

Analýza konsorcií methanogenů s využitím molekulárně biologických metod

Bc. Vendula Krátká

Diplomová práce
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Vendula Krátká
Osobní číslo:	T18691
Studijní program:	N2808 Chemie a technologie materiálů
Studijní obor:	Inženýrství ochrany životního prostředí
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Analýza konsorcií methanogenů s využitím molekulárně biologických metod

Zásady pro vypracování

1. Provést literární rešerši na dané téma. Zaměřit se na výskyt methanogenů v životním prostředí (především v uhelných dolech), jejich vlastnosti a stanovení pomocí molekulárně biologických metod.
2. Izolovat DNA ze vzorků odebraných z uhelných dolů.
3. Analyzovat výskyt methanogenů spolu s ANME mikroorganismy ve vzorcích z uhelných dolů pomocí molekulárně biologických metod (sledování výskytu genu *mcrA*).
4. Vyhodnotit výsledky.
5. Výsledky přehledně zpracovat do formy DP.

Seznam doporučené literatury:

1. Enzmann F, Mayer F, Rother M, Holtmann D. G. Ferry, James. (1993). *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics*. doi:10.1007/978-1-4615-2391-8.
2. *Methanogens: biochemical background and biotechnological applications*. *AMB Express*. 2018;8(1):1. Published 2018 Jan 4. doi:10.1186/s13568-017-0531-x.
3. Yates, M. V., et al., Suresh D. (ed). (2016). *Manual of Environmental Microbiology, Fourth Edition*. ASM Press. doi: 10.1128/9781555818821.
4. Isaac P. G. (2009) *Essentials of nucleic acid analysis: a robust approach*. *Ann Bot*. 104(2). doi: 10.1093/aob/mcp135.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jana Šerá, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užit své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá studiem methanogenních mikroorganismů z domény *Archaea*. Cílem této práce bylo vytipovat vzorky obsahující gen *mcrA*, tedy provést screening konsorcií methanogenů v rámci společenstva vyskytujícího se ve vybraných hnědouhelných a černouhelných lokalitách na území České republiky, a vytipovat tak uhelné lokality s největším potenciálem pro podporu biogenní methanogeneze.

Zacílením na gen *mcrA* proběhla analýza reálných vzorků černého a hnědého uhlí a také důlních vod, dále byly analyzovány další environmentální vzorky. Gen *mcrA* byl detekován pomocí metod PCR a qPCR. Absolutní kvantifikace genu *mcrA* proběhla metodou klonování. Jednotlivé molekulárně biologické metody byly optimalizovány za účelem zpřesnění výsledků. Z toho důvodu byly také navrženy specifické DNA próby. Přítomnost genu *mcrA* byla potvrzena v 15 vzorcích černého uhlí, 13 vzorcích hnědého uhlí a 4 dalších environmentálních vzorcích.

Klíčová slova: methanogenní mikroorganismy, uhelné doly, gen *mcrA*, qPCR

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the study of methanogenic microorganisms which belong to the domain *Archaea*. The goal of this thesis was to identify samples which contain *mcrA* gene. The goal was to perform the screening of consortium of methanogens within a community occurring in selected lignite and coal locations in The Czech Republic and to identify coal sites with the highest potential for biogenic methanogenesis support.

Analysis of real coal and lignite samples, and also mine water, was made by targeting to *mcrA* gene. In the addition to this the analysis of other environmental samples was conducted. PCR and qPCR methods were used to detect *mcrA* gene. The cloning was used for absolute quantification of *mcrA* gene. Molecular biological methods were optimized to refine the results. Specific DNA probes were designed for this purpose. The presence of *mcrA* gene was confirmed in 15 samples of coal, 13 samples of lignite and 4 other environmental samples.

Keywords: methanogens, coal mines, *mcrA* gene, qPCR

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce Ing. Janě Šeré, Ph.D. za její vedení, konzultace, podporu a čas, který mi po celou dobu mého studia věnovala. Oceňuji také pomoc, vstřícnost, ochotu a cenné rady při vypracování mé diplomové práce.

Velké díky patří také Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za poskytnutí prostoru pro realizaci experimentální části diplomové práce. Děkuji také paní laborantce Ing. Veronice Kučabové za pomoc při vypracování experimentální části práce, a rovněž paní laborantce Ing. Olze Vlčkové za pomoc a vytvoření přátelského prostředí.

Diplomová práce vznikla za podpory TAČR projektu reg.č.: TK01030054. Ráda bych proto také poděkovala řešitelům projektu za jejich cenné rady a ochotu při konzultacích experimentální části diplomové práce a také za poskytnutí materiálů a informací pro vypracování této práce.

V neposlední řadě děkuji rodině a všem blízkým za podporu a trpělivost během mého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 METHAN V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ	11
1.1 METHAN JAKO SKLENÍKOVÝ PLYN	11
1.2 METHAN JAKO ZDROJ ENERGIE.....	13
1.3 METHANOGENNÍ MIKROORGANISMY	16
1.4 SYSTEMATIKA METHANOGENŮ.....	17
1.5 METABOLISMUS METHANOGENŮ.....	19
1.6 METHAN V UHELNÝCH DOLECH	21
1.7 PODPORA METHANOGENEZE.....	27
2 VYBRANÉ METODY STUDIA METHANOGENNÍCH ORGANISMŮ	30
2.1 ANALYTICKÉ A INSTRUMENTÁLNÍ METODY.....	30
2.2 KULTIVAČNÍ METODY	30
2.3 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY.....	32
2.3.1 PCR	32
2.3.2 qPCR	33
2.3.3 DNA markery.....	34
2.3.4 Klonování.....	35
2.3.5 Denaturační gelová gradientová elektroforéza.....	36
2.3.6 Sekvence.....	36
2.3.7 FISH.....	37
3 CÍLE PRÁCE	39
II PRAKTICKÁ ČÁST	40
4 MATERIÁL A METODY	41
4.1 PŘÍSTROJE	41
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	42
4.3 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ.....	43
4.3.1 Hnědohelné lomy	43
Lom ČSA	43
Lom Bílina	44
Lom Vršany	45
Lom Libouš.....	46
Těžebna Václav.....	46
4.3.2 Černouhelné doly:	47
Doly ČSM.....	47
Doly Darkov	47
4.3.3 Další environmentální vzorky.....	48

4.4	IZOLACE DNA.....	49
4.5	MĚŘENÍ KONCENTRACE DNA	50
4.6	TEST PRIMERŮ NA KULTURÁCH SBÍRKOVÝCH KMENŮ	51
4.7	HORIZONTÁLNÍ AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA	54
4.8	qPCR.....	55
4.8.1	Test průběhu qPCR	55
4.8.2	Test qPCR na reálném vzorku obsahujícím methanogeny	56
4.8.3	Analýza methanogenů	56
4.9	NÁVRH NOVÝCH ORIGINÁLNÍCH PRIMERŮ	57
4.10	SPECIFICKY ZNAČENÁ DNA PRÓBA.....	57
4.11	KVANTIFIKACE POČTU KOPIÍ GENU MCRA	58
5	VÝSLEDKY	63
5.1	OPTIMALIZACE MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÝCH METOD	63
5.1.1	Test qPCR	64
5.1.2	Stanovení meze detekce methanogenů.....	65
5.2	DETEKCE GENU MCRA.....	66
5.2.1	Specificky značené DNA próby.....	71
5.2.2	Detekce genu mcrA ve vzorcích černého uhlí	71
5.2.3	Detekce genu mcrA ve vzorcích hnědého uhlí	72
5.2.4	Detekce genu mcrA v dalších environmentálních vzorcích.....	74
5.3	ABSOLUTNÍ KVANTIFIKACE GENU MCRA V DODANÝCH VZORCÍCH	75
5.3.1	Absolutní kvantifikace genu mcrA ve vzorcích černého uhlí.....	78
5.3.2	Absolutní kvantifikace genu mcrA ve vzorcích hnědého uhlí.....	80
5.3.3	Absolutní kvantifikace genu mcrA v dalších environmentálních vzorcích	83
5.3.4	Diskuze získaných dat s literaturou.....	84
	ZÁVĚR	87
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	89
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	110
	SEZNAM OBRÁZKŮ	112
	SEZNAM TABULEK.....	113

ÚVOD

Světová ložiska uhlí jsou spojena s výskytem plynu, který je složen z proměnného množství methanu, oxidu uhličitého a dusíku. Methan je primárně vytvářen během zuhelnování, ale také prostřednictvím anaerobní mikrobiální aktivity v uhelných slojích (USEPA, 2006).

Methanogeny jsou zodpovědné za produkci až 71 % globálního atmosférického methanu. Tento plyn silně absorbuje infračervené záření, a proto je řazen mezi významné skleníkové plyny. Ačkoliv methan negativně ovlivňuje životní prostředí, může také sloužit jako potenciální zdroj energie. V oblasti energetiky lze využít methan jako plynné palivo ve směsi s jinými uhlovodíky, dále je využíván v automobilové dopravě, a to jako pohonná látka, která je součástí stlačeného zemního plynu. Směs kapalného kyslíku a methanu může sloužit jako pohonná látka v raketových motorech.

Methanogeneze představuje proces přijímání terminálních akceptorů elektronů, který katalyzují methanogenní *Archaea*. Tyto organismy představují jedinečný, leč fylogeneticky různorodý spolek prokaryot, který lze mapovat zacílením na gen *mcrA* jako funkční marker.

V této práci byly analyzovány reálné vzorky černého a hnědého uhlí a také důlních vod. Z homogenizovaných vzorků byla vyextrahována DNA pomocí komerčního kitu. Koncentrace vyizolované DNA byla změřena fluorometricky. Dále byly pomocí metody PCR otestovány primery komplementární k úseku genu *mcrA*. Vzorky byly analyzovány metodou qPCR, která byla v průběhu experimentální části optimalizována. Pro zpřesnění výsledků a vytipování vzorků obsahujících gen *mcrA* byla nakonec zvolena metoda qPCR s použitím specificky značených DNA prób. Kvantifikace počtu kopií genu *mcrA* byla provedena metodou klonování. Cílem této práce byl screening konsorcií methanogenů ve vybraných černouhelných a hnědouhelných lokalitách na území České republiky. Dále byly stejnými metodami testovány další environmentální vzorky.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 METHAN V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Uhlík je jedním z nejdůležitějších prvků na Zemi. Jeho globální cyklus zahrnuje procesy odehrávající se v atmosféře, pevninské biosféře, oceánech a sedimentech. Mikrobiální rozklad organických sloučenin a odumřelých rostlinných a živočišných tkání vede k emisi CO₂ do atmosféry. Oxid uhličitý je rostlinami využíván v procesu fotosyntézy. Některé mikroorganismy, jako například methylotrófní *Archaea*, využívají oxid uhličitý nebo také methan jako zdroj energie, a snižují tak koncentrace těchto plynů v atmosféře. Rovnováha v uhlíkovém cyklu je udržována několika chemickými přeměnami, jako jsou fixace oxidu uhličitého, methanotrofie, methanogeneze, fermentace a anaerobní dýchání (Kumar a kol., 2016).

Methan je bezbarvý vysoce hořlavý plyn bez zápachu, složený z 1 atomu uhlíku a 4 atomů vodíku. V přítomnosti kyslíku je spalován za vzniku oxidu uhličitého a vodní páry. Methan vzniká řadou chemických reakcí během rozkladu organické hmoty v prostředích bez nebo s nízkým obsahem kyslíku, jako jsou bažiny a rašeliniště. Jakmile odumřelé části rostlin klesnou na dno těchto prostředí, jsou rozloženy mikroorganismy. Methan je emitován také bahenními sopkami, rýžovými poli a termišti a lze jej nalézt také v podzemních ložiscích fosilních paliv. Ve vrstvě sedimentu na dně oceánu a také pod permafrostem lze nalézt hydráty methanu. Tato pevná ložiska podobná ledu se dříve nabízela jako potenciální zdroj energie, dnes však představují hrozbu uvolňování velkého množství methanu do atmosféry. Zejména v podzemních dolech představuje methan vysoké riziko nebezpečí a jeho koncentrace musí být snižována ventilací. Důlní methan je termín určený pro methan produkovaný ve spojení s těžební činností ze samotné sloje nebo jiných plynných útvarů v podzemí. Množství methanu generovaného při konkrétní důlní činnosti závisí na produktivitě uhelného dolu, množství plynu v uhelné sloji, typu podloží, provozních a geologických podmínkách. Důlní methan může být zachycen inženýrskými vrty, které rozšiřují ventilační systém dolu, nebo je emitován do důlního prostředí a následně vyčerpán z důlních šachet spolu s ventilačním vzduchem (Bonaglia a kol., 2017).

1.1 Methan jako skleníkový plyn

Pochopení biochemických procesů regulujících tok uhlíku na Zemi je důležité pro kontrolu emisí oxidu uhličitého a methanu a zmírnění klimatických změn. Ty jsou způsobeny nárůstem skleníkových plynů v atmosféře. Skleníkový plyn je jakákoli plynná sloučenina v atmosféře, která je schopna absorbovat infračervené záření, a tím také udržovat teplo. Skleníkové

plyny jsou tak zodpovědné za skleníkový efekt, který v konečném důsledku vede ke globálnímu oteplování. Nejvýznamnějšími skleníkovými plyny jsou podle Agentury pro ochranu životního prostředí (EPA) vodní pára (H₂O), oxid uhličitý (CO₂), methan (CH₄) a oxid dusný (N₂O) (US EPA, 1994a). Mezi významné zdroje methanu patří úniky zemního plynu a chov hospodářských zvířat. Asi 50–65 % celkových emisí methanu pochází z lidských činností – energetika, průmysl, zemědělství, nakládání s odpady (Stocker a kol., 2013). Zdroje globálních emisí methanu jsou popsány také v tabulce, která popisuje relativní příspěvek emisí methanu z daných zdrojů vztážený na celkovou globální emisi 600 Tg methanu za rok (Tabulka 1).

Tabulka 1 Zdroje globálních emisí methanu (modifikováno dle Lowe, 2006; Prather a Ehhalt, 2001)

Zdroje	Emise methanu (Tg CH₄ ročně)	Procento (%)^a
Přírodní zdroje		
Mokřady	92–237	15–40
Činnost termitů	20	3
Oceány	10–15	2–3
Hydráty methanu	5–10	1–2
Mezisoučet	127–282	21–47
Antropogenní zdroje		
Přežvýkavci	80–115	13–19
Výroba energií ^b	75–110	13–18
Pěstování rýže	25–100	7–17
Skládky	35–73	6–12
Spalování biomasy	23–55	4–9
Nakládání s odpady	14–25	2–4
Mezisoučet	267–478	45–80
Celkové zdroje	500–600	

a – relativní příspěvek emisí methanu ze zdroje vztažený na celkovou globální emisi 600 Tg methanu za rok
 b – methanová ložiska uvolněná těžbou uhlí, ropy, vrtáním a petrochemickou výrobou

1.2 Methan jako zdroj energie

Bioplynové stanice

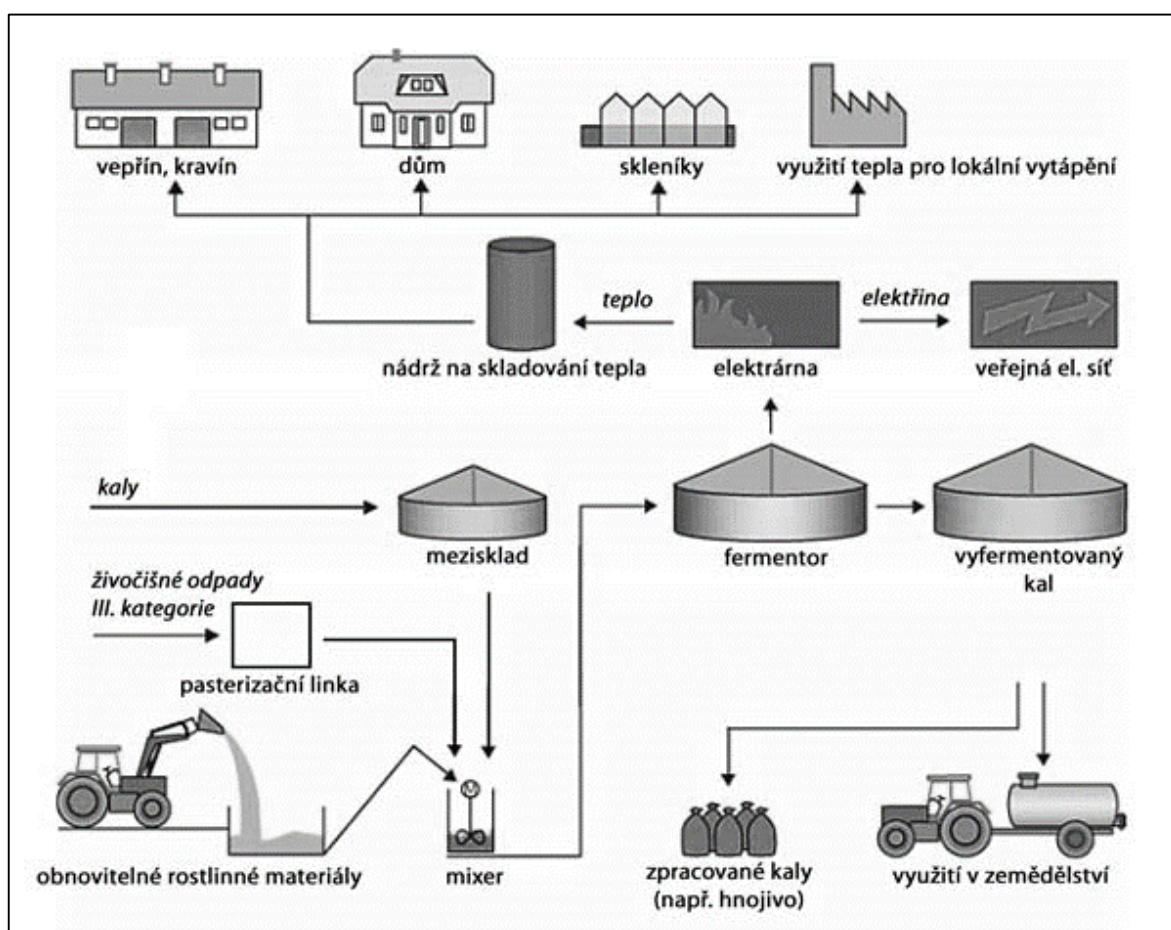
S postupným úbytkem fosilních paliv vzrůstá zájem o alternativní zdroje energie. Vhodnou možností, jak pomoci snížit spotřebu fosilních paliv a zároveň i nadměrnou produkci odpadu, je využít biomasu pro proces anaerobní digesce (Krátký a Jirout, 2015; Yates a kol., 2016). Organická hmota je za pomoci mikroorganismů rozložena, přičemž tento proces vyžaduje specifické podmínky (Enzmann a kol., 2018). Těmi jsou vlhké prostředí, zabránění přístupu kyslíku a světla, stálá teplota a pH, rovnoměrný přísun substrátu a živin (dusíkaté sloučeniny, minerální látky a stopové prvky). Anaerobní digesce je rozdělena do 4 fází, jimiž jsou hydrolyza, acidogeneze, acetogeneze a methanogeneze. Celý proces je blíže popsán v kapitole 1.6. Dále bude diskutován proces vzniku bioplynu v bioplynových stanicích. Mezi hlavní produkty anaerobní fermentace patří bioplyn, představující směs oxidu uhličitého, vody a methanu. Směs dále obsahuje vodní páru a stopové prvky, přičemž koncentrace jednotlivých látek je ovlivněna použitým substrátem (Tabulka 2) (Jelínek, 2001).

Tabulka 2 Složky bioplynu a jejich procentuální zastoupení (převzato z Jelínek, 2001)

Složka	Obsah [%]
Methan	45–70
Oxid uhličitý	30–55
Vodík	0–3
Sulfan	0,1–1
Dusík	1–3
Kyslík	0–2
Amoniak	<1

Při procesu výroby bioplynu v bioplynových stanicích jsou nejčastěji využívány 2 metody lišící se obsahem sušiny ve fermentovaném materiálu, a to anaerobní fermentace mokřích organických materiálů („mokrý metoda“) a anaerobní fermentace suchých organických materiálů („suchá metoda“). Mokrý metoda je rozšířenější, avšak vyžaduje vyšší investiční a provozní náklady (Česká bioplynová asociace, 2014).

Mezi nejčastěji využívané substráty v bioplynových stanicích patří vepřová kejda, kukuřičná siláž, cukrovarnické řízky a drůbeží trus. Před vlastním procesem mokré metody musí být substrát řádně upraven. Mletím a drcením biomasy lze dosáhnout její vyšší biologické rozložitelnosti, a tedy i vyšší výtěžnosti bioplynu. Následně je suchý substrát naředěn vodou, nebo naopak zahuštěn přidavkem sušiny, pokud je příliš tekutý. Takto připravený substrát je rozkládán v anaerobním fermentoru. K zachování stálé teploty v digestoru slouží ohřev a míchadlo. Míchadlo také zabezpečuje mísení s čerstvě přidaným substrátem a substrátem již vyhnívajícím a dále zabraňuje tvorbě usazenin. Vzniklý plyn je shromažďován v plynovém, kde zároveň dochází k oddělení pěny a kapalných částic. Bioplyn lze využít přímo v bioplynových stanicích jako technologické palivo sloužící k výhřevu digestoru, pro výrobu tepla v plynových kotlech nebo palivo pro motory kogeneračních jednotek. Kogenerační jednotka je zařízení, které slouží k výrobě tepla a elektrické energie (Appels a kol., 2008).



Obrázek 1 Schéma bioplynové stanice (Tenza, 2021)

Během fermentace dochází ke vzniku zbytku (digestátu), který má převážně kapalnou formu. Ten obsahuje směs živin a humusu, která již není dále rozkládána. Tato kapalná forma je dále využita jako organické hnojivo s obsahem sušiny 5–10 %, nebo lze oddělit tzv. fugát

a separát. V případě fugátu se jedná o kapalnou fázi s obsahem sušiny 2–4 %, která je využita jako hnojivo kapalné. Separát, který představuje pevný podíl, je využit v zemědělství nebo zahradnictví. Digestát je skladován ve skladovací jímce vybavené míchadly (Krátký a Jirout, 2015).

Jak již bylo zmíněno, samotný bioplyn může být využit přímo v bioplynové stanici. Nejčastějším způsobem jeho využití je kogenerace, představující společnou výrobu tepla a elektřiny. Bioplyn je nejprve zbaven nečistot a sušen, dále je spalován. Asi 20–40 % vygenerovaného tepla je využito k vytápění celého systému, přebytečné teplo pak slouží k procesům jako je výroba elektřiny, topení, chlazení nebo sušení. Další využití bioplynu v i mimo bioplynové stanice je znázorněno v tabulce (Tabulka 3). Dochází k přeměně bioplynu na mechanickou, tepelnou nebo elektromagnetickou energii (Krátký a Jirout).

Tabulka 3 Využití bioplynu a jeho aplikace, převzato z Krátký a Jirout, 2015

Aplikace	Využití
Osvětlení	Plynová svítidla
Teplo	Hořáky, kotle a plynové sporáky
Sušení	Sušárny
Chlazení	Absorpční chladiče
Elektřina	Plynové motory, palivové články, mikroturbíny
Doprava	Vozidla na stlačený zemní plyn
Uchování energie	Rozvodná síť zemního plynu
Náhrada zemního plynu	Rozvodná síť zemního plynu

Uhelné doly

Z aktivních i opuštěných uhelných dolů je uvolňováno značné množství methanu. Důlní plyn přispívá ke globálnímu oteplování, zároveň je ale potenciálním zdrojem methanu pro průmysl. Stabilní uhlíkové a vodíkové izotopy naznačují, že methan v důlním plynu je biogenního a nebiogenního původu. V opuštěných dolech je nebiogenní methan výsledkem geologických procesů, biogenní tvorba methanu zde dále pokračuje. Kromě uhlí je zdrojem methanu také důlní dřevo, které se používá při stavbě dolů (Karacan a kol., 2011).

Methan se v uhelných dolech nachází v několika formách (Scott, 2002):

- (i) *volný plyn v mikropórech uhlí*
- (ii) *rozpuštěný plyn ve vodě uvnitř uhlí*
- (iii) *adsorbovaný plyn na površích pórů a štěpů uhlí*
- (iv) *absorbovaný plyn uvnitř molekul uhlí*

Methan se vyskytuje především v nevětraných prostorách, dutinách a na všech stanovištích, kde hromadící se methanové vrstvy nelze odvětrávat. Tento plyn pak představuje vysoké nebezpečí pro pracovníky důlního provozu. V ovzduší s vyšším obsahem methanu dochází k náhlému snížení koncentrace kyslíku, doprovodné vyšší uhlovodíky projevují narkotizující účinky a jedinec upadá do bezvědomí. Koncentrace methanu by proto v místech, kde se zdržují pracovníci, neměla překročit více než 1 % (vyhláška č. 22/1989 Sb.; Prokop a Zapletal, 2013).

Důlní methan je v současnosti využíván k mnoha účelům. Těmi jsou vytápění, vaření, ohřev kotlů, výroba elektřiny, přímý ohřev vzduchu v důlních ventilačních systémech a sušení uhlí. Existují 3 primární důvody pro získání methanu z uhelných dolů. Prvním z nich je zvýšení bezpečnosti dolů. Po celém světě byly totiž zaznamenány tisíce úmrtí při výbuchu podzemních dolů, při nichž byl hlavním faktorem přispívajícím k výbuchu právě methan. Díky drenážním a ventilačním systémům lze tomuto předejít. Dalším důvodem je zlepšení těžební ekonomiky. Snížením emisí a předcházením výbuchů lze snížit náklady na těžbu. Získaný methan může být navíc použit jako palivo v místě těžby nebo prodán jiným uživatelům. Třetím důvodem pro využití methanu z uhelných dolů je fakt, že se jedná o významný skleníkový plyn (Thiellemann a kol., 2004).

Asi 83 % methanu z uhelných dolů v České republice je využíváno v kotlích v dolech a také v okolních průmyslových odvětvích, jako jsou ocelárny, kombinované teplárny a elektrárny. I přestože je tato míra využití ve srovnání s většinou zemí velmi vysoká, většina zemního plynu je do České republiky dovážena (Biebler a kol., 1998; USEPA, 2006).

1.3 Methanogenní mikroorganismy

Methanogenní *Archaea* jsou fylogeneticky různorodou skupinou striktně anaerobních mikroorganismů, jež řadíme do kmene *Euryarchaeota*. Metabolismus methanogenů je omezen na tvorbu methanu z CO_2 a H_2 , formiátu, methanolu, methylaminů nebo acetátu (Ferry, 1993; Garcia a kol., 2000; Thauer a kol., 1998). Navzdory tomuto omezení mají tyto organismy

kvantitativně důležitou roli v globálním uhlíkovém cyklu. Je odhadováno, že přibližně 1 miliarda tun methanu ročně je tvořena methanogenními mikroorganismy v anoxickém prostředí, jako jsou sladkovodní sedimenty, bažiny, rýžová pole nebo střevní trakt. To znamená, že přibližně 2 % čistého CO₂, který je ročně fixován prostřednictvím fotosyntézy, je přeměněno na methan (Thauer a kol., 2008). Existují výzkumy prokazující produkci biogenního methanu cyanobakteriemi v doméně bakterií, které zpochybňují paradigma, že methanogeneze je výlučná pro *Archaea* (Pyzik a kol., 2018).

1.4 Systematika methanogenů

Po celá desetiletí byla methanogenní *Archaea* řazena výhradně do kmene *Euryarchaeota*. Bylo rozeznáváno nejprve 5 řádů, a to *Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* a *Methanopyrales* (Stadtman a Barker, 1951; Kurr a kol., 1991). Mezi lety 2008 a 2012 byly do kmene *Euryarchaeota* zařazeny další 2 řády, konkrétně *Methanocellales* (Sakai a kol., 2008) a *Methanomassiliicoccales* (Dridi a kol., 2012; Iino a kol., 2013). Další vývoj metagenomového sekvenování a analýza taxonomické a funkční rozmanitosti umožnil pochopení úlohy mikroorganismů při anaerobní digesci a produkci methanu. Nedávné studie naznačují, že lidstvo teprve začíná vnímat rozmanitost methanogenů a samotný proces methanogeneze. Nejlépe studovatelná společenství mikroorganismů produkujících methan pocházejí z bioplynových reaktorů (Yang a kol., 2014; Stolze a kol., 2015; Luo a kol., 2016), ale mnoho odpadních materiálů používaných jako doplněk v bioplynových systémech by mohlo poskytnout nové mikroorganismy přizpůsobené produkci methanu a degradaci organické hmoty (Hess a kol., 2011; Borrel a kol., 2014; 2015; Wallace a kol., 2015). Zdá se, že společenství jsou mnohem rozmanitější, leč těžce charakterizovatelná.

Organismy z odlišných řádů mají méně než 82 % podobnost sekvence 16S rRNA. Gen 16S rRNA kóduje RNA složku 30S podjednotky bakteriálního ribozomu. Je přítomen u všech bakteriálních druhů, přičemž jednotlivé druhy mají jednu až více kopií tohoto genu. V průběhu evoluce dochází ke změnám sekvence 16S rRNA a to umožňuje studium bakteriální fylogeneze a klasifikace rodů/druhů (Janda a Abbott, 2007).

Methanogeny patřící do různých řádů mají odlišnou strukturu buněčné stěny, odlišné složení lipidů, rozsah substrátů a další biologické vlastnosti. Jednotlivé řády methanogenů jsou dále rozděleny do 10 čeledí a 31 rodů. Detailní popisy taxonů jsou uvedeny v publikaci Ber-

gey's Manual of Systematic Bacteriology (Whitman a kol., 2001) a The Prokaryotes (Whitman a kol., 2006; Garcia a kol., 2006; Bonin a Boone, 2006; Kendall a Boone, 2006; Whitman a Jeanthon, 2006). Nedávné studie odhalily přítomnost nových fylogenetických skupin methanogenů. Nejsou úzce spjaty se známými organismy a pravděpodobně představují nové řády. Například rýžový klastr RC-I, hojný v rýžových polích, tvoří v rámci fylogeneze samostatnou linii *Methanosarcinales* a *Methanomicrobiales*. Sekvence 16S rRNA u RC-I mají se známými organismy podobnost méně než 82 % (Lueders a kol., 2001; Conrad a Liesack, 2006; Erkel a kol., 2006). Tabulka 4 popisuje výskyt methanogenů v přírodě.

Tabulka 4 Výskyt methanogenů v přírodě (modifikováno podle Liu a Whitman, 2008)

Řád	Typické prostředí
<i>Methanobacteriales</i>	Sladkovodní sedimenty, bažiny, bachor přežvýkavců, anaerobní fermentory
	Trávicí ústrojí živočichů, rýžová pole, tlející dřevo, anaerobní fermentory
	Trávicí ústrojí živočichů
	Anaerobní fermentory
	Horké prameny
<i>Methanococcales</i>	Mořské sedimenty
	Mořské geotermální sedimenty
	Mořské geotermální sedimenty
	Mořské geotermální sedimenty
<i>Methanomicrobiales</i>	Podzemní vody, bachor přežvýkavců, anaerobní fermentory
	Mořské sedimenty, sladkovodní sedimenty, rýžová pole, ropná pole, horké prameny, anaerobní fermentory
	Anaerobní fermentory
	Mořské sedimenty, sladkovodní sedimenty, rýžová pole, trávicí ústrojí živočichů
	Mořské sedimenty

Řád	Typické prostředí
	Ropná pole
	Anaerobní fermentory, mořské sedimenty
	Anaerobní fermentory, sladkovodní sedimenty
<i>Methanomicrobiales</i>	Ropná pole
<i>Methanosarcinales</i>	Anaerobní fermentory, mořské sedimenty, sladkovodní sedimenty, bachor živočichů
	Mořské sedimenty
	Hypersaliní sedimenty
	Hypersaliní sedimenty
	Hypersaliní sedimenty
	Sladkovodní sedimenty, anaerobní fermentory
	Trávicí trakt živočichů
	Hypersaliní sedimenty
	Anaerobní fermentory, sladkovodní sedimenty
<i>Methanopyrales</i>	Mořské geotermální sedimenty

1.5 Metabolismus methanogenů

Ačkoliv jsou methanogeny velmi rozmanitou skupinou, jejich metabolismus je omezen na využití pouze tří typů substrátů - CO₂, sloučeniny obsahující metylovou skupinu, a acetát (Tabulka 5). Většinu organických látek, například uhlovodíky, mastné kyseliny a alkoholy s dlouhým řetězcem, nedokáží methanogenní mikroorganismy využít jako substrát. Tyto sloučeniny musí být nejdříve zpracovány anaerobními bakteriemi nebo eukaryoty, a methanogeny jsou tudíž na těchto organismech závislé (Liu a kol., 2008). Na základě současných znalostí lze přeměnu organické hmoty na methan rozdělit do čtyř hlavních kroků (Zinder, 1993):

- (v) *hydrolyza*
- (vi) *acidogeneze*
- (vii) *acetogeneze*
- (viii) *methanogeneze*

Tabulka 5 Typy reakcí během methanogeneze v závislosti na substrátu a organismu (modifikováno dle Hedderich a Whitman, 2006; Zinder, 1993).

Reakce	Organismus
1. CO₂	
$4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	Většina methanogenů
$4 \text{ HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + 4 \text{ aceton} + 2 \text{ H}_2\text{O}$	Většina hydrogenotrofů
$\text{CO}_2 + 4 \text{ isopropanol} \rightarrow \text{CH}_4 + 4 \text{ aceton} + 2 \text{ H}_2\text{O}$	Někteří hydrogenotrofové
$\text{CO} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{ CO}_2$	<i>Methanothermobacter</i> a <i>Methanosarcina</i>
2. Methylované C₁ sloučeniny	
$\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	<i>Methanosarcina</i> a další methylotrófové
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	<i>Methanomicrococcus blatticola</i> a <i>Methanosphaera</i>
$2 (\text{CH}_3)_2\text{-S} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ H}_2\text{S}$	Někteří methylotrófové
$4 \text{ CH}_3\text{-NH}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{ NH}_3$	Někteří methylotrófové
$2 (\text{CH}_3)_2\text{-NH} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{ NH}_3$	Někteří methylotrófové
$4 (\text{CH}_3)_3\text{-N} + 6 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 9 \text{ CH}_4 + 3 \text{ CO}_2 + 4 \text{ NH}_3$	Někteří methylotrófové
$4 \text{ CH}_3\text{NH}_3\text{Cl} + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 3 \text{ CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{ NH}_4\text{Cl}$	Někteří methylotrófové
3. Acetát	
$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	<i>Methanosarcina</i> a <i>Methanosaeta</i>

První tři kroky produkce bioplynu mohou být prováděny širokým spektrem mikroorganismů, ale poslední krok, methanogeneze souvisí výhradně s methanogenními *Archaea* (Chaban a kol., 2006).

Methanogeneze může probíhat třemi hlavními cestami:

- (i) *hydrogenotrofní* (z CO_2 a H_2)
- (ii) *acetoklastická* (z acetátu)

(iii) *methyloτροφická (methanol, methylaminy)*

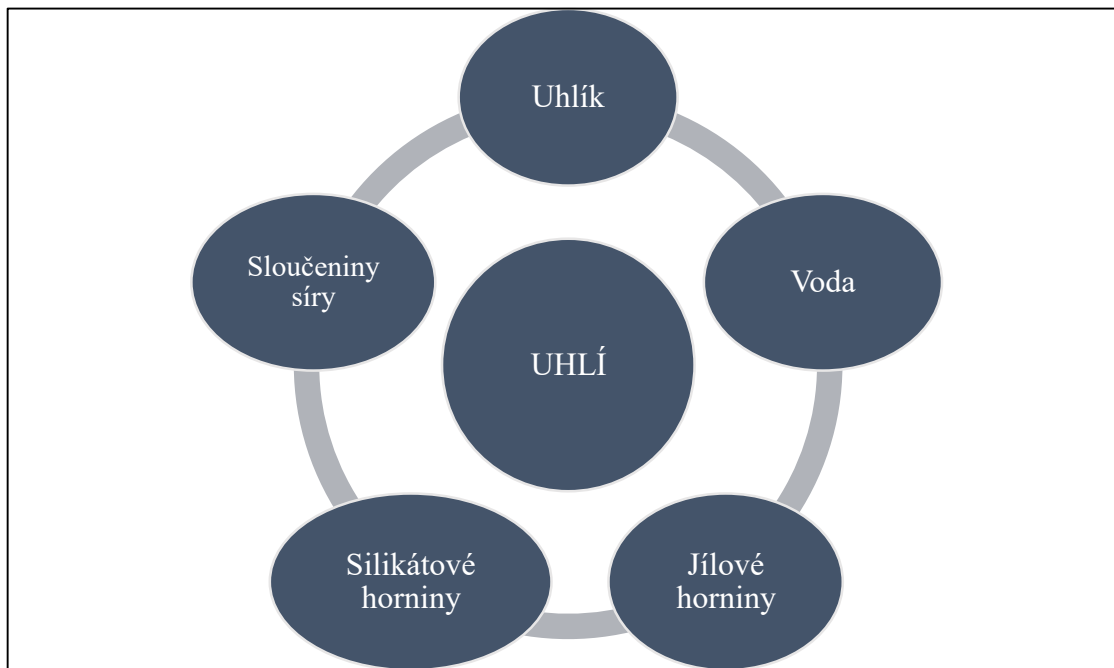
Bez ohledu na typ metabolické dráhy methanogeneze zahrnuje její poslední společný krok redukci methyl-koenzymu M na methan. U hydrogenotrofních a acetoklastických drah dochází k přenosu uhlíku v šesti, a třech až čtyřech krocích, zatímco v methyloτροφické dráze je pro redukci methylovaných sloučenin potřebná pouze jedna třída enzymů (methyltransferázy). Hydrogenotrofní a methyloτροφická methanogeneze je termodynamicky příznivější než acetoklastická (Hedderich a kol., 2006). Většina methanogenů redukuje oxid uhličitý. V řádech *Methanosarcinales*, *Methanobacteriales* a *Methanomassiliicoccales* však existují mikroorganismy se schopností přeměnit methylované sloučeniny na methan, zatímco zástupci *Methanosarcinales* jsou schopni využívat také acetát. Všechny tři dráhy methanogeneze byly doposud potvrzeny pouze u *Methanosarcina* (Liu a Whitman., 2008).

Většina zdrojů popisuje methanogeny jako vysoce citlivé na přítomnost kyslíku a redoxní potenciál $E_h > -200$ mV (Wang a kol., 2015; Yagi a kol., 1996), tento popis však nemusí být zcela správný. Methanogenní mikroorganismy izolované z půdy nejsou podle Fetzer a kol., 1993; Fetzer a Conrad, 1993 příliš citlivé na vysoký redoxní potenciál ani expozici kyslíku. Bylo zjištěno, že některé specifické druhy žijí na stanovištích v oxických podmínkách a zjevně jsou schopny přijímat kyslík, pokud je dodáván v nízkých koncentracích (Leadbetter a Breznak, 1996).

1.6 Methan v uhelných dolech

Přibližně 71,4 % celosvětových zásob fosilních paliv se nachází ve formě uhlí. Jedná se o černou, hnědou nebo hnědočernou sedimentovanou horninu, vzniklou nahromaděním rostlinné biomasy ve vodním prostředí s nedostatkem kyslíku. Toto anaerobní prostředí, nejčastěji rašeliniště, zabránilo kompletní oxidaci rostlinného materiálu a mohlo tak dojít ke vzniku uhlí (Dopita a kol., 1985).

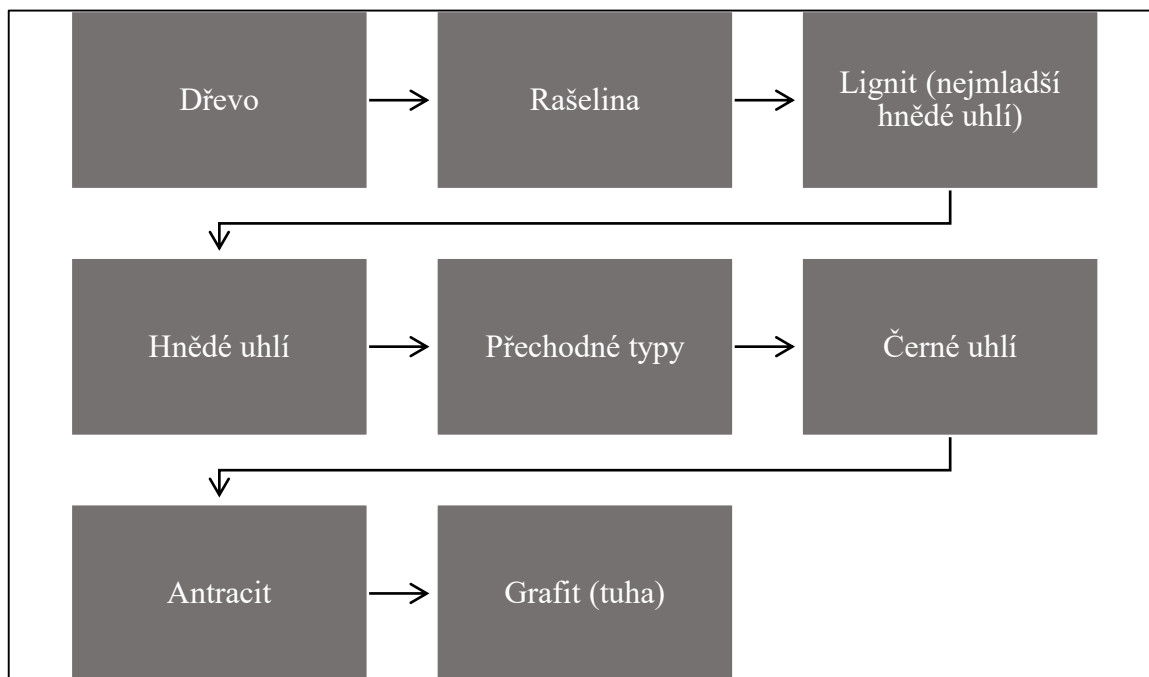
Podle stupně prouhelnění lze uhlí rozdělit na rašelinu, hnědé uhlí, černé uhlí a antracit. Hnědé uhlí pochází z terciéru až křídý a celkový obsah uhlíku zde kolísá mezi 60–75 %. Černé uhlí s obsahem uhlíku 74–91 % pochází z období karbonu či permu. Nejvyšší obsah uhlíku se vyskytuje v antracitu, a to 92–98 % (Dopita a kol., 1985). Jednotlivé složky uhlí jsou znázorněny na obrázku (Obrázek 2).



Obrázek 2 Složení uhlí (OKD, 2012)

Je předpokládáno, že methan vzniká v uhelných dolech dvěma odlišnými procesy, termogenními a biogenními. Termogenní plyny jsou tvořeny disociací organické hmoty v uhlí, zatímco biogenní plyny vznikají mikrobiálním procesem. Termogenní metan vzniká v horninovém prostředí při tepelném zrání kerogenu hornin a uhlí (Flores, 2008).

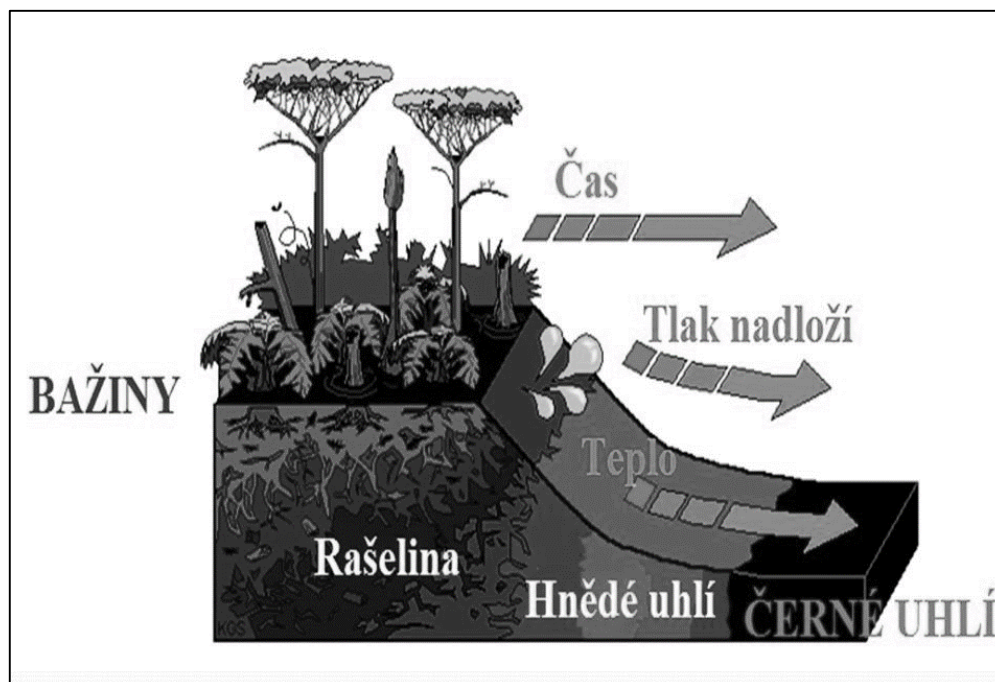
Většina zemních plynů je termogenního původu. Mikrobiální metan vzniká metabolismem konsorcií metanogenních *Archaea* v bezkyslíkovém prostředí, např. v uhelných slojích nebo na jejich kontaktu se zvodněnými pískovci. Účinným nástrojem pro rozlišení uvedených dvou typů methanu je přitom chemická a izotopová analýza plynů. Mikrobiální metan je suchý, tj. neobsahuje vyšší plynné uhlovodíky (ethan, propan, butan). Podpora mikrobiálních konsorcií, která jsou schopna produkovat biogenní metan, představuje jednu z alternativ k neobnovitelným zdrojům energie, protože spalování methanu emituje výrazně méně oxidu uhličitého než konvenční fosilní paliva, jako je uhlí a ropa (Flores, 2008).



Obrázek 3 Typy uhlí podle stupně přeměny (OKD, 2012)

Jak už bylo zmíněno výše, proces kolifikace (tvorba uhlí) zahrnuje jak biochemické, tak geochemické reakce. Rostlinná hmota je nejdříve rozkládána anaerobně pod vodou, molekuly odvozené od počátečního substrátu (acetát, CO_2 , H_2 , NH_4^+ , HS^- , mastné kyseliny s dlouhým řetězcem) jsou dále metabolizovány. Fermentační *Archaea* poté produkují methan dvěma cestami, a to acetoklastickou reakcí nebo redukcí CO_2 . V průběhu kolifikace narůstá i obsah uhlíku, doprovázený relativním vyčerpáním těkavých sloučenin, jako je vodík a kyslík, uvolněných ve formě vody, methanu, oxidu uhličitého a vyšších uhlovodíků dekarboxylačními a dehydratačními reakcemi (Whiticar, 1999).

Při zvyšování teploty jsou kapalné uhlovodíky tepelně krakovány na methan, což zvyšuje množství produkovaného methanu (Faiz a Hendry, 2006). Proces přeměny rostlinného materiálu v uhlí znázorňují obrázky (Obrázek 3, Obrázek 4). Výsledkem první fáze procesu kolifikace je vznik rašeliny a hnědého uhlí. Vertikální tlak vyvíjený hromaděním sedimentů přeměňuje rašelinu na lignit. Intenzifikace tlaku a tepla vede k přeměně lignitu na dvoubarevné uhlí a následně antracit, uhlí s nejvyšším obsahem uhlíku (O'Keefe, 2013). Během stadia rašeliny a hnědého uhlí dochází k tvorbě primárního biogenního methanu, který je rozpuštěný ve vodě, protože uhlí dosud není strukturováno k zadržení plynu (Kotarba a Rice, 2001).



Obrázek 4 Mechanismus tvorby uhlí z rostlinného materiálu (Těžba a využití černého uhlí, 2011)

Ve velkých hloubkách a při vysoké teplotě dochází k tepelné modifikaci sedimentární organické hmoty a při zvednutí pánve může být spuštěna produkce methanu proudem meteorické vody do uhlí. Tímto procesem tak dochází ke vzniku sekundárního biogenního plynu. Sekundární biogenní plyny jsou generovány metabolickou aktivitou bakterií, která je započata proudícími meteorickými vodami skrz propustné uhelné lože nebo jiné horniny bohaté na organické sloučeniny. Bakterie metabolizují složky mokrého plynu, n-alkany a další organické sloučeniny při relativně nízkých teplotách za vzniku methanu a oxidu uhličitého. Primární biogenní methan není v uhlí zachován ve významném množství, což naznačuje, že většina biogenních plynů nalezených v uhelných ložiscích jsou sekundárního biogenního původu. Přítomnost biogenních plynů je tedy řízena především hydrogeologií podloží. Významná cirkulace podzemní vody nastává až po vytvoření klastrů, vyzdvižení podloží a expozici zvodnělých vrstev (Scott a Kaiser, 1994).

Chemické složení těžebního plynu, stabilní poměry izotopů uhlíku a vodíku methanu, dále také izotopová frakcionace mezi CO_2 a CH_4 jsou běžně používány k rozlišení původu methanu v uhelném dole. Použitím metody stabilního izotopu lze rozlišit původ methanu z různých uhelných slojí. Ukázalo se, že biogenní methan tvoří asi 20 % zásob plynu na světě (Conrad, 2005). Přítomnost termogenního plynu však nenaznačuje potenciál pro biogenní

methanogenezi v uhelných slojích, neboť o mikrobiálních komunitách a biogenním potenciálu v uhelných dolech je dosud málo známo (Kimura a kol., 2010).

Termogenní methan je ve srovnání s biogenním methanem izotopicky obohacen o ^{13}C ($\delta^{13}\text{C} > 50 \text{ ‰}$), protože methanogeny přednostně využívají pro tvorbu methanu lehčí izotopy C z důvodu nižší vazebné energie. Migrace methanu z jednotlivých hloubkových zón může ovlivnit izotopové složení (Clayton, 1998).

Izotopové hodnoty methanu $\delta^{13}\text{C}$ vykazují extrémně široký rozsah. Porozumění procesům, které toto izotopové složení methanu řídí, vyžaduje zaměření na konkrétní soubor geologických podmínek v dané lokalitě (Zazzeri a kol., 2016).

Biogenní tvorba methanu byla identifikována ve studii zahrnující uhlí nízké kvality, konkrétně lignit. Toto uhlí je složeno z frakcí vysoce rozvětvených sloučenin s četnými funkčními skupinami obsahujícími kyslík. Některé z těchto složek jsou biologicky dostupné pro mikrobiální společenství v uhelných slojích (Harris a kol., 2008). Naproti tomu uhlí vyšší kvality je dle většiny studií pro biogenní tvorbu methanu méně příznivé. I přesto ale byla produkce methanu v černouhelných lokalitách popsána (Faiz a Hendry, 2006).

Fakultativní bakterie nejprve rozloží organické komplexy na meziprodukty, které jsou využity jinými kmeny k fermentaci. Vzniklé produkty, kterými jsou především CO_2 , H_2 a acetát, slouží jako substrát pro methanogeny. Ty jsou podle typu využívaného substrátu děleny na acetoklastické a hydrogenotrofní. Podle Bapteste a kol. napomáhají hydrogenotrofní methanogeny udržovat stabilně nízké hladiny vodíku v atmosféře (Bapteste, 2005).

Acetoklastické methanogeny využívají acetát, který konvertují do methanu a oxidu uhličitého, zatímco hydrogenotrofní využívají oxid uhličitý a vodík. Finální reakcí je konverze substrátů do methyl-koenzymu M a následně do methanu. Tento krok je zprostředkován enzymem methyl CoM reduktáza (MCR), který je společný pro všechny methanogeny a umožňuje je tak detekovat prostřednictvím molekulárně biologických metod. Enzym MCR (Obrázek 5) je kódován genem *mcrA*, který je rovněž přítomen u všech methanogenů (Hallam a kol., 2003).

Prostřednictvím symbiózy mezi anaerobními oxidačními bakteriemi a sulfátredukcujícími bakteriemi dochází také k anaerobní oxidaci methanu (Hinrichs a kol., 1999). Sulfátová redukce je důležitou metabolickou drahou a má velký význam pro globální cyklus uhlíku a síry. Jako akceptor elektronů nebo organická hmota slouží těmto mikroorganismům funkční skupina SO_4^{2-} , donorem elektronů je pak vodík. Podzemní vody v uhelných dolech

jsou pak členěny do mikrobiálních zón podle prosakování povrchových atmosférických srážek a rozpuštěných minerálů, a jsou tak vhodným prostředím pro methanogeny, aerobní methanotrofní bakterie, anaerobní methan oxidující *Archaea* (ANME) a sulfát redukující bakterie (SRB) (Shen a kol., 2001).



Obrázek 5 Struktura MCR (Ermler a kol., 1997)

Aerobní methanotrofní bakterie dominují v prostředí s vysokou koncentrací kyslíku, zatímco anaerobní *Archaea* nebo bakterie *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* (denitrifikační methanotrof) vyžadují extrémně nízkou koncentraci až absenci kyslíku. Například Lai a kol. (2016) zjistili, že chromát lze redukovat pomocí methanu jako donoru elektronů, a to v případě, že koncentrace rozpuštěného kyslíku v prostředí je $6,2\mu\text{M}$ a biofilmu dominují aerobní methanotrofy. Hranice absolutního obsahu kyslíku, která by určovala, zda budou v prostředí převládat aerobní nebo anaerobní mikroorganismy však neexistuje (Ettwig a kol., 2010).

Anaerobní oxidace methanu (AOM) je zásadním mechanismem pro řízení toku methanu z anoxického prostředí. AOM ve spojení s redukcí železa, manganu a sulfátu byla prokázána v konsorciích obsahujících anaerobní methan oxidující *Archaea* (ANME) (Ettwig a kol., 2010).

Anaerobní methan oxidující *Archaea* (ANME) provádí anaerobní oxidaci methanu obrácením methanogenní dráhy. ANME byly poprvé objeveny v mořských sedimentech, kde byla AOM spojena s redukcí sulfátu. ANME tedy tvoří metabolicky vzájemně závislá konsorcia s bakteriemi SRB (Knittel a kol., 2010).

Zatímco během hydrogenotrofní methanogeneze dochází k redukcí CO_2 na CH_4 , methylotrofní tvorba methanu, kterou využívají ANME, představuje částečně obrácený proces. Methan oxidující anaerobní *Archaea* využívají sloučeniny s 1 uhlíkem, jako jsou methylaminy, methanol nebo sloučeniny methylované síry (methanthiol, dimethylsulfid, které jsou aktivovány na methyl koenzym M. I přes odlišný metabolismus obsahují ANME gen *mcrA* (Deppenmeier a kol., 1996).

Strukturu methanogenního konsorcia ovlivňuje teplota prostředí. Studie Conrad a kol. (2009) poukazuje na změnu společenstva acetoklastická/hydrogenotrofní methanogeneze na čistě hydrogenotrofní společenstvo, v případě teploty prostředí 42–46 °C. Chin a kol. (1998) popsali výskyt *Methanosarcinaceae* při teplotě 30 °C a převahu *Methanosaetaceae* při teplotě 15 °C. V případě změny teploty vody, prostředí, oxických podmínek nebo kompetici jiných mikroorganismů o dostupné elektrony může dojít k inhibici methanogeneze (McHugh a kol., 2003).

1.7 Podpora methanogeneze

Z důvodů omezení vypouštění emisí do ovzduší a podpory udržitelné výroby energie je dnes o biogenní methan velký zájem (Strapoc a kol., 2011). Uhelňé lože se skládá z komplikovaného systému zlomů. Nesourodý povrch mikropórů uhelňé matrice poskytuje široké spektrum uložení plynu. Z toho důvodu lze bez stimulace extrahovat méně než 50 % plynu (Alexeev a kol., 1999). Při extrakci methanu je tok plynu řízen propustností uhlí. Většina uhelňých slojí je však charakteristická propustností tak nízkou, že samotné získávání plynu bez stimulace nepředstavuje ekonomickou variantu. Během posledních několika desetiletí byla však vyvinuta řada stimulačních technik (Fei a kol., 2018).

Hydraulické techniky, jako je hydraulické štěpení, hydraulické drážkování a hydraulické děrování, jsou pravděpodobně nejrozšířenějšími nástroji vhodnými ke štěpení uhelňého tělesa a vytvoření nových trhlin pro zlepšení průtoku kapaliny v uhelňé sloji a následné vytlačení plynu na povrch. Tyto techniky však spotřebovávají značné množství vody, což může mít negativní vliv na životní prostředí, a to jak z hlediska využití čisté vody, tak z hlediska možné kontaminace podzemních vod (Yekeen a kol., 2018).

Později byly navrženy tzv. bezvodé stimulační techniky, jako jsou přidavek oxidu uhličitého nebo dusíku. Tyto plyny snižují parciální tlak methanu v mikropórech a methan je tak snadněji desorbován. V případě oxidu uhličitého tato metoda přináší výhodu pro životní prostředí prostřednictvím trvalého skladování CO₂ v podzemí (Zhang a kol., 2020).

Podle stimulačního mechanismu mohou být techniky stimulace rozděleny do tří skupin. První skupinou je technika mechanické stimulace, do které se řadí například hydraulická technika a tryskání hlubokých děr, která způsobí přerozdělení napětí a tvorbu nových trhlin v uhelné sloji. Druhým typem je technika tepelné stimulace (kryogenní kapalný dusík, technika mikrovlnného ohřevu) a mezi třetí způsob je řazena metoda chemická, a to metoda okyselení a metoda mikrobiální stimulace, která může změnit pórovitost uhlí rozpuštěním minerálů a organických látek (Zhang a kol., 2020).

Mikrobiální stimulace methanogeneze zahrnuje přidání živin (dusík a fosfor) a/nebo mikroživin (vitamíny a stopové prvky) do uhelných slojí. Živiny mohou být přidávány za účelem zvýšení produkce methanu do míst, kde dochází k aktivní tvorbě mikrobiálního methanu, nebo jsou přidávány do oblastí, kde nebyla tvorba methanu potvrzena. V tomto případě lze stimulovat tvorbu methanogenních komunit a vytvořit podmínky vhodné pro methanogenezi (Barnhart a kol., 2013).

Ačkoliv lze methanogeny stimulovat k produkci methanu pouhým přidáním acetátu a/nebo oxidu uhličitého a vodíku, primárním cílem mikrobiální stimulace je podpora methanogeneze závislé na uhlí (Schlegel a kol., 2013). V kontextu methanogeneze závislé na uhlí byly jedněmi z hlavních studovaných živin buněčné extrakty (kvasničný extrakt). I přes vysoké hladiny dusíkatých sloučenin jsou tyto extrakty komplexní směsí dusíku, fosforu, uhlíku a dalších mikroživin. Proto je obtížné určit stimulanty, které mají největší dopad na mikrobiální společenstvo (Fallgren a kol., 2013).

Mikrobiální augmentace je proces přidávání nových nebo dalších mikroorganismů do uhelných dolů za účelem zvýšení nebo zahájení mikrobiální produkce methanu. Přídavkem může být pouze jediný mikroorganismus nebo konsorcium mikroorganismů (bakterie a *Archaea*). V některých případech je nutné upravit redoxní podmínky nebo salinitu uhelného lože. Methanogeneze může být totiž v určitých lokalitách omezena z důvodu vysokých (inhibičních) koncentrací síranů nebo chloridů. Může být také značně obtížné získat povolení k vnášení mikroorganismů do podpovrchové vrstvy, zejména do vodonosných vrstev, které obsahují pitnou vodu (Ritter a kol., 2015).

Další z technik podpory methanogeneze je zvětšení dostupné povrchové plochy pro mikrobiální kolonizaci. Toho lze dosáhnout mletím uhlí (obvykle *ex situ*), zvětšením uhelné sloje, štěpením uhlí, rozpuštěním uhlí pomocí podzemního roztoku k vytvoření dutin nebo zvětšení pórovitosti (Strapoc a kol., 2011).

Přístup ke zvýšení biologické dostupnosti organických látek v uhlí zahrnuje chemické štěpení geopolymérů uhlí tak, aby mikroorganismy během tvorby metanu mohly využívat vedlejší produkty. Biotický a abiotický proces štěpení uhlí na meziproducty je totiž často považován za krok omezující rychlost methanogeneze. Použití rozpuštědla nebo jiných prostředků (alkohol, biosurfaktanty, emulgovaný sójový olej) by mohlo zlepšit biologickou dostupnost organických látek v uhlí a zvýšit tak rychlost methanogeneze. Laboratorní studie naznačují, že přidání silného oxidačního činidla, jako je manganistan draselný nebo peroxid vodíku, může pomoci k přeměně uhlí na organické kyseliny (Jones a kol., 2013).

Nelze ale vyloučit, že tyto změny mohou zahrnovat chemikálie, které jsou pro methanogeny toxické nebo které mohou kontaminovat zdroje pitné vody. Produkce methanu vede ke změnám v půdě, povrchových vodách a systémech podzemní vody. Tyto změny by měly být sledovány (Scott, 1999).

Uhelný methan získávaný domácím trhem snižuje naši potřebu dovážet energii. Pokud jsou si geologové vědomi depozičních prostředí, kde by mohlo docházet k produkci methanu, náklady na rozsáhlý výzkum jsou sníženy. Dalším aspektem je, že methan představuje relativně čistý spalovací zdroj energie. Kombinace těchto faktorů tak popisuje tento plyn jako vhodný a dostupný lokální zdroj energie. Biogenní methan tak může být s výhodou využíván jako obnovitelný zdroj energie a přispívat tak k rozvoji udržitelné ekonomiky (Jones a kol., 2013).

2 VYBRANÉ METODY STUDIA METHANOGENNÍCH ORGANISMŮ

2.1 Analytické a instrumentální metody

Analytické a instrumentální metody ve studiu methanogenních organismů v uhelných dolech se zabývají především měřením vyprodukovaného methanu. Po odběru pevných a kapalných vzorků jsou obvykle měřeny následující parametry: teplota, relativní vlhkost a tlak na povrchu, teplota a tlak v místě odběru. Dále jsou prováděna orientační měření chemického složení plynů (O_2 , CH_4 , CO_2 , H_2S) pomocí mobilních zařízení (Ecoprobe 5, Draeger, Biogas, Anagas). V pevných vzorcích uhlí lze následně změřit obsah celkového organického uhlíku (TOC – total organic carbon), celkového minerálního uhlíku (TIC – total inorganic carbon) a celkové síry (TS – total sulphur), k tomu lze využít přístroje s infračervenou detekcí (Kotarba a Clayton, 2003; Milicka a kol, 1994).

Chemické složení plynů je možné měřit pomocí plynové chromatografie s TCD/FID detektorem. Výsledkem je především obsah CO_2 , CO , O_2 , N_2 , CH_4 . Geochemické markery methanogenních a methanotrofních konsorcií v pevných vzorcích a ve vzorcích vody lze měřit na plynovém chromatografu s hmotnostně selektivním detektorem. Významnou metodou je také plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií, udávající izotopové složení uhlíku ($\delta^{13}C$) a vodíku (δD) v methanu (Jones a kol., 2008).

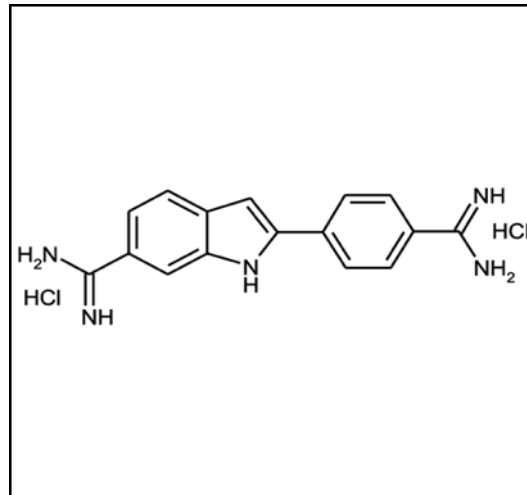
K analýze pevných vzorků může dále sloužit mikroskopie v odraženém a fluorescenčním světle. Fázové složení jílových minerálů v pevných maticích lze měřit práškovou rentgen difrakční analýzou (Milicka a kol, 1994).

2.2 Kultivační metody

Celkový počet fakultativně anaerobních mikroorganismů je stanoven na agarových miskách s Plate Count Agarem, anaerobních mikroorganismů na miskách s anaerobním agarem a methanogenních mikroorganismů na médiu určeném pro methanogeny (Apolinario a Sovers, 1996).

Celkový počet mikroorganismů lze stanovit barvením pomocí DAPI (Obrázek 6). Jedná se o fluorescenční barvivo, které prochází buněčnou membránou, váže se na oblasti DNA bohaté na AT, a proto je ve fluorescenční mikroskopii používáno k barvení buněčných jader. Barvit lze přímo kapalnou vzorek, při nízké koncentraci biomasy je nutná filtrace. U pevných

vzorků je třeba homogenizace a separace buněk od matrice. Barvivo představuje sondu pro jadernou, mitochondriální i chloroplastovou DNA. Přednostně se v buňkách váže na dvouřetězcovou DNA. Barvenou buňku, která září jasně modrou barvou, lze poté vidět při vlnové délce 365 nm (Porter a Feig, 1980).



Obrázek 6 DAPI (2-(4-amidinofenyl)-
1H-indol-6-carboxamidin))

Další metodou je stanovení pomocí fluorescenční mikroskopie, tzv. Live and Dead barvení. Po kultivaci methanogenů na selektivním médiu lze pomocí testu sledovat mrtvé a živé buňky. Vlastní test se skládá ze dvou komponentů, které pronikají buněčnou stěnou, následnou reakcí s vnitřním prostředím buňky dochází ke vzniku barevné fáze. Živé bakteriální buňky s neporušenou buněčnou membránou propouštějí pouze molekuly složky A, a tím dochází k výraznému zelenému zabarvení vnitřního prostředí, zatímco buňky mrtvé s porušenou buněčnou membránou jsou přístupné i pro molekuly složky B (propidium jodid), jež v redukční reakci se složkou A vytvářejí výrazné červenohnědé zbarvení. Výhodou tohoto testu je poměrně krátká doba provedení. V případě methanogenních mikroorganismů lze využít i autofluorescenčních vlastností buněk. Buňky lze pozorovat pod UV filtrem jako modré objekty. Při nízké koncentraci buněk je nutné před stanovením médium nejprve přefiltrovat a methanogeny tak zahustit (Robertson a kol., 2019).

Intenzitu metabolických procesů lze stanovit pomocí spektrofotometrického měření množství produktu vzniklého aktivitou buněčných enzymů. Podíl respirujících buněk ve společenstvu může být odhadnut na základě měření aktivity dehydrogenáz v elektron transportním systému dýchacího řetězce. Iodonitro-tetrazolium chlorid proniká membránovým systémem buňky a je redukován elektron-transportním systémem bakteriální buňky za vzniku

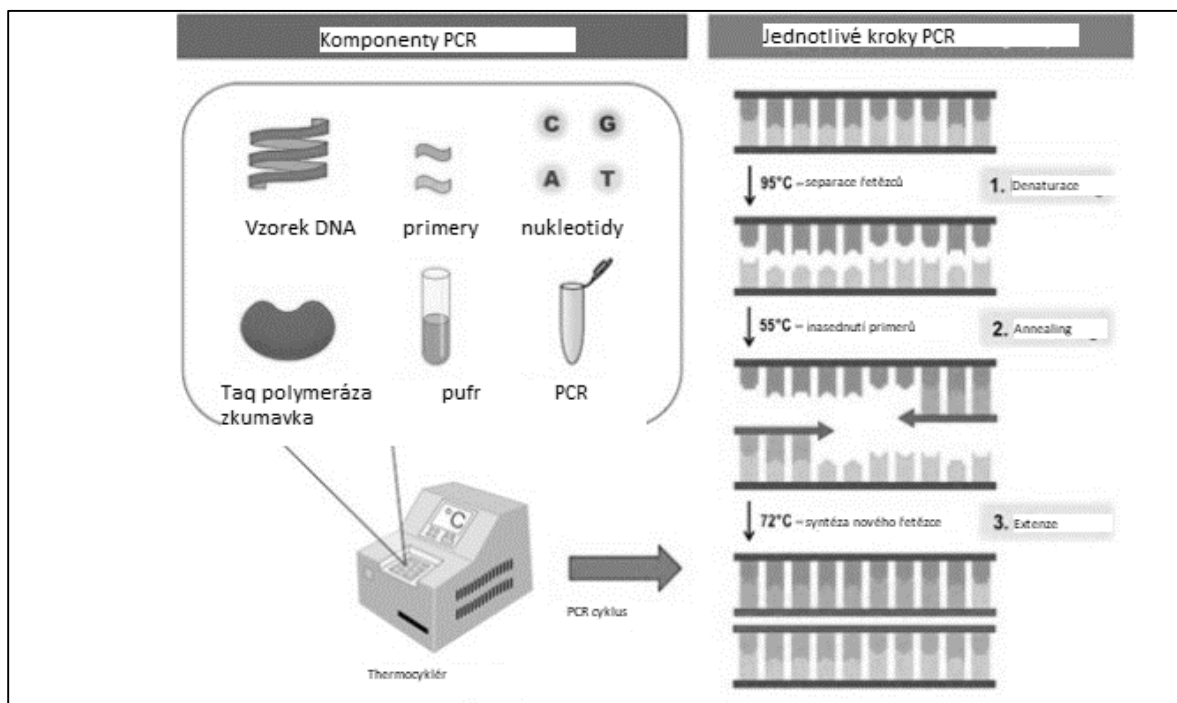
fluorescenčního produktu. Ke stanovení aktivity nespecifických esteráz slouží jako substrát fluorescein diacetát, který je jejich činností štěpen na fluorescein. Množství produktu vzniklého činností buněčných enzymů odráží metabolickou aktivitu společenstva (Battin a kol., 2001).

2.3 Molekulárně biologické metody

2.3.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce je založena na rychlém namnožení úseku DNA. Základním principem PCR je opakovaná řízená denaturace dvouřetězcové DNA a následná renaturace osamocených řetězců se specifickými oligonukleotidy, které jsou v reakční směsi v nadbytku. Tyto oligonukleotidy slouží následně jako primery pro syntézu nového řetězce DNA.

Reakční směs je tedy složena z templátové DNA, synteticky připravených primerů, směsi nukleotidů dNTP, termostabilní DNA polymerázy, přičemž dNTP a DNA polymeráza jsou zpravidla součástí tzv. mastermixu. Amplifikace DNA probíhá v opakujících se cyklech, které mají následující kroky (Obrázek 7): počáteční denaturace, denaturace řetězců DNA, annealing, elongace (Nolan, 2014).



Obrázek 7 Schéma průběhu PCR (upraveno podle BioNinja)

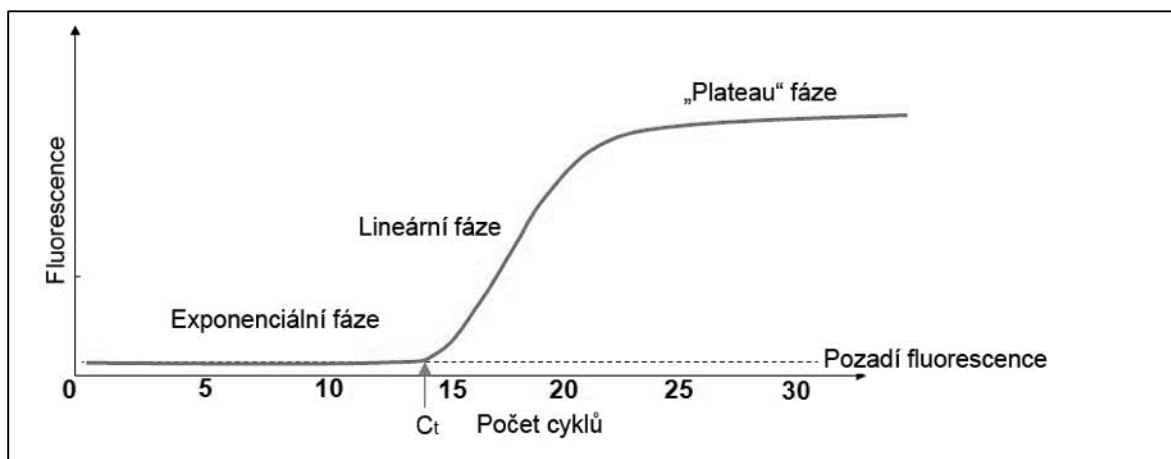
Amplifikovaný úsek DNA lze analyzovat např. stanovením velikosti produktu gelovou elektroforézou, štěpením restrikcími enzymy a posouzením vznikajících restrikcími fragmentů

(RFLP), hybridizací se značenou sondou komplementární k části sekvence amplifikovaného úseku (southern blot) nebo stanovením sekvence DNA (sekvenování). Výhodou PCR je, že vyžaduje minimální množství DNA. Touto metodou lze získat 2^n kopií DNA, kdy n je počet cyklů. Z jedné molekuly DNA lze tedy například získat po proběhnutí 30 amplifikačních cyklů více než 109 kopií (Nolan, 2014).

2.3.2 qPCR

Kvantitativní realtime PCR využívá speciálního thermocykléru, který umožňuje zaznamenávat množství DNA v průběhu každého cyklu. Toto množství je detekováno prostřednictvím fluorescenčního substrátu. Po navázání substrátu na DNA, dochází k vyzaření fluorescenčního záření. Zdrojem fluorescence může být substrát SyberGreen, který je vzhledem k vazbě na DNA nespecifický, nebo lze použít vysoce specifické TaqMan sondy, Molecular Beacon sondy, Scorpion sondy a další (LabGuide, 2014-2019).

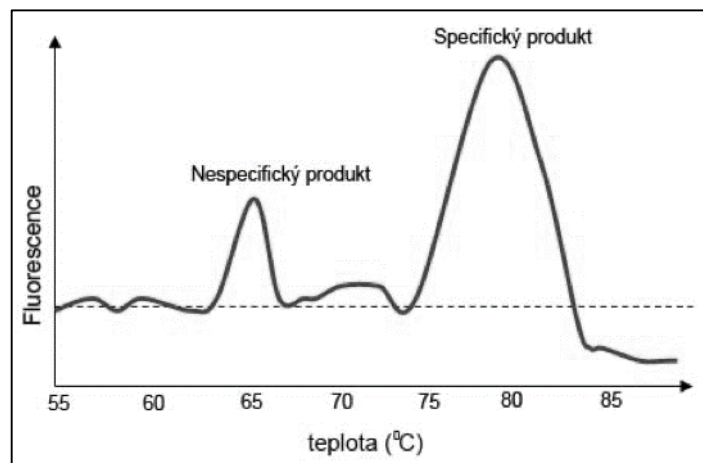
V počátečních cyklech (Obrázek 8) lze pozorovat exponenciální nárůst amplifikovaných sekvencí. Následně dochází k lineární fázi, primery jsou spotřebovávány na neúměrně narůstající množství amplikonu a reakce je tak zpomalována. Ve fázi plató již množství produktu neroste, a to z důvodu vyčerpání primerů. Cyklus, ve kterém je zaznamenán počátek exponenciální fáze, je označen hodnotou C_t . Tato hodnota udává počet cyklů, při kterém fluorescence překročí práh pozadí, které se v reakci vyskytuje. C_t hodnota je následně využívána k dalším výpočtům (Nolan, 2014).



Obrázek 8 Jednotlivé fáze qPCR (LabGuide, 2019)

Relativní kvantifikace je provedena srovnáním množství fluorescence testovaného vzorku s množstvím fluorescence jiného vzorku. Absolutní kvantifikace představuje přípravu kalibrační křivky, která umožňuje odečtení množství DNA o dané koncentraci (Nolan, 2014).

S kvantifikačními metodami souvisí také zohlednění účinnosti reakce. Ta závisí na nasedání primerů, složení reakce, přítomnosti PCR inhibitorů nebo enhancerů. Nejprve je třeba vytvořit standardní křivku. Templátová DNA je naředěna desítkovým ředěním a následně je provedena qPCR. Propojením hodnot Ct a koncentrací jednotlivých ředění je sestavena standardní křivka. Účinnost reakce tak lze stanovit ze sklonu standardní křivky. Pokud je efektivita reakce 100 %, sklon standardní křivky je -3,32. Pokud je hodnota sklonu nižší, reakce proběhla s efektivitou menší, než 100 %. Vyšší hodnota naopak značí nízkou kvalitu vzorku nebo špatně připravenou reakční směs. V případě nízké účinnosti je přesnost kvantifikace nízká. Ke kontrole průběhu reakce v případě použití mastermixu SyberGreen slouží křivka tání (melting curve). Křivka umožňuje odlišit nespecifické produkty od specifických a lze ji zobrazit po proběhnutí reakce dodaným softwarem k thermocykléru. Dva a více vrcholů křivky (Obrázek 9) značí vznik nespecifických produktů (Nolan, 2014).



Obrázek 9 Využití křivky tání k odlišení specifických a nespecifických produktů (LabGuide, 2019)

Pomocí metody je možno specificky detekovat přítomnost methanogenů ve vzorcích a také kvantifikovat jejich zastoupení jako počet kopií klíčového funkčního genu v jednotkovém množství vzorku. Tímto způsobem je možné také monitorovat dynamiku přítomnosti methanogenů například v průběhu kultivace, nebo v reakci na zásah (Nolan, 2014).

2.3.3 DNA markery

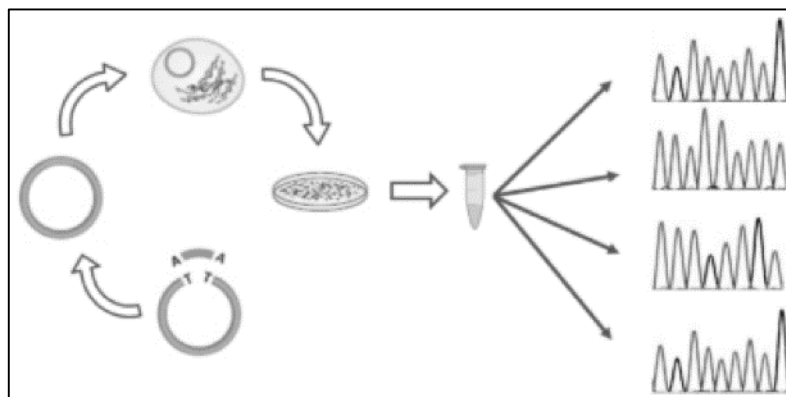
Jedním z vhodných DNA markerů je gen 16S rRNA. Jedná se o 1542 nukleotidů dlouhou sekvenci RNA, která tvoří složku menší 30S podjednotky ribozomu prokaryot. Obsahuje jak velmi konzervované oblasti, tak oblasti, které jsou variabilní a charakteristické pro každý bakteriální druh. Je tedy možno sledovat jak methanogeny, tak doprovodnou mikroflóru (Kim a Chun, 2014; Isaac, 2015).

Dalším vhodným markerem je gen *mcrA*, kterým disponují všechny známé methanogeny. Gen *mcrA* exprimuje enzym methyl koenzym M reduktázu (MCR), který katalyzuje terminální krok v produkci biogenního methanu. V současnosti je přítomnost MCR považována za indikátor methanogeneze (Weimer a Zeikus, 1978). Genomy všech methanogenních *Archaei* kódují alespoň jednu kopii *mcrA* operonu. Enzym *mcrA* je složen ze tří komponent, a to A, C a kofaktoru B. Komponent C představuje místo pro redukci methylu a skládá se z podjednotek alfa, beta a gama. Tyto podjednotky jsou kódovány geny *mcrA*, *mcrB* a *mcrG*. U samotného *mcrA* operonu lze rozlišit dvě formy. Zatímco forma MCRI je přítomna u všech methanogenů, forma MCRII byla potvrzena pouze u *Methanobacteriales* a *Methanococcales* (Luton a kol., 2002).

Enzym MCR katalyzuje tvorbu heterosulfidové formace mezi koenzymem M a koenzymem B z methyl-koenzymu M a koenzymu B, a následné uvolňování methanu (Ellerman a kol., 1988). Funkční omezení katalytické aktivity enzymu vedla k vysokému stupni zachování aminokyselinové sekvence MCR, a to i mezi fylogeneticky vzdálenými methanogenními liniemi (Lueders a kol., 2001).

2.3.4 Klonování

Jak znázorňuje obrázek (Obrázek 10), principem klonování je izolace DNA z buněk, amplifikace vybrané sekvence a její vložení do klonovacího vektoru (plazmid, bakteriofág). Následuje transport vektoru do hostitelské buňky (bakterie), která se dělí, vybraná sekvence je tak kopírována a dochází ke vzniku geneticky identických jedinců. Porovnáním sekvence se sekvencemi v databázi světové banky klonů lze pomocí počítačových programů určit ve vzorku přítomnost specifických taxonů (Brown, 2006).



Obrázek 10 Schematické znázornění průběhu klonování (LabGuide, 2019)

2.3.5 Denaturační gelová gradientová elektroforéza

DGGE představuje modifikaci gelové elektroforézy, která je využívána k oddělení fragmentů DNA. Po proběhnutí PCR dochází ke vzniku řady produktů s různou sekvencí DNA, které představují mikrobiální populaci přítomnou ve vzorku. Produkty PCR, které mají podobnou velikost (např. 200-700 bp), jsou konvenční separací elektroforézou na agarózovém gelu rozlišeny od ostatních pouze jedním bandem, který již nelze více specifikovat. Za účelem překonání tohoto omezení byla vyvinuta technika DGGE, která využívá diferenciální denaturační charakteristiky DNA. Krátké restrikční fragmenty stejné velikosti jsou naneseny na polyakrylamidový gel s nízkým až vysokým denaturačním gradientem. Zpočátku se fragmenty pohybují podle molekulové hmotnosti, postupně se dostávají do vyšších denaturačních podmínek, až dosáhnou denaturačního prahu. DNA začne denaturovat, migrace je dramaticky zpomalena a lze pozorovat zastavení mobility. Různé sekvence DNA (podle obsahu DNA bazí) denaturují při různých koncentracích, a proto vzniká množství bandů představující odlišnou mikrobiální populaci, kterou lze prostřednictvím sekvenace a dohledání v databázích blíže určit. Hlavní výhodou DGGE je citlivost (Singh a kol., 2012).

2.3.6 Sekvenace

Tato metoda umožňuje určit primární strukturu DNA, tedy pořadí jednotlivých nukleotidů v polypeptidovém řetězci. Porovnáním získané sekvence se sekvencemi mikroorganismů, které jsou dostupné v databázích lze identifikovat mikroorganismus přítomný v analyzovaném konsorciu. Nezávisle na sobě byly popsány v 70. letech 20. století metody Maxam-Gilbert (chemická metoda) a Sanger (enzymatická metoda).

Maxam-Gilbertova metoda zahrnuje modifikaci bází DNA chemickými činidly a následné specifické štěpení řetězce DNA (Maxam a Gilbert, 1977; Sanger a Coulson, 1977). Podstatou Sangerovy metody je ukončení replikačního procesu DNA na specifických místech pomocí terminátorů replikace. Maxam-Gilbertova metoda vykazuje mnohem nižší účinnost, z tohoto důvodu tak již není používána (King, 2006).

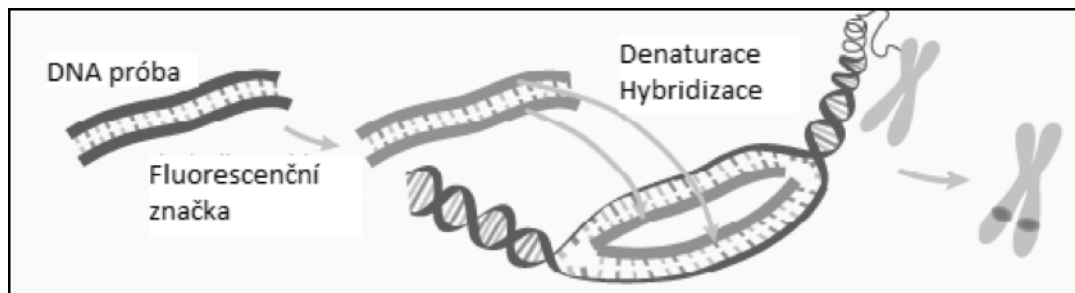
Podstatou Sangerova sekvenování je nasednutí 15-25 bp dlouhého primeru komplementárního k začátku sekvenovaného místa. Syntéza DNA probíhá od navázaného primeru za přítomnosti fluorescenčních značek, jimiž jsou dideoxynukleotidy (ddNTP). Dideoxynukleotidy jsou řazeny k nukleotidům původního řetězce DNA a z důvodu absence OH skupiny je syntéza zastavena. Dochází tak ke vzniku fluorescenčně značených fragmentů různé délky, jež jsou následně rozděleny kapilární elektroforézou v sekvenátoru. Získaný sekvenogram znázorňuje pořadí jednotlivých nukleotidů v testované DNA (Sanger a Coulson, 1977).

Zisk velkého množství osekvenovaných vzorků umožňuje Next Generation sequencing (NGS) neboli sekvenování nové generace. Tato metoda paralelizuje proces sekvenování, a to umožňuje vznik tisíců až milionů sekvencí současně. Next Generation sequencing zahrnuje mnoho technologií, přičemž mezi nejvýznamnější patří sekvenace syntézou, ligací a pyrosekvenování (Faure a Joly, 2015).

2.3.7 FISH

Pro identifikaci, vizualizaci a porovnání zastoupení methanogenů lze použít také fluorescenční in situ hybridizaci. Methanogeny lze takto vizualizovat nejen v kapalných vzorcích po odfiltrování vodné části, ale i v jemnozrnných pevných vzorcích, kde jsou adsorbovány na povrchu vzorků.

Tato metoda (Obrázek 11) spočívá ve fixaci biologických struktur a následné vizualizaci methanogenů pomocí fragmentu DNA, který je komplementární k charakteristické sekvenci v DNA methanogenů. Tento fragment je označen fluoreskující molekulou. Pro vizualizaci methanogenů lze využít například komerčního kitu VIT Methanogenic Bacteria, který je vhodný také pro *Archaea* (Vermicon).



Obrázek 11 Schematické znázornění průběhu FISH (Abnova, 2021)

3 CÍLE PRÁCE

TEORETICKÁ ČÁST

Vypracování literární rešerše zaměřené na methanogenní mikroorganismy, methan a jeho výskyt v uhelných dolech, jeho využití a vznik. Teoretická část byla dále zaměřená na metody stanovení methanogenních mikroorganismů v environmentálních vzorcích.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

- optimalizace molekulárně biologických metod pro sledování genu *mcrA* v různých environmentálních vzorcích
- kvantifikace genu *mcrA* ve vzorcích odebraných z životního prostředí
- vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Přístroje

- Analytické váhy SI – 64A (Denver Instrument, USA)
- Analyzátor uhlíku TOC-5000A (Shimadzu, Japonsko)
- Aseptický laminární box Telstar (Španělsko)
- Centrifuga ROTANA 460R (Andreas Hettich, Německo)
- Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga MR23i (ThermoScientific, USA)
- Dry block heating termostat, Bio TDB-100 (BioSan, Lotyšsko)
- Elektroforetická aparatura HU10 Mini-Plus Horizontal (Scie-Plas, Velká Británie)
- Elektroforetická vana vč. příslušenství MultiSUB Mini (Consort, Belgie)
- Elektrický zdroj pro elektroforézu EV243 (Consort, Belgie)
- Chladnička (ARDO, Itálie)
- Kombinovaná chladnička (BEKO, Turecko)
- Laboratorní sterilizátor SANoclav (Wolf, Velká Británie)
- Laboratorní váhy Adventurer Pro 500 (OHAUS, USA)
- Mikropipety Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Mikrovlnná trouba (Electrolux, Švédsko)
- Osobní počítač ESPRIMO (Fujitsu-Siemens, Japonsko, Německo)
- PCR box AURA PCRTM (BIOAIR, Itálie)
- Termocykler Aeris™ (ESCO, Singapur)
- Termocykler PIKO, Finnzymes, (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Termostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika)
- Třepačka laboratorní vratná (GFL, Německo)
- UV-Transiluminátor InGeniusLHR (SynGene Imaging, Velká Británie)
- Vortex-Genie® 2 Vortex vč. vortexového adaptéru (Mo Bio Laboratories, USA)

Vortex V-1 plus (Biosan, USA)

Ostatní – laboratorní sklo, stojánek na zkumavky, plynový kahan, zápalky, sterilní špičky, sterilní špičky pro PCR s filtrem, rukavice, skalpel, pinzeta, třecí miska s tloučkem, kovová lžička, sterilní plastové zkumavky 25ml a 50ml, sterilní mikrozukumavky, sterilní mikrozukumavky pro PCR 0,2 ml 8 ks ve stripu, sterilní plastová víčka pro mikrozukumavky ve stripu, mikrotitrační destička, sterilní jednorázový filtr (Sartorius, Německo).

4.2 Použité chemikálie a roztoky

Agaróza SeaKem (Lonza, Švýcarsko)

DNA Gel Loading Dye (6x) (Thermo Scientific, USA)

EliZyme™ Probe MIX AddROX (Elisabeth Pharmacon, ČR)

Ethanol 70 % (Sigma-Aldrich, USA)

Etidiumbromid 1:30 H₂O (Sigma-Aldrich, USA)

GoTaq® Hot Start Green MasterMix (Promega, USA)

High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan)

In-Fusion HD Cloning kit – In-Fusion HD Enzyme premix, linearizovaný pUC 19 vektor, kontrolní inzert a Stellar kompetentní buňky (Takara Bio, USA)

NucleoSpin Gel and PCR clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL, Německo)

Pevné kultivační médium – SOC médium, 1,5 % Agar Type I, 0,01 % Ampicilin

100 bp DNA Ladder N3231L (Biolabs. Inc., New England)

PowerSoil DNA Isolation Kit (Qiagen)

Primery

Redestilovaná voda pro molekulární biologii

SOC médium – 2% trypton, 0,5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukóza

Sterilní destilovaná voda

50x koncentrovaný TAE pufr – 242 g 2M Tris base, 57,1 ml 1M kyselina octová, 100 ml 0,5M EDTA, doplněno vodou do 1000 ml

4.3 Charakteristika vzorků

Experimentální část diplomové práce byla provedena v rámci projektu České technologické agentury Řízená podporovaná mikrobiální methanogeneze *in situ*. Vzorky byly dodány Českou geologickou službou a dále Výzkumným ústavem pro hnědé uhlí a.s. Vzorky byly odebrány z různých lokalit, které se lišily podložím i historií těžby. Lokality byly z geologického hlediska dobře charakterizované.

K molekulárně biologické analýze výskytu methanogenů byly vybrány reálné vzorky hnědé uhlí, černého uhlí a důlní vody. Dále byly Českou geologickou službou dodány různorodé environmentální vzorky, potenciálně obsahující methanogenní a anaerobní methan oxidující *Archaea*. Vzorky byly dodány z následujících lokalit:

4.3.1 Hnědouhelné lomy

Lom ČSA

Tento rozsáhlý lom nacházející se v blízkosti svahů Krušných hor je tvořen makroskopicky monotónní vrstvou jezerních sedimentů. Dříve totiž patřila tato část krajiny Komořanskému jezeru, následně zde vznikly rozsáhlé mokřady. Vlivem těžby uhlí docházelo k postupnému vysoušení vodní plochy. Těžba skrývkových zemin zde již byla ukončena. Mocnost uhelné sloje činí cca 30 m. Podloží sloje tvoří jíly, slíny a pískovce.

Dodané vzorky:

Odběrové místo bylo označeno LLC.

LCAC-1A – překop hlubiny, uhlí

LCAC-1B – překop hlubiny, uhlí

LCBC-1A – křížení chodeb, uhlí

LCBC-1B – křížení chodeb, uhlí

LCCC-1A – sloj, oranžové Fe okry, uhlí

LCCC-1B – sloj, oranžové Fe okry, uhlí

Lom Bílina

Jedná se o největší povrchový důl České republiky s vysokou kvalitou hnědého uhlí. Jedná se o výplň Mostecké pánve třetihorního původu. Podloží je tvořeno vulkanickými horninami, pod kterými se nachází mořské usazeniny a v nejhlubších vrstvách rula. Těžba skrývky a uhlí má zde dlouhodobou perspektivu. Těleso lomu tvoří složitý komplex písčitých výplní říčních koryt a jezerních jílu.

Bod BIA

Jedná se o nejsevernější část báze sloje s vývěrem důlní vody z pukliny o průměru 1 cm, stěny pukliny jsou pokryty bělavým biofilmem vzhledu chmýří, délka vláken cca 10 mm. Po vytažení z vody přilne chmýří na kámen a je sotva patrné. Vně byly pozorovány i zelené řasy. Slabý zápach H_2S , voda čirá.

Dodané vzorky:

BIAB 2A – odryp uhlí z pukliny se zbytky biofilmu a řasou

BIAB 2B – odryp odryp uhlí z pukliny se zbytky biofilmu

BIAW 1B – vývěr vody z pukliny asi 2 m nad bází sloje, stěny pukliny a výronu pokryty bělavým biofilmem

Bod BIB

Soustředěný vývěr v pásmu výronů železitých vod ve stěně při bázi sloje, pásmo cca 200 m široké, bez řasy, pokryto rzivými okry, bez zápachu.

Dodané vzorky:

BIBC 1B – odkop uhlí v místě vývěru vody

Vrt Bílina

Bi179 – písek, hloubka 159 m, místo zavážky staré štoly z války

Bi180 – hloubka 160 m, uhlí hlavní sloj

Bi181 – hloubka 161 m, uhlí hlavní sloj

Bi182 – hloubka 167 m, uhlí hlavní sloj

Vrt JU2061 v předpolí vrtu Bílina

I12 – nadložní písky, voda

Vrt LB470 v předpolí vrtu Bílina

I14 – nadložní písky, voda

Vrt JUI786 v předpolí vrtu Bílina

I15 – nadložní písky, hloubka 65–100 m, voda

Lom Vršany

V centrální části mostecké pánve je situován lom Vršany, jehož uhelná sloj je rozštěpena do několika lávek. Mezi první a hlavní slojí je situováno mocné meziloží. Nachází se zde také fosilní koryto terciérní řeky, které prochází celou lokalitou a způsobuje pokles hlavní uhelné sloje na několik metrů. Kvalita hnědého uhlí je nižší než v případě lomu ČSA. Mocnost hlavní uhelné sloje v oblasti lomu značně kolísá. Podloží sloje tvoří především terciérní šedé jílovce, písky a křídové slínovce.

Dodané vzorky:

Odběrová místa byla označena VRA, VRB, VRC

VRBW 1A – skap ze stěny při bázi sloje, uhlí

VRBW 1B – odběr z vyhrabané tůňky při bázi sloje, uhlí

VRCC 1B – odkop ze stěny v místě zavlhnutí, uhlí

VRBC 1B – odkop uhlí v místě vývěru vody, uhlí

VRVAC 1B – odvodňovací příkop, odryp uhlí ze stěny příkopu, uhlí

Vrt SL437

VRS1 – vrt SL437, hloubka 56 m, uhlí

VRS2 – vrt SL437, hloubka 63 m, uhlí

VRS3 – vrt SL437, hloubka 71 m, uhlí

Vrt SL438

VRS4 – vrt SL438, hloubka 79 m, uhlí

VRS5 – vrt SL438, hloubka 85 m, uhlí

Lom Libouš

Geologická situace lomu Libouš je oproti lomům Bílina a Vršany odlišná. Uhelná sloj je relativně jednotná bez neuhelného meziloží. Kvalita hnědého uhlí je nižší, než na lokalitách ČSA a Bílina. V místě odběru lze počítat s mocností cca 30 m. Svrchní horizont skrývkových zemin je tvořen především ornici, hlínami a zahliněnými štěrky.

Dodané vzorky:

Odběrové místo bylo označeno LIA.

LIAC 1A – odkop uhlí ze stěny v místě vývěru vody, zalito vodou, uhlí

LIAC 1B – odkop uhlí ze stěny v místě vývěru vody, zalito vodou, uhlí

LIBC 1A – odkop uhlí ze stěny v místě vývěru vody, cca 200 m od LIA, bez vody, uhlí

LIBC 1B – odkop uhlí ze stěny v místě vývěru vody, cca 200 m od LIA, bez vody, uhlí

LICC 1A – odkop uhlí ze stěny v místě vývěru vody, bez vody, uhlí

LICC 1B – odkop uhlí ze stěny v místě vývěru vody, bez vody, uhlí

Těžebna Václav

Tato lokalita se nachází v blízkosti nádraží Duchcov a je velmi odlišná od lokalit předešlých. Rozsah těžebny je pouze cca 5 ha a dobývá se zde jedním těžebním řezem zvětralý výchoz uhelné sloje. Těžba probíhá příležitostně dle potřeby. Skrývku tvoří pouze hlinitý horizont o minimální mocnosti. Mocnost horizontu kolísá, v zásadě činí několik metrů.

Dodané vzorky:

Odběrová místa byla označena VAA, VAB, VAC

VAAC 1A – odkop ze stěny, příležitostně těžená jáma s oxyhumolitem, uhlí

VAAC 1B – odkop ze stěny, příležitostně těžená jáma s oxyhumolitem, uhlí

VABC 1A – odkop ze stěny, příležitostně těžená jáma s oxyhumolitem, uhlí

VABC 1B – odkop ze stěny, příležitostně těžená jáma s oxyhumolitem, uhlí

VACC 1A – odkop z průzkumné sondy v úrovni hladiny, příležitostně těžená jáma s oxyhumolitem, uhlí

VACC 1B – odkop z průzkumné sondy v úrovni hladiny, příležitostně těžená jáma s oxyhumolitem, uhlí

4.3.2 Černouhelné doly:

Doly ČSM

Doly ČSM se nachází v hornoslezské pánvi, která vznikla v karbonu. V nadloží se vyskytuje významný kolektor fosilní mořské vody. Dominantní složkou plynů vyprodukovaných doly je izotopově lehký methan. V roce 2018 zde došlo k výbuchu methanu.

Dodané vzorky:

ČSM 2VA – jímka odvodňovacích vrtů, 42 °C, voda

ČSM 2VB – jímka odvodňovacích vrtů, 42 °C, voda

ČSM 8A – čelba, vydatný skap, voda

ČSM 10A – přesah do polského dolu Morcinek, v místě čerpání na chodbě, voda

ČSM 10B – přesah do polského dolu Morcinek, v místě čerpání na chodbě, voda

OKDj11 – hloubka 2 m, sever, uhlí

OKDj25u – hloubka 150 m, jih, uhlí

OKDj25p – hloubka 150 m, jih, pískovec

OKDj29 – hloubka 209 m, jih, pískovec

Doly Darkov

Doly Darkov jsou z hlediska methanogeneze analogem ČSM jak z hlediska typu methanového plynu, tak geologického prostředí a složení podzemních vod.

Dodané vzorky:

DAR 17 – průsaky u odvodňovacího vrtu, hloubka 160 m, voda

DAR 18A – hloubka 350 m, voda

DAR 18B – hloubka 350 m, voda

DAR 19 – odvodnění degazačního systému, od předešlého dne zastaveno sání, voda

DAR 20A – vrt do čelby, voda z čelby

DAR 20B – vrt do čelby, voda z čelby

DAR 21A – vývěr vody z masivu, hloubka 800 m, voda

DAR 21B – vývěr vody z masivu, hloubka 800 m, voda

Důl ČSA

Bývalý důlní komplex (Důl Československé armády) je rozdělen do dvou závodů: Jan Karel, Doubrava. Jedná se o důl s produkcí kvalitního koksovateľného černého uhlí. Mocnost uhelné sloje činí řádově 2–3 m.

Dodané vzorky:

OKDj6 – hloubka 52,5 m, uhlí

ČSA 18A – mísení s vodou z podloží, voda

ČSA 18B – mísení s vodou z podloží, voda

ČSA 19 – skap ze stěny sloje, voda

ČSA 20 – odvodňovací vrt, voda

ČSA 21 – nečinný vrt, voda

ČSA 22 – překop do sloje, voda

ČSA 23 – křížení překopů do sloje, voda

4.3.3 Další environmentální vzorky

Důl Staříč

Důl Staříč představuje horninové a slojové prostředí s typicky termogenním methanovým plynem z degazace porubu se zvýšeným obsahem vyšších uhlovodíkových plynů. Jedná se o termogenní methan s malou příměsí mikrobiálního methanu. Uzavřené části dolu představují typický analog dolů v porúří v Německu, kde byla v nepřístupných bezkyslíkatých částech chodeb popsána „živá“ methanogeneze působením *Archaea* (Beckmann a kol., 2011).

Dodané vzorky:

Následující vzorky byly odebrány z louže v lokalitě dolu Staříč.

1-S2 – povrch hladiny, voda

2-S2 – povrch hladiny, voda

Sta3/os – západní okraj obce Staříč, potok v hájku, povlaky na hladině, oranžový sediment

Sta4/ok – západní okraj obce Staříč, potok v hájku, povlaky na hladině, kůra, oranžový povrch

Důl Žukov

Tato lokalita se nachází v oblasti severní Moravy (mezi Příborem a Českým Těšínem). Vyskytují se zde ložiska zvětralého a tektonicky porušeného karbonu. V letech 1949–1980 zde byl těžen zemní plyn, v současnosti se jedná pouze o podzemní zásobník plynu.

Dodané vzorky:

ŽU-1D8 S – ústí zlikvidovaného vrtu Žukov, kal na stěnách otvoru, pevná fáze

ŽU-1D8 W – ústí zlikvidovaného vrtu Žukov, kal na stěnách otvoru, kapalná fáze

Hornoslezská uhelná pánev

Tato lokalita nebyla blíže určena. Jednalo se o 2 vzorky z louže. V této lokalitě byl také zaznamenán vývěr methanu. Vzorky byly odebrány z míst průsaků methanu. Vzorek 1 byl po filtraci rozdělen na vodnou fázi 1W a sediment 1S. Vzorek 2 obsahující směs vody a listů byl rozdělen na vodnou fázi 2W a pevnou fázi 2S.

1W – sediment, vodná fáze

2W – směs vody s listy, vodná fáze

1S – sediment, pevná fáze

2S – směs vody s listy, pevná fáze

4.4 Izolace DNA

Vzorky byly zpracovány ihned po dodání. Pro izolaci DNA z hnědého uhlí vzorku byl navážen 1 g sedimentu, který byl homogenizován v třecí misce s tloučkem, pro izolaci DNA z důlní vody bylo centrifugováno 100 ml vodné fáze a izolace proběhla z pelety po centrifugaci. Pevná a kapalná fáze neuhelných environmentálních vzorků byla zpracována obdobně.

K izolaci DNA byl použit komerční kit PowerSoil DNA Isolation Kit (Quiagen), který obsahuje roztoky C1 – C6, jejichž složení není výrobcem poskytováno.

POSTUP DLE PROTOKOLU VÝROBCE

1. Do rozbíjecí zkumavky byl navážen 1 g homogenizovaného vzorku hnědého uhlí, nebo přenesen pelet po centrifugaci 100 ml vodné fáze důlní vody.
2. Do rozbíjecí zkumavky bylo přidáno 60 μ l roztoku C1 a řádně vortexováno.
3. Rozbíjecí zkumavky byly umístěny na vortex a třepány maximální rychlostí po dobu 10 min.

4. Zkumavky byly zcentrifugovány při 10 000 x g po dobu 30 s.
5. Supernatant byl přenesen do přiložené 2ml mikrozkušavky.
6. Bylo přidáno 250 μ l roztoku C2, zkumavky byly vortexovány po dobu 5 s a inkubovány při 4 °C po dobu 5 min.
7. Zkumavky byly centrifugovány při 10 000 x g po dobu 1 min.
8. Do přiložené 2ml mikrozkušavky bylo přeneseno 600 μ l supernatantu.
9. K supernatantu bylo přidáno 200 μ l roztoku C3 a vortexováno.
10. Mikrozkušavky byly inkubovány při 4 °C po dobu 5 min.
11. Vzorky byly centrifugovány při 10 000 x g po dobu 1 min.
12. Do přiložené 2ml mikrozkušavky bylo přeneseno 750 μ l supernatantu.
13. Bylo přidáno 1200 μ l roztoku C4 a vortexováno po dobu 5 s.
14. Do přiložené kolonky bylo přeneseno 675 μ l směsi a centrifugováno při 10 000 x po dobu 1 min.
15. Přefiltrovaná kapalina byla vylita a do kolonky bylo přeneseno dalších 675 μ l směsi a centrifugováno stejně, jako v předešlém kroku.
16. Přefiltrovaná kapalina byla vylita a do kolonky byl přidán zbytek směsi a opět centrifugován.
17. Přefiltrovaná kapalina byla vylita.
18. Do kolonky bylo přidáno 500 μ l roztoku C5 a centrifugováno při 10 000 x g po dobu 30 s.
19. Přefiltrovaná kapalina byla odstraněna a prázdné zkumavky s kolonkami byly znovu centrifugovány při 10 000 x g po dobu 3 min.
20. Kolonka byla přenesena do přiložené 2ml mikrozkušavky.
21. Doprostřed bílé membrány kolonky bylo přidáno 50 μ l roztoku C6, směs byla ponechána k absorpci a následně centrifugována při 10 000 x g po dobu 30 s.
22. Kolonka byla vyjmuta z mikrozkušavky, DNA v mikrozkušavce byla připravena k dalšímu použití.

4.5 Měření koncentrace DNA

Koncentrace DNA ve vzorcích bylo měřena pomocí kitu určeného pro velmi nízké koncentrace DNA (AccuGreen™ High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit) od společnosti Biotium. K měření koncentrace byl použit Fluorometr QFX (DeNovix).

POSTUP DLE PROTOKOLU VÝROBCE

1. Do zkumavky bylo napipetováno 200 μl roztoku DNA Quantification Buffer (součást kitu) a 4 μl barviva AccuGreen™ Dye a obsah zkumavky byl zvortexován.
2. Do čisté přiložené mikrozkuavky byla napipetováno 190 μl směsi a 10 μl DNA.
3. Do 2 čistých přiložených mikrozkuavek bylo napipetováno 190 μl směsi a 10 μl standardů AccuGreen™ Standard 1 a AccuGreen™ Standard 2.
4. Nejprve byla změřena koncentrace standardů a následně vzorků obsahujících vyizolovanou DNA.

4.6 Test primerů na kulturách sbírkových kmenů

Detekce methanogenů proběhla zacílením na gen *mcrA*, který je společný pro methanogenní i anaerobní methan oxidující *Archaea* – ANME (Hallam a kol., 2003; Liu a kol., 2016; Narihiro a Sekiguchi, 2011; Timmers a kol., 2017). K tomu byly vybrány primery uvedené v následující tabulce (Tabulka 6).

Tabulka 6 Vybrané sady primerů k detekci genu *mcrA*

Primer	Sekvence	Délka amplifikovaného segmentu [bp]	Zdroj
931f m1100r	AGG AAT TGG CGG GGG AGC A BGG GTC TCG CTC GTT RCC	180	Einen a kol., 2008
338f 518r	BGG GTC TCG CTC GTT RCC ATT ACC GCG GCT GCT GG	180	Ghyselinck a kol., 2013
mlas mcrA-rev	GGTGGTGTMGDDTTCACMCARTA CGTTCATBGCCTAGTTVGGRTAGT	400	Hales a kol., 1996
ME3MF ME2r	ATGTCNNGGTGGHGTMGSTTYAC TCATBGCRTAGTTDGGRTAGT	400	Steinberg a Regan, 2009
ME3MF-e ME2r	ATGAGCGGTGGTGTCCGTTTCAC TCATBGCRTAGTTDGGRTAGT	400	Steinberg a Regan, 2009

Vhodnost primerů byla otestována Nested polymerázovou řetězovou reakcí. K tomuto byly vybrány 3 sbírkové kmeny methanogenů (Tabulka 7). Byla objednána DNA od společnosti DSMZ (Německo). Nested PCR byla provedena ve dvou krocích. V prvním kroku, tzv. touch down PCR, byla použita sada vnějších primerů a teplota annealingu byla nastavena na teplotu vyšší, než je optimální T_m primerů, zatímco ve druhém kroku byla nastavena teplota optimální. Vznikly tak vysoce specifické produkty, jelikož během první PCR bylo vysokou teplotou zamezeno vzniku nespecifických produktů (např. dimery primerů).

Tabulka 7 Sbírkové kmeny vybrané pro test primerů

Číslo	Sbírkový kmen
1	<i>Methanoculleus horonobensis</i>
2	<i>Methanosarcina subterranea</i>
3	<i>Methanococcus vannielii</i>

Jako master mix byl použit GoTaq® Hot Start Green MasterMix (Promega), který obsahoval DNA polymerázu, MgCl₂, deoxynukleotidy (dNTP) a reakční pufr. Sady primerů byly ředěny 5x. Reakční směs byla připravována v objemu 20 µl a její složení je zobrazeno v tabulce (Tabulka 8).

Tabulka 8 Složení PCR směsi

Reakční objem směsi	20 µl	Koncentrace v reakční směsi
Komponenty	Objem [µl]	-
PCR voda	7	-
Master mix	10	1x
Forward primer	1	1 µmol/l
Reverse primer	1	1 µmol/l
Templátová DNA	1	-

Nastavení touch down PCR i druhého kroku PCR je znázorněno v tabulkách (Tabulka 9, Tabulka 10).

Tabulka 9 Nastavení touch down PCR

	Teplota (°C)	Čas (min.)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94–95 °C	2 min	9
Denaturace	94–95 °C	30 sec	
Annealing	57–61 °C	1 min	
Elongace	72 °C	1–1,5 min	
Denaturace	94–95 °C	30 sec	20–35 -0,5 °C/cyklus
Annealing	52–56 °C	30 sec	
Elongace	72 °C	1–1,5 min	
Závěrečná amplifikace	72 °C	10 min	1

Tabulka 10 Nastavení druhého kroku PCR

	Teplota (°C)	Čas (min.)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94–95 °C	4–7 min	1
Denaturace	94–95 °C	1 min	20–35
Annealing	50–56 °C	1 min	20–35
Elongace	72 °C	1–1,5 min	20–35
Závěrečná amplifikace	72 °C	10 min	1

4.7 Horizontální agarózová elektroforéza

Pomocí gelové elektroforézy bylo ověřeno, zda během PCR vznikly odpovídající produkty. Elektroforéza probíhala v prostředí TAE pufru, a to v 1,5 % gelu. Bylo nastaveno napětí 120 V po dobu 40 min. Gel byl vyhodnocen pomocí UV transiluminátoru při vlnové délce 302 nm a následně zdokumentován pomocí digitálního fotoaparátu s oranžovým filtrem. Následovalo zpracování počítačovým systémem GeneSnap.

POSTUP

1. Bylo naváženo 0,75 g agarózy a rozpuštěno v 50 ml TAE pufru.
2. Roztok byl rozvařen v mikrovlnné troubě.
3. Po zchladnutí byly přidány 2 μ l barviva SimplySafe EURX a gel přelit do elektroforetické vany.
4. Do gelu byly vloženy hřebínky a gel byl ponechán ke ztuhnutí.
5. Hřebínky byly odstraněny a gel byl vložen do elektroforetické komůrky naplněné TAE pufrem.
6. Do krajní jamky v každé řadě byly napipetovány 3 μ l standardu molekulové hmotnosti.
7. Následně bylo do jamek přeneseno 6 μ l vzorku.
8. Elektroforetická komůrka byla připojena ke zdroji elektrického napětí (120 V), elektroforetická separace probíhala asi 40 min.
9. Po ukončení elektroforézy byl gel vizualizován pomocí transiluminátoru.

4.8 qPCR

Kvantitativní real-time PCR je metoda, která slouží ke kvantifikaci sledovaného úseku DNA v reálném čase. K tomu jsou využívány fluorescenční látky, které jsou schopny navázat se na amplifikovaný úsek DNA. Jakmile dojde během reakce k nárůstu fluorescence nad práh pozadí, je známa hodnota Ct. Tato hodnota značí číslo cyklu, přičemž nižší číslo představuje větší množství templátové DNA dodané do reakce, a naopak. Desítkovým ředěním templátové DNA je připravena standardní křivka, která zároveň vyjadřuje vztah Ct hodnoty vzhledem k množství vstupní templátové DNA. Ze sklonu standardní křivky je následně možno vypočítat účinnost reakce.

4.8.1 Test průběhu qPCR

K otestování správného průběhu qPCR byla real-time PCR provedena s 10x ředěnou DNA sbírkových methanogenů (Tabulka 8). K tomu byly použity primery specifické pro skupinu *Archaea* 931f a m1100r. Amplifikace ředěné DNA byla provedena také s využitím primerů mlas a mcrA-rev, které jsou specifické pro methanogeny a ANME.

Pro qPCR byl použit komerční master mix Luna Universal qPCR Master Mix od společnosti BioLabs. Master mix obsahuje polymerázu, reakční pufr i nukleotidy (dNTP). Objem reakce byl 25 μl a její složení je zobrazeno v tabulce (Tabulka 11).

Tabulka 11 Složení qPCR směsi

Reagencie	Obj. [μl]	Koncentrace
Luna Universal qPCR Master Mix	12,5	1x
H ₂ O	9,5	-
Forward primer	0,25	300 nmol.l ⁻¹
Reverse primer	0,25	300 nmol.l ⁻¹
DNA	2,5	variabilní
Celkový objem	25,0	

Po napipetování všech reagií do mikrotitrační destičky byla tato přelepena folií a vložena do termocykléru a byl spuštěn vhodný program (Tabulka 12).

Tabulka 12 Nastavení programu qPCR

	Teplota (°C)	Čas (min.)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94–95 °C	4–7 min	
Denaturace	94–95 °C	1 min	20–35
Annealing	60 °C	min	20–35
Elongace	72 °C	min	20–35
Závěrečná amplifikace	72 °C	min	1

4.8.2 Test qPCR na reálném vzorku obsahujícím methanogeny

Z anaerobního kalu z bioplynové stanice byla vyizolována DNA. K izolaci byl použit komerční kit PowerSoil Isolation Kit od společnosti Quiagen a DNA byla izolována stejným postupem, jako v kapitole 3.4. Koncentrace DNA byla změřena pomocí Fluorometru QFX (DeNovix) a kitu určeného pro velmi nízké koncentrace DNA AccuGreen™ High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit (Biotium) podle postupu v kapitole 3.5. Následně byla provedena touch down PCR za použití primerů mlas a mcrA-rev (Tabulka 8, Tabulka 9, Tabulka 10).

4.8.3 Analýza methanogenů

S jednotlivými vyizolovanými vzorky DNA z hnědého uhlí, černého uhlí a důlní vody byla provedena qPCR za použití primerů mlas, mcrA-rev. Jako master mix byl použit komerční Luna Universal qPCR Master Mix od společnosti BioLabs. Složení PCR reakce a nastavení teplotního programu je znázorněno v tabulkách (Tabulka 13, Tabulka 14). Jako pozitivní kontrola sloužila DNA typového kmenu *Methanococcus vannielii* SB.

Pro environmentální vzorky dodané ČGS byl použit master mix SYBR Green. Jako pozitivní kontrola sloužila DNA typového kmenu *Methanococcus vannielii* SB. Složení směsi qPCR je znázorněno v tabulce (Tabulka 13). Nastavení teplotního programu a použití primerů bylo stejné, jako pro vzorky černého a hnědého uhlí.

Tabulka 13 Složení PCR směsi environmentální vzorky dodané ČGS

Komponenta	Objem [μ l]
SYBR Green Master mix	12,5
Forward primer	2,5
Reverse primer	2,5
DNA	1
PCR voda	6

4.9 Návrh nových originálních primerů

Pro kvantifikaci počtu kopií sledovaného genu byly navrženy nové originální vnitřní specifické primery (Tabulka 14) pro real-time PCR. Tyto primery ohraničují část úseku genu *mcrA* a pro jejich návrh byl použit software Primer – Blast (Basic Local Alignment Search Tool) na základě znalosti genomu organismu *Methanococcus vannielii* SB. Primery byly navrženy ve spolupráci s pracovníky laboratoře molekulární biologie Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí.

Tabulka 14 Nové originální primery pro kvantifikaci počtu kopií sledovaného genu

Primer	Sekvence	Délka amplifikovaného segmentu [bp]	Zdroj
mlas7 mcrA- rev7	GCTACAGCAGCATAACCGA TGCAATGTCTTCTACTACGTCCA	123	Vlastní

4.10 Specificky značená DNA próba

Pro zpřesnění výsledků a vytipování vzorků obsahujících gen *mcrA* byly v rámci projektu navrženy (program Primer3) specifické TaqMan próby detekující tento gen. Bylo tak zamezeno vzniku tzv. nesespecifických produktů, které mohou ztížit vyhodnocení výsledků. Navržené sekvence primerů jsou znázorněny v tabulce (Tabulka 15). Sekvence hybridizační oligo (próby) s modifikací 5'FAM a 3'Tamra je uvedena v tabulce. Sondy byly navrženy ve spolupráci s pracovníky laboratoře molekulární biologie Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí.

Tabulka 15 Specificky značená DNA próba

Primer	Sekvence	Délka amplifikovaného segmentu [bp]	Zdroj
oligoM7	CGATATCTTGGACGATTTCTCA	123	Vlastní

Pro qPCR byl použit mastermix EliZyme™ Probe MIX AddROX (Elisabeth Pharmacon). Složení reakční směsi je zobrazeno v tabulce (Tabulka 16), program qPCR je uveden v tabulce (Tabulka 17).

Tabulka 16 Složení reakční směsi qPCR s použitím specifické DNA próby

Reagencie	Obj. [μl]	Koncentrace
2x EliZYME™ Probe Mix	10	1x
H ₂ O	7	-
Forward primer	0,8	400 nmol.l ⁻¹
Reverse primer	0,8	200 nmol.l ⁻¹
próba	0,4	variabilní
DNA	1	-

Tabulka 17 Nastavení programu qPCR s použitím specifické DNA próby

	Teplota (°C)	Čas (min.)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94–95 °C	2–3min	40
Denaturace	94–95 °C	5 s	
Annealing	60 °C	30 s	
Analýza křivky tání	-		

4.11 Kvantifikace počtu kopií genu *mcrA*

Kvantifikace počtu kopií genu *mcrA* byla provedena metodou klonování. Jedná se o proces, během kterého vznikají funkční kopie identické s původní předlohou - klony.

Ke klonování byl použit komerční kit In-Fusion HD Cloning kit a DNA mikroorganismu *Methanococcus vannielii* SB, nesoucího gen *mcrA*. In-Fusion HD Cloning kit obsahuje In-

Fusion HD Enzyme premix, linearizovaný pUC 19 vektor, kontrolní inzert a Stellar kompetentní buňky. In-Fusion klonování je založeno na homologní rekombinaci 15bp konců inzertu (cizí DNA) a vektoru, což umožňuje vložení inzertu do vektoru. 15bp přesahy komplementární k 15bp koncům vektoru se do inzertu vnesou pomocí PCR primerů. Pro integraci vektoru s vloženým inzertem do bakterií (Stellar kompetentních buněk) je využíváno tzv. kompetence, což je schopnost bakterií přijmout cizorodou DNA. Transformace, prostupnost cytoplazmatické membrány kompetentních buněk pro vektor, je provedena mírným teplotním šokem. Klonovací systém In-fusion se vyznačuje až 90 % účinností transformace. Po kultivaci a namnožení buněk vyrostle na Petriho miskách s pevným kultivačním médiem s ampicilinem z každé kompetentní buňky jedna kolonie-jeden klon.

POSTUP DLE PROTOKOLU VÝROBCE

1. Nejdříve byl pomocí metody PCR amplifikovaný požadovaný úsek DNA. Složení reakční směsi a nastavení PCR je uvedeno v tabulkách (Tabulka 8, Tabulka 9, Tabulka 10).
2. Výsledný amplifikovaný produkt byl purifikován. K tomu byl použit komerčně dostupný kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit.
 - Vzorek byl upraven na objem min. 30 μ l.
 - Vzorek byl následně smíchán s NTI pufrem v poměru 1 : 2.
 - Směs byla převedena na kolonku obsahující křemíkovou mikrofiltrační membránu.
 - Kolonka byla vložena do sběrné mikrozkušavky.
 - Vzorek byl centrifugován po dobu 30 s při 11 000 x g.
 - Roztok ze sběrné zkušavky byl odstraněn a na kolonku bylo napipetováno 700 μ l NT3 pufru.
 - Vzorek byl centrifugován 30 s při 11 000 x g. Roztok ze sběrné zkušavky byl opět odstraněn.
 - Pro vysušení kolonky byla tato inkubována po dobu 3 min při teplotě 70 °C a následně znovu centrifugována po dobu 1 min při 11 000 x g.
 - Kolonka byla vložena do nové sterilní mikrozkušavky a na membránu bylo napipetováno 20 μ l NE pufru.
 - Zkušavka byla inkubována při teplotě 70 °C po dobu 3 min.
 - Vzorek byl následně centrifugován po dobu 1 min při 11 000 x g.
 - Eluát byl připraven k následnému použití.

3. Následně byl purifikovaný PCR produkt vložen do vektoru PUC19. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 18.

Tabulka 18 Složení reakční směsi

	Objem [μ l]	Množství v reakci
Purifikovaný PCR produkt	2	10–200 ng
Vektor pUC19	1	50–200 ng
5 x In-Fusion HD Enzyme Premix	2	1 x
Deionizovaná voda	5	
Reakční objem	10	

4. Směs byla inkubována 15 min při 50 °C, poté na ledu.
Následně byla provedena transformace vektoru s vloženým inzertem do Stellar kompetentních buněk: K 50 μ l Stellar kompetentních buněk bylo přidáno 2,5 μ l reakční směsi. Reakční směs byla inkubována na ledu 30 min, poté byla vystavena teplotnímu šoku při 42 °C 45 sekund, poté znovu inkubována na ledu 1–2 minuty.
5. Následně byly kompetentní buňky s vloženým vektorem kultivovány.
6. SOC médium bylo předehřáto na 37 °C a přidáno ke kompetentním buňkám do celkového objemu 500 μ l.
Směs byla inkubována v třepačce 160–225 rpm při 37 °C 1 hodinu.
Buňky byly následně očkované na Petriho misky s pevným kultivačním médiem s ampicilinem o koncentraci 100 μ g/ml: 5 μ l namnožených kompetentních buněk bylo smícháno s 95 μ l SOC média a rovnoměrně rozetřeno na Petriho misku.
Na další Petriho misku bylo rozetřeno 100 μ l neředěných namnožených kompetentních buněk. Zbylý objem kompetentních buněk byl centrifugován při 6000 rpm 5 minut, supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 100 μ l SOC média.
7. Pelet byl rozpuštěn a rozetřen na další Petriho misku.
8. Petriho misky byly inkubovány při 37 °C 24 hodin.
9. Následně byl z narostlých kolonií izolován plazmid.

Izolace plazmidu

K izolaci plazmidu byl použit High-Speed Plasmid Mini Kit. Tento mini kit byl navržen pro rychlou izolaci plazmidové DNA z 1-5 ml kultivovaných bakteriálních buněk. Metoda modifikované alkalické lýzy s přidavkem RNázy zajišťuje získání čistého buněčného lyzátu s minimálním množstvím genomové DNA a RNA kontaminantů. V přítomnosti chaotropní soli je plazmidová DNA navázána na matici kolonky. Kontaminanty jsou odstraněny promývacím pufrem a vyčištěná DNA je následně eluována pufrem s nízkým obsahem soli.

POSTUP DLE PROTOKOLU VÝROBCE

1. Do mikrocentrifugační zkumavky bylo přeneseno 1,5 ml bakteriální kultury, směs byla centrifugována při 16 000 x g po dobu 1 min.
2. Následně byl odstraněn supernatant.
3. K peletu bylo přidáno 200 µl PD1 pufru a směs byla zvortexována.
4. Poté bylo přidáno 200 µl PD2 pufru, směs byla rozsuspendována pipetováním a následně inkubována při pokojové teplotě po dobu 2 min.
5. Bylo přidáno 300 µl PD3 pufru, směs byla rozsuspendována pipetováním a následně centrifugována při 16 000 x g po dobu 3 min.
6. Do 2ml mikrozukavky byla vložena kolonka.
7. Supernatant byl napipetován na kolonku, následně byla směs zcentrifugována při 16 000 x g po dobu 30 s.
8. Kapalná část byla z mikrozukavky odstraněna.
9. Kolonka byla vložena do čisté mikrozukavky.
10. Následně bylo na kolonku napipetováno 600 µl promývacího pufru, kolonka byla zcentrifugována při 16 000 x g po dobu 30 s.
11. Kapalná část byla z mikrozukavky odstraněna, kolonka byla znovu zcentrifugována.
12. Následně byla kolonka přenesena do čisté mikrozukavky.
13. Na kolonku bylo přidáno 50 µl elučního pufru, následně byla provedena inkubace při pokojové teplotě po dobu 5 min.
14. Kolonka byla zcentrifugována při 16 000 x g po dobu 2 min.
15. Obsah mikrozukavky byl připraven k následujícím molekulárně biologickým metodám.

Ověření přítomnosti vloženého úseku genu *mcrA* do klonovacího plasmidu bylo provedeno pomocí PCR, sekvenováním a následnou identifikací v databázi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Počet kopií genu *mcrA* v dodaných vzorcích bylo následně vypočteno pomocí metody absolutní kvantifikace. Nejdříve byla vytvořena standardní křivka. Vzorky standardu (*Methanococcus vanniellii* SB) byly sériově naředěny 0x, 10x, 100x, 1 000x, 10 000x a byla provedena qPCR (kapitola 4.10.) Pro každé ředění byla získána Ct hodnota. Propojením Ct hodnot s hodnotami daného ředění byla získána standardní křivka. Podle rovnice přímky $y = -bx + a$ byla vypočtena efektivita reakce. Parametr y je závislá proměnná a představuje výstup, parametr b vyjadřuje sklon křivky, parametr x je nezávislá proměnná představující vstup a parametr a značí odklon počátku regresní přímky od nulového bodu. Efektivita reakce je pak vypočítána ze sklonu standardní přímky podle rovnice: $E = (10^{(-1/b)} - 1) \times 100$. Pokud je efektivita reakce 100 %, sklon standardní křivky je -3,32. Nižší hodnota sklonu představuje efektivitu nižší než 100 %, zatímco hodnota vyšší, než -3,32 ukazuje nízkou kvalitu vzorku nebo problémy při přípravě vzorku (LabGuide).

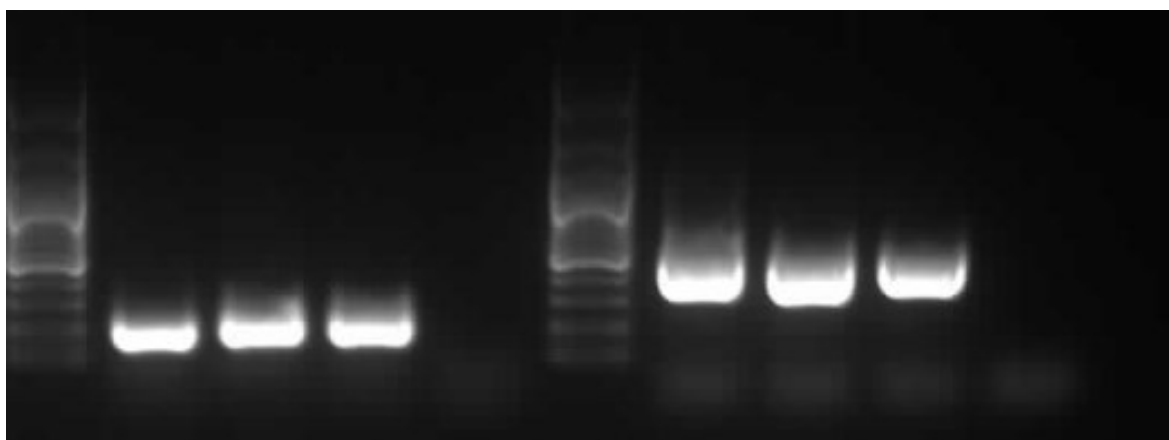
Pro výpočet kopií genu *mcrA* byly použity hodnoty ředění, u kterého byla vypočtena nejlepší efektivita reakce. Následně byla ze série standardů získána kalibrační křivka metodou lineární regrese. Kalibrační přímka byla získána ze závislosti delta Ct hodnot na logaritmu koncentrace standardů.

Dodané vzorky byly amplifikovány (kapitola 4.10.) společně se standardem o známé koncentraci (*Methanococcus vanniellii* SB). Vzorky i standardy byly sériově naředěny 0x, 10x, 100x, 1000x a následně napipetovány do mikrotitrační destičky. Každé ředění bylo pipetováno ve dvou opakováních. Následně byla provedena qPCR (kapitola 4.10.).

5 VÝSLEDKY

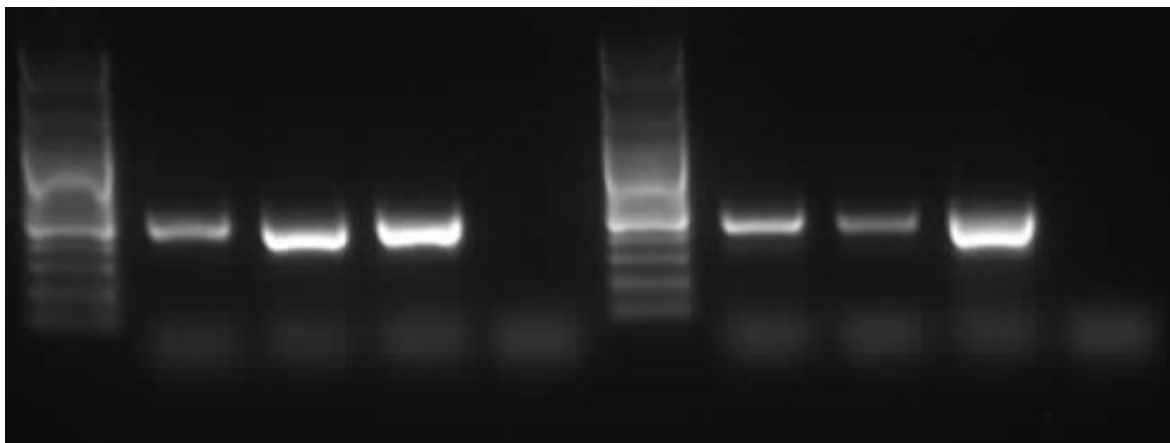
5.1 Optimalizace molekulárně biologických metod

Vhodnost primerů (tabulka) byla testována na sbírkových kmenech *Methanoculleus horonobensis* SB (Shimizu a kol., 2013), *Methanosarcina subterranea* SB (Shimizu a kol., 2015) a *Methanococcus vannielii* SB (Stadtman a Barker, 1951). Byla provedena Nested PCR. Teplota annealingu v první části touchdown PCR zvolena na 60 °C a ve druhé na 54°C. Počet cyklů byl nastaven na 35. Jako master mix byl použit GoTaq® Hot Start Green Master-Mix (Promega) a výsledky byly zkontrolovány pomocí elektroforézy v agarosovém gelu (Obrázek 12, Obrázek 13). Číslování jednotlivých bendů v obrázku představuje sbírkové kmeny v pořadí *Methanoculleus horonobensis* SB (1), *Methanosarcina subterranea* SB (2), *Methanococcus vannielii* SB (3). Negativní kontrola je značena jako N. Obrázek 12 znázorňuje test primerů 931f, 1100r a mlas, mcrA-rev, zatímco na obrázku 13 byly v reakci použity primery ME3MF, ME2r a ME3MFe, ME2r. Jak lze na obrázcích vidět, všechny vybrané primery reagovaly se sbírkovými kmeny pozitivně a mohly být tedy dále použity.



Obrázek 12 Test primerů a) 931f a 1100r b) mlas a mcrA-rev

a)					b)				
Marker	1	2	3	N	Marker	1	2	3	N

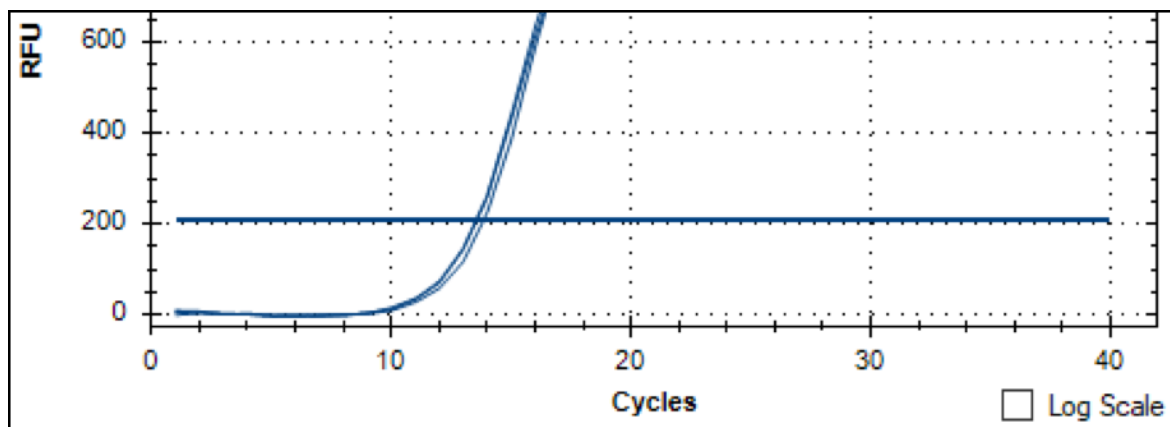


Obrázek 13 Test primerů a) ME3MF a ME2r b) ME3MFe a ME2r

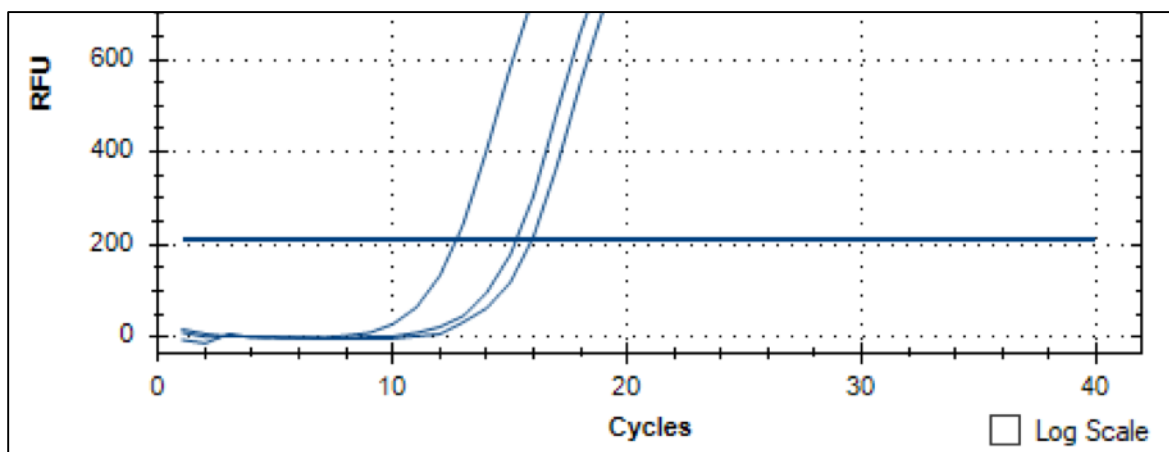
a)					b)				
Marker	1	2	3	N	Marker	1	2	3	N

5.1.1 Test qPCR

Byla provedena qPCR s 10x ředěnou DNA sbírkových kmenů methanogenů s využitím primerů specifických pro skupinu *Archaea* 931f a m1100r (endogen). Pro qPCR byl použit komerční master mix Luna Universal qPCR Master Mix od společnosti BioLabs. Složení směsi a nastavení programu qPCR je znázorněno v tabulkách. Jak lze vidět na obrázku (Obrázek 14), exponenciální fáze amplifikace DNA nastala již ve 13. cyklu. Dále byla otestována amplifikace 10x ředěné DNA s využitím primerů specifických pro methanogenní (a anaerobní methan oxidující) *Archaea* mlas a mcrA-rev. Exponenciální fáze proběhla v 12. – 15. PCR cyklu. Jak naznačuje obrázek (Obrázek 15), křivky tání byly v optimálních hodnotách. Teploty annealingu byly nastaveny dle teploty tání primerů.



Obrázek 14 Amplifikační křivka s využitím primerů 931f a m1100r



Obrázek 15 Amplifikační křivka s využitím primerů mlas a mcrA-rev

5.1.2 Stanovení meze detekce methanogenů

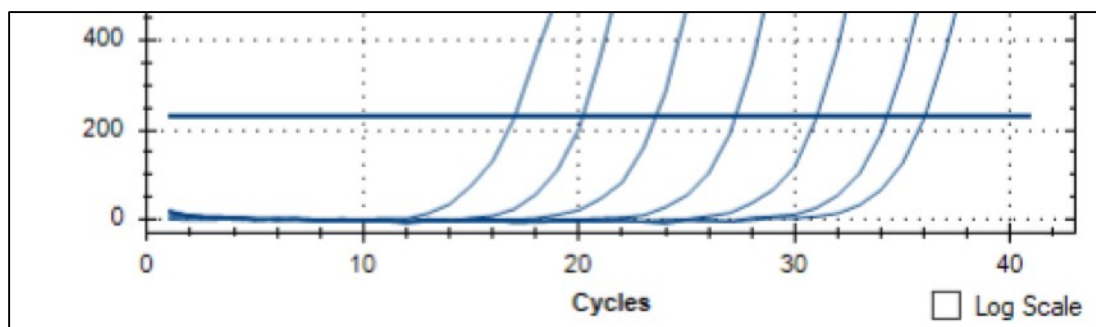
Pro hlubší kontrolu metody byla testována mez detekce genu *mcrA*. Bylo sledováno, při jakém nejvyšším ředění DNA bude ještě možné sledovat pomocí qPCR gen *mcrA*.

Ke stanovení meze detekce byla použita DNA vyizolovaná z anaerobního kalu z bioplynové stanice. Na základě charakteru kalu byl předpokládán vysoký výskyt methanogenů. K izolaci DNA byl použit komerční kit PowerSoil Isolation Kit od společnosti Quiagen. Koncentrace DNA byla změřena pomocí Fluorometru QFX (DeNovix) a kitu určeného pro velmi nízké koncentrace DNA AccuGreen™ High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit (Biotium) podle postupu v kapitole 3.5. Koncentrace DNA v anaerobním kalu byla 144 ng/μl.

Následně byla provedena touch down PCR. Složení směsi a nastavení programu PCR je znázorněno v tabulkách (Tabulka 8, Tabulka 9, Tabulka 10).

Vzorek anaerobního kalu byl využit také ke stanovení meze detekce genu *mcrA*. Při amplifikaci byly použity primery mlas a *mcrA*-rev. Vzorek anaerobního kalu byl metodou desítkového ředění naředěn až na 10^{-5} a následně byla provedena qPCR. Složení směsi a nastavení programu qPCR je znázorněno v tabulce. Efektivita reakce pro všechna ředění byla 96 % a křivky tání potvrdily pro všechna ředění také specificitu reakce. Vzorek bylo tedy možno naředit až 10 000x, to znamená, že gen *mcrA* mohl být detekován při minimální koncentraci DNA 0,00144 ng/μl.

Výsledné amplifikační křivky včetně negativní kontroly (poslední křivka) jsou uvedeny na obrázku (Obrázek 16).



Obrázek 16 Amplifikační křivka vzorku anaerobního kalu s použitím primerů mlas a mcrA-rev

5.2 Detekce genu mcrA

Pro molekulárně biologickou analýzu byly dodány reálné vzorky černého, hnědého uhlí a důlní vody. Ihned po dodání byla provedena izolace DNA komerčním kitem PowerSoil DNA Isolation Kit (Quiagen). Pro izolaci DNA z kapalných vzorků bylo filtrováno 500 ml pomocí vakuové filtrace (velikost pórů 0,45 μm) a DNA byla izolována z pevného podílu po filtraci. Pro izolaci DNA z pevných vzorů byl navážen 1 g homogenizovaného uhlí. Postup izolace DNA je uveden v kapitole 4.4.

Následně byla změřena koncentrace DNA ve vzorcích (Tabulka 19). Pro měření koncentrace DNA byl použit Fluorometr QFX (DeNovix) a kit určený pro velmi nízké koncentrace DNA AccuGreen™ High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit (Biotium). Fluorescenční barva je vázána k DNA, metoda je tak citlivá a je vhodná pro měření koncentrace vzorků, které mají být dále analyzovány metodou qPCR. Postup měření koncentrace DNA je uveden v kapitole 4.5.

V tabulce 19 lze vidět naměřené hodnoty koncentrace vyizolované DNA v $\text{ng}/\mu\text{l}$ ve vzorcích černého uhlí. Nejvyšší množství DNA bylo vyizolováno ze vzorku ČSA 21A, a to konkrétně 3,41 $\text{ng}/\mu\text{l}$, naopak nejméně bylo vyextrahováno ze vzorku DAR 21A, a to 0,007 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

Tabulka 19 Naměřené hodnoty koncentrace vyizolované DNA ve vzorcích černého uhlí

Důl	Vzorek	Koncentrace DNA [$\text{ng}/\mu\text{l}$]
Darkov	DAR 21B	0,027
Darkov	DAR 20A	0,95
ČSM	ČSM 2VA	0,023
ČSM	ČSM 2VB	0,049

Důl	Vzorek	Koncentrace DNA [ng/μl]
ČSM	ČSM 8A	0,02
Darkov	DAR 19	0,997
Darkov	DAR 21A	0,007
Darkov	DAR 18A	0,107
Darkov	DAR 18B	0,264
Darkov	DAR 17	0,056
Darkov	DAR 20B	0,425
ČSM	ČSM 10A	0,022
ČSM	ČSM 10B	0,062
ČSM	OKDj 11	0,123
ČSM	OKDj 29	0,18
ČSM	OKDj 25u	0,055
ČSM	OKDj 25p	0,071
ČSA	OKDj6	0,023
ČSA	ČSA 18A	0,117
ČSA	ČSA 18B	0,552
ČSA	ČSA 19	0,017
ČSA	ČSA 20A	0,038
ČSA	ČSA 21A	3,41
ČSA	ČSA 22	0,019
ČSA	ČSA 23	0,033

V tabulce 20 lze vidět naměřené hodnoty koncentrace vyizolované DNA v ng/μl ve vzorcích hnědého uhlí. Nejvyšší množství DNA bylo vyizolováno ze vzorku I14, konkrétně 3,95 ng/μl, naopak nejméně bylo vyextrahováno ze vzorků VAAC 1B, BIBW 1B a BICC 1B.

Tabulka 20 Naměřené hodnoty koncentrace vyizolované DNA ve vzorcích hnědého uhlí

Důl	Vzorek	Koncentrace DNA [ng/μl]
Vršany	VRBW 1B	0,64
Vršany	VRCC 1B	0,166

Důl	Vzorek	Koncentrace DNA [ng/μl]
Václav	VAAC 1B	0,001
Vršany	VRBC 1B	0,214
Václav	VABC 1B	0,011
Vršany	VRVAC 1B	0,002
Václav	VACC 1B	0,283
Bílina	BIAC 1B	0,042
Bílina	BIBC 1B	0,019
Bílina	BICC 1B	0,001
Bílina	BIAW 1B	0,02
Bílina	BIBW 1B	0,001
Libouš	LICC 1A	0,022
Libouš	LIBC 1A	0,069
Libouš	LIAC 1A	0,024
ČSA	LCBC 1A	0,022
ČSA	LCCC 1A	0,037
ČSA	LCAC 1A	0,099
ČSA	LCAC 1B	0,584
Libouš	LIAC 1B	0,069
ČSA	LCCC 1B	0,014
Libouš	LICC 1B	0,035
ČSA	LCBC 1B	0,03
Libouš	LIBC 1B	0,084
Bílina	Bi179	0,449
Bílina	Bi180	0,292
Bílina	Bi181	0,226
Bílina	Bi182	0,238
Vršany	VRS 1	0,33
Vršany	VRS 2	0,051
Vršany	VRS 3	0,89
Vršany	VRS 4	0,64
Vršany	VRS 5	0,85

Důl	Vzorek	Koncentrace DNA [ng/μl]
Bílina	I12	2,88
Bílina	I14	3,95
Bílina	I15	2,13

Před vlastní analýzou dodaných vzorků byly nejprve metodou polymerázové řetězové reakce otestovány primery mlas, mcrA-rev a ME3MF, ME2r. Bylo vybráno celkem 26 vzorků (Tabulka 19), které byly podrobeny qPCR analýze. Složení směsi a nastavení programu qPCR je znázorněno v tabulkách (Tabulka 11, Tabulka 12). Jako pozitivní kontrola sloužila DNA izolovaná z anaerobního kalu odebraného v bioplynové stanici. Zároveň každá reakce proběhla se 3 druhy master mixu, a to SYBR Green, Luna a Sso Fast Eva Green. Vyhodnocení real-time PCR proběhlo na základě Ct hodnoty. Jednotlivé reakce jsou znázorněny v tabulce (Tabulka 21). Nejdříve byly vzorky testovány použitím master mixu Luna. Detekovatelné množství DNA a gen mcrA obsahovaly vzorky ČSA 21A, DAR 18A, DAR 18B, DAR 17, ČSA 18A, ČSM 10A. Gen mcrA je společný pro methanogenní i anaerobní methan oxidující *Archaea*. U vzorků, které jsou v tabulce uvedeny s otazníkem, došlo v reakci k tvorbě nestandardních křivek tání, nebylo proto možno rozeznat, zda se jedná o nespecifické, nebo specifické produkty. Zda se v těchto vzorcích opravdu nachází gen mcrA, bylo ověřeno další qPCR za použití master mixu SYBR Green, který by měl zajistit citlivou a přesnou detekci DNA fragmentů amplifikovaných při qPCR. Při použití master mixu Sso Fast Eva Green však u vzorků ČSA 19, ČSM 2VA, DAR 21A, ČSA 22, ČSM 10B, ČSA 18B přítomnost genu mcrA prokázána nebyla.

Tabulka 21 Výsledky qPCR z se vzorky černého, hnědého uhlí a důlní vody

Vzorek	Přítomnost genu mcrA (Luna)	Přítomnost genu mcrA (SYBR Green)	Přítomnost genu mcrA (Sso Fast Eva Green)
BIAB 2a	x	x	x
BIAB 2b	x	x	x
BIAB 2c	x	x	x
BIBC 2a	x	x	x

Vzorek	Přítomnost genu mcrA (Luna)	Přítomnost genu mcrA (SYBR Green)	Přítomnost genu mcrA (Sso Fast Eva Green)
BIAW2/1	x	x	x
BIAW 1b	x	x	x
DAR 21B	?	Ano	x
DAR 20A	?	Ano	Ano
ČSA 20	?	Ano	Ano
ČSA 19	?	Ano	x
ČSM 2VA	?	Ano	x
ČSM 2VB	?	Ano	Ano
ČSM 8A	?	Ano	Ano
DAR 19	?	Ano	Ano
DAR 21A	?	Ano	x
ČSA 21A	Ano	Ano	Ano
DAR 18A	Ano	Ano	Ano
DAR 18B	Ano	Ano	Ano
DAR 17	Ano	Ano	Ano
ČSA 18A	Ano	Ano	Ano
DAR 20B	?	Ano	Ano
ČSA 22	?	Ano	x
ČSA 23	?	Ano	Ano
ČSM 10A	Ano	Ano	Ano
ČSM 10B	?	Ano	x
ČSA 18B	?	Ano	x

5.2.1 Specificky značené DNA próby

S použitím nespecifických master mixů (Luna, SYBR Green, Sso Fast Eva Green) nebylo možné s určitostí stanovit vzorky uhlí, které obsahovaly *Archaea* s genem *mcrA*. PCR primery mohou vytvářet nespecifické produkty a v některých případech tak může být vyhodnocení výsledků ztíženo. Proto byla provedena doplňující analýza pomocí specifických TaqMan prób (sond) detekujících gen *mcrA*. Tyto próby byly navrženy pro detekci genu *mcrA*. To zpřesnilo výsledky, a bylo tedy možné vytipovat vzorky obsahující gen *mcrA*. Specificky značené DNA próby byly následně použity pro analýzu všech dodaných vzorků černého a hnědého uhlí a environmentálních vzorků dodaných ČGS. Složení směsi a nastavení programu qPCR se specificky značenými DNA próbami je popsáno v kapitole 4.10.

5.2.2 Detekce genu *mcrA* ve vzorcích černého uhlí

Proběhla detekce genu *mcrA* v následujících vzorcích: DAR 17, DAR 18B, DAR 20A, DAR 20B, ČSM 10A, ČSM 10 B, ČSM 2VB, OKDj11, OKDj29, OKDj25p, OKDj25u, OKDj6, ČSA 18A, ČSA 21A, ČSA 23 (Tabulka 22), celkem tedy v 15 z 25 testovaných vzorků.

Co se týká dolu Darkov, gen *mcrA* byl detekován ve 4 z 8 analyzovaných vzorků. Celkem 9 vzorků uhlí odebraných z dolu ČSM bylo podrobeno analýze qPCR, přičemž přítomnost genu *mcrA* byla potvrzena u 7. Na první pohled zajímavé výsledky přineslo místo odběru označené jako OKD. Ve vzorcích z dolu ČSA byl gen *mcrA* potvrzen ve 3 ze 7 odebraných vzorků.

Tabulka 22 Výsledky qPCR se vzorky černého uhlí s použitím specifických DNA prób

Vzorek	Přítomnost genu <i>mcrA</i>
DAR 17	✓
DAR 18A	✗
DAR 18B	✓
DAR 19	✗
DAR 20A	✓
DAR 20B	✓
DAR 21A	✗
DAR 21B	✗
ČSM 2VA	✗

Vzorek	Přítomnost genu <i>mcrA</i>
ČSM 2VB	✓
ČSM 8A	✗
ČSM 10A	✓
ČSM 10B	✓
OKDj11	✓
OKDj29	✓
OKDj25p	✓
OKDj25u	✓
OKDj6	✓
ČSA 18A	✓
ČSA 18B	✗
ČSA 19	✗
ČSA 20A	✗
ČSA 21A	✓
ČSA 22	✗
ČSA 23	✓

5.2.3 Detekce genu *mcrA* ve vzorcích hnědého uhlí

Proběhla detekce genu v následujících vzorcích: VRS 1, VRS 2, VRS 3, VRA 4, VRS 5, BIAW 1B, Bi179, Bi180, Bi181, Bi182, I12, I14, I15 (Tabulka 23), celkem tedy ve 13 z 31 testovaných vzorků.

Zajímavé výsledky byly získány u vzorků z lomu Vršany, zde byla přítomnost genu *mcrA* potvrzena u 5 z celkového počtu 10 odebraných vzorků. Celkem u 8 z 11 vzorků pocházejících z dolu Bílina byla přítomnost genu *mcrA* potvrzena. Zde se jednalo jak o uhelnou matici, tak i důlní vodu nebo nadložní písky. Sledovaný gen nebyl nalezen v žádném vzorku z dolu Libouš, ani z těžebny Václav.

Tabulka 23 Výsledky qPCR se vzorky hnědého uhlí s použitím specifických DNA prób

Vzorek	Přítomnost genu <i>mcrA</i>
VRBW 1A	✗
VRBW 1B	✗

Vzorek	Přítomnost genu mcrA
VRVAC 1B	✗
VRBC 1B	✗
VRS1	✓
VRS2	✓
VRS3	✓
VRS4	✓
VRS5	✓
LIAC 1A	✗
LIAC 1B	✗
LIBC 1A	✗
LIBC 1B	✗
LICC 1A	✗
BIAW 1B	✓
BIBW 1B	✗
VAAC 1B	✗
VABC 1B	✗
LCAC 1A	✗
LCAC 1B	✗
LCBC 1A	✗
LCBC 1B	✗
LCCC 1A	✗
LCCC 1B	✗
Bi179	✓
Bi180	✓
Bi181	✓
Bi182	✓
I12	✓
I14	✓
I15	✓

5.2.4 Detekce genu *mcrA* v dalších environmentálních vzorcích

Vzorky dodané ČGS mohly potenciálně obsahovat methanogenní a methylotrófní *Archaea*. Vzorky byly zpracovány ihned po dodání. Pro izolaci DNA z kapalně fáze vzorků bylo centrifugováno 100 ml vodné fáze a DNA byla izolována z pevného podílu po centrifugaci. Pro izolaci DNA ze sedimentu byl navážen 1 g sedimentu. DNA byla izolována pomocí komerčního kitu PowerSoil Isolation Kit od společnosti Qiagen. Postup izolace DNA je uveden v kapitole 4.4. Koncentrace DNA byla změřena pomocí Fluorometru QFX (DeNovix) a kitu určeného pro velmi nízké koncentrace DNA AccuGreen™ High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit (Biotium). Postup měření koncentrace DNA je uveden v kapitole 4.5. Koncentrace DNA jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 24). Nejvyšší množství DNA bylo vyizolováno ze vzorku Sta3/os, konkrétně 4,72 ng/μl, naopak nejméně bylo vyextrahováno ze vzorku 1W, a to 0,29 ng/μl.

Tabulka 24 Naměřené hodnoty koncentrace vzorků dodaných ČGS

Vzorek	Koncentrace DNA [ng/μl]
1-S2	1,31
2-S2	0,28
Sta3/os	4,72
Sta4/ok	3,82
ŽU-1D8 S	2,1
ŽU-1D8 W	0,8
1W	0,29
2W	0,45
1S	1,25
2S	1,34

DNA byla amplifikována pomocí real-time PCR s primery *mcrA* a *mcrA*-rev. Byla použita specificky značená DNA próba. Jako pozitivní kontrola sloužila DNA typového kmenu *Methanococcus vannielii* SB. Nastavení melting temperature bylo po předešlých neúspěšných testech při 60 °C zvoleno na 57 °C. Složení PCR směsi a nastavení programu qPCR je zobrazeno v tabulkách. Stejně jako u vzorků uhlí, vyhodnocení real-time PCR proběhlo na základě Ct hodnoty (Tabulka 25).

Přítomnost genu *mcrA* byla potvrzena u vzorků Sta3/os, Sta4/ok, 1W a 1S. Vzorky 1W a 1S pocházely z dolu Staříč, jednalo se o oranžový sediment a kůru. Ve vzorcích pocházejících z místa uzavřeného vrtu v lokalitě Žukov přítomnost genu *mcrA* potvrzena nebyla. Naopak u vzorků 1W a 1S, které byly odebrány z louže s průsakem methanu v Hornoslezské uhelné pánvi, byl gen *mcrA* potvrzen.

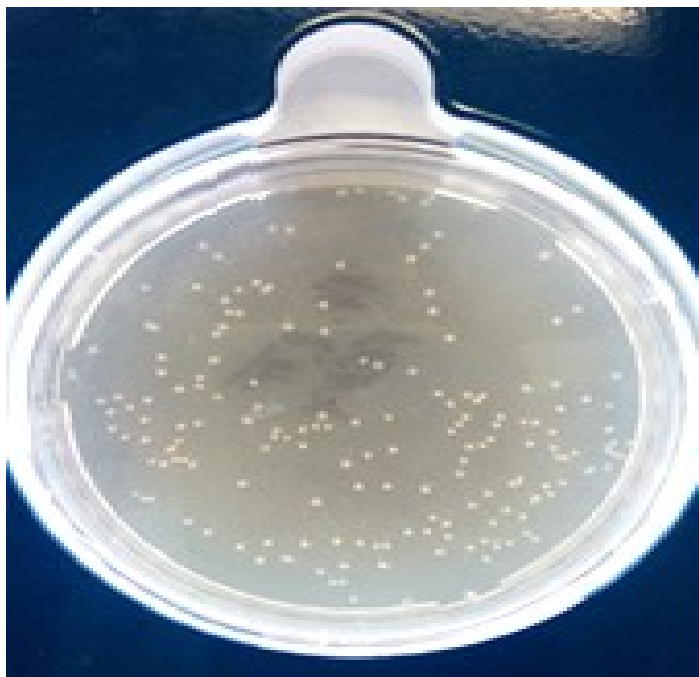
Tabulka 25 Vyhodnocení qPCR pro vodné fáze a sedimenty.

Vzorek	Přítomnost genu <i>mcrA</i>
1-S2	✘
2-S2	✘
Sta3/os	✓
Sta4/os	✓
13W	✘
ŽU-1D8 S	✘
ŽU-1D8 W	✘
1W	✓
2W	✘
1S	✓
2S	✘

5.3 Absolutní kvantifikace genu *mcrA* v dodaných vzorcích

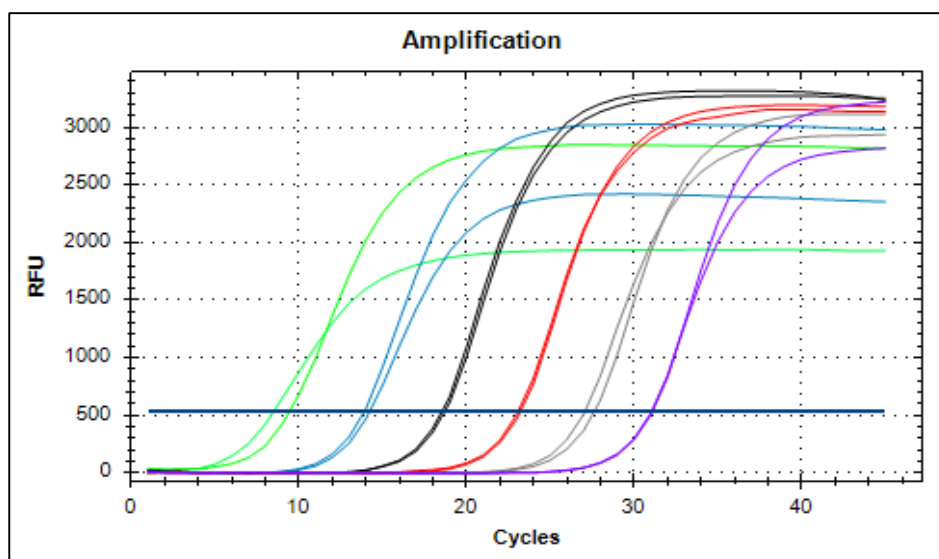
Absolutní kvantifikaci byly podrobeny vzorky, ve kterých byla potvrzena přítomnost genu *mcrA*. Absolutní kvantifikace využívá metodu standardní (kalibrační) křivky. Pomocí této metody je možné stanovit reálný počet kopií sledovaného genu ve vzorcích, který se porovnává se standardy o známém množství tohoto genu.

Standardy byly připraveny pomocí klonování. K zaklonování byla použita DNA mikroorganismu *Methanococcus vannielii* SB. Nejprve byl zaklonován plasmid, který byl přenesen do kompetentní buňky. Z kompetentních buněk (Obrázek 17) byla poté izolována plasmidová DNA. Ověření přítomnosti vloženého úseku genu *mcrA* do klonovacího plasmidu v kompetentních buňkách bylo provedeno pomocí PCR, sekvenování a identifikace v databázi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).



Obrázek 17 StellarTM Competent Cells + plazmid s vloženým sledovaným úsekem genu *mcrA*.

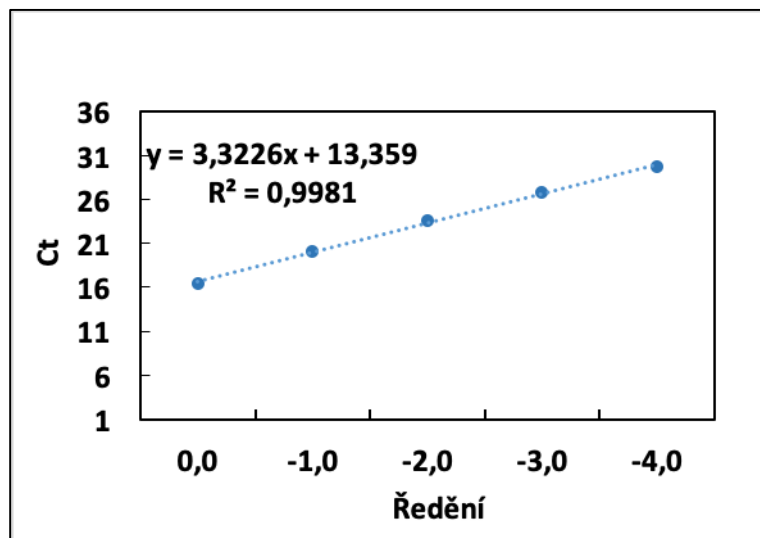
Plazmidová DNA s vloženým úsekem *mcrA* genu byla použita pro přípravu standardů o známých počtech kopií genu. Tato DNA byla sériově naředěna (0x, 10x, 100x, 1000x, 10000x, 100000x), a to vždy v duplikátech. Mezi jednotlivými duplikáty by neměly být vysoké standardní odchylky. Ty totiž značí chybu v pipetování nebo přítomnost inhibitorů. Výstupem je soubor Ct hodnot. Amplifikační křivky lze pozorovat na obrázku (Obrázek 18).



Obrázek 18 Výsledné standardní křivky vzniklé sériovým naředěním plazmidové DNA a provedením qPCR

Pomocí vytvořených standardních křivek byl kvantifikován počet kopií úseku genu *mcrA* ($6,665 \cdot 10^{11}$ kopií genu *mcrA* v 1 μl plazmidu).

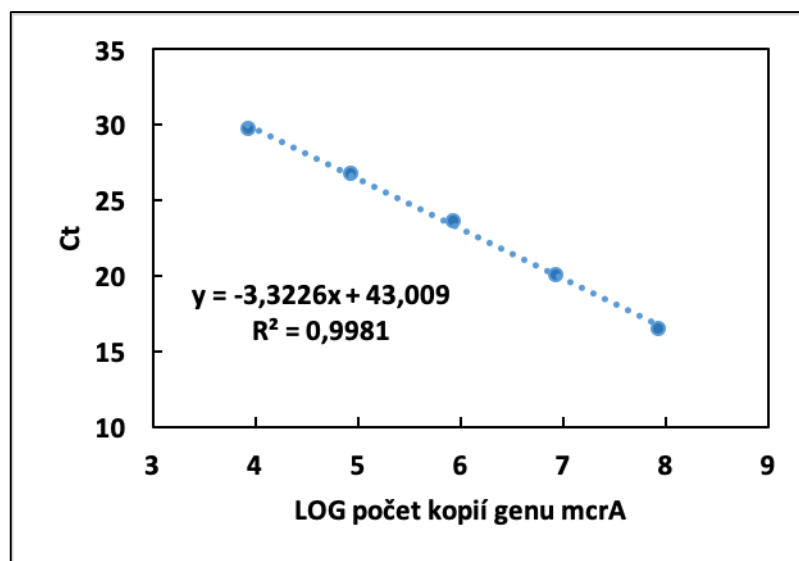
Efektivita reakce byla vypočtena ze sklonu standardní křivky (Obrázek 19).



Obrázek 19 Standardní křivka qPCR pro absolutní kvantifikaci

Efektivita reakce byla **100,1** %, leží tak v rozmezí akceptovaných hodnot (90–110 %). Efektivita může být vyšší než 100 % kvůli formování nespecifických produktů během reakce (Rogers-Broadway a kol., 2015).

Ze známého množství genu *mcrA* v kalibraci a Ct hodnot byla vytvořena kalibrační křivka (Obrázek 20), která sloužila pro určení počtu kopií úseku genu *mcrA* ve vzorcích, ve kterých byl tento gen detekován pomocí specifických prób TaqMan.



Obrázek 20 Kalibrační křivka pro stanovení počtu kopií úseku genu mcrA ve vzorcích

5.3.1 Absolutní kvantifikace genu mcrA ve vzorcích černého uhlí

Přesné množství kopií genu mcrA bylo vypočteno z kalibrační křivky pomocí metody lineární regrese (kapitola 5.6). Ve všech testovaných černouhelných lokalitách byla potvrzena přítomnost genu mcrA, ovšem ne ve všech vzorcích. Bylo tedy potvrzeno, že výskyt tohoto genu je ovlivněn nejen geografickým umístěním uhelného dolu, ale také přesným odběrným místem.

Tabulka 26 a obrázek 21 popisuje přesný počet kopií genu mcrA v jednotlivých vzorcích. Lze si povšimnout, že tyto počty se pohybují v intervalu desítek až desetitisíců kopií. Jak lze vidět v grafu, nejvyšší množství kopií tohoto genu bylo zjištěno u vzorku DAR 20B. Jedná se o kapalný vzorek vody z čelby. Množství 15 040 kopií genu v 1 ml vody bylo v porovnání s ostatními vzorky až tisícinásobně vyšší. Vzorek DAR 20A pocházející taktéž ze stejného dolu obsahoval 6 768 kopií genu mcrA. Lze tedy říci, že důl Darkov představuje z hlediska methanogeneze oblast s nejvyšším potenciálem výskytu sledovaného genu ze všech analyzovaných černouhelných lokalit. Vzorky byly odebrány na místech nedaleko od sebe, detailnější charakteristika vzorků však nebyla dodána, a proto nelze diskutovat, čím může být způsoben tak markantní rozdíl v počtu kopií genu mcrA.

Jako vzorek s nejnižším počtem kopií genu mcrA byl vyhodnocen ČSA 23. Jednalo se o vzorek vody z lokality dolu ČSA odebraný v místě křížení překopů sloje. Počet kopií genu mcrA ve všech vzorcích je uveden v tabulce.

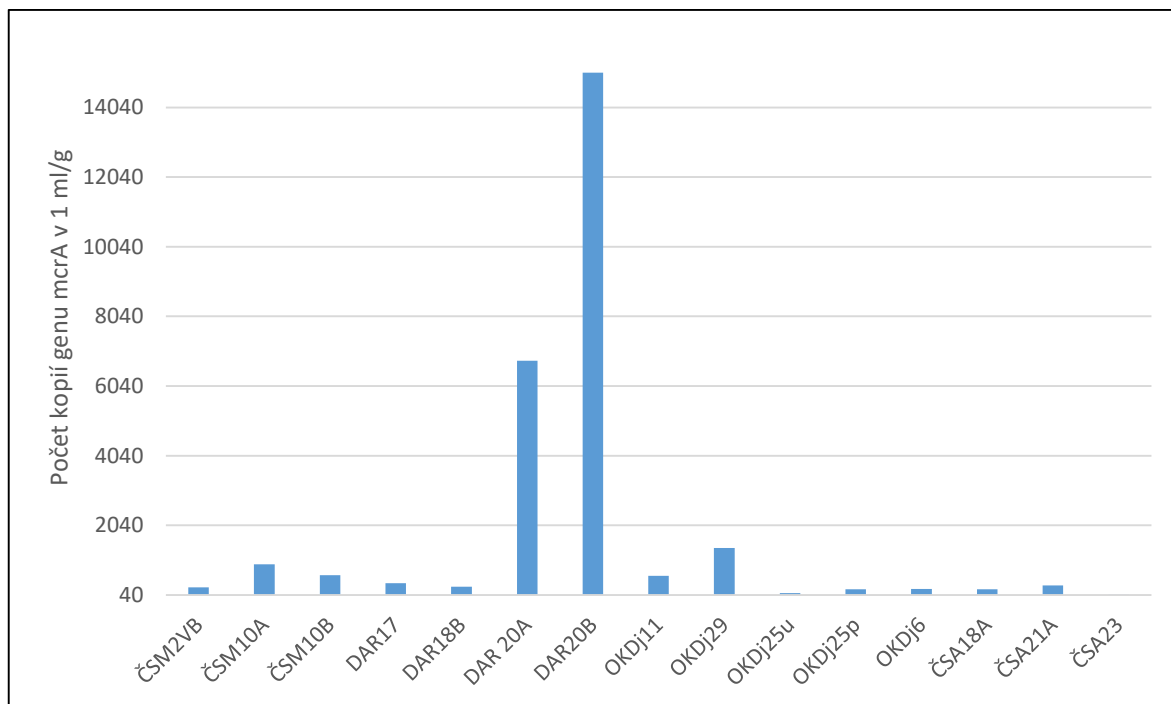
Kromě vzorků OKDj11, OKDj25u, OKDj25p, OKDj6, OKDj29 se jednalo o vzorky kapalné. Zajímavé výsledky přinesla také analýza vzorků OKD. Vzorky OKDj11, OKDj6 a OKDj25u představovaly uhelnou matici, zatímco vzorky OKDj25p a OKDj29 pískovec. Vzorek OKDj25p byl odebrán v hloubce 150 m, vzorek OKDj29 v hloubce 209 m. Počty kopií genu *mcrA* byly vyšší ve vzorku pocházejícím z větší hloubky.

Z dolu ČSA byly dodány vzorky kapalné, nejvyšší počet kopií genu *mcrA* byl zjištěn ve vzorku ČSA 21A, který pocházel z nečinného vrtu.

Nejvyšší počet kopií genu *mcrA* ve vzorcích odebraných v dole ČSM byl zjištěn ve vzorku ČSM 10A. Tento vzorek pocházel z místa přesahu do polského dolu Morcinek a jednalo se o kapalný vzorek. Ze stejné lokality pocházel také vzorek ČSM 10B.

Tabulka 26 Počet kopií genu *mcrA* v pozitivních vzorcích černého uhlí. Přepočteno na počet kopií genu v 1 ml (důlní voda) nebo 1 g (uhlí, voda z čelby – hustá směs pevné a kapalné fáze).

Vzorek	Počet kopií genu/ml
ČSM 2VB	255
ČSM 10A	920
ČSM 10B	612
DAR 17	375
DAR 18B	280
DAR 20A	6 768
DAR 20B	15 040
OKDj11	591
OKDj29	1386
OKDj25u	90
OKDj25p	200
OKDj6	209
ČSA 18A	202
ČSA 21A	318
ČSA 23	41



Obrázek 21 Počet kopií genu mcrA v 1 ml důlní vody nebo 1 g černého uhlí.

5.3.2 Absolutní kvantifikace genu mcrA ve vzorcích hnědého uhlí

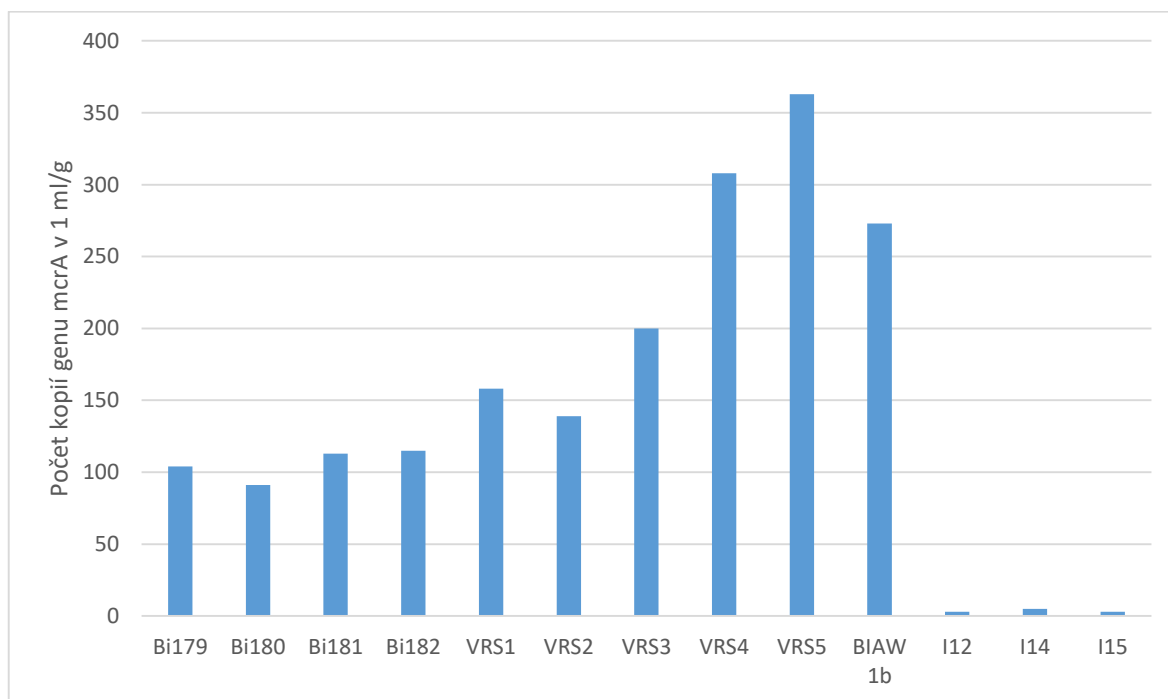
V tabulce (Tabulka 27) jsou zaznamenány počty kopií sledovaného genu ve vzorcích hnědého uhlí. Jednotlivé hodnoty se pohybují od desítek ke stovkám kopií. Tato čísla jsou tedy mnohem nižší než u vzorků uhlí černého.

Tabulka 27 Počet kopií genu mcrA ve vzorních hnědého uhlí

Vzorek	Počet kopií genu/ml/g
Bi179	104
Bi180	91
Bi181	113
Bi182	115
VRS1	158
VRS2	139
VRS3	200
VRS4	308
VRS5	363
BIAW 1B	273
I12	3
I14	5

Vzorek	Počet kopií genu/ml/g
I15	3

Nejvyšší počet kopií genu *mcrA*, a to 363 buněk, byl zjištěn u vzorku VRS5 (Obrázek 22), který pochází z dolu Vršany. Vzorek byl získán z hloubky 85 m vrtu SL438. Jedná se o pevný vzorek.



Obrázek 22 Počet kopií genu *mcrA* v 1 ml důlní vody nebo 1 g hnědého uhlí.

Velmi zajímavé výsledky lze pozorovat u vzorků z lomu Bílina (Bi179, Bi180, Bi181, Bi182, BIAW 1B). Vzorky Bi180, Bi181 a Bi182 jsou řazeny podle narůstající hloubky odběru (160 m, 161 m, 167 m). V grafu lze vidět, že tedy s narůstající hloubkou odběru roste i počet kopií genu *mcrA*. Důležitým poznatkem je také to, že se tento gen nevyskytuje pouze v uhlí (Bi180, Bi181, Bi182), ale také v písku (Bi179 – hloubka 159 m) a rovněž v místě vývěru vody ze stěny sloje (BIAW 1B).

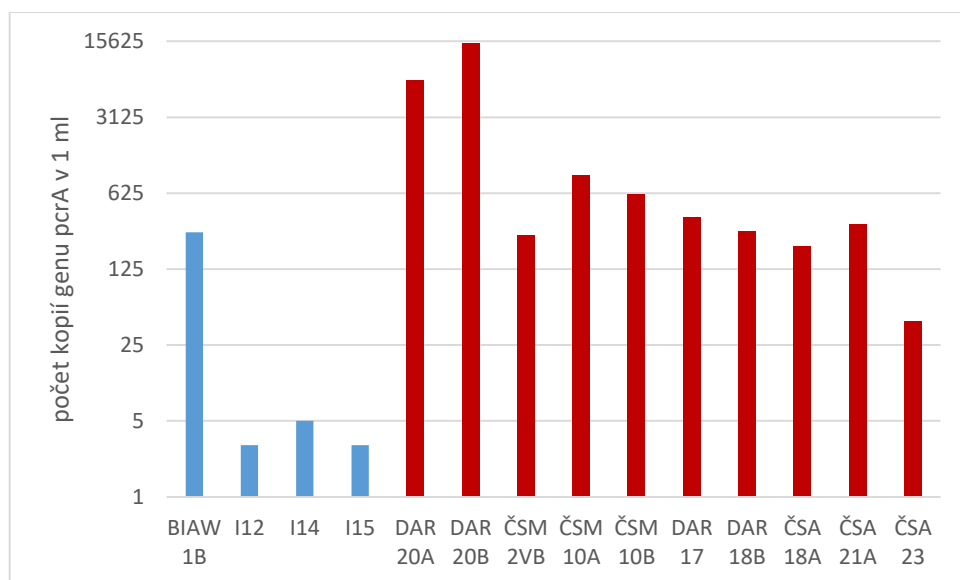
Vzorky VRS1, VRS2 a VRS3 pochází z dolu Vršany a byly získány z vrtu SL437. Opět jsou řazeny podle narůstající hloubky odběru (56 m, 63 m, 71 m). Zde však již závislost počtu kopií genu *mcrA* na hloubce odběru pozorovat nelze. I přesto ale lze konstatovat, že jeho nejvyšší počet byl zjištěn ve vzorku VRS3, tedy v nejhlubším místě odběru vrtu SL437.

Vzorky VRS4 a VRS5 pochází z vrtu SL438. Hloubka odběru byla 79 a 85 m. Z grafu vyplývá, že v tomto vrtu jsou příznivější podmínky pro organismy obsahující gen *mcrA* ve větší hloubce.

Za zmínku stojí také vzorek BIAW 1B (273 kopií genu *mcrA* v 1 ml vody). Jednalo se o vývěr vody ze stěny sloje lomu Bílina. Odběrové místo BIA se nacházelo v nejsevernější části báze sloje a z pukliny o průměru 1 cm zde vyvěrala voda. Stěny pukliny byly pokryty bělavým biofilmem vzhledem připomínajícím chmýří. Voda slabě zapáchala sulfanem, byla však čirá.

Vzorky I12, I14 a I15 (voda z nadložních písků) se lišily hloubkou odběru. Z největší hloubky dolu Bílina pocházel vzorek I14, který také obsahoval nejvyšší počet kopií sledovaného genu.

Obrázek 23 popisuje počet genu *mcrA* v kapalných vzorcích. Modře jsou znázorněny vzorky pocházející z hnědouhelných lokalit a červeně z lokalit černouhelných.



Obrázek 23 Srovnání počtu kopií genu *mcrA* v kapalných vzorcích hnědého uhlí (modře) a černého uhlí (červeně)

Z obrázku je patrné, že počty kopií genu *mcrA* ve vzorcích vody z černouhelných lokalit byly v řádu tisíců a desetitisíců, zatímco v lokalitách hnědouhelných se tyto počty pohybovaly pouze v řádu jednotek až stovek kopií genu *mcrA* v 1 ml. Nejvyšší počet kopií genu byl zjištěn u vzorků DAR 20A a DAR 20B, tedy u vody z čelby. Jednalo se o hustou směs pevné a kapalné fáze. Vzorek BIAW 1B obsahoval výrazné množství částic uhlí (vrtná drť) a počet kopií genu *mcrA* výrazně převyšoval obsah genu ve vzorcích vody pocházející z hnědouhelných lokalit. Tato skutečnost navádí k hypotéze, že se methanogeny vyskytují v biofilmu, kde jsou poměrně silně vázány a neochotně se uvolňují do vody. Největší methanogenní

potenciál by tak mohly představovat vzorky s pevnou maticí a na ní adheřovaným biofilmem. Vysoké počty kopií genu *mcrA* byly zjištěny také u vzorku ČSM 10A (přesah do polského dolu Morcinek) a také ČSA 21A (nečinný vrt).

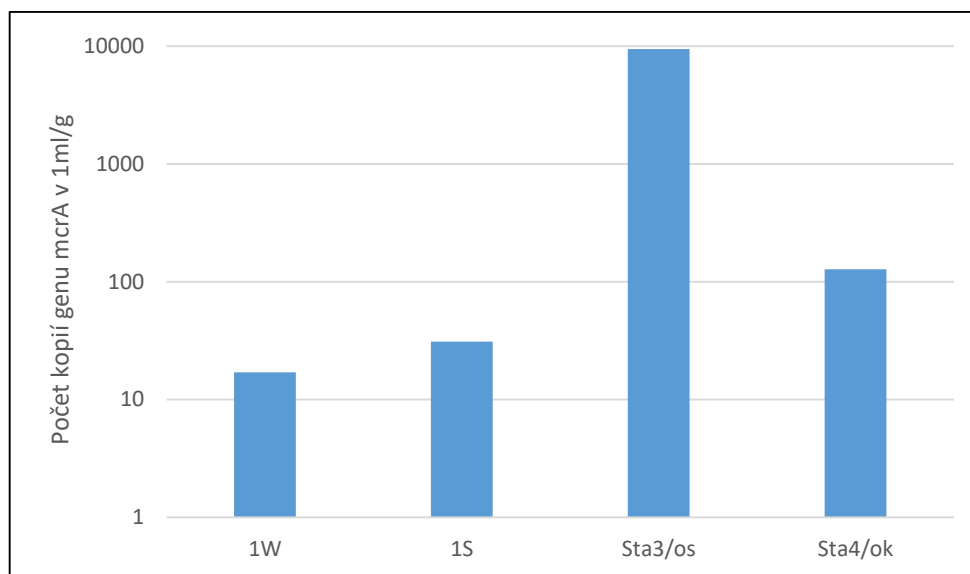
5.3.3 Absolutní kvantifikace genu *mcrA* v dalších environmentálních vzorcích

V tabulce (Tabulka 28) je zaznamenán počet kopií genu *mcrA* v environmentálních vzorcích dodaných ČGS. Analýza potvrdila, že tento gen není přítomen pouze v uhlí, ale i v jiných environmentálních vzorcích.

Tabulka 28 Počet kopií genu *mcrA* ve vzorcích dodaných ČGS

Důlní voda	Počet kopií genu/ml
Sta3/os	9460
Sta4/ok	128
1W	17
1S	31

Jak ukazuje obrázek (Obrázek 24), zajímavé výsledky přinesla také analýza vzorku Sta3/os s 9460 kopiemi genu *mcrA* v 1 ml. Jednalo se o oranžový sediment z dolu Staříč. Přítomnost genu byla potvrzena i v kůře, získané taktéž z lokality Staříč. Stejně jako předešlý vzorek, i Sta4/ok pokrývala oranžová vrstva. Množství genu zde však bylo nižší (128 kopií v 1 ml). Sledovaný gen byl potvrzen také ve vzorku vody 1W a sedimentu 1S. Tyto vzorky pocházely z místa vývěru methanu v oblasti Hornoslezské uhelné pánve. Počet kopií genu *mcrA* v porovnání s lokalitou Staříč zde však byl mnohem nižší.



Obrázek 24 Počet kopií genu mcrA v environmentálních vzorcích dodaných ČGS

5.3.4 Diskuze získaných dat s literaturou

Methanogeneze je v životním prostředí připisována především anoxickým stanovištím, jako jsou mokřady, rýžová pole, sedimenty a další, nicméně nepatrné množství methanu bylo prokázáno také v nezaplavených půdách a sedimentech. Je také známo, že tok methanu je ovlivněn sezónními výkyvy půdní vlhkosti a změnami hladiny podzemní vody při přechodu půdních podmínek z oxických na anoxické (Glinski a kol., 2011). Methanogeny mají také schopnost snášet podmínky ve vysušené matici, v prostředí s vysokou hladinou kyslíku, a mohou po dlouhou dobu přežít i v převážně suchých a oxických půdách navzdory skutečnosti, že netvoří spory ani jiná stadia (Liu a kol., 2008). Tato skutečnost by tedy mohla být potvrzena i u vzorků vody z nadložních písků lomu Bílina (I12, I14, I15), v nichž byl přítomen gen mcrA. Tyto kapalné vzorky se lišily hloubkou odběru. Vzorek I14, odebraný nejhlouběji, obsahoval nejvyšší počet kopií genu mcrA. Vzorek I12 (hloubka 70–95 m) obsahoval stejný počet kopií genu mcrA jako vzorek I15 (65–100 m). Tato skutečnost by teda mohla napovídat tomu, že hloubka odběru má na methanogenní společenstva vliv nejen u černého a hnědého uhlí, ale také jiných matic.

Mezi samotné parametry tvorby methanu patří stupeň zuhelnatění, základní chemické a fyzikální vlastnosti uhlí (těkavé látky, popelovina, obsah vody), macerální složení uhlí a jeho pórovitost. Studie Hemza a kol. zmiňuje také migraci plynů, erozi georeliéfu, tektoniku uhelného dna, charakter povrchu ložiska a anomálie vývoje uhelné sloje (Hemza a kol., 2009).

Ve studii Hemza a kol. bylo zjištěno, že se obsah plynu v uhelných slojích značně liší. Obecně se množství plynu v uhelných ložích s hloubkou snižuje. Tento pokles není lineární, ale charakterizují jej maxima a minima. Nejvýraznější interval s vyššími hodnotami plynu sahá do hloubky 150 m (zejména v místech nepropustné skrývky). U vzorků vody z nadložních písků lomu Bílina lze pozorovat nárůst počtu kopií genu *mcrA* s přibývajícím hloubkou. Rovněž vzorek VRS3, získaný z nejhlubšího odběrového místa (71 m) vrtu SL437, obsahoval nejvyšší počet kopií genu v porovnání se vzorky VRS1 a VRS2 získanými z téhož vrtu. Poté následuje interval do hloubky 100–200 m, kde jsou relativně odplyněná uhelná dna. Ve vzorcích Bi180, Bi181, Bi182, které byly odebrány z této hloubky, ale bylo kvantifikováno větší množství genu *mcrA*. Hloubka 600–700 m je pak charakteristická vyšší koncentrací plynu, ale ne tak vysokou, jako v místech skrývky. Vzorek DAR 18B pocházející z dolu Darkov a hloubky 350 m je zástupcem nejnižší položených odběrových lokalit. V porovnání s ostatními vzorky DAR, obsahoval DAR 18B nejnižší počet kopií sledovaného genu. Lze tedy odvodit, že výskyt genu *mcrA* nemusí korelovat s množstvím methanu, toto množství ale zároveň může být ovlivněno hloubkou odběru. Detailní analýza nebiogenního a biogenního methanu na odběrových místech bude provedena v rámci projektu.

Dalším faktorem ovlivňujícím množství plynu je také stupeň prouhelnění. Byl popsán trend, ve kterém zvýšení stupně prouhelnění koreluje se sníženým obsahem plynu v uhlí z dané lokality. Tento pokles je také charakterizován maximy a minimy. Množství plynu v uhlí ovlivňují také makropóry, mikropóry a migrační procesy v uhelné matici (Hemza a kol., 2009).

Mnoho výzkumů zabývajících se methanogenezí poukazuje na fakt, že tento proces probíhá především v hnědouhelných ložiscích (Faiz a Hendry, 2006, Harris a kol., 2008, Fallgren a kol., 2013, Haider a kol., 2013). Při srovnání testovaných vzorků z černouhelných a hnědouhelných lokalit však lze vidět, že v případě černého uhlí byly zjištěny stovky-tisíce kopií genu *mcrA*, zatímco hnědouhelné lokality jsou charakteristické stovkami kopií. Analýze bylo podrobena celkem 39 vzorků hnědého uhlí, z toho ve 13 vzorcích byla potvrzena přítomnost genu *mcrA*, dále bylo otestováno 25 vzorků černého uhlí, z nichž celkem 15 obsahovalo sledovaný gen. Zajímavým výsledkem této práce je zjištění, že methanogeneze nemusí probíhat především v hnědouhelných ložiscích.

Předmětem zájmu mnoha výzkumných týmů je také methanogeneze v uhlí vyšší kvality. Výzkumný tým Xiao a kol. projevil úsilí o pochopení biologického odbourání antracitu. Pří-

kladem je studie zaměřená na tvorbu bioplynu v pánvi Qinshui, která je bohatá na nebiodegradabilní uhlí. Xiao a kol. ale tvrdí, že těkavé látky patří mezi řídicí faktory methanogeneze v různých typech uhlí. Například antracit obsahuje 2–8 % těkavých látek. Jedná se o složky uhlí, které jsou uvolňovány ve formě plynu při vysokých teplotách. Těkavé látky představují také malé procento zachycených plynů, jako jsou vodík, oxid uhličitý, methan a další nízkomolekulární uhlovodíky v uhelných macerálech (Strapoc a kol., 2011). Přítomnost takových sloučenin zajišťuje vysokou vznětlivost, těkavá hmota je ale také důležitá pro pochopení potenciálu produkce biogenního methanu z uhlí (Xiao a kol., 2013). Zajímavý je fakt, že s přítomností nízkomolekulárních uhlovodíků a plynných sloučenin, mohou methanogenní komunity inicializovat využití substrátu ve vysoce kvalitním uhlí bez pomoci bakterií a hub degradujících uhlí. Největší potenciál pro generování methanu má vysoce těkavé černé nebo hnědé uhlí (Sekhohola a kol., 2013). Vysoké množství těkavých látek není příznivé pro životní prostředí, zatímco nízké množství fixovaného uhlíku v daném typu uhlí představuje problémy pro ekonomické účely. Díky těmto vlastnostem je uhlí s vysokou těkavostí a nízkým obsahem uhlíku méně žádoucí při spalování. Na druhou stranu mohou tyto vlastnosti pozitivně ovlivnit konečnou produkci methanu (Fallgren a kol., 2013).

Gen *mcrA* je společný pro methanogenní i anaerobní methan oxidující *Archaea*. Vysoké počty kopií genu *mcrA* obsahovaly vzorky DAR 20A a DAR 20B (voda z čelby, hustá směs pevné a kapalné fáze), dále pak vzorek BIAW 1B (odebrán ze stěny pukliny, bělavý biofilm vzhledem připomínající chmýří). Konsorcia v biofilmu jsou chráněna před odplavením vodním proudem. Biofilm zároveň představuje bariéru před extrémními podmínkami prostředí jako je pH, teplota, UV záření, vysychání nebo působení toxických látek. Matrice biofilmu, která je tvořena převážně z polysacharidů, také akumuluje živiny a umožňuje koexistenci více mikrobiálních druhů. Methanogeny jsou striktní anaerobové, biofilm tedy musí mít dostatečnou tloušťku a umožnit tak vznik anoxického prostředí. Jak již bylo zmíněno, methanogeny využívají produkty metabolismu jiných druhů, které se v biofilmu taktéž vyskytují (Lock, 1994).

ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce byla zaměřena na methanogenní mikroorganismy ze skupiny *Archaea*, jejich výskyt a význam v životním prostředí, především však v uhelných dolech. Práce byla zároveň zaměřena na metody detekce genu *mcrA* pomocí molekulárně biologických metod.

Cílem této práce bylo optimalizovat metodiku stanovení genu *mcrA* pomocí molekulárně biologických metod, dále tento gen analyzovat v reálných vzorcích černého a hnědého uhlí, důlní vody a dalších různorodých vzorcích, které byly dodány Českou geologickou službou a v neposlední řadě také kvantifikovat jejich množství zacílením na gen *mcrA*.

V rámci optimalizace metod byla nejprve otestována vhodnost primerů metodou Nested PCR na kulturách sbírkových kmenů *Methanoculleus horonobensis* SB, *Methanosarcina subterranea* SB, *Methanococcus vannielii* SB. Správný průběh reakce byl ověřen horizontální agarózovou elektroforézou. Dále byla otestována qPCR a stanovena mez detekce genu *mcrA* za použití DNA vyizolované z anaerobního kalu z bioplynové stanice.

Následné detekci bylo podrobena celkem 75 vzorků, z toho 25 vzorků z černouhelných lokalit, 39 vzorků z lokalit hnědouhelných a 10 dalších environmentálních vzorků. Ihned po dodání vzorků byla vyizolována DNA komerčním kitem PowerSoil DNA Isolation Kit, koncentrace vyextrahované DNA byla změřena na přístroji Fluorometr QFX za použití kitu pro velmi nízké koncentrace DNA. K analýze qPCR byly vybrány 3 druhy master mixů – Luna, SYBR Green a Sso Fast Eva Green. Tyto master mixy však reagovaly nespecificky, proto nebylo možné s určitostí stanovit vzorky obsahující gen *mcrA*. Z tohoto důvodu byla navržena specifická TaqMan próba. To zpřesnilo výsledky a umožnilo určit vzorky obsahující tento gen. Tato próba byla následně použita pro analýzu všech dodaných vzorků. Absolutní kvantifikace genu *mcrA* byla provedena metodou klonování.

Gen *mcrA* byl potvrzen v 15 vzorcích černého uhlí, 13 vzorcích hnědého uhlí a 4 dalších environmentálních vzorcích. Sledovaný gen nebyl nalezen pouze v pevných uhelných maticích, ale také v důlní vodě, vodě z čelby, nadložních pískách, kůře a sedimentech. Počty kopií genu *mcrA* v 1 ml/g se pohybovaly v jednotkách až stovkách kopií v případě hnědouhelných lokalit a tisíců až desetitisíců kopií v případě černouhelných lokalit. Zároveň bylo zjištěno, že výskyt genu *mcrA* není ovlivněn pouze geografickým umístěním uhelného dolu,

ale také polohou odběrového místa. S hloubkou odběru rostl i počet kopií genu *mcrA*. Dalším zjištěním byla také skutečnost, že největší methanogenní potenciál představovaly vzorky s pevnou maticí a na ní adherovaný biofilm.

Výsledky této práce pomohly vytipovat uhelné lokality s největším potenciálem pro podporu biogenní methanogeneze. Na těchto lokalitách proběhne po dalších testech cílená podpora methanogenů s cílem zvýšit produkci biogenního methanu, který má potenciál sloužit jako obnovitelný zdroj energie.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abnova: FISH Probes, 2021. Dostupné z: <http://www.abnova.com/support/resources.asp?switchfunctionid=%7BB4285500-DB85-435D-BE02-2BF420D5C70D%7D>

ALEXEEV, A.D., T.A. VASILENKO a E.V. ULYANOVA, 1999. Closed porosity in fossil coals. *Fuel*. [online]. 78(6), 635-638 [cit. 2021-04-16]. ISSN 00162361. Dostupné z: doi:10.1016/S0016-2361(98)00198-7

ANDREW R. SCOTT, W. R. KAISER, 1994. Thermogenic and Secondary Biogenic Gases, San Juan Basin, Colorado and New Mexico--Implications for Coalbed Gas Producibility. *AAPG Bulletin*. 78. ISSN 0149-1423. Dostupné z: doi:10.1306/A25FEAA9-171B-11D7-8645000102C1865D

APPELS, Lise, Jan BAEYENS, Jan DEGRÈVE a Raf DEWIL, 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science* [online]. 34(6), 755-781 [cit. 2021-04-16]. ISSN 03601285. Dostupné z: doi:10.1016/j.pecs.2008.06.002

APOLINARIO, Ethel A. a Kevin R. SOWERS, 1996. Plate colonization of *Methanococcus maripaludis* and *Methanosarcina thermophila* in a modified canning jar. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 145(1), 131-137 [cit. 2021-04-16]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.1996.tb08567.x

Báňské předpisy: úplné znění s komentářem. Ostrava: *Montanex*, 1998-^^^^. Báňské publikace. ISBN 80-7225-008-6.

BAPTESTE, Éric, Céline BROCHIER a Yan BOUCHER, 2005. Higher-level classification of the Archaea: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* [online]. 1(5), 353-363 [cit. 2021-04-16]. ISSN 1472-3646. Dostupné z: doi:10.1155/2005/859728

BARNHART, Elliott P., Kara Bowen DE LEÓN, Bradley D. RAMSAY, Alfred B. CUNNINGHAM a Matthew W. FIELDS, 2013. Investigation of coal-associated bacterial and archaeal populations from a diffusive microbial sampler (DMS). *International Journal of Coal Geology*. 115, 64-77. ISSN 01665162. DOI: 10.1016/j.coal.2013.03.006

BATTIN, Tom J., Anton WILLE, Birgit SATTLER a Roland PSENNER, 2001. Phylogenetic and Functional Heterogeneity of Sediment Biofilms along Environmental Gradients in a Glacial Stream. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(2), 799-807. ISSN 1098-5336.

BATTUMUR, Urantulkhuur, Young-Man YOON a Chang-Hyun KIM, 2016. Isolation and Characterization of a New Methanobacterium formicum KOR-1 from an Anaerobic Digester Using Pig Slurry. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* [online]. 29(4), 586-593 [cit. 2021-04-16]. ISSN 1011-2367. Dostupné z: doi:10.5713/ajas.15.0507

BECKMANN, Sabrina, Tillmann LUEDERS, Martin KRÜGER, Frederick VON NETZER, Bert ENGELEN a Heribert CYPIONKA, 2011. Acetogens and Acetoclastic Methanosarcinales Govern Methane Formation in Abandoned Coal Mines. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(11), 3749-3756. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02818-10

BERK, Holger a R. K. THAUER, 1997. Function of coenzyme F₄₂₀-dependent NADP reductase in methanogenic archaea containing an NADP-dependent alcohol dehydrogenase. *Archives of Microbiology*. 168(5), 396-402. DOI: 10.1007/s002030050514. ISSN 0302-8933.

BIBLER, Carol J, James S MARSHALL a Raymond C PILCHER, 1998. Status of worldwide coal mine methane emissions and use. *International Journal of Coal Geology* [online]. 35(1-4), 283-310 [cit. 2021-04-17]. ISSN 01665162. Dostupné z: doi:10.1016/S0166-5162(97)00038-4

BLEICHER, K., G. ZELLNER a J. WINTER, 1989. Growth of methanogens on cyclopentanol/CO₂ and specificity of alcohol dehydrogenase. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 59(3), 307-312 [cit. 2021-04-18]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.1989.tb03130.x

BOETIUS, Antje, Katrin RAVENSCHLAG, Carsten J. SCHUBERT, et al, 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* [online]. 407(6804), 623-626 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35036572

BONAGLIA, Stefano, Volker BRÜCHERT, Nolwenn CALLAC, Alessandra VICENZI, Ernest CHI FRU a Francisco J. A. NASCIMENTO, 2017. Methane fluxes from coastal sediments are enhanced by macrofauna. *Scientific Reports*. 7(1). ISSN 2045-2322. DOI:10.1038/s41598-017-13263-w

BONIN, A. & D. BOONE, 2006. The order Methanobacteriales. *In The Prokaryotes*. 3(3), 231–243. New York: Springer Verlag.

BORREL, Guillaume, Nicolas PARISOT, Hugh MB HARRIS, et al, 2014. Comparative genomics highlights the unique biology of Methanomassiliicoccales, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics* [online]. 15(1) [cit. 2021-04-18]. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2164-15-679

Brown, TA, 2010. *Gene Cloning and DNA Analysis, An Introduction. 6th edition.* 6th edn, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

BURKE, Stephen Anthony a Joseph Adrian KRZYCKI 1997. Reconstitution of Monomethylamine: Coenzyme M Methyl Transfer with a Corrinoid Protein and Two Methyltransferases Purified from *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 272(26), 16570-16577 [cit. 2021-04-18]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.272.26.16570

CLAYTON, J.L, 1998. Geochemistry of coalbed gas – A review. *International Journal of Coal Geology* [online]. 35(1-4), 159-173 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01665162. Dostupné z: doi:10.1016/S0166-5162(97)00017-7

CONRAD, Ralf, 2005. Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures: a review and a proposal. *Organic Geochemistry* [online]. 36(5), 739-752 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01466380. Dostupné z: doi:10.1016/j.orggeochem.2004.09.006

CONRAD, Ralf, Christoph ERKEL a Werner LIESACK, 2006. Rice Cluster I methanogens, an important group of Archaea producing greenhouse gas in soil. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 17(3), 262-267 [cit. 2021-04-18]. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2006.04.002

CONRAD, Ralf, 2009. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. *Environmental Microbiology Reports* [online]. 1(5), 285-292 [cit. 2021-04-18]. ISSN 17582229. Dostupné z: doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00038.x

ČESKÁ BIOPLYNOVÁ ASOCIACE, 2014. *Strategická výzkumná agenda oboru bioplyn* [online]. Dostupné z: http://www.czba.cz/files/ceska-bioplynovaasociace/uploads/files/SVA_CzBA_2014_FINAL.pdf

ČESKÁ REPUBLIKA. *Vyhláška č. 22/1989 Sb.: Vyhláška Českého báňského úřadu o bezpečnosti a ochraně zdraví při práci a bezpečnosti provozu při hornické činnosti a při činnosti*

prováděné hornickým způsobem v podzemí. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1989-22>

DANIELS, L., G. FUCHS, R. K. THAUER a J. G. ZEIKUS, 1977. Carbon Monoxide Oxidation by Methanogenic Bacteria. *Journal of Bacteriology* [online]. 132(1), 118-126 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.132.1.118-126.1977

DEPPENMEIER, U., V. MÜLLER a G. GOTTSCHALK, 1996. Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Archives of Microbiology* [online]. 165(3), 149-163 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/BF01692856

DOPITA M., HAVLENA V., PEŠEK J., 1985. *Ložiska fosilních paliv*. SNTL, 263.

DRIDI, Bédís, Marie-Laure FARDEAU, Bernard OLLIVIER, Didier RAOULT a Michel DRANCOURT, 2012. Methanomassiliicoccus luminyensis gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 62(Pt_8), 1902-1907 [cit. 2021-04-18]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.033712-0

Důl ČSA v Karviné. Zdař Bůh.cz, 2008-2020 [online]. [cit. 2021-04-19]. Dostupné z: <https://www.zdarbuh.cz/reviry/okd/dul-csa-v-karvine/>

Ecoprobe 5. *EkoTechnika: Přístroje pro environmentální diagnostiku* [online]. Česká republika [cit. 2021-04-21]. Dostupné z: <https://ekotechnika.cz/vyrobek/ecoprobe-5>

EINEN, Jørn, Ingunn H. THORSETH a Lise ØVREÅS, 2008. Enumeration of Archaea and Bacteria in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 282(2), 182-187 [cit. 2021-04-18]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01119.x

ELLERMANN, Joachim, Reiner HEDDERICH, Reinhard BOCHER a Rudolf K. THAUER, 1988. The final step in methane formation. Investigations with highly purified methyl-CoM reductase (component C) from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg). *European Journal of Biochemistry* [online]. 172(3), 669-677 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0014-2956. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1988.tb13941.x

ENZMANN, Franziska, Florian MAYER, Michael ROTHER a Dirk HOLTSMANN, 2018. *Methanogens: biochemical background and biotechnological applications*. *AMB Express* [online]. 8(1) [cit. 2021-04-22]. ISSN 2191-0855. Dostupné z: doi:10.1186/s13568-017-0531-x

ERKEL, C, 2006. Genome of Rice Cluster I Archaea--the Key Methane Producers in the Rice Rhizosphere. *Science* [online]. 313(5785), 370-372 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1127062

ERMLER, U., 1997. Crystal Structure of Methyl-Coenzyme M Reductase: The Key Enzyme of Biological Methane Formation. *Science* [online]. 278(5342), 1457-1462 [cit. 2021-04-18]. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.278.5342.1457

ETTWIG, Katharina F., Margaret K. BUTLER, Denis LE PASLIER, et al, 2010. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* [online]. 464(7288), 543-548 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature08883

FAIZ, M. a P. HENDRY, 2006. Significance of microbial activity in Australian coal bed methane reservoirs -- a review. *Bulletin of Canadian Petroleum Geology*. 54(3), 261-272. ISSN 0007-4802.

FAURE, Denis a Dominique JOLY, 2015. Next-generation sequencing as a powerful motor for advances in the biological and environmental sciences. *Genetica* [online]. 143(2), 129-132 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0016-6707. Dostupné z: doi:10.1007/s10709-015-9831-8

FALLGREN, Paul H., Cuiping ZENG, Zhiyong REN, Anhuai LU, Shijin REN a Song JIN, 2013. Feasibility of microbial production of new natural gas from non-gas-producing lignite. *International Journal of Coal Geology* [online]. 115, 79-84 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01665162. Dostupné z: doi:10.1016/j.coal.2013.03.003

FEI, Yang, Raymond L. JOHNSON, Mary GONZALEZ, Manouchehr HAGHIGHI a Kuna-korn POKALAI, 2018. Experimental and numerical investigation into nano-stabilized foams in low permeability reservoir hydraulic fracturing applications. *Fuel* [online]. 213, 133-143 [cit. 2021-04-18]. ISSN 00162361. Dostupné z: doi:10.1016/j.fuel.2017.10.095

FERGUSON, Donald J., Natalia GORLATOVA, David A. GRAHAME a Joseph A. KRZYCKI, 2000. Reconstitution of Dimethylamine: Coenzyme M Methyl Transfer with a Discrete Corrinoid Protein and Two Methyltransferases Purified from *Methanosarcina barkeri*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 275(37), 29053-29060 [cit. 2021-04-18]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M910218199

FERRY, James G., ed., 1993 *Methanogenesis* [online]. Boston, MA: Springer US, [cit. 2021-04-18]. ISBN 978-1-4613-6013-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4615-2391-8

FETZER, Silke, Friedhelm BAK a Ralf CONRAD, 1993. Sensitivity of methanogenic bacteria from paddy soil to oxygen and desiccation. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 12(2), 107-115 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01686496. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6941.1993.tb00022.x

FLORES, Romeo M., 2008. Microbes, methanogenesis, and microbial gas in coal. *International Journal of Coal Geology* [online]. 76(1-2), 1-2 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01665162. Dostupné z: doi:10.1016/j.coal.2008.04.008

FORMOLO, Michael, Anna MARTINI a Steven PETSCH, 2008. Biodegradation of sedimentary organic matter associated with coalbed methane in the Powder River and San Juan Basins, U.S.A. *International Journal of Coal Geology* [online]. 76(1-2), 86-97 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01665162. Dostupné z: doi:10.1016/j.coal.2008.03.005

FRICKE, Wolfgang F., Henning SEEDORF, Anke HENNE, Markus KRÜER, Heiko LIESEGANG, Reiner HEDDERICH, Gerhard GOTTSCHALK a Rudolf K. THAUER, 2006. The Genome Sequence of *Methanosphaera stadtmanae* Reveals Why This Human Intestinal Archaeon Is Restricted to Methanol and H₂ for Methane Formation and ATP Synthesis. *Journal of Bacteriology* [online]. 188(2), 642-658 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.188.2.642-658.2006

FRIMMER, Ursula a Friedrich WIDDEL, 1989. Oxidation of ethanol by methanogenic bacteria. *Archives of Microbiology* [online]. 152(5), 479-483 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/BF00446933

FUEX, A.N., 1980. Experimental evidence against an appreciable isotopic fractionation of methane during migration. *Physics and Chemistry of the Earth* [online]. 12, 725-732 [cit. 2021-04-18]. ISSN 00791946. Dostupné z: doi:10.1016/0079-1946(79)90153-8

GHYSELINCK, Jonas, Stefan PFEIFFER, Kim HEYLEN, Angela SESSITSCH, Paul DEVOS a Jacques RAVEL, 2013. The Effect of Primer Choice and Short Read Sequences on the Outcome of 16S rRNA Gene Based Diversity Studies. *PLoS ONE* [online]. 8(8) [cit. 2021-04-18]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0071360

GLIŃSKI, Jan, Józef HORABIK a Jerzy LIPIEC, 2011. Agrophysical Properties and Processes. *Encyclopedia of Agrophysics* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011-8-28, s. 35-35 [cit. 2021-04-18]. Encyclopedia of Earth Sciences Series. ISBN 978-90-481-3584-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-90-481-3585-1_10

HAIDER, Rizwan, Muhammad A. GHURI, John R. SANFILIPO, Elizabeth J. JONES, William H. OREM, Calin A. TATU, Kalsoom AKHTAR a Nasrin AKHTAR, 2013. Fungal degradation of coal as a pretreatment for methane production. *Fuel* [online]. 104, 717-725 [cit. 2021-04-18]. ISSN 00162361. Dostupné z: doi:10.1016/j.fuel.2012.05.015

HALLAM, S. J., 2004. Reverse Methanogenesis: Testing the Hypothesis with Environmental Genomics. *Science* [online]. 305(5689), 1457-1462 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1100025

HARRIS, Steve H., Richard L. SMITH a Charles E. BARKER, 2008. Microbial and chemical factors influencing methane production in laboratory incubations of low-rank subsurface coals. *International Journal of Coal Geology* [online]. 76(1-2), 46-51 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01665162. Dostupné z: doi:10.1016/j.coal.2008.05.019

HEMZA, Petr, Martin SIVEK a Jakub JIRÁSEK, 2009. Factors influencing the methane content of coal beds of the Czech part of the Upper Silesian Coal Basin, Czech Republic. *International Journal of Coal Geology* [online]. 79(1-2), 29-39 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01665162. Dostupné z: doi:10.1016/j.coal.2009.04.003

HINRICHS, Kai-Uwe, John M. HAYES, Sean P. SYLVA, Peter G. BREWER a Edward F. DELONG, 1999. Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments. *Nature* [online]. 398(6730), 802-805 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/19751

CHIN, Kuk-Jeong, Frederick A. RAINEY, Peter H. JANSSEN a Ralf CONRAD, 1998. Methanogenic Degradation of Polysaccharides and the Characterization of Polysaccharolytic Clostridia from Anoxic Rice Field Soil. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 21(2), 185-200 [cit. 2021-04-17]. ISSN 07232020. Dostupné z: doi:10.1016/S0723-2020(98)80023-4

ISAAC, Peter G., 2009. Essentials of nucleic acid analysis: a robust approach. *Annals of Botany* [online]. 104(2), vi-vi [cit. 2021-04-22]. ISSN 1095-8290. Dostupné z: doi:10.1093/aob/mcp135

JANDA, J. M. a S. L. ABBOTT, 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 45(9), 2761-2764 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01228-07

JELÍNEK, Antonín, 2001. *Hospodaření a manipulace s odpady ze zemědělství a venkovských sídel*. Praha: Agrospoj. Semafor. ISBN 80-239-4234-4.

JETTEN, M., 1992. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanothrix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 88(3-4), 181-197 [cit. 2021-04-18]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1097(92)90802-U

JONES, Elizabeth J.P., Mary A. VOYTEK, Peter D. WARWICK, Margo D. CORUM, Alexander COHN, Joseph E. BUNNELL, Arthur C. CLARK a William H. OREM, 2008. Bioassay for estimating the biogenic methane-generating potential of coal samples. *International Journal of Coal Geology* [online]. 76(1-2), 138-150 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01665162. Dostupné z: doi:10.1016/j.coal.2008.05.011

JONES, Elizabeth J.P., Steve H. HARRIS, Elliott P. BARNHART, et al, 2013. The effect of coal bed dewatering and partial oxidation on biogenic methane potential. *International Journal of Coal Geology* [online]. 115, 54-63 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01665162. Dostupné z: doi:10.1016/j.coal.2013.03.011

KENDALL, M. & D. BOONE, 2006. The order Methanosarcinales. *In The Prokaryotes*. 244–256. New York: Springer Verlag.

KIM, Mincheol a Jongsik CHUN, 2014. 16S rRNA Gene-Based Identification of Bacteria and Archaea using the EzTaxon Server. *New Approaches to Prokaryotic Systematics* [online]. Elsevier, s. 61-74 [cit. 2021-04-18]. Methods in Microbiology. ISBN 9780128001769. Dostupné z: doi:10.1016/bs.mim.2014.08.001

KIMURA, Hiroyuki, Hiroaki NASHIMOTO, Mikio SHIMIZU, Shohei HATTORI, Keita YAMADA, Keisuke KOBAYASHI, Naohiro YOSHIDA a Kenji KATO, 2010. Microbial methane production in deep aquifer associated with the accretionary prism in Southwest Japan. *The ISME Journal* [online]. 4(4), 531-541 [cit. 2021-04-18]. ISSN 1751-7362. Dostupné z: doi:10.1038/ismej.2009.132

KING, Robert C., William D. STANSFIELD a Pamela Khipple MULLIGAN, 2006. *A Dictionary of Genetics*. New York: Oxford University Press. ISBN 9780195307610.

KNITTEL, Katrin, Tina SEKANN, Antje BOETIUS, Renate KORT a Rudolf AMANN, 2005. Diversity and Distribution of Methanotrophic Archaea at Cold Seeps. *Applied and*

Environmental Microbiology [online]. 71(1), 467-479 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.71.1.467-479.2005

KOTARBA, Maciej J. a Dudley D. RICE, 2001. Composition and origin of coalbed gases in the Lower Silesian basin, southwest Poland. *Applied Geochemistry* [online]. 16(7-8), 895-910 [cit. 2021-04-18]. ISSN 08832927. Dostupné z: doi:10.1016/S0883-2927(00)00058-5

KRÁTKÝ, L. a JIROUT, T., 2015. *Moderní trendy předúprav biomasy*. Praha : České vysoké učení technické. ISBN 978-80-01-05720-9.

KRÜGER, Martin, Sabrina BECKMANN, Bert ENGELN, Thomas THIELEMANN, Bernhard CRAMER, Axel SCHIPPERS a Heribert CYPIONKA, 2008. Microbial Methane Formation from Hard Coal and Timber in an Abandoned Coal Mine. *Geomicrobiology Journal* [online]. 25(6), 315-321 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0149-0451. Dostupné z: doi:10.1080/01490450802258402

KUMAR, Manish, Raghvendra SAXENA, Rajesh Singh TOMAR, Pankaj K. RAI a Diby PAUL, 2018. ROLE OF METHYLOTROPHIC BACTERIA IN CLIMATE CHANGE MITIGATION. KASHYAP, Prem Lal, Alok Kumar SRIVASTAVA, Shree Prakash TIWARI a Sudheer KUMAR, ed. *Microbes for Climate Resilient Agriculture* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2017-12-15, s. 149-164 [cit. 2021-04-18]. ISBN 9781119276050. Dostupné z: doi:10.1002/9781119276050.ch7

LAB Guide: Klonování.: 2014-2019. Dostupné také z: <https://labguide.cz/metody/klonovani/>

LAB Guide: Real-time PCR.:2014-2019. Dostupné také z: <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>

LAI, Chun-Yu, Liang ZHONG, Yin ZHANG, et al., 2016. Bioreduction of Chromate in a Methane-Based Membrane Biofilm Reactor. *Environmental Science & Technology* [online]. 50(11), 5832-5839 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.5b06177

LEADBETTER, J R a J A BREZNAK, 1996. Physiological ecology of *Methanobrevibacter cuticularis* sp. nov. and *Methanobrevibacter curvatus* sp. nov., isolated from the hindgut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Applied and environmental microbiology* [online]. 62(10), 3620-3631 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.62.10.3620-3631.1996

- LILLEY, M. D., M. A. DE ANGELIS a E. J. OLSON, 2017. Methane concentrations and estimated fluxes from Pacific Northwest rivers. *SIL Communications*, 1953-1996 [online]. 25(1), 187-196 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0538-4680. Dostupné z: doi:10.1080/05384680.1996.11904080
- LIU, Yuan, Xiaoyu LIU, Kun CHENG, Lianqing LI, Xuhui ZHANG, Jufeng ZHENG, Jinwei ZHENG a Genxing PAN, 2016. Responses of Methanogenic and Methanotrophic Communities to Elevated Atmospheric CO₂ and Temperature in a Paddy Field. *Frontiers in Microbiology* [online]. 7 [cit. 2021-04-16]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.01895
- LIU, Yuchen a William B. WHITMAN, 2008. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 1125(1), 171-189 [cit. 2021-04-17]. ISSN 00778923. Dostupné z: doi:10.1196/annals.1419.019
- LOWE, David C., 2006. A green source of surprise. *Nature* [online]. 439(7073), 148-149 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/439148a
- LUEDERS, Tillmann, Kuk-Jeong CHIN, Ralf CONRAD a Michael FRIEDRICH, 2001. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environmental Microbiology* [online]. 3(3), 194-204 [cit. 2021-04-18]. ISSN 1462-2912. Dostupné z: doi:10.1046/j.1462-2920.2001.00179.x
- LUO, Fei, Cheryl E. DEVINE a Elizabeth A. EDWARDS, 2016. Cultivating microbial dark matter in benzene-degrading methanogenic consortia. *Environmental Microbiology* [online]. 18(9), 2923-2936 [cit. 2021-04-17]. ISSN 14622912. Dostupné z: doi:10.1111/1462-2920.13121
- LUTON, Philip E., Jonathan M. WAYNE, Richard J. SHARP a Paul W. RILEY, 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill b bThe GenBank accession numbers for the *mcrA* sequences reported in this paper are AF414034–AF414051 (see Fig. 2) and AF414007–AF414033 (environmental isolates in Fig. 3). *Microbiology* [online]. 148(11), 3521-3530 [cit. 2021-04-18]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-148-11-3521

LUEDERS, Tillmann, Kuk-Jeong CHIN, Ralf CONRAD a Michael FRIEDRICH, 2001. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environmental Microbiology* [online]. 3(3), 194-204 [cit. 2021-04-18]. ISSN 1462-2912. Dostupné z: doi:10.1046/j.1462-2920.2001.00179.x

GARCIA, Jean-Louis, Bharat K.C PATEL a Bernard OLLIVIER, 2000. Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. *Anaerobe* [online]. 6(4), 205-226 [cit. 2021-04-18]. ISSN 10759964. Dostupné z: doi:10.1006/anae.2000.0345

GARCIA, J.-L., B. OLLIVIER & W. WHITMAN, 2006. The order Methanomicrobiales. In *The Prokaryotes*. 2006, 208–230. New York: Springer Verlag.

Greenhouse Gas Emissions. *EPA: United States Environmental Protection Agency* [online]. [cit. 2021-04-21]. Dostupné z: <https://www.epa.gov/>

HALLAM, Steven J., Peter R. GIRGUIS, Christina M. PRESTON, Paul M. RICHARDSON a Edward F. DELONG, 2003. Identification of Methyl Coenzyme M Reductase A (*mcrA*) Genes Associated with Methane-Oxidizing Archaea. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 69(9), 5483-5491 [cit. 2021-04-16]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.69.9.5483-5491.2003

HALES, B A, C EDWARDS, D A RITCHIE, G HALL, R W PICKUP a J R SAUNDERS, 1996. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied and environmental microbiology* [online]. 62(2), 668-675 [cit. 2021-04-16]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.62.2.668-675.1996

HAO, B., 1991. A New UAG-Encoded Residue in the Structure of a Methanogen Methyltransferase. *Science* [online]. 296(5572), 1462-1466 [cit. 2021-04-18]. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1069556

HARRIS, Steve H., Richard L. SMITH a Charles E. BARKER, 2008. Microbial and chemical factors influencing methane production in laboratory incubations of low-rank subsurface coals. *International Journal of Coal Geology* [online]. 76(1-2), 46-51 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01665162. Dostupné z: doi:10.1016/j.coal.2008.05.019

HEDDERICH R, Whitman WB., 2006. Physiology and biochemistry of the methane-producing Archaea. In *The prokaryotes*. 3. (1050–79).

HESS, M., A. SCZYRBA, R. EGAN, et al., 2011. Metagenomic Discovery of Biomass-Degrading Genes and Genomes from Cow Rumen. *Science* [online]. 331(6016), 463-467 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1200387

CHABAN, Bonnie, Sandy Y.M NG a Ken F JARRELL, 2006. Archaeal habitats — from the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 52(2), 73-116 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0008-4166. Dostupné z: doi:10.1139/w05-147

CHAUDHARY, Prem Prashant, Nadia GACI, Guillaume BORREL, Paul W. O'TOOLE a Jean-François BRUGÈRE, 2015. Molecular methods for studying methanogens of the human gastrointestinal tract: current status and future directions. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 99(14), 5801-5815 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-015-6739-2

IINO, Takao, Hideyuki TAMAKI, Satoshi TAMAZAWA, Yoshiyuki UENO, Moriya OHKUMA, Ken-ichiro SUZUKI, Yasuo IGARASHI a Shin HARUTA, 2013. Candidatus Methanogranum caenicola: a Novel Methanogen from the Anaerobic Digested Sludge, and Proposal of Methanomassiliicoccaceae fam. nov. and Methanomassiliicoccales ord. nov., for a Methanogenic Lineage of the Class Thermoplasmata. *Microbes and Environments* [online]. 28(2), 244-250 [cit. 2021-04-18]. ISSN 1342-6311. Dostupné z: doi:10.1264/jsme2.ME12189

IPCC, 2013: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.

JETTEN, Mike S.M., STAMS Alfons J.M., ZEHNDER Alexander J.B., 1992. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotheroxobacter* and *Methanosarcina* spp., *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 8, Issue 3-4, June 1992, Pages 181–197, DOI: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb04987.x

KARACAN, C. Özgen, Felicia A. RUIZ, Michael COTÈ a Sally PHIPPS, 2011. Coal mine methane: A review of capture and utilization practices with benefits to mining safety and to greenhouse gas reduction. *International Journal of Coal Geology* [online]. 86(2-3), 121-156 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01665162. Dostupné z: doi:10.1016/j.coal.2011.02.009

- KOTARBA, Maciej J. a Jerry L. CLAYTON, 2003. A stable carbon isotope and biological marker study of Polish bituminous coals and carbonaceous shales. *International Journal of Coal Geology* [online]. 55(2-4), 73-94 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01665162. Dostupné z: doi:10.1016/S0166-5162(03)00082-X
- KRZYCKI, Joseph A., 2005. The direct genetic encoding of pyrrolysine. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 8(6), 706-712 [cit. 2021-04-18]. ISSN 13695274. Dostupné z: doi:10.1016/j.mib.2005.10.009
- KUMAR, Manish, Rajesh Singh TOMAR, Harshad LADE a Diby PAUL, 2016. Methylo-trophic bacteria in sustainable agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 32(7) [cit. 2021-04-18]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-016-2074-8
- KURR, Margit, Robert HUBER, Helmut KONIG, Holger W. JANNASCH, Hans FRICKE, Antonio TRINCONE, Jakob K. KRISTJANSSON a Karl O. STETTER, 1991. Methanopyrus kandleri, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Archives of Microbiology* [online]. 156(4), 239-247 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/BF00262992
- LESSNER, D. J., L. LI, Q. LI, et al., 2006 An unconventional pathway for reduction of CO₂ to methane in CO-grown Methanosarcina acetivorans revealed by proteomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 103(47), 17921-17926 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0608833103
- LI, Lingyun, Qingbo LI, Lars ROHLIN, et al., 2007. Quantitative Proteomic and Microarray Analysis of the Archaeon Methanosarcina acetivorans Grown with Acetate versus Methanol. *Journal of Proteome Research* [online]. 6(2), 759-771 [cit. 2021-04-18]. ISSN 1535-3893. Dostupné z: doi:10.1021/pr0603831
- LIU, Yuchen a William B. WHITMAN, 2008. Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic Archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 1125(1), 171-189 [cit. 2021-04-18]. ISSN 00778923. Dostupné z: doi:10.1196/annals.1419.019
- LOCK, Marc, 1993. Attached microbial communities in rivers. In: *Aquatic microbiology – an ecological approach* (TE Ford, ed.), 113-138. Blackwell, Oxford, UK.

LUO, Gang, Ioannis A. FOTIDIS a Irini ANGELIDAKI, 2016. Comparative analysis of taxonomic, functional, and metabolic patterns of microbiomes from 14 full-scale biogas reactors by metagenomic sequencing and radioisotopic analysis. *Biotechnology for Biofuels* [online]. 9(1) [cit. 2021-04-18]. ISSN 1754-6834. Dostupné z: doi:10.1186/s13068-016-0465-6

MAHAPATRA, Anirban, Asmita PATEL, Jitesh A. SOARES, Ross C. LARUE, Jun Kai ZHANG, William W. METCALF a Joseph A. KRZYCKI, 2006. Characterization of a *Methanosarcina acetivorans* mutant unable to translate UAG as pyrrolysine. *Molecular Microbiology* [online]. 59(1), 56-66 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0950-382X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04927.x

MAXAM, A. M. a W. GILBERT, 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(2), 560-564. ISSN 0027-8424.

MILICKA, J., MASSAULT, M., FRANCU, J., 1994. CARBON AND HYDROGEN ISOTOPES IN FOUR NATURAL GASES FROM THE SLOVAK AND CZECH PART OF THE VIENNA BASIN. In *Geologica Carpathica*, vol. 45, no.6, pp. 379-382.

MCHUGH, Sharon, Micheal CARTON, Tharase MAHONY a Vincent O'FLAHERTY, 2003. Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 219(2), 297-304 [cit. 2021-04-17]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-1097(03)00055-7

MILLER, Terry L. a Meyer J. WOLIN, 1985. *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Archives of Microbiology* [online]. 141(2), 116-122 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/BF00423270

NARIHIRO, Takashi a Yuji SEKIGUCHI, 2011. Oligonucleotide primers, probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea. *Microbial Biotechnology* [online]. 4(5), 585-602 [cit. 2021-04-16]. ISSN 17517915. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-7915.2010.00239.x

NOLAN T., 2014. *A Technical Guide: PCR TECHNOLOGIES* [online]. Sigma-Aldrich Co. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/pcr-technologies-guide.pdf

O'BRIEN, J M, R H WOLKIN, T T MOENCH, J B MORGAN a J G ZEIKUS, 1984. Association of hydrogen metabolism with unitrophic or mixotrophic growth of *Methanosarcina barkeri* on carbon monoxide. *Journal of Bacteriology* [online]. 158(1), 373-375 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.158.1.373-375.1984

OKD: *Uhlí: tradiční zdroj energie*. Stonava, ročník 2012. Dostupné také z: <https://www.okd.cz/cs/tezime-uhli/uhli-tradicni-zdroj-energie/slozeni-uhli>

O'KEEFE, Jennifer M.K., Achim BECHTEL, Kimon CHRISTANIS, et al., 2013. On the fundamental difference between coal rank and coal type. *International Journal of Coal Geology* [online]. 118, 58-87 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01665162. Dostupné z: doi:10.1016/j.coal.2013.08.007

PCR, 2016. *BioNinja* [online]. [cit. 2021-04-19]. Dostupné z: <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/pcr.html>

PORTER, Karen G. a Yvette S. FEIG, 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* [online]. 25(5), 943-948 [cit. 2021-04-18]. ISSN 00243590. Dostupné z: doi:10.4319/lo.1980.25.5.0943

PRATHER, M. & D. EHHALT, 2001. Atmospheric chemistry and greenhouse gases. In *Climate Change 2001: The Scientific Basis*. J.T. HOUGHTON et al., Eds.: 239–287. Cambridge: Cambridge University Press. ISBN 0521 80767 0.

PROKOP, Pavel a Pavel ZAPLETAL, 2013. *Větrání dolů a lomů*. Ostrava: Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava. ISBN 978-80-248-3295-1.

PYZIK, Adam, Martyna CIEZKOWSKA, Pawel S. KRAWCZYK, Adam SOBCZAK, Lukasz DREWNIAK, Andrzej DZIEMBOWSKI a Leszek LIPINSKI, 2018. Comparative analysis of deep sequenced methanogenic communities: identification of microorganisms responsible for methane production. *Microbial Cell Factories* [online]. 17(1) [cit. 2021-04-18]. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-018-1043-3

RICE, D. D., 1993. *Composition and origins of coalbed gas: Hydrocarbons from coal*, *AAPG Studies in Geology*, 38, 159–184.

RITTER, Daniel, David VINSON, Elliott BARNHART, Denise M. AKOB, Matthew W. FIELDS, Al B. CUNNINGHAM, William OREM a Jennifer C. MCINTOSH, 2015. Enhanced microbial coalbed methane generation: A review of research, commercial activity, and

remaining challenges. *International Journal of Coal Geology* [online]. 146, 28-41 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01665162. Dostupné z: doi:10.1016/j.coal.2015.04.013

ROBERTSON, Julia, Cushla MCGOVERIN, Frédérique VANHOLSBEECK a Simon SWIFT, 2019. Optimisation of the Protocol for the LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit for Rapid Determination of Bacterial Load. *Frontiers in Microbiology* [online]. 10 [cit. 2021-04-18]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.00801

ROGERS-BROADWAY, KARLY-RAI a EMMANOUIL KARTERIS, 2015. Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: Current landscape and future perspectives. *Experimental and Therapeutic Medicine* [online]. 10(4), 1261-1264 [cit. 2021-04-18]. ISSN 1792-0981. Dostupné z: doi:10.3892/etm.2015.2712

ROTARU, Amelia-Elena, Pravin Malla SHRESTHA, Fanghua LIU, et al., 2014. A new model for electron flow during anaerobic digestion: direct interspecies electron transfer to *Methanosaeta* for the reduction of carbon dioxide to methane. *Energy Environ. Sci* [online]. 7(1), 408-415 [cit. 2021-04-18]. ISSN 1754-5692. Dostupné z: doi:10.1039/C3EE42189A

RULÍK, Martin, 2011. *Mikrobiální biofilmy*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-2747-8.

RUTZ, Dominik, Rita MERGNER a Rainer JANSSEN, 2012. *Sustainable Heat Use of Biogas Plants: A Handbook*. 2. Munchen: WIP Renewable Energies. ISBN 978-936338-35-5.

SAKAI, S., H. IMACHI, S. HANADA, A. OHASHI, H. HARADA a Y. KAMAGATA, 2008. *Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord. nov. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 58(4), 929-936. Dostupné z: doi: 10.1099/ijs.0.65571-0. ISSN 1466-5026.

SANGER, F. a A.R. COULSON, 1977. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*. 94(3), 441-448. ISSN 00222836.

SAUER, Karin, Ulrike HARMS a Rudolf K. THAUER, 1997. Methanol: Coenzyme M Methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Purification, Properties and Encoding Genes of the Corrinoid Protein MT1. *European Journal of Biochemistry*. 243(3), 670-677. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00670.x. ISSN 0014-2956.

SCOTT, Andrew R., 1999. Improving coal gas recovery with microbially enhanced coalbed methane. Coalbed methane: scientific, environmental and economic evaluation. *Springer*, pp. 89–110. ISBN 9789401710626

SCOTT, Andrew R., 2002. Hydrogeologic factors affecting gas content distribution in coal beds. *International Journal of Coal Geology*. 50(1-4), 363-38. ISSN 01665162. Dostupné z: doi: 10.1016/S0166-5162(02)00135-0

SEKHOHOLA, Lerato M., Eric E. IGBINIGIE a A. Keith COWAN, 2013. Biological degradation and solubilisation of coal. *Biodegradation*. 24(3), 305-318. ISSN 0923-9820. Dostupné z: doi:10.1007/s10532-012-9594-1

SHEN, Yanan, Roger BUICK a Donald E. CANFIELD, 2001. Isotopic evidence for microbial sulphate reduction in the early Archaean era. *Nature* [online]. 410(6824), 77-81 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35065071

SCHLEGEL, Melissa E., Jennifer C. MCINTOSH, Steven T. PETSCH, William H. OREM, Elizabeth J.P. JONES a Anna M. MARTINI, 2013. Extent and limits of biodegradation by in situ methanogenic consortia in shale and formation fluids. *Applied Geochemistry* [online]. 28, 172-184 [cit. 2021-04-18]. ISSN 08832927. Dostupné z: doi:10.1016/j.apgeochem.2012.10.008

SINGH-WISSMANN, K. and FERRY, J. G., 1995. Transcriptional regulation of the phosphotransacetylase-encoding and acetate kinase-encoding genes (pta and ack) from *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* 177: 1699–1702.

SINGH, Anu, Meenakshi CHOUDHARY, M.P. SINGH, H.N. VERMA, Surinder P. SINGH a Kavita ARORA, 2015. DNA Functionalized Direct Electro-deposited Gold nanoaggregates for Efficient Detection of Salmonella typhi. *Bioelectrochemistry* [online]. 105, 7-15 [cit. 2021-04-18]. ISSN 15675394. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioelechem.2015.03.005

SMITH, Kerry S. a Cheryl INGRAM-SMITH, 2007. Methanosaeta, the forgotten methanogen? *Trends in Microbiology*. 15(4), 150-155. Dostupné z: doi: 10.1016/j.tim.2007.02.002. ISSN 0966842X.

SPRENGER, W. W., M. C. VAN BELZEN, J. ROSENBERG, J. HACKSTEIN a J. T. KELTJENS, 2000. Methanomicrococcus blatticola gen. nov., sp. nov., a methanol- and me-

thylamine-reducing methanogen from the hindgut of the cockroach *Periplaneta americana*. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 50(6), 1989-1999. Dostupné z: doi: 10.1099/00207713-50-6-1989. ISSN 1466-5026.

SPRENGER, Wander W., Johannes H.P. HACKSTEIN a Jan T. KELTJENS, 2007. The competitive success of *Methanomicrococcus blatticola*, a dominant methylotrophic methanogen in the cockroach hindgut, is supported by high substrate affinities and favorable thermodynamics. *FEMS Microbiology Ecology*. 60(2), 266-275. Dostupné z: doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00287.x. ISSN 01686496.

STADTMAN, Thressa C. a H. A. BARKER, 1951. STUDIES ON THE METHANE FERMENTATION X. *Journal of Bacteriology* [online]. 62(3), 269-280 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.62.3.269-280.1951

STEINBERG, Lisa M. a John M. REGAN, 2009. McrA-Targeted Real-Time Quantitative PCR Method To Examine Methanogen Communities. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 75(13), 4435-4442 [cit. 2021-04-16]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.02858-08

STOLZE, Yvonne, Martha ZAKRZEWSKI, Irena MAUS, et al., 2015. Comparative metagenomics of biogas-producing microbial communities from production-scale biogas plants operating under wet or dry fermentation conditions. *Biotechnology for Biofuels*. 8(1). Dostupné z: doi: 10.1186/s13068-014-0193-8. ISSN 1754-6834.

STRĄPOĆ, Dariusz, Maria MASTALERZ, Katherine DAWSON, Jennifer MACALADY, Amy V. CALLAGHAN, Boris WAWRIK, Courtney TURICH a Matthew ASHBY, 2011. Biogeochemistry of Microbial Coal-Bed Methane. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. 39(1), 617-656. Dostupné z: doi: 10.1146/annurev-earth-040610-133343. ISSN 0084-6597.

TAO, Mingxin, Baoguang SHI, Jinying LI, Wanchun WANG, Xiaobin LI a Bo GAO, 2007. Secondary biological coalbed gas in the Xinji area, Anhui province, China: Evidence from the geochemical features and secondary changes. *International Journal of Coal Geology* [online]. 71(2-3), 358-370 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01665162. Dostupné z: doi:10.1016/j.coal.2006.12.002

TEH, Y. L. , ZINDER, S., 1992. Acetyl-coenzyme A synthetase in the thermophilic, acetate-utilizing methanogen *Methanotrix* sp. strain CALS-1, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 98, Issue 1-3, November 1992, Pages 1–7, Dostupné z: doi: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05481.x

THAUER, R. K., 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology*. 144(9), 2377-2406. Dostupné z: doi: 10.1099/00221287-144-9-2377. ISSN 1350-0872.

Tenza: Bioplynové stanice, 2021. *TENZA* [online]. Dostupné z: <http://www.tenza.cz/cz/aktivita/energetika/energeticke-stavby/bioplynove-stanice/>

Těžba a využití černého uhlí: *Vznik uhlí.*: . ročník 2011. Dostupné také z: <https://tezba-a-vyuziti-cerneho-uhli.webnode.cz/uhli/vznik/>

THAUER, Rudolf K., Anne-Kristin KASTER, Henning SEEDORF, Wolfgang BUCKEL a Reiner HEDDERICH, 2008. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*. 6(8), 579-591 . Dostupné z: doi: 10.1038/nrmicro1931. ISSN 1740-1526.

THAUER, R K, D M ZINKHAN a A M SPORMANN, 1989. Biochemistry of Acetate Catabolism in Anaerobic Chemotrophic Bacteria. *Annual Review of Microbiology* [online]. 43(1), 43-67 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0066-4227. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.mi.43.100189.000355

THIELEMANN, Thomas, Bernhard CRAMER a Axel SCHIPPERS, 2004. Coalbed methane in the Ruhr Basin, Germany: a renewable energy resource? *Organic Geochemistry* [online]. 35(11-12), 1537-1549 [cit. 2021-04-18]. ISSN 01466380. Dostupné z: doi:10.1016/j.orggeochem.2004.05.004

TIMMERS, Peer H. A., Cornelia U. WELTE, Jasper J. KOEHORST, Caroline M. PLUGGE, Mike S. M. JETTEN a Alfons J. M. STAMS, 2017. Reverse Methanogenesis and Respiration in Methanotrophic Archaea. *Archaea* [online]. 2017, 1-22 [cit. 2021-04-16]. ISSN 1472-3646. Dostupné z: doi:10.1155/2017/1654237

USEPA, 2006. *Global Anthropogenic Non-CO2 Greenhouse Gas Emissions: 1990–2020*. EPA-430-R-06-003, United States Environment Protection Agency, Climate Change Division, Washington, DC, 274 pp.

United States Environmental Protection Agency, 1994a. International Anthropogenic Methane Emissions: Estimates for 1990. US Env. Protection Agency, EPA 230-R-93-010.

WALLACE, R. John, John A. ROOKE, Nest MCKAIN, et al., 2015. The rumen microbial metagenome associated with high methane production in cattle. *BMC Genomics*. 16(1). Dostupné z: doi: 10.1186/s12864-015-2032-0. ISSN 1471-2164.

WANG, Han, Ioannis A. FOTIDIS, Irimi ANGELIDAKI a Alfons STAMS, 2015. Ammonia effect on hydrogenotrophic methanogens and syntrophic acetate-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 91(11). ISSN 1574-6941.

WEIMER, P. J. a J. G. ZEIKUS, 1978. One carbon metabolism in methanogenic bacteria. *Archives of Microbiology* [online]. 119(1), 49-57 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/BF00407927

WHITICAR, Michael J., 1999. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chemical Geology*. 161(1-3), 291-314. Dostupné z: doi: 10.1016/S0009-2541(99)00092-3. ISSN 00092541

WHITMAN, W.B. et al., 2001. Taxonomy of methanogenic archaea. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, D.R. BOONE, R.W. CASTENHOLTZ & G.M. GARRITY, Vol. 1. Eds.: 211–213. New York: Springer.

WHITMAN, W., T. BOWEN & D. BOONE, 2006. The methanogenic bacteria. In *The Prokaryotes*, Vol. 3, 3rd ed. M. Dworkin, et al., Eds.: 165–207. New York: Springer Verlag.

WHITMAN, W. & C. JEANTHON, 2006. Methanococcales. In *The Prokaryotes*, Vol. 3, 3rd ed. M. Dworkin, et al., Eds.: 257–273. New York: Springer Verlag.

WIDDEL, Friedrich, 1986. Growth of Methanogenic Bacteria in Pure Culture with 2-Propanol and Other Alcohols as Hydrogen Donors. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 51(5), 1056-1062 [cit. 2021-04-18]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.51.5.1056-1062.1986

WIDDEL, F., P.E. ROUVIERE & R.S. WOLFE., 1988. Classification of secondary alcohol-utilizing methanogens including a new thermophilic isolate. *Arch. Microbiol.* 150: 477–481.

YAGI, Kazuyuki, Haruo TSURUTA a Katsuyuki MINAMI, 1997. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* [online]. 49(1/3), 213-220 [cit. 2021-04-18]. ISSN 13851314. Dostupné z: doi:10.1023/A:1009743909716

YANG, Ying, Ke YU, Yu XIA, Frankie T. K. LAU, Daniel T. W. TANG, Wing Cheong FUNG, Herbert H. P. FANG a Tong ZHANG, 2014. Metagenomic analysis of sludge from full-scale anaerobic digesters operated in municipal wastewater treatment plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(12), 5709-5718. Dostupné z: doi: 10.1007/s00253-014-5648-0. ISSN 0175-7598.

YATES, Marylynn V., Cindy H. NAKATSU, Robert V. MILLER a Suresh D. PILLAI, ed., 2016. *Manual of Environmental Microbiology* [online]. Washington, DC, USA: ASM Press [cit. 2021-04-22]. ISBN 9781683670742. Dostupné z: doi:10.1128/9781555818821

YEKEEN, Nurudeen, Eswaran PADMANABHAN a Ahmad Kamal IDRIS, 2018. A review of recent advances in foam-based fracturing fluid application in unconventional reservoirs. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 66, 45-74. ISSN 1226086X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jiec.2018.05.039

ZAZZERI, Giulia, Dave LOWRY, Rebecca E. FISHER, et al., 2016. Carbon isotopic signature of coal-derived methane emissions to the atmosphere: from coalification to alteration. *Atmospheric Chemistry and Physics* [online]. 16(21), 13669-13680 [cit. 2021-04-16]. ISSN 1680-7324. Dostupné z: doi:10.5194/acp-16-13669-2016

ZHANG, Jicheng, Leilei SI, Junguo CHEN, Mehmet KIZIL, Chunguang WANG a Zhongwei CHEN, 2020. Stimulation Techniques of Coalbed Methane Reservoirs. *Geofluids*. 1-23. ISSN 1468-8115. Dostupné z: doi:10.1155/2020/5152646

ZINDER, S.H., 1993. Physiological ecology of methanogens. In *Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics*. J.G. FERRY, Ed.: 128–206. New York: Chapman & Hall. ISSN 978-1-4615-2391-8.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	Adenin
AOM	Anaerobní oxidace methanu
ANME	Anaerobní methan oxidující <i>Archaea</i>
bp	počet párů bází
CH ₄	Methan
CO ₂	Oxid uhličitý
Ct	Cyklus, kdy dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí
DAPI	2-(4-amidinofenyl)-1H-indol-6-carboxamidin
ddNTP	dideoxynukleotid
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
E _h	Oxidačně-redukční potenciál
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí
FISH	fluorescenční in-situ hybridizace
MCR	Methyl-koenzym M reduktáza
mV	Milivolt
NGS	Next Generation Sequencing
PCR	Polymerázová řetězová reakce
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RFLP	Polymorfismus restrikčních fragmentů
rRNA	Ribozomální RNA
SRB	Sulfát redukující bakterie
T	Thymin
TAE	Tris-acetát-EDTA

TCD/FID	Plynová chromatografie s tepelně vodivostním/plamenoionizačním detektorem
TIC	Celkový anorganický uhlík
TOC	Celkový organický uhlík
TS	Celková síra

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma bioplynové stanice (Tenza, 2021).....	14
Obrázek 2 Složení uhlí (OKD, 2012)	22
Obrázek 3 Typy uhlí podle stupně přeměny (OKD, 2012).....	23
Obrázek 4 Mechanismus tvorby uhlí z rostlinného materiálu (Těžba a využití černého uhlí, 2011)	24
Obrázek 5 Struktura MCR (Ermler a kol., 1997)	26
Obrázek 6 DAPI (2-(4-amidinofenyl)-1H-indol-6-carboxamidin)	31
Obrázek 7 Schéma průběhu PCR (upraveno podle BioNinja)	32
Obrázek 8 Jednotlivé fáze qPCR (LabGuide, 2019).....	33
Obrázek 9 Využití křivky tání k odlišení specifických a nespecifických produktů (LabGuide, 2019)	34
Obrázek 10 Schematické znázornění průběhu klonování (LabGuide, 2019)	36
Obrázek 11 Schematické znázornění průběhu FISH (Abnova, 2021).....	38
Obrázek 12 Test primerů a) 931f a 1100r b) mlas a mcrA-rev.....	63
Obrázek 13 Test primerů a) ME3MF a ME2r b) ME3MFe a ME2r	64
Obrázek 14 Amplifikační křivka s využitím primerů 931f a m1100r	64
Obrázek 15 Amplifikační křivka s využitím primerů mlas a mcrA-rev	65
Obrázek 16 Amplifikační křivka vzorku anaerobního kalu s použitím primerů mlas a mcrA-rev	66
Obrázek 17 Stellar™ Competent Cells + plazmid s vloženým sledovaným úsekem genu mcrA.	76
Obrázek 18 Výsledné standardní křivky vzniklé sériovým naředěním plazmidové DNA a provedením qPCR.....	76
Obrázek 19 Standardní křivka qPCR pro absolutní kvantifikaci.....	77
Obrázek 20 Kalibrační křivka pro stanovení počtu kopií úseku genu mcrA ve vzorcích	78
Obrázek 21 Počet kopií genu mcrA v 1 ml důlní vody nebo 1 g černého uhlí.....	80
Obrázek 22 Počet kopií genu mcrA v 1 ml důlní vody nebo 1 g hnědého uhlí.....	81
Obrázek 23 Srovnání počtu kopií genu mcrA v kapalných vzorcích hnědého uhlí (modře) a černého uhlí (červeně)	82
Obrázek 24 Počet kopií genu mcrA v environmentálních vzorcích dodaných ČGS..	84

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Zdroje globálních emisí methanu (modifikováno dle Lowe, 2006; Prather a Ehhalt, 2001)	12
Tabulka 2 Složky bioplynu a jejich procentuální zastoupení (převzato z Jelínek, 2001)	13
Tabulka 3 Využití bioplynu a jeho aplikace, převzato z Krátký a Jirout, 2015.....	15
Tabulka 4 Výskyt methanogenů v přírodě (modifikováno podle Liu a Whitman, 2008)	18
Tabulka 5 Typy reakcí během methanogeneze v závislosti na substrátu a organismu (modifikováno dle Hedderich a Whitman, 2006; Zinder, 1993).....	20
Tabulka 6 Vybrané sady primerů k detekci genu <i>mcrA</i>	52
Tabulka 7 Sbírkové kmeny vybrané pro test primerů.....	52
Tabulka 8 Složení PCR směsi.....	53
Tabulka 9 Nastavení touch down PCR	53
Tabulka 10 Nastavení druhého kroku PCR	54
Tabulka 11 Složení qPCR směsi.....	55
Tabulka 12 Nastavení programu qPCR	56
Tabulka 13 Složení PCR směsi environmentální vzorky dodané ČGS	57
Tabulka 14 Nové originální primery pro kvantifikaci počtu kopií sledovaného genu	57
Tabulka 15 Specificky značená DNA próba.....	58
Tabulka 16 Složení reakční směsi qPCR s použitím specifické DNA próby.....	58
Tabulka 17 Nastavení programu qPCR s použitím specifické DNA próby	58
Tabulka 18 Složení reakční směsi	60
Tabulka 19 Naměřené hodnoty koncentrace vyizolované DNA ve vzorcích černého uhlí.....	66
Tabulka 20 Naměřené hodnoty koncentrace vyizolované DNA ve vzorcích hnědého uhlí.....	67
Tabulka 21 Výsledky qPCR se vzorky černého, hnědého uhlí a důlní vody.....	69
Tabulka 22 Výsledky qPCR se vzorky černého uhlí s použitím specifických DNA prób	71
Tabulka 23 Výsledky qPCR se vzorky hnědého uhlí s použitím specifických DNA prób.....	72

Tabulka 24 Naměřené hodnoty koncentrace vzorků dodaných ČGS	74
Tabulka 25 Vyhodnocení qPCR pro vodné fáze a sedimenty.	75
Tabulka 26 Počet kopií genu mcrA v pozitivních vzorcích černého uhlí. Přepočteno na počet kopií genu v 1 ml (důlní voda) nebo 1 g (uhlí, voda z čelby – hustá směs pevné a kapalné fáze).	79
Tabulka 27 Počet kopií genu mcrA ve vzorních hnědého uhlí.....	80
Tabulka 28 Počet kopií genu mcrA ve vzorcích dodaných ČGS	83