Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie

Bc. Andrea Burešová

Složení a aktivita mikrobiálního společenstva během rozkladu rostlinného opadu na dvou kontrastních lokalitách

Composition and activity of microbial community during decomposition of plant litter on two contrasting localities

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Markéta Marečková, PhD.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4.5.2015

Podpis

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala především své školitelce RNDr. Markétě Marečkové, PhD. za vedení, pomoc a cenné rady během vypracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Janu Kopeckému, PhD. za pomoc s prací v laboratoři a během vypracování této práce. Také bych ráda poděkovala za pomoc prof., RNDr. Adamu Petruskovi, PhD. Velké díky patří i RNDr. Petru Baldrianovi, PhD. za možnost provedení části analýzy v laboratoři Mikrobiologického ústavu Akademie Věd. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem členům laboratoře Výzkumného ústavu rostlinné výroby, především Mgr. Pavle Průchové, a Mikrobiologického ústavu Akademie Věd, především Mgr. Martině Štursové za pomoc v laboratoři a ochotu.

Abstrakt

Rozklad organické hmoty v půdě je ovlivněn abiotickými a biotickými faktory, jejichž role se mění v závislosti na lokalitě, organickém substrátu a fázi rozkladu. Půdní mikrobiální společenstvo zasahuje do procesu rozkladu rostlinného opadu různým způsobem, a to se projevuje například změnami jejich abundance a produkcí enzymů rozkladných procesů. Tato práce poskytuje nové informace o odlišnosti průběhu rozkladu rostlinného opadu v půdní opadové vrstvě *in situ,* v závislosti na environmentálních podmínkách prostředí a složení rostlinného opadu. Práce se soustřeďuje na stanovení vztahu mezi dvěma hlavními skupinami půdních mikrobiálních rozkladačů hub a aktinobakterií, o jejichž vztahu v tomto kontextu zatím existuje jen málo informací.

Vliv vybraných faktorů na rozkladné procesy byl sledován pomocí experimentu s opadovými sáčky. Ty byly naplněny rostlinným opadem odlišných vlastností. *Astragalus exscapus* z čeledi *Fabaceae* je charakteristický vyšším množstvím dusíku ve svých pletivech, *Fagus sylvatica* zase obsahuje velké množství uhlíku a ligninu a *Carex humilis* má o něco méně uhlíku než *Fagus sylvatica* a řadí se svým složením mezi *Fagus sylvatica* a *Astragalus exscapus*. Opadové sáčky (litterbags) se třemi druhy rostlinného substrátu, byly položeny pod opadovou vrstvu půdy na obou kontrastních lokalitách. Ve dvouměsíčních intervalech v průběhu roku 2011-2012 byly odebírány a váženy. Spolu s opadovými sáčky byla také odebírána okolní půda. Z rostlinného materiálu a okolní půdy byla izolována celková DNA a provedena analýza kvantitativní real time PCR s primery pro 16S/18S rRNA geny. Dále byla analyzována enzymová aktivita a prvkové složení rostlinného opadu. Na lokalitách bylo stanoveno pH a v průběhu experimentu byly také měřeny vlhkost a teplota půdy.

Výsledky této práce ukázaly substrátově specifickou enzymovou aktivitu, která se měnila během rozkladu mezi oběma lokalitami. Celkově větší aktivity enzymů byly zaznamenány u exoceluláz ve Vídni, u endoceluláz na Oblíku a u oxidáz byla maxima pro jednotlivé enzymy naměřena různě. Složení společenstva mikrobiálních rozkladačů bylo, až na výjimky, charakteristické vyšším poměrem aktinobakterií než hub na obou lokalitách. Houby se projevily jako substrátově specifické mikroorganismy a aktinobakterie naopak jako

lokálně specifické. Obě dvě skupiny mikroorganismů spolu pozitivně korelovaly a negativně zase korelovaly s hmotností rostlinného opadu. S aktivitou některých enzymů pozitivně korelovaly pouze houby a aktinobakterie naopak negativně, přičemž aktinobakterie korelovaly s větším množstvím jednotlivých enzymů, i když negativně, v porovnání s houbami. Z experimentu vyplývá, že aktinobakterie využívají k heterotrofnímu růstu na opadu jiné enzymy, nebo přímo jiné strategie než houby.

Abstract

Decomposition of organic matter in soil is influenced by abiotic and biotic factors and their role is different depending on site, organic substrate and its decomposition phase. Soil microbial community influences soil organic decomposition process in a different way, which is manifested, for example, by changes of microbial abundance and production of extracellular enzymes. The thesis aimed in determining relationship of two main soil microbial decomposers groups - fungi and actinobacteria in decomposition processes *in situ*.

The impact of selected factors on decomposition processes were determined by experiment with litterbags, which were filled with litter of plant with different properties. *Astragalus exscapus* from the *Fabaceae* family contains high amounts of nitrogen in the tissues, *Fagus sylvatica* contains high amounts of carbon and lignin and *Carex humilis* has less carbon in the tissues than *Fagus sylvatica* falling in tissue element composition between *Astragalus exscapus* and *Fagus sylvatica*. Litterbags with three plant species were put under a litter layer at both contrasting sites. Litterbags and samples of soil were collected every two months during the years 2011-2012. Each litterbag was weighted, DNA was isolated from litter and soil samples and analyses of quantitative real time PCR with 16S/18S rRNA primers were performed. Enzymatic activities, element composition were also analysed in plant litter. Above that soil pH, humidity and temperature were assessed during the experiment.

Results of the thesis showed substrate specificity of enzyme activities and differences between sites during decomposition. Overall, higher exocellulase enzyme activities were detected in Vienna, while higher endocellulase enzyme activities were detected in Oblík. Variable oxidase activities were detected at both sites. Soil microbial decomposer communities were typical by dominance of actinobacteria over fungi at both sites. Fungi proved to be a substrate specific microorganism as opposed to actinobacteria that proved to be a local specific microorganisms. Both microbail groups correlated positively with each other and correlated negatively with dry weight of plant litter. Positive correlation between

enzymatic activities and fungi were observed opposite to actinobacteria, that correlated negatively with enzymatic activities, while correlation with greater number of enzymes of actinobacteria were observed in comparison to fungi. This experiment shows, that actinobacteria use different type of enzymes or different strategies than fungi for heterotrophic growth.

Obsah

1 Seznam zkratek 3

2 Úvod 5

3 Literární přehled 8

3.1 Struktura společenstva půdních mikroorganismů 8

3.2 Rozklad rostlinné organické hmoty v půdě 11

3.3 Faktory ovlivňující rozklad 12

3.3.1 Abiotické faktory 13

3.3.1.1 Klima - teplota a vlhkost 13

3.3.1.2 Kvalita organického substrátu 14

3.3.1.3 Půdní vlastnosti 16

3.3.2 Biotické faktory 17

3.4 Dynamika rozkladu 19

3.4.1 Chemická změna rostlinného opadu během rozkladu 20

3.4.2 Sukcese mikroorganismů během rozkladu 21

3.5 Rozklad organické hmoty v lesích a na stepních lokalitách 22

3.5.1 Stepní lokality 23

3.5.2 Lesní lokality 25

3.6 Houby a rozklad 26

3.6.1 Interakce s bakteriemi 28

3.7 Aktinobakterie a rozklad 29

3.7.1 Rozklad komplexních substrátů aktinobakteriemi 31

3.8 Rozkladné enzymy 32

3.8.1 Komplexní substráty 32

3.8.2 Extracelulární enzymy 34

4 Materiál a metody 37

4.1 Chemikálie 38

4.2 Ředění a příprava roztoků 39

4.3 Komerční soupravy 42

4.4 Oligonukleotidy 42

4.5 Popis lokalit a vzorkování 42

4.6 Fyzikální a biochemické metody 44

4.6.1 Stanovení úbytku hmotnosti a suché biomasy 44

4.6.2 Měření teploty a vlhkosti 45
4.6.3 Měření pH a obsahu organické hmoty v půdě 45
4.6.4 Elementární analýza prvkového složení 45
4.6.5 Stanovení enzymové aktivity 46
4.6.5.1 Stanovení aktivity hydrolytických exoenzymů 47
4.6.5.2 Odsolení 48
4.6.5.3 Stanovení aktivity hydrolytických endoenzymů 49
4.6.5.4 Stanovení aktivity oxidativních enzymů 50
4.7 Molekulární metody 51
4.7.1 Izolace chromozomální DNA z půdy a z rostlinného opadu 51
4.7.2 Elektroforéza 53
4.7.3 Kvantitativní PCR (qPCR) 53
4.7.3.1 Příprava standardu a transformace buněk 53
4.7.3.2 Izolace plazmidu 54
4.7.3.3 Štěpení plazmidu restrikční endonukleázou SalI 54
4.7.3.4 Přečištění naštěpeného plazmidu fenolem a chloroformem 55
4.7.3.5 Kvantitativní PCR (qPCR) 55
4.8 Statistické vyhodnocení výsledků 57
5 Výsledky 59
5.1 Úbytek suché hmotnosti 59
5.2 Elementární analýza prvkového složení 62
5.3 Enzymová aktivita 64
5.4 Složení společenstva hub a aktinobakterií v půdě a na opadu 75
5.5 PCA analýza 78
6 Diskuze 82
7 Závěr 89
8 Reference 91

1 Seznam zkratek

16S/18SrRNA Gen kódující část malé ribozomální podjednotky prokaryot/eukaryot

ANOVA Analýza variance

ABTS 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazolin- 6-sulfonová kyselina

Azo-CM-celulosa Karboxymetyl celulosa

Azo-xylan Xylan z březového dřeva

DMAB 3,3-dimethylaminobenzoová kyselina

CTAB Cetyl trimethylamonium bromid

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Deoxyribonukleová kyselina

EDTA 2, 2, 2, 2-(ethan-1,2-diyldinitrylo)tetraoctová kyselina

HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina

MUF Methylumbellyferol

MUFαG 4-methylumbellyferyl-α-D-glukopyranosid

MUFC 4-methylumbellyferyl-N-celobiosid

MUFG 4-methylumbellyferyl-β-D-glukopyranosid

MUFL 4-methylumbellyferyl-β-D-galaktopyranosid

MUFM 4-methylumbellyferyl-β-D-manopyranosid

MUFN 4-methylumbellyferyl-N-acetylglukozaminid

MUFP 4-methylumbellyferyl-fosfát

MUFX 4-methylumbellyferyl-β-D-xylopyranosid

MUFY 4-methylumbellyferyl-β-D oktanoát

qPCR Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

TAE Tris-acetát-EDTA

MBTH 3-methylbenzthiazolinon-2-hydrazon

2 Úvod

Půdní prostředí je hlavní zásobárnou uhlíku v terestrických ekosystémech. Hlavním zdrojem tohoto uhlíku jsou rostlinné zbytky, které se do půdy dostávají jednak ve formě kořenů, nebo jako opad z odumřelých nadzemních částí rostlin na půdní povrch. Tyto rostlinné zbytky vytvářejí svrchní opadovou vrstvu, jež je brzy kolonizovaná půdními mikroorganismy, které začnou rostlinný opad degradovat. Mikrobiální rozklad zahrnuje proces mineralizace, kdy dochází k přeměně organických látek z rostlinného opadu na anorganické anebo proces imobilizace (humifikace), kdy se organické látky začleňují do mikrobiální biomasy (Schmidt et al., 2011). Intenzivnější mineralizace organické hmoty vyúsťuje především ve vyšší produkci CO_2 do ovzduší, která tak může podpořit globální klimatickou změnu (Schlesinger, 1984). Právě tímto spojením mikrobiálního rozkladu s globální klimatickou změnou se zabývá v posledních letech mnoho studií (Jumpponen et Jones, 2014; Lam et al., 2014). Na průběh a způsob, jakým se budou organické látky z rostlinného opadu rozkládat, mají vliv různé biotické a abiotické faktory, které se mohou proměňovat v různé časové i prostorové škále (Song et al. 2010).

Mezi hlavní abiotické faktory ovlivňující průběh rozkladu patří klima, kvalita a kvantita rostlinného opadu a půdní vlastnosti. Klima se projevuje především srážkovým úhrnem a teplotou ovzduší. Srážky ovlivňují vlhkost půdy, množství dostupné vody a kyslíku pro mikrobiální rozkladače (Lee et al., 2014; Fierer et Schimel, 2002). Změny teploty působí na rychlost rozkladu rostlinného opadu, ale také na rychlost mineralizace organické hmoty (Allison and Treseder, 2011). Chemické složení rostlinného opadu ovlivňuje rozklad, protože množství živin a obsah lépe nebo hůře rozložitelných látek určuje, jaké společenstvo mikroorganismů jej bude rozkládat (O'Neill and Norby 1996; Hättenschwiler et al. 2005; Ge et al. 2013). Dalším faktorem, který rozklad silně ovlivňuje, je půdní pH. Všechny abiotické faktory tedy ovlivňují rychlost rozkladu nepřímo prostřednictvím vlivu na činnost, diverzitu a četnost půdních rozkladačů.

Úloha mikroorganismů v rozkladné činnosti byla zkoumána z mnoha hledisek. Jak se mikroorganismy podílejí na rozkladu rostlinného substrátu lze zjistit pomocí určení jejich biomasy, která ale nemusí nutně poskytnout informaci o jejich rozkladné aktivitě (McGuire

et Treseder, 2010). Tuto informaci může například poskytnout analýza aktivity extracelulárních enzymů. Ty jsou produkovány houbami i bakteriemi, nicméně účinnější rozkladná aktivita těchto enzymů je přisuzována právě houbám. Ty jsou díky této schopnosti a kolonizaci substrátu pomocí hyf pokládány za dominantní rozkladače v terestrických ekosystémech. Jejich hlavními konkurenty během rozkladu jsou považovány vláknité bakterie patřící do kmene *Actinobacteria* (Jayasinghe et Parkinson, 2008; De Boer et al., 2005). Podíl na rozkladu těchto dvou hlavních mikrobiálních skupin společně však nebyl nikdy *in situ* v průběhu roku studován.

Cílem této práce je vysvětlit, jsou-li úbytek rostlinného opadu, složení mikrobiálního společenstva a jeho aktivita více ovlivněny odlišnými abiotickými faktory prostředí nebo různým druhem rostlinného opadu v čase. Během jednoho roku byl stanoven úbytek hmotnosti tří druhů rostlinného opadu lišícího se chemickými charakteristikami na dvou kontrastních lokalitách, které se lišily půdní vlhkostí, teplotou, rostlinným porostem, hodnotou půdního pH a množstvím organické hmoty. Zároveň byl během rozkladu stanoven poměr aktinobakterií a hub v mikrobiálním společenstvu a produkce několika skupin extracelulárních enzymů, které poskytnou informaci o aktivitě mikrobiálního společenstva.

Hlavní hypotézy:

- Hmotnost rostlinného opadu se mění v čase podle jednotlivých lokalit a v závislosti na druhu opadu, přičemž nejmenší úbytek bude zaznamenán u hůře rozložitelného rostlinného opadu na lokalitě, kde panují horší podmínky pro mikrobiální rozklad (především nižší pH, dominance hub).

- Jednotlivé enzymy budou substrátově specifické, jejich aktivita se bude měnit pro jednotlivé druhy rostlinného opadu, mezi lokalitami i v čase. Vyšší aktivita hydrolytických enzymů bude zaznamenána u nejlépe rozložitelného organického opadu, na lokalitě, kde jsou optimální podmínky pro rozklad na jeho začátku, a u hůře rozložitelných opadů bude jejich aktivitě předcházet vyšší aktivita oxidativních enzymů.

- Množství a poměr aktinobakterií a hub se bude měnit v čase, mezi lokalitami a v rámci lokalit u jednotlivých rostlinných druhů opadu. Největší abundance mikrobiální biomasy bude na opadu, který je nejlépe rozložitelný během optimálních podmínek prostředí na začátku rozkladu. Bakterie budou dominovat pozdější fázi rozkladu.

3 Literární přehled

3.1 Struktura společenstva půdních mikroorganismů

V porovnání s živočichy a rostlinami je diverzita mikroorganismů větší a také méně prozkoumaná. Půdní mikroorganismy mají významnou úlohu ve fungování přírodních ekosystémů, jsou nejen součástí potravního řetězce, kde propojují primární producenty s vyššími živočichy, ale mají také velký význam v biogeochemických cyklech. Struktura jejich společenstva je závislá na několika faktorech, mezi nejdůležitější z nich se řadí charakter populace určité skupiny mikroorganismů, schopnost využití zdroje, kolonizační strategie a také faktory prostředí (Fenchel, 2008).

Co se týče biogeografické rozšíření mikroorganismů, neznáme jej tak dobře jako u rostlin a zvířat. Makrobiogeografii, týkající se rostlin a zvířat, primárně určují geografické izolace na rozdíl od mikrobiogeografie, která se týká mikroorganismů, které nebývají omezeny geografickými barierami, protože jsou neomezeně disperzibilní. Jejich distribuce je spíše ovlivněna faktory prostředí. Podle O'Malley, (2008) určuje rozmístění mikroorganismů na velkých vzdálenostech převážně geografická vzdálenost a na malých environmentální faktory. Tyto faktory, mezi které se řadí klima, topografie a čas, slouží jako filtr určující, jaká potenciální biota obsadí daný ekosystém. To by znamenalo, že pokud by mikroorganismy byly generalisté a neovlivňovala by jejich různá diverzita vlastnosti ekosystému, jako například odlišné uvolňování živin, dynamiku prvků by určovaly právě environmentální faktory. Ovšem empirický výzkum ukazuje, že většinou se živiny transformují za pomoci specializovaných organismů (McGuire et Treseder 2010). Mezi hlavní faktory ovlivňující strukturu mikrobiálního společenstva patří pH a vlhkost půdy (Sagova-Mareckova et al. 2011,Landesman et al. 2014;).

Půdní pH je jedním z hlavních faktorů, které určuje početnost a složení mikrobiálního společenstva, přičemž s narůstajícím pH se také zvyšuje poměr bakterií a hub, neboť vysoké pH zvýhodňuje přítomnost bakterií a znevýhodňuje přítomnost hub (Kamble et al., 2014). Proto v lesích s vysoce kyselou půdou (pH<4,1) a vysokým C:N (>38) dominují mikrobiálnímu společenstvu houby (Smyth et al., 2015). Někdy ale mohou houby narůst v půdě s pH vyšším

než 7, v případě odstranění bakterií z mikrobiálního společenstva, čímž se sníží konkurence mezi mikroorganismy (Rousk et al., 2010). Různé půdní pH může působit také nepřímo na složení společenstva mikroorganismů, jak bylo prokázáno ve studii Čermák et al. (2008). Jeho nízká hodnota v půdě zvýšila adsorpci pozitivně nabitých molekul na negativně nabité povrchy, jako jsou jílové částice, čímž se snížilo množství reaktivních molekul antibiotik v půdě a díky tomu nebyly přítomné mikroorganismy vystaveny jejich vlivu.

Vlhkost půdy ovlivňuje složení společenstva mikroorganismů mimo jiné tím, že určuje dostupnost kyslíku pro mikroorganismy. Pokud by byly totiž způsobeny anoxické podmínky zatopením půdy, půdní prokaryota by musela využívat jiný akceptor elektronů než je kyslík. Spolu s fluktuacemi srážek a tedy i vlhkostí půdy, se tak mění i složení mikrobiálního společenstva (Peralta et al., 2014). Podle Baldrian et al. (2010) je les mozaika více či méně vlhkých ploch, na kterých se mění množství mikroorganismů v řádu desítek procent. Vlhčí území bylo charakteristické větší biomasou mikroorganismů a také větší produkcí rozkladných enzymů. Ve vrstvě opadu byly vlhkostí více ovlivněny houby v porovnání s organickým horizontem, kde se více nacházely bakterie. Dostupnost vody se může měnit i mezi horizonty a společně se tak mění i mikrobiální společenstvo.

Hustota většiny mikrobiálních populací s hloubkou půdy klesá. Podle Prescott et Grayston, (2013) se v půdní F vrstvě nachází největší množství především mykorhizních hub. V této vrstvě dochází k nejintenzivnějšímu rozkladu organické hmoty a je zde zaznamenána nejaktivnější činnost půdní fauny. Hlubší půdní vrstvy obsahují velké množství C, především v podobě stabilizované půdní organické hmoty (POH), která je ale velmi obtížně rozložitelná. Podle Wang et al. (2014) by bylo nutné k její mineralizaci dodat do půdy snadno rozložitelný zdroj energie, například čerstvý rostlinný opad, který by rozklad této POH podpořil. Gabor et al. (2014) tvrdí, že je změna diverzity mikrobiálního společenstva, spolu se změnou chemického složení POH, významnější s narůstající hloubkou, tedy vertikálně, než prostorová, horizontální změna diverzity.

Horizontální distribuci mikroorganismů na povrchu půdy určuje složení a kvalita rostlinného opadu a pod povrchem zase místa, kde se střídá volná neúživná půda s místy úživnými, jako je například rhizosféra nebo drilosféra (Lavelle et Spain,2005). Urbanová et al. (2015) zjistili, že diverzitu hub v lese určuje druh rostlinného opadu. Houby jsou tedy většími

specialisty a mají větší β-diverzitu, v porovnání s bakteriemi, které se vůči různému lesnímu opadu projevovaly jako generalisté a jejich diverzita nebyla závislá na druhovém složení opadu. V rámci určitého druhu opadu byla jejich diverzita ale větší než u hub, a proto u nich byla stanovena větší α-diverzita. Pravděpodobně horší disperzní schopnost nedovolila bakteriím specializovat se na určité druhy rostlinného opadu. Rhizosféra nacházející se v okolí rostlinných kořenů poskytuje mikroorganismům snadno dostupné živiny z kořenových exudátů a odumřelých kořenů. V rhizosféře a ve volné půdě se nacházela odlišná mikrobiální společenstva stejně tak jako ve volné půdě a v opadu (Lavelle et Spain, 2005, Urbanová 2015).

Rozdíly mezi společenstvy v půdě a na opadu jsou způsobené tím, že mikroorganismy z minerální vrstvy půdy jsou více závislé na půdní organické hmotě nežli na přísunu lehce rozložitelného materiálu z opadu. Z toho také vyplývá, že většina snadno rozložitelného uhlíku z rostlinného opadu je rozložena dříve, než se substrát dostane do minerální vrstvy půdy (Feng et al., 2009). Odlišná společenstva mikroorganismů v půdě a na opadu potvrdili později i další autoři (Prescott et Grayston, 2013; Smyth et al, 2015). Společenstva mikroorganismů v půdě si selektivně vybírají, jaký opad budou kolonizovat podle jeho složení. Rozdílnost nejen ve společenstvech mikroorganizmů ale i půdní fauny mezi opadem a půdou potvrdil ve své studii i Ball et al., (2014). Složení půdní organické hmoty ovlivňuje přítomnost mikroorganismů s různou růstovou strategií. Ti bývají označováni jako K- nebo r-stratégové. K-stratégové rostou na komplexních, hůře rozložitelných substrátech v podmínkách, kde je substrátu nedostatek a nereagují na přísun jednoduchých organických molekul. Opačně je to s r-stratégy, kteří využívají jednoduché organické molekuly pro rychlý růst. Množství K-stratégů narůstá s hloubkou půdy, kde se nachází menší množství hůře rozložitelné POH (Malý et al., 2014). Výběr vhodného organického materiálu mikroorganismy probíhá na základě prvkového složení mikroorganismů.

Různé poměry mezi C, N a P v prostředí a v tělech organismů jsou spojeny s biogeochemickými cykly těchto prvků. Poměr C:N bakteriální biomasy bývá od 3 do 6, zatímco u hub od 5 do 15 (Strickland and Rousk, 2010). V půdě byl podle Cleveland et Liptzin, (2007) zjištěn poměr mezi C:N:P 60:7:1, oproti tomu mikroorganismy na opadu vykazují tento poměr nižší. V porovnání, houby mají oproti bakteriím vyšší poměr C:N a C:P. To naznačuje nižší množství uhlíku u bakterií a vyšší poměr C:živiny ve společenstvu, kde je větší

početnost hub. V rámci bakterií je poměr prvků v buňkách fylogeneticky závislý, například poměr C:P je vyšší u *Proteobacteria* oproti *Actinobacteria* a *Bacteroidetes*. Houby naopak nejeví fylogenetickou strukturovanost podle prvkového složení (Mouginot et al., 2014).

3.2 Rozklad rostlinné organické hmoty v půdě

Půda je největší zásobárnou uhlíku v porovnání s ostatními terestrickými ekosystémy, proto je rozklad významným procesem ovlivňujícím globální cyklus uhlíku a dalších prvků. Během rozkladu se také navrací do půdy živiny potřebné pro růst rostlin (Meier et Bowman 2008). Jelikož dochází během mineralizace organických látek k produkci CO_2 do ovzduší, jsou rozkladné procesy důležitým předmětem studia kvůli předpovědi vlivu zvýšené produkce tohoto skleníkového plynu na klimatickou změnu a globální oteplování (Jin et al., 2013; Thiessen et al., 2013).

Uhlík se dostává do půdy různými způsoby a nachází se zde v různých formách. Majoritní význam v jeho přísunu má rostlinný opad a kořenové zbytky (Frouz, et al. 2013; Ponge 2003). Uhlík se v půdě a na jejím povrchu nachází v různých lépe a hůře rozložitelných formách. Lépe rozložitelný se nachází převážně v čerstvé organické hmotě z rostlinných zbytků nebo z kořenových exudátů. Naopak POH, která je v půdě delší dobu, je charakteristická horší rozložitelností, protože bývá v půdě stabilizovaná a stává se tak odolná proti rozkladu (Thiessen et al., 2013). Podle Davidson et Janssens, (2006) obsahuje půda větší množství nerozložitelných organických látek a méně těch snadno rozložitelných. Uhlík z půdy vychází nejvíce v podobě CO2, který je produkován nejen během mikrobiálního rozkladu, ale i během kořenové respirace. V menší míře pak i v podobě CH_4 (Berg et al., 2003).

Rozklad organického materiálu je proces několika na sebe navazujících fází, během kterých se postupně přeměňuje odumřelý organický materiál na jednodušší, za současného uvolnění energie. Tyto změny mohou být dvojího typu. Buď dochází k mineralizaci, nebo k humifikaci. Mineralizace zvyšuje přísun živin do půdy a během humifikace se vytvářejí odolné organické polymery, které v půdě setrvávají dlouhou dobu a zvyšují tak zásobu uhlíku v půdě (Lavelle et Spain, 2005, Thiessen et al., 2013).

Rozklad POH může být v půdě omezen různými chemickými, fyzikálními, ale i biologickými mechanismy. Například houby mohou chránit půdní uhlík před rozkladem několika způsoby, jedním z nich je tvorba agregátů chemickou (s pomocí hyfových exudátů) či fyzikální cestou (stmelení půdních částic pomocí hyf (Strickland et Rousk, 2010). Jak píše Koukoura et al., (2003), podle Swift et al.,(1979) má na průběh rozkladu různého organického materiálu vliv společenstvo rozkladačů a jejich komplexní prostředí, kvalita opadu a fyzikální a chemické charakteristiky prostředí.

3.3 Faktory ovlivňující rozklad

Rozklad půdní organické hmoty (POH) v půdě je ovlivněn různými biotickými a abiotickými faktory. Tyto faktory v přirozeném prostředí fungují interaktivně, a proto se s izolovaným vlivem jednoho faktoru na rozklad můžeme setkat jen v laboratorním prostředí (Wen et al., 2014). Podle Liu et al. (2015) působí na akumulaci POH v půdě na začátku rozkladných procesů jednotlivé faktory zvlášť, a teprve v pozdějších fázích má větší efekt interakce biotických a abiotických faktorů. Ty se projevují různým způsobem v závislosti na regulaci aktivity mikroorganismů v různém čase a prostoru (Ge et al., 2013)) Například organická hmota přicházející do půdy ovlivňuje půdní biotu, která se přímo či nepřímo opadem živí. Zpětně ovlivňuje půdní biota kvalitu opadu rychlostí rozkladu POH a uvolňováním živin pro rostliny (Ponge et al., 2003, Frouz 2013).

Podle Ge et al. (2013) ovlivňují rozklad organické hmoty v půdě tři hlavní faktory fungující hierarchicky tak, že nejvýznamnější je klima, následuje kvalita organického substrátu a nakonec půdní biota. Různý význam těchto faktorů závislý na měřítku studoval Berg, (2000)a později i Song et al. (2010). Podle těchto autorů korigují průběh rozkladu klimatické podmínky v regionálním měřítku a chemické složení substrátu na lokální úrovni. Co se týče půdních vlastností, které v těchto pravidlech nejsou zahrnuty, Delgado-Baquerizo et al. (2015) tvrdí, že půdní vlastnosti mají nezanedbatelný vliv na průběh rozkladu, který byl dříve opomíjen v porovnání s ostatními faktory, jako jsou klima a chemické složení organického substrátu.

3.3.1Abiotické faktory

3.3.1.1 Klima - teplota a vlhkost

Z Arhenniovy teorie vyplývá, že čím horší je rozložitelnost substrátu, tím vice je jeho rozklad závislý na teplotě (Thiessen et al., 2013). S vyšší aktivační energií substrátu se zvýší citlivost vůči změnám teplot, a proto rezistentním organickým substrátům je třeba dodat větší množství aktivační energie (Davidson and Janssens, 2006). Nejednoznačný postoj vůči této teorii zaujala studie Wallenstein et al. (2012), kdy po dvou týdnech měření byla rychlost rozkladu u rezistentního dubového listí méně teplotně závislá v porovnání s lépe rozložitelným borovým jehličím. Po 28 dnech byl výsledek opačný. Přestože se prokázalo, že nižší teplota měnila rychlost rozkladu, citlivost ke změnám teplot nejvíce korelovala s pH půdy, nikoli s chemickou kvalitou organického substrátu (Gutiérrez-Girón et al., 2015).

Zvýšení teploty může rychlost rozkladu urychlit nebo naopak zpomalit. Vyšší teploty způsobily desorpci organické hmoty z jílového povrchu, čímž se organická hmota stala dostupnější pro půdní rozkladače (Wei et al., 2014). Příliš vysoké teploty ale mohou způsobit vysychání půdy. Opad, který obvykle obsahuje ještě méně vody než půda, může být k vysychání náchylnější. Během vysokých teplot a nízkých srážek může dojít k dehydrataci opadu, a jak Suseela et al. (2014) zaznamenal, v té situaci se snížila aktivita rozkladných enzymů a zpomalil se rozklad organické hmoty. Naopak podle Berg et al., (2003) se na vlhčím a teplejším místě jehličnatý opad rozkládá hůř, a přispívá tak k akumulaci organické hmoty v půdě.

Nízké teploty většinou rychlost rozkladu organické hmoty zpomalují (Thiessen et al., 2013), přesto mikroorganismy v opadavém lese mírného pásu aktivně rozkládaly organický substrát i pod sněhovou pokrývkou (Uchida et al., 2005). Naopak ve studii Smyth et al., (2015)se nenašel žádný vliv klimatu na strukturu společenstva a podle Creamer et al., (2015) na změnu teplot reagovaly jen gram-pozitivní bakterie.

Rozklad organické hmoty je také silně ovlivněn srážkami (Suseela et al., 2014). Pokud se na suchých lokalitách mírně zvýší přísun vody, zrychlí se rozklad organické hmoty mnohem více než na vlhčích lokalitách po větším srážkovém úhrnu (Lee et al., 2014). V příliš

vlhkých půdách může ale docházet k limitaci mikroorganismů kyslíkem. Ty se pak musejí přeorientovat na jiné akceptory elektronů, jako je například trojmocné železo nebo nitrát. Podle Schwartz et al., (2007) se s narůstajícím srážkovým gradientem snížila mineralizace dusíku. V důsledku jeho sníženého množství v půdě poklesl i růst rostlinných primárních producentů. Naopak Feng et al., (2009) nezaznamenal žádný vliv na sezónní změnu mikrobiálního uhlíku v humusové vrstvě opadavého lesa, způsobenou fluktuacemi vlhkosti a teploty, na rozdíl od minerální vrstvy, ve které došlo během experimentu k poklesu mikrobiálního uhlíku.

3.3.1.2 Kvalita organického substrátu

Různé druhy rostlinných materiálů mohou zasahovat negativně či pozitivně do procesů půdní respirace a koloběhu uhlíku a dusíku. Jejich vliv je důležitý pro bližší pochopení rozkladu organické hmoty (OH) a především také pro to, jak rostliny ovlivňují proces cyklu prvků (Meier and Bowman, 2008). Rozdílné chemické složení opadu by mělo zásadním způsobem ovlivnit mikrobiální aktivitu (Yavitt and Williams, 2015). Pokud má chemické složení opadu vliv na změnu mikrobiálních společenstev v půdě, pak platí, že čím je materiál různorodější, tím rozmanitější společenstvo mikroorganismů se na něm nachází. To znamená, že čerstvý opad je kolonizován různorodějším společenstvem než opad rozloženější. Ten obsahuje převážně lignin a celulozu a je kolonizován druhově chudším společenstvem mikroorganismů (Bray et al., 2012).

Vliv jednodruhového a vícedruhového opadu na rychlost rozkladu OH studoval Wen et al., (2014) v monokulturním a smíšeném lese. Půda ze smíšeného lesa obsahovala více mikrobiálního uhlíku a dusíku i půdního organického uhlíku a celkového dusíku než jednodruhový les. Došel tedy k závěru, že by zalesnění smíšenými lesy zvýšilo akumulaci organického uhlíku v půdě, čímž by nevzrůstal obsah atmosferického CO_2, a proto by nebyla podpořena klimatická změna. McDaniel et al., (2014) zjistili, že půda s rozmanitějším porostem vykazuje lepší rozkladnou funkci oproti půdě s monokulturním porostem. v půdě s různorodějším porostem se nacházelo právě větší množství enzymů, které degradují celulozu a lignin, což indikovalo vyšší mikrobiální aktivitu a intezivnější rozklad OH.

V přirozených ekosystémech se většinou setkáváme s přísunem opadu z více rostlinných druhů. Různé druhy opadu na sebe mohou působit buď synergicky, čímž se zrychlí jejich rozklad či antagonisticky, čímž se rozklad zpomalí. Antagonistický účinek způsobuje převážně špatně rozložitelný materiál obsahující velké množství ligninu a fenolu, které tvoří nerozložitelné komplexy s proteiny (Cuchietti et al., 2014). Špatně rozložitelný materiál je také charakteristický tím, že může obsahovat sekundární metabolity nebo i taniny. Taniny inhibují nebo zpomalují rozklad tvorbou komplexů s extracelulárními enzymy hub. Mohou také negativně působit na strukturní a enzymatické proteiny uvnitř hyf, čímž přímo inhibují aktivitu a růst hub (Ge et al., 2013). Není překvapivé, že opad s vysokým obsahem živin a nízkým množstvím ligninu se rozkládá rychleji než opad obsahující velké množství ligninu a malé množství živin (Ball et al., 2014). Například jehličí, které je tlusté, obsahuje velké množství strukturních sloučenin a málo živin a rozkládá se pomaleji v porovnání s listy opadavých stromů, které jsou tenké s velkým množstvím živin a nízkým množstvím strukturních sloučenin (Yavitt et Williams, 2015).

Synergický účinek nalezneme ve směsi substrátů, kde lépe rozložitelná rostlinná část podporuje rozklad té hůře rozložitelné. Podle Meier et Bowman, (2008) materiál s různým složením organické hmoty může vzájemně podpořit rozklad, neboť snadno rozložitelné látky mohou podpořit rozklad těch hůře rozložitelných. Jedná se o tzv. "priming effect", kdy lehce dostupný uhlík nebo dusík stimuluje mineralizaci nerozložitelného C. Přesto podle Cuchietti et al., (2014) byl naopak rozklad lépe rozložitelného materiálu podnícen hůře rozložitelným substrátem. To bylo způsobeno poskytnutím jiného druhu nebo většího množství uhlíku lépe se rozkládajícímu substrátu, který byl ale pravděpodobně uhlíkem limitován.

Meier et Bowman., (2008) zjištovali, zdali rychlost rozkladu opadu koreluje s druhovým složením rostlinných společenstev anebo s chemickým složením a chemickou diverzitou opadu. Zjistili, že rozklad opadu koreluje pouze s chemickým složením a s chemickou diverzitou opadu, ale nikoliv s druhovou diverzitou rostlinného společenstva. Organický materiál může podle Allison et al., (2014) ovlivňovat rychlost rozkladu nejen chemickým složením ale i množstvím. Podle této studie je respirace společenstva nejvíce ovlivněna koncentrací organického substrátu. Malá koncentrace substrátu totiž nutí mikroorganismy k menší investici do tvorby biochemického aparátu, což vede k nižší respiraci uhlíku ze substrátu.

Podle Jiang et al., (2014)je dusík limitující živinou v boreálních lesích a jeho přísun může různým způsobem ovlivnit průběh rozkladu. V dřívějších fázích rozkladu může přídavek dusíku rozklad stimulovat, naopak v pozdějších fázích tvorbou odolných komplexů se rozklad zpomaluje (Berg et al, 2003). Pokud je do půdy přidáváno malé množství dusíku, které nepokryje nároky hub na dusík, stimuluje se jejich aktivita a zvýší se rozklad substrátu. Zároveň se zvýší produkce enzymů hydrolyzujících část substrátu až na aminokyseliny, které jsou hlavním zdrojem dusíku pro mikroorganismy. Pokud se přidá větší množství dusíku, energetické náklady do asimilace dusíku ze substrátu se snižují spolu s nižší produkcí hydrolytických enzymů (Jiang et al., 2014). Rostliny obsahující velké množství dusíku, jako je například jetel a další rostliny z čeledi *Fabaceae*, uvolní během rozkladu větší množství dusíku do půdy a hostí četnější mikrobiální společenstvo s převahou bakterií v porovnání s opadem obsahujícím malé množství dusíku jako je například jedlové jehličí nebo sláma (Ball et al., 2014).

3.3.1.3 Půdní vlastnosti

Kvalita půdy může korelovat s rozkladem rostlinného opadu více, než jeho chemické složení. Podle studie Delgado-Baquerizo et al., (2015) má půda s lepšími chemickými vlastnostmi, mezi které patří například obsah organického uhlíku a početnější mikrobiální biomasa, po rozkladu rostlinného opadu větší množství dostupného uhlíku a dusíku, oproti půdě s horšími charakteristikami. Ve výsledku nemělo chemické složení opadu tak výrazný pozitivní efekt na množství půdního uhlíku a dusíku během rozkladu, jako půdní charakteristiky reprezentované mikrobiální biomasou a organickým uhlíkem.

Zvýšené množství půdních agregátů může zpomalovat nebo inhibovat rozklad POH. Menší agregáty jsou více rezistentní vůči rozkladu než ty větší, protože je v nich POH lépe stabilizována před mikrobiálním rozkladem (Tian et al., 2015). Podle Nie et al. (2014) se ale kvůli vyšší koncentraci CO_2 v půdě zvýšila produkce uhlík degradujících enzymů v mikroagregátech. Podobně bylo zaznamenáno u Gunina et Kuzyakov, (2014), že půda obsahující stabilní agregáty produkovala více CO_2 v porovnání s půdou s nestabilními agregáty. Tyto půdy jsou proto více ohroženy vodní erozí, než půdy se stabilními agregáty. Důvodem je minimální schopnost infiltrace srážkové vody, která z těchto půd odtéká pryč

spolu s živinami a minerálními částicemi. Půdní roztok a sedimenty v jílovitých půdách se stabilními agregáty sice obsahují více rozpuštěného půdního C, ale v důsledku vysoké schopnosti infiltrace, nedochází ke ztrátám půdního uhlíku a minerálních částic odplavením (Chaplot et Cooper, 2015).

Typ jílových minerálů byl silný prediktor struktury mikrobiálního společenstva, které bylo během dlouhodobé inkubace ovlivněno nejvíce illitem a montmorillonitem. Jílové minerály mají nepřímý efekt na půdní společenstvo, protože ovlivňují jejich mikrohabitaty, například redukcí toxického stresu a vyrovnáváním pH (Vogel et al., 2014). Jílovité půdy také mohou organickou hmotu držet fyzikálními silami mimo dosah rozkladačů v miniaturních pórech. Více než 90% organické hmoty z pórů je pro bakterie nedosažitelné, protože do pórů, které jsou menší než trojnásobná velikost jejich buněčných těl, nejsou schopny proniknout. Přesto podle Wei et al. (2014) množství mikroorganizmů narůstá v jílovitých půdách díky menším pórům, které slouží jako úkryty před většími predátory jako jsou např. prvoci. Jílovité částice mají také velký specifický povrch, na který mohou mikroorganismy adherovat. Stejně jako agregáty by mohly podle Juarez et al. (2013) i různě velké půdní póry ovlivnit rozklad organické hmoty z opadu a POH. Přesto během této studie změna ve velikosti půdních pórů neměla žádný vliv na rychlost mineralizace organického uhlíku. Většina studovaných pórů byla naplněna vzduchem, a protože mineralizace organického uhlíku lépe probíhá v pórech naplněných vodou, změna struktury pórů měla pravděpodobně minimální vliv na mineralizaci organického uhlíku, neboť mikroorganismy byly primárně limitovány právě vodou.

3.3.2 Biotické faktory

Půdní mezofauna, jako jsou chvostoskoci, roupice a larvy dvoukřídlých zvyšují specifický povrch rostlinného opadu fragmentací a také trávením inokuluje rostlinný opad mikroorganismy (Jiang et al., 2014). Některá půdní makrofauna, například žížaly, přemísťují čerstvý opad z povrchu půdy do nižších vrstev, a tím stejně jako mezofauna fragmentací opadu zvětšují povrch organického materiálu. Tím může opad hostit větší množství mikrobiálních rozkladačů a rychleji se degraduje (Frouz et al., 2015). Již dříve se zjistilo, že

čím menší rostlinné zbytky byly vloženy do půdy, tím rychleji byly zabudovány do mikrobiální biomasy, a čím byly větší, tím déle trvalo, než se rozložily (Tarafdar et al. 2001). Žížaly zpomalují rozklad produkcí svých exkrementů, protože se rozkládají pomaleji než rostlinný opad, čímž kompenzují pozitivní efekt na rozklad opadu zabudováním do půdy. Dalo by se tedy říct, že makrofauna pravděpodobně globálně mineralizaci neurychluje (Frouz et al., 2015). V lesní půdě, kde žížaly chyběly, se opad akumuloval na povrchu půdy, ale byla na něm naměřena větší mikrobiální respirace, oproti opadu promíchanému s půdou. Přestože mikrobiální biomasa byla vyšší v půdě s žížalami, její respirace byla nižší. Mohlo se stát, že se metabolická aktivita mikroorganizmů snížila přidáním čerstvého organického uhlíku do půdy. Pravděpodobněji se ale promícháním opadu do půdy organický uhlík s pomocí jílových částic stabilizoval, a byl tak rezistentní vůči mikrobiální mineralizaci (Frouz, et al. 2013b).

Půdní fauna může nepřímo ovlivnit aktivitu mikrobiálních rozkladačů tvorbou specifických struktur. Žížaly během hloubení chodbiček v půdě produkují sekret a tím zvyšují vlhkost a množství asimilovatelného uhlíku. Mikroorganismy nacházející se v těchto místech, jsou většinou v dormantní fázi dokud nejsou žížalami stimulovány k aktivitě.. Jedná se o mutualistickou interakci mezi makrofaunou a mikroorganismy, kdy endogeické žížaly živící se POH, potřebují zvýšit rozkladnou činnost mikroorganismů, jejichž metabolity se živí (Brown et al., 2000).

Rostliny mohou ovlivnit rozklad půdními mikroorganismy nejen svým odumřelým opadem, ale vytvářejí vhodný habitat pro růst mikroorganismů v okolí svých kořenů. Území do 0,5 mm kolem rostlinných kořenů se nazývá rhizosféra. V tomto místě je dostupné větší množství živin, vody, kyslíku a je zde zvýšená i mikrobiální aktivita oproti okolní půdě. V rhizosféře poskytují kořeny rostlin mikroorganismům snadno rozložitelný zdroj uhlíku prostřednictvím kořenových exudátů, díky kterým mohou mikroorganismy rozkládat i obtížněji rozložitelnou POH. Během vegetativního období rostliny zvyšují priming effect produkcí kořenových exudátů a zvýšením rozkladu POH mikroorganismy (Brown et al., 2000; Lam et al., 2014). Neutrální priming effect na rozklad POH byl pozorován Koranda et al. (2011), kdy docházelo k nižší produkci oxidativních a vyšší produkci proteolytických enzymů v rhizosféře v porovnání s okolní půdou. Přítomné mikroorganismy si tedy vystačily s živinami z kořenových exudátů, případně s rostlinným opadem, a nedocházelo tak k vyššímu rozkladu POH. Z toho lze vyvodit, že se v rhizosféře nacházejí spíše kopiotrofní mikroorganismy, které

nejsou schopné rozkládat komplexní organické sloučeniny. Tomu odovídá i mikrobiální složení společenstva, kdy se na jednoduchých organických substrátech, například na rostlinném opadu nebo v rhizosféře, nacházejí především Gram-negativní bakterie a v okolní půdě Gram-pozitivní bakterie a K- strategické saprotrofní houby (Koranda et al., 2011).

Co se týče mikroorganismů, houby jsou považovány za hlavní rozkladače opadu z důvodu jejich schopnosti rozkládat komplexní sloučeniny s pomocí extracelulárního enzymatického aparátu. Některé *Basidiomycetes* jsou schopné degradovat lignin a humózní materiál a jiné houby zase celulozu a chitin. Pokud půdnímu mikrobiálnímu společenstvu dominují houby, bude mineralizace rychlejší a dostupnost N vyšší oproti půdám s vyšším podílem bakterií. Důležitá je také funkční diverzita mikrobiálního společenstva. Je-li společenstvo funkčně diverzifikované neboli má širší funkční rozsah, je schopné rozkládat jak čerstvý, snadno dostupný organický substrát, tak i ten hůře dostupný, stabilizovaný v půdě (Delgado-Baquerizo et al, 2015). Creamer et al., (2015) také dokazují, že uhlík lépe asimilují gram-pozitivní bakterie oproti gram-negativním. Některé studie potvrzují, že na priming effect hlavně reagují houby (Fontaine et al., 2011), ale Creamer et al., (2015) nezaznamenal, že by houby vykazovaly jakoukoliv změnu spojenou s priming effect přídavkem rostlinného opadu nebo změnou teploty.

3.4 Dynamika rozkladu

Rozklad může být chápán jako sukcese, kdy se střídají fáze aktivní a fáze inhibiční, které zpomalují nebo zastavují rozklad organického materiálu (Lavelle et Spain, 2005). Faktory, které ovlivňují průběh rozkladu,mohou fungovat odlišným způsobem v iniciální a v pozdější fázi rozkladu, například některé prvky jako jsou N, P, a K v pozdější fázi negativně korelují s rychlostí rozkladu, přestože na začátku rozklad stimulují. Pozdější fáze rozkladu jsou méně prozkoumané, protože většina studií obvykle neprobíhá déle než dva nebo pět let (Ge et al. 2013, Smyth et al., 2015). Jak tvrdí Frankland (1998), každá sukcese je jedinečná a jinak závislá na rozkladném materiálu a zároveň na podmínkách prostředí.

3.4.1 Chemická změna rostlinného opadu během rozkladu

V počáteční fázi ovlivňuje rozklad opadu klima a koncentrace živin v rostlinném opadu. V pozdější fázi koncentrace ligninu, která převyšuje význam živin (Berg et al.,2000). Na začátku rozkladu často převažuje vliv fosforu, kdežto na konci poměry fenolu/N, fenolu/P, ligninu/N a C/N (Moretto et al. 2001, Lavelle et Spain, 2005b). Rozklad opadu, který je bohatý na živiny, probíhá relativně rychle, přibližně 12-18 měsíců (Yassir et Buurman, 2012). V pozdější fázi rychlost rozkladu klesá, její křivka má tvar asymptoty a blíží se limitní hodnotě (Berg et al., 2000).

Rostlinný opad, který obsahuje málo živin (N, P a S) se rozkládá pomaleji než opad na živiny bohatý (Berg, 2000). Většinou se jedná o opad rostlin, které rostou pomalu, špatně konkurují o prostor a nemají velké nároky na přísun živin (Berg et al. 2000,Moretto et al. 2001). N je imobilizován v případě, že poměr mezi C:N je menší než 30 a mineralizován, pokud je větší než 30 (Moretto et al. 2001, Lavelle et Spain, 2005). Později se začínají rozkládat i některé makroprvky, ale lignin se nerozkládá vůbec nebo jen minimálně. Nakonec se nerozložené zbytky akumulují v půdě (Berg et al., 2000, Cosgrove, 2005, Yavitt et Williams, 2015). Obsah dusíku může v různých fázích rozkladu fungovat protichůdně. V iniciálních fázích může dusík rozklad urychlit, zatímco v pozdějších fázích ho může inhibovat tvorbou obtížně rozložitelných sloučenin s ligninem (Ge et al., 2013). Rostlinný opad s vysokým obsahem dusíku se po dopadu na půdu velmi rychle rozloží, neboť půdní heterotrofové mají na N vysoké nároky (Song et al., 2010). V půdě s nedostatkem N byla zaznamenána v iniciální fázi rozkladu vysoká produkce ureazy, enzymu, který v půdě přeměňuje dusíkaté organické látky na amoniak, a urychluje tak přísun minerálního dusíku pro mikroorganismy tam, kde je ho nedostatek (Liu et al., 2015). Průběh rozkladu závisí také na tom, kolik rostlinný opad obsahuje rozpustných látek a jaká je struktura jeho uhlíkových sloučenin (Berg et al. 2000, Moretto et al. 2001). Během rozkladu organického substrátu jako první klesá po několika měsících množství ve vodě rozpustných látek. Zatímco se koncentrace těchto látek spolu s celulozou snižuje, koncentrace ligninu a živin v organickém substrátu naopak narůstá. Nicméně podle Yassir et Buurman, (2012) nemusí být lignin tak rezistentní sloučenina, jak se vždy předpokládalo. Bylo totiž zjištěno, že na začátku rozkladu se v opadu rozložilo mnohem více ligninu než celulozy.

3.4.2 Sukcese mikroorganismů během rozkladu

Jak píší McGuire et Treseder (2010) podle Moorhead et Sinsabaugh (2006) se dají v rámci rozkladu rozdělit mikroorganismy do tří gild podle toho, jak odolný organický substrát rozkádají, jestli snadno, středně anebo těžko rozložitelný. Gildy, které rozkládají snadno rozložitelný substrát, jsou stimulovány dostupným N a naopak gildy, které rozkládají odolný substrát, jsou N inhibovány. Podle He et al. (2011) snadno rozložitelný dusíkatý substrát byly schopné po aplikaci do půdy rychleji využít bakterie, po delší době na tomto substrátu dominovaly houby. V iniciální fázi rozkladu opadu dominují houby, které z něj dokáží lépe než bakterie a aktinobakterie rozkládat cukry a polysacharidy (Lavelle et a., 2005). Ball et al. (2014) zjistili zpomalení rozkladu po přidání směsi různých substrátů do půdy a jen minimální nárůst mikrobiálního společenstva, které mělo nízký poměr bakterií a hub. Houby jsou zvýhodněné růstem svých hyf, díky nimž se mohou dostat dále a využít lépe směs organických substrátů oproti jednobuněčným bakteriím. Nárůst hub může být doprovázen nárůstem bakterií, které se živí jejich metabolity (Wallenstein et al., 2012). Naopak Bray et al. (2012) zjistili, že Gram- negativní bakterie se nacházejí v dominantním zastoupení v půdách bohatých na přísun organické hmoty a dusíku. V pozdějších fázích, kdy se substrát stává odolnější vůči rozkladu, naopak převládají ve společenstvu Gram-pozitivní bakterie a houby.

Během pozdějších fází rozkladu se na opadu nacházejí mikroorganismy, které jsou méně specializované vůči danému organickému substrátu. Celková diverzita společenstva klesá a společenstvo je homogennější v porovnání s iniciální fází rozkladu (Lavelle et al., 2005). Biomasa mikroorganizmů může během sukcese lineárně růst nebo klesat, ale může také kolísat. Podle Wen et al, (2014) množství mikroorganismů ve smíšeném lese klesá mezi 10 a 24 lety a od 24 do 45let zase narůstá.

Pozdější fáze rozkladu jsou charakteristické převahou perzistentních hub produkujících antibiotika a několik druhů rozkladných enzymů (Lavelle et al., 2005). V lesním ekosystému houby bílé hniloby rozkládají lignin kompletně v porovnání s houbami hnědé hniloby, které jej využívají jen omezeně. Opad s vysokým obsahem dusíku inhibuje degradaci ligninu enzymovým systémem hub bílé hniloby, což způsobuje dominanci hub hnědé hniloby (Ge et al., 2013). Po dvou letech rozkladu začínají v lese převládat *Bazidiomycota*, po 5-6 letech

přestávají být houby aktivní a na opadu převládají bakterie (Frankland, 1998). Přesto kromě *Pezizomycotina* převládaly na začátku rozkladu smrkového jehličí i *Agaricomycotina* zařazující se do *Bazidiomycota* (Haňáčková et al., 2015). Pozdější fáze je také charakteristická tím, že jí dominují mikroby a zvířata už jen minimálně (Berg et al., 2000).

Chemické složení substrátu určuje, které druhy rozkladačů budou opad rozkládat v jednotlivých fázích rozkladu. Podle Strickland et Rousk (2010) poměr C:N u organického materiálu určuje, jestli bude primárně rozkládán houbami či bakteriemi. Gusewell et Gessner (2009) zjistili, že bakterie dominují dekompozici listového opadu s větším poměrem C:N, pokud fosfor není v půdě limitujícím prvkem a stanovili stejnou nebo větší rychlost rozkladu u bakterií v porovnání s houbami. Naopak růst hub je stimulován nižším poměrem C:N, pokud je P v půdě limitujícím prvkem. V tom případě by růst hub měl být stimulován i přídavkem dusíku (Strickland et Rousk, 2010). Právě na bukovém listí, které má vysoký poměr C:N, rozkladu dominovaly *Bazidiomycetes* až po šesti měsících. Po dvou letech bylo na opadu největší množství typických saprotrofních hub. Listí jasanu, které má nižší poměr C:N v porovnání s bukovým listím, kolonizovaly *Bazidiomycetes* mnohem dříve a již po šesti měsících byl opad zcela rozložen nebo promíchán žížalami v půdním horizontu (Frankland, 1998). Nicméně podle Šnajdr et al., (2011) jsou houby primární rozkladači jak na bukovém, tak na jedlovém opadu v prvních čtrnácti dnech rozkladu, a po této době se složení společenstva změní ve prospěch bakterií. Vyšší podíl hub než bakterií se nacházel na chudém, nekvalitním substrátu oproti substrátu bohatém na živiny. V rámci bakterií, Gram-negativní bakterie využívají kvalitnější, snadno rozložitelný organický substrát v porovnání s Gram-pozitivními, které mohou rozkládat i rezistentní organické sloučeniny (Bray, 2012)

3.5 Rozklad organické hmoty v lesích a na stepních lokalitách

Stepní lokality v temperátní zóně obsahují v půdě velké množství organického uhlíku, dokonce více než lesy této zony, a to především díky vysoké rostlinné produktivitě, ročnímu úhrnu srážek, a množství POH. Zatímco na stepních lokalitách se nachází větší množství rostlinných zbytků v půdním horizontu v podobě kořenů, většina organické hmoty

v temperátních lesích se nachází na povrchu půdy v podobě opadu (Schlessinger, 1977). Dlouhotravinné prérie produkují více CO2 v porovnání s ostatními temperátními terestrickými ekosystémy. Snížením vlhkosti a rostlinné produkce a z toho očekávaných změn přísunů uhlíku do půdy, by se snížila i produkce CO2 na těchto stepních lokalitách. Naopak větší přísun uhlíku do půdy by stimuloval rozklad POH a snížil tak její množství v půdě (Jin et al., 2013).

Lesní mikrobiální společenstva jsou vystavena stabilním podmínkám prostředí oproti stepím, kde dochází k fluktuaci environmentálních faktorů během roku, především teplot a srážek, a proto zde půdní mikroorganismy mají širší ekologickou valenci (Fierer et Schimel, 2002). POH se pod primárním lesem rozkládala rychleji, než POH na stepi, pravděpodobně díky vyššímu množství N v půdě a nižšímu přísunu kořenového opadu do půdy. Stepní lokalita obsahovala v opadu i v půdě více uhlovodíků, ale jejich rozklad omezoval nedostatek N (Yassir et Buurman, 2012).

3.5.1Stepní lokality

Mineralizace uhlíku na stepních lokalitách je ovlivněna především vlhkostí a půdním typem a méně změnami v poměru C:N rostlinného opadu. Podle Jin et al. (2013) se s nižší půdní vlhkostí zpomaluje rozklad organické hmoty. Podobně i Suseela et al. (2014) zjistili, že degradace sloučenin z *Poa trivialis* na stepních lokalitách, se měnila spolu s rozdílnou precipitací, a houby a jejich extracelulární enzymy spíše s teplotou. Naopak Jumpponen et Jones (2014) nezjistili žádnou změnu ve společenstvu hub během pokusu s kombinovaným efektem srážkových intervalů a změn teploty na mezofilních dlouhotravinných prériích. Ty jsou typické sezonní variabilitou v úhrnu srážek a mikroorganismy zde disponují širokou environmentální a fyziologickou tolerancí a díky tomu mohou lépe tlumit působení změn klimatu. Nízký úhrn srážek na stepních lokalitách negativně koreluje také s přítomností půdních bioturbátorů, jako jsou žížaly, které by promíchávaly organickou a minerální vrstvu půdy a podpořily tak rozklad OH. Přesto, fyzikálním působením klimatu, smršťováním a rozpínáním během mrazů a během období vlhka a sucha a za pomoci některých

bezobratlých, došlo i bez jejich přítomnosti k promíchání rostlinného opadu s minerálním horizontem (Frouz et al. 2013).

Různé chemické složení stepních rostlin ovlivňuje rychlost jejich rozkladu. V době, kdy traviny ukončí svůj růst, přesouvají část živin do svých kořenů. Zbytek zůstane v suché nadzemní části. Stonky byly celkově rozkládány pomaleji než listy, ale u různých druhů rostlin se rychlost rozkladu měnila. Pozitivně korelovala s parametry kvality opadu (C, N, P a K) a negativně s celulozou a ligninem. Rychlost rozkladu se lišila i mezi C3 a C4 rostlinami (Koukora et al., 2003). Na humidních lokalitách mají traviny ve svých pletivech nižší množství N, vyšší poměr C:N a množství ligninu, což způsobuje pomalejší rozklad a imobilizaci prvků. Naproti tomu dominantní traviny na aridních a semi-aridních stepích, mají vysoký obsah N ve svých pletivech a nízký poměr C:N a množství ligninu což způsobuje rychlejší rozklad a imobilizaci prvků (Moretto et al., 2001). Traviny totiž na rozdíl od bylin a listí stromů obsahují aromatické heteropolymery, jako je lignin, s bílkovinnými sloučeninami a polysacharidy, jako je celulosa. Během rozkladu jsou polysacharidy a proteiny z rostliny nedostupné pro mikroorganismy a tím se zpomaluje mineralizace uhlíku a dusíku (Suseela et al., 2014). Na stepní lokalitě, kde převládal růst snadno rozložitelného bylinného porostu, byl rozklad rychlejší než na lokalitě, kde převažoval růst *Poaceae* a *Cyperaceae* a kde se vysoké množství uhlíku akumulovalo v půdě. Na obou lokalitách dominovaly během rozkladu bakterie a nejpočetnější z nich byly aktinobakterie (Sagova-Mareckova et al., 2011).

Stepní lokality disponují menším množstvím mikrobiální biomasy s nižší početností hub a Gram-negativních bakterií v porovnání s lesními lokalitami. (Frouz et al., 2013). Ukázalo se, že stepní rostliny jsou schopné svými kořenovými exudáty poskytnout půdním mikroorganismům rychlý zdroj snadno rozložitelného uhlíku, který použijí k syntéze a produkci extracelulárních enzymů, které pomáhají mineralizovat POH. Mezi rostlinami a mikroby v rhizosféře tak probíhá mutualistická interakce, kdy díky tzv. kořenovému „priming effect“, rostliny stimulují nebo inhibují mineralizaci POH, a tím ovlivňují dostupnost živin v půdě (Shazhad et al., 2015). Jelikož mají traviny vyšší poměr mezi kořenovou a nadzemní biomasou v porovnání se stromy, jsou lesní půdní společenstva více závislá na přísunu rostlinné organické hmoty do půdy z listového opadu a stepní společenstva z kořenového opadu (Frouz et al. 2013).

3.5.2 Lesní lokality

Uhlík fixovaný ve stromech se navrací do půdy formou opadu dopadajícího na půdní povrch, kořenovými exudáty nebo odumřelými kořeny. Jejich rozklad je pak ovlivněn několika faktory, které vedou k poklesu nebo nárůstu mikrobiální aktivity v čase. Rychleji se organická hmota rozkládá v opadavých lesích a pomaleji v jehličnatých. Z listů opadavých stromů se totiž mnohem snadněji vymývají rozpustné nízkomolekulární organické látky, které způsobili větší nárůst a aktivitu mikrobiálního společenstva. Naopak jehličí obsahuje vyšší množství polyfenolů, které rozklad inhibuje. Nicméně Berger et al. (2015) zjistili, že z listí *Fagus sylvatica* se v prvním roce rozkládalo mnohem více prvků, než z jehličí *Pinus nigra*. Ale po roce u buku nastala stagnace a začalo se rychleji rozkládat jehličí *Pinus nigra*, které se nakonec rozložilo rychleji a více než *Fagus sylvatica*. V rámci opadavých lesů se rychlost rozkladu liší v závislosti na druhu opadu, kdy opad s větším množstvím živin se rozkládá rychleji než opad na živiny chudý (Ge et al., 2013, Chavez-Vergara et al., 2014 Malý et al. 2014).

Odlišné druhy mikroorganismů se nacházejí v organické vrstvě půdy listnatých a jehličnatých lesů. Jehličnatý les se špatně rozložitelným opadem a nízkým pH zvýhodňuje přítomnost hub oproti bakteriím (Haňáčková et al., 2015). Například v borových lesích zasahují až z 80% ektomykorhizní houby do houbového společenstva a ze 30% zasahují do celkové mikrobiální biomasy (Urbanová et al., 2015). Větší podíl ektomykorhizních hub v některých tropických a v mnoha temperátních lesích může ale rozklad zpomalit. Za prvé, protože ektomykorhizní houby málo zasahují do rozkladu rostlinného opadu, neboť většinu potřebného uhlíku jim poskytují stromoví symbionti. Za druhé, tyto houby mohou potlačovat ostatní heterotrofní mikrobiální rozkladače v půdě (McGuire et Treseder, 2010). Nižší pH v jehličnatých lesích může také způsobit vyšší akumulaci organické hmoty v půdě, protože kyselé sloučeniny působí jako inhibitory mikrobiální aktivity. Hliník může stabilizovat OH v půdě při nízkém pH, což zabraňuje jejímu využití mikroorganismy (Malý et al., 2014). V jehličnatých lesích je nejmenší počet Gram-negativních bakterií, největší počet hub a aktinomycet a je zde nejvyšší poměr hub a bakterií. V některých jehličnatých lesích může být naopak více Gram-pozitivních bakterií a aktinomycet a nižší poměr hub a bakterií, z důvodu

zvýšeného pH půdy v cedrovém lese (Prescott et Grayston, 2013). Ovlivnit diverzitu a sukcesi hub v iniciální fázi kolonizující jehličnatý opad může i napadený smrkový les kůrovcem. Lokalita napadená kůrovcem totiž vykazovala vyšší teploty a nižší vlhkost půdy během léta, což pravděpodobně negativně ovlivnilo početnost hub (Haňáčková et al., 2015)

3.6 Houby a rozklad

Houby mají vyšší druhovou rozmanitost oproti bakteriím, čítající až 1,5 milionů druhů (De Boer et al., 2005). Půdní houby mají vyšší beta a naopak nižší alfa diverzitu než bakterie. Ve smíšeném lese byla studována druhová diverzita hub a bakterií na různém druhu opadu a během této studie nebylo pozorováno, že by se bakterie lišily mezi jednotlivými druhy rostlinného opadu v porovnání s houbami. Z toho také vyplývá, že houby jsou potravní specialisté a bakterie zase potravní generalisté (Urbanová et al., 2015). Houby si mohou specializaci dovolit, díky lepší schopnosti kolonizovat substrát a dostávat se k místům s preferovaným organickým substrátem. Jsou lépe adaptované pro hledání úživných míst tam, kde se heterogenně střídají místa úživná a neúživná, v porovnání s bakteriemi. Mikromycety například produkují hustou sít hyf díky které mohou přemístit živiny z místa s úživnějším opadem do místa s opadem chudším, a tím se urychlí jeho rozklad. Přenos látek s pomocí hyf probíhá selektivně, protože bylo zjištěno, že se hyfami nepřemísťovaly inhibující látky (Song et al., 2010). Houby jsou nejen schopné lépe kolonizovat a penetrovat substrát než bakterie, ale jsou také schopné rozkládat odolný lignin z odumřelých rostlinných částí (De Boer et al., 2005).

Různé druhy půdních hub jsou schopné rozkládat specifické sloučeniny. Některé z nich preferenčně degradují lignin, jiné zase sacharidy. Schopnost rozkládat lignin mají především Bazidiomycota a Ascomycota (Jiang et al., 2014). Houby bílé hniloby, jak se souhrnně nazývají Bazidiomycota, jsou schopné získávat celulozu z komplexu ligninocelulozy tím, že rozkládají lignin (De Boer et al. 2005). Houby bílé hniloby produkují různé lignolytické enzymy, jako jsou například manganová peroxidáza, obecné peroxidázy a lakáza, s jejichž pomocí lignin degradují (Bugg et al., 2011). Je zajímavé, že množství ligninu nemusí mít vliv na rozkladnou činnost saprotrofními *Basidiomycetes* (Voříšková et al., 2011).Rozkládat lignin dokáží nejen houby bílé hniloby, ale také houby hnědé hniloby (De Boer et al., 2005).

Nedávná studie dospěla k závěru, že *Penicillium* a *Aspergillus* jsou schopné produkovat fenol oxidázu na rozklad ligninu z jehličí a lze je tedy zařadit mezi lignocelulotické rozkladače (Jiang et al, 2014).

Různé podmínky prostředí mohou ovlivnit společenstvo hub a jejich aktivitu v půdě. Přestože se tvrdí, že se větší množství houbových rozkladačů nachází v půdách chudých na živiny s pomalu rozkládajícím se substrátem, nízkým pH a podmáčených půdách, během studie Smyth et al, (2015) nebyl nezaznamenán žádný vliv změn pH ani poměru uhlíku a dusíku na abundanci hub v půdě. A podobně, přesto že je známo, že vývoj houbového mycelia je omezen v příliš suché nebo zavodněné půdě, a že vyšší teploty stimulují růst mycelia, ukázalo se, že tyto faktory ovlivnily pouze rozkladnou aktivitu hub a nikoliv jejich biomasu. Teplota a změny v zavodnění a vysychání půdy regulovaly rozklad dřeva saprotrofními bazidiomycety, kdy vysychání způsobilo snížení aktivity extracelulárních enzymů a oteplení zvýšilo rozklad dřeva kolonizovaného houbami (A'Bear et al., 2014). Změnou půdních vlastností jako zvýšením půdní vlhkosti, změnou dostupnosti živin a inhibicí saprotrofických hub, došlo k inhibici aktivity půdní mikrobioty. Přesto se tvorba agregátů v půdě zvýšila, s pomocí houbových hyf a díky eliminaci okolních mikroorganismů, které by pravděpodobně z důvodu mezidruhové kompetice omezily činnost vedoucí k tvorbě agregátů (Leifheit et al., 2015). Množství dusíku v půdě může mít také vliv na společenstvo hub. Bylo prokázáno, že dusík je lépe mineralizován v půdě, které dominují houby a ne bakterie (Delgado-Baquerizo et al, 2015).

Některé mikrobiální parametry nemusí nutně ovlivňovat rychlost rozkladu. Mikrobiální biomasa nemusí například pozitivně korelovat s rychlostí rozkladu, ale struktura společenstva mikroorganismů může být naopak velmi důležitý prediktor rozkladu. V některých lesích dominují společenstvu ektomykorhizní houby. Pokud naroste v půdě jejich biomasa, rozklad se zpomalí, protože ektomykorhizní houby nepotřebují získávat uhlík rozkladem opadu, neboť jim dostatek uhlíku obstarávají jejich hostitelské stromy (McGuire et Treseder, 2010).

3.6.1 Interakce s bakteriemi

Houby mohou s bakteriemi během rozkladu ligninu interagovat několika způsoby. Mezi jeden z nich patří kompetice o rozpustné produkty rozkladu (cukry, fenolické sloučeniny). Bakterie tak mohou zbavovat houby zdrojů energie a omezit tak rozklad lignocelulózy houbami (De Boer et al., 2005). Z toho vyplývá, že vlastnosti opadu mají větší vliv na saprotrofické houby než na bakterie. Ale efekt stromového opadu na rozklad bakteriemi je mnohem méně prozkoumán než u hub (Urbanová et al., 2015) .
Je známo, že aktinobakterie mohou mít antagonistický účinek jak na patogenní, tak na mykorhizní houby, méně se však ví o účinku na saprotrofické houby. Některé aktinobakterie mohou fungovat jako antagonisté hub rozkládajících jak opad, tak dřevo.

Jeden druh aktinobakterie inhibující pět druhů hub, byl jedním z pár aktinobakterií schopných inhibovat nejvíce rezistentní testovaný druh houby. To dokazuje, že jediný aktinobakteriální kmen nebude pravděpodobně schopný ovlivňovat široké spektrum houbových rozkladačů, ale antifungální aktivita je výsledkem antagonistického působení všech aktinomycet kombinovaně.

Houby rozkládající opad a rychle rostoucí rody jako jsou například *Penicillium* a *Mucor*, byly více tolerantní k aktinobakteriálnímu antagonismu v porovnání s pomaleji rostoucími rody (např.*Cladosporium*) a houbami rozkládající dřevo. Aktinobakterie jsou totiž převážně pomalu rostoucí mikroorganismy a rychle rostoucí mikroorganismy mohou přerůst inhibiční fázi. Nehledě na rychlý růst těchto hub, většina z nich obsahuje rezistentní geny ke svým vlastním antibiotikům, což může zapříčinit rezistenci i vůči antagonistickým aktinomycetám.

Některé aktinobakterie vykazovaly vůči silně rezistentním skupinám hub hyperparasitismus, kdy se jedná o parasitismu houbových hyf, kdy aktinomycety penetrují hostitelskou houbovou hyfu, ve které se větví, což vede ke granulaci a koagulaci cytoplasmy a lyzi hostitelské hyfy (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006). Díky této schopnosti mohou aktinobakterie inhibovat houbové rozkladače i jiným mechanismem než jsou antifungální sloučeniny. Ovšem některé rezistentní houby, které vůči antifungálním sloučeninám

aktinomycet byly odolné, nebyly schopné kolonizovat území, kde se aktinobakterie nacházely jako první navzdory tomu, jak moc byly vůči jejich látkám rezistentní. Pokud se některým houbám přece jen povedlo území primárně osídlené aktinobakteriemi kolonizovat, nemělo to vliv na aktinobakteriální početnost (Jayasinghe et Parkinson, 2009).

Bakterie mohou také pozitivně ovlivňovat houbová společenstva stimulací jejich růstu tím, že produkují růstové faktory, jako jsou například vitaminy, které houby využívají. Produkcí celuláz a pektináz mohou zvýšit dostupnost substrátu pro houby nebo mohou rozkládat látky, které by mohly být pro houby toxické (De Boer et al., 2005). Aktinobakterie mohou rozkládat organický substrát na menší molekuly, které mohou být později rozkládány s pomocí hub (Pometto et Crawford, 1986; Brown et Chang, 2014).

Během fluktuací teplot v této studii se měnilo složení houbového společenstva a bakteriální společenstvo naopak nevykazovalo žádné změny, což poukazuje na odlišné habitaty těchto dvou skupin mikroorganismů (gild). Houby totiž žijí ve větších pórech, kde se během sucha neudrží půdní voda a naopak v malých pórech, které preferenčně obývají bakterie, je tato voda držena kapilární silou. Jiným vysvětlením může být, že jsou bakterie lépe adaptované na změny prostředí. Společenstvo hub se projevilo jako vysoce variabilní během fluktuace srážek. Jsou tedy lepšími indikátory půdní vlhkosti v neextrémních podmínkách prostředí v porovnání s bakteriemi (Kaisermann et al., 2015).

3.7 Aktinobakterie a rozklad

Aktinobakterie jsou ubikvistní mikroorganismy u nichž je známo, že upřednostňují kolonizaci některých částí půdního profilu, jako je například opad, humus nebo povrchy hornin. V gramu půdy byly naměřeny hodnoty několika milionů aktinobakterií a nejfrekventovaněji izolovaným rodem bývá rod *Streptomyces*. V relativně vlhkých, humózních a vápnitých půdách dominují aktinobakterie půdní mikroflóře a jejich počet se v gramu půdy na těchto místech pohybuje kolem deseti milionů. Naopak v místech, která jsou pro ně nevhodná, například v příliš zavodněných půdách, je jejich počet o několik řádů nižší (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006).

Ukázalo se, že se vzrůstající hloubkou půdy a zároveň se snižující se vlhkostí a množstvím organické hmoty, se snižuje i velikost společenstva aktinobakterií (Jayasinghe et Parkinson, 2009). Podobně zjistili i El-Tarabily et Sivasithamparam, (2006), že abundance aktinobakterií pozitivně koreluje s množstvím organické hmoty. Jedná se totiž převážně o chemoorganotrofní, aerobní a mezofilní bakterie, které rostou v neutrálních až alkalických půdách. Stejně tak byla zjištěna vyšší početnost aktinobakterií v opadavém osikovém lese s nižším půdním pH, v porovnání s jedlovým lesem. Rod *Streptomyces* na obou lokalitách dominoval aktinobakteriálnímu společenstvu, nehledě na množství organické hmoty, vlhkosti a hodnotě pH v půdě. Jedlový rostlinný opad mohl hostit méně aktinobakterií pravděpodobně kvůli jeho poměrně horší rozložitelnosti v porovnání s osikovým opadem (Jayasinghe et Parkinson, 2009). Aktinobakterie jsou sezónně proměnlivé. Podle této studie bylo zjištěno, že nejpočetnější byly aktinobakterie v horním půdním horizontu v zimě a že jejich početnost silně fluktuovala v čase i prostoru (Kopecky et al., 2011). Větší množství aktinobakterií produkující antibiotika bylo také nalezeno v rhizosféře v porovnání z okolní půdou (El-Tarabily & Sivasithamparam 2006).

V terestrických ekosystémech nejsou bakterie schopné monopolizovat rozkladné procesy v jako v ekosystémech vodních, neboť je zde jejich vývoj ovlivněn kompeticí s houbovými rozkladači. Půdní prostředí je také odlišné od vodních sedimentů, jejichž póry jsou zcela zaplněné vodou na rozdíl od půdních pórů, které jsou zaplněny vodou i vzduchem. Proto se zde jednobuněčné bakterie pohybují hůře, ale tato nevýhoda je překonána vláknitými bakteriemi, které mají tvar mycelií nebo hyf stejně tak jako houby. Přesto tyto bakterie nejsou dominantními rozkladači v terestrických ekosystémech, protože se například nevyvíjí na odumřelém dřevě, tak jako houby. Mnoho bakterií také není schopno degradovat krystalickou celulosu. Kyselé dřevo a zvýšení kyselosti spojené s činností hub pravděpodobně omezuje produkci aktinobakteriálních extracelulárních enzymů, které nejvíce fungují v neutrálním až alkalickém pH. Zvýšení pH, jako je například amonifikace, naopak podporuje aktinobakteriální rozklad (De Boer et al. 2005; Lavelle et Spain, 2005). Některé aktinobakterie mohou mít výhodu během rozkladu kompostů, během nejvyššího zahřívání jsou schopné tolerovat vyšší teploty a také pH než houby. Efektivita jejich rozkladu je ovšem nižší v porovnání s houbami (Tuomela et al., 2000). Aktinobakterie produkující celulázy a hemicelulázy preferují neutrální až alkalické pH, ale studie od autorů Abdulla et El-

Shatoury (2007) prokázala rychlejší rozklad aktinobakteriální lignocelulózy během snižování pH, což může být vysvětleno tím, že v nižším pH došlo ke změkčení organického substrátu, čímž se usnadnila jeho penetrace.

3.7.1 Rozklad komplexních substrátů aktinobakteriemi

Aktinobakterie jsou schopné rozpouštět lignin podobnou strategií jako houby hnědé hniloby, které tímto způsobem získávají přístup k celulose. To bylo prokázáno především v travinách. Aktinobakterie právě díky schopnosti rozkládat komplexní sloučeniny, mohou být početnější v lesním ekosystému než jiné bakterie (Jayasinghe et Parkinson 2009). Jsou také hlavními rozkladači odumřelých houbových hyf. Vysoký nárůst hub díky dodání substrátu byl později po snížení houbové aktivity doprovázen nárůstem aktinobakterií (De Boer et al., 2005; El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006).

Bylo prokázáno, že spousta bakterií degradujících aromatické sloučeniny jsou schopné rozkládat lignin. Některé další půdní bakterie jako je například *Nocardia*, dokážou rozkládat lignin, také například *Streptomyces viridosporus* T7A depolymerizuje lignin s pomocí extracelulárních lignin peroxidázových enzymů a bifenyly degradující rod *Rhodococcus* rozkládá lignin jako svůj vedlejší produkt. Bakterie rozkládající lignin jsou součástí skupin *Actinobacteria, α-proteobacteria a γ-proteobacteria*. Jejich aktivita je sice nižší, než aktivita hub bílé hniloby, ale srovnatelná s jinými houbami degradujícími lignin (Bugg et al., 2011). *Nocardiopsis* spadající do aktinobakterií je schopná rozkládat celulosu, xylan,chitin, škrob a B-1,3-glukan s pomocí extracelulárních enzymů, díky kterým může rozkládat různé živočišné a rostlinné zbytky. U některých zástupců *Nocardiopsis* byla potvrzena chitinolytická aktivita a šest genů kódujících různé druhy celuláz, což jim dává velký význam v cyklu uhlíku (Bennur et al., 2015) Ve studii Ting et al. (2014) bylo potvrzeno, že aktinobakterie jsou schopné produkovat hydrolytické a lipolytické enzymy, konkrétně amylázu, celulázu a xylanázu. Avšak množství produkovaných enzymů bylo nižší v porovnání s některými půdními bakteriemi jako je například *Bacillus spp*. Prvním produktem rozkladu ligninocelulozy aktinobakteriemi je modifikovaný rozpustný lignin, který se vysráží po okyselení z vodného roztoku, nazývající se „acid-precipitable polymeric lignin“ (APPL). Jedná

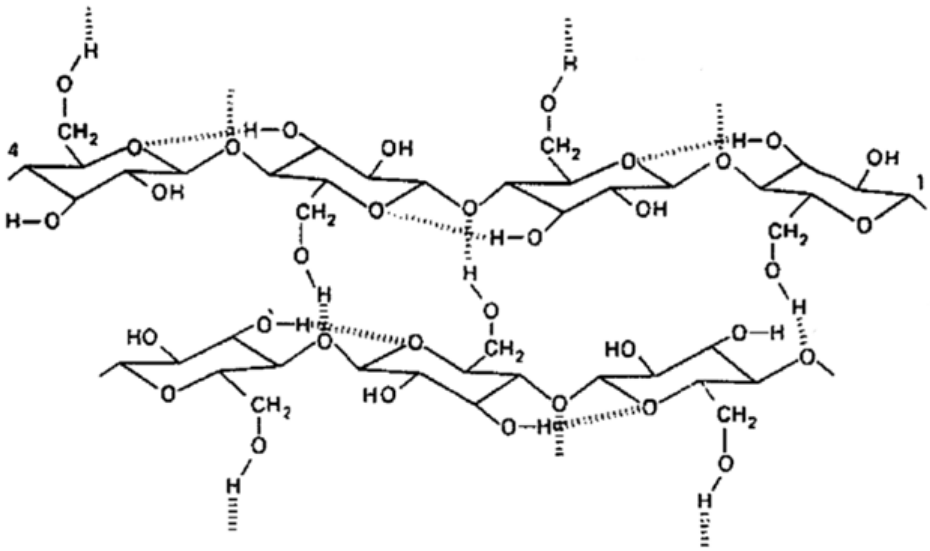
se tedy o degradaci, která není zcela kompletní v porovnání s houbami, ale je možné tímto způsobem reagovat s ligninem, kdy produktem jsou menší aromatické sloučeniny, které jsou schopné bakterie importovat do buňky k aromatickému katabolismu. Bakterie tedy nemají tak účinné oxidativní enzymy jako houby, ale tyto enzymy mohou fungovat synergicky s jinými oxidativními enzymy a poskytnout substrát pro pozdější rozklad (Pometto et Crawford, 1986; Brown et Chang, 2014).

3.8 Rozkladné enzymy

3.8.1Komplexní substráty

V terestrických ekosystémech se musí rostliny chránit proti sluneční radiaci a proti vysychání na rozdíl od vodních rostlin, a proto mají nově vyvinuty některé strukturní prvky jako je například kutin a suberin. Mikroorganismy jsou proto nuceny získávat přístup k takto chráněné organické hmotě obtížnější cestou na souši než ve vodě a jako první krok k jejich k rozkladu, je nutné tyto rostliny penetrovat s pomocí hyfových růstových forem (De Boer et al., 2005).

Celulosa je řetězec glukosových zbytků spojených β-1,4-glykosidickou vazbou. Každá opakující se jednotka řetězce se nazývá glukosa a jednotlivé řetězce jsou vzájemně propojeny vodíkovými vazbami, díky kterým se vytvoří nerozpustné vlákno (Obr. 1). Tato vlákna mohou být asociována s dalšími stavebními složkami jako je lignin, hemicelulosa nebo pektin (Coughlan, 1985).



Obr. 1: Celulosový řetězec (upraveno podle Coughlan (1985))

Hemicelulosa má různorodější strukturu než celulosa a obsahuje několik polymerů, mezi které patří například xylan. Tento polymer je nejpočetnější skupinou hemicelulosy, která překrývá vodíkové vazby v celulose a je kovalentně spojená s ligninem dohromady tvoří vnější ochranný povrch rostliny. Množství xylanu tvoří kolem 30% suché hmotnosti rostlinné buňky, lišící se v závislosti na druhu rostliny (Van Dyk et Pletschke, 2012) Jelikož má hemicelulosa mnohem složitější strukturu než celulosa, slouží k její degradaci více druhů hydrolytických enzymů (Coughlan, 1985).

Lignin zahrnuje 10 – 30% suché hmotnosti z lignocelulosy (Bugg et al., 2011), která se skládá z ligninu a z dalších strukturních složek jako je celulosa, pektin, proteiny, soli a minerály. Více ligninu obsahují dřevnaté části rostlin a jeho složení se mění mezi různým druhem dřeva, ale jeho specifická struktura není zcela známá (Van Dyk et Pletschke 2012).

Celulosa se může rozkládat aerobně i anaerobně. Aerobně dokážou rozkládat celulosu houby i některé půdní vláknité bakterie, kterými jsou *Streptomyces*, *Micromonospora* i nevláknité, např. *Pseudomonas*. Fermentativně ji dokážou rozkládat obligátní anaerobní bakterie a některé houby v gastrointestinálních traktech přežvýkavců (De Boer et al., 2005). Celulosová vlákna se většinou nacházejí ve spojení s dalšími strukturními polymery, zejména s hemicelulosou a ligninem. V závislosti na tom, jak je celulosa z této struktury dostupná, se liší i schopnost enzymů i hydrolyzovat a oddělují se tak i niky mikroorganismů. Rychlost rozkladu celulosy je závislá na její formě, přičemž rychleji se

rozkládá amorfní celulosa v porovnání s krystalickou formou (Knill et Kennedy 2003). Výhodnou strategii proto mají vláknité mikroorganismy, které jsou schopné dostat se k celulosovým vláknům skrz rostlinné póry, kde mohou produkovat celulázu v bližším kontaktu s celulosou (De Boer et al., 2005).

3.8.2 Extracelulární enzymy

Tab. 1: Organické polymery a k nim příslušné rozkladné extracelulární enzymy

Sloučenina	Enzym(y)	Reference
Lignin	Lakáza, Manganová peroxidáza, Peroxidáza	(Bugg et al. 2011)
Hemicelulosa	β-xylosidáza, Endoxylanáza, Glukuronidáza	(Ting et al. 2014)
Celulosa	Celobiohydroláza, Endoglukanáza, β-glukosidáza	(De Boer et al. 2005)
Chitin	N-acetyl-glukosaminidáza (chitináza)	(El-Tarabily and Sivasithamparam, 2006)
Fosfoestery	Kyselá fosfatáza	(A´Bear et al., 2014)
Sulfátové estery	Arylsulfatáza	(Malý et al. 2014)
Škrob	α-glukosidáza	(Kähkönen et Hakulinen, 2011)

Do extracelulárních enzymů patří enzymy hydrolytické, které rozkládající celulosu, hemicelulosu, chitin a další komplexní rostlinné polymery kromě ligninu, který rozkládají především enzymy oxidativní (Tab. 1). Celulázové enzymy, tedy ty rozkládající celulosu, se vyvíjeli u jiných skupin organismů konvergentně směrem ke stejné specifitě substrátu. Struktura těchto enzymů může být tedy mírně odlišná u hub i bakterií, ale jejich funkce je velmi podobná. Aerobní celulolytické bakterie a houby uvolňují extracelulární celulázové enzymy skládající se z endoglukanázy (celulázy), exoglukanázy (celobiohydrolázy) a β-glukosidázy. Celobiohydroláza štěpí celulosu na konci, zatímco endoglukanáza ji štěpí uprostřed. Tyto enzymy fungují synergicky v přeměně celulosy na glukosu (De Boer et al. 2005; Van Dyk et Pletschke, 2012). Synergický účinek hydrolytických enzymů byl zaznamenán u endoglukanázy, exoglukanázy a β-glukosidázy, projevuje se tak, že jejich účinnost je vyšší pokud jsou produkovány společně nežli každý zvlášť (Coughlan, 1985) Endoxylanáza degraduje hemicelulosu na menší oligosacharidy a β-xylosidáza tyto oligosacharidy dále štěpí až na xylan. Glukuronidáza je pomocný enzym štěpící některé substituenty na uhlíkové kostře hemicelulosy. Obecně je známo, že mikroorganismy produkují malé množství celulázy,

které rozloží celulosu na rozpustné produkty, obsahující celobiosu, které mohou být přijaty do buňky, kde jsou pravděpodobně s pomocí β-glukosidázy převedeny na induktory enzymové syntézy (Coughlan, 1985).

Mezi další hydrolytické enzymy rozkládající některé polymery v půdě patří arylsulfatáza, fosfatáza a chitináza. Arylsulfatáza katalyzuje hydrolýzu aromatických esterů na sírany a fenoly, síranové estery jsou hlavní frakcí celkové půdní síry a proto je aktivita arylsulfatázy důležitá pro imobilizaci síranových iontů sloužící jako zdroj síry pro rostliny (Elsgaard et al., 2002). Některé aktinobakterie mohou produkovat enzymy degradující buněčné stěny, jakými jsou například chitináza, vedoucí k lyzi houbových hyf nebo k potlačení jejich germinace. Tímto způsobem se mohou potlačit některé houbové patogeny. Bylo prokázáno, že i s pomocí aplikace celulázy a β-glukosidázy izolované z *Micromonospora carbonacea* byl potlačen houbový patogen způsobující hnití kořenů (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006). Aktivita chitinázy (NAG) by měla vzrůst spolu s úhynem houbových hyf, které hynou s narůstající teplotou, protože degraduje chitin z jejich buněčných stěn (Suseela et al., 2014). β-glukosidáza, β-xylosidáza a celobiohydroláza jsou enzymy, které produkují spíš houby a arylsulfatázu spíše bakterie (Malý et al., 2014).

Klimatické podmínky, půdní pH a dostupnost substrátu ovlivňují enzymovou aktivitu mikroorganismů skrz změnu mikrobiální proliferace a enzymové kinetiky (Kang et Freeman 1999). Přesto u (Suseela et al., 2014) nebyl zaznamenán žádný lineární vztah chitinázy a β-glukosidázy na oteplování. Přesto je obecně známo, že se zvyšující se teplotou a zároveň se snižující se vlhkostí je inhibována aktivita enzymů v půdě. Některé proteolytické enzymy tak mohou snížit svou aktivitu na stepních lokalitách, které jsou na vysychání náchylné. Celulázy a hemicelulázy aktinobakterií nejlépe fungují v neutrálním až alkalickém pH, enzymy hub naopak pracují nejlépe v kyselém pH (De Boer et al., 2005). Toto tvrzení potvrzuje i Caldwell (2005), a zároveň dodává, že většina enzymů hydrolyzujících polysacharidy, jako například fosfatázy a esterázy, mají optimum v kyselém pH. Kyselá fosfatáza byla aktivnější v půdě s pH 6,2, které bylo blíže jejímu optimu než alkalická fosfatáza. Kyselá fosfatáza byla také ovlivněna sezónním vysycháním půdy v zimě a v létě více, než dostupností substrátu (Sardans et al., 2008).

Rozklad ligninu je zprostředkován takovými enzymy, jako jsou například lakáza a peroxidáza anebo kyslíkovými radikály, přičemž tento proces probíhá striktně v aerobním

prostředí. (De Boer et al., 2005) Lakáza je enzym obsahující měď, která je schopná oxidovat široké množství fenolických sloučenin. S její pomocí se depolymerizuje lignin prostřednictvím oxidace menších molekul. Může ale zastávat variabilní role například i ve sporulaci a pigmentaci (Bugg et al., 2011). Manganová peroxidáza oxidující manganaté ionty, je jedním z hlavních peroxidázových enzymů degradující lignin, nachází se především u *Basidiomycetes* kolonizující dřevo (Hofrichter, 2002).

Již dříve se myslelo, že jsou houby schopnější efektivněji v degradaci ligninu v porovnání s bakteriemi. U nevláknitých bakterií navíc nebylo jisté, zdali jsou schopné lipolytické enzymy sekretovat ven z buňky (Gonzalez et Vicuña, 1990). Rozklad ligninu je z velké části nalezen jen u *Bazidiomycetes*, které se souhrnně nazývají houby bílé hniloby a schopnost rozkládat lignin až na CO_2 mají pouze tyto houby (Hofrichter, 2002). Přestože se o bakteriálních lignolytických enzymech ví málo, pravděpodobně bakterie využívají podobné enzymy na depolymerizaci ligninu, jako mají houby. Například byla nalezena houbová lignin peroxidáza in vivo i u aktinobakterie *Corynebacterium equi* ATCC 6939 (Gonzalez and Vicuña, 1990). Široké spektrum aktinobakterií má také schopnost extracelulární peroxidázové aktivity. U bakterií byla také zaznamenána lakázová aktivita (Majumdar et al., 2014). Na rozdíl od hub, mohou mít bakteriální lakázy určitá vylepšení podle toho, z jakých bakterií jsou izolovány, podléhají tedy evoluci. Například některé lakázy mohou mít poločas rozpadu až 14 hodin při 80°C (*Thermus thermophilus*) a jiné jsou zase aktivní v alkalickém pH (*Streptomyces psammoticus*) (Bugg et al., 2011).

4 Materiál a metody

Tab. 2: Shrnutí analýz použitých v diplomové práci a jejich řešitelé.

Metoda	Řešitel(é)
Založení pokusu, měření teploty a vlhkosti, odběry vzorků	RNDr.Markéta Marečková, PhD. ; Ing. Jan Kopecký, PhD. (VÚRV)
Příprava alikvótů, vážení vzorků	Mgr. Veronika Hrdinková (VÚRV)
Analýza půdního pH a obsahu organických látek v půdě	Iveta Slaninová (VÚRV)
Elementární analýza prvkového složení	Botanický ústav AVČR v Třeboni, Aquatest a.s.
Analýza enzymové aktivity rostlinného opadu a stanovení jeho suché hmotnosti	Bc. Andrea Burešová
Izolace chromozomální DNA z půdy a rostlinného opadu, gelová elektroforéza	Bc. Andrea Burešová
Příprava standardu pro aktinobakteriální 16S rRNA	Bc. Andrea Burešová
Příprava standardu pro houbovou 18S rRNA	Ing. Marta Nesvorná (VÚRV)
Transformace buněk, izolace a restrikce plazmidu pro 16S i 18S rRNA genu	Bc. Andrea Burešová
Kvantitativní qPCR pro 16S a 18S rRNA pro vzorky DNA izolované z půdy a rostlinného opadu	Bc. Andrea Burešová
Vyhodnocení výsledků, statistická analýza, grafy	Bc. Andrea Burešová

4.1 Chemikálie

Tab. 3: Rozpis chemikálií, které byly během metod používány a jejich výrobce/dodavatel

Název	**Výrobce/Dodavatel**
Fenol	MP Biomedicals
Chloroform	Lachner
Isoamylalkohol	Penta
Chlorid sodný	Sigma-Aldrich
Octan sodný	Sigma-Aldrich
Isopropylalkohol	p.a. Penta
Etanol	p.a. Penta
Chlorid vápenatý	Sigma-Aldrich
Hepes	Sigma-Aldrich
Agaróza	Sigma-Aldrich
SYBR® Safe DNA Gel Stain	Invitrogen
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas
PCR vkládací pufr Yellow load	Top-Bio
Dimethyl-sulfoxid	Top-Bio; Serva
GoTaq® qPCR MasterMix	Promega
Aktinobakteriální primery	Eurogentec
Houbové primery	Metabion international AG
PCR Nucleotide mix (dNTP)	Roche
BSA	New England Biolabs
Dynazyme II DNA polymeráza	Finnzymes ™
10x Buffer pro DyNAzyme DNA Polymerázu	Thermo Scientific
Tris(hydroxymethyl)aminometan	Serva
Restrikční endonukleáza SalI	New England BioLabs
D-glukosa	Sigma-Aldrich
EDTA	Amersham

MUF substráty	Glycosynth
Dihydrogenfosforečnan sodný	Penta
Yeast extract	HiMedia
Ampicilin	Duchefa
IPTG	Duchefa
X-gal	Duchefa
D-glukosa	Sigma-Aldrich

4.2 Ředění a příprava roztoků

Tab. 4: Složení a příprava jednotlivých roztoků použitých při analýzách

Název	**Složení**	**Množství/koncentrace**
TAE	Tris-acetát EDTA (pH 8)	40 mM 1 mM
LB médium (pH 7,5)	Trypton Yeast extract NaCl dH_2O sterilní	10 g 5 g 10 g 1000 m
Müllerův pufr	NaH_2PO_4 (pH 8) NaCl Tris-HCl (pH 8)	50 mM 50 mM 500 mM
DMAB (25 mM)	DMAB Fosfátový pufr (pH 6,5)	0,0826 g 20 ml

Citrát-fosfátový pufr (pH 5):	Monohydrát kyseliny citronové $Na_2HPO_4.{}_2H_2O$ dH_2O	2,1 g 3,56 g 100 ml
MBTH (1 mM)	MBTH dH_2O	0,0043 g 20 ml
ABTS (0,08 %):	ABTS dH_2O	40 mg 50 ml
$MnSO_4$ (2 mM)	$MnSo_4$. $2H_2O$ dH_2O	0,0169 g 50 ml
EDTA (2 mM)	$Na_2EDTA.2H_2O$ dH_2O	0,074 g 50 ml
Sukcinát-láktátový pufr (100 mM) (pH 4,5)	Kyselina jantarová DL-kyselina mléčná, sodná sůl (60%) dH_2O	0,146 g 1,64 g 100 ml
Acetát pufr	Octan sodný Kyselina octová dH_2O	2,78 g 900 µl 1000 ml
Precipitant (pH 5)	Trihydrát octanu sodného Octan zinečnatý 95% Etanol dH_2O	40g a 4 g 800 ml 200 ml.
Peroxid	dH_2O 30% H_2O_2	85 ml 50µl
Fosfátový pufr (100 mM) pH 6,5	KH_2PO_4 $Na_2HP_4.2H_2O$ dH_2O	0,095 g 0,540 g 100 ml

Azo – CM celulosa	Azo – CM celulosa acetát pufr (2 M, pH 5) azid sodný dH_2O	1g 5 ml 0,02 g 50 ml
azo-xylan	Azo – xylan : dH_2O	1:1
MUFX	MUFX DMSO	0,00846 g 10 ml
MUFG	MUFG DMSO	0,0093 g 10 ml
MUFP	MUFP DMSO	0,00704 g 10 ml
MUFN	MUFN DMSO	0,00379 g 10 ml
MUFC	MUFC DMSO	0,01251 g 10 ml
MUFαG	MUFαG DMSO	0,00846 g 10 ml
MUFU	MUFU DMSO	0,01078 g 10 ml
MUFS	MUFS DMSO	0,00736 g 10 ml
MUF	MUF DMSO (Ředěním v DMSO se připraví 10x a 100x zředěné roztoky MUF/100 a MUF/10)	0,00176 g 10 ml

4.3 Komerční soupravy

GENECLEAN® Turbo Kit – MP Biomedicals

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System - Promega

pGEM®-T Easy Vector Systems – Promega

CloneJET PCR Cloning Kit – Life Technologies

4.4 Oligonukleotidy

Tab. 5: Název a sekvence použitých primerů

Název	Sekvence
EUB518R	5´-ATTACCGCGGCTGCTGG-3´
EUB338F	5´-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3´
Act235F	5´-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3´
FF390	5´-CGATAACGAACGAGACCT -3´
FR1	5´-AICCATTCAATCGGTAIT-3´

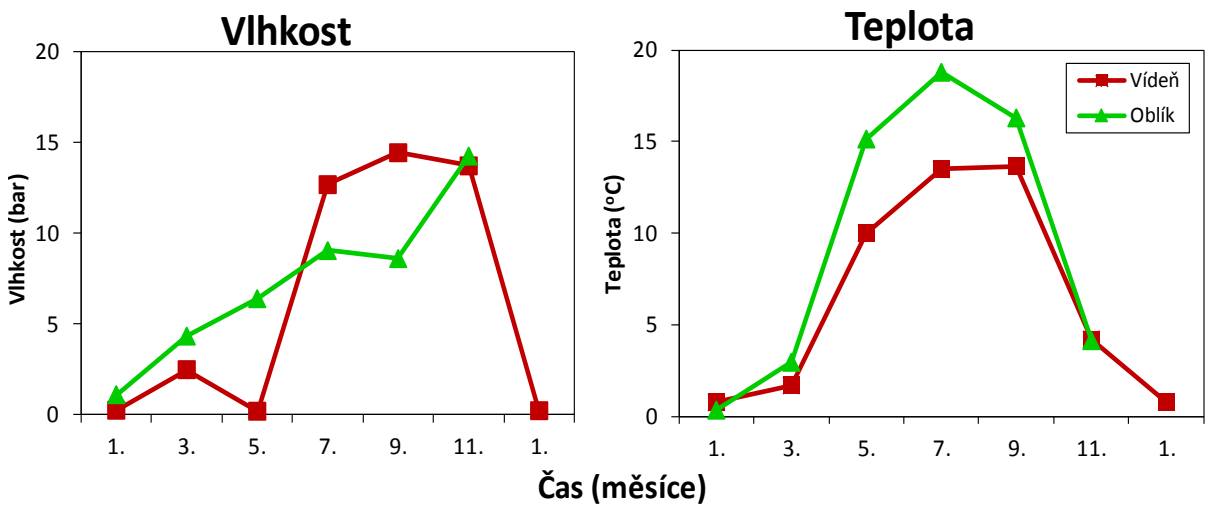
4.5 Popis lokalit a vzorkování

Studie probíhala na dvou kontrastních lokalitách, v bukovém lese u Vídně a na teplomilné stepi Oblík u Loun (Tab. 6). Na Oblíku je dominantní travinný a bylinný porost různého druhového složení. Hodnota pH půdy je 7,9 a množství organického uhlíku v půdě je 4,3% (Sagova-Mareckova et al., 2011). Naopak porost na druhé studované lokalitě v bukovém lese u Vídně je tvořen výhradně bukem lesním (*Fagus sylvatica)* a půda je zde kyselejší, její pH má hodnotu 5,3. Množství organického uhlíku zde bylo naměřeno s hodnotou 11,7%. Průměrná roční teplota na povrchu půdy byla v roce 2011 na Oblíku 9,6°C

a ve Vídni 7,3 °C, průběh teplot a vlhkosti půdy na obou lokalitách je zaznamenán na obrázku2.

Tab. 6: Zeměpisné souřadnice lokalit (Oblík, Vídeň), na kterých experiment probíhal

Lokalita	Souřadnice
Bukový les Dorotheer Wald, Neustift u Vídně (Rakousko)	N 48 14' 43.1", E 16 17' 11.3"
Teplomilná step na vrchu Oblík u Loun (Česká republika)	N 50 24' 39.2", E 13 48' 17.0"



Obr. 2: Měsíční průměrné teploty a vlhkost na povrchu půdy pro jednotlivé měsíce během rozkladu na Oblíku a ve Vídni v roce 2011.

Tab. 7: Název, taxonomické zařazení a místo sběru jednotlivých rostlin použitých při pokusu

Název česky (*název latinsky*)	**třída**	**řád**	**čeleď**	**Místo sběru**
Buk lesní (*Fagus sylvatica*)	Rosopsida	Fagales	*Fagaceae*	Vídeň
Kozinec bezlodyžný (*Astragalus exscapus*)	Rosopsida	Fabales	*Fabaceae*	Oblík
Ostřice nízká (*Carex humilis*)	Liliopsida	Poales	*Cyperaceae*	Oblík

Do polyesterových opadových sáčků (litterbags), o rozměrech 5 x 10 cm a s velikosí ok 1 mm, bylo vloženo 7 g listů buku lesního (*Fagus sylvatica*), nadzemní části ostřice nízké (*Carex humilis*) a kozince bezlodyžného (*Astragalus exscapus*), přičemž listy *Fagus sylvatica* byly sesbírány ve Vídeňské lokalitě a nadzemní části *Carex humilis* a *Astragalus exscapus* na lokalitě Oblík (Tab. 7). Na každé lokalitě se pod opadovou vrstvu uložilo celkem 120 litterbagů (tj. 40 litterbagů od každého rostlinného druhu na každé lokalitě). To znamená, že *Fagus sylvatica* byl autochtonní ve Vídni a alochtonní na Oblíku a *Astragalus exscapus* a *Carex humilis* byly zase autochtonní na Oblíku a alochtonní ve Vídni. Odběry probíhaly každé dva měsíce, první odběr byl proveden v lednu roku 2011 a poslední v lednu 2012. Celkem proběhlo sedm odběrů a během každého odběru bylo odebíráno pět litterbagů od každého druhu rostlinného opadu. Pro srovnání byla během každého ze sedmi odběrů odebírána také okolní půda.

Vzorky byly po vyjmutí z půdy převezeny v přenosném mrazáku do laboratoře. Jednotlivé litterbagy se zvážily, rostlinný opad a půda se rozdělili do sterilních mikrozkumavek pro další analýzy a uložily se do mrazáku do -80°C.

4.6 Fyzikální a biochemické metody

4.6.1Stanovení úbytku hmotnosti a suché biomasy

Stanovení suché hmotnosti bylo provedeno navážením přesného množství rostlinného substrátu do skleněné kádinky. Tento substrát byl vysušen do konstantní hmotnosti při teplotě 60°C. Poměrem hmotnosti vzorku před a po vysušení se vypočítala vlhkost substrátu.

Ke stanovení úbytků hmotností rostlinných opadů se vážily celé opadové sáčky z každého odběru po převezení do laboratoře. Hmotnosti z jednotlivých odběrů byly vynásobeny poměrem hmotností před a po vysušení, čímž se zjistil úbytek suché hmotnosti rostlinných substrátů v čase.

4.6.2 Měření teploty a vlhkosti

Na měření půdní vlhkosti a teploty během rozkladu byl použit detekční přístroj Microlog SP1 od firmy EMS Brno. Na obou lokalitách bylo vloženo teplotní čidlo i sádrový tělísko, zaznamenávající půdní vlhkost, 10 cm pod půdní povrch tak, aby byl zcela přikryt půdou. Přístroj zaznamenával hodnoty každou hodinu v průběhu celého pokusu, na konci byla data zpracována pomocí počítačového programu EMS universal software version 4.3.21.0. Z naměřených dat se vypočítaly průměrné měsíční teploty (°C) a vlhkost (bar) půdy za sledované období.

4.6.3 Měření pH a obsahu organické hmoty v půdě

Půdní pH bylo měřeno ve vodném roztoku, kdy se smíchalo 5 g půdy s 20 ml dH_2O a směs se nechala přes noc odstát. Další den byla změřena s pomocí pH metru pH vodného roztoku. Obsah organické hmoty v půdě byl stanoven jako rozdíl mezi hmotností vysušené půdy před a po spálení při 500°C do konstantní hmotnosti, hodnota bylo přepočítána na procenta.

4.6.4 Elementární analýza prvkového složení

Ke stanovení celkového obsahu uhlíku a dusíku na vzorcích rostlinného opadu, bylo třeba navážit 2 g usušeného zhomogenizovaného vzorku, který byl poté analyzován v přístroji pro analýzu prvků CNS analyzer (Elementar Analysensysteme, Německo). Analýza proběhla na zakázku ve firmě Aquatest a.s.

Obsah fosforu byl stanoven ve 20 mg vysušeného vzorku opadu, který byl sekvenčně rozkládán za pomoci HNO3 a HClO4. V mineralizovaných vzorcích byl obsah fosforu analyzován průtokovou injekční analýzou se spektrofotometrickou detekcí, použitím FIA

Lachat QC 8500 analyzéru (Lachat, Instruments, Hach Company, Colorado). Analýza proběhla na zakázku v Botanickém Institutu v Třeboni.

4.6.5 Stanovení enzymové aktivity

Ve vzorcích rostlinného opadu se analyzovala enzymová aktivita dvou oxidativních a deseti hydrolytických enzymů. Mezi stanovené oxidativní enzymy patří lakáza a manganová peroxidáza. Stanovované hydrolytické enzymy, které byly stanoveny se dělí na endoenzymy, které štěpí řetězec uprostřed a exoenzymy, které jej štěpí na kraji. Stanovované endoenzymy enzymy, jejichž aktivita byla měřena, jsou endoxylanaza a endoglukanaza a mezi exoenzymy enzymy patří β – xylosidaza, β – glukosidáza, kyselá fosfatáza, chitináza, celobiohydroláza, α – glukosidáza, glukuronidaza a arylsulfataza (Tab. 8). Pro analýzu oxidativních a endocelulázových enzymů bylo třeba použít odsolený vzorek. Analýza byla provedena podle protokolu od Baldrian (2009).

Tab. 8: Název a druh analyzovaného rozkladného enzymu a k němu příslušný substrát

Název enzymu	**Druh enzymu**	**substrát**
β - xylosidaza	Hydrolytický exoenzym	MUFX
β – glukosidáza	Hydrolytický exoenzym	MUFG
Kyselá fosfatáza	Hydrolytický exoenzym	MUFP
Chitináza	Hydrolytický exoenzym	MUFN
Celobiohydroláza	Hydrolytický exoenzym	MUFC
α – glukosidáza	Hydrolytický exoenzym	MUFαG
Glukuronidaza	Hydrolytický exoenzym	MUFU
Arylsulfataza	Hydrolytický exoenzym	MUFS
Endoxylanaza	Hydrolytický endoenzym	Azo-xylan

Endoglukanaza	Hydrolytický endoenzym	Azo – CM celulosa
Manganová peroxidáza	Oxidativní	AR, AP, AB
Lakáza	Oxidativní	ABTS

4.6.5.1 Stanovení aktivity hydrolytických exoenzymů

Hydrolytické enzymy, které štěpí polysacharidový řetězec na kraji, byly stanoveny spektrofotometricky s využitím fluorescenčně značených substrátů. Fluorescence se dala pozorovat po enzymatickém štěpení substrátu.

Do plastových Erlenmeyerových baněk bylo naváženo 0,5 g rostlinného substrátu. Přidalo se 50 ml acetátového pufru a na střední rychlost se vzorek homogenizoval na UltraTurraxu (IKA Labortechnik, Německo) po dobu 45 sekund.

Na plastovou mikrotitrační destičku s 96 jamkami se do příslušných jamek přidalo 40 µl substrátů (MUFG, MUFC, MUFX, MUFN, MUFU, MUFP, MUFS a MUFαG) podle tabulky 9. K substrátům MUFG a MUFP se navíc přidalo ještě 20 µl DMSO. Standardů (MUF, MUF/10, MUF/100 ředění v DMSO) se do posledních tří sloupců přidalo takové množství, jaké je uvedeno v tabulce č. 9. S pomocí vícekanálové pipety se k substrátům a standardům do každé jamky napipetovalo 200µl vzorku. Takto připravené destičky byly inkubovány v termostatu při teplotě 40°C. Po 5 a 125 minutách byla změřena fluorescence při vlnové délce excitace 355 nm a emise 460 nm na přístroji TECAN Austria s využitím softwaru Magellan. Mezi měřeními byly vzorky inkubovány při 40°C.

Tab. 9: Mikrotitrační destička s umístěním substrátů a kalibračních roztoků

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
A	1 MUFG	1 MUFG	1 MUFG	2 MUFG	2 MUFG	2 MUFG	3 MUFG	3 MUFG	3 MUFG	1	2	3
B	1 MFC	1 MFC	1 MFC	2 MFC	2 MFC	2 MFC	3 MFC	3 MFC	3 MFC	1 10µl MUF/100	2 10µl MUF/100	3 10µl MUF/100
C	1 MUFX	1 MUFX	1 MUFX	2 MUFX	2 MUFX	2 MUFX	3 MUFX	3 MUFX	3 MUFX	1 20µl MUF/100	2 20µl MUF/100	3 20µl MUF/100
D	1 MUFN	1 MUFN	1 MUFN	2 MUFN	2 MUFN	2 MUFN	3 MUFN	3 MUFN	3 MUFN	1 50µl MUF/100	2 50µl MUF/100	3 50µl MUF/100
E	1 MUFU	1 MUFU	1 MUFU	2 MUFU	2 MUFU	2 MUFU	3 MUFU	3 MUFU	3 MUFU	1 20µl MUF/10	2 20µl MUF/10	3 20µl MUF/10
F	1 MUFP	1 MUFP	1 MUFP	2 MUFP	2 MUFP	2 MUFP	3 MUFP	3 MUFP	3 MUFP	1 50µl MUF/10	2 50µl MUF/10	3 50µl MUF/10
G	1 MUFS	1 MUFS	1 MUFS	2 MUFS	2 MUFS	2 MUFS	3 MUFS	3 MUFS	3 MUFS	1 10µl MUF	2 10µl MUF	3 10µl MUF
H	1 MUFαG	1 MUFαG	1 MUFαG	2 MUFαG	2 MUFαG	2 MUFαG	3 MUFαG	3 MUFαG	3 MUFαG	1 20µl MUF	2 20µl MUF	3 20µl MUF

4.6.5.2 Odsolení

Odsolením se z roztoku odstraní sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností, jako jsou kovy a humínové látky, které inhibují analýzu oxidativních enzymů a hydrolytických enzymů štěpících řetězec uprostřed (Baldrian, 2009).

Nejdříve se 5 ml vzorku v acetátovém pufru z předchozího kroku přefiltrovalo přes filtrační papír do čisté zkumavky. Na odsolení byly použity odsolovací kolony PD-10 (Pharmacia, Švédsko) postupovalo se podle výrobního protokolu. Nejdříve se do kolon naneslo 3,5 ml dH_2O, které kolonu promyly a odtekly do připravených kádinek. Když voda odtekla, naneslo se 2,5 ml přefiltrovaného vzorku, který vodu z kolony vytlačil. Kádinky s vodou se po té vyměnili za zkumavky na vzorky. Do kolony se naneslo 3,5 ml dH_2O a vzorek vytékal z kolony do připravené zkumavky. Poté se zkumavky se vzorkem uchovaly na další analýzu a kolona se znovu promyla 3,5 ml dH_2O.

4.6.5.3 Stanovení aktivity hydrolytických endoenzymů

Do dvou 1,5 ml eppendorfek se přidalo 150 µl odsoleného vzorku. Do jedné eppendorfky se ke vzorku přidalo 150 µl substrátu na měření endoglukanazy (azo-CM celulosa: karboxymetyl celulosa) a do druhé 150 µl substrátu na měření endoxylanazy (azo-xylan: xylan z březového dřeva). Postup přípravy substrátů je uveden v tabulce č. 10. Tři eppendorfky pro endoxylanazu a tři pro endogklukanazu byly použity jako BLANK a místo vzorku do nich bylo nepipetováno 150µl dH_2O. Vzorky se promíchaly na vortexu na střední rychlost po 3 sekundy a nechaly se inkubovat na 1 hodinu při 40°C. Potom se přidalo 750 µl precipitantu, a tím se reakce zastavila. Vzorky se promíchaly a vložily do centrifugy na 10 minut při 10 000 x g. Poté se spektrofotometricky měřily při 595 nm v 1000 µl plastové kyvetě, kdy množství uvolněného barviva do roztoku pozitivně koreluje s množstvím uvolněných naštěpených cukrů.

Tab. 10: Postup přípravy substrátů pro stanovení endoenzymů (Azo-CM celulosa a Azo-xylan) a příprava precipitantu

Azo – CM celulosa
1. Navážit 1g substrátu Azo – CM celulosa do Erlenmeyerovy baňky 2. Předehřát dH_2O na 85-90°C a přidat 40 ml k substrátu 3. Rozpustit ve vodě po dobu 15 minut, míchat 4. Přidat 5 ml acetát pufru (2 M, pH 5) 5. Doplnit dH_2O na 50 ml 6. Přidat 0,02 azidu sodného 7. Uchovávat v chladu maximálně 12 měsíců
Azo-xylan
1. Azo – xylan zředit 1:1 s dH_2O
Precipitant
1. 40g trihydrát octanu sodného a 4 g octanu zinečnatého rozpustit ve 150 ml dH_2O. 2. Upravit na pH 5 s pomocí HCl. 3. Přidat dH_2O na 200 ml. **4.** Přidat 800 ml 95% Etanolu.

4.6.5.4 Stanovení aktivity oxidativních enzymů

Lakáza

Pro stanovení lakázové aktivity se nejdříve nepipetovalo 50 µl odsoleného vzorku do čtyř jamek na plastovou mikrotitrační destičku. Do každé jamky se ke vzorku přidalo 150 µl citrát – fosfátového pufru a 50 µl ABTS. Potom se co nejrychleji destička spektrofotometricky měřila na přístroji TECAN Austria při laboratorní teplotě, nejdříve 30 x 7 sekund a pak 2 x 7 minut při 420 nm.

Manganová peroxidáza, peroxidáza a oxidáza

Nejdříve bylo třeba namíchat peroxid a substráty AR, AP a AB, jejich složení pro jeden vzorek je uvedeno v tabulce č. 11. Substráty a peroxid nelze uchovávat pro další stanovení, vždy se míchají nové. Do dvanácti jamek na mikrotitrační destičku se napipetovalo 50 µl odsoleného vzorku a vždy do čtyř jamek se vzorkem bylo nepipetováno 200 µl každého substrátu AR, AP a AB. Destička byla potom ihned spektrofotometricky změřena na přístroji TECAN Austria při laboratorní teplotě 3 x 7 minut při 595 nm.

Tab. 11: Postup přípravy substrátů (AR, AP, AB) pro stanovení aktivity manganové peroxidázy, peroxidázy a oxidázy.

	AR	**AP**	**AB**
Sukcinát – laktát pufr	580 µl	580 µl	580 µl
DMAB	70 µl	70 µl	70 µl
MBTH	38 µl	38 µl	38 µl
$MnSO_4$	38 µl	-	-
Peroxid	38 µl	38 µl	-
EDTA	-	38 µl	38 µl
dH_2O	-	-	38 µl

4.7 Molekulární metody

4.7.1 Izolace chromozomální DNA z půdy a z rostlinného opadu

Izolace chromozomální DNA byla provedena podle protokolu Sagova-Mareckova et al., (2008) Do 2ml šroubovacích zkumavek se navážilo 0,5 g směsi kuliček o průměru 0,1 mm a 0,5 mm. Po jejich vysterilizování do nich bylo naváženo 0,5g vzorku půdy (rostlinného opadu 0,1 g) a přidalo se 600 µl Müllerova extrakčního pufru a 300 µl směsi fenolu:chlororoformu:izoamylalkoholu v poměru 25:24:1 (k opadu se přidalo 114 µl fenolu a 150 µl směsi chloroform:izoamylalkohol v poměru 24:1). Zkumavky byly vloženy do mlýnku (3110 BX Mini-NeadBeater-1, BioSpec), a po dobu 90 sekund při 2 500 kmitech za minutu probíhala homogenizace směsi (opad byl homogenizován 2 minuty při 4 000 kmitech za minutu). Vzorky se nechaly v centrifuze odstředit na 2 minuty při 12 000 x g a odstředěný supernatant byl odebrán do čistých 2ml zkumavek. Do zkumavek, ze kterých byl odebrán supernatant, se opět přidal Müllerův pufr, ale tentokrát jen 300 µl, a poté byly vloženy do mlýnku na 30 sekund při 2 500 kmitech za minutu. Zkumavky byly znovu vloženy do centrifugy na 2 minuty při 12 000 x g a odstředěný supernatant byl přidán k odebranému supernatantu z předchozího kroku.

K supernatantu se přidal stejný objem směsi fenol:chloroform v poměru 1:1 jako byl objem vzorku ve zkumavce. Vzorky se důkladně promíchaly a centrifugovaly se 5 minut při 3 000 x g. Poté byl opět odebrán supernatant, ke kterému se přidalo stejné množství chloroformu, jako bylo odebraného supernatantu. Po pečlivém promíchání se nechaly vzorky opět odstředit na 5 minut při 3 000 x g a znovu byl odebrán supernatant do čistých zkumavek. Ty se nechaly zahřát v termobloku na 65 °C a pak se do každé zkumavky přidal 5 M roztok chloridu sodného až na výslednou koncentraci 1,5 M a 10% CTAB do výsledné koncentrace 1%. Vzorky se nechaly inkubovat v termobloku na dobu 30 minut při 65°C. Po této době se ochladily na ledu přibližně na 20°C a přidal se k nim stejný objem chloroformu, jako byl objem vzorku. Směs ve zkumavkách se pečlivě promíchala a byla vložena do centrifugy na 15 minut při 2 000 x g. Po této době se do čisté zkumavky odebrala vodná fáze. K ní se přidalo 10% objemu 3 M roztoku octanu sodného (pH 5) a 60% objemu

izopropylalkoholu. Vzorky byly promíchány a nechaly se inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byly vzorky centrifugovány v centrifuze nastavené na 4 °C na 20 minut při 10 000 x g.

Po vyjmutí z centrifugy se slil supernatant opatrně, aby peleta zůstala ve zkumavce. K ní se přidalo 50 µl vychlazeného 70% etanolu, který ji promyl. Následně byly vzorky stočeny v centrifuze při 4 °C po dobu 5 minut při 10 000 x g. Etanol se slil a peleta byla vysušena ve vakuové odparce při teplotě 40 °C. Poté bylo přidáno 50 µl destilované vody a DNA byla rozpouštěna po dobu 60 minut při teplotě 65 °C. Nakonec se přidal stejný objem 1 M roztoku směsi chloridu vápenatého s Hepes a směs byla inkubována po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci se DNA přečistila pomocí GENECLEAN® Turbo kit (MP Biomedicals, Solon, USA).

Přečištění bylo provedeno podle protokolu komerční sady. Do extrahované DNA byl přidán pětinásobný objem roztoku GeneClean Turbo Salt Solution a vzorky byly pak promíchány. Poté byl objem (přibližně 580 µl vzorku) jednotlivých zkumavek přenesen na přečisťovací kolonku se sběrnými zkumavkami. Ty se vložily do centrifugy asi na 5 sekund při 13 500 x g. Obsah sběrných zkumavek se vylil a filtr kolonky se opět nasadil zpět na sběrnou zkumavku. Do filtru se naneslo 500 µl roztoku GeneClean Turbo Wash, a pak byly vzorky opět centrifugovány na 5 sekund při 13 500 x. Opět se vylil obsah sběrných zkumavek. Do filtrů se naneslo opět 500 µl roztoku GeneClean Turbo Wash a vzorky byly centrifugovány po dobu 5 sekund při 13 500 x. Po vylití obsahu sběrných zkumavek byly vzorky opět centrifugovány na 4 minuty při 13 500 x g, aby se z kolonek odstředil přebytečný roztok. Kolonky byly poté přeneseny do čistých mikrozkumavek a na filtr se naneslo 50 ul roztoku GeneClean Turbo Elution Solution, který byl předem ve vodní lázni ochlazen přibližně na 37 °C. Vzorky se nechaly při laboratorní teplotě inkubovat 5 minut. Potom se vzorky stočily v centrifuze na 1 minutu při 13 500 x g, čímž se izolovaná DNA uvolnila z filtru do mikrozkumavky. Přečištěná DNA byla uložena v – 80 °C.

4.7.2 Elektroforéza

Elektroforéza v agarozovém gelu byla použita k ověření výsledků extrakce DNA a PCR reakce. Na 50 ml agarozového byla potřeba smíchat 50 ml TAE pufru a 0,5 g agarozy a nechat v mikrovlnné troubě rozpustit a pak pod tekoucí vodou lehce zchladit. Do roztoku se přidalo 5 µl SYBR Safe DNA Gel Stain (v DMSO v poměru 1:9). Roztok se nalil do formy a byl ponechán asi 30 minut v laboratorní teplotě. Ztuhlý gel se vložil do elektroforézové aparatury s TAE pufrem. Do každé jamky se nanesl 1 µl vzorku DNA smíchaný s 2 µl pufru Yellow load. Do jedné jamky v gelu se naneslo 5 µl markeru GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder s jehož pomocí byla určena velikost a množství vzorku. Po nanesení vzorů na gel byla spuštěna elektroforéza při konstantním proudu 100 V a napětí 95 mA po dobu 20 minut. Poté byl gel vyhodnocen na UV transluminátoru.

4.7.3 Kvantitativní PCR (qPCR)

4.7.3.1 Příprava standardu a transformace buněk

Na výrobu standardu kvantitativní PCR pro aktinobakterie byl použit kmen *Streptomyces europaeiscabiei DMS* 41802. S tímto kmenem byla nejdříve provedena PCR reakce s obecnými bakteriálními primery.

Pro výrobu standardu kvantitativní PCR pro houby, jehož sekvence má 100% identitu s různými kmeny *Penicillium sp.*, byla použita DNA izolovaná z environmentálního klonu. Nejdříve proběhla qPCR reakce s pomocí houbových primerů.

Vzorky pro 16S rRNA byly přečištěny sadou QIAquick® PCR Purification Kit a naklonovány do vektoru komerční sady pGEM®- T Easy Vector Systems od společnosti Promega podle protokolu. Narostlé klony pro houbový i aktinobakteriální standard byly očkovány do sterilního tekutého LB media s přídavkem amplicinu o koncentraci 100 $\mu g.ml^{-1}$. Misky byly třepány 200 rpm 16 hodin při 37°C.

Vzorky se po 16 hodinách stočily v centrifuze a medium se odlilo. Vzorky se několikrát promyly destilovanou vodou a plazmid byl izolován.

4.7.3.2 Izolace plazmidu

Izolace byla provedena podle protokolu komerční sady Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. K peletě buněk ve zkumavce bylo přidáno 250 µl *Cell Resuspension Solution* a obsah byl promíchán. Poté se přidalo 10 µl *Alkaline Protease Solution* a vzorky se opět promíchaly. Vzorky se nechaly inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Pak se přidalo 350 µl *Neutralization Solution* a vzorky se stočily v centrifuze na 10 minut při 14 000 x g. Odebral se čistý lyzát do zkumavek s filtry na kterých se vzorek zachytil a přidalo se 750 µl *Wash Solution*. Vzorky se vložily do centrifugy na 1 minutu při 14 000 x g. Přidalo se 250 µl *Wash Solution* a vzorky se centrifugovaly 2 minuty při 14 000 xg. Filtry se nasadily na čisté zkumavky a do filtru se naneslo 100 µl sterilní destilované vody, kterou se vzorek z filtru vymyl do zkumavky. Vzorky se vložily do centrifugy na 1 minutu při 14 000 x g. Poté se filtry ze zkumavek odebraly a produkt izolace ve zkumavkách byl zkontrolován na gelové elektroforéze.

4.7.3.3 Štěpení plazmidu restrikční endonukleázou SalI

K 50 µl izolovaného plazmidu bylo přidáno 60 µl pufru a reakční objem byl doplněn na 590 µl sterilní destilovanou vodou. Přidalo se 5 µl restrikčního enzymu SalI (pro houby i aktinobakterie). Vzorky se promíchaly a nechaly se inkubovat 90 minut při 37°C. Po této době se opět přidalo 5 µl restrikčního enzymu SalI a za občasného míchání se vzorky nechaly inkubovat dalších 90 minut při 37°C. Na elektroforézový gel se nanesl 1 µl vzorku. Vzorek byl správně naštěpen v případě, že se na gelu objevil nerozmazaný, jasně ohraničený proužek. V tom případě se provedla inaktivace zahřátím vzorku na 65°C po dobu 20 minut, čímž se ukončila restrikce. Vzorky byly poté přečištěny.

4.7.3.4 Přečištění naštěpeného plazmidu fenolem a chloroformem

Ke směsi po štípání se přidalo v poměru 1:1 směs fenol:chloroform:izoamylalkohol (v poměru 25:24:1) a 1-2 minuty se vzorky promíchaly na vortexu a pak se vložily do centrifugy na 2 minuty při 3 000 x g. Odebrala se horní vodná fáze do čisté ependorfky, ke které se přidalo v poměru 1:1 směs chloroform/izoamylalkohol (poměr 24:1). Po promíchání na vortexu se vzorky vložily do centrifugy při 3 000 x g. Odebrala se vodná fáze, ke které se přidal 10% z původního objemu vzorku 3 M octan sodný a 70% z původního objemu vzorku vychlazeného izopropylalkoholu. Po promíchání se vzorky nechaly inkubovat 20 minut na ledu. Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 20 minut při 10 000 x g při teplotě 4°C. Po centrifugaci se slil supernatant a peleta na dně ependorfky se promyla 100 µl vychlazeného 70% etanolem. Vzorky se opět centrifugovaly po dobu 10 minut při 10 000 x g při teplotě 4°C. Etanol se slil a a vzorky se vysušily při 40°C ve vakuové odparce. Ke vzorkům přidalo 100 µl 10 mM roztoku TRIS (pH 8) a DNA se rozpouštěla 60 minut při 60°C. Nakonec se nanesl 1 µl vzorku na elektroforezový gel a stanovila se koncentrace standardu. Standardy se rozdělily na alikvoty po 10 µl a uložily se do mrazáku do -80°C.

4.7.3.5 Kvantitativní PCR (qPCR)

Pro qPCR byla namíchána rekční směs, jejíž složení pro jeden vzorek je uvedeno v tabulce č. 12. Pro každý běh reakce byla namíchána ředící řada standardu. Pro stanovení počtů kopií genu pro 16S rRNA u aktinobakterií byly použity primery Act235F a Eub518R, jejich sekvence jsou uvedeny v tabulce č. 5. Standard byl připraven naklonováním genu 16S rRNA z kmene *Streptomyces europaeiscabiei* DMS 41802. Pro stanovení počtu kopií genu pro 18S rRNA u hub byly použity primery FF390 a FR1, jejichž sekvence jsou uvedeny v tabulce č. 5. Standard byl připraven naklonováním genu 18S rRNA z environmentálního klonu.

Nejdříve byla připravena reakce pro stanovení hub a pak aktinobakterií. Do každé jamky 96-ti jamkové destičky speciálně určené pro kvantitativní PCR bylo nepipetováno 10 µl namíchané směsi. Vždy dva sloupce v destičce po osmi jamkách byly vyhrazeny pro standard, který byl naředěn desítkovou ředící řadou v 10 mM TRIS. Na destičku pro stanovení hub se

naneslo do první jamky 0,55 ng, do druhé 0,055 ng a do dalších jamek vždy 10x menší množství standardu až do sedmé jamky, kde byla koncentrace nejnižší. Osmá jamka sloužila jako negativní kontrola a místo standardu se nanesla voda. Na destičku pro stanovení aktinobakterií se do první jamky naneslo 1,25 ng standardu, do druhé jamky desetkrát méně (0,125 ng) a tak dále až do sedmé jamky a osmá sloužila opět jako negativní kontrola. Totéž bylo naneseno do druhého sloupce určeného pro standard. Vzorky DNA byly naneseny vždy ve třech opakováních, nanáška DNA byla celkem 5 µl vzorku o koncentraci 2 ng. μl^{-1}. Rozpis reakce pro amplifikaci genu pro 18S rRNA hub a 16S rRNA aktinobakterií je popsán v tabulkách č. 13 a 14. Po ukončení reakce byla data dále zpracována.

Tab. 12: Namíchání reakční směsi pro qPCR reakci stanovení počtu genů 16S/18S rRNA pro aktinobakterie a houby

	Objem reakční směsi pro 1 vzorek		**koncentrace**	
	Aktinobakterie	Houby	Aktinobakterie	Houby
PCR master mic (Promega)	7,5	7,5		
Přímý primer	0,3	0,9	10µM	10µM
Zpětný primer	0,3	0,9	10µM	10µM
Sterilní dH_2O	1,9	0,7		

Nejdříve se data upravila přímo v programu StepOne Software v 2.2.2. Zkontrolovala se kalibrační křivka, jejíž směrnice by se měla pohybovat kolem hodnoty -3,3. Podle této křivky lze vyvodit, jestli došlo k správnému naředění standardu a zda nedošlo k chybě při přípravě. Správně by všechny body představující jednotlivé ředění standardu měly ležet na přímce se směrnicí -3,3 ve stejných vzdálenostech od sebe. Vychází se z předpokladu, že by v ideálním případě produkt vznikal se stoprocentní účinností a směrnice je tak -3,3. Pokud má přímka vyšší sklon, produkt nevzniká s dostatečnou účinností. Standardy slouží k tomu, aby se vytvořila chybná směrnice. Dále se zkontrolovala křivka tání, která by měla mít jeden vrchol a měla by mít pro všechny vzorky zhruba stejný tvar. Pokud by měla více vrcholů nebo by teplota tání byla příliš nízká, znamenalo by to, že nevznikl správný produkt

Tab. 13: Protokol reakce pro amplifikaci aktinobakteriálních genů 16S rRNA

Krok	Teplota	Doba trvání	Počet opakování
Iniciace	95°C	10 minut	1x
Denaturace	95°C	15 sekund	45x
Nasedání primerů	56°C	30 sekund	
Syntéza	72°C	30 sekund	
Denaturace	95°C	15 sekund	1x
Nasedání primerů	56°C	60 sekund	1x
syntéza	72°C	15 sekund	1x

Tab. 14: Protokol reakce pro amplifikaci houbových genů 18S rRNA

Krok	Teplota	Doba trvání	Počet opakování
iniciace	95 °C	10 minut	1×
denaturace	95 °C	15 sekund	45×
nasedání primerů	50 °C	30 sekund	
syntéza	72 °C	30 sekund	
denaturace	95 °C	15 sekund	1×
nasedání primerů	50 °C	60 sekund	1×
syntéza	72 °C	15 sekund	1×

4.8 Statistické vyhodnocení výsledků

Na statistické vyhodnocení výsledků byl použit softwaru STATISTICA 12 (Statsoft). Vstupní hodnoty zahrnovaly závislé proměnné, které zahrnovaly aktivity enzymů, hmotnost, aktinobakteriální a houbové kopie genů rRNA a jako nezávislé proměnné sloužily data pro čas, lokalitu a druh rostlinného opadu. Nejprve byla provedena analýza variance s interakcemi (ANOVA), kde bylo třeba některá data logaritmicky transformovat, aby dosáhla normálního rozdělení. Jednalo se konkrétně o hodnoty aktivity enzymů a počtů kopií genů 16S a 18S rRNA pro houby a aktinobakterie, hmotnost vykazovala normální rozložení chyb a tak tato data nemusela být transformována. Byla vypočítána p hodnota pro $\alpha<0,05$, určena statistická významnost rozdílem jednotlivých závisle proměnných na faktorech času, lokality a druhu rostliny. Pro vztah mezi hmotností, houbami, aktinobakteriemi a interakcí rostliny a

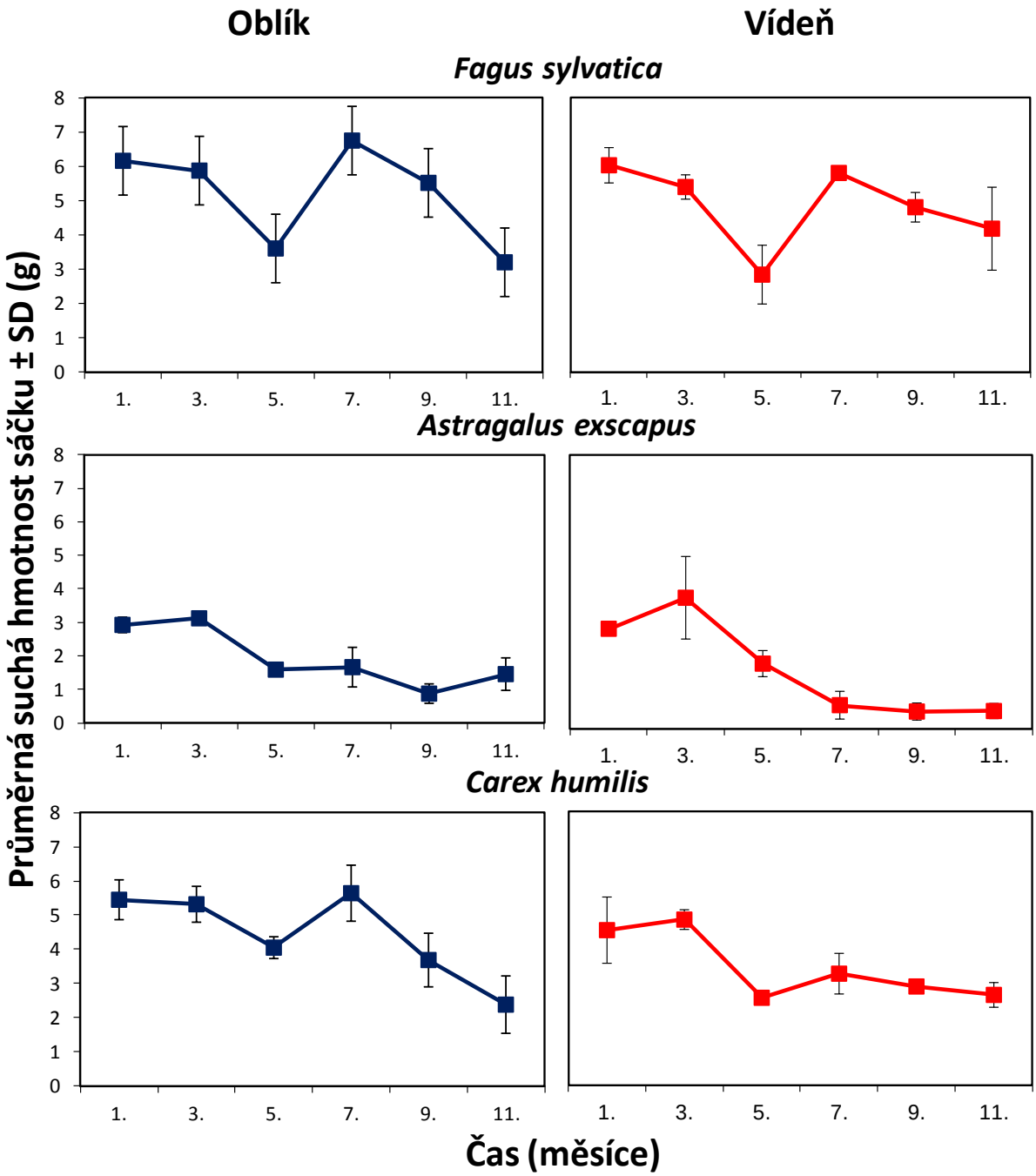
lokality, byly zkonstruované grafy pro vizualizaci tohoto vztahu a pro porovnání rozdílů mezi jednotlivými rostlinami a lokalitami. S netransformovanými daty byla vypočítána Spearmanova neparametrická korelace, který ukázala vzájemnou korelaci mezi závislými proměnnými nabývající hodnot <-1,1>, na hladině významnosti $\alpha<0,05$.

PCA analýza hlavních komponent byla použita pro určení korelace mezi jednotlivými proměnnými. Vstupní kvantitativní proměnné byly opět stejným způsobem transformovány pro dosažení normálního rozdělení jako pro analýzu ANOVA s interakcemi. V software STATISTICA 12 byla zvolena vícerozměrná analýza hlavních komponent, která ukazuje vztah mezi zvolenými proměnnými v závislosti na vzájemné poloze šipek. Pokud svírají pravý úhel, mezi dvěma proměnnými je nulový vztah, pokud svírají ostrý úhel, je mezi nimi pozitivní a pokud tupý, tak negativní korelace. S pomocí programu STATISTICA 12 byl zkonstruován bodový graf mezi enzymovou aktivitou logaritmicky transformovaných enzymů a hmotností, která sloužila k vizualizaci rozdílů mezi aktivitami všech sledovaných enzymů.

S pomocí softwaru CANOCO 4.5 byla vypočítána unimodální nepřímá analýza (CA) pro všechny enzymy, která ukazuje, jak se jednotlivé enzymy od sebe liší v závislosti na tom, jak jsou od sebe jednotlivé body představující daný druh enzymu vzdálené v grafu vytvořeném v programu CANODRAW.

5 Výsledky

5.1 Úbytek suché hmotnosti

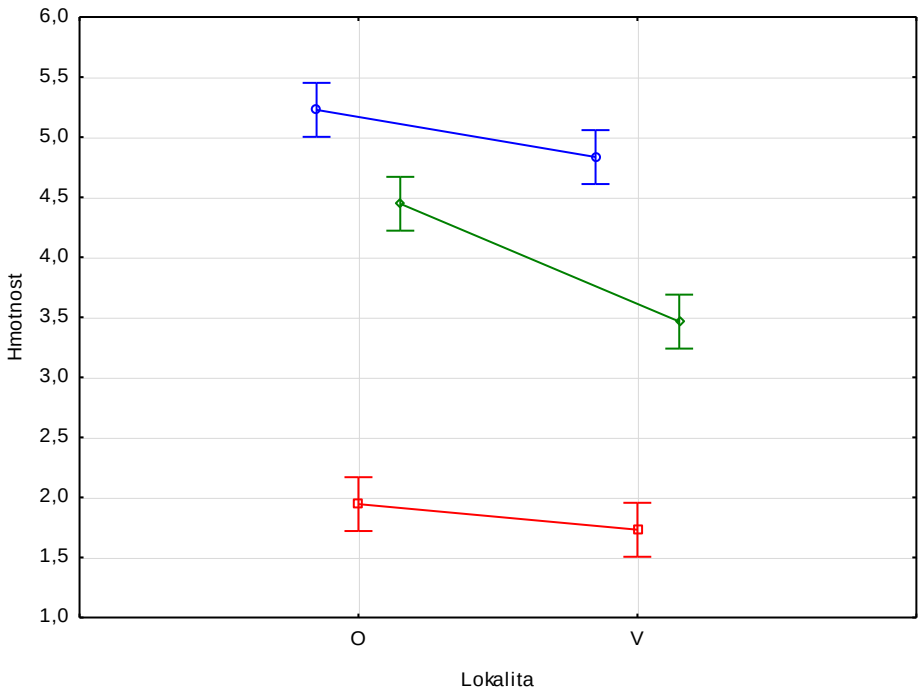


Obr. 3: Suchá hmotnost tří rostlinných druhů opadu na Oblíku a ve Vídni během jednotlivých měsíců rozkladu v letech 2011-2012. Jsou uvedeny průměry z pěti opakování a směrodatné odchylky

Tab. 15: Faktoriální ANOVA pro hmotnost a faktory rostliny, času a lokality a jejich interakce.

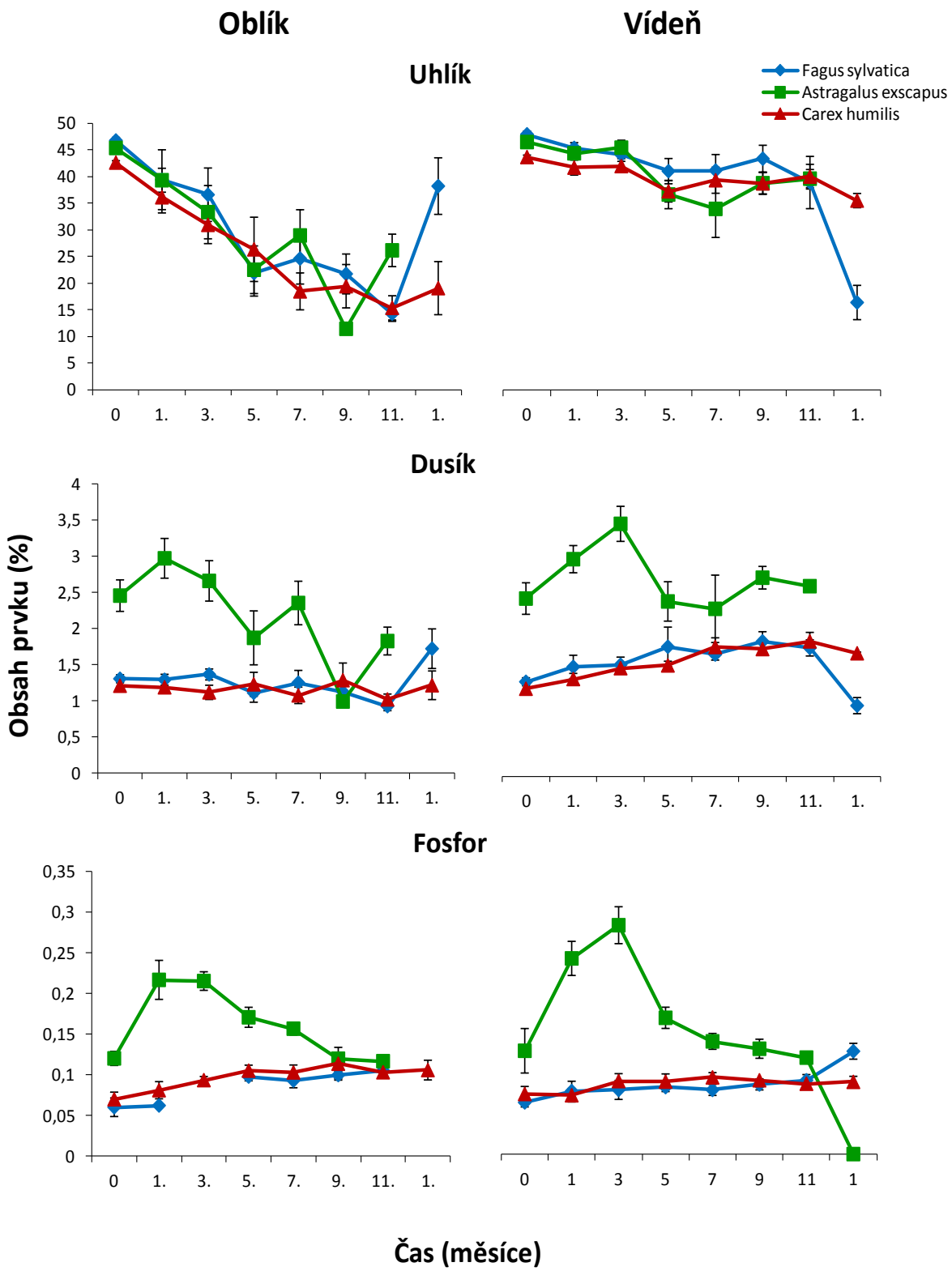
		Hmotnost	
Efekt	St. volnosti	F	p
Abs.člen	1	6,1E+03	***
rostlina	2	409,05	***
lokalita	1	32,56	***
čas	5	75,40	***
rostlina*lokalita	2	6,24	0,0025
rostlina*čas	10	12,40	***
lokalita*čas	5	5,27	***

Suchá hmotnost ubývala na obou lokalitách a pro každý druh rostlinného opadu jiným způsobem. Signifikantně vyšla závislost hmotnosti na čase, lokalitě i druhu rostliny a jejich dvojných interakcí. Ve Vídni byla suchá hmotnost všech rostlin celkově nižší, než na Oblíku, jak je patrné z obrázku 3, přičemž největší rozdíl mezi lokalitami byl vypočítán s pomocí ANOVA u *Carex humilis*. Nejvíce suché hmotnosti měl na začátku *Fagus sylvatica* a nejméně *Astragalus exscapus*. V průběhu rozkladu se v některých fázích hmotnost opadových sáčků zvýšila. U *Fagus sylvatica* hmotnost vzrostla v červenci na Oblíku i ve Vídni. U *Astragalus exscapus* byl zaznamenán mírnější nárůst suché hmotnosti v měsíci březnu. U *Carex humilis* byl zaznamenán nárůst hmotnosti na obou lokalitách během července. Ve Vídni byl u *Astragalus exscapus* a *Carex humilis* zaznamenán ještě další nárůst hmotnosti ve třetím měsíci u *Carex humilis* a v jedenáctém měsíci u *Astragalus exscapus*. U *Carex humilis* a *Fagus sylvatica* byl rozdíl mezi suchou hmotností na začátku a na konci měření vyšší na Oblíku v porovnání s Vídní. Naopak u *Astragalus exscapus* byl větší úbytek suché hmotnosti zaznamenán ve Vídni než na Oblíku.



Obr. 4: Graf vztahu hmotnosti (osa y) a interakce faktorů lokality (osa x; V: Vídeň,O: Oblík) a druhu rostlinného opadu (osa x; Fagus sylvatica ●, Astragalus exscapus ●, Carex humilis ●). Rozmezí sloupců označuje 95% interval spolehlivosti.

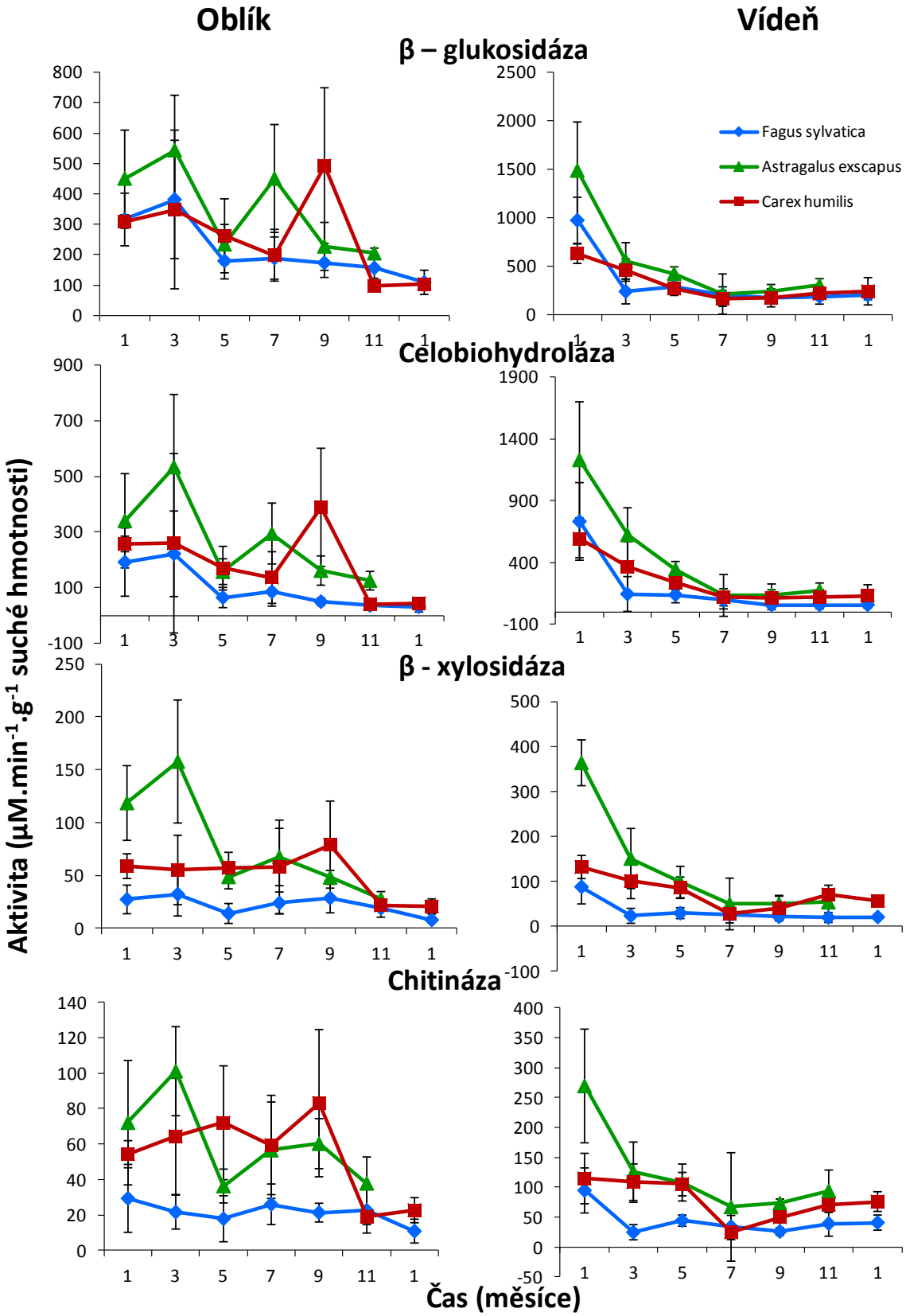
5.2 Elementární analýza prvkového složení



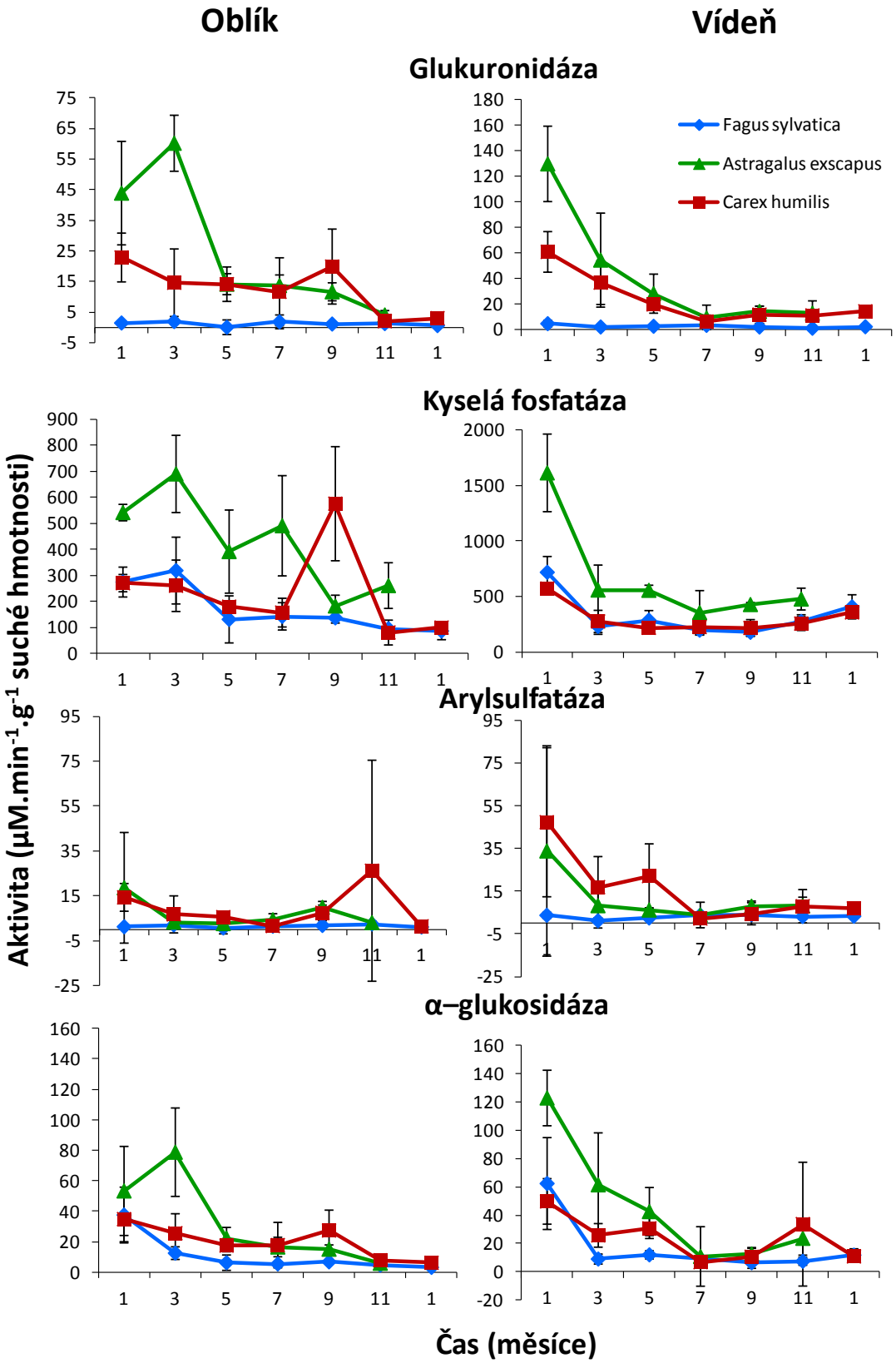
Obr. 5: Obsah uhlíku, dusíku a fosforu tří druhů rostlinného opadu na dvou lokalitách (Oblík/Vídeň) před rozkladem (měsíc 0) a během jednotlivých měsíců rozkladu v roce 2011-2012. Jsou uvedeny průměry z pěti opakování a směrodatné odchylky.

Analýzou prvkového složení bylo stanoveno procentuální zastoupení uhlíku, dusíku a fosforu v rostlinném opadu. Pletiva všech rostlin obsahovala největší zastoupení uhlíku a nejméně fosforu. Před vložením rostlinného opadu do půdy bylo u všech rostlin podobné zastoupení uhlíku. Nejvíce dusíku obsahovala rostlina *Astragalus exscapus* (2,5%), u dalších dvou rostlin se jeho obsah pohyboval okolo 1,3%. Největší obsah fosforu byl naměřen také v *Astragalus exscapus* (1%) a u dalších dvou rostlin byla tato hodnota přibližně poloviční. *U Astragalus exscapus* došlo na začátku rozkladu k úbytku především uhlíku, naopak u dalších dvou prvků došlo v prvních měsících k nárůstu jejich obsahu. V dalších fázích dochází u fosforu na *Astragalus exscapus* k úbytku až do konce rozkladu, zatímco u dusíku dochází k fluktuacím, které jsou výraznější na Oblíku než ve Vídni, podobně jako u uhlíku. U *Carex humilis* také nejvíce ubýval uhlík v prvních měsících, přičemž větší úbytek byl zaznamenán na Oblíku. Dusík a fosfor v tomto rostlinném opadu na Oblíku i ve Vídni mírně narůstal, ale obsah dusíku na Oblíku až do března mírně klesal. Tento trend pokračoval až do posledních měsíců rozkladu. U *Fagus sylvatica* také nejvíce ubýval ze všech prvků právě uhlík, přičemž větší úbytek byl zaznamenán na Oblíku. U *Fagus sylvatica* analýzy z některých měsíců chybějí, protože analýza neproběhla úspěšně. Přesto je patrné, že u tohoto rostlinného opadu se křivka obsahu fosforu a dusíku pozvolně snižuje v průběhu celého rozkladu a v posledních měsících narůstá u uhlíku a dusíku na Oblíku a také u fosforu ve Vídni. Pokles je v této době naopak zaznamenán u uhlíku a dusíku ve Vídni.

5.3 Enzymová aktivita



Obr. 6: Aktivita β- glukosidázy, celobiohydrolázy a β-xylosidázy na dvou lokalitách (Oblík/Vídeň) a třech druzích rostlinného opadu během jednotlivých měsíců rozkladu v letech 2011-2012. Jsou uvedeny průměry z pěti opakování a směrodatné odchylky.



Obr. 7: Aktivita chitinázy, glukuronidázy a kyselé fosfatázy na dvou lokalitách (Oblík/Vídeň) a třech druzích rostlinného opadu během jednotlivých měsíců rozkladu v letech 2011-2012. Jsou uvedeny průměry z pěti opakování a směrodatné odchylky.

Tab. 16: Faktoriální ANOVA pro β- glukosidázu, celobiohydrolázu, β –xylosidázu, chitinázu a faktorů rostliny, času a lokality. Závislá proměnná byla logaritmicky transformována.

		β-glukosidáza		Celobiohydroláza		β-xylosidáza		Chitináza	
Efekt	St. volnosti	F	p	F	p	F	p	F	p
Abs.člen	1	1,4E+05	0,00	6,1E+04	***	6,8E+04	***	9,0E+04	***
rostlina	2	14,96	***	36,88	***	69,94	***	66,35	***
lokalita	1	8,0218	0,0052	7,0418	0,0088	8,9946	0,0032	40,8827	***
čas	5	26,02	***	28,78	***	17,44	***	9,50	***
rostlina*lokalita	2	0,3037	0,74	0,18	0,83	0,05	0,96	2,63	0,08
rostlina*čas	10	1,62	0,11	1,93	0,0452	3,35	***	3,75	***
lokalita*čas	5	8,36	***	7,04	***	7,96	***	10,18	***

Tab. 17: Faktoriální ANOVA pro glukuronidázu, kyselou fosfatázu, arylsulfatázu, α-glukosidázu a faktorů rostliny, času a lokality. Závislá proměnná byla logaritmicky transformována.

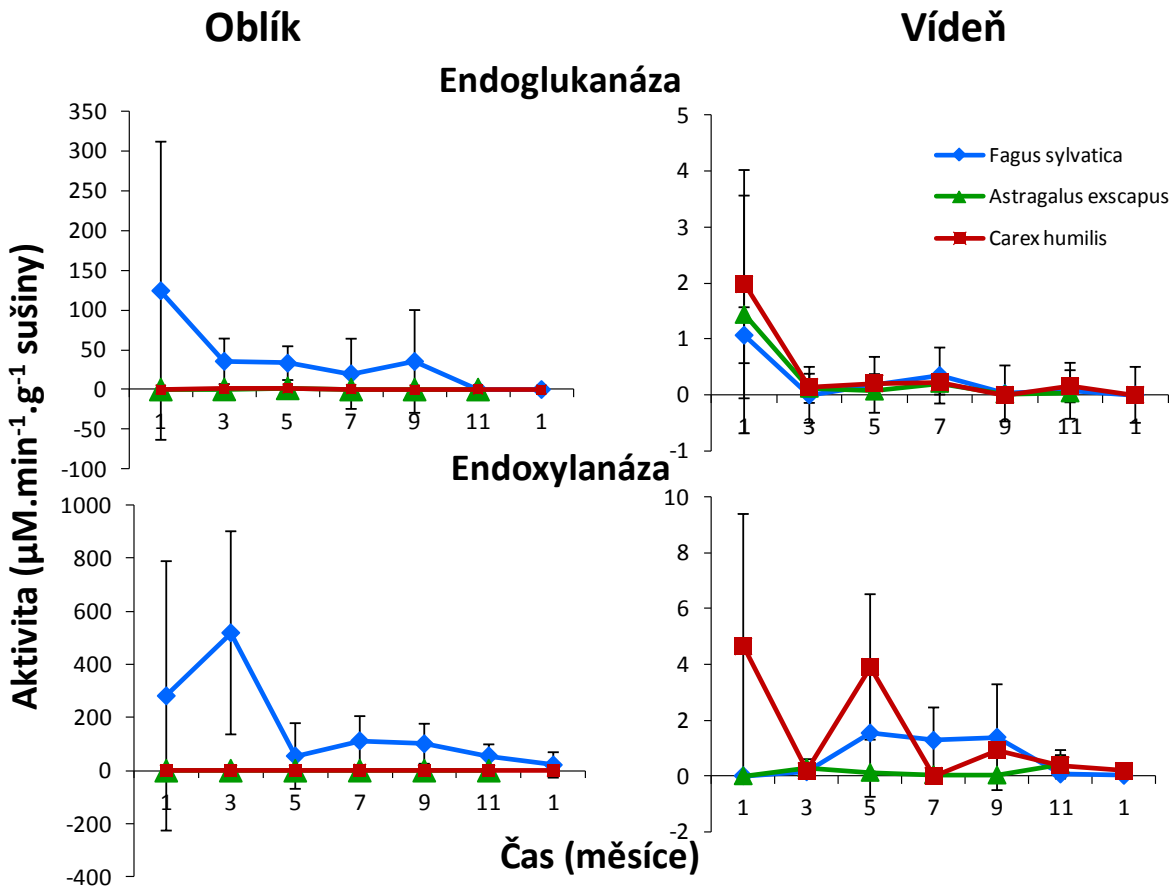
		Glukuronidáza		Kyselá fosfatáza		Arylsulfatáza		α-glukosidáza	
Efekt	St. volnosti	F	p	F	p	F	p	F	p
Abs.člen	1	3,4E+04	***	1,9E+05	***	1,6E+04	***	6,3E+04	***
rostlina	2	225,42	***	76,7	***	28,12	***	56,51	***
lokalita	1	21,73	***	40,8	***	10,31	***	7,68	0,006
čas	5	25,81	***	23,8	***	6,92	***	48,57	***
rostlina*lokalita	2	0,54	0,59	3,5	0,034	0,26	0,77	2,86	0,060
rostlina*čas	10	6,43	***	3,8	***	3,87	***	4,20	***
lokalita*čas	5	7,50	***	9,1	***	2,16	0,061	7,81	***

Mezi exoenzymy, jejichž aktivita byla měřená, patří β- glukosidáza, celobiohydroláza, β–xylosidáza, chitináza, glukuronidáza, kyselá fosfatáza, arylsulfatáza a α-glukosidáza. U arylsulfatázy, jako u jediného enzymu, není signifiantně průkazná závislost na interakci času a lokality. U ostatních je tato závislost signifikantně průkazná. Kromě kyselé fosfatázy, nevyšla ani u jednoho z endocelulázových enzymů průkazná závislost na interakci rostliny a lokality, produkce enzymů se tedy u rostlin mezi lokalitami, až na výjimku (kyselá fosfatáza), nelišila. U β-glukosidázy nevyšla průkazně interakce rostliny a času, což naznačuje, že se produkce enzymu u jednotlivých druhů rostlinného opadu v čase nelišila. Ostatní faktory vyšly pro všechny aktivity enzymů signifikantně průkazné.

Vyšší aktivity těchto enzymů byly naměřeny celkově ve Vídni než na Oblíku. Nejvyšší aktivity byly zaznamenány právě ve Vídni u kyselé fosfatázy, β-glukosidázy a celobiohydrolázy a to pokaždé u *Astragalus exscapus*. Naopak minimální aktivita byla

zaznamenána u glukuronidázy a α-glukosidázy, kde se aktivita na *Fagus sylvatica* blížila nulové hodnotě. Na Oblíku hodnoty jednotlivých enzymů více fluktuují mezi jednotlivými měsíci a to spíše pro *Carex humilis* a *Astragalus exscapus* v porovnání s Vídní, kde aktivity od prvního měsíce klesají.

Nejvyšší aktivita v prvním měsíci lednu 2011 byla naměřená u *Astragalus exscapus* a to u všech enzymů na obou lokalitách ovšem s výjimkou arylsulfatázy ve Vídni. Na Oblíku se aktivita všech enzymů ve třetím měsíci pokaždé zvvýšila a následně poklesla, s výjimkou arylsulfatázy, kde se od začátku snižovala. Ve Vídni aktivita všech enzymů na *Astragalus exscapus* byla naměřená nejvyšší na začátku v prvním měsíci a nasledně klesala. U *Carex humilis* je patrný pík vždy v devátém měsíci na Oblíku u všech enzymů kromě arylsulfatazy, kde bylo pro tento druh rostlinného opadu naměřeno maximum v listopadu. Ve Vídni se zdá být ve všech případech (enzymy, rostliny) klesající trend, u kyselé fosfatázy během posledního měsíce měření mírně aktivita narůstá. *Fagus sylvatica* má během rozkladu na Oblíku i ve Vídni nejnižší hodnoty u všech enzymů, v některých měsících se hodnota některých enzymů (β- glukosidáza, kyselá fosfatáza) v porovnání s *Carex humilis* zvyšuje, ale nikdy nepřevýší aktivitu *Astragalus exscapus* v daném měsíci. Pro každý enzym je jiné měřítko na ose y na Oblíku a ve Vídni.



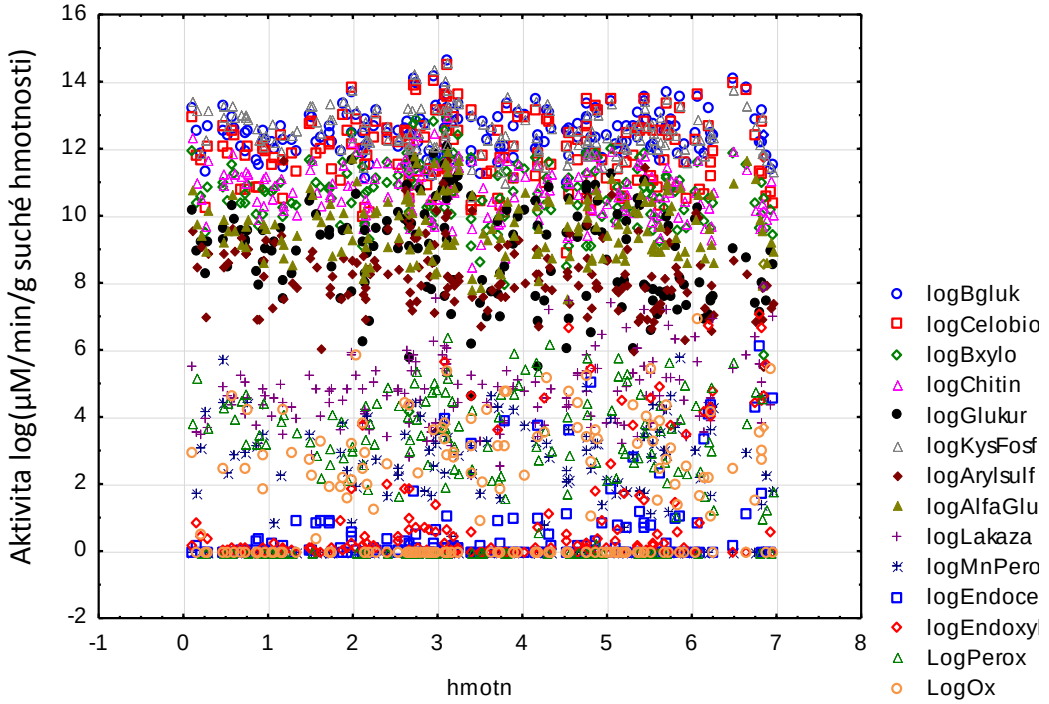
Obr. 8: Aktivita endoglukanázy a endoxylanázy na dvou lokalitách (Oblík/Vídeň) a třech druzích rostlinného opadu během jednotlivých měsíců. Jsou uvedeny průměry z pěti opakování a směrodatné odchylky.

Tab. 18: Faktoriální ANOVA pro endocelulázu a endoxylanázu a faktorů rostliny, času a lokality. Závislá proměnná byla logaritmicky transformována.

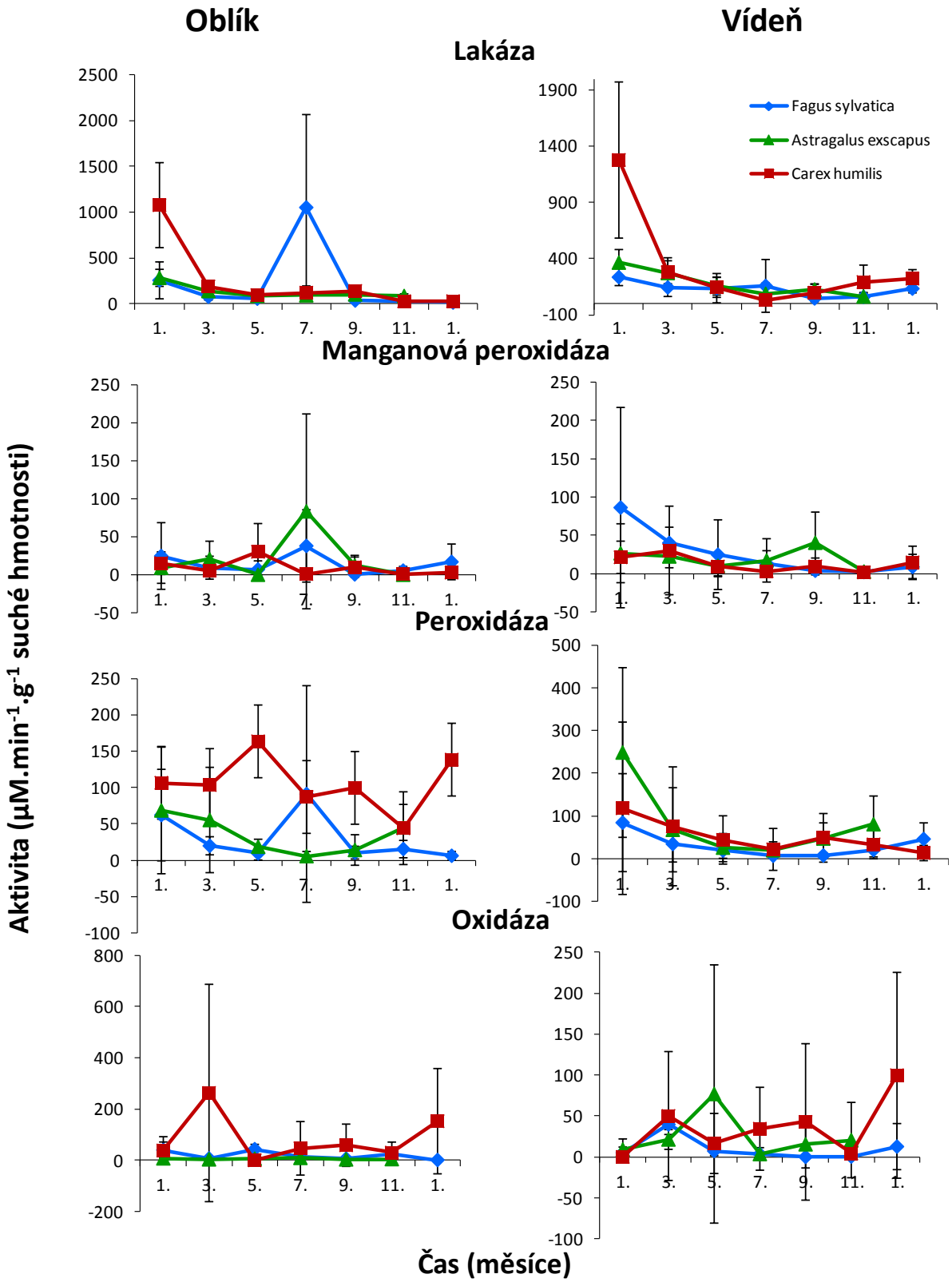
		Endoceluláza		Endoxylanáza	
Efekt	St. volnosti	F	p	F	p
Abs.člen	1	74,22	***	13,86	***
rostlina	2	24,37	***	13,37	***
lokalita	1	27,51	***	13,13	***
čas	5	5,99	***	2,10	0,07
rostlina*lokalita	2	25,97	***	13,42	***
rostlina*čas	10	2,04	0,033	2,11	0,026
lokalita*čas	5	3,88	0,002	2,13	0,07

Mezi endocelulázové enzymy, které byly měřeny, patří endoglukanáza a endoxylanáza. Pro endocelulázovou aktivitu vyšla signifikantně závislost na všech studovaných faktorech. U interakce rostliny a času byla p hodnota nejvyšší. Naopak u endoxylanázy nevyšla signifikantně její aktivita závislá na čase, což prokazuje, že jednotlivé měsíce v námi studovaném období neměly žádný vliv na množství vyprodukované endoxylanázy. Na aktivitu endoxylanázy neměla vliv ani interakce lokality a času.

Vyšší aktivity byly pro oba enzymy naměřeny na Oblíku než ve Vídni. Na Oblíku dominovala produkce endoglukanázy i endoxylanázy na rostlinném opadu *Fagus sylvatica*, na ostatních dvou druzích opadu byla aktivita obou enzymů blízká nule ve všech měsících v průběhu rozkladu. U endoglukanázy byla nejvyšší hodnota na *Fagus sylvatica* naměřena právě v prvním měsíci a v ostatních měsících většinou klesala. Endoxylanáza na tomto druhu opadu nejvíce vzrostla ve třetím měsíci, kdy její aktivita dosahovala největších hodnot ze všech měření pro oba dva enzymy, obě dvě lokality i všechny tři rostlinné druhy opadu. Ve Vídni byla aktivita obou enzymů nízká, blížící se nule, pro všechny druhy rostlinného opadu, přičemž endoglukanáza od začátku měření klesala a endoxylanáza vykazovala menší fluktuace především u *Astragalus exscapus.* Oba dva enzymy se od ostatních enzymů velmi lišily, jak ukazuje CA neparametrická unimodální analýza (Obr. 11). Podle obr. lze vidět, jak se aktivita jednotlivých druhů enzymů liší (osa y), nejnižší aktivitu mají oxidativní a endocelulázové enzymy a nejvyšší exocelulázové enzymy (Obr. 9). Pro každý enzym je jiné měřítko na ose y na Oblíku a ve Vídni.



Obr. 9: Dvourozměrný bodový graf enzymové aktivity všech měřených enzymů (osa y) vůči hmotnosti (osa x). Enzymy jsou logaritmicky transformovány. Zkratky: logBgluk: β-glukosidáza, logCelobio: Celobiohydroláza, logBxylo: β-xylosidáza, logChitin: Chitináza, logGlukur: Glukuronidáza, logKysFosf: Kyselá fosfatáza, logArylsulf: Arylsulfatáza, logAlfaGluk: α-Glukosidáza, logLakaza: Lakáza, logMnPero: Manganová peroxidáza, logEndocel: Endoceluláza, logEndoxyl: Endoxylanáza, LogPerox: Peroxidáza, LogOx: Oxidáza



Obr. 10: Aktivita lakázy, manganové peroxidázy, peroxidázy a oxidázy na dvou lokalitách (Oblík/Vídeň) a třech druzích rostlinného opadu během jednotlivých měsíců v letech 2011-2012. Jsou uvedeny průměry z pěti opakování a směrodatné odchylky.

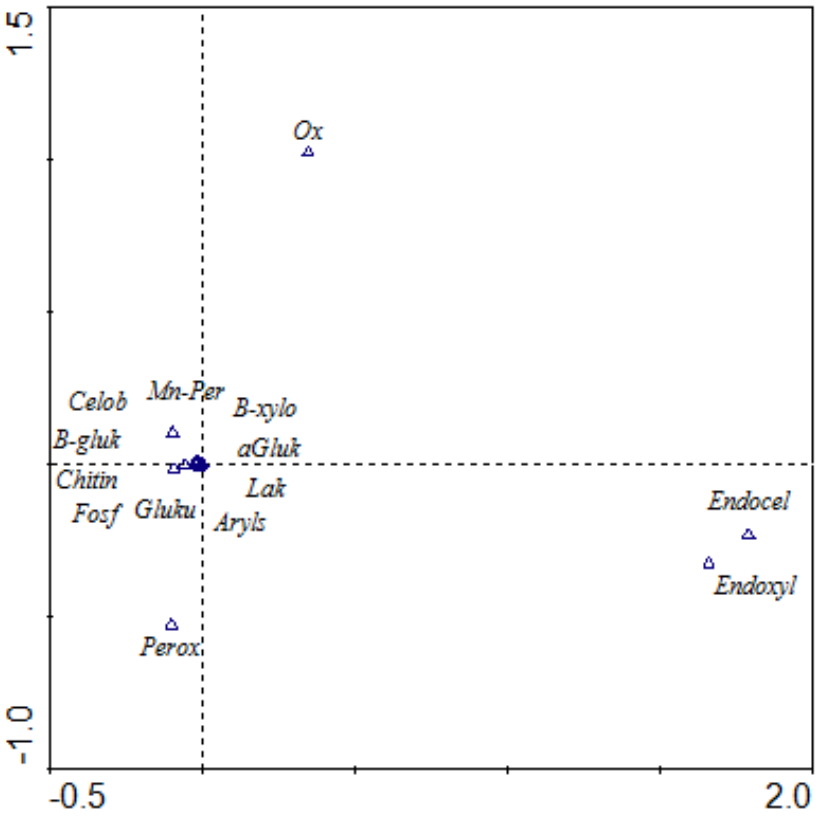
Tab. 19: Faktoriální ANOVA pro lakázu, manganovou peroxidázu, peroxidázu a oxidázu a faktorů rostliny, času a lokality a jejich interakce. Závislá proměnná byla logaritmicky transformována.

		Lakáza		**Mn peroxidáza**		**Peroxidáza**		**Oxidáza**	
Efekt	St. volnosti	F	p	F	p	F	p	F	p
Abs.člen	1	9712,6	***	185,0	***	368,5	***	154,1	***
rostlina	2	9,53	***	0,87	0,42	0,74	0,48	1,86	0,16
lokalita	1	1,81	0,18	3,46	0,06	0,13	0,71	1,62	0,20
čas	5	37,41	***	3,84	0,003	2,41	0,039	2,35	0,043
rostlina*lokalita	2	0,037	0,96	0,36	0,70	2,33	0,10	3,54	0,031
rostlina*čas	10	7,77	***	2,21	0,020	1,03	0,42	1,41	0,18
lokalita*čas	5	8,72	***	1,39	0,23	0,94	0,46	2,10	0,07

Mezi oxidativní enzymy, jejichž aktivity byly na rostlinném opadu měřeny, patří lakáza, manganová peroxidáza, peroxidáza a oxidáza. U všech enzymů nevyšla signifikantně závislost jejich aktivity na lokalitě (Tab.19), což značí, že aktivita všech zkoumaných oxidativních enzymů není lokálně specifická. Pro každý z těchto enzymů, s výjimkou lakázy, nevyšel signifikantně vliv rostliny, což znamená, že produkce těchto oxidativních enzymů se mezi jednotlivými druhy rostlinného opadu neliší. Stejně tak bylo zaznamenáno u všech enzymů opět s výjimkou lakázy nesignifikantní interakce lokality a času. U lakázy vyšly oba tyto efekty silně signifikantní. Jen u oxidázy vyšla signifikantně její závislost na interakci rostliny a lokality, s vyšší *p*-hodnotou (0,03). U lakázy a manganové peroxidázy vyšla signifikantní závislost na interakci rostliny a času. Jediný faktor, který měl průkazný vliv na všechny druhy oxidativních enzymů, byl faktor času. Jeho *p*-hodnota pro peroxidázu a oxidázu byla podstatně vyšší než u ostatních dvou enzymů. CA unimodální analýza ukazuje, že nejvzdálenější vůči ostatním enzymům jsou endoglukanáza, endoxylanáza, peroxidáza a oxidáza.

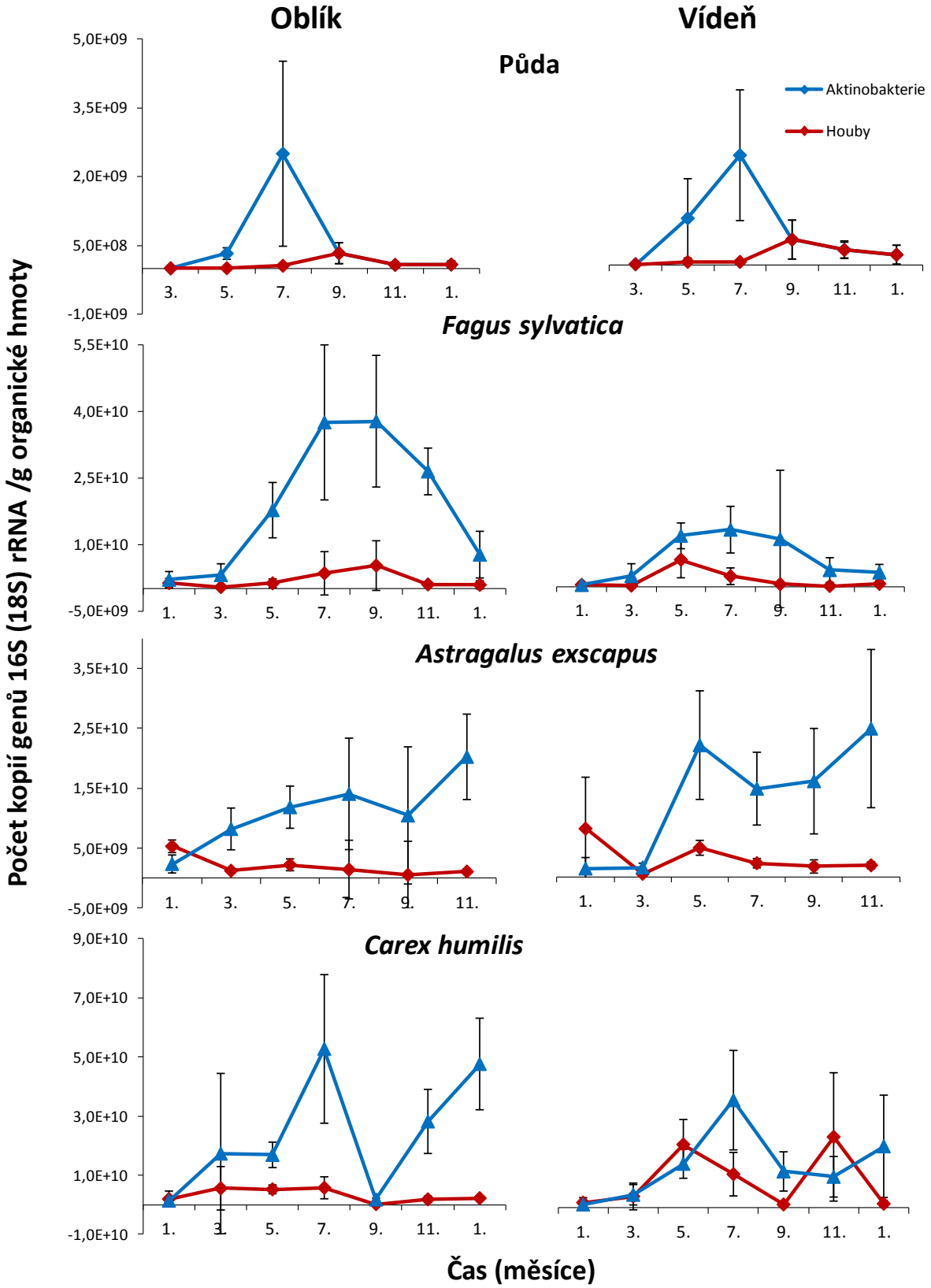
Vyšší aktivity enzymů ve Vídni než na Oblíku byly naměřeny u lakázy a peroxidázy. U manganové peroxidázy byly hodnoty podobné na obou lokalitách a u oxidázy byly hodnoty naměřeny vyšší na Oblíku. Nejvíce aktivní ze všech enzymů byla lakáza a nejméně oxidáza. U lakázy byly na Oblíku i ve Vídni naměřeny v prvním měsíci nejvyšší hodnoty na *Carex humilis*. Ve Vídni byla tato aktivita vyšší než na Oblíku v následujících měsících hodnota na obou lokalitách klesala až k nulové hodnotě, ve Vídni pak od sedmého měsíce mírně narůstala. Na ostatních dvou rostlinných opadech nepřesáhla aktivita v prvním měsíci 500µM.min^{-1}.g^{-1}

suché hmotnosti a následně klesala s výjimkou sedmého měsíce na Oblíku, kdy došlo k prudkému nárůstu aktivity na rostlinném opadu *Fagus sylvatica*. U manganové peroxidázy byla na Oblíku naměřená maximální aktivita v sedmém měsíci u *Astragalus exscapus* a ve Vídni u *Fagus sylvatica*, v obou případech se aktivita pohybovala kolem 100µM.min^{-1}.g^{-1} suché hmotnosti. Během ostatních měsíců aktivita nepřesáhla poloviční maximální hodnotu ani u jednoho rostlinného opadu na obou lokalitách. U peroxidázy byla na začátku i v průběhu celého rozkladu na Oblíku nejvyšší aktivita naměřena na *Carex humilis*. U peroxidázy na rostlinném opadu *Fagus sylvatica* je zjevný podobný trend jako u manganové peroxidázy, kdy se v červenci objevil pík indikující vyšší aktivitu tohoto enzymu. U *Astragalus exscapus* byla od začátku do sedmého měsíce zaznamenána klesající a od sedmého měsíce dále mírně stoupající tendence aktivity tohoto enzymu. Ve Vídni je u oxidázy zjevná klesající tendence od začátku měření na všech rostlinných opadech s nejvyšší počáteční hodnotou u *Astragalus exscapus*. U oxidázy byly nejvyšší hodnoty naměřeny u *Carex humilis* na obou lokalitách s tím, že maximální aktivita tohoto enzymu byla naměřena na Oblíku, kde byla tato maximální aktivita zaznamenána v březnu a ve Vídni v posledním měsíci lednu 2012. Na dalších dvou rostlinných opadech byla na obou dvou lokalitách aktivita tohoto enzymu po celou dobu měření nižší. Pro každý enzym je jiné měřítko na ose y na Oblíku a ve Vídni.



Obr. 11: Nepřímá unimodální analýza (CA) jednotlivých druhů enzymů. Hodnoty enzymů jsou logaritmicky transformovány. Zkratky enzymů: B-gluk:β-glukosidáza,Celob: Celobiohydroláza, B-xylo: β-xylosidáza,Fosf: Kyselá fosfatáza, Chitin: Chitináza, Aryls: Arylsulfatáza, aGluk: glukosidáza, Endocel: Endoceluláza, Endoxyl: Endoxylanáza, Perox: Peroxidáza, Ox: Oxidáza

5.4 Složení společenstva hub a aktinobakterií v půdě a na opadu



Obr. 12: Počet kopií genu 16S/18S rRNA pro aktinobakterie a houby v půdě a na opadu u třech rostlinných opadů na dvou lokalitách (Oblík/Vídeň) během jednotlivých měsíců rozkladu v roce 2011-2012. Jsou uvedeny průměry z pěti opakování a směrodatné odchylky.

Tab. 20 Faktoriální ANOVA pro aktinobakterie, houby a faktorů rostliny, času a lokality a jejich dvojné interakce. Závislé proměnné byly logaritmicky transformovány.

		Aktinobakterie		**Houby**	
Efekt	St. volnosti	F	p	F	p
Abs.člen	1	90707,7	***	57239,3	***
rostlina	2	1,25	0,29	14,14	***
lokalita	1	12,10	***	2,04	0,16
čas	5	43,84	***	13,70	***
rostlina*lokalita	2	5,54	0,0048	4,49	0,013
rostlina*čas	10	1,86	0,05	6,25	***
lokalita*čas	5	2,91	0,015	3,52	0,0048

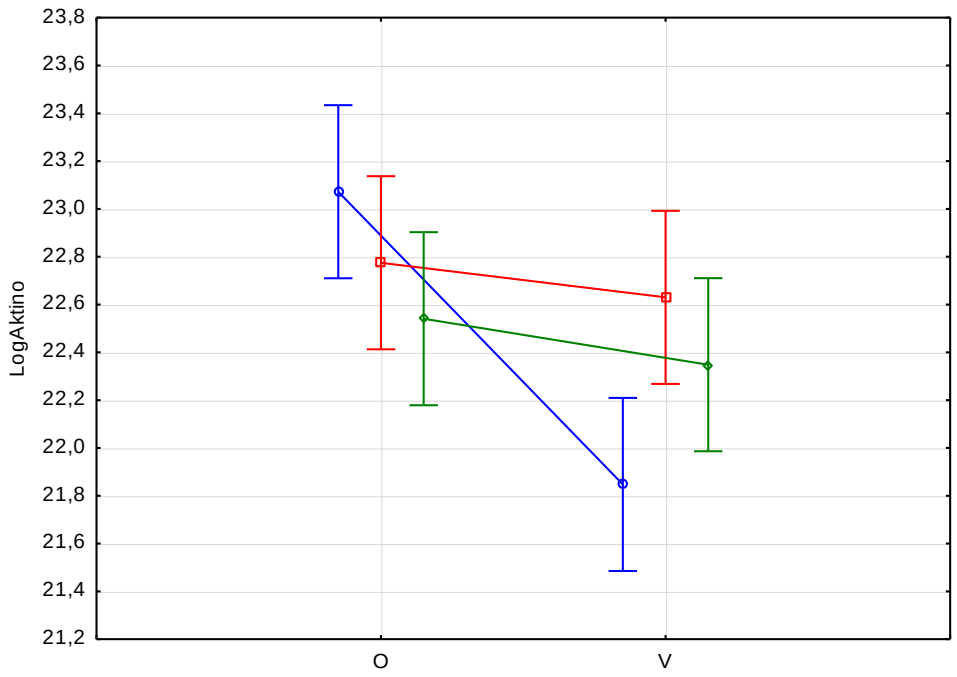
Pro zjištění poměru aktinobakterií a hub na rostlinném opadu nám sloužilo možství kopií genů 16S rRNA pro aktinobakterie a 18S rRNA pro houby. Počet těchto genů pro aktinobakterie i houby je silně signifikantně ovlivněný časem. O něco vyšší *p*-hodnota, ale přesto průkazná, byla zaznamenána také u interakcí rostliny a lokality a lokality a času u obou sledovaných veličin. U aktinobakterií nebyla průkazná závislost na druhu rostliny, která byla naopak u hub silně signifikantní. A u aktinobakterií byla prokázána silná závislost na lokalitě, která naopak u hub nebyla prokázána. Nesignifikantně vyšla závislost na interakci rostliny a času. U hub měla tato interakce prokazatelně silný vliv. Největší rozdíl mezi lokalitami byl zaznamenán u aktinobakteriálních genů na *Fagus sylvatica (*Obr.13.) Houbových genů bylo u *Astragalus exscapus* i *Carex humilis* více ve Vídni a u *Fagus sylvatica* jich bylo naopak více na Oblíku (Obr.14). Podle těchto obrázků je patrné, že v rámci aktinobakterií, byla větší abundance jejich genů na Oblíku než ve Vídni a v rámci hub tak bylo přesně naopak.

Pro srovnání proběhla obdobná analýza aktinobakteriálních a houbových genů rRNA v okolní půdě. Hodnota začíná druhým odběrem, tedy v měsíci březnu. Dvojice grafů pro jednotlivé rostlinné opady a půdy na obou lokalitách mají stejné jednotky na ose y, proto byla tato osa u grafu ve Vídni odstraněna.

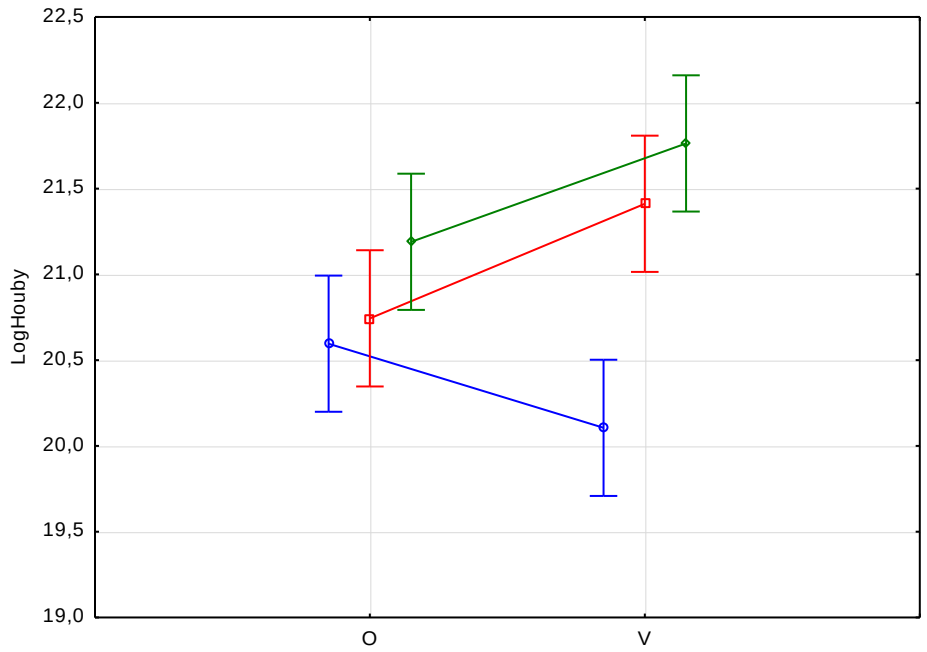
Na obou lokalitách na každém rostlinném opadu bylo zaznamenáno větší množství aktinobakteriálních genů než houbových, s výjimkou vyšších hodnot ve Vídni na *Carex*

humilis v květnu a listopadu a v prvním měsíci na Oblíku a ve Vídni u *Astragalus exscapus*. Půda měla na obou lokalitách stoupající tendenci aktinobakterií až do července a od července do konce měření klesala. Tento nárůst byl vyšší na Vídeňské lokalitě než na Oblíku. Množství houbových genů bylo na obou lokalitách přibližně o dva řády nižší než nejvyšší hodnoty u aktinobakterií, přičemž v půdě ve Vídni bylo houbových genů v jednotlivých časových bodech více než na Oblíku. Na obou lokalitách bylo množství houbových genů maximální v měsíci září a od tohoto měsíce tato hodnota klesala.

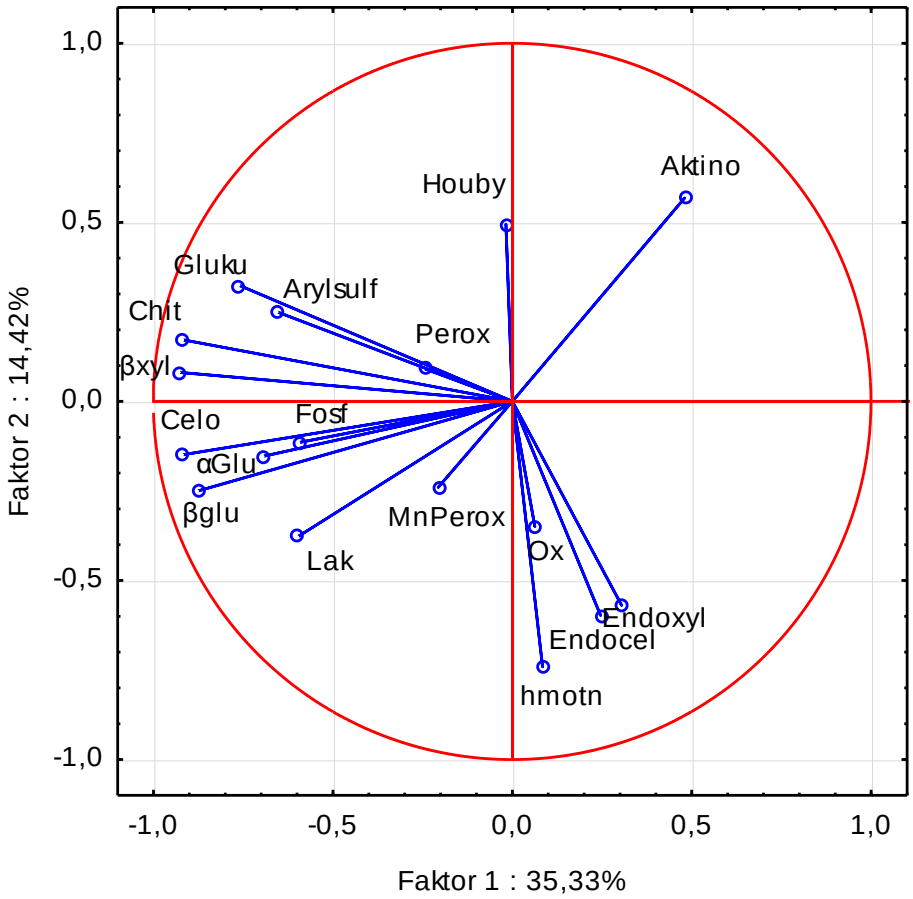
Na opadu bylo největší množství aktinobakterií ze všech rostlin na obou lokalitách naměřeno na Obliku na rostlinném opadu *Carex humilis* během měsíce července (Obr. 12). U *Fagus sylvatica* bylo množství aktinobakteriálních genů vyšší na lokalitě Oblík v porovnání s Vídní. Na obou lokalitách se množství těchto genů zvyšovalo od března do července a od září opět klesalo. Množství houbových genů bylo podstatně nižší na obou lokalitách na rostlinném opadu *Fagus sylvatica* s tím, že jejich nejvyšší množství bylo na Oblíku naměřeno v měsíci květnu a ve Vídni zase v měsíci září. Množství aktinobakteriálních genů na *Astragalus exscapus* bylo na konci měření vyšší než na začátku s mírnými fluktuacemi během měření. U hub naopak byla na začátku hodnota vyšší než na konci a počáteční hodnoty dokonce převyšovaly hodnoty aktinobakterií. V ostatních měsících byly hodnoty pro houby nízké s výjimkou mírného nárůstu v květnu na obou lokalitách. U *Carex humilis* lze pozorovat nárůst aktinobakteriálních genů od ledna do července, následovaný poklesem v následujícím měsíci na obou lokalitách. Tento pokles byl výraznější na Oblíku v porovnání s Vídní. Na obou lokalitách množství aktinobakteriálních genů od listopadu opět vzrůstalo. Na tomto rostlinném opadu bylo větší množství houbových genů naměřeno od března do července a v ostatních měsících byla hodnota nižší. Naopak ve Vídni bylo toto množství mnohem vyšší v porovnání s Oblíkem, které mělo dva píky v květnu a v listopadu, kdy oba dva tyto píky v daném měsíci převyšovaly množství aktinobakteriálních genů.



Obr. 13: Graf analýzy rozptylu (ANOVA) aktinobakteriálních kopií genů 16S rRNA/g OM (osa y) a interakce faktorů lokality (osa x; V: Vídeň, O: Oblík) a druhu rostlinného opadu (*Fagus sylvatica* ●, *Astragalus exscapus* ●, *Carex humilis* ●). Rozmezí sloupců označuje 95% interval spolehlivosti.



Obr. 14: Graf analýzy rozptylu (ANOVA) houbových kopií genů 18S rRNA/g OM (osa y) a interakce faktorů lokality (osa x; V: Vídeň, O: Oblík) a druhu rostlinného opadu (*Fagus sylvatica* ●, *Astragalus exscapus* ●, *Carex humilis* ●). Rozmezí sloupců označuje 95% interval spolehlivosti.



Obr. 15: Analýza hlavních komponent (PCA), zahrnuty jsou všechny závisle proměnné (Aktino: Aktinobakterie, Houby: Houby, Endoxyl: Endoxylanáza, Ebdocel: Endoceluláza, βglu: β-glukosidáza, βxyl: β-xylosidáza, Arylsulf: Arylsulfatáza, Fosf: Kyselá fosfatáza, Glu: Glkukuronidáza, Celo: Celobiohydroláza, αGlu: α-glukosidáza, Perox: Peroxidáza, Ox: Oxidáz, hmotn: Hmotnost).

U analýzy hlavních komponent osa y vysvětluje 35,33% a osa y 14,42% variability. Ose x se blíží především exocelulázové a některé oxidativní enzymy, nejvíce β-xylosidáza, celobiohydroláza, kyselá fosfatáza a chitináza. Osa y vysvětluje více variability u endocelulázových enzymů, hmotnosti a také u hub. Z analýzy hlavních komponent vidíme, že spolu pozitivně korelují jednotlivé enzymy ze skupiny endoceluláz a také z exoceluláz. S aktinobakteriemi negativně korelují téměř všechny proměnné až na houby. Mezi lakázou a manganovou peroxidázou byla zaznamenána největší negativní korelace. S endoxylanázou, endocelulázou, arylsulfatázou, glukuronidázou, oxidázou a peroxidázou měly aktinobakterie nejslabší interakci, neboť úhel mezi přímkami je blízký pravému úhlu, což indikuje neutrální vztah mezi aktinobakteriemi a zmíněnými enzymy. Houby naopak svírají ostrý úhel s peroxidázou, arylsulfatázou, glukuronidázou, chitinázou a β-xylozidázou, s ostatními

enzymy korelovaly negativně. S hmotností korelovaly houby i aktinobakterie negativně, přičemž houby více. Negativně s ní také korelovala většina enzymů, které pozitivně korelovaly s houbami, pozitivně pak hlavně endocelulázové enzymy, manganová peroxidáza a lakáza. β-glukosidáza a α-glukosidáza s hmotností nekorelovaly ani pozitivně a ani negativně. Přesné pozitivní a negativní korelace jsou vypočítány s pomocí Spearmanovy neparametrické korelace v tabulce č. 21.

Tab. 21: Spearmanova neparametrická korelace mezi všemi sledovanými závislými proměnnými. Korelace jsou významné na hladině α=0,05.

	β-glukosidáz	Celobiohydı	B-xylozidaz	Chitinaza	Glukuronid	Kys.fosfatá	arylsulfata	Alfa-gluk	Lakáza	Mn-perox	Endocelula	Endoxylan	Aktinobak	Houby	Peroxid	Oxid	hmotn
β-glukosidáza	**1,0000**	0,9436	0,8262	0,7664	0,6376	0,8131	0,4278	0,8205	0,5930	0,1947	0,1635	-0,1171	-0,4415	-0,0514	0,1899	0,0639	0,0568
Celobiohydroláza	0,9436	**1,0000**	0,8836	0,8111	0,7456	0,7841	0,4941	0,8486	0,6061	0,1831	0,1572	-0,1487	-0,4397	0,0026	0,1917	0,0416	-0,0173
β-xylozidaza	0,8262	0,8836	**1,0000**	0,8924	0,8555	0,7258	0,5971	0,8413	0,5685	0,0929	0,1037	-0,1673	-0,3343	0,1768	0,2021	-0,0669	-0,1590
Chitináza	0,7664	0,8111	0,8924	**1,0000**	0,8156	0,6961	0,6754	0,7799	0,5583	0,1140	0,0490	-0,1604	-0,2898	0,1838	0,2044	-0,0717	-0,2152
Glukuronidaza	0,6376	0,7456	0,8555	0,8156	**1,0000**	0,6154	0,6545	0,7390	0,5273	0,0694	0,0338	-0,2767	-0,2705	0,2262	0,1825	-0,1309	-0,2933
Kys.fosfatáza	0,8131	0,7841	0,7258	0,6961	0,6154	**1,0000**	0,3786	0,7436	0,4638	0,1349	0,0870	-0,2684	-0,4272	-0,0797	0,1347	0,0010	-0,2083
Arylsulfatáza	0,4278	0,4941	0,5971	0,6754	0,6545	0,3786	**1,0000**	0,5433	0,3888	0,0866	-0,0538	-0,1682	-0,1539	0,1580	0,1222	-0,1359	-0,2807
α-glukosidáza	0,8205	0,8486	0,8413	0,7799	0,7390	0,7436	0,5433	**1,0000**	0,5958	0,1452	0,2071	-0,1724	-0,4658	0,0801	0,2099	0,0206	-0,0004
Lakáza	0,5930	0,6061	0,5685	0,5583	0,5273	0,4638	0,3888	0,5958	**1,0000**	0,2131	0,1231	-0,0638	-0,4875	0,0041	0,1746	0,0031	0,2270
Mn-peroxidáza	0,1947	0,1831	0,0929	0,1140	0,0694	0,1349	0,0866	0,1452	0,2131	**1,0000**	-0,1027	-0,0001	-0,1791	-0,2136	0,0365	0,0494	0,1022
Endocelulaza	0,1635	0,1572	0,1037	0,0490	0,0338	0,0870	-0,0538	0,2071	0,1231	-0,1027	**1,0000**	0,0478	-0,0792	0,1413	0,0571	-0,0212	0,1703
Endoxylanaza	-0,1171	-0,1487	-0,1673	-0,1604	-0,2767	-0,2684	-0,1682	-0,1724	-0,0638	-0,0001	0,0478	**1,0000**	0,0997	-0,0332	-0,0697	0,0444	0,2611
Aktinobakterie	**-0,4415**	**-0,4397**	**-0,3343**	**-0,2898**	**-0,2705**	**-0,4272**	**-0,1539**	**-0,4658**	**-0,4875**	**-0,1791**	-0,0792	0,0997	**1,0000**	0,4657	-0,0884	-0,0228	-0,2683
Houby	-0,0514	0,0026	**0,1768**	**0,1838**	**0,2262**	-0,0797	**0,1580**	0,0801	0,0041	**-0,2136**	0,1413	-0,0332	**0,4657**	**1,0000**	0,0948	-0,0769	-0,1842
Peroxidáza	0,1899	0,1917	0,2021	0,2044	0,1825	0,1347	0,1222	0,2099	0,1746	0,0365	0,0571	-0,0697	-0,0884	0,0948	**1,0000**	-0,5039	0,0163
Oxidáza	0,0639	0,0416	-0,0669	-0,0717	-0,1309	0,0010	-0,1359	0,0206	0,0031	0,0494	-0,0212	0,0444	-0,0228	-0,0769	-0,5039	**1,0000**	0,1202
hmotnost	0,0568	-0,0173	-0,1590	-0,2152	-0,2933	-0,2083	-0,2807	-0,0004	0,2270	0,1022	0,1703	0,2611	-0,2683	-0,1842	0,0163	0,1202	**1,0000**

6 Diskuze

Naše výsledky ukazují, že změna hmotnosti opadu v průběhu rozkladu se signifikantně lišila mezi lokalitami, podobně jako například u Martínez-Yrízar et al. (2007), kde byla studována rychlost rozkladu mezi jednotlivými pouštními habitaty. Některé výsledky dalších studií nezaznamenaly rozdíly v rozkladu rostlinného opadu mezi lokalitami (Papa et al., 2008), což může být spojeno s větší podobností těchto lokalit, neboť se v tomto případě jednalo o porovnání dvou různých listnatých lesů, zatímco v našem případě byl porovnáván zcela odlišný lesní a luční ekosystémy. Na druhou stranu, v této studii měly lesní lokality odlišné pH půdy, texturu a další půdní charakteristiky, a také měly rozdílné rozdělení srážek během roku podobně, jako to bylo v naší studii. V komplexních ekosystémech mohou ale hrát významnou roli i další faktory, které nemusí být podchyceny, jako například míra insolace, která se výrazně liší mezi lokalitami, kde převažuje stromový nebo bylinný porost nebo také rozdíly v topografii (Sariyildiz et al., 2005). V naší studii pravděpodobně způsobily odlišný úbytek hmotnosti rostlinného opadu kontrastní podmínky obou lokalit, kterými mohou být nejen odlišné pH, vlhkost i teplota půdy, ale i další neměřené faktory prostředí.

Teplota může ovlivnit rychlost rozkladu organického materiálu. Nízké teploty na obou lokalitách od ledna do března mohou vysvětlit pozvolný úbytek suché hmotnosti u všech rostlinných druhů, podobně jako studii Thiessen et al. (2013). Podle Arhenniovy teorie by hůře rozložitelný organický substrát, tedy například ten, který už je z velké části rozložený, měl být více závislý na změnách teplot. Z toho vyplývá, že rozklad takového organického materiálu, se více mění spolu se změnou teploty (Davidson and Janssens, 2006). V případě naší studie to také znamená, že hůře rozložitelný organický substrát nacházející se v pozdější fázi rozkladu, by se měl, zároveň se snižující se teplotou, rozkládat pomaleji než na začátku rozkladu. To by bylo patrné v případě, že by křivka mezi měsíci září a listopad měla nižší sklon než křivka mezi březnem a květnem u všech rostlin, což u většiny z našich měření není zjevné. Největší nárůst teploty během sezony se projevil největším úbytkem hmotnosti u všech sledovaných rostlin na obou lokalitách. Podobně zaznamenal vyšší rychlost rozkladu během zvýšení teplot v půdě například i Innangi et al. (2015), kdy byla rychlost rozkladu listového opadu buku větší při změně teploty z 15°C na 22°C. Někdy by zvýšení teplot mohlo mít naopak protichůdný účinek na rychlost rozkladu a to v případě, že by došlo k vysychání

půdy a rostlinného opadu (Suseela et al., 2014). V našem případě byla spolu se zvyšující se teplotou zaznamenána i zvyšující se vlhkost půdy na obou lokalitách, takže nedošlo k vysychání opadu a k limitaci mikroorganismů vodou.

Rychlost rozkladu se mění v závislosti na rozdílném druhu organického substrátu, konkrétně na jeho chemickém složení, kdy hůře rozložitelný substrát, obsahující velké množství strukturních sloučenin a menší množství živin, se rozkládá pomalu (Meier et Bowman, 2008). Protože listí buku nebo dubu bývá hůře rozložitelné (Frankland, 1998), v pletivech travin je vysoký poměr lignin:N a dohromady je u těchto rostlin větší poměr C:N v porovnání s *Astragalus exscapus* (Hu et al., 2015), byl právě u těchto dvou rostlin zaznamenán nejnižší úbytek hmotnosti od začátku do konce studovaného období. *Astragalus exscapus* obsahuje více dusíku a fosforu v porovnání s dalšími dvěma rostlinami, jeho vyšší hmotnostní úbytek by mohl být tedy vysvětlen tím. Podobný výsledek zaznamenal ve své studii i Yavitt & Williams (2015).

V některých fázích rozkladu byl zaznamenán naopak nárůst hmotnosti, podobně jako například ve studii Martínez-Yrízar et al. (2007) nebo Duboc et al. (2012), kde byl zaznamenán konkrétně nárůst hmotnosti na opadu *Fagus sylvatica*. Důvodem může být například kolonizace opadu velkým množstvím hub, jejichž biomasa zvýší hmotnost litterbagu. Na rozdíl od ostatních rostlinných opadů, byla v poslední fázi rozkladu u *Astragalus exscapus* zaznamenána stagnace úbytku hmotnosti, kdy ve Vídni poslední dva měsíce nedocházelo téměř k žádnému úbytku hmotnosti a na Oblíku dokonce došlo k jeho mírnému nárůstu. Tato rostlina, patřící do čeledi *fabaceae,* obsahuje ve svých pletivech velké množství dusíku (Ball et al., 2014), o němž je známo, že může v pozdějších fázích rozklad zpomalovat tvorbou špatně rozložitelných komplexů s ligninem, což mohlo způsobit horší rozložitelnost této rostliny v pozdějších fázích v porovnání s prvními měsíci rozkladu (Ge et al., 2013). Na začátku by se měl tento rostlinný opad rozkládat rychleji, což by se projevilo výrazným poklesem hmotnosti v prvních měsících rozkladu, to ale naše výsledky neprokazují. Ve druhém měsíci rozkladu byl však na této rostlině znatelný také nárůst hmotnosti, což může být způsobeno právě nárůstem houbové biomasy, která zde byla zároveň zaznamenána a která tak mohla případný úbytek hmotnosti rostlinného opadu zastínit.

Enzymová aktivita byla v porovnání s Oblíkem výrazně vyšší na vídeňské lokalitě v rámci hydrolytických exoceluláz především na začátku rozkladu. Jelikož je na lokalitě Oblík větší diverzita rostlin než ve Vídni, je tento závěr v rozporu s McDaniel et al. (2014), který zjistil větší enzymovou aktivitu na území, které je na rostliny druhově bohatší. Ale jelikož jsou půdní enzymy převážně ovlivněny půdním pH a klimatickými faktory (Kang et Freeman 1999), může být vyšší aktivita těchto enzymů ve Vídni vysvětlena právě odlišnými podmínkami na námi studovaných lokalitách. Půdní pH ve Vídni je nižší než na Oblíku, vyšší aktivita enzymů může být způsobena tím, že do jeho množství přispívají s větším podílem houby než aktinobakterie, neboť houby produkují enzymy ideálně v kyselém pH a bakterie naopak v neutrálním až alkalickém (Caldwell 2005; De Boer et al. 2005). Nicméně bylo zjištěno, že do produkce extracelulárních enzymů v kyselém prostředí mohou zasahovat také aktinobakterie (Abdulla et El-Shatoury, 2007).

Bylo prokázáno, že aktivita většiny enzymů se liší mezi jednotlivými rostlinami v rámci jedné lokality, ale ne mezi lokalitami. To znamená, že jsou tyto enzymy substrátově, ale nikoliv lokálně, specifické. Tyto enzymy mají stejnou aktivitu na daném rostlinném substrátu na obou dvou lokalitách. Exocelulolytické enzymy jsou nejaktivnější na *Astragalus exscapus*, endocelulolytické na *Fagus sylvatica* a oxidativní lakáza na *Carex humilis*. Je tedy zjevné, že jednotlivé skupiny enzymů rozkládají preferenčně jiný rostlinný druh opadu podobně jako ve studii Tian and Shi (2014). Přestože nebyla aktivita enzymů závislá na interakci rostliny a lokality, u *Astragalus exscapus* a *Carex humilis* jsou patrné zajímavé rozdíly v aktivitě enzymů v čase. Na Oblíku byla maxima enzymové aktivity zaznamenána v jiném měsíci než ve Vídni. U *Carex humilis* byla na Oblíku nejvyšší aktivita u všech enzymů zaznamenána až v září a u *Astragalus exscapus*, s výjimkou arylsulfatázy, zase v březnu. Na Oblíku je v lednu zaznamenána nejmenší vlhkost půdy, která mohla způsobit inhibici aktivity enzymů v prvních měsících rozkladu a v pozdějších měsících se spolu s narůstající vlhkostí půdy mohla zvýšit i aktivita hydrolytických enzymů na těchto rostlinných opadech (De Boer et al., 2005). Pozdější maximum aktivity enzymů u *Carex humilis* může být spojeno s horší rozložitelností této rostliny oproti *Astragalus exscapus*. Hůře rozložitelné složení *Carex humilis* by potvrzovala i vysoká aktivita lakázy, především na začátku rozkladu (Bugg et al., 2011). Odlišný průběh aktivity jednotlivých enzymů může poukazovat na jiné složení pletiv rostlinného opadu, kdy *Astragalus exscapus* může obsahovat amorfní celulosu, která se rozkládá kratší dobu než

krystalická celulosa, která mohla být zase obsažena v pletivech *Carex humilis* (Knill et Kennedy 2003). Aktivita kyselé fosfatázy byla, na rozdíl od ostatních hydrolytických exoenzymů, lokálně specifická pro jednotlivé rostlinné druhy opadu. Pravděpodobně tedy není tento enzym ovlivněn pouze chemickým složením substrátu, ale i odlišnými podmínkami prostředí panujícími na obou lokalitách. Je možné, že byl ovlivněn více půdním pH, než jinými faktory prostředí, jak již bylo dříve zjištěno v jiných studiích (Kang and Freeman, 1999).

Aktivity enzymů byly během rozkladu typické tím, že ve Vídni byla zřejmá nejvyšší aktivita exocelulázových enzymů na začátku rozkladu, a pak postupem času klesala. Nejvyšší aktivity byly zaznamenány především u β-glukosidázy, celobiohydrolázy a kyselé fosfatázy. Z toho vyplývá, že díky vyšší aktivitě těchto enzymů v prvním měsíci rozkladu, došlo k největšímu rozkladu celulozy a hemicelulozy z rostlinných opadů (Berg, 2000). Podobně i Šnajdr et al. (2011) označili iniciální rozkladnou fázi typickou vysokou aktivitou β-glukosidázy a dalších celulolytických enzymů. Společná produkce některých enzymů způsobuje synergický účinek těchto enzymů při rozkladu. Stejný časový trend v aktivitě celobiohydrolázy a β-glukosidázy by mohl indikovat synergické působení těchto dvou enzymů, které bylo již dříve zaznamenáno (Coughlan 1985; Van Dyk et Pletschke 2012). Nejvyšší aktivita chitinázy byla zaznamenána ve Vídni na rostlinném opadu *Astragalus exscapus* v prvních měsících rozkladu, kde je zároveň vysoký poměr hub a aktinobakterií. Tento enzym je schopný rozkládat chitin z buněčných stěn hub a jeho aktivita se zvyšuje po té, co houby začínají odumírat (Suseela et al., 2014). Může být také produkován aktinobakteriemi k lyzi houbových buněk nebo k potlačení jejich růstu (Suseela et al., 2014). To by v tom případě znamenalo, že houbová biomasa na *Astragalus exscapus* byla v lednu z větší části odumřelá nebo došlo k její inhibici poté, co se zvýšila aktinobakteriální aktivita chitinázy.

Aktivita lignolytických oxidázových enzymů byla u manganové peroxidázy a oxidázy velmi nízká, což není neobvyklé, protože například u manganové peroxidázy se předpokládá, že je produkována především houbami kolonizujícími dřevo (Hofrichter, 2002). Spolu s peroxidázou byly tyto enzymy produkovány na všech rostlinách a na obou lokalitách bez signifikantního rozdílu, což značí, že jejich produkce není ani substrátově a ani lokálně specifická. Nejvyšší aktivity a zároveň statistická významnost vůči většině faktorů, oproti

ostatním oxidativním enzymům, byly zaznamenány u lakázy na začátku rozkladu na obou lokalitách u *Carex humilis.* Tento enzym má větší aktivitu na této rostlině pravděpodobně z důvodu její horší rozložitelnosti. Aktivitou lakázy se zvýší rozklad ligninu, čímž se zpřístupní cesta k lépe rozložitelným sloučeninám. Její produkce na začátku rozkladu je v rozporu se studií Šnajdr et al. (2011), kde se aktivita tohoto enzymu na dubovém listí zvyšuje až po dvou letech rozkladu. Naopak podobný časový trend byl v aktivitě lakázy zaznamenán během rozkladu travinného i stromového rostlinného opadu Urbanovou et al. (2014).

Analýza společenstva mikroorganismů ukázala celkově vyšší poměr aktinobakterií (kopií genů 16S rRNA) vůči houbám (kopií genů 18S rRNA) na obou lokalitách a u všech rostlinných opadů. U aktinobakterií nebyl průkazný vztah jejich početnosti k různým rostlinám, což může znamenat, že jsou generalisté a jsou schopné kolonizovat organický substrát nehledě na jeho chemické složení. Naproti tomu u hub byla statisticky významná závislost jejich množství na různých rostlinných druzích, což poukazuje na to, že jsou specialisté a kolonizují jen určitý druh rostlinného opadu. Podobné výsledky zaznamenala studie Urbanové et al. (2015), kdy byla studována diverzita hub a bakterií na opadu smíšeného lesa.

Během rozkladu je patrná větší variabilita v abundanci aktinobakterií oproti houbám na jednotlivých lokalitách. K opačnému závěru naopak dospěli Kaisermann et al. (2015), kdy byly půdní bakterie pravděpodobně lépe adaptované na změny vlhkosti a nevykazovaly tedy tak velké fluktuace v abundanci jako houby. To může potvrdit hypotézu, že se na opadu nachází jiné společenstvo mikroorganismů než v půdě, podobně jak bylo zaznamenáno dalšími autory (Prescott and Grayston, 2013; Smyth et al., 2015). V našich výsledcích bylo potvrzeno nižší množství mikroorganismů v půdě než na opadu, což může být vysvětleno nižším množstvím živin v humusovém horizontu v porovnání s opadovou vrstvou, protože většinu snadno rozložitelných látek a živin využijí mikroorganismy dříve, než se rostlinný substrát dostane z opadové vrstvy do půdy (Feng et al., 2009).

Množství hub nebylo statisticky významně odlišné mezi lokalitami. To znamená, že ani rozdíly v pH půdy mezi lokalitami neměly významný vliv na abundanci hub, což je v rozporu s některými autory, podle kterých je kyselé pH půdy spojené s narůstajícím poměrem hub v mikrobiálním společenstvu (Kamble et al., 2014). Naopak podobné výsledky

zaznamenali Smyth et al. (2015), podle kterých není abundance hub odlišná mezi půdami s odlišnými hodnotami pH. Houby slabě korelovaly pouze s některými rozkladnými enzymy jako je například β-xylozidáza, chitináza a arylsulfatáza, se kterými aktinobakterie korelovaly naopak negativně. To může potvrzovat a zároveň vyvracet teorii, že arylsulfataza je produkována především bakteriemi a aktivita β-glukosidázy a β-xylosidázy spíše houbami, jak píše ve své práci Malý et al. (2014). Produkce extracelulárních enzymů houbami by se mohla zvýšit ve vhodných podmínkách prostředí, nehledě na to, že jejich biomasa zůstává stejná, jak bylo potvrzeno studií A'Bear et al. (2014). To by vysvětlovalo nízkou anebo nulovou korelaci mezi houbami a některými enzymy.

Na Oblíku byla stanovena statisticky vyšší abundance aktinobakterií než ve Vídni, což je v souladu se studií Sagova-Mareckova et al. (2011), kdy byly aktinobakterie početnější na území s diverznějším a lépe rozložitelným porostem. Nárůst aktinobakterií může být na Oblíku i ve Vídni způsoben klimatickými podmínkami. U *Fagus sylvatica* se zdá, že nárůst aktinobakterií sleduje křivku nárůstu teploty, kdy ve Vídni dosahuje teplota nižších a na Oblíku vyšších hodnot. Jelikož je patrné nižší množství aktinobakterií ve Vídni pouze na *Fagus sylvatica*, není pravděpodobně jejich abundance negativně ovlivněna pH půdy, jak bylo naopak zjištěno Urbanová et al. (2011). Na ostatních rostlinách se zdá, že abundance aktinobakterií na Oblíku i ve Vídni sleduje křivku vlhkosti. Ve Vídni mohou hrát roli i jiné faktory, které početnost aktinobakterií v podzimních měsících snižují. Aktinobakterie tedy na rozdíl od hub sledují sezonní změny prostředí, jak potvrdili i Kopecky et al. (2011). S pomocí ANOVA bylo prokázáno, že největší rozdíl v abundanci aktinobakterií mezi Oblíkem a Vídní se nachází u rostlinného opadu *Fagus sylvatica*. Jeho opad je na Oblíku alochtonní a přesto se na něm nachází více aktinobakterií i hub, než ve Vídni. Na dalších dvou rostlinných druzích je více aktinobakterií na Oblíku než ve Vídni a u hub je to naopak. To znamená, že ve společenstvu houby lépe kolonizují alochtonní substrát nehledě na odlišné podmínky prostředí a aktinobakterie alochtonní i autochtonní substrát raději kolonizují na Oblíku.

Korelační analýza potvrdila negativní korelaci aktinobakterií téměř se všemi extracelulárními enzymy. Tato negativní korelace byla u bakterií s některými hydrolytickými enzymy zjištěna již dříve (Criquet et al., 2002). Tento závěr může být způsoben prodlevou mezi aktivitou enzymů a nárůstem biomasy, kdy zvýšená aktivita enzymu je později doprovázena nárůstem aktinobakteriální biomasy, jak bylo podobně zaznamenáno i ve studii

Andersson et al. (2004). Přesto byla zaznamenána silnější korelace hmotnosti rostlinného opadu a aktinobakteriální biomasy než korelace hmotnosti a biomasy houbové. Korelace aktivity enzymů a úbytku hmotnosti nebyla u žádného enzymu výrazně odlišná v porovnání s korelací mezi oběma skupinami mikroorganismů a hmotností. To znamená, že jsme nepotvrdily významnější vztah úbytku hmotnosti s aktivitou mikrobiálního společenstva před vztahem úbytku hmotnosti s mikrobiální biomasou, jak je zaznamenáno ve studii McGuire & Treseder (2010).

Analýza společenstva mikroorganismů s pomocí měření počtů genů 16S nebo 18S rRNA neposkytuje informaci o celkové biomase hub a aktinobakterií v půdě. Lze z ní spíše usoudit, jaký bude poměr mezi aktinobakteriemi a houbami v mikrobiálním společenstvu, pokud je bráno na vědomí, že v aktinobakteriálním genomu se nachází asi 2-6 genů pro 16S rRNA, zatímco u hub je počet 18S rRNA o řád vyšší (Hirsch et al., 2010). Z toho vyplývá, že se nachází desetkrát více aktinobakterií ve společenstvu než hub, nicméně buněčná velikost aktinobakterií je minimálně o řád menší (Lavelle et Spain, 2005). Bylo by možné stanovit biomasu hub a aktinobakterií dalšími metodami, například analýzou mastných kyselin (PLFA). Tato metoda je založená na částečné identifikaci markerových mastných kyselin, specifických pro jednotlivé taxony, u nichž není známá přesná koncentrace v jednotlivých mikroorganismech. Také samotná kvantifikace mastných kyselin je problematická a neposkytuje přesné kvantitativní výsledky o mikroorganismech (Zelles, 1999; Welc et al. 2012).

Výsledky této práce poukazují na význam různých abiotických faktorů na abundanci a aktivitu půdních mikrobiálních rozkladačů aktinobakterií a hub, které se pak promítnou úbytkem hmotnosti organického substrátu v opadové vrstvě. Biomasa aktinobakterií může během rozkladu hrát významnější roli, než jí dosud byla přisuzována, je však třeba bližší výzkum rozkladné aktivity této skupiny mikroorganismů. Tato práce může sloužit jako podklad pro další výzkum rozkladu organické hmoty, například podrobnějšího studia významu aktinobakterií a jejich interakcí s houbami během rozkladu.

7 Závěr

Cílem práce bylo sledovat, jaký vliv budou mít environmentální faktory prostředí v kombinaci s odlišnými druhy rostlinného opadu na abundanci hlavních skupin mikrobiálních rozkladačů a jejich rozkladnou aktivitu reprezentovanou produkcí specifických enzymů. Výsledky ukázaly, jaké mikroorganismy a jimi produkované enzymy se podílejí na rozkladu vybraného rostlinného materiálu. Suchá hmotnost ubývala specificky na obou lokalitách a také pro všechny tři druhy rostlinného opadu během rozkladu.

- Enzymová aktivita byla substrátově specifická, především u jednotlivých rostlinných druhů opadu, kdy nejvyšší aktivita u hydrolytických exoenzymů byla zaznamenána na *Astragalus exscapus*, u endoceluláz na *Fagus sylvatica* a u oxidativního enzymu lakázy na *Carex humilis*. U exoenzymů a většiny oxidáz nebyl prokázán rozdíl v jejich aktivitě mezi lokalitami, s výjimkou kyselé fosfatázy a oxidázy.
- Enzymová aktivita se měnila v čase, přičemž u všech enzymů byl patrný úbytek mezi prvním a posledním měsícem rozkladu, ale maxima produkce jednotlivých enzymů se lišily u jednotlivých rostlin mezi lokalitami. Největší aktivity byly u exoenzymů zaznamenány na začátku rozkladu v lednu pro všechny rostlinné druhy opadů ve Vídni a naopak v jiných měsících než v lednu zase na Oblíku.
- Celkově větší aktivity byly zaznamenány u těchto enzymů právě ve Vídni než na Oblíku. U endoceluláz byly větší aktivity naměřeny na Oblíku než ve Vídni a u oxidáz jsou maxima naměřena pro jednotlivé enzymy různě.
- Složení společenstva mikrobiálních rozkladačů je na obou lokalitách charakteristické vyšším poměrem aktinobakterií než hub v průběhu rozkladu, kdy se objevují výjimky především na začátku rozkladu rostlinného opadu *Astragalus exscapus* ve Vídni i na Oblíku a v květnu a listopadu na *Carex humilis*, kdy dominují společenstvu houby, které jsou však v následujících měsících opět vystřídány aktinobakteriemi.
- Houby se projevily jako substrátově specifické mikroorganismy, ale ne lokálně specifické, ukázalo se totiž, že preferují alochtonní rostlinný opad před autochtonním, nehledě na odlišných podmínkách daných lokalit. Naproti tomu aktinobakterie se projevily jako lokálně specifické mikroorganismy, protože kolonizovaly jak alochtonní,

tak autochtonní rostlinný opad preferenčně na lokalitě Oblík. Houby i aktinobakterie upřednostnily kolonizaci rostlinného opadu *Fagus sylvatica* spíše na Oblíku než ve Vídni.

- Korelace mezi aktinobakteriemi a houbami ukázala, že jsou na sobě pozitivně závislé. Negativní korelace s hmotností opadu také ukázala, že s jejich nárůstem rostlinný opad ubývá. Přesto bylo zjištěno, že většina aktinobakterií spolu s aktivitou enzymů korelují mírně negativně a u hub zase mírně pozitivně nebo vůbec, přičemž aktinobakterie korelovaly s větším množstvím jednotlivých enzymů, i když negativně, v porovnání s houbami.

8 Reference

A'Bear, a. D., Jones, T.H., Kandeler, E., Boddy, L., 2014. Interactive effects of temperature and soil moisture on fungal-mediated wood decomposition and extracellular enzyme activity. Soil Biol. Biochem. 70, 151–158. doi:10.1016/j.soilbio.2013.12.017

Abdulla, H.M., El-Shatoury, S. a., 2007. Actinomycetes in rice straw decomposition. Waste Manag. 27, 850–853. doi:10.1016/j.wasman.2006.06.006

Allison, S.D., Chacon, S.S., German, D.P., 2014. Substrate concentration constraints on microbial decomposition. Soil Biol. Biochem. 79, 43–49. doi:10.1016/j.soilbio.2014.08.021

Allison, S.D., Treseder, K.K., 2011. Climate change feedbacks to microbial decomposition in boreal soils. Fungal Ecol. 4, 362–374. doi:10.1016/j.funeco.2011.01.003

Andersson, M., Kjøller, A., Struwe, S., 2004. Microbial enzyme activities in leaf litter, humus and mineral soil layers of European forests. Soil Biol. Biochem. 36, 1527–1537. doi:10.1016/j.soilbio.2004.07.018

Baldrian, P., 2009. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. Plant, Soil Environ. 55, 370–378. doi:10.1007/s11104-008-9731-0

Baldrian, P., Merhautová, V., Petránková, M., Cajthaml, T., Šnajdr, J., 2010. Distribution of microbial biomass and activity of extracellular enzymes in a hardwood forest soil reflect soil moisture content. Appl. Soil Ecol. 46, 177–182. doi:10.1016/j.apsoil.2010.08.013

Ball, B. a., Carrillo, Y., Molina, M., 2014. The influence of litter composition across the litter-soil interface on mass loss, nitrogen dynamics and the decomposer community. Soil Biol. Biochem. 69, 71–82. doi:10.1016/j.soilbio.2013.10.048

Bennur, T., Kumar, A.R., Zinjarde, S., Javdekar, V., 2015. Nocardiopsis species: Incidence, ecological roles and adaptations. Microbiol. Res. 174, 33–47. doi:10.1016/j.micres.2015.03.010

Berg, B., 2000. Litter decomposition and organic matter turnover in northern forest soils. For. Ecol. Manage. 133, 13–22. doi:10.1016/S0378-1127(99)00294-7

Berg, B., De Santo, A.V., Rutigliano, F.A., Fierro, A., Ekbohm, G., 2003. Limit values for plant litter decomposing in two contrasting soils - Influence of litter elemental composition. Acta Oecologica 24, 295–302. doi:10.1016/j.actao.2003.08.002

Berger, T.W., Duboc, O., Djukic, I., Tatzber, M., Gerzabek, M.H., Zehetner, F., 2015. Decomposition of beech (Fagus sylvatica) and pine (Pinus nigra) litter along an Alpine elevation gradient: Decay and nutrient release. Geoderma 251-252, 92–104. doi:10.1016/j.geoderma.2015.03.024

Bray, S.R., Kitajima, K., Mack, M.C., 2012. Temporal dynamics of microbial communities on decomposing leaf litter of 10 plant species in relation to decomposition rate. Soil Biol. Biochem. 49, 30–37. doi:10.1016/j.soilbio.2012.02.009

Brown, G.G., Barois, I., Lavelle, P., 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. Eur. J. Soil Biol. 36, 177–198. doi:10.1016/S1164-5563(00)01062-1

Brown, M.E., Chang, M.C.Y., 2014. Exploring bacterial lignin degradation. Curr. Opin. Chem. Biol. 19, 1–7. doi:10.1016/j.cbpa.2013.11.015

Bugg, T.D.H., Ahmad, M., Hardiman, E.M., Singh, R., 2011. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. Curr. Opin. Biotechnol. 22, 394–400. doi:10.1016/j.copbio.2010.10.009

Caldwell, B. a., 2005. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. Pedobiologia (Jena). 49, 637–644. doi:10.1016/j.pedobi.2005.06.003

Cleveland, C.C., Liptzin, D., 2007. C:N:P stoichiometry in soil: Is there a “Redfield ratio” for the microbial biomass? Biogeochemistry 85, 235–252. doi:10.1007/s10533-007-9132-0

Coughlan, M.P., 1985. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 3, 39–109. doi:10.1080/02648725.1985.10647809

Creamer, C. a., de Menezes, A.B., Krull, E.S., Sanderman, J., Newton-Walters, R., Farrell, M., 2015. Microbial community structure mediates response of soil C decomposition to litter addition and warming. Soil Biol. Biochem. 80, 175–188. doi:10.1016/j.soilbio.2014.10.008

Criquet, S., Tagger, S., Vogt, G., Le Petit, J., 2002. Endoglucanase and β-glycosidase activities in an evergreen oak litter: Annual variation and regulating factors. Soil Biol. Biochem. 34, 1111–1120. doi:10.1016/S0038-0717(02)00045-7

Cuchietti, a., Marcotti, E., Gurvich, D.E., Cingolani, a. M., Pérez Harguindeguy, N., 2014. Leaf litter mixtures and neighbour effects: Low-nitrogen and high-lignin species increase decomposition rate of high-nitrogen and low-lignin neighbours. Appl. Soil Ecol. 82, 44–51. doi:10.1016/j.apsoil.2014.05.004

Čermák, L., Kopecký, J., Novotná, J., Omelka, M., Parkhomenko, N., Plháčková, K., Ságová-Marečková, M., 2008. Bacterial communities of two contrasting soils reacted differently to lincomycin treatment. Appl. Soil Ecol. 40, 348–358. doi:10.1016/j.apsoil.2008.06.001

Davidson, E. a, Janssens, I. a, 2006. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. Nature 440, 165–173. doi:10.1038/nature04514

De Boer, W., Folman, L.B., Summerbell, R.C., Boddy, L., 2005. Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development. FEMS Microbiol. Rev. 29, 795–811. doi:10.1016/j.femsre.2004.11.005

Delgado-Baquerizo, M., García-Palacios, P., Milla, R., Gallardo, A., Maestre, F.T., 2015. Soil characteristics determine soil carbon and nitrogen availability during leaf litter decomposition regardless of litter quality. Soil Biol. Biochem. 81, 134–142. doi:10.1016/j.soilbio.2014.11.009

Duboc, O., Zehetner, F., Djukic, I., Tatzber, M., Berger, T.W., Gerzabek, M.H., 2012. Decomposition of European beech and Black pine foliar litter along an Alpine elevation gradient: Mass loss and molecular characteristics. Geoderma 189-190, 522–531. doi:10.1016/j.geoderma.2012.06.018

Elsgaard, L., Andersen, G.H., Eriksen, J., 2002. Measurement of arylsulphatase activity in agricultural soils using a simpli ® ed assay. Soil Biol. Biochem. 34, 79–82. doi:10.1016/S0038-0717(01)00157-2

El-Tarabily, K. a., Sivasithamparam, K., 2006. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. Soil Biol. Biochem. 38, 1505–1520. doi:10.1016/j.soilbio.2005.12.017

Feng, W., Zou, X., Schaefer, D., 2009. Above- and belowground carbon inputs affect seasonal variations of soil microbial biomass in a subtropical monsoon forest of southwest China. Soil Biol. Biochem. 41, 978–983. doi:10.1016/j.soilbio.2008.10.002

Fenchel, T., 2008. The microbial loop - 25??years later. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 366, 99–103. doi:10.1016/j.jembe.2008.07.013

Fierer, N., Schimel, J.P., 2002. Effects of drying-rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. Soil Biol. Biochem. 34, 777–787. doi:10.1016/S0038-0717(02)00007-X

Fontaine, S., Henault, C., Aamor, a., Bdioui, N., Bloor, J.M.G., Maire, V., Mary, B., Revaillot, S., Maron, P. a., 2011. Fungi mediate long term sequestration of carbon and nitrogen in soil through their priming effect. Soil Biol. Biochem. 43, 86–96. doi:10.1016/j.soilbio.2010.09.017

Frankland, J.C., 1998. Fungal succession — unravelling the unpredictable. Mycol. Res. 102, 1–15. doi:10.1017/S0953756297005364

Frouz, J., Jílková, V., Cajthaml, T., Pižl, V., Tajovský, K., Háněl, L., Burešová, A., Šimáčková, H., Kolaříková, K., Franklin, J., Nawrot, J., Groninger, J.W., Stahl, P.D., 2013a. Soil biota in post-mining sites along a climatic gradient in the USA: Simple communities in shortgrass prairie recover faster than complex communities in tallgrass prairie and forest. Soil Biol. Biochem. 67, 212–225. doi:10.1016/j.soilbio.2013.08.025

Frouz, J., Livečková, M., Albrechtová, J., Chroňáková, A., Cajthaml, T., Pižl, V., Háněl, L., Starý, J., Baldrian, P., Lhotáková, Z., Šimáčková, H., Cepáková, Š., 2013b. Is the effect of trees on soil properties mediated by soil fauna? A case study from post-mining sites. For. Ecol. Manage. 309, 87–95. doi:10.1016/j.foreco.2013.02.013

Frouz, J., Roubíčková, A., Heděnec, P., Tajovský, K., 2015. Do soil fauna really hasten litter decomposition? A meta-analysis of enclosure studies. Eur. J. Soil Biol. 68, 18–24. doi:10.1016/j.ejsobi.2015.03.002

Gabor, R.S., Eilers, K., McKnight, D.M., Fierer, N., Anderson, S.P., 2014. From the litter layer to the saprolite: Chemical changes in water-soluble soil organic matter and their correlation to microbial community composition. Soil Biol. Biochem. 68, 166–176. doi:10.1016/j.soilbio.2013.09.029

Ge, X., Zeng, L., Xiao, W., Huang, Z., Geng, X., Tan, B., 2013. Effect of litter substrate quality and soil nutrients on forest litter decomposition: A review. Acta Ecol. Sin. 33, 102–108. doi:10.1016/j.chnaes.2013.01.006

Gonzalez, B., Vicuña, R., 1990. Recent advances in studies on the bacterial degradation of lignin 157, 151–157.

Gunina, A., Kuzyakov, Y., 2014. Pathways of litter C by formation of aggregates and SOM density fractions: Implications from 13C natural abundance. Soil Biol. Biochem. 71, 95–104. doi:10.1016/j.soilbio.2014.01.011

Gutiérrez-Girón, A., Díaz-Pinés, E., Rubio, A., Gavilán, R.G., 2015. Both altitude and vegetation affect temperature sensitivity of soil organic matter decomposition in Mediterranean high mountain soils. Geoderma 237-238, 1–8. doi:10.1016/j.geoderma.2014.08.005

Haňáčková, Z., Koukol, O., Štursová, M., Kolařík, M., Baldrian, P., 2015. Fungal succession in the needle litter of a montane Picea abies forest investigated through strain isolation and molecular fingerprinting. Fungal Ecol. 13, 157–166. doi:10.1016/j.funeco.2014.09.007

Hättenschwiler, S., Tiunov, A. V., Scheu, S., 2005. Biodiversity and Litter Decomposition in Terrestrial Ecosystems. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 36, 191–218. doi:10.1146/annurev.ecolsys.36.112904.151932

Hirsch, P.R., Mauchline, T.H., Clark, I.M., 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. Soil Biol. Biochem. 42, 878–887. doi:10.1016/j.soilbio.2010.02.019

Hofrichter, M., 2002. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme Microb. Technol. 30, 454–466. doi:10.1016/S0141-0229(01)00528-2

Hu, Q., Wu, Q., Yao, B., Xu, X., 2015. Ecosystem respiration and its components from a Carex meadow of Poyang Lake during the drawdown period. Atmos. Environ. 100, 124–132. doi:10.1016/j.atmosenv.2014.10.047

Chaplot, V., Cooper, M., 2015. Geoderma Soil aggregate stability to predict organic carbon outputs from soils. Geoderma 243-244, 205–213. doi:10.1016/j.geoderma.2014.12.013

Innangi, M., Schenk, M.K., d'Alessandro, F., Pinto, S., Menta, C., Papa, S., Fioretto, A., 2015. Field and microcosms decomposition dynamics of European beech leaf litter: Influence of climate, plant material and soil with focus on N and Mn. Appl. Soil Ecol. 93, 88–97. doi:10.1016/j.apsoil.2015.04.007

Jayasinghe, B. a T.D., Parkinson, D., 2009. Earthworms as the vectors of actinomycetes antagonistic to litter decomposer fungi. Appl. Soil Ecol. 43, 1–10. doi:10.1016/j.apsoil.2009.06.001

Jayasinghe, B. a T.D., Parkinson, D., 2008. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. Appl. Soil Ecol. 38, 109–118. doi:10.1016/j.apsoil.2007.09.005

Jiang, Y., Yin, X., Wang, F., 2014. The influence of litter mixing on decomposition and soil fauna assemblages in a Pinus koraiensis mixed broad-leaved forest of the Changbai Mountains, China. Eur. J. Soil Biol. 55, 28–39. doi:10.1016/j.ejsobi.2012.11.004

Jin, V.L., Haney, R.L., Fay, P. a., Polley, H.W., 2013. Soil type and moisture regime control microbial C and N mineralization in grassland soils more than atmospheric CO2-induced changes in litter quality. Soil Biol. Biochem. 58, 172–180. doi:10.1016/j.soilbio.2012.11.024

Juarez, S., Nunan, N., Duday, A.-C., Pouteau, V., Schmidt, S., Hapca, S., Falconer, R., Otten, W., Chenu, C., 2013. Effects of different soil structures on the decomposition of native and added organic carbon. Eur. J. Soil Biol. 58, 81–90. doi:10.1016/j.ejsobi.2013.06.005

Jumpponen, A., Jones, K.L., 2014. Tallgrass prairie soil fungal communities are resilient to climate change. Fungal Ecol. 10, 44–57. doi:10.1016/j.funeco.2013.11.003

Kaisermann, a., Maron, P. a., Beaumelle, L., Lata, J.C., 2015. Fungal communities are more sensitive indicators to non-extreme soil moisture variations than bacterial communities. Appl. Soil Ecol. 86, 158–164. doi:10.1016/j.apsoil.2014.10.009

Kamble, P.N., Gaikwad, V.B., Kuchekar, S.R., Bååth, E., 2014. Microbial growth, biomass, community structure and nutrient limitation in high pH and salinity soils from Pravaranagar (India). Eur. J. Soil Biol. 65, 87–95. doi:10.1016/j.ejsobi.2014.10.005

Kang, H., Freeman, C., 1999. Phosphatase and arylsulphatase activities in wetland soils: Annual variation and controlling factors. Soil Biol. Biochem. 31, 449–454. doi:10.1016/S0038-0717(98)00150-3

Knill, C.J., Kennedy, J.F., 2003. Degradation of cellulose under alkaline conditions. Carbohydr. Polym. 51, 281–300. doi:10.1016/S0144-8617(02)00183-2

Kopecky, J., Kyselkova, M., Omelka, M., Cermak, L., Novotna, J., Grundmann, G.L., Moënne-Loccoz, Y., Sagova-Mareckova, M., 2011. Actinobacterial community dominated by a distinct clade in acidic soil of a waterlogged deciduous forest. FEMS Microbiol. Ecol. 78, 386–394. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01173.x

Koranda, M., Schnecker, J., Kaiser, C., Fuchslueger, L., Kitzler, B., Stange, C.F., Sessitsch, A., Zechmeister-Boltenstern, S., Richter, A., 2011. Microbial processes and community composition in the rhizosphere of European beech - The influence of plant C exudates. Soil Biol. Biochem. 43, 551–558. doi:10.1016/j.soilbio.2010.11.022

Koukoura, Z., Mamolos, a. P., Kalburtji, K.L., 2003. Decomposition of dominant plant species litter in a semi-arid grassland. Appl. Soil Ecol. 23, 13–23. doi:10.1016/S0929-1393(03)00006-4

Lam, S.K., Norton, R., Armstrong, R., Chen, D., 2014. Increased microbial activity under elevated [CO2] does not enhance residue decomposition in a semi-arid cropping system in Australia. Soil Biol. Biochem. 72, 97–99. doi:10.1016/j.soilbio.2014.01.028

Landesman, W.J., Nelson, D.M., Fitzpatrick, M.C., 2014. Soil properties and tree species drive ß-diversity of soil bacterial communities. Soil Biol. Biochem. 76, 201–209. doi:10.1016/j.soilbio.2014.05.025

Lavelle Patrick, Spain V. Alister, 2005, Soil ecology, Kluwer Academic Publishers, second printing with corrections, 203-229, 359-388

Lee, H., Fitzgerald, J., Hewins, D.B., McCulley, R.L., Archer, S.R., Rahn, T., Throop, H.L., 2014. Soil moisture and soil-litter mixing effects on surface litter decomposition: A controlled environment assessment. Soil Biol. Biochem. 72, 123–132. doi:10.1016/j.soilbio.2014.01.027

Leifheit, E.F., Verbruggen, E., Rillig, M.C., 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi reduce decomposition of woody plant litter while increasing soil aggregation. Soil Biol. Biochem. 81, 323–328. doi:10.1016/j.soilbio.2014.12.003

Liu, S., Zhang, W., Wang, K., Pan, F., Yang, S., Shu, S., 2015. Factors controlling accumulation of soil organic carbon along vegetation succession in a typical karst region in Southwest China. Sci. Total Environ. 521-522, 52–58. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.03.074

Majumdar, S., Lukk, T., Solbiati, J.O., Bauer, S., Nair, S.K., Cronan, J.E., Gerlt, J. a., 2014. Roles of small laccases from streptomyces in lignin degradation. Biochemistry 53, 4047–4058. doi:10.1021/bi500285t

Malý, S., Fiala, P., Reininger, D., Obdržálková, E., 2014. The relationships among microbial parameters and the rate of organic matter mineralization in forest soils, as influenced by forest type. Pedobiologia (Jena). 57, 235–244. doi:10.1016/j.pedobi.2014.09.003

Martínez-Yrízar, A., Núñez, S., Búrquez, A., 2007. Leaf litter decomposition in a southern Sonoran Desert ecosystem, northwestern Mexico: Effects of habitat and litter quality. Acta Oecologica 32, 291–300. doi:10.1016/j.actao.2007.05.010

McDaniel, M.D., Grandy, a. S., Tiemann, L.K., Weintraub, M.N., 2014. Crop rotation complexity regulates the decomposition of high and low quality residues. Soil Biol. Biochem. 78, 243–254. doi:10.1016/j.soilbio.2014.07.027

McGuire, K.L., Treseder, K.K., 2010. Microbial communities and their relevance for ecosystem models: Decomposition as a case study. Soil Biol. Biochem. 42, 529–535. doi:10.1016/j.soilbio.2009.11.016

Meier, C.L., Bowman, W.D., 2008. Links between plant litter chemistry, species diversity, and below-ground ecosystem function. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 19780–19785. doi:10.1073/pnas.0805600105

Moretto, a. S., Distel, R. a., Didoné, N.G., 2001. Decomposition and nutrient dynamic of leaf litter and roots from palatable and unpalatable grasses in a semi-arid grassland. Appl. Soil Ecol. 18, 31–37. doi:10.1016/S0929-1393(01)00151-2

Mouginot, C., Kawamura, R., Matulich, K.L., Berlemont, R., Allison, S.D., Amend, A.S., Martiny, A.C., 2014. Elemental stoichiometry of fungi and bacteria strains from grassland leaf litter. Soil Biol. Biochem. 76, 278–285. doi:10.1016/j.soilbio.2014.05.011

Nie, M., Pendall, E., Bell, C., Wallenstein, M.D., 2014. Soil aggregate size distribution mediates microbial climate change feedbacks. Soil Biol. Biochem. 68, 357–365. doi:10.1016/j.soilbio.2013.10.012

O'Malley, M. a., 2008. "Everything is everywhere: but the environment selects": ubiquitous distribution and ecological determinism in microbial biogeography. Stud. Hist. Philos. Sci. Part C Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci. 39, 314–325. doi:10.1016/j.shpsc.2008.06.005

O'Neill, E.G., Norby, R.J., 1996. Litter Quality and Decomposition Rates of Foliar Litter Produced under CO$_{2}$ Enrichment, Carbon Dioxide and Terrestrial Ecosystems. ACADEMIC PRESS, INC. doi:10.1016/b978-012505295-5/50007-0

Papa, S., Pellegrino, a., Fioretto, a., 2008. Microbial activity and quality changes during decomposition of Quercus ilex leaf litter in three Mediterranean woods. Appl. Soil Ecol. 40, 401–410. doi:10.1016/j.apsoil.2008.06.013

Peralta, A.L., Ludmer, S., Matthews, J.W., Kent, A.D., 2014. Bacterial community response to changes in soil redox potential along a moisture gradient in restored wetlands. Ecol. Eng. 73, 246–253. doi:10.1016/j.ecoleng.2014.09.047

Pometto, a. L., Crawford, D.L., 1986. Catabolic fate of Streptomyces viridosporus T7A-produced, acid-precipitable polymeric lignin upon incubation with ligninolytic

Streptomyces species and Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 51, 171–179.

Ponge, J.F., 2003. Humus forms in terrestrial ecosystems: A framework to biodiversity. Soil Biol. Biochem. 35, 935–945. doi:10.1016/S0038-0717(03)00149-4

Prescott, C.E., Grayston, S.J., 2013. Tree species influence on microbial communities in litter and soil: Current knowledge and research needs. For. Ecol. Manage. 309, 19–27. doi:10.1016/j.foreco.2013.02.034

Rousk, J., Brookes, P.C., Bååth, E., 2010. Investigating the mechanisms for the opposing pH relationships of fungal and bacterial growth in soil. Soil Biol. Biochem. 42, 926–934. doi:10.1016/j.soilbio.2010.02.009

Sagova-Mareckova, M., Cermak, L., Novotna, J., Plhackova, K., Forstova, J., Kopecky, J., 2008. Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2902–2907. doi:10.1128/AEM.02161-07

Sagova-Mareckova, M., Omelka, M., Cermak, L., Kamenik, Z., Olsovska, J., Hackl, E., Kopecky, J., Hadacek, F., 2011. Microbial communities show parallels at sites with distinct litter and soil characteristics. Appl. Environ. Microbiol. 77, 7560–7567. doi:10.1128/AEM.00527-11

Sardans, J., Peñuelas, J., Ogaya, R., 2008. Experimental drought reduced acid and alkaline phosphatase activity and increased organic extractable P in soil in a Quercus ilex Mediterranean forest. Eur. J. Soil Biol. 44, 509–520. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.09.011

Sariyildiz, T., Anderson, J.M., Kucuk, M., 2005. Effects of tree species and topography on soil chemistry, litter quality, and decomposition in Northeast Turkey. Soil Biol. Biochem. 37, 1695–1706. doi:10.1016/j.soilbio.2005.02.004

Schlesinger, W., 1984. Soil organic matter: a source of atmospheric CO2. role Terr. Veg. ….

Schmidt, B.H.M., Kalbitz, K., Braun, S., Fuß, R., McDowell, W.H., Matzner, E., 2011. Microbial immobilization and mineralization of dissolved organic nitrogen from forest floors. Soil Biol. Biochem. 43, 1742–1745. doi:10.1016/j.soilbio.2011.04.021

Schwartz, E., Adair, K.L., Schuur, E. a., 2007. Bacterial community structure correlates with decomposition parameters along a Hawaiian precipitation gradient. Soil Biol. Biochem. 39, 2164–2167. doi:10.1016/j.soilbio.2007.02.013

Smyth, C.E., Macey, D., Trofymow, J. a, 2015. Soil Biology & Biochemistry Long-term litter decay in Canadian forests and the in fl uence of soil microbial community and soil chemistry. Soil Biol. Biochem. 80, 251–259. doi:10.1016/j.soilbio.2014.09.027

Song, F., Fan, X., Song, R., 2010. Review of mixed forest litter decomposition researches. Acta Ecol. Sin. 30, 221–225. doi:10.1016/j.chnaes.2010.06.006

Strickland, M.S., Rousk, J., 2010. Considering fungal: Bacterial dominance in soils - Methods, controls, and ecosystem implications. Soil Biol. Biochem. 42, 1385–1395. doi:10.1016/j.soilbio.2010.05.007

Suseela, V., Tharayil, N., Xing, B., Dukes, J.S., 2014. Warming alters potential enzyme activity but precipitation regulates chemical transformations in grass litter exposed to simulated climatic changes. Soil Biol. Biochem. 75, 102–112. doi:10.1016/j.soilbio.2014.03.022

Šnajdr, J., Cajthaml, T., Valášková, V., Merhautová, V., Petránková, M., Spetz, P., Leppänen, K., Baldrian, P., 2011. Transformation of Quercus petraea litter: Successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. FEMS Microbiol. Ecol. 75, 291–303. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00999.x

Tarafdar, J.C., Meena, S.C., Kathju, S., 2001. Influence of straw size on activity and biomass of soil microorganisms during decomposition. Eur. J. Soil Biol. 37, 157–160. doi:10.1016/S1164-5563(01)01084-6

Thiessen, S., Gleixner, G., Wutzler, T., Reichstein, M., 2013. Both priming and temperature sensitivity of soil organic matter decomposition depend on microbial biomass - An incubation study. Soil Biol. Biochem. 57, 739–748. doi:10.1016/j.soilbio.2012.10.029

Tian, J., Pausch, J., Yu, G., Blagodatskaya, E., Gao, Y., Kuzyakov, Y., 2015. Aggregate size and their disruption affect mineralization and priming effect C-labeled glucose. Appl. Soil Ecol. 90, 1–10. doi:10.1016/j.apsoil.2015.01.014

Tian, L., Shi, W., 2014. Short-term effects of plant litter on the dynamics, amount, and stoichiometry of soil enzyme activity in agroecosystems. Eur. J. Soil Biol. 65, 23–29. doi:10.1016/j.ejsobi.2014.08.004

Ting, A.S.Y., Hermanto, A., Peh, K.L., 2014. Indigenous actinomycetes from empty fruit bunch compost of oil palm: Evaluation on enzymatic and antagonistic properties. Biocatal. Agric. Biotechnol. 3, 310–315. doi:10.1016/j.bcab.2014.03.004

Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, a., Itävaara, M., 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: A review. Bioresour. Technol. 72, 169–183. doi:10.1016/S0960-8524(99)00104-2

Uchida, M., Mo, W., Nakatsubo, T., Tsuchiya, Y., Horikoshi, T., Koizumi, H., 2005. Microbial activity and litter decomposition under snow cover in a cool-temperate broad-leaved deciduous forest. Agric. For. Meteorol. 134, 102–109. doi:10.1016/j.agrformet.2005.11.003

Urbanová, M., Kopecký, J., Valášková, V., Ságová-Marečková, M., Elhottová, D., Kyselková, M., Moënne-Loccoz, Y., Baldrian, P., 2011. Development of bacterial community during spontaneous succession on spoil heaps after brown coal mining. FEMS Microbiol. Ecol. 78, 59–69. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01164.x

Urbanová, M., Šnajdr, J., Baldrian, P., 2015. Composition of fungal and bacterial communities in forest litter and soil is largely determined by dominant trees. Soil Biol. Biochem. 84, 53–64. doi:10.1016/j.soilbio.2015.02.011

Urbanová, M., Šnajdr, J., Brabcová, V., Merhautová, V., Dobiášová, P., Cajthaml, T., Vaněk, D., Frouz, J., Šantrůčková, H., Baldrian, P., 2014. Litter decomposition along a primary post-mining chronosequence. Biol. Fertil. Soils 50, 827–837. doi:10.1007/s00374-014-0905-z

Van Dyk, J.S., Pletschke, B.I., 2012. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. Biotechnol. Adv. 30, 1458–1480. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.03.002

Vogel, C., Babin, D., Pronk, G.J., Heister, K., Smalla, K., Kögel-Knabner, I., 2014. Establishment of macro-aggregates and organic matter turnover by microbial communities in long-term incubated artificial soils. Soil Biol. Biochem. 79, 1–11. doi:10.1016/j.soilbio.2014.07.012

Voříšková, J., Dobiášová, P., Šnajdr, J., Vaněk, D., Cajthaml, T., Šantrůčková, H., Baldrian, P., 2011. Chemical composition of litter affects the growth and enzyme production by the saprotrophic basidiomycete Hypholoma fasciculare. Fungal Ecol. 4, 417–426. doi:10.1016/j.funeco.2011.03.005

Wallenstein, M.D., Haddix, M.L., Lee, D.D., Conant, R.T., Paul, E. a., 2012. A litter-slurry technique elucidates the key role of enzyme production and microbial dynamics in temperature sensitivity of organic matter decomposition. Soil Biol. Biochem. 47, 18–26. doi:10.1016/j.soilbio.2011.12.009

Wang, Q., Wang, Y., Wang, S., He, T., Liu, L., 2014. Fresh carbon and nitrogen inputs alter organic carbon mineralization and microbial community in forest deep soil layers. Soil Biol. Biochem. 72, 145–151. doi:10.1016/j.soilbio.2014.01.020

Wei, K., Chen, Z.H., Zhang, X.P., Liang, W.J., Chen, L.J., 2014. Tillage effects on phosphorus composition and phosphatase activities in soil aggregates. Geoderma 217-218, 37–44. doi:10.1016/j.geoderma.2013.11.002

Welc, M., Bünemann, E.K., Fließbach, A., Frossard, E., Jansa, J., 2012. Soil bacterial and fungal communities along a soil chronosequence assessed by fatty acid profiling. Soil Biol. Biochem. 49, 184–192. doi:10.1016/j.soilbio.2012.01.032

Wen, L., Lei, P., Xiang, W., Yan, W., Liu, S., 2014. Soil microbial biomass carbon and nitrogen in pure and mixed stands of Pinus massoniana and Cinnamomum camphora differing in stand age. For. Ecol. Manage. 328, 150–158. doi:10.1016/j.foreco.2014.05.037

Yassir, I., Buurman, P., 2012. Soil organic matter chemistry changes upon secondary succession in Imperata Grasslands, Indonesia: A pyrolysis-GC/MS study. Geoderma 173-174, 94–103. doi:10.1016/j.geoderma.2011.12.024

Yavitt, J.B., Williams, C.J., 2015. Conifer litter identity regulates anaerobic microbial activity in wetland soils via variation in leaf litter chemical composition. Geoderma 243-244, 141–148. doi:10.1016/j.geoderma.2014.12.023

Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review. Biol. Fertil. Soils 29, 111–129. doi:10.1007/s003740050533