-Pergamon. Oxford. UK: 65 – 89.

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

Tyler, S. C. (1991). The global methane budget. *Microbial Production and Consumption of Greenhouse Gases*. J. E. Rogers and W. B. Whitman (Eds). American Society for Microbiology. Washington, DC: 7 – 38.

Urbanová Z., Bárta J., Pícek T. (2013). Methane emissions and methanogenic Archaea on pristine, drained and restored mountain peatlands, Central Europe. *Ecosystems* 16: 664 - 677.

Urbanová Z., Pícek T., Hájek T., Buřková I., Tuittila E. S. (2012). Vegetation and carbon gas dynamics under a changed hydrological regime in central European peatlands. *Plant Ecology & Diversity* 5 (1): 89 – 103.

Urich T., Lanzén A., Qi J., Huson D. H., Schleper C., Schuster S. C. (2008). Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the metatranscriptome. *PLoS ONE* 3: e2527.

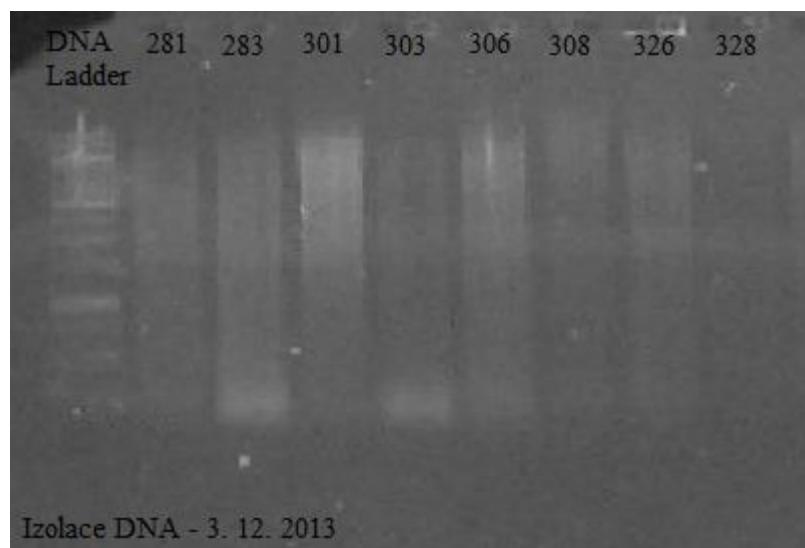
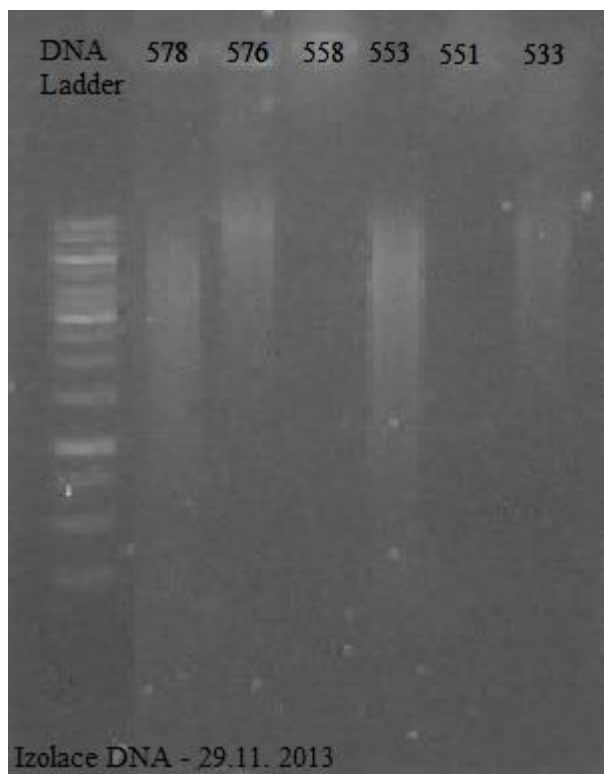
White I. D., Mottershead D. N., Harrison S. J. (1992). *Environmental systems* (Second Edition). Alden Press. Oxford. Great Britain.

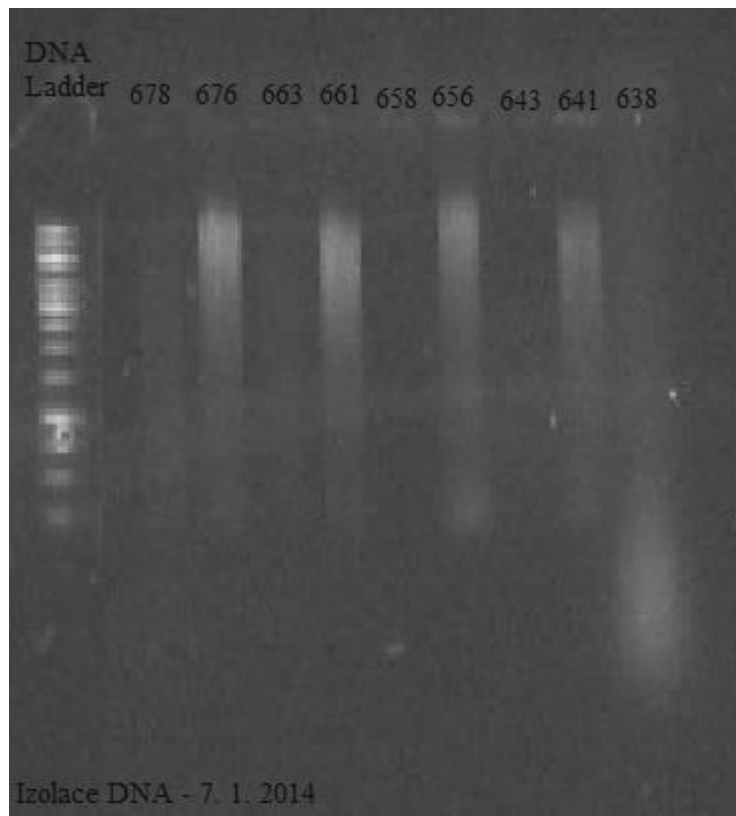
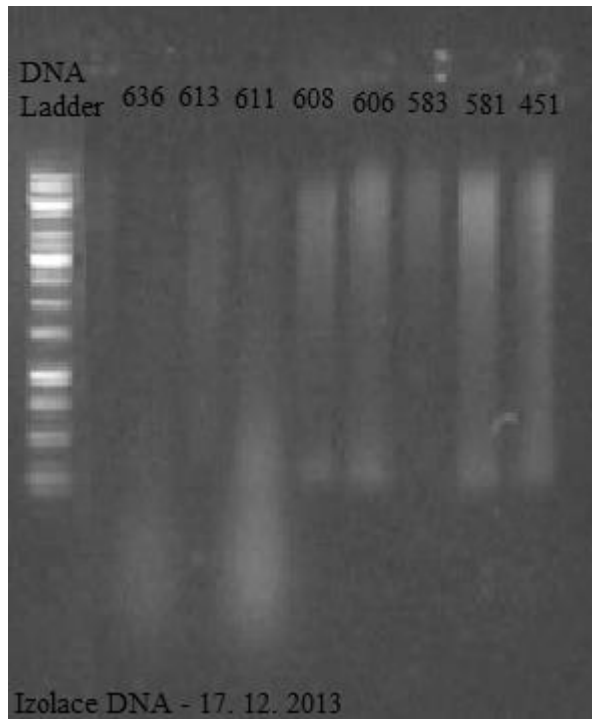
Whitman W. B., Bowen T. L., Boone D. R. (2006). The Methanogenic Bacteria. *The Prokaryotes Volume 3* (Third Edition). Dworkin M. et al. (Eds). Springer. New York: 165 - 207.

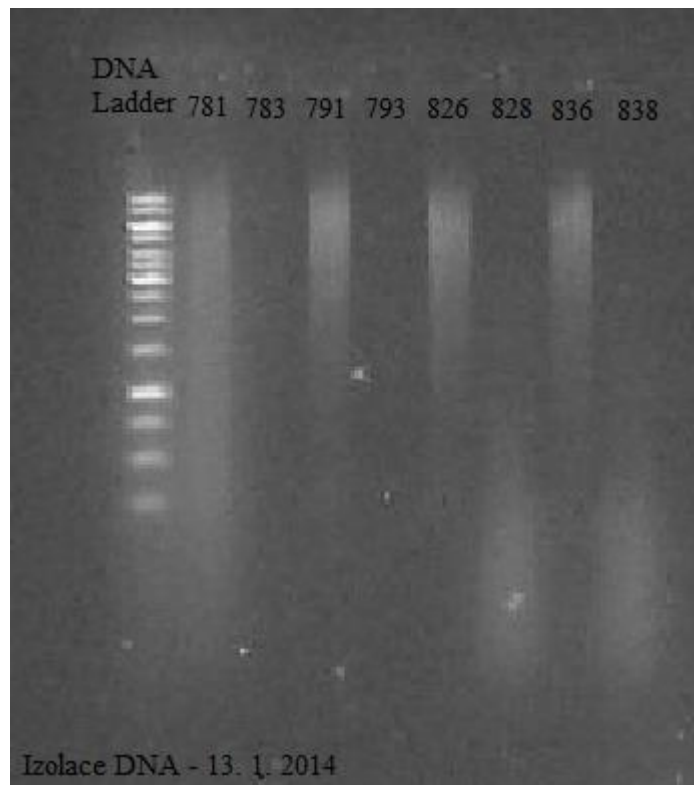
Whitman W. B., Jeanthon CH. (2006). Methanococcales. *The Prokaryotes Volume 3* (Third Edition). Dworkin M. et al. (Eds). Springer. New York: 257 - 273.

8. Přílohy

Příloha 1: Fotografie izolovaných vzorků na agarozovém gelu.







Příloha 2: Výsledky kvantifikace metanogenních Archaea v závislosti na různé hloubce, lokalitě a typu rašeliniště.

Vzorek	Vrstva (cm)	Lokalita	Typ rašeliniště	Místo odběru	Místo přenesení	Kopie genu mcrA/g suché půdy
281	0-10	Lakkasuo	FEN	P	P	2,57E+06
301	0-10	Lakkasuo	FEN	P	P	5,99E+06
306	0-10	Lakkasuo	FEN	S	S	4,40E+06
326	0-10	Lakkasuo	FEN	S	S	1,18E+06
331	0-10	Lakkasuo	FEN	L	L	nedetekováno
351	0-10	Lakkasuo	FEN	L	L	nedetekováno
356	0-10	Lakkasuo	BOG	P	P	nedetekováno
376	0-10	Lakkasuo	BOG	P	P	neanalyzováno
381	0-10	Lakkasuo	BOG	S	S	nedetekováno
401	0-10	Lakkasuo	BOG	S	S	4,68E+03
406	0-10	Lakkasuo	BOG	L	L	7,06E+03
426	0-10	Lakkasuo	BOG	L	L	4,10E+03
581	0-10	Šumava	FEN	P	P	6,04E+06
606	0-10	Šumava	FEN	P	P	4,04E+06
611	0-10	Šumava	FEN	L	L	nedetekováno
636	0-10	Šumava	FEN	L	L	nedetekováno
641	0-10	Šumava	BOG	P	P	1,85E+06
656	0-10	Šumava	BOG	P	P	3,52E+05
661	0-10	Šumava	BOG	L	L	1,51E+05
676	0-10	Šumava	BOG	L	L	nedetekováno
431	0-10	Lakkasuo	FEN	L	P	3,01E+05
451	0-10	Lakkasuo	FEN	L	P	7,58E+05
456	0-10	Lakkasuo	FEN	P	S	1,13E+05
476	0-10	Lakkasuo	FEN	P	S	1,66E+06
481	0-10	Lakkasuo	FEN	S	L	7,79E+05
501	0-10	Lakkasuo	FEN	S	L	3,36E+06
531	0-10	Lakkasuo	BOG	P	S	nedetekováno
551	0-10	Lakkasuo	BOG	P	S	neanalyzováno
556	0-10	Lakkasuo	BOG	S	L	nedetekováno
576	0-10	Lakkasuo	BOG	S	L	nedetekováno
681	0-10	Šumava	FEN	L	P	2,31E+04
706	0-10	Šumava	FEN	L	P	nedetekováno
711	0-10	Šumava	FEN	P	L	1,09E+06
736	0-10	Šumava	FEN	P	L	2,62E+06
741	0-10	Šumava	BOG	L	P	nedetekováno
756	0-10	Šumava	BOG	L	P	7,66E+04
761	0-10	Šumava	BOG	P	L	4,30E+05
776	0-10	Šumava	BOG	P	L	2,29E+04
283	20-30	Lakkasuo	FEN	P	P	7,75E+06

303	20-30	Lakkasuo	FEN	P	P	3,73E+07
308	20-30	Lakkasuo	FEN	S	S	1,82E+06
328	20-30	Lakkasuo	FEN	S	S	1,93E+06
333	20-30	Lakkasuo	FEN	L	L	7,05E+05
353	20-30	Lakkasuo	FEN	L	L	4,44E+05
358	20-30	Lakkasuo	BOG	P	P	7,84E+05
378	20-30	Lakkasuo	BOG	P	P	3,38E+05
383	20-30	Lakkasuo	BOG	S	S	4,88E+05
403	20-30	Lakkasuo	BOG	S	S	4,94E+05
408	20-30	Lakkasuo	BOG	L	L	5,19E+04
428	20-30	Lakkasuo	BOG	L	L	7,10E+03
583	20-30	Šumava	FEN	P	P	1,14E+06
608	20-30	Šumava	FEN	P	P	5,06E+06
613	20-30	Šumava	FEN	L	L	6,44E+04
638	20-30	Šumava	FEN	L	L	nedetekováno
643	20-30	Šumava	BOG	P	P	neanalyzováno
658	20-30	Šumava	BOG	P	P	neanalyzováno
663	20-30	Šumava	BOG	L	L	2,33E+05
678	20-30	Šumava	BOG	L	L	7,17E+05
433	20-30	Lakkasuo	FEN	L	P	1,81E+05
453	20-30	Lakkasuo	FEN	L	P	1,16E+05
458	20-30	Lakkasuo	FEN	P	S	1,74E+06
478	20-30	Lakkasuo	FEN	P	S	7,19E+06
483	20-30	Lakkasuo	FEN	S	L	3,99E+06
503	20-30	Lakkasuo	FEN	S	L	4,16E+06
533	20-30	Lakkasuo	BOG	P	S	7,38E+04
553	20-30	Lakkasuo	BOG	P	S	1,84E+05
558	20-30	Lakkasuo	BOG	S	L	7,77E+03
578	20-30	Lakkasuo	BOG	S	L	2,77E+05
683	20-30	Šumava	FEN	L	P	1,15E+05
708	20-30	Šumava	FEN	L	P	2,74E+04
713	20-30	Šumava	FEN	P	L	2,77E+06
738	20-30	Šumava	FEN	P	L	4,15E+05
743	20-30	Šumava	BOG	L	P	3,61E+05
758	20-30	Šumava	BOG	L	P	1,76E+05
763	20-30	Šumava	BOG	P	L	2,44E+05
778	20-30	Šumava	BOG	P	L	4,19E+05

P - přírodní, S - odvodnění krátkodobé, L - odvodnění dlouhodobé