

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí



Diplomová práce

**Vliv diversity mikrobiálního společenstva na dekompozici organické
hmoty**

**Influence of microbial community diversity on the decomposition of
organic matter**

Zpracovatel: Bc. Jakub Vicena

Školitel: prof. Mgr. Ing. Jan Frouz, CSc

srpen 2016

Poděkování

Poděkování patří zejména panu prof. Mgr. Ing. Janu Frouzovi CSc, kterému děkuji za jeho trpělivost, ochotu, cenné rady a věcné připomínky během konzultací i mimo ně. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Haně Šimáčkové, Mgr. Jaroslavu Kuklovi a Jitce Hubáčové z BC ÚPB AV ČR za cenné rady a pomoc během měření a zpracování vzorků. Také bych chtěl poděkovat rodině a svým blízkým, kteří mi vždy byli oporou a hnací silou během studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně s využitím uvedené literatury a informací, na něž odkazuji. Svoluji k jejímu zapůjčení s tím, že veškeré i přejaté informace budou řádně citovány. Rovněž prohlašuji, že předložená diplomová práce je totožná s elektronickou verzí vloženou do SIS.

V Praze dne:

Podpis:

Abstrakt

Mikrobiální diversita hraje významnou roli v dekompozici půdní organické hmoty. Avšak faktory, které tuto spojitost ovlivňují, zůstávají stále nejasné. Práce vychází z dlouhodobého sledování půd odlišného sukcesního stádia o rozdílné diversitě. Odběr půd probíhal na dvou výsypkách po těžbě hnědého uhlí na Sokolovsku. Půdy byly následně radiečně sterilizovány a inokulovány mikroflórou z obou zdrojových půd o různé hustotě inokula, což vytvořilo gradient mikrobiální diversity. Následně byla měřena respirace půd s přídavkem a bez přídavku opadu trávy *Calamagrostis epigejos*. Výsledky prokázaly silnou pozitivní závislost mezi mikrobiální diversitou a dekompozicí organické hmoty v případě, že je mikrobiální společenstvo limitováno dostupným uhlíkem. Pokud tomu tak není, je dekompoziční rychlost řízena množstvím mikrobiální biomasy. Zároveň byla prokázána pozitivní korelace mezi rychlostí dekompozice a množstvím houbové biomasy. U půd s přídavkem listového opadu se v iniciální fázi dekompozice projevil priming efekt. Kontrolní vzorky bez přídavku opadu priming efekt nevykazovaly. Zvýšení vlhkosti vedlo k navýšení dekompoziční rychlosti. S klidným svědomím můžeme konstatovat, že podobně průkazné výsledky, související s vlivem diversity mikrobiálního společenstva na dekompozici organické hmoty, jsou ve vědecké sféře ojedinělé.

Klíčová slova: mikrobiální diversita, dekompozice půdní organické hmoty, mikrobiální biomasa, houbová biomasa, listový opad, dostupnost uhlíku.

Abstract

Microbial diversity plays an important role in the decomposition of soil organic matter. However, the drivers of this dependence still remain unclear. The work is based on long-term monitoring of soils of different successional stages of different diversity. Soil sampling was conducted on two dumps after brown coal mining in the Sokolov. Soils were X ray sterilized and inoculated by inoculum from both soils in two inoculation density which create gradient of microbial diversity. Then microbial respiration was measured in either supplied or not supplied by litter of *Calamagrostis epigejos*. Results showed a strong positive correlation between the microbial diversity and decomposition of organic matter if the microbial community is limited by available carbon. If there isn't carbon limit available, the decomposition rate is controlled by the amount of microbial biomass. Results demonstrated positive correlation between the rate of decomposition and the amount of fungal biomass. The soils with the addition of leaf litter showed priming effect in the initial stage of decomposition. In the control samples without addition of litter priming effect wasn't observed. Increasing humidity led to increase of decomposition rate. We can conclude with a clear conscience that similarly conclusive results associated with the microbial community diversity due to the decomposition of soil organic matter are sporadic in the scientific sphere.

Keywords: microbial diversity, decomposition of soil organic matter, microbial biomass, fungal biomass, leaf litter, carbon availability.

Obsah

1. Úvod	5
1.1. Cíle.....	6
1.2. Hypotézy	7
2. Literární přehled	8
2.1. Definice dekomposice.....	8
2.2. Význam dekomposice	9
2.2.1. Globální cyklus uhlíku.....	10
2.2.2. Uhlík v půdě.....	12
2.3. Hlavní faktory ovlivňující rychlost dekomposice	14
2.3.1. Chemické složení opadu	15
2.3.2. Teplota a vlhkost	17
2.3.3. Půdní pH.....	18
2.4. Působení mikroorganismů.....	19
2.4.1. Bakterie	20
2.4.2. Houby.....	21
2.4.3. Mikrobiální diversity.....	22
3. Materiál a metody	24
3.1. Odběr vzorků, příprava a průběh experimentu.....	24
3.2. Metodika měření.....	26
3.2.1. Stanovení mikrobiální diversity	26
3.2.2. Stanovení mikrobiální respirace titrační metodou.....	26
3.2.3. Stanovení mikrobiální respirace vzhledem k dostupnému uhlíku.....	28
3.2.4. Stanovení uhlíku mikrobiální biomasy	29
3.2.5. Stanovení obsahu ergosterolu.....	32
3.3. Statistické zpracování dat.....	34
4. Výsledky	35

5. Diskuse	46
5.1. Vztah diversity, respirace a biomasy mikrobiálního společenstva.....	46
5.2. Vztah ergosterolu s mikrobiální respirací a mikrobiální biomasou.....	49
5.3. Vliv přídavku opadu a vody na průběh respirace	52
6. Závěry	55
7. Reference.....	56

1. Úvod

Dekompozice je klíčovým procesem z hlediska koloběhu uhlíku a dalších prvků v terestrických ekosystémech (Aerts, 1997). Rozkladem půdní organické hmoty je podle odhadů v globálním měřítku uvolňováno až 60Gt uhlíku za rok (GLOBE, 2007), a tím je do oběhu navraceno stejné množství organické hmoty. Studium mechanismů dekompozice a faktorů, které ji ovlivňují, je tedy klíčové pro lepší pochopení a předpověď globálních změn klimatu. V souvislosti s klimatickou změnou, způsobenou rozvojem průmyslu, dopravy a zemědělství, můžeme v budoucnu předpokládat změny v rychlosti dekompozice (Bragazza et al., 2007).

Největší podíl terestrické dekompozice probíhá v půdním prostředí. Půda je proto z hlediska dekompozice nenahraditelnou složkou. Nenahraditelná je také pro koloběh živin, má pufrací i detoxikační schopnost, je prostředím pro akumulaci, retenci i infiltraci vody a je nepostradatelná z hlediska transformace látek (Novák et. al. 2010). Tyto funkce významnou měrou ovlivňuje půdní organická hmota (SOM), která zvyšuje schopnost půdy vázat nutrienty i toxické látky. Také snižuje náchylnost půd vůči erozi a zhutnění tím, že zlepšuje půdní strukturu a zvyšuje její provzdušnění. Složení SOM razantně ovlivňuje složení půdního společenstva, kterému slouží jako zdroj živin a energie (Carter, 2002).

Půdní organická hmota je důležitým zásobníkem uhlíku a je významná i z hlediska jeho globálního koloběhu. Tento proces je negativně narušován lidskou činností, např. přeměnou přirozených půd na půdy zemědělské, těžbou nerostných surovin, odlesňováním krajiny a spalováním fosilních paliv. Koloběh uhlíku je ovlivňován buď přímou emitací oxidu uhličitého, nebo omezením jeho akumulace v ekosystémech (Vitousek et al., 2007). Cílem je najít taková opatření, která povedou k odebrání uhlíku z atmosféry, tzv. sekvestraci uhlíku. Z tohoto hlediska jsou pro nás zajímavé půdy

vznikající na výsypkách po těžbě nerostných surovin (Karu et al. 2009), které mají často nízký obsah půdní organické hmoty. Mohou tak být odběrateli uhlíku z atmosféry (tzv. sinks).

Jakou měrou se bude uhlík v půdě akumulovat, ovlivňuje řada faktorů. Patří mezi ně např. vegetační pokryv, klima, půdní textura, rychlost a intenzita dekompozice půdní organické hmoty, aktivita společenstev půdních organismů a zejména pak mikroorganismů (Persson, 1980). Mikrobiální diversitu a složení mikrobiálního společenstva řídí půdní pH, vlhkost, teplota a zvláště diversita rostlinného pokryvu (Berg a Smalla, 2009). Rostlinné společenstvo přímo ovlivňuje dynamiku mikrobiální komunity množstvím vstupujícího opadu. Složení mikrobiálního společenstva je také závislé na kořenových výměšcích. Ty jsou dobře dostupným zdrojem energie (Kuzyakov et al., 2000; Luo et al., 2016). Rostliny nepřímo kombinací těchto pochodů mění i půdní pH a další půdní parametry (Eviner a Chapin, 2003). Mikrobiální diversita je do jisté míry odrazem výše zmíněných faktorů a její hlavní význam z hlediska dekompozice spatřujeme ve vyšší variabilitě enzymatického aparátu, která vede k lepšímu hospodaření s dostupnými živinami a energií (Berg a McLaugherty, 2008). Složení mikrobiálního společenstva má význam analogický.

1.1. Cíle

Cílem mé diplomové práce je získání ucelených informací o vlivu diversity mikrobiálního společenstva na dekompozici organické hmoty, a to prostřednictvím dat vycházejících z dlouhodobého měření dekompoziční rychlosti na dvou druzích půd, u nichž byl s rozdílnou inokulací vytvořen gradient diversity mikrobiálního společenstva. Míra dekompozice bude následně korelována s dalšími měřenými parametry souvisejícími nejen s diversitou, ale také s množstvím půdních mikroorganismů (mikrobiální biomasou, množstvím ergosterolu, počtem operačních taxonomických jednotek).

1.2. Hypotézy

- (1) Rozhodujícím faktorem závislosti dekompozice na diversitě mikrobiálního společenstva bude limitace dostupným uhlíkem. Pokud půdy nebudou limitovány uhlíkem, bude se respirace s vyšší diversitou snižovat. Současně bude míra respirace vyšší u vzorků s větší mikrobiální biomasou. V případě limitace uhlíkem se projeví závislost dekompozice na mikrobiální diversitě a vliv mikrobiální biomasy nebude významný.
- (2) Dekompozice bude probíhat rychleji u vzorků s větší houbovou biomasou reprezentovanou množstvím obsaženého ergosterolu. Bude také patrný výrazný rozdíl mezi množstvím ergosterolu ve vzorcích s přídavkem (vyšší hodnoty) a bez přídavku opadu (nižší hodnoty). Mikrobiální a houbová biomasa bude vzhledem k relativně konstantním podmínkám vykazovat silnou závislost.
- (3) U půd s přídavkem opadu bude respirace v iniciální fázi dekompozice probíhat rychleji, než u půd bez přídavku, a respirační křivka bude vykazovat prudký pokles vzhledem k rychlému úbytku dobře dostupných živin obsažených v opadu. U půd bez přídavku opadu budeme v iniciální fázi dekompozice sledovat absenci výše zmíněného poklesu. Očekáváme také, že přídavek vody povede k dočasnému zvýšení dekompoziční rychlosti.

2. Literární přehled

2.1. Definice dekomposice

Dekomposice je procesem postupného rozkladu mrtvé organické hmoty. Jejím vrcholem je mineralizace, tedy transformace látek organických na anorganické (oxid uhličitý a uvolněné živiny). Hnací silou dekomposice jsou fyzikální a chemické procesy, ale uplatňují se při ní také živé organismy (Berg a McLaugherty, 2008). Míra dekomposice je ovlivněna množstvím vstupující půdní organické hmoty, především ve formě opadu. Jeho množství a kvalita má proto význam na fungování ekosystémů (Berg et al., 2001). Rozklad půdní organické hmoty a fotosyntéza jsou hlavními procesy, které se účastní biologického obratu uhlíku na naší planetě. (Abaye a Brookes, 2006, Garbulsky et al., 2014). I přesto, že mechanismům fotosyntézy relativně dobře rozumíme po všech stránkách, proces dekomposice je objasněn nepoměrně hůře. Biochemické přeměny půdní organické hmoty během dekomposice jsou na rozdíl od fotosyntézy velmi variabilní (Berg a McLaugherty, 2008).

Dekompozici dělíme na dvě fáze. Raná fáze dekomposice se vyznačuje vyšší rychlostí, převládají při ní klimatické podmínky, obsah živin a množství vodou rozpustných látek. Pozdější fáze je řízena množstvím ligninu a míra dekomposice je výrazně nižší (Berg, 2000).

2.2. Význam dekomposice

Dekomposice je významná z hlediska koloběhu živin vázaných v biomase, především uhlíku, dusíku, fosforu a síry. Zvyšující se koncentrace oxidu uhličitého je dnes často diskutovaným tématem, zejména vzhledem k jeho vlivu na globální oteplování. Tento hlavní skleníkový plyn významně přispívá k vzestupu globální teploty, která se během posledních sto let zvýšila o 0,74 °C, a její průměrný růst za posledních padesát let byl 0,13°C za desetiletí (Oulehle a Hruška, 2009). Přitom je dekomposice půdní organické hmoty zodpovědná za obrovské množství CO₂, který vstupuje do atmosféry. Na druhou stranu dekomposice zahrnuje i sekvestraci uhlíku, tedy jeho ukládání do půdy ve formě humusu a ostatních stabilních organických látek (Schlesinger a Andrews, 2000). Pochopení těchto protichůdných procesů je důležité pro přesnější stanovení globální bilance uhlíku a zároveň k formování postupů, které povedou k jeho sekvestraci (Frouz, 2010; Shrestha et al., 2009; Juwarkar et al., 2010).

Mimo plochy vznikající na výsypkách (Vindušková a Frouz, 2013; Karu et al., 2009; Akala a Lal, 2001) patří mezi významné propady (sinks) uhlíku také lesní ekosystémy, které podle odhadů vstřebávají až 30% antropogenních emisí CO₂ ročně (Schulze et al., 2000). Dynamika pochodů, které vedou k sekvestraci uhlíku na lesních plochách, zůstává z velké části neobjasněna (Bellassen a Luysaert, 2014). Naudts et al. (2016) došli k závěru, že navzdory nárůstu lesní plochy v Evropě během posledních 250 let, nedošlo k výraznému snížení koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře. To přičítají zvýšenému odběru biomasy z lesních hospodářských ploch. Těžba dřeva totiž snižuje množství mrtvé dřevní hmoty vstupující do procesu dekomposice, čímž je narušena integrita celého dekomposičního řetězce v těchto ekosystémech. V určitých oblastech dochází dokonce k chřadnutí lesů. Následným projevem může být mj. snižování mikrobiální diversity.

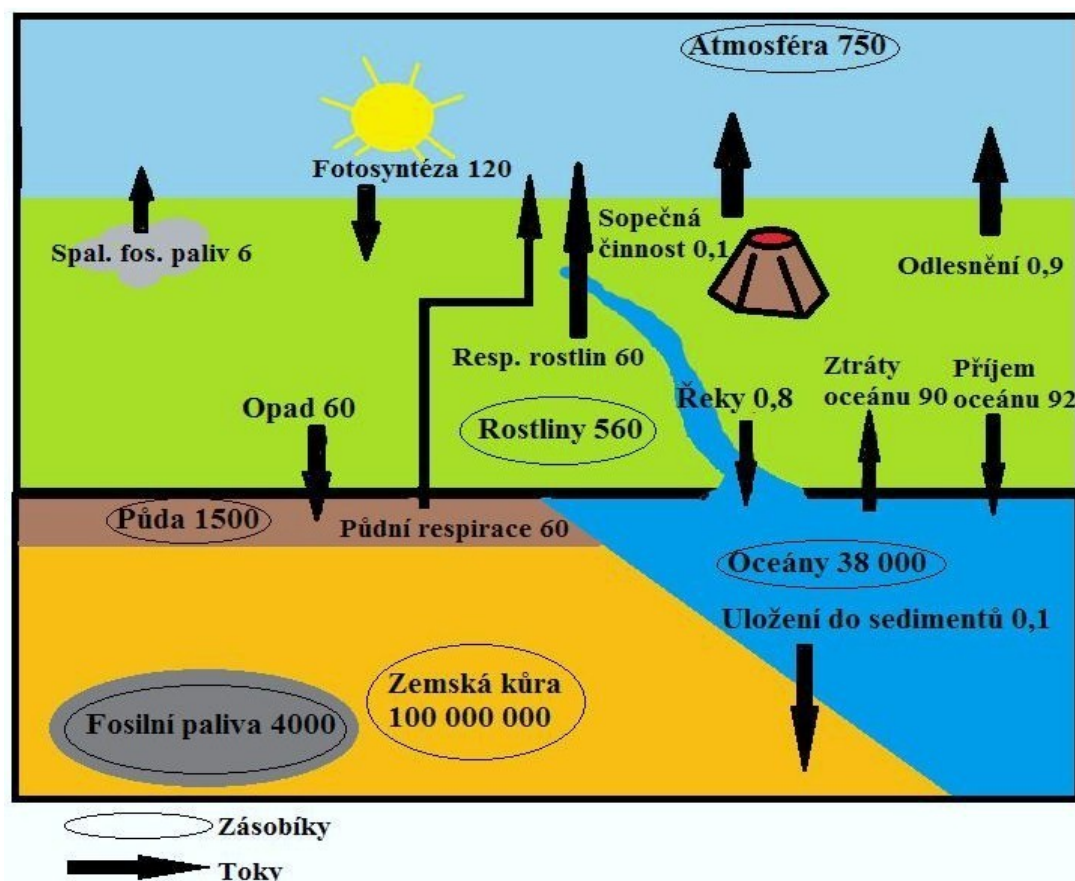
Například velké množství saprofytních organismů je ohroženo vyhynutím (Grove, 2002; Stokland et al., 2012). Pokud se nezmění politika hospodaření na těchto plochách, nemůžeme v současné době očekávat významné navýšení sekvestrace uhlíku (Vanhala et al., 2016).

2.2.1. Globální cyklus uhlíku

Z hlediska koloběhu uhlíku patří mezi nejvýznamnější procesy fotosyntéza a respirace. Fotosyntéza zajišťuje vázání uhlíku do rostlinné biomasy, která je po odumření transformována chemickými procesy a rozkládána půdními organismy. Rozkladné procesy v půdě vedou k uvolňování tak velkého množství oxidu uhličitého do atmosféry, které až desetkrát převyšuje množství uhlíku emitovaného ze spalování fosilních paliv (Law et al., 2002; Grace a Rayment, 2000; Frouz, 2010). Musíme si ale uvědomit, že rovnováha mezi respirací a ostatními pochody, které určují cyklus uhlíku, byla postupem času vybalancována tak, aby nedocházelo k výrazným změnám koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře. Antropogenní činností ale dochází k narušování těchto přirozených pochodů, což může znamenat dodatečné vstupy uhlíku do atmosféry.

Tok uhlíku mezi atmosférou, hydrosférou a organismy je zprostředkován ve formě oxidu uhličitého. Ten je zdrojem uhlíku pro fotosyntézu suchozemských rostlin, zatímco vodní rostliny v tomto ohledu využívají rozpuštěné uhličitany (Begon et al., 2006). Jørgensen et al. (2008) uvádí, že doba obratu uhlíku v atmosféře je přibližně 2 roky. Nicméně tento údaj je zavádějící. Většina obratu je totiž započtena jako výměna plynů mezi atmosférou a hydrosférou. Neočekávaný přírůstek uhlíku tedy může zůstat v atmosféře i po výrazně delší dobu (Jørgensen et al., 2008).

Půda obsahuje přibližně dvakrát až třikrát vyšší množství uhlíku než atmosféra. Uhlík je z globálního hlediska soustředěn do několika rezervoárů (viz obr. 1). Největší množství uhlíku je uloženo v zemské kůře (10^8 Gt C), druhým největším zásobníkem jsou oceány (38 000 Gt C), zásoby fosilních paliv obsahují až 4000 Gt uhlíku. Půda globálně obsahuje přibližně 1500 Gt C a rostliny až 560 Gt C. Roční vstup rostlinného opadu do půdy se pohybuje okolo 60 Gt uhlíku (GLOBE, 2007). Doba obratu uhlíku v opadu je přibližně 1,5 roku. K akumulaci uhlíku nejvýrazněji přispívají ekosystémy chladnějších oblastí (např. ve formě rašeliny). Naopak vysoký obrat, který akumulaci uhlíku neumožňuje, můžeme pozorovat v tropických oblastech s průměrnou roční teplotou nad $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Berg a McLaugherty, 2008).



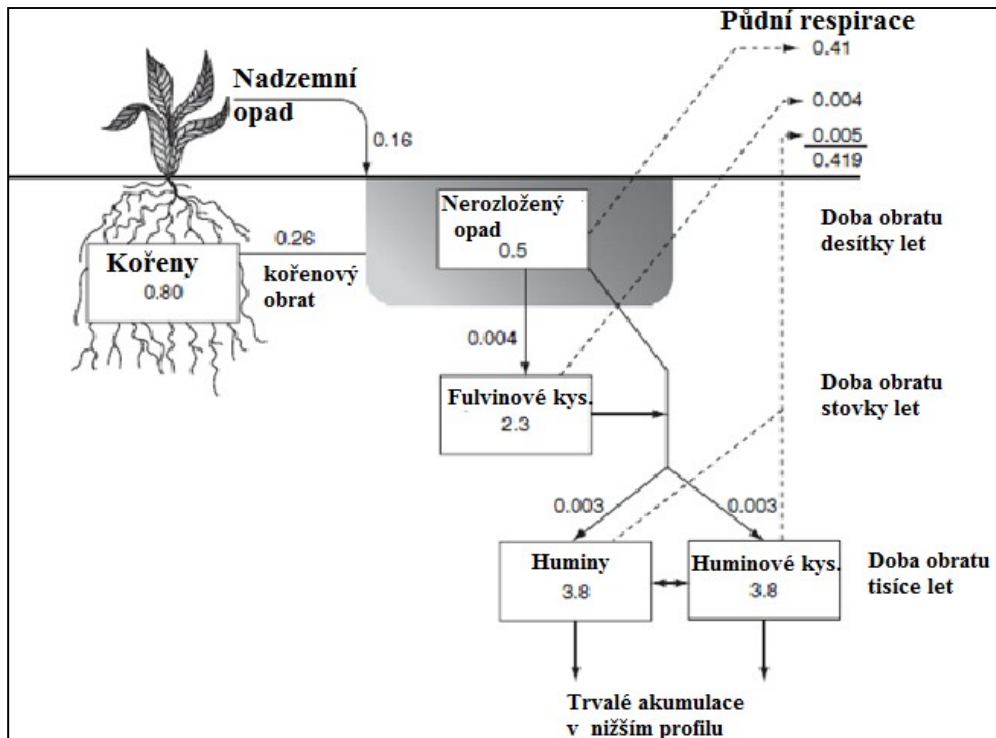
Obr. 1: Globální cyklus uhlíku s popisem zásobníků v Gt C a toků v Gt C. rok⁻¹, převzato a upraveno (GLOBE 2007).

Nejnovější studie dokazují, že terestrické ekosystémy mají vyšší potenciál ukládat oxid uhličitý, než bylo předpokládáno (Song et al., 2005; Batjes, 2014; Sheng et al., 2016). Navíc i malé změny v akumulaci uhlíku v půdě mohou mít vysoký dopad na snížení atmosférické koncentrace CO₂ (Manlay et al., 2007). Na druhou stranu existuje vzhledem ke zvyšování globální teploty riziko uvolňování oxidu uhličitého z obrovských zásobníků v permafrostu (Dorrepaal et al., 2009; Tarnocai et al., 2009; Wang et al., 2010; Harden et al., 2012). V půdě permafrostu je totiž akumulováno takové množství uhlíku blížící se jeho množství ve všech netrvale zmrzlých půdách (Tarnocai et al., 2009).

2.2.2. Uhlík v půdě

Hlavními vstupy uhlíku do půdy jsou nadzemní i podzemní rostlinný opad a kořenové exsudáty (Schimel a Schaefer, 2012). Dekompozice rostlinného opadu je komplexním souborem procesů, během kterých chemické, biologické i fyzikální faktory účinkují na široké spektrum organických substrátů. Dochází tak k neustálým změnám jejich vlastností a složení. Komplikovanost těchto procesů nás omezuje na pouhý popis jejich všeobecných podmínek (Berg a McLaugherty, 2008).

Z hlediska sekvestrace uhlíku v půdě patří mezi nejvýznamnější komponenty humusové látky, které jsou typické velmi pomalým rozkladem (Andreetta et al., 2011; De Vos et al., 2015). Humusové látky vznikají během humifikačního procesu a mají velmi dlouhou dobu obratu. Ta se v závislosti na klimatických podmínkách pohybuje v rozmezí 300-1000 let (Berg a McLaugherty, 2008; Wall et al., 2008). Naopak u nerozloženého opadu, který v půdě tvoří přibližně 4% uhlíku, je udávána doba obratu v řádu desítek let (viz obr. 2). Meziproduktem jsou fulvokyseliny, které obsahují okolo 22% uhlíku v půdě, a jejich obrat je odhadován na stovky let. Až 74% půdního uhlíku je uloženo v huminových kyselinách a huminech s dobou obratu až v tisících let (Jørgensen et al., 2008).



Obr. 2: Dynamika rozkladu opadu v profilu 0 až 20cm, pro travní porosty černozemí s jednotlivými přechody (kg C. m⁻². rok⁻¹). Převzato a upraveno (Jørgensen et al., 2008).

Dlouhá doba obratu huminových kyselin je zapříčiněna jejich nerozpustností ve vodě. Naproti tomu fulvokyseliny s kratší dobou obratu ve vodě rozpustné jsou (Jørgensen et al., 2008). Důležitost huminových kyselin pro akumulaci uhlíku je umocněna tím, že obsahují přibližně 55% uhlíku, oproti fulvokyselinám, které obsahují uhlíku asi o 10% méně. Huminové kyseliny jsou významné i svou schopností vázat se na jílové minerály za vzniku organominerálních komplexů, jejichž sorpční vlastnosti se projevují vázáním živin (Berg a McClaugherty, 2008).

Podobné vlastnosti jako huminové kyseliny mají huminy. Ty jsou navíc výrazně odolnější vůči účinkům kyselin, zásad i mikroorganismů. Vytvářejí dlouhé řetězce, které mohou obsahovat molekuly lipidů, peptidů a esterů, jež jsou mezi sebou propojeny vodíkovými můstky a Van Der Waalsovými silami (Hayes a Clapp, 2001).

Cyklus uhlíku v půdě může být významně ovlivněn efektem označovaným jako hnojení uhlíkem (Raddatz et al., 2007; Ahlström et al., 2012). Ten je zapříčiněn zvyšováním koncentrace oxidu uhličitého a vzrůstem průměrných teplot, což vede k pozitivnímu vlivu na fotosyntézu, a tím i urychlení příbytku biomasy (Brodrigg et al., 2009, Beer et al., 2010; Cox et al., 2013). Zároveň narůstá listová plocha a zvyšuje se množství opadu, čímž je ovlivněno složení půdního mikrobiálního společenstva (Zak et al., 2000).

2.3. Hlavní faktory ovlivňující rychlost dekompozice

Dekompoziční rychlost ovlivňuje řada proměnných. Patří sem faktory abiotické, tedy chemické a fyzikální vlastnosti půdy, biotické, které shrnují vliv všech organismů i rostlin v půdě žijících, a jim nadřazené faktory klimatické. Klimatické podmínky jsou hlavním činitelem řídícím dekompozici globálně i regionálně. Vliv půdních mikroorganismů a chemického složení opadu, resp. půdní organické hmoty, převažuje v menším měřítku (Aerts, 1997). Klimatické podmínky působí na dekompozici přímo prostřednictvím teploty a vlhkosti, či nepřímo, vzhledem k jejich vlivu na chemické složení opadu (Aerts, 1997). Biologické faktory jsou podmíněny teplotou, vlhkostí, půdním pH a zvláště pak chemickým složením opadu a půdní organické hmoty. Dekompoziční rychlost rostlinného opadu je v závislosti na zeměpisné šířce a nadmořské výšce velice variabilní a stále není zcela jasné, které faktory hrají hlavní roli při jejím globálním odhadu (Zhang et al., 2008).

2.3.1. Chemické složení opadu

Hlavním vstupem živin, které se během dekompozice z velké části uvolňují do půdního systému, je rostlinný opad. Kvantitativní a chemické složení opadu ovlivňuje strukturu a složení mikrobiálního společenstva (Berg a McLaugherty, 2008). Současně s tím se mění i schopnost mikrobiálního společenstva rozkládat čerstvou organickou hmotu. Dekompoziční rychlost je řízena množstvím dostupného uhlíku a dusíku, obsahem fosforu, ligninu a poměrem ligninu a dusíku (Zhang et al., 2008).

Dostupnost uhlíku se mění společně s chemickým složením opadu. Pro mikroorganismy je nejdostupnější uhlík ve formě jednoduchých řetězců. K této složce opadu patří vodou rozpustné organické látky, které se z opadu ztrácejí při procesu vyluhování (Bogatyrev et al., 1983). Mezi tyto látky patří cukry, glyceridy a fenoly. Z hlediska cukrů se jedná převážně o mono a oligosacharidy, které jsou pozůstatky metabolických procesů rostlin. Rozpustnost fenolů, mezi které patří i taniny, je velmi proměnná. To vychází ze skutečnosti, že některé z nich jsou schopné reagovat s většími molekulami a mají tendenci měnit se v méně rozpustné formy (Berg a McLaugherty, 2008). Množství těchto látek v listovém opadu je variabilní, podle toho, z jakého druhu rostliny opad pochází (Hagen-Thorn et al., 2006). Příkladem může být olše, kde se koncentrace těchto látek pohybuje kolem 30%, naopak u borovice je to v průměru 7% (Berg a McLaugherty, 2008).

Majoritní část biomasy opadu představuje celulóza a lignin, jejichž dostupnost je pro organismy nižší. Obsah ligninu v opadu může být dobrým prediktorem dekompoziční rychlosti, avšak u opadu, kde je jeho obsah nízký, je tento odhad omezen (Aerts, 1997). Koncentrace ligninu v různých fázích dekompozice je závislá na místních klimatických

podmínkách, přičemž v oblastech s vyšší teplotou a vlhkostí obsah ligninu v opadu roste (Coûteaux et al. 1995).

Fosfor se v opadu nachází převážně v nukleových kyselinách a pro mikrobiální společenstva není ve většině terestrických ekosystémů limitujícím prvkem (Scheu, 1990).

Z hlediska dekompozice je důležitý také dusík. Obsah dusíku je většinou uváděn ve stechiometrickém poměru s uhlíkem (C:N). Tento poměr je významný z hlediska rychlosti rozkladu listového opadu. Můžeme obecně konstatovat, že rychlost dekompozice s jeho rostoucím poměrem klesá. Obdobně to platí i u poměru ligninu a dusíku (Zhang et al., 2008). Rostliny na stanovištích s nedostatkem živin produkují hůře rozložitelný opad, charakteristický vysokým poměrem C:N s vyšší koncentrací špatně rozložitelných látek, což vede k nižší dekompoziční rychlosti. Naopak to platí na stanovištích na živiny bohatých (Aerts a de Caluwe, 1997). Dostupný dusík je limitující ve většině lesů mírného pásma. Jeho akumulace v lesní půdě, akcelerovaná prostřednictvím atmosferické deposice, může zapříčinit výrazné změny ve struktuře těchto ekosystémů (Falkengren-Grerup a Schötteldreier, 2004). Tyto změny se projevují např. acidifikací půdy, vyluhováním dusičnanů a ztrátou biologické rozmanitosti půdních společenstev (Chen et al., 2014). Na lokální úrovni je primární produktivita ekosystému ovlivněna dusíkem z geologických zdrojů (Thompson et al., 2001).

2.3.2. Teplota a vlhkost

Za předpokladu příznivých podmínek převládá v iniciální fázi dekompozice vliv chemického složení opadu. Naopak v oblastech nepříznivých teplotních a povětrnostních podmínek převažuje vliv klimatu (Coûteaux et al. 1995). Pokud není aktivita mikrobiálního společenstva limitována vlhkostí, je hlavní hnací silou dekompozice teplota. Dekompoziční rychlost je tedy globálně závislá na zeměpisné šířce a nadmořské výšce, lokálně pak na reliéfu krajiny.

Snížení půdní vlhkosti vede k vodnímu stresu a dehydrataci mikrobiálního společenstva, což se projevuje snížením dekompoziční rychlosti (Begon et al., 2006). Společně s nedostatkem vody se redukuje mobilita látek, které se prostřednictvím difuze dostávají k mikrobiálnímu společenstvu (Whitworth et al., 2014). Složení mikrobiální komunity pak může být výrazně pozměněno. Například tak, že se více uplatňují houbové mikroorganismy, které jsou k suchu více tolerantní než bakterie (Hendrix et al., 1986). V podmínkách střídání vlhkých a suchých cyklů dochází ke stimulaci mikrobiální aktivity, jelikož mikrobiální společenstvo je na výkyvy vlhkosti dobře přizpůsobeno (Cornejo et al., 1994). Na druhou stranu dochází v přemokřených půdách ke snížení množství dostupného kyslíku, čímž je dekompoziční proces omezen, či pozastaven. Tento projev je typický pro kyselé mokřadní půdy, kde je v biomase rašeliny podle odhadů akumulováno až 600Gt C (McGuire et al., 2009).

Vliv půdní vlhkosti na dekompozici je omezen i dalšími faktory, např. v boreálních lesích, které jsou limitované množstvím dostupných živin, nevede nutně vyšší dostupnost vody k vyšší dekompoziční rychlosti (Berg a McClaugherty, 2008; Berg a Meentemeyer, 2002).

2.3.3. Půdní pH

Půdní reakce je základním faktorem, kterým hodnotíme stav půdy. Hodnota půdního pH ovlivňuje složení mikrobiálního společenstva a množství jeho biomasy (Jenkinson et al., 1977; Fierer a Jackson, 2006; Lauber et al., 2009). S rostoucím pH dochází ke změně poměru bakterií a hub, jelikož jeho vysoké hodnoty zvýhodňují přítomnost bakterií, zatímco houby ustupují (Kamble et al., 2014). Naopak snížení pH, které může být zapříčiněno kyselou atmosferickou deposicí, kořenovými exsudáty, kyselým opadem aj., vede k vysokému nárůstu acidofilních organismů na úkor ostatních druhů. Ty jsou buď výrazně redukovány, nebo úplně mizí (Williams et al., 2013). Současně se snižuje mikrobiální biomasa (Jenkinson et al., 1977).

Mimo přímého vlivu na mikrobiální společenstvo působí pH i nepřímo, jelikož má výrazný vliv na rozpustnost a tím pádem i dostupnost živin (Berg a McLaugherty, 2008). Extrémní hodnoty pH vedou ke zvýšení mobility toxických prvků (Frouz, 2011; Štýs, 1990), které mohou narušit půdní mikrobiální společenstvo. Nízké pH při vyluhování opadu vede ke zvýšení vyplavování vodou rozpustných organických látek a k ochuzování půdy o záporně nabitě sloučeniny.

Na snižování pH může mít vliv i samotná dekompozice, jelikož z uvolněného oxidu uhličitého vzniká v půdním prostředí kyselina uhličitá (Berg a McLaugherty, 2008). Za nízkého pH je rychlost fixace dusíku velmi pomalá. Vyšší pH naopak fixaci dusíku podporuje. S tím souvisí vyšší úživnost a dekompoziční rychlost na půdách s vyšším pH.

2.4. Působení mikroorganismů

Navzdory tomu, že mikrobiální biomasa obsahuje pouze 1-3 % organického uhlíku v půdním prostředí a zabírá jen 0,001 % půdního objemu (Grundmann a Gourbiere, 1999), jsou největší toky uhlíku (rozklad a akumulace) v půdních ekosystémech řízeny mikrobiálním společenstvem (Schimel a Schaefer, 2012). Vezmeme-li v úvahu postavení mikroorganismů v edafonu, je mikrobiální společenstvo často dominantní. To platí jak z hlediska kvantity, jelikož průměrné množství biomasy mikroorganismů je 15 tun na hektar (Jørgensen et al., 2008), tak z hlediska diversity. Literatura udává, že na 1 m² plochy připadá až 5000 druhů bakterií. Diversita houbových mikroorganismů je výrazně nižší, tedy přibližně 100 dominantních druhů hub na stejné ploše (Berg a McLaugherty, 2008). Avšak biomasa hub často až dvojnásobně převyšuje biomasu bakterií (Jørgensen et al., 2008) a z globálního hlediska je diversity hub vyšší než u bakterií (De Boer et al., 2005). Vysoké hodnoty biomasy i mikrobiální diversity můžeme sledovat např. na půdách boreálních a mírných lesů, kde mikroorganismy tvoří primární dekompository rostlinného opadu (Berg a McLaugherty, 2008).

Základní skupiny půdních mikroorganismů představují bakterie (včetně vláknitých bakterií, dříve skupina aktinomycet), houby a Archae (Berg a McLaugherty, 2008), které byly dříve zařazovány mezi bakterie. Bakterie ve své buněčné stěně obsahují mastné kyseliny, naopak Archae izoprenové řetězce (Pace, 2006). Dále mikroorganismy dělíme na aerobní a anaerobní. Anaerobní mikroorganismy se v terestrických ekosystémech uplatňují v podmínkách trvale zamokřených půd (např. ekosystémy mokřadů), aerobní dominují ve většině ostatních.

Dělení mikroorganismů podle zdrojů uhlíku zahrnuje organismy autotrofní (zdrojem uhlíku CO₂) a heterotrofní, které jako zdroj uhlíku využívají organické

sloučeniny. Během sukcese se navzdory rozdílné fyziologii obě tyto skupiny objevují společně. Rozdílná je pouze jejich dominance determinovaná prostředím, které je během sukcese osidlováno (Fierer et al., 2010).

Hlavní skupinu mikroorganismů, které se podílejí na procesu dekompozice, představují aerobní heterotrofové, kteří jsou zapojeni do jednotlivých i souhrnných procesů, zajišťovaných širokou škálou mikroorganismů. Souhrnné procesy, tvořené součtem několika dílčích pochodů, měříme jako proces jediný, což může být značně omezující (např. půdní respirace).

2.4.1. Bakterie

Bakterie řadíme mezi aerobní i anaerobní mikroorganismy, narozdíl od hub, které jsou výhradně aerobní. Podle příjmu energie můžeme bakterie dělit na fotolitotrofické, přijímající energii ve formě slunečního záření, foto-organotrofické, u nichž probíhá fotosyntéza, chemo-litotrofické, které jako zdroj energie využívají redoxní reakce a chemo-organotrofické, pro něž jsou donorem elektronu organické sloučeniny. Tato variabilita v příjmu energie vede mj. k jejich obrovské druhové i funkční rozmanitosti (Jørgensen et al., 2008). Bakteriální společenstvo je proto schopné rozkládat široké spektrum substrátů (Berg a McClaugherty, 2008). Potravní generalismus bakterií však vede k jejich vysoké alfa diversitě a nízké beta diversitě. Naproti tomu houby vykazují závislost opačnou, a považujeme je tedy za potravní specialisty (Urbanová et al., 2015).

Z hlediska dekompozice půdní organické hmoty patří mezi nejvýznamnější bakterie aktinobakterie. Tento globálně rozšířený kmen bakterií upřednostňující rozklad opadu a půdního humusu bývá nejpočetnějším druhem bakterií, které můžeme v půdě nalézt (Sagova-Mareckova et al., 2011). Jejich enzymatický aparát je relativně dobře přizpůsoben

rozkladu komplexních sloučenin jako je celulosa a lignin (Jayasinghe a Parkinson 2009). Jejich schopnost konkurovat během rozkladu těchto látek houbám je nižší (Tuomela et al., 2000), což úzce souvisí i s výše zmíněným potravním generalismem bakterií. Aktinobakterie dominují v bakteriálním společenstvu v ekosystémech relativně vlhkých a bohatých na rostlinný opad. Zároveň preferují neutrální až zásadité pH. Považujeme je za významné dekompository houbových hyf (El-Tarabily a Sivasithamparam, 2006).

2.4.2. Houby

Vysokou účinnost hub při degradaci lignocelulosity, jejíž obsah dekompozici limituje, zajišťuje specializace jejich enzymatického aparátu (Kjøller a Struwe 1982). Během tohoto procesu se uplatňují hydrolytické extracelulární enzymy, které jsou vylučovány buď do jejich přímého okolí, nebo se nacházejí na povrchu hyf, přičemž k degradaci celulosity dochází mimo houbové buňky. Tímto způsobem dochází k rozkladu nerozpustné makromolekuly na monomer či oligomer, skládající se z několika jednotek glukosy. Tato látka je následně přijata do buňky a metabolizována. Část celulosity v rostlinných pletivech je uspořádána v hůře štěpitelné krystalické formě. Některé houbové mikroorganismy mají takovou enzymatickou výbavu, která jim dovoluje rozštěpit i takto tvořené struktury (Eriksson et al., 1990). Výhodou hub je jejich velký povrch vzhledem k objemu, který vyplývá z vláknitého uspořádání hyf, a přispívá jejich vysoké efektivitě během rozkladu opadu (Maheshwari, 2005).

Z hlediska dekompozice můžeme houby dělit na tzv. soft-rot, white-rot a brown-rot (houby měkké, bílé a hnědé hniloby). Ačkoli je toto dělení poměrně zastaralé, je vzhledem k své názornosti stále používáno. Každá z těchto skupin využívá jiné mechanismy rozkladu ligninu, což je spojeno s jejich rozdílnou účinností během tohoto procesu (Berg a McClaugherty, 2008). Například v lesních ekosystémech, které nejsou limitovány

dusíkem, vykazují houby bílé hniloby schopnost kompletního rozkladu molekuly ligninu, zatímco u hub hnědé hniloby je tato schopnost omezená. Naopak při rozkladu opadu s vysokým obsahem dusíku dochází u hub bílé hniloby k inhibici enzymatického aparátu pro rozklad ligninu, tudíž při jeho rozkladu dominují houby hniloby hnědé (Ge et al., 2013).

Přítomnost snadno rozložitelných látek v opadu se během dekompozice projevuje vyšším zastoupením biomasy bakterií vůči biomase hub. Tento projev je patrný během iniciální fáze dekompozice. V pozdější fázi dekompozice, kdy je složení opadu méně příznivé, převažuje biomasa perzistentních hub, které produkují antibiotika a několik druhů rozkladných enzymů (Torres et al., 2005; Lavelle a Spain, 2005).

2.4.3. Mikrobiální diversita

Ačkoli by se mohlo zdát, že mikrobiální diversita je pouhým odrazem podmínek, které v půdě panují, není platnost tohoto tvrzení zcela jednoznačná. Tomu nasvědčuje i řada studií (Loreau, 2001; Moorhead a Sinsabaugh, 2006; Miki et al., 2010; McGuire a Treseder, 2010; Zhang a Zhang, 2016; Luo a Gu, 2016). Můžeme uvažovat o tom, že mikrobiální diversita funguje jako protiváha výhradnímu ovlivňování obsahu živin v půdě rostlinami, tedy kořenovými exsudáty a chemismem vstupujícího opadu (Miki et al., 2010). Vliv rostlin na množství a kompozici živin v půdě tedy nemusí být vzhledem k působení mikrobiálního společenstva zcela přímý.

Vliv mikrobiální diversity na dekompozici je lépe patrný v laboratorních podmínkách, jelikož můžeme omezit faktory, které by mohly výsledek zkreslit, nebo by nebylo možno rozlišit, který faktor dekompozici nejvíce ovlivňuje. Příkladem může být studie (Wohl et al., 2004). V tomto experimentu byla porovnávána efektivita dekompozice

celulosity populacemi bakterií o rozdílné diversitě. Výsledky ukázaly na pozitivní korelaci mezi bakteriální diversitou a degradací celulosy v případě, že vzorek obsahoval více než dva bakteriální druhy. Zároveň společenstva s vyšší diversitou vykazovala i vyšší hodnotu bakteriální biomasy. Tyto výsledky podporují i teoretický model (Loreau, 2001), který předpokládá vyšší míru využití živin bakteriálními společenstvy s vyšší druhovou bohatostí. K tomu dochází proto, že více diversifikované společenstvo dokáže využít širší spektrum substrátů, což vede k vyšší produktivitě (Wohl et al., 2004). Možným vysvětlením by mohlo být i usnadnění využití substrátu mezi redundantními druhy. Ty k dekompozici využívají podobné enzymy, jejichž společné působení vede k vyšší účinnosti rozkladu. Mohou také využívat stejný zdroj, ale odlišné meziproducty metabolismu (Hättenschwiler et al. 2011).

Vyšší mikrobiální diversita může vést k vyšší pravděpodobnosti výskytu takových druhů, které si budou odbourávat látky vyvolávající zpomalení dekompoziční rychlosti. Látka, která je pro jeden druh inhibiorem, může být jiným druhem zpracována a zároveň odbourána. Obecně lze tedy říci, že se zvyšující diversitou se zvyšuje pravděpodobnost výskytu takových druhů, jejichž kombinace povede ke zvýšení rychlosti dekompozice (Bell et al., 2005).

Na druhou stranu může dojít i k takové kombinaci organismů s vzájemným antagonistickým účinkem, která povede ke snížení dekompoziční rychlosti. Tento efekt můžeme pozorovat například u společenstva hub, které produkcí antibiotik omezují růst druhů ostatních (Šnajdr et al., 2010).

3. Materiál a metody

3.1. Odběr vzorků, příprava a průběh experimentu

Půdy použité v experimentu byly odebrány na dvou výsypkách po těžbě hnědého uhlí rozdílného stáří na Sokolovsku. Uložený materiál sestával z alkalických jílovců, které se následně rozložily na menší částice a amorfni jíl. Během půdotvorného procesu na této chronosekvenci docházelo k postupnému snižování pH, fosfor se stával lépe dostupným a postupně se zvyšovalo množství uloženého uhlíku a dusíku (Frouz et al., 2008).

Záměrem bylo vybrat půdy rozdílného stáří a chemického složení, u kterých byla vyšší pravděpodobnost nalézt výrazné odlišnosti z hlediska mikrobiálního společenstva, které se projeví v rozdílné dekompoziční rychlosti. První z odebraných půd byla označena jako E (early succesion – mladší sukcese). Její stáří bylo 10 let, resp. substrát byl na místě deponován z nadloží před deseti lety. Jílovec byl rozložen na částice <2mm a vegetační pokryv byl nízký. Půdní pH bylo stanoveno na hodnotě 8,75 (Frouz et al., 2016). Půda na druhém stanovišti o stáří 50 let byla označena jako L (late succesion – pozdní sukcese). Vliv kořenů, půdní fauny a rostlinného opadu po několik desetiletí dal na této lokalitě vzniknout půdnímu horizontu o tloušťce 8-10 cm. Půdní pH bylo méně zásadité než u půdy mladší, tedy 7,16 (Frouz et al., 2016).

Odběr vzorků probíhal na obou místech ve stejnou dobu (září 2011). Na každé lokalitě bylo odebráno pět vzorků z hloubky 5-8 cm. Vzdálenost mezi jednotlivými odběry byla přibližně 50 m. Vzorky z každého stanoviště byly následně spojeny do dvou kompozitních vzorků. Přibližně 1 kg substrátu byl skladován při teplotě 4 °C. Zbylý substrát byl umístěn do čtyř uzavíratelných plastových sáčků. Tento substrát byl poté sterilován dávkou 40 kGy γ radiace. Sterilizované substráty byly inokulovány suspenzí nesterilizované půdy pro získání ředění 10^{-2} a 10^{-7} . Ředěním je v tomto případě

myšlen podíl půdy využité k vytvoření inokula vůči sterilizované půdě. Suspenze byla před použitím podrobena působení ultrazvuku a filtrována přes 40 µm filtr. Objem suspenze přidané do každého opakování byl vždy stejný. Rozdíl byl v použití odlišného množství nesterilního substrátu k vytvoření suspenze pro jednotlivé treatmenty.

Tímto postupem vzniklo osm kombinací půd: LLH, LLL, LEH, LEL, ELH, ELL, EEH, EEL. První písmeno znamená použitý typ sterilního substrátu (E – mladší sukcese stádium, L – starší sukcese). Druhé písmeno značí, z jaké půdy byla vytvořena suspenze, kterou byla sterilní půda následně inokulována (E – mladší půda, L – starší půda). Třetí písmeno označuje, jaké ředění bylo použito pro jednotlivý treatment. Ředění 10^{-2} je označeno jako H a ředění 10^{-7} jako L. Očekáváme, že při větším naředění vypadnou vzácné druhy mikroorganismů, a proto je větší ředění označeno jako L od očekávané nižší diversity (Low diversity), a naopak u málo zředěných suspensí očekáváme větší diversitu (High diversity) a značíme je H.

Pokusné půdy byly vytvořeny pro jiný experiment (Frouz et al., 2016). V experimentu pro mou diplomovou práci tak byly využity zbytky půd, což se odráží v absenci půdy LEL, které nebylo dostatečné množství k založení tohoto treatmentu.

3.2. Metodika měření

3.2.1. Stanovení mikrobiální diversity

Rozdílné mikrobiální diversity bylo dosaženo ředěním, respektive neředěním inokula. Dle Wertz et al., (2006) měla být vyšší mikrobiální diversity sledována u půd s menším ředěním (H – high diversity) a nižší u půd s větším ředěním (L – low diversity).

Inokulované vzorky půd byly testovány na počet operačních taxonomických jednotek (OTU) metodou 454 pyrosekvence. Počet OTU byl převzat z práce (Frouz et al., 2016).

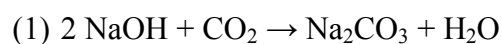
3.2.2. Stanovení mikrobiální respirace titrační metodou

Pro měření mikrobiální respirace vzorků byly využity uzavíratelné vzduchotěsné skleněné nádoby (sérovky) o objemu 150 ml. Před založením pokusu byly tyto nádoby sterilizovány. Samotné vážení půd do jednotlivých treatmentů probíhalo ve flow boxu, aby byla co nejvíce snížena pravděpodobnost kontaminace mikroorganismy z okolního prostředí. Do každé nádoby bylo naváženo 40 g zeminy ve 2-6 opakováních, podle toho, kolik materiálu bylo k dispozici. Byly vytvořeny dvě skupiny vzorků, a to vzorky s přídatkem 0,5 g listového opadu *Calamagrostis epigejos* a bez jeho přídatku. Opad *Calamagrostis epigejos* byl uložen v polyesterových sáčcích 3x3 cm a sterilizován stejnou metodou jako půdní vzorky. Opadové sáčky byly vloženy do nádob s půdou tak, aby byly substrátem překryty. Následně bylo do půdy přidáno 5ml deionizované vody.

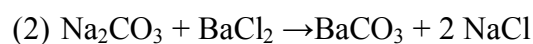
Měření probíhalo po dobu 1100 dní. Interval mezi měřeními byl jeden týden, později delší. K vlastnímu měření dekompozice byla použita statická respirometrická metoda. Množství uvolněného CO₂ bylo stanoveno titrační metodou (Berg a Laskowski,

2005). Uvolněný oxid uhličitý byl zpočátku absorbován v 6 ml 0,5 M NaOH, postupně se tento objem vzhledem ke klesající respiraci jednotlivých vzorků snižoval až ke 3 ml 0,5 M NaOH. Doba inkubace hydroxidu sodného v mikrokosmu byla jeden týden. Přibližně v polovině (570 dnů) a před koncem (1000 dnů) celého měření byly do každého vzorku přidány 2ml deionizované vody.

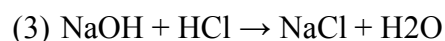
Reakce oxidu uhličitého a hydroxidu sodného probíhá podle následující rovnice (1).



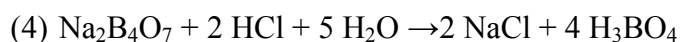
Po uplynutí inkubační doby NaOH byl kalíšek vylit, a poté dvakrát vypláchnut destilovanou vodou do kádinky. Absorbovaný oxid uhličitý ve formě Na_2CO_3 byl převeden na BaCO_3 za přídavku 2 ml 12,5 % roztoku BaCl_2 (2).



Do roztoku bylo přidáno několik kapek fenolftaleinu, který slouží jako indikátor neutralizace. Titrací 0,05 M HCl (normovaný faktor 10,38) bylo následně určeno nadbytečné množství NaOH (3). Titrace NaOH probíhala do doby, než fialová barva přešla přes růžovou a následně na průhlednou. Stejný postup byl využit u slepého vzorku (blank).



Faktor roztoku kyseliny chlorovodíkové byl stanoven titrační metodou známého množství (0,2 g) tetraboritanu sodného (Na₂B₄O₇) použitou HCl (4). Do roztoku byla jako indikátor přidána methylovaná oranž. Vzniklý roztok byl titrován do doby, než se oranžová barva změnila na tmavě oranžovou až červenou.



Výpočet respirace:

$$R = \frac{(X_s - X_v) * 6005 \text{ .mol}}{t}$$

Rrespirace [$\mu\text{g C-CO}_2 / \text{h} * \text{microkosm}^{-1}$]

X_sspotřeba HCl při titraci blanku[ml]

X_vspotřeba HCl při titraci vzorku[ml]

molpřesná koncentrace roztoku HCl [$\text{mol} * \text{l}^{-1}$]

6005koeficient přepočtu

tdoba inkubace [hod]

3.2.3. Stanovení mikrobiální respirace vzhledem k dostupnému uhlíku

Pro stanovení respirace vzhledem k dostupnému uhlíku byla využita data z článku Frouz et al. (2016). U sledovaných půd bylo naměřeno množství dostupného uhlíku. Pro půdu pozdního sukcesního stádia (L) byla tato hodnota stanovena na hladině 7,8 % C, pro půdu raného sukcesního stádia (E) byla tato hodnota 2,4 % C. Množství uhlíku obsaženého v přidávaném opadu *Calamagrostis epigejos* bylo stanoveno na 0,2 g C, tzn. 40 % uhlíku v opadu.

Následně bylo na základě těchto hodnot vypočteno množství uhlíku obsažené v jednotlivých mikrokosmech. Pro půdu L bez přídatku opadu to bylo 3,12 g C, pro půdu L s přídatkem opadu 3,32 g C. Půda E bez přídatku opadu obsahovala 0,96 g C a půda s jeho přídatkem 1,16 g C. Respirace vzhledem k dostupnému uhlíku byla poté stanovena vydělením respirace měřené příslušnými hodnotami dostupného uhlíku.

3.2.4. Stanovení uhlíku mikrobiální biomasy

Pomocí fumigační extrakční metody je měřen přímo uhlík mikrobiální biomasy, který je uvolněn z mikrobiálních buněk po fumigaci půdy v parách chloroformu (Vance et al. 1987). Půdní vzorek je rozdělen do dvou částí. Z první části jsou vyextrahovány rozpustné uhlíkaté látky, na druhou působí páry chloroformu (fumigace) a vlastní extrakce rozpustných uhlíkatých látek je prováděna po fumigaci. Metoda je založena na rozdílu hodnot fumigované půdy, kdy je navíc uvolněn uhlík obsažený v buňkách mikroorganismů, které účinkem par chloroformu lýzují a jejich obsah je uvolněn do okolního prostředí, a hodnot nefumigované půdy.

Do 100 ml sérovek bylo naváženo 5 g čerstvé půdy pro každý vzorek v jednom opakování. Z treatmentů o 4 a více opakováních byly náhodně vybrány 3 vzorky, u ostatních byly použity všechny. Do poloviny sérovek bylo nalito 40 ml K_2SO_4 a vzorky byly následně třepány 45 minut na třepačce. Po vytřepání byly vzorky zfiltrány a zároveň byl zfiltrován i čistý K_2SO_4 jako slepý vzorek. Filtrát byl uchován v plastových scintilačních lahvičkách o objemu 20ml a zmražen až do doby analytické koncovky.

Druhá polovina sérovek byla vložena do exsikátoru se zvlhčeným filtračním papírem. Navrch byla položena miska s rozbitým laboratorním sklem a 50 ml chloroformu. Exsikátor byl zavřen a za pomoci vývěvy byl vytvořen podtlak, který zapříčinil snížení

teploty varu chloroformu. Vývěva byla spuštěna do doby, kdy z misky unikaly bublinky. Poté byl kohout exsikátoru zavřen a vzorky byly ponechány působení par chloroformu po dobu 72 hodin. Po otevření byly sérovky vyjmuty z exsikátoru, exsikátor byl zbaven filtračního papíru a vytřen vlhkým ubrouskem. Sérovky byly protřepány a vráceny zpět do exsikátoru, odkud byl posléze odsáván vzduch. Tento proces byl opakován do doby, než byly sérovky zbaveny zápachu chloroformu. Do sérovek bylo nalito 40 ml K_2SO_4 a byly třepány 45 minut na třepačce. Po vytřepání byla suspenze zfiltrována a zmražena v plastových scintilačních lahvičkách až do analytické koncovky.

Do erlenek o objemu 50 ml bylo nepipetováno 8 ml rozmrzlého filtrátu. Zároveň bylo do tří erlenek nepipetováno 8ml slepého vzorku. Filtrát byl před pipetováním důkladně protřepán. Za pomoci dávkovače bylo do erlenek přidáno 15 ml chromsírové směsi, roztok byl promíchán a vložen do sušárny předeřáté na 125 °C na 45 minut. Po jedné hodině chladnutí bylo do roztoku přidáno 8 kapek indikátoru fenantrolinu a roztok byl posléze titrován Mohrovou solí přes zelenou až po oranžovou barvu.

Ke stanovení faktoru Mohrovi soli byl použit roztok 1ml dvojchromanu draselného, 2,5 ml kyseliny sírové s 20ml destilované vody a 8 kapkami ferroin indikátoru. Tento roztok byl titrován Mohrovou solí ve třech opakováních. Ke stanovení faktoru byla použita průměrná hodnota spotřeby Mohrovy soli.

Pro výpočet bylo nutno stanovit hmotnost sušiny. Bylo naváženo 5 g půdy každého vzorku. Vzorky byly sušeny po dobu 24 hodin sušeny při teplotě 70 °C. Po vyjmutí ze sušárny byly vzorky váženy na laboratorních vahách s přesností na tisícinu gramu.

Použité chemikálie

Roztok síranu draselného (K_2SO_4) – připraven z 87,14 g čistého síranu rozpuštěných v 1 l destilované vody

Mohrova sůl – připravena z 20 g síranu železnato-amonného $(NH_4)_2(FeSO_4)_2$, 20 ml H_2SO_4 , doplněno destilovanou vodou do objemu 1 l.

Roztok dvojchromanu draselného ($K_2Cr_2O_7$) – připraven z 19,615 g čistého dvojchromanu rozpuštěných v 1 l destilované vody.

Chromsírová směs – roztok 500 ml H_2SO_4 , 200 ml H_3PO_4 a 100 ml roztoku $K_2Cr_2O_7$

Výpočet uhlíku mikrobiální biomasy:

$$C_{NEFUM} = \frac{(B - V_{NEFUM}) * (8/F) * 0,15 * V_{EXTR} * 1000}{V_{MIN} * m}$$

$$C_{FUM} = \frac{(B - V_{FUM}) * (8/F) * 0,15 * V_{EXTR} * 1000}{V_{MIN} * m}$$

$$C_{MIC} = (C_{FUM} - C_{NEFUM}) / k_{EC}$$

Bspotřeba Mohrovy soli na titraci slepého vzorku [ml]

V_{FUM} spotřeba Mohrovy soli na fumigované vzorky [ml]

V_{NEFUM} spotřeba Mohrovy soli na nefumigované vzorky [ml]

V_{EXTR} objem K_2SO_4 použitého při extrakci uhlíku [ml]

0,15faktor přepočtu na mg C (1 ml 0,05 M Mohrovy soli odpovídá 0,15 mg C)

1000přepočet z mg na μ g C

V_{MIN} objem filtrátu [ml]

msuchá hmotnost vzorku použitého pro extrakci (navážka * sušina) [g]

k_{EC} konverzní faktor (0,38)

C_{MIC} uhlík mikrobiální biomasy [μ g C * g^{-1} suché půdy]

3.2.5. Stanovení obsahu ergosterolu

Ergosterol je látkou obsaženou v buněčných membránách hub. Je produkován pouze živými mikroorganismy a po jejich uhynutí se velmi rychle rozkládá. Metoda stanovení je založena na extrakci ergosterolu z půdy a následné analýze na kapalinovém chromatografu se spektrofotometrickou detekcí.

Určení množství ergosterolu obsaženého v jednotlivých vzorcích probíhalo přibližně měsíc po ukončení měření respirace. Vzorky byly během této doby uchovány v chladničce při teplotě 3 °C.

Ke stanovení bylo použito 0,75 g půdy každého vzorku. Vzorky byly naváženy do vialek z čirého skla o objemu 8 ml a popsány permanentním fixem. Poté byly přidány 3 ml 10 % roztoku KOH v metanolu a zavíčkovány s použitím teflonového septa. Vzorky byly na 90 minut vloženy do ultrazvukové lázně předehřáté na 70 °C a prvních 15 minut vystaveny účinkům ultrazvuku. Teplota byla průběžně kontrolována. Po 90 minutách byly vzorky vyjmuty z lázně, a po jejich vychladnutí byl do vialek přidán 1 ml destilované vody a 2 ml cyklohexanu. Vzorky byly protřepány na vertexu po dobu 30 sekund a poté vloženy do centrifugy nastavené na 3500 rpm, kde na ně odstředivá síla působila po dobu 5 minut, což vedlo k oddělení jednotlivých frakcí. Supernatant (horní cyklohexanová fáze) byl odebrán pasteurovou pipetou do nových vialek o objemu 8 ml. K původnímu vzorku byly přidány 2 ml cyklohexanu a byl znovu třepán po dobu 30 sekund ve vertexu a vložen do centrifugy za stejných podmínek na dobu 5 minut. Nový supernatant byl za pomoci Pasteurovy pipety odebrán a přidán k prvnímu. Vzorky byly zamrazeny po dobu 48 hodin. Po rozmražení byly vzorky odpařeny v digestoři pod proudem N₂ o tlaku 0,1 Bar. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml metanolu a protřepán ve vertexu po dobu 30 sekund. Poté byly vzorky vloženy na 15 minut do vodní lázně o teplotě 40 °C a následně protřepány ve vortexu na 30

sekund. Celý objem byl nepipetován do ependorfeek o objemu 1,5 ml a vzorky byly vloženy do centrifugy nastavené na 6000 rpm na 3 minuty. Poté bylo odebráno 800 μ l supernatantu do vialek o objemu 2 ml a vialky byly zakrimpovány.

Před samotnou analýzou bylo nutno připravit kalibrační roztoky ergosterolu v metanolu, podle kterých přístroj vypočítal přesné koncentrace ergosterolu. Vzorky byly připraveny ředěním standardu o koncentraci 1000 ppm. Byly vytvořeny roztoky o koncentraci 1, 2, 5, 10,15, 20, 50 a 100 ppm.

Samotné měření probíhalo na přístroji DIONEX ICS-5000. Objem dávkování vzorků byl 10 μ l. Ergosterol byl detekován UV detektorem při 282 nm. Koncentrace ergosterolu byla stanovena automaticky na základě plochy peaku pomocí kalibračních křivek standardu.

Výsledky bylo posléze nutno přepočítat vzhledem k sušině, jelikož při přípravě vzorků byla použita vlhká půda. Pro přepočet na skutečné hodnoty obsahu ergosterolu ve vzorcích byla použita data získaná během měření uhlíku mikrobiální biomasy, respektive hodnoty získané při stanovení podílu sušiny ve vlhké půdě (viz kapitola 3.2.4. Stanovení uhlíku mikrobiální biomasy). Skutečný obsah ergosterolu v ppm pak byl získán vynásobením naměřených hodnot ergosterolu s procentuelním zastoupením sušiny ve vzorku.

3.3. Statistické zpracování dat

Získaná data byla upravena v programu Microsoft Office Excel a následně statisticky vyhodnocena v programu STATISTICA 06. Pro vyhodnocení homogenních skupin a zjištění, zda je mezi jednotlivými treatmenty signifikantní rozdíl byly použity metody One way ANOVA (jednocestná analýza variance) a Repeated measurement ANOVA (analýza variance opakovaných měření). Pro vyhodnocení vzájemných korelací jednotlivých parametrů byla použita metoda analýzy korelačních koeficientů.

4. Výsledky

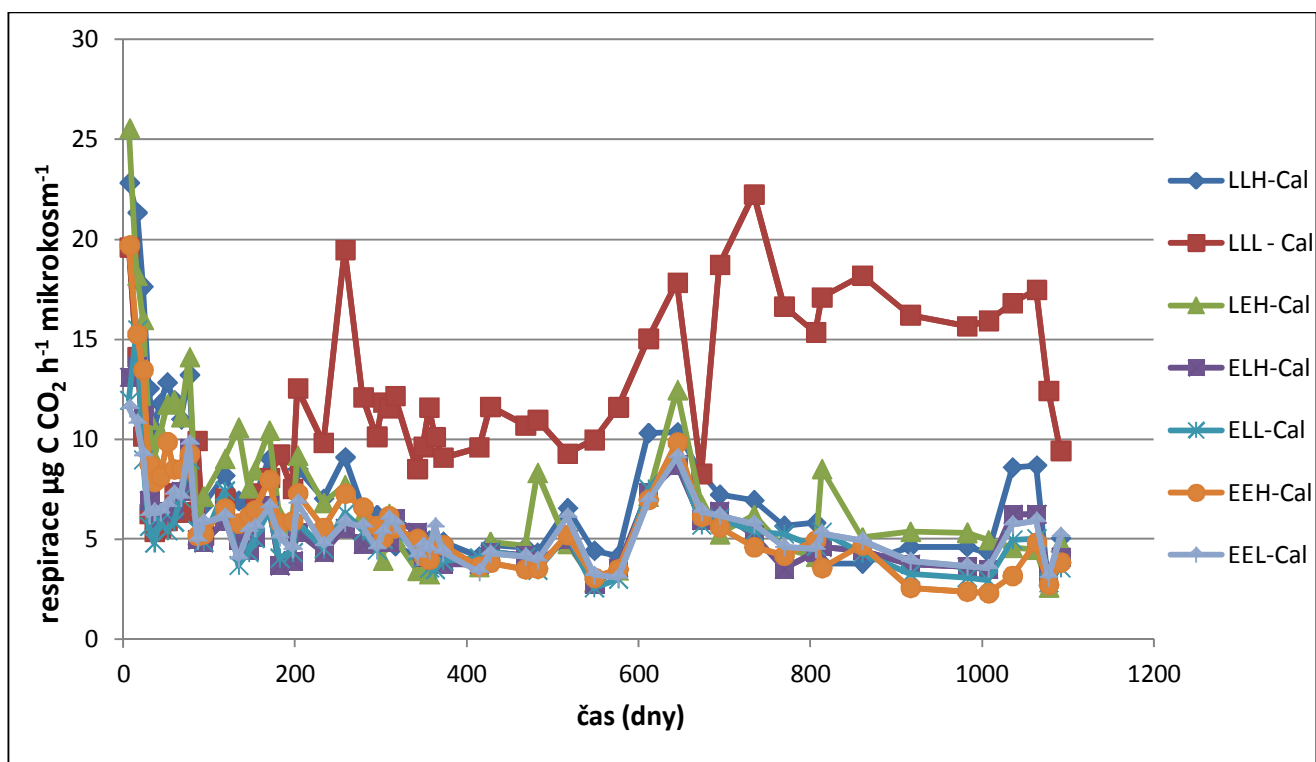
Tab. 1 znázorňuje počty zjištěných operačních taxonomických skupin jednotlivých treatmentů a množství dostupného uhlíku na mikrocism. Srovnáním vzorků s rozdílným ředěním inokulace je zřejmé, že aplikace tohoto postupu nevedla k vyšší mikrobiální diversitě u vzorků s méně ředěným inokulem a nižší diversitě u vzorků s ředěním vyšším. Efekt ředění měl tedy prokazatelný vliv pouze u vzorků ELH a ELL. V tomto případě tedy můžeme hovořit spíše o náhodném efektu. Na samotný experiment však tento fakt nemá výrazný vliv, jelikož nás zajímá především samotná diversita a intenzita ředění inokula je podružná.

Nejvyšší počet OTU byl stanoven u půdy ELH. Tomuto počtu je blízká hodnota u půdy EEL. Nejnižší počet OTU byl stanoven u vzorku LLH, o něco vyšší u vzorku LLL. Můžeme tedy konstatovat, že počet OTU byl vyšší u treatmentů založených na substrátu půdy E, což také odpovídá výrazně nižšímu množství dostupného uhlíku v tomto substrátu. Možný je i vliv půdního pH, avšak vzhledem k bazickému prostředí obou půd jeho významnost z hlediska diversity nepředpokládáme (tab. 1).

Tab. 1: Počet OTU zjištěných u jednotlivých půdních vzorků, množství dostupného uhlíku v substrátu pro jednotlivé treatmenty (g), pH půdy Převzato a upraveno (Frouz et al. 2016).

Treatment	LLH	LLL	LEH	ELH	ELL	EEH	EEL
Počet OTU	69	79	87	127	86	111	125
Dostupný uhlík	3,12	3,12	3,12	0,96	0,96	0,96	0,96
Půdní pH	7,16	7,16	7,16	8,75	8,75	8,75	8,75

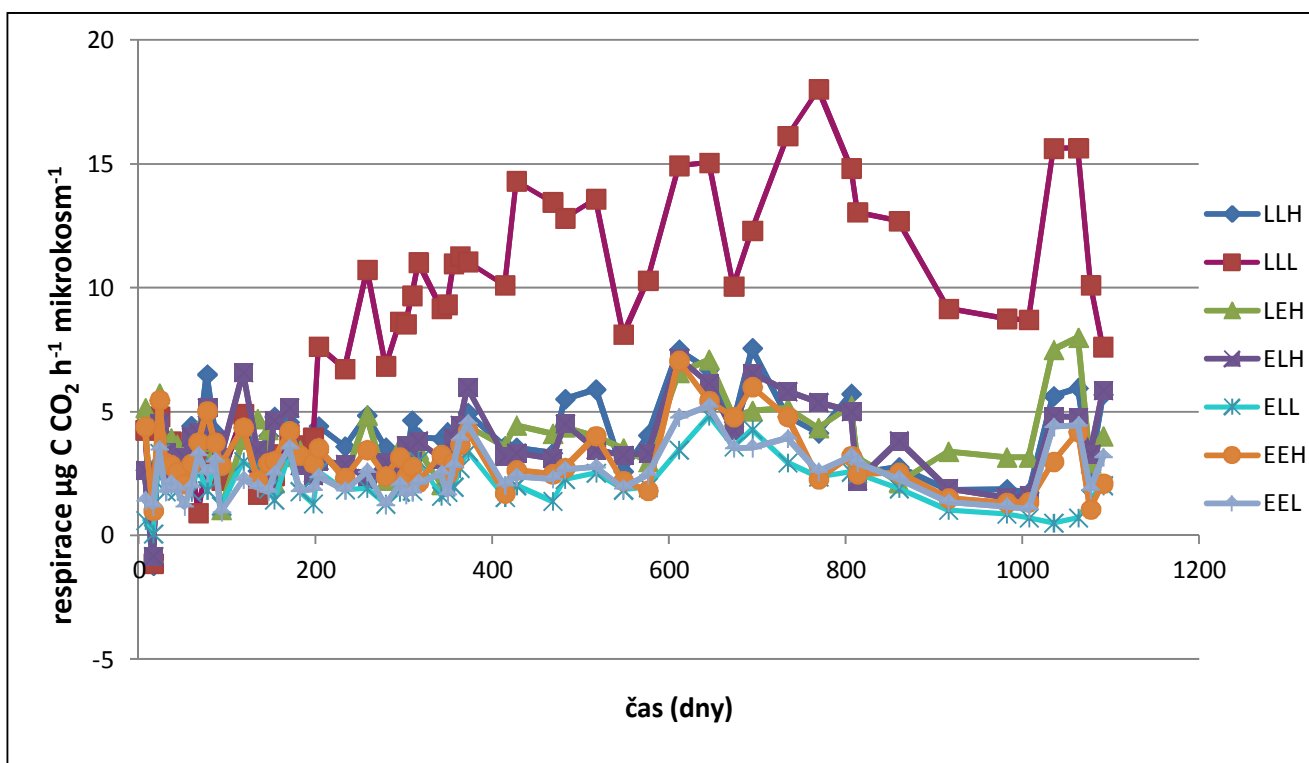
Z obr. 3 je zřejmé, že u vzorků s přidavkem opadu došlo během iniciální fáze dekomposice k rapidnímu poklesu respirace oproti počátku. Poté se pokles zpomalil. Míra dekomposice se až na výjimky pozvolna snižovala po celý zbytek měření. Vzestupné tendence následované opětovným poklesem můžeme sledovat v čase 570 dnů a 1000 dnů, kdy byly vzorky hydratovány.



Obr. 3: Průběh průměrných respirací půd s přidavkem opadu *Calamagrostis epigejos* během celé doby pokusu ($\mu\text{g C CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mikrokosm}^{-1}$).

Poměrně dobře patrná je i vyšší míra dekomposice u vzorků substrátu L. Z této skupiny nejvýrazněji vystupuje trend respirace treatmentu LLL-Cal. Respirační křivka tohoto vzorku se během prvních 200 dnů od ostatních výrazně nelišila. Po uplynutí této

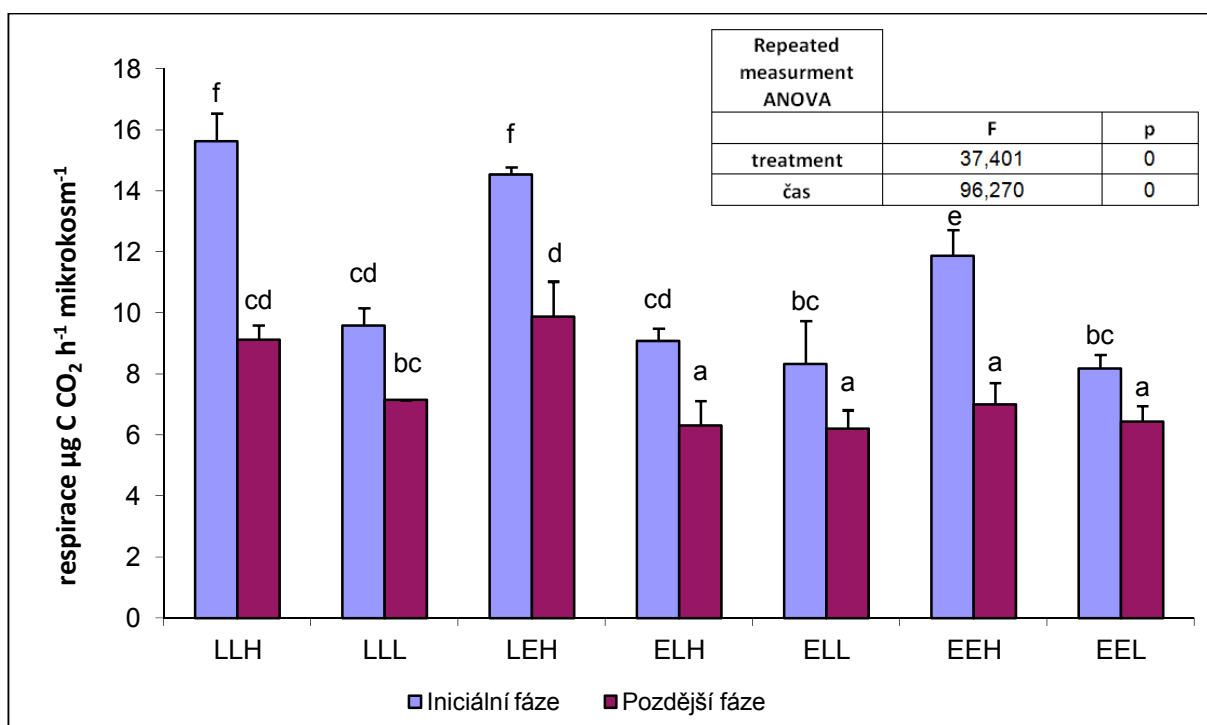
doby však došlo k rapidnímu nárůstu respirace oproti ostatním vzorkům a tyto hodnoty se na vysoké hladině udržely i po celý zbytek měření (viz obr. 3).



Obr. 4: Průběh průměrných respirací půd bez přidaného opadu *Calamagrostis epigejos* během celé doby pokusu ($\mu\text{g C CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mikrokosm}^{-1}$).

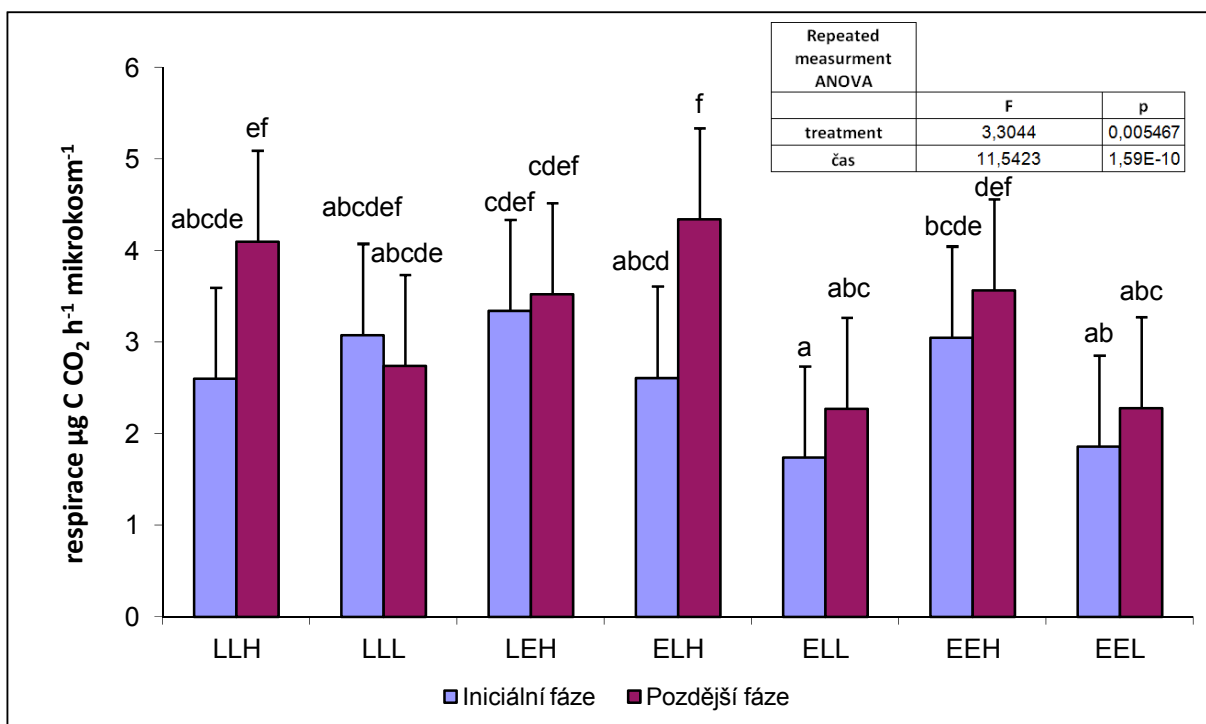
U půd bez přídavku opadu (obr. 4) není počáteční pokles respirace patrný, spíše můžeme pozorovat mírný vzestup. Vyšší hodnoty respirace můžeme opět sledovat u vzorků substrátu L, ze kterých s velmi podobným trendem jako v předchozím případě vystupuje treatment LLL. Respirace se však pohybují na nižší hladině než u treatmentů s přídavkem opadu (obr. 3).

Z obr. 5 je patrný výrazný rozdíl průměrných hodnot v dekomposiční míře vzorků s přidavkem opadu během prvních sedmi (iniciální fáze dekomposice) a po nich následujících sedmi měřeních (pozdější fáze dekomposice). Jak již bylo naznačeno, vzorky s přidavkem opadu vykazují vyšší průměrnou hodnotu respirace v iniciální fázi dekomposice. Nejvyšší dekomposiční rychlost vykazují vzorky substrátu L, a to jak v iniciální fázi, tak ve fázi pozdější. Dekomposiční rychlost vzorku LLL-Cal se však pohybuje na výrazně nižší hladině, než která je patrná z obr. 8. To souvisí se vzestupem těchto hodnot až po delší době (přibližně 200 dnů).



Obr. 5: Hodnoty průměrné respirace ($\mu\text{g C CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mikrokosm}^{-1}$) jednotlivých treatmentů s přidavkem opadu v prvních 51 dnech (iniciální fáze) a následujících 83 dnech (pozdější fáze), směrodatná odchylka. Výsledky repeated measurement ANOVA. Pokud je ANOVA pro typ půdy signifikantní, jsou uvedeny výsledky post hoc testu (LSD, $p < 0.05$), statistiky homogenní skupiny jsou označeny stejnými písmeny.

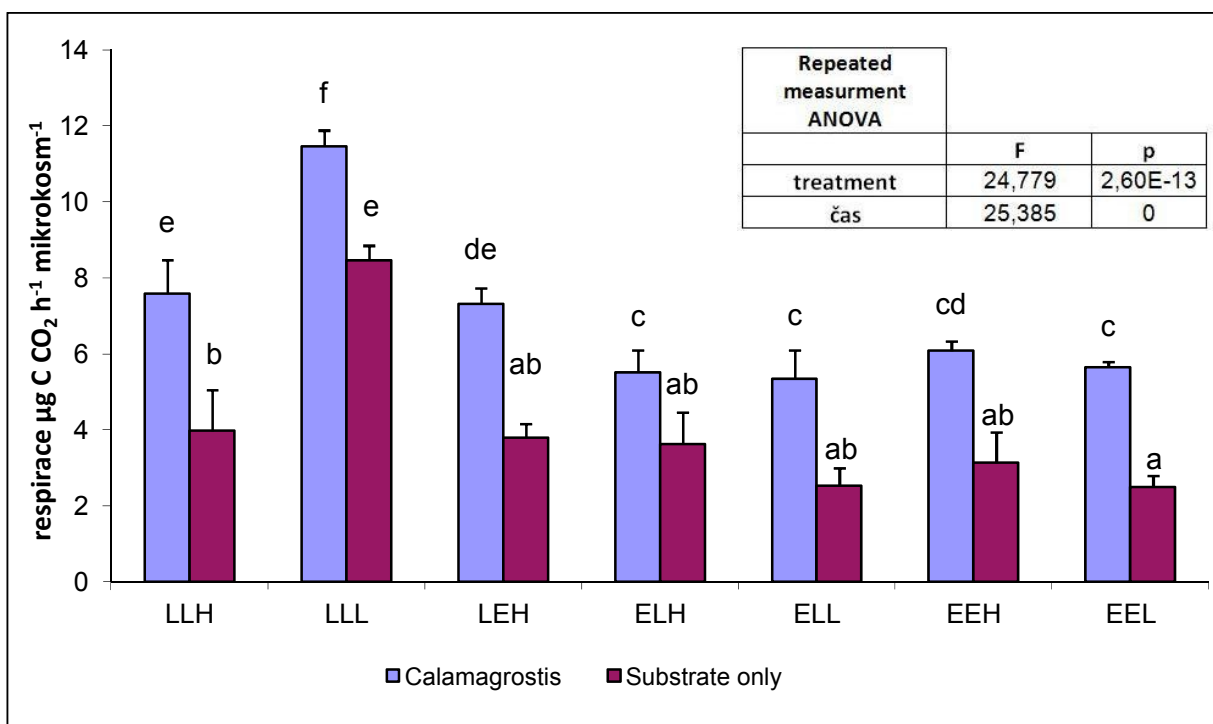
Vzorky bez přídavku opadu (obr. 6) sledují trend opačný. Tedy vyšší průměrnou respiraci v pozdější fázi dekompozice. Odlišný je v tomto ohledu pouze vzorek LLL, u kterého můžeme sledovat vyšší rychlost dekompozice v iniciální fázi, což by mohlo mít určitou souvislost i s jeho pozdější vyšší aktivitou oproti ostatním vzorkům bez přídavku opadu (viz obr. 4).



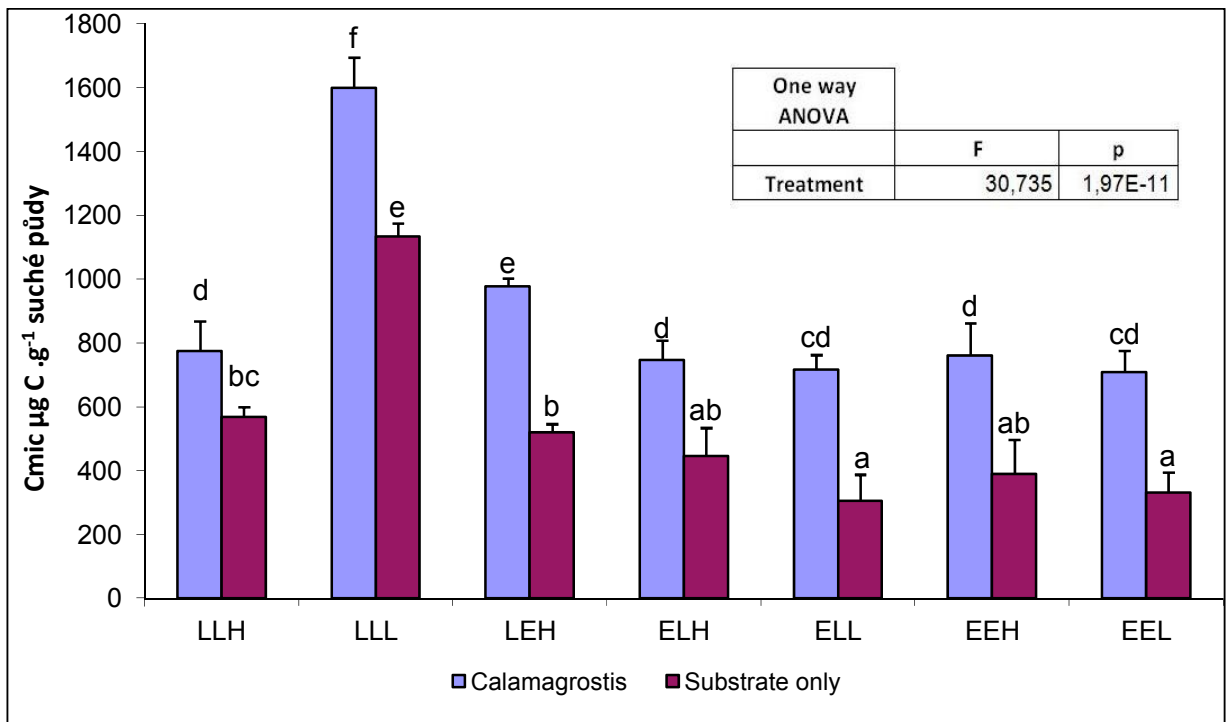
Obr. 6: Hodnoty průměrné respirace ($\mu\text{g C CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mikrokosm}^{-1}$) jednotlivých treatmentů bez přídavku opadu v prvních 51 dnech (iniciální fáze) a následujících 83 dnech (pozdější fáze), směrodatná odchylka. Výsledky repeated measurement ANOVA. Pokud je ANOVA pro typ půdy signifikantní, jsou uvedeny výsledky post hoc testu (LSD, $p < 0.05$), statistiky homogenní skupiny jsou označeny stejnými písmeny.

Výsledky měření mikrobiální respirace vykazují signifikantní rozdíly v dekompozici. Tento trend platí jak u půd bez přidaného opadu *Calamagrostis epigejos*, tak u půd ve kterých byl opad přidán (viz obr. 7).

Obr. 7 znázorňující průměrné respirace jednotlivých treatmentů se výrazně odlišuje od rozložení hodnot naměřených pro mikrobiální diversitu (viz tab. 1). Hodnoty průměrné respirace však svým rozložením velmi dobře odpovídají hodnotám sledovaným u obr. 8, který znázorňuje průměrné hodnoty uhlíku mikrobiální biomasy.



Obr. 7: Hodnoty průměrné respirace jednotlivých treatmentů s přidavkem opadu *Calamagrostis epigejos* (*Calamagrostis*) a bez přidavku opadu (*Substrate only*) za celou dobu pokusu ($\mu\text{g C CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mikrokosm}^{-1}$), směrodatná odchylka. Výsledky repeated measurement ANOVA. Pokud je ANOVA pro typ půdy signifikantní, jsou uvedeny výsledky post hoc testu (LSD, $p < 0.05$), statistiky homogenní skupiny jsou označeny stejnými písmeny.



Obr. 8: Průměrné hodnoty uhlíku mikrobiální biomasy C_{MIC} na gram suché půdy u jednotlivých treatmentů ($\mu\text{gC} \cdot \text{g}^{-1}$) s přidavkem opadu *Calamagrostis epigejos* (*Calamagrostis*) a bez přidavku opadu (*Substrate only*), směrodatná odchylka. Výsledky one way ANOVA. Pokud je ANOVA pro typ půdy signifikantní, jsou uvedeny výsledky post hoc testu (LSD, $p < 0.05$), statistiky homogenní skupiny jsou označeny stejnými písmeny.

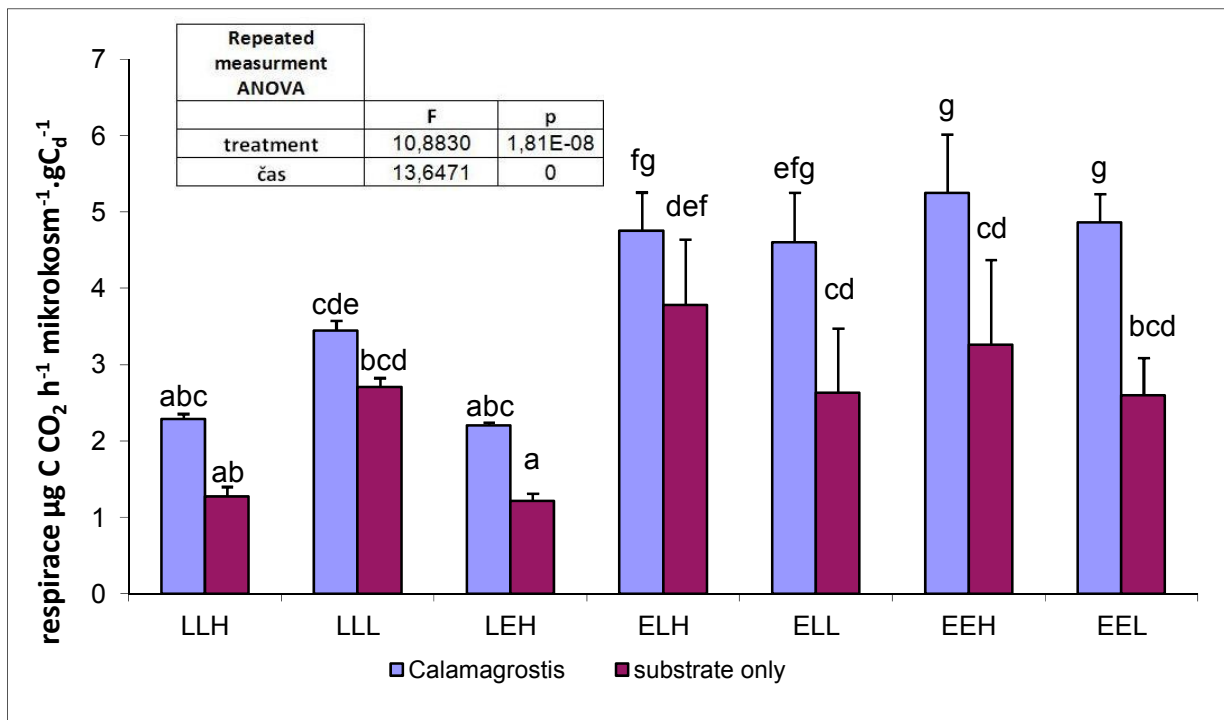
Nejvyšší průměrná respirace ($11,45 \text{ C CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mikrokosm}^{-1}$) a zároveň nejvyšší hodnota mikrobiální biomasy na gram suché půdy ($1599 \mu\text{g C} \cdot \text{g}^{-1}$) byla naměřena u vzorku LLL-Cal. Nižší hodnoty byly naměřeny u vzorku LLH-Cal ($7,59 \mu\text{g C CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mikrokosm}^{-1}$ a $774 \mu\text{g C g}^{-1}$). Vzorky založené na substrátu E pak vykazují hodnoty nižší a nepanují mezi nimi tak výrazné rozdíly jako u vzorků substrátu L, avšak závislost respirace na mikrobiální biomase je u nich též patrná (viz obr. 7, obr. 8).

Podobný trend můžeme sledovat u vzorků bez přidavku opadu. Zde byla nejvyšší průměrná respirace i mikrobiální biomasa naměřena taktéž u vzorku LLL

(8,46 $\mu\text{g C CO}_2\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mikrokosm}^{-1}$, 1133 $\mu\text{g C}\cdot\text{g}^{-1}$). Nízké hodnoty respirace sledované u půd substrátu E také dobře odpovídají měřené mikrobiální biomase (viz obr. 7; obr. 8).

Pokud mezi sebou porovnáme vzorky s přidavkem a bez přidavku opadu, vykazují vzorky s přidavkem vyšší dekompozici i vyšší hodnoty uhlíku mikrobiální biomasy než vzorky bez jeho přidavku (viz obr. 7, obr. 8).

Z Obr. 9, na kterém je znázorněna průměrná respirace vztažená k dostupnému uhlíku, je na první pohled patrné, že se výrazně liší od výsledků respirace, které k množství dostupného uhlíku vztaženy nebyly (viz obr. 7).



Obr. 9: Hodnoty průměrné respirace jednotlivých treatmentů s přidavkem opadu *Calamagrostis epigejos* (*Calamagrostis*) a bez přidavku opadu (*Substrate only*) za celou dobu pokusu vztažené k množství dostupného uhlíku Cd ($\text{C CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mikrokosm}^{-1} \cdot \text{gCd}^{-1}$), směrodatná odchylka. Výsledky repeated measurement ANOVA. Pokud je ANOVA pro typ půdy signifikantní, jsou uvedeny výsledky post hoc testu (LSD, $p < 0.05$), statistiky homogenní skupiny jsou označeny stejnými písmeny.

Hodnoty respirace treatmentů založených na substrátu E v tomto případě výrazně převyšují hodnoty treatmentů kultivovaných na půdě L (obr. 9). Tento trend napovídá určitému vztahu mezi respirací vzhledem k dostupnému uhlíku a mikrobiální diversitou reprezentovanou počtem OTU, která byla naměřena v jednotlivých treatmentech (viz tab. 1).

Vyšší mikrobiální diversitu a zároveň i hodnoty respirace vzhledem k dostupnému uhlíku tedy můžeme pozorovat u vzorků založených na substrátu půdy E. Příkladem je půda s nejvyšší respirací na gram dostupného uhlíku EEH-Cal ($5,25 \text{ C CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{microkosm}^{-1} \cdot \text{gC}_d^{-1}$, počet OTU 111), nebo také půda EEL-Cal ($4,87 \text{ C CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{microkosm}^{-1} \cdot \text{gC}_d^{-1}$, 125 OTU).

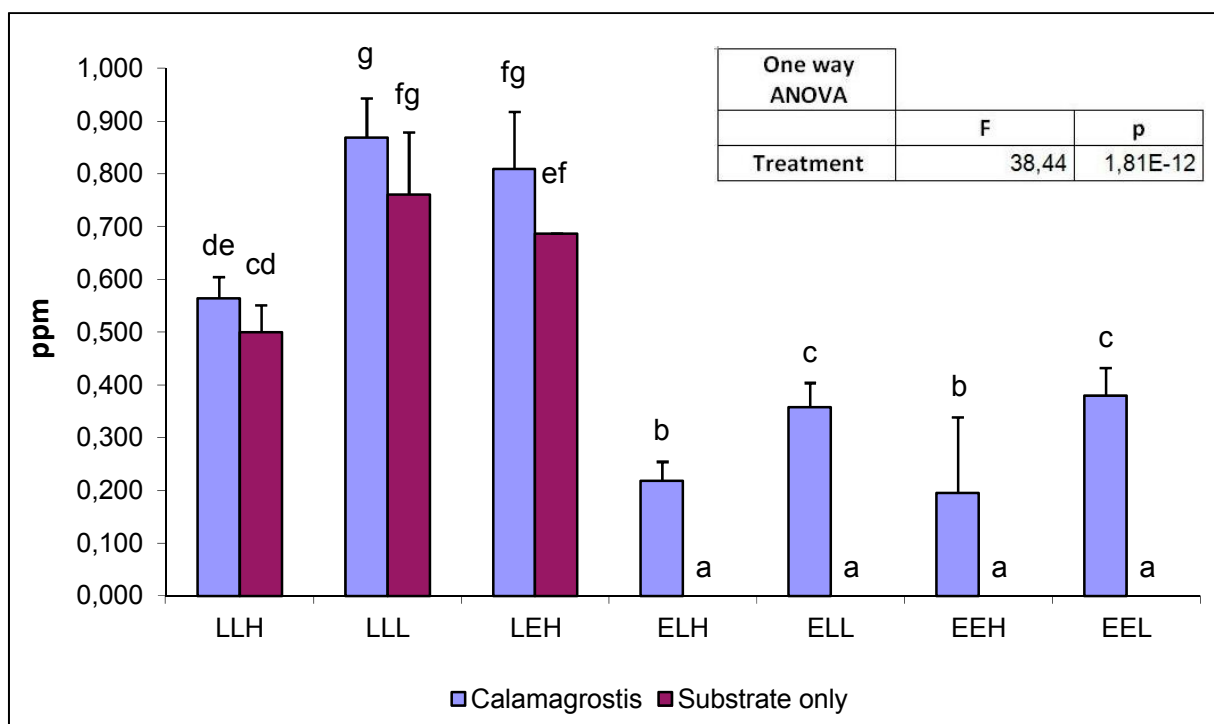
U treatmentů s přidavkem opadu kultivovaných na substrátu L byly počty OTU nižší, což také souhlasí s nižší respirací vztažené k dostupnému uhlíku u těchto vzorků (viz obr. 9; tab. 1.).

Podobný trend vykazují hodnoty stanovené u treatmentů bez přidavku opadu (viz obr. 9). Počet OTU je u těchto vzorků stejný jako v případě vzorků s jeho přidavkem, jelikož u obou skupin byly použity stejné půdy.

Na obr. 10 jsou znázorněny průměrné hodnoty obsahu ergosterolu v jednotlivých treatmentech. Na první pohled je patrný výrazně vyšší obsah ergosterolu u treatmentů kultivovaných na půdě L, oproti jeho obsahu v treatmentech půdy E. To napovídá určité souvislosti s hodnotami průměrné mikrobiální respirace za celou dobu měření (viz obr. 7), respektive mikrobiální biomasy (obr. 8).

Obsah ergosterolu byl v půdách s přidavkem opadu nejvyšší ve vzorku LLL-Cal (0,869 ppm), u kterého byla zároveň naměřena nejvyšší mikrobiální respirace i mikrobiální biomasa. U vzorků bez přidavku opadu byla nejvyšší hodnota sledována u vzorku LLL

(0,761 ppm), u kterého byla průměrná respirace i mikrobiální biomasa taktéž vysoká. Nízké hodnoty ergosterolu u vzorků substrátu E také poměrně dobře odpovídají průměrné respiraci (viz obr. 7).



Obr. 10: Průměrné hodnoty obsahu ergosterolu (ppm) u jednotlivých treatmentů s přidavkem opadu *Calamagrostis epigejos* (*Calamagrostis*) a bez přidavku opadu (*Substrate only*), směrodatná odchylka. Výsledky one way ANOVA. Pokud je ANOVA pro typ půdy signifikantní, jsou uvedeny výsledky post hoc testu (LSD, $p < 0.05$), statistiky homogenní skupiny jsou označeny stejnými písmeny.

U půd bez přidavku opadu je trend u treatmentů kultivovaných na substrátu L velmi podobný jako u půd s jeho přidavkem. Avšak u půd E byly zaznamenány hodnoty ergosterolu na neměřitelné hladině (viz obr. 10), což odpovídá i nízkým hodnotám mikrobiální respirace za celou dobu měření (obr. 7).

Analýza korelačních koeficientů (tab. 2) mezi parametry jednotlivých půd ukázala, že mikrobiální respirace na celý microkosmos koreluje s mikrobiální biomasou a obsahem ergosterolu, je též zvyšována přidavkem opadu. Naproti tomu bakteriální diversita vyjádřená počtem OTU koreluje s mikrobiální respirací negativně. To může souviset s negativní korelací mezi počtem bakteriálních OTU a biomasou, respektive obsahem ergosterolu.

Tab. 2: Regresní koeficienty parametrů jednotlivých půd. Přídavek opadu byl kódován jako 0 (bez přídavku opadu) nebo 1 (s přídavkem opadu), stáří plochy pak jako 1 (mladší plocha) a 2 (starší plocha). Jsou zobrazeny pouze statisticky významné korelační koeficienty $p < 0.05$.

	Mikrobiální respirace	Mikrobiální respirace na gC	Ergosterol	Mikrobiální biomasa	C _d na microkosm	Počet OTU
Ergosterol	0.759	-	-	-	-	-
Mikrobiální biomasa	0.965	-	0.780	-	-	-
C _d na microkosm	0.594	-0.554	0.880	0.592	-	-
Počet OTU	-0.390	0.505	-0.632	-0.361	-0.762	-
Přídavek opadu	0.637	0.520	0.378	0.566	-	-
Stáří plochy	0.537	-0.609	0.850	0.542	0.995	-0.765
Stáří substrátu ze kterého bylo získáno inokulum	0.628	-	0.633	0.635	0.649	-0.538

Podíváme-li se však na respiraci přepočtenou na dostupný uhlík v microkosmu, pak počet OTU a přídavek opadu koreluje s respirací pozitivně, zatímco množství uhlíku a stáří plochy negativně. Korelační koeficient mezi respirací a mikrobiální biomasou není v tomto případě statisticky významný.

5. Diskuse

5.1. Vztah diversity, respirace a biomasy mikrobiálního společenstva

S rostoucí diversitou se mikrobiální respirace na celý mikrokosmos snižuje a naopak, jak ukazuje negativní korelace mezi respirací a počtem OTU (tab. 2). K podobným závěrům došli i Zhang a Zhang (2016). Ve svém měsíc trvajícím experimentu, kde taktéž využili respirace mikrokosmů a sledování počtu OTU, došli k závěru, že ztráta mikrobiální diversity vede k vyšší míře dekompozice. Míra respirace pak může být řízena biomasou mikrobiálního společenstva, respektive množstvím ergosterolu (viz níže).

Velmi úzký vztah mezi respirací a mikrobiální biomasou, který je patrný jak z porovnání hodnot obr. 7 a obr. 8, tak z výsledků analýzy korelačních koeficientů (96,5 % vysvětlené variability), souhlasí s částí hypotézy, která tvrdí, že vyšší míru dekompozice vykazují půdy s vyšší mikrobiální biomasou. Colman a Schimel (2013), kteří sledovali mj. míru respirace na půdách s rozdílnou vegetací (louky, pastviny, křoviny, jehličnaté a listnaté lesy), prokázaly podobnou závislost mezi mírou respirace a mikrobiální biomasou (61% vysvětlené variability). Podobný vztah respirace a mikrobiální biomasy byl prezentován také v dalších publikacích (Spohn a Chodak, 2015; Shi a Marschner, 2014; Susyan et al., 2011).

Byla podložena i poslední část hypotézy uvažující limitaci uhlíkem, která se projevila pozitivní závislostí respirace přepočtené k dostupnému uhlíku na mikrobiální diversitě (viz tab. 2). Vliv mikrobiální biomasy nebyl v tomto případě statisticky významný (21 % vysvětlené variability). Po přepočtu naměřených hodnot respirace na množství dostupného uhlíku došlo k většímu zvýšení respirace mikrokosmů kultivovaných

na půdě E s vyšší mikrobiální diversitou, oproti vzorkům založených na půdě L s diversitou nižší (tab. 1; obr. 9).

Spojitost mezi množstvím dostupného uhlíku a mikrobiální diversitou je prezentována ve studii Luo a Gu (2016). Jejich výsledky vykazují negativní korelaci mezi množstvím dostupného uhlíku a mikrobiální diversitou. Po zvýšení dostupnosti uhlíku došlo k výraznému poklesu mikrobiální diversity. Vyšší diversitu tedy můžeme podle tohoto modelu očekávat u půd, které jsou více limitovány uhlíkem, což souvisí i s trendem vyšší míry respirace vzhledem k dostupnému uhlíku u půd, u kterých byl naměřen vyšší počet OTU (viz tab. 1; obr. 9).

Studie Cleveland a Liptzin (2007) navzdory vysoké heterogenitě podmínek v jednotlivých půdních systémech prokázala, že množství mikrobiální biomasy velmi dobře odpovídá stechiometrickému poměru C:N:P. Tuto hypotézu podporují i další studie (Manzoni et al., 2010; Hartman a Richardson, 2013). To částečně odpovídá poměrně vyrovnaným hodnotám mikrobiální biomasy, respektive mikrobiální respirace, které byly sledovány u substrátu půdy E. Nevysvětluje to však vysokou heterogenitu těchto hodnot pozorovanou u substrátu půdy L. Vzhledem k tomu, že jediným faktorem, který od sebe odlišoval půdy založené na stejném substrátu (pokud neuvažujeme vliv látek vyluhovaných v inokulátu), byla by rozdílná mikrobiální diversita také možným vysvětlením.

Naše hypotéza částečně podporuje model Schimel a Weintraub (2003), který předpokládá, že míra dekomposice je do jisté míry závislá na kompetici o zdroje, přičemž vztah míry dekomposice a dostupnosti uhlíku není lineární.

Domníváme se tedy, že pokud není půda limitována uhlíkem, dojde k velkému růstu biomasy mikrobiálního společenstva, uplatní se druhy s rychlou strategií růstu, které však nemusí maximálně účinně využívat dostupné zdroje.

Pak tedy nebude mikrobiální respirace úměrně navýšena množstvím dostupného uhlíku a dojde také k potlačení vlivu mikrobiální diversity. Vyšší mikrobiální diversity totiž souvisí s větší různorodostí enzymatického aparátu jako celku, který je tak schopen více využívat dostupné zdroje. Tento efekt je však za těchto podmínek upozaděn. Na druhou stranu nedostatečný přísun dostupného uhlíku vede k nutnosti maximálního možného využití zdrojů. Pak bude mikrobiální respirace vyšší u společenstev s různorodějším enzymatickým aparátem.

To také vysvětluje, proč jsou hodnoty mikrobiální diversity vyšší na méně vyvinuté půdě než na půdě starší, více vyvinuté (tab. 1).

Je to tím, že menší dostupnost zdrojů vede k nižší schopnosti dominantních druhů vytlačit z půdní niky stres tolerující mikroorganismy. Naopak při zvyšování dostupnosti zdrojů dojde k vysokému nárůstu biomasy dominantních mikroorganismů, přizpůsobených podmínkám odpovídajícím dobré dostupnosti živin. Ty pak výrazně převáží nad druhy, které jsou v tomto prostředí méně úspěšné, a nakonec dojde k jejich úplnému vytlačení. Nižší mikrobiální diversity byla totiž sledována u substrátu staršího sukcesního stádia s větším množstvím dostupného uhlíku a výrazně vyšší u substrátu mladšího, který byl uhlíkem více limitován (viz tab. 1). K podobnému vysvětlení se přiklání i Fontaine et al. (2003).

5.2. Vztah ergosterolu s mikrobiální respirací a mikrobiální biomasou

Naše výsledky ukazují, že průměrné hodnoty obsahu ergosterolu vykazovaly signifikantní odlišnost. Závislost obsahu ergosterolu na množství houbové biomasy byla sledována ve studii Montgomery et al. (2000). Výsledky potvrdily, že obsah ergosterolu je dobrým prediktorem žijící houbové biomasy (Montgomery et al., 2000). Podobné výsledky jsou prezentovány i v dalších publikacích (Grant a West, 1986; Davis a Lamar, 1992; Porep et al., 2014).

Množství houbové biomasy v půdě závisí na mnoha faktorech, jako je např. vlhkost, teplota, a zejména pak na přísunu odumřelé rostlinné hmoty ve formě opadu. Rostlinný opad totiž obsahuje velké množství ligninu, k jehož rozkladu jsou některé houby velmi dobře vybaveny (Sanchez, 2009; Berg a McClaugherty, 2006). Tato zjištění souhlasí s pozitivní korelací ergosterolu s přidavkem opadu. Souhlasí také s vysokým koeficientem korelace (viz tab. 2), který ergosterol vykazuje se stářím substrátu, respektive plochy, ze které byla půda odebrána. Vegetační pokryv u plochy staršího sukcesního stádia (L) byl totiž výrazně hustší než na ploše mladé (E), což jistě vedlo k vyššímu přísunu opadu do půdy starší. Nerozložené zbytky opadu se pak projeví podobně jako jeho výše zmíněný přídavek.

Platnost části hypotézy předpokládající vyšší dekompoziční rychlost u vzorků s vyšším obsahem ergosterolu podkládá pozitivní korelační koeficient mezi ergosterolem a respirací (76 % vysvětlené variability). Poměrně dobře je tento vztah také patrný z výsledků skupiny vzorků odlišného substrátu (obr. 7; obr. 10), kde můžeme sledovat vysoké respirace a zároveň vysoké hodnoty ergosterolu u vzorků substrátu L a oproti nim tyto hodnoty pro substrát E výrazně nižší.

U vzorků kultivovaných na půdě E bez přídavku opadu výsledky poukazují na neměřitelné hodnoty houbové biomasy, ačkoli můžeme s jistotou konstatovat, že vzhledem k použití stejného inokula musely být houbové mikroorganismy ve vzorcích přítomny. Měření respirace však probíhalo po velmi dlouhou dobu a je tedy možné, že absence opadu způsobila úplné vytlačení houbových mikroorganismů, které nebyly schopny v daném prostředí konkurovat bakteriím. O tom svědčí i to, že ve stejných vzorcích s přídavkem opadu ergosterol detekován byl. Tyto skutečnosti podporují část hypotézy, která předpokládá vyšší hodnoty ergosterolu u vzorků s přídavkem opadu oproti vzorkům, kde nebyl opad přidán.

Velmi výrazně se projevil vzorek LLL, a to jak s přídavkem, tak bez přídavku opadu. Trend počínající u těchto vzorků v čase 200 dnů (viz obr. 3; obr. 4) by mohl být vysvětlen vysokým nárůstem houbové biomasy. V tomto případě mohla hrát významnou roli vlhkost. Suché prostředí totiž může měnit složení mikrobiální komunity, přičemž houby jsou k suchu tolerantnější než bakterie (Hendrix et al., 1986). Vzhledem k dlouhé době měření a vysokému počtu jednotlivých manipulací se vzorky, docházelo k postupnému úbytku vlhkosti v půdních mikrokosmech. Mohlo pak nastat takové snížení dostupnosti vody, při které mikrobiální společenstvo bakterií nebylo schopno konkurovat houbám. Tuto domněnku podporují i další studie (Ouahmane et al., 2006; Al-Karaki et al., 2004). Po navýšení vlhkosti, a tedy i navrácení půdy do původního stavu, bychom mohli očekávat, že dojde ke zpětnému snížení aktivity, což ale patrně nebylo (viz obr. 3; obr. 4). Možným vysvětlením by bylo, že se diversity a poměr mezi jednotlivými druhy změnily natolik, že návrat do původního stavu nebyl možný a z hlediska využití energie ani výhodný.

Další vysvětlení vysokých hodnot dekompozice u půd LLL by mohly přinést výsledky Rousk et al. (2010). Ty poukazují na možnost, že v případě oslabení bakteriálního společenstva v půdách s $\text{pH} > 7$, může dojít k výraznému nárůstu houbových mikroorganismů. Těmto podmínkám vyhovuje jak pH vyšší než 7 sledované na našich půdách (viz tab. 1), tak i zásah do diversity společenstva. Sporný je však fakt, že lokální diversity by měla být vyšší u bakterií než u hub (Urbanová et al., 2015), a tudíž bychom mohli vzhledem k ředění inokulace čekat spíše oslabení diversity houbového společenstva. To je ještě umocněno závěry, že v bazických podmínkách mají určitou výhodu bakteriální organismy, zatímco houby dominují hlavně v kyseljším prostředí (De Boer et al., 2005; Caldwell, 2005).

Pozitivní korelace mezi ergosterolem a mikrobiální biomasou (78% vysvětlené variability) odpovídá tvrzení, že množství biomasy hub a celkové mikrobiální biomasy bude vykazovat výraznou závislost. Odlišným závěrům, které vycházejí z výrazně rozdílného poměru bakteriální a houbové biomasy mezi jednotlivými vzorky, napovídá studie Frouz et al. (2016) Zde byly použity totožné půdní vzorky. Cílem tohoto experimentu bylo ale mj. sledování změn v mikrobiálním společenstvu za přispěvku rostlin, které byly na půdách kultivovány. Kořeny rostlin do mikrobiálního společenstva „pumpují“ velké množství dobře dostupné energie v podobě kořenových exsudátů a energeticky tak přispívají především mykorhizním houbám, ale i ostatním mikroorganismům (Bonkowski et al, 2000; Berg a Smalla, 2009). V takto odlišném prostředí tedy můžeme očekávat rozdílný poměr mezi houbovou a bakteriální biomasou. V podmínkách našeho experimentu byl vliv rostlin vyloučen. Je tedy možné, že postupem času došlo k jeho určitému vyrovnání tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší dekompoziční rychlosti, což naznačuje i studie Lv et al. (2015).

Důležité je zmínit, že tato domněnka není v konfliktu s vlivem mikrobiální diversity na rozdílnou respiraci. Nebere totiž v úvahu druhové složení mikrobiálního společenstva, jak by se mohlo zdát, ale pouze určitý poměr biomasy hub a bakterií. Výsledky studií uvádějí v platnost hypotézu různé rychlosti dekompozice u rozdílných mikroorganismů stejného taxonomického zařazení (Lv et al., 2013; Zimmerman, 1990; Geib et al., 2008). Pokud by se tedy poměr všech přítomných skupin mikroorganismů vyrovnal na naprosto stejné hladině, půda by vzhledem k rozdílnému druhovému složení stále vykazovala odlišnou bazální respiraci. Naopak bylo poukázáno na možné nahrazení jedné skupiny mikroorganismů jinou. Například v některých případech mohou roli půdních hub na dekompozici SOM převzít aktinomycety i další mikroorganismy (Helfrich et al., 2015; Geib et al., 2008). Tato skutečnost by pak mohla vliv mikrobiální diversity na dekompozici organické hmoty do určité míry oslabovat. K podobným projevům však dochází často v případě určitého narušení. To vede k umělému vytlačení konkurenčně zdatného druhu, jehož funkce je poté substituována druhem jiným, který by za normálních podmínek nebyl schopen vytlačenému druhu v dané nise konkurovat (Berg a McClaugherty, 2006).

5.3. Vliv přídavku opadu a vody na průběh respirace

Je všeobecně uznáváno, že nízká dostupnost uhlíku omezuje tok energie procházející skrze půdní mikrobiální společenstvo, a tím i rychlost mineralizace půdní organické hmoty (Fontaine et al., 2003). Nárazový účinek zvýšení podílu čerstvé SOM má za následek prudké zvýšení mikrobiální aktivity spojené s vyšší mírou dekompozice (Fontaine et al., 2000). S postupným vyčerpáváním živin, které je často velmi rychlé, dochází k prudkému poklesu biomasy mikrobiálního společenstva a s tím i k výraznému snížení dekompozice. Tento jev také označovaný jako „priming effect“ je předmětem řady

studií (Kuzyakov, 2002; Hamer a Marschner, 2005; Bertrand et al., 2010; Cheng et al., 2014), avšak jeho mechanismy jsou stále poměrně špatně vysvětleny (Kuzyakov et al., 2000; Luo et al., 2016).

Naše hypotéza předpokládala priming efekt v počáteční fázi dekomposice u vzorků s přídatkem opadu. Kontrolními vzorky, kde neměl být tento projev sledován, byly půdy bez přídatku opadu.

Platnost hypotézy podkládá průběh respirace u vzorků s přídatkem opadu (viz obr. 3). U vzorků bez přítomnosti opadu je pak zřetelná absence priming efektu (viz obr. 4). To je dobře patrné i ze srovnání průměrných respirací obou skupin vzorků během prvních sedmi a po nich následujících sedmi měřeních (obr. 5; obr. 6). Zde je průkazné, že vzorky s přídatkem opadu sledují v iniciální fázi výrazně vyšší průměrnou dekomposiční rychlost než později.

U vzorků, kde nebyl opad přítomen, pozorujeme vyšší průměrnou respiraci v pozdější fázi dekomposice. Možnou odpovědí je právě nepřítomnost opadu a zároveň s tím i dobře dostupných živin. To by odpovídalo teorii opožděného nárůstu mikrobiální biomasy oproti vzorkům, kde jsou živiny dostupnější (Blagodatsky et al., 2000; Yates a Smotzer, 2007; Blagodatskaya et al., 2014).

Respirace mikrobiálního společenstva je silně ovlivněna dostupností vody (Verhoef et al., 1996). K jak velkému zvýšení mikrobiální respirace dojde s rostoucí půdní vlhkostí, je závislé na abiotických i biotických faktorech, především teplotě (Wang et al., 2014).

V našem experimentu nebyla teplota sledována. Nechceme tedy nijak kvantifikovat závislost růstu teploty, vlhkosti a mikrobiální respirace. Zajímá nás pouze to, zda měl přídatek vody po delší době bez zavlažení na míru dekomposice patrný vliv. K tomu

dobře postačí trendy sledované na křivkách respirace (obr. 3, obr. 4). Zásadním momentem byl v tomto ohledu přidavek vody v čase 570 dnů. Pro kontrolu byla půda zavlažena v čase přibližně 1000 dnů.

Před prvním zavlažením sledujeme u obou grafů víceméně klesající tendenci, která je lépe patrná u vzorků s přidavkem opadu (viz obr. 3). Po zavlažení substrátu došlo k výraznému nárůstu dekompoziční rychlosti, která u vzorků bez přidavku opadu dosáhla svého vrcholu přibližně za 40 dní. U vzorků s opadem sledujeme vrchol přibližně o měsíc později. Poté dochází k postupnému poklesu mikrobiální aktivity. Pokud zanedbáme mírné odchylky, můžeme také sledovat o něco větší zpoždění a zároveň i vyšší nárůst dekompozice u půd LLL (obr. 3; obr. 4).

U kontrolního zavlažení (1000 dnů) bylo zvýšení dekompoziční rychlosti také patrné, ačkoli vzestup nebyl tak razantní, což by mohlo souviset s postupným snižováním dostupných živin.

Tyto výsledky nás přivádí k myšlence, že intenzita a délka odpovědi dekompoziční rychlosti na přidavek nebo úbytek vody by se mohla lišit v závislosti na biomase mikrobiálního společenstva, respektive na jeho funkčním (dělení dle zdrojů energie) a druhovém složení (mikrobiální diversita). To by odpovídalo velmi odlišným reakcím dekompozice na přidavek či nedostatek vody, které byly sledovány na odlišných půdách v různých oblastech celého světa (Nikolova et al., 2009; Sotta et al., 2007; Cleveland et al., 2010; Wang et al., 2014; Liua et al., 2016).

6. Závěry

- (1) Rozhodujícím faktorem závislosti dekompozice na diversitě mikrobiálního společenstva je limitace dostupným uhlíkem. Pokud uhlík není limitující, dekompoziční rychlost se s vyšší diversitou snižuje a současně převládá kvantitativní vliv mikrobiální biomasy. V případě limitace uhlíkem se projevuje závislost dekompozice na mikrobiální diversitě, a vliv mikrobiální biomasy pak nehraje významnou roli.
- (2) Dekompozice probíhá rychleji u vzorků s větším množstvím houbové biomasy, která je reprezentována obsaženým ergosterolem. Množství houbové biomasy je závislé na vstupu opadu a zároveň na stáří rekultivované plochy, které s množstvím opadu za našich podmínek úzce souvisí. Vztah mikrobiální a houbové biomasy je v daných podmínkách silně závislý.
- (3) U půd s přidavkem opadu byl prokázán priming efekt způsobený jeho počátečním přidavkem, což potvrdil průběh respirační křivky. U kontrolního vzorku bez přidavku opadu tato závislost sledována nebyla. Vliv přidavku vody na zvýšení mikrobiální aktivity byl taktéž potvrzen.

7. Reference

- Abaye, D.A., Brookes, P.C., 2006. Relative importance of substrate type and previous soil management in synthesis of microbial biomass and substrate mineralization. *European Journal of Soil Science* 57: 179-189.
- Aerts R., 1997. Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial ecosystems: a triangular relationship. *Oikos* 79: 439-449.
- Aerts, R., de Caluwe, H., 1997. Nutritional and plant-mediated controls on leaf litter decomposition of *Carex* species. *Ecology* 78: 244-260.
- Ahlström, A., Schurgers, G., Arneth, A., Smith, B., 2012. Robustness and uncertainty in terrestrial ecosystem carbon response to CMIP5 climate change projections *Environ. Res. Lett.* 7: 044008.
- Akala, V.A., Lal, R., 2001. Soil organic carbon pools and sequestration rates in reclaimed mine soils in Ohio. *Journal of Environmental Quality* 30: 2098–2104.
- Al-Karaki, G.N., McMichael, B., Zak, J., 2004. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza* 14: 263–269.
- Andreetta, A., Ciampalini, R., Moretti, P., Vingiani, S., Poggio, G., Matteucci, G., Tescari, F., Carnicelli, S., 2011. Forest humus forms as potential indicators of soil carbon storage in Mediterranean environments. *Biol. Fertil. Soils* 47: 31–40.
- Asina, F., Brzonova, I., Voeller, K., Kozliak, E., Kubátová, A., Yao, B., Ji, Y., 2016. Biodegradation of lignin by fungi, bacteria and laccases. *Bioresource Technology*, In press, accepted manusc.
- Batjes, N.H., 2014. Total carbon and nitrogen in the soils of the world. *European Journal Soil Sci.* 65: 10–21.
- Beer, C., Reichstein, M., Tomelleri, E., Ciais, P., Jung, M., Carvalhais, N., Rödenbeck, C., Arain, M.A., Baldocchi, D., Bonan, G.B., 2010. Terrestrial gross carbon dioxide uptake: global distribution and covariation with climate. *Science* 329: 834–838.
- Begon, M., Harper, J. L., Townsend, C. R., 1997. *Ekologie: jedinci, populace a společenstva*, 1. vyd., Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 979 str., ISBN 80-7067-695-7.
- Bell, T., Newman, J., Silverman, B.W., Turner, S.L., Lilley, A.K., 2005. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 436: 1157–1160.
- Bellassen, V., Luyssaert, S., 2014. Carbon sequestration: managing forests in uncertain times. *Nature* 506: 153-155.
- Berg, B., 2000. Litter decomposition and organic matter turnover in northern forest soils. *Forest Ecology and Management* 133: 13-22.
- Berg, B., Laskowski, 2006. *Litter decomposition: A guide to carbon and nutrient turnover*, Elsevier Academic Press, San Diego, 447 pp, ISBN 0-12-013938-3.
- Berg, B., McClaugerty, C., 2008. *Plant litter: Decomposition, Humus Formation, Carbon Sequestration*. 2. vyd., Springer, Berlin Heidelberg, 340 pp., ISBN: 978-3-540-74922-6.

- Berg, B., McClaugherty, C., De Santo, A.V., Johnson, D., 2001. Humus buildup in boreal forests: effects of litter fall and its N concentration. *Canadian Journal of Forest Research* 31: 988-998.
- Berg, B., Meentemeyer, V., 2002. Litter quality in a north European transect versus carbon storage potential. *Plant Soil* 242:83–92.
- Berg, B., Smalla, K., 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68: 1-13.
- Blagodatskaya, E., Khomyakova, N., Myachina, O., Bogomolova, I., Blagodatsky, S., Kuzyakova, Y., 2014. Microbial interactions affect sources of priming induced by cellulose. *Soil Biology and Biochemistry* 74: 39–49.
- Blagodatsky, S.A., Heinemeyer, O., Richter, J., 2000. Estimating the active and total soil microbial biomass by kinetic respiration analysis. *Biology and Fertility of Soils* 32: 73–81.
- Bogatyrev, L., Berg, B., Staaf, H., 1983. Leaching of plant nutrients and total phenolic substances from some foliage litters. *Swedish Coniferous Forest Project* 33: 1-57.
- Bonkowski, M., Cheng, W., Griffiths, B.S., Alpeh, J., Scheu, S., 2000. Microbial-faunal interactions in the rhizosphere and effects on plant growth. *Eur. J. Soil Biol.* 36: 135-147.
- Bragazza, L., Siffi, C., Iacumin, P., Gerdol, R., 2007. Mass loss and nutrient release during litter decay in peatland: The role of microbial adaptability to litter chemistry. *Soil Biology and Biochemistry* 39: 257-267.
- Brodribb, T.J., McAdam, S.A., Jordan, G.J., Feild, T.S., 2009. Evolution of stomatal responsiveness to CO₂ and optimization of water-use efficiency among land plants. *New Phytol.* 183: 839–847.
- Carter, M. R. 2002. Soil quality for sustainable land management: Organic matter and aggregation interactions that maintain soil functions. *Agronomy Journal* 94:38-47.
- Caldwell, B., 2005. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. *Pedobiologia* 49: 637–644.
- Chen, R., Senbayram, M., Blagodatsky, S., Myachina, O., Dittert, K., Lin, X., Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2014. Soil C and N availability determine the priming effect: microbial N mining and stoichiometric decomposition theories. *Global Change Biology* 20: 2356–2367.
- Cheng, W., Parton, W.J., Gonzalez-Meler, M.A., 2014. Synthesis and modeling perspectives of rhizosphere priming. *New Phytol.* 201: 31–44.
- 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.
- Cleveland, C.C., Wieder, W.R., Reed, S.C., Townsend, A.R., 2010. Experimental drought in a tropical rain forest increases soil carbon dioxide losses to the atmosphere. *Ecology* 91: 2313–2323.
- Cornejo, F.H, Varela, A., Wright, S.J., 1994. Tropical forest litter decomposition under seasonal drought: nutrient release, fungi and bacteria. *Oikos* 70:183–190.

- Coûteaux, M., Bottner, P., Berg, B., 1995. Litter decomposition, climate and litter Quality. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 63-66.
- Cox, P.M. Pearson, D., Booth, B.B., Friedlingstein, P., Huntingford, C., Jones, C.D., Luke, C.M., 2013. Sensitivity of tropical carbon to climate change constrained by carbon dioxide variability. *Nature* 494: 341–344.
- Davis, M.V., Lamar, R.T., 1992. Evaluation of methods to extract ergosterol for quantitation of soil fungal biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 24: 189-198.
- 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 Microbiology Reviews* 29: 795–811.
- De Vos, B., Cools, N., Ilvesniemi, H., Vesterdal, L., Vanguelova, E., Carnicelli, S., 2015. Benchmark values for forest soil carbon stocks in Europe: results from a large scale forest soil survey. *Geoderma* 251: 33–46.
- Dorrepaal, E., Toet, S., Logtestijn, R.S.P., Swart, E., Weg, M.J., Callaghan, T.V., Aerts, R., 2009. Carbon respiration from subsurface peat accelerated by climate warming in the subarctic. *Nature* 460: 616–619.
- El-Tarabily, K., 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.
- Eriksson, K.E.L., Blanchette, R.A., Ander, P., 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer, Berlin Heidelberg, 407 pp., ISBN: 978-3-642-46689-2.
- Eviner, V.T, Chapin, F.S., 2003. Functional matrix: a conceptual framework for predicting multiple plant effects on ecosystem processes. 2003. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34: 455–485.
- Falkengren-Grerup, U., Schöttelndreier, M., 2004. Vascular plants as indicators of nitrogen enrichment in soils. *Plant Ecology* 172: 51–62.
- Fierer, N., Jackson, R.B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 626–631.
- Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L., 2003: The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology & Biochemistry* 35: 837–843.
- Frouz, J., 2010. Půda – živý systém. Interakce půdní fauny a mikroflóry a jejich význam pro přeměny organické hmoty v půdě. *Vesmír* 89: 490.
- Frouz J., 2011. Rozvoj půd jako základní předpoklad obnovy ekosystémových služeb na těžce disturbovaných plochách, *Acta Environmentalica Universitas Comeniane (Bratislava)*, Supplement 19: 66-70.
- Frouz, J., Prach, K., Pizl, V., Hanel, L., Starý, J., Tajovský, K., Materna, J., Balík, V., Kalcík, J., Rehounkova, K., 2008. Interactions between soil development, vegetation and soil fauna during spontaneous succession in post mining sites. *Eur. J. Soil Biol.* 44, 109-121.

- Frouz, J., Toyota, A., Mudrak, O., Jilkova, J., Filipova, A., Cajthaml, T., 2016. Effects of soil substrate quality, microbial diversity and community composition on the plant community during primary succession. *Soil Biology and Biochemistry* 99: 75-84.
- Garbulsky, M.F., Filella, I., Verger, A., Penuelas, J., 2014. Photosynthetic light use efficiency from satellite sensors: From global to Mediterranean vegetation. *Environmental and Experimental Botany* 103: 3-11.
- 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. *Acta Ecol. Sin.* 33: 102–108.
- Geib, S.M., Filley, T.R., Hatcher, P.G., Hoover, K., Carlson, J.E., Jimenez-Gasco, M.M., Lzumi, A.N., Sieghter, R.L., Tien, M., 2008. Lignin degradation in wood-feeding insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 12932–12937.
- GLOBE 2007: www.meteocentrum.cz/zajimavosti/globalnioteplovani/sklenikovy-efekt (stranka dostupna 10. 7. 2016).
- Grace, J., Rayment, M., 2000. Respiration in the balance. *Nature* 404: 819–820.
- Grant, W. D., West, A. W., 1986. Measurement of ergosterol, diaminopimelic acid and glucosamine in soil: evaluation as indicators of soil microbial biomass. *of Microbiological Methods* 6: 47–53.
- Grove, S.J., Stamm, L., Barry, C., 2009. Log decomposition rates in Tasmanian Eucalyptus oblique determined using an indirect chronosequence approach. *For. Ecol. Management* 258: 389–397.
- Grundmann, L.G., Gourbiere, F., 1999. A micro-sampling approach to improve the inventory of bacterial diversity in soil. *Applied Soil Ecology* 13: 123-126.
- Guenet, B., Neill, C., Bardoux, G., Abbadie, L., 2010. Is there a linear relationship between priming effect intensity and the amount of organic matter input? *Applied Soil Ecology* 46: 436–442.
- Hagen-Thorn, A., Varnagiryte, I., Nihlgard, B., Armolaitis, K., 2006. Autumn nutrient resorption and losses in four deciduous forest tree species. *Forest Ecology and Management* 228: 33-39.
- Hamer, U., Marschner, B., 2005. Priming effects in soils after combined and repeated substrate additions. *Geoderma* 128: 38–51.
- Hattenschwiler, S., Fromin, N., Barantal, S., 2011. Functional diversity of terrestrial microbial decomposers and their substrates. *Comptes Rendus Biologies* 334: 393–402.
- Hartman, W.H., Richardson, C. J., 2013. Differential nutrient limitation of soil microbial biomass and metabolic quotients (qCO₂): is there a biological stoichiometry of soil microbes?. *PLoS One* 8, article e57127.
- Harden, J.W., Koven, C., Ping, C., Hugelius, G., McGuire, A.D., Camill, P., Jorgenson, T., Kuhry, P., Michaelson, G., O'Donnell, J.A., Tarnocai, C., Johnson, K., Grosse G., 2012. Field information links permafrost carbon to physical vulnerabilities of thawing. *Geophys. Res. Lett.*, 39: L15704.
- Hayes, M.H., Clapp, C.E., 2001. Humic substances: Considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences, *Soil Science* 166: 723–737.

- Helfrich, M., Ludwig, B., Thoms, C., Gleixner, G., Flessa, H., 2015. The role of soil fungi and bacteria in plant litter decomposition and macroaggregate formation determined using phospholipid fatty acids. *Applied Soil Ecology* 96: 261–264.
- Hendrix, P.J., Parmelee, R.W., Crossley, D.A., Coleman, D.C., Odum, E.P., Goffman, P.M., 1986. Detritus food webs in conventional and no-tillage agrosystems. *Bioscience* 36: 374-380.
- Jacob, M., Weland, N., Platner, C., Schaefer, M., Leuschner, C., Thomas, F.M., 2009. Nutrient release from decomposing leaf litter of temperate deciduous forest trees along a gradient of increasing tree species diversity. *Soil Biology & Biochemistry* 41: 2122–2130.
- Jayasinghe, D.B.T.D, Parkinson, D., 2009. Earthworms as the vectors of actinomycetes antagonistic to litter decomposer fungi. *Appl. Soil Ecol.* 43: 1–10.
- Jenkinson, D.S., Rayner, J.H., 1977: Turnover of Soil Organic-Matter in Some of Rothamsted Classical Experiments. *Soil Science* 123:298-305.
- Jørgensen, S.E., Fath, B.D. et al., 2008. *Encyclopedia of Ecology*, 1. ed., Elsevier B.V., Amsterdam, 3834 pp, ISBN 978-0-080-45405-4.
- Juwarkar, A.A., Jambhulkar, H.P., 2008. Phytoremediation of coal mine spoil dump through integrated biotechnological approach. *Bioresource Technology* 99:4732–4741.
- 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). *European Journal Soil Biology* 65: 87–95.
- Karu, H., Szava-Kovats, R., Pensa, M., Kull, O., 2009. Carbon sequestration in a chronosequence of Scots pine stands in a reclaimed opencast oil shale mine. *Canadian Journal of Forest Research* 39:1507–1517.
- Kjølner, A., Struwe, S., 1982. Microfungi in ecosystems: fungal occurrence and activity in litter and soil. *Oikos* 39: 389-422.
- Kuzyakov, Y., 2002. Factors affecting rhizosphere priming effects. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165: 382- 396.
- Kuzyakov, Y., Friedel, J.K., Stahr, K., 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1485-1498.
- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N., 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 5111–5120.
- Lavelle, P., Spain, A.V., 2005. *Soil ecology*, Springer, Dordrecht, 654 pp, ISBN 1-40200490-7.
- Law, B.E., Falge, E., Gu, L., Baldocchi, D.D., Bakwin, P., Berbigier, P., et al., 2002. Environmental controls over carbon dioxide and water vapor exchange of terrestrial vegetation. *Agric. For. Meteorol.* 113: 97–120.
- Liua, Y., Liua, S., Wanb, S., Wangc, J., Luand, J., Wanga, H., 2016. Differential responses of soil respiration to soil warming and experimental throughfall reduction in a transitional oak forest in central China. *Agricultural and Forest Meteorology* 226–227: 186–198.

- Loreau, M., 2001. Microbial diversity, producer-decomposer interactions and ecosystem processes: a theoretical model. *Proceedings Biological sciences*: 268: 303–309.
- Luo, L., Gu, J., 2016. Alteration of extracellular enzyme activity and microbial abundance by biochar addition: Implication for carbon sequestration in subtropical mangrove sediment. *Journal of Environmental Management* 182: 29–36.
- Luo, Z., Wang, E., Sun, O., 2016. A meta-analysis of the temporal dynamics of priming soil carbon decomposition by fresh carbon inputs across ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry* 101: 96–103.
- Lv, Y., Chen, Y., Sun, S., Hu, Y., 2014. Interaction among multiple microorganisms and effects of nitrogen and carbon supplementations on lignin degradation. *Bioresource Technology* 155: 144–151.
- Maheshwari, R., 2012. *Fungi: experimental methods in biology*. Mycology 28.
- Manlay, R. J., Feller, C., Swift, M. J., 2007: Historical evolution of soil organic matter concepts and their relationships with the fertility and sustainability of cropping systems, *Agriculture, Ecosystems & Environment* 119: 217–233.
- Manzoni, S., Trofymow, J.A., Jackson, R.B., Porporato, A., 2010. Stoichiometric controls on carbon, nitrogen, and phosphorus dynamics in decomposing litter. *Ecol. Monogr.* 80: 89–106.
- McGuire, A.D., Anderson, L.G., Christensen, T.R., Dallimore, S., Guo, L., Hayes, D.J., 2009. Sensitivity of the carbon cycle in the Arctic to climate change. *Ecological Monography* 79: 523–555.
- McGuire, K.L., Treseder, K.K., 2010. Microbial communities and their relevance for ecosystem models: Decomposition as a case study. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 529–535.
- Miki, T., Ushio, M., Fukui, S., Kondoh, M., 2010. Functional diversity of microbial decomposers facilitates plant coexistence in a plant-microbe-soil feedback model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 107: 14251–14256.
- Moorhead, D.L., Sinsabaugh, R.L., 2006. A theoretical model of litter decay and microbial interaction. *Ecological Monographs* 76: 151–174.
- Montgomery, H.J., Monreal, C.M., Young, J.C., Seifert, K.A., 2000. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses 32: 8–9.
- Nikolova, P.S., Raspe, S., Andersen, C.P., Mainiero, R., Blaschke, H., Matyssek, H., Häberle, H.K., 2009. Effects of the extreme drought in 2003 on soil respiration in a mixed forest. *Eur. J. For. Res* 128: 87–98
- Novák, P., Vopravil, J., Lagová, J., 2010. Assessment of the soil quality as a complex of productive and environmental soil function potentials. *Soil and Water Research* 5:113–119.
- Ouahmane, L., Hafidi, M., Kisa, M., Boumezzough, A., Thoulouse, J., Duponnois, R., 2006. Lavandula species as accompanying plants in Cupressus replanting strategies: effect on plant growth, mycorrhizal soil infectivity and soil microbial catabolic diversity. *Appl. Soil Ecol.* 34: 190–199.
- Oulehle, F., Hruška, J., 2009. Lesy v globálním koloběhu uhlíku. *Vesmír* 88: 496–500.

- Pace, N.R., 2006. Time for a change. *Nature* 441: 289.
- Porep, J. U., Walter, R., Kortekamp, A., Carle, R., 2014. Ergosterol as an objective indicator for grape rot and fungal biomass in grapes. *Food Control* 37: 77–84.
- Persson, H., 1980. Spatial distribution of fine-root growth, mortality and decomposition in a young Scots pine stand in Central Sweden, *Oikos* 34: 77–87.
- Raddatz, T., Reick, C., Knorr, W., Kattge, J., Roeckner, E., Schnur, R., Schnitzler, K., Wetzel, P. Jungclaus, J., 2007. Will the tropical land biosphere dominate the climate carbon cycle feedback during the twenty-first century? *Clim. Dyn.* 29: 565–574.
- 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.
- Sanchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv.* 27: 185–194.
- Schimel J.P., Schaeffer, S.M., 2012. Microbial control over carbon cycling in soil. *Frontiers in Microbiology* 3: 348.
- Schimel, J.P., Weintraub, M.N., 2003. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 549–563.
- Schlesinger, W.H., Andrews, J.A., 2000. Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry* 48: 7–20.
- Schulze, E., Wirth, C., Heimann, M., 2000. Managing forests after Kyoto. *Science* 289: 2058–2059.
- Sheng, Y., Zhan, Y., Zhu, L., 2016. Reduced carbon sequestration potential of biochar in acidic soil. *Science of The Total Environment* 572: 129–137.
- Shi, A., Marschner, P., 2014. Soil respiration and microbial biomass after residue addition are influenced by the extent by which water-extractable organic C was removed from the residues. *European Journal of Soil Biology* 63: 28–32.
- Shrestha, R.K., Lal, R., Jacinthe, P.A., 2009. Enhancing carbon and nitrogen sequestration in reclaimed soils through organic amendments and chiseling. *Soil Science Society of America Journal* 73:1004–1011.
- Song, G.H., Li, L.Q., Pan, G.X., Zhang, Q., 2005. Topsoil organic carbon storage of China and its loss by cultivation. *Biogeochemistry* 74: 47–62.
- Sotta, E.D., Veldkamp, E., Schwendenmann, L., Guimaraes, B.R., Paixao, R.K., Ruivo, M., da Costa, L., Carlos, A., Meir, P., 2007. Effects of an induced drought on soil carbon dioxide (CO₂) efflux and soil CO₂ production in an Eastern Amazonian rainforest, Brazil. *Global Change Biol* 13: 2218–2229.
- Spohn, M., Chodak, M., 2015. Microbial respiration per unit biomass increases with carbon-to-nutrient ratios in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 81: 128–133.
- Stokland, J.N., J. Siitonen, J., Jonsson, B.J., 2012. *Biodiversity in Dead Wood*. Cambridge University Press, Cambridge, Online ISBN: 9781139025843.

- Strickland, M.S., Rousk, J., 2010. Considering fungal: Bacterial dominance in soils. Methods, controls, and ecosystem implications. *Soil Biology Biochemistry* 42: 1385–1395.
- Šnajdr, J., Valášková, V., Merhautová, V., Herinková, J., Cajthaml, T., Baldrian, P., 2008. Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2068–2075.
- Tarnocai, C., Canadell, J.G., Schuur, E.A.G., Kuhry, P., Mazhitova, G., Zimov, S., 2009. Soil organic carbon pools in the northern circumpolar permafrost region. *Global Biogeochemical Cycles* 23: [GB2023].
- Thompson, R.M., Townsend, C.R., Craw, D., Frew, R., Riley, R., 2001. Further links from rocks to plants. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 543.
- Torres, P.A., Abril, A.B., Bucher, E.H., 2005. Microbial succession in litter decomposition in the semi-arid Chaco woodland. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 49–54.
- Tuomela, M., Vikman, M., Hatakka, A., Itävaara, M., 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: A review. *Bioresour. Technol.* 72: 169–183.
- 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 Biology and Biochemistry* 84: 53–64.
- Vance, E.D., Brookes P.C., Jenkinson D. S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 703–707.
- Vanhala, P., Bergströma, I., Haaspurob, T., Kortelainen, P., Holmberga, M., Forsiusa, M., 2016. Boreal forests can have a remarkable role in reducing greenhouse gas emissions locally: Land use-related and anthropogenic greenhouse gas emissions and sinks at the municipal level. *Science of The Total Environment* 557: 51–57.
- Verhoef, A., Allen, S.J., De Bruin, H.A., Jacobs, C.M., Heusinkveld, B.G., 1996. Fluxes of carbon dioxide and water vapour from a Sahelian savanna. *Agric. For. Meteorol.*, 80: 231–248.
- Vindušková, O., Frouz, J., 2013. Soil carbon accumulation after open-cast coal and oilshale mining in Northern Hemisphere: a quantitative review. *EnvironmentalEarth Sciences* 69, 1685–1698.
- Vitousek, P. M., H. A. Mooney, J. Lubchenco, a J. M. Melillo. 1997. Human domination of Earth's ecosystems. *Science* 277: 494–499.
- Wall, D.H., Bradford, M.A., St John, M.G., Trofymow, J.A., Behan-Pelletier, V., et al., 2008 Global decomposition experiment shows soil animal impacts on decomposition are climate-dependent. *Glob. Chang. Biol.* 14: 2661–2677.
- Wang, X.W., Li, X., Hu, Y., Lü, J., Sun, J., Li, Z., He, H.S., 2010. Potential carbon mineralisation of permafrost peatlands in Great Hing'an Mountains. *China. Wetlands* 30: 747–756.

- Wang, X., Liu, L.L., Piao, S.L., Janssens, I.A., Tang, J.W., Liu, W.X., Chi, Y., Wang, J., Xu, S., 2014. Soil respiration under climate warming: differential response of heterotrophic and autotrophic respiration. *Global Change Biol* 20: 3229–3237.
- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Cornmeuax, C., Freitag, T., Guillaumaud, N., Le Roux, X., 2006. Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environ. Microbiol* 8: 2162–2169.
- Whitworth, K.L., Baldwin, D.S., Kerr, J.L., 2014. The effect of temperature on leaching and subsequent decomposition of dissolved carbon from inundated floodplain litter: implications for the generation of hypoxic blackwater in lowland floodplain rivers. *Chemistry and Ecology* 30: 491–500.
- Wohl, D.L., Satyam, A., Gladstone, J.R., 2004. Functional redundancy supports biodiversity and ecosystem function in a closed and constant environment. *Ecology* 85: 1534–1540.
- Yates, G.T., Smotzer, T., 2007. On the lag phase and initial decline of microbial growth curves. *Journal of Theoretical Biology* 244: 511–517.
- Zak, D.R., Pregitzer, K.S., Curtis, P.S., Holmes, W.E., 2000. Atmospheric CO₂ and the Composition and Function of Soil Microbial Communities. *Ecological Applications* 10: 47–59.
- Zhang, D., Dafeng, H., Yiqi, L., Zhou, G., 2008. Rates of litter decomposition in terrestrial ecosystems: global patterns and controlling factors. *Journal of Plant Ecology* 1: 85–93.
- Zhang, F., Zhang, Q., 2016. Microbial diversity limits soil heterotrophic respiration and mitigates the respiration response to moisture increase. *Soil Biology and Biochemistry* 98: 180–185.
- Zimmermann, W., 1990. Degradation of lignin by bacteria. *J. Biotechnol.* 13: 119–130.