

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



**Aktivita fenoloxidáz a peroxidáz v opadech jehličnatého lesa
v povodí Plešného a Čertova jezera**

Bakalářská práce 2008

**Vypracovala: Markéta Applová
Vedoucí práce: Jiří Bárta, PhD.**

Applová, M., 2008. Aktivita fenoloxidáz a peroxidáz v opadech jehličnatého lesa v povodí Plešného a Čertova jezera [Activity of phenoloxidases and peroxidases in the litter of spruce forest in Plešné and Čertovo lake watersheds. Bc. Thesis, in Czech] - 38 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The aim of the study was to determine the activity of phenoloxidases and peroxidases in three dominating litter samples (*Vaccinium myrtillus*, *Calamagrostis villosa* and *Picea abies*) from Plešné and Čertovo lake watersheds.

High activity of lignin-degrading enzymes was detected in litter incubated at 0°C. Activity of enzymes was in general higher at 10°C but the difference was not significant compared to 0°C. In Plešné Lake watershed high amount of phenolic compounds negatively influenced the activity of enzymes compared to Čertovo Lake watershed, where the effect of phenolic compounds was opposite. The highest activities of the enzymes were found in the *Calamagrostis villosa* litter from Plešné Lake watershed and in the litter of spruce needles from Čertovo lake watershed.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury a rad školitele.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 30.4.2008

.....

Poděkování:

Nejdříve bych chtěla poděkovat svému školiteli Jirkovi Bártovi za veškerou pomoc, rady a velkou trpělivost, kterou se mnou měl a doufám, že mít ještě bude. Danovi Vaňkovi bych chtěla poděkovat za poskytování cenných rad ohledně práce v laboratoři a za trpělivost při zodpovídání mých zvědavých otázek. Paní Haně Šantrůčkové bych chtěla poděkovat za mnohé důležité rady. Jirkovi Kaňovi, Tomáši Pickovi, paní Říhové a ostatním, kteří prováděli některé analýzy, bych chtěla poděkovat za jejich provedení.

Všem, včetně paní uklízečky, bych chtěla poděkovat za odemykání dveří od laboratoří. Všem z laboratoří, ve kterých jsem se vyskytovala, bych chtěla poděkovat za příjemné přátelské prostředí a studentům ze studentské laboratoře za poskytnutí počítače.

Zvláštní dík patří starším přátelům, kteří mě zásobovali svými zkušenostmi se psaním diplomek.

V poslední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za jejich podporu.

Všem, kterým jsem zapoměla poděkovat, se omlouvám a činím tak dodatečně.

Obsah

1. Úvod.....	2
2. Literární rešerše.....	3
2.1. Složení rostlinného opadu	3
2.2. Faktory ovlivňující dekompozici rostlinného opadu.....	4
2.2.1. Vliv složení opadu.....	4
2.2.2. Vliv poměru C:N.....	5
2.2.3. Vliv fosforu v rostlinném opadu	6
2.2.4. Vliv fenolických látek v rostlinném opadu	6
2.2.4. Vliv depozic dusíku.....	7
2.2.5. Vliv teploty.....	8
2.3. Vyplavování živin z povodí	9
2.4. Mikroorganismy rozkládající fenolické látky a jejich ligninolytický enzymatický aparát ...	9
3. Materiál a metody.....	11
3.1. Studijní plochy	11
3.1.1. Výzkumná plocha Plešné jezero (PL)	11
3.1.2. Výzkumná plocha Čertovo jezero (CT)	12
3.2. Odběr materiálu a založení pokusu	12
3.3. Laboratorní analýzy.....	12
3.3.1. Počáteční a koncové analýzy opadu.....	12
3.3.2. Stanovení aktivit fenoloxidáz (PheOx) a peroxidáz (PerOx).....	15
3.4. Statistické zpracování dat.....	16
4. Výsledky.....	17
4.1. Aktivita fenoloxidáz a peroxidáz	17
4.2. Celkové aktivity za dobu inkubace	21
4.3. Počáteční a konečná analýza kvality opadu	23
4.4. Vztah mezi aktivitami enzymů a počátečním obsahem fenolických látek v opadu	26
5. Diskuze.....	28
5.1. Antropogenní vlivy	28
5.2. Aktivita fenoloxidáz a peroxidáz	29
5.3. Vliv teploty.....	30
5.4. Vliv kvality opadu	30
5.5. Vliv povodí.....	32
5.6. Další sledování aktivit ligninolytických enzymů	32
6. Závěr.....	33
7. Literatura	34

1. Úvod

V druhé polovině 20. století vlivem vysokých atmosférických depozic síranových (SO_4^{2-}) a dusičnanových (NO_3^-) aniontů docházelo ve střední Evropě k výrazné acidifikaci půd smrkových horských lesů (Kopáček and Veselý, 2005). K podobnému jevu došlo také v půdách šumavského smrkového lesa. Se zvýšenou acidifikací souvisí uvolňování a vyplavování bazických kationtů (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+}) a toxických forem Al^{3+} (Pawłowski, 1997). Po snížení depozic v devadesátých letech 20. století došlo ke snížení množství vyplavovaných SO_4^{2-} aniontů (Prechtel et al., 2001), ovšem vyplavování NO_3^- je stále na vysoké úrovni. Ze šumavských lesů se tedy stále vyplavují důležité živiny.

Rostlinnou dominantu Šumavy tvoří především smrkové monokulturální porosty. Vlivem vyplavování esenciálních živin a působením dalších faktorů jako je vysoká toxicita Al^{3+} iontů se smrkové lesy Šumavy stávají náchylnějšími a celkově se oslabují. V případě smrkového lesa v povodí Plešného jezera se toto oslabení projevilo kůrovcovou kalamitou, která se zvolna rozšiřuje i do smrkových lesů v povodí Čertova jezera. Po odumření lesa dochází ke zvýšení spadu smrkového jehličí, prosvětlování ploch a zarůstání podrostem, ve kterém v těchto povodích dominuje kapradí, borůvčí a trávy (převážně třtina chloupkatá (*Calamagrostis villosa*) a metlička křivolaká (*Avenella flexuosa*)). Dochází tak ke změně v kvalitě opadu, která se projevuje v rozdílné rychlosti dekompozice.

Tato práce studuje rychlost rozkladu dominantních druhů opadu smrkového lesa v povodí Plešného a Čertova jezera, sledováním aktivity hlavních ligninolytických enzymů (fenoloxidáz a peroxidáz) v závislosti na počátečním složení opadu a teplotě.

Hypotézy:

- Opad s vyšším obsahem ligninu/fenolických látek bude mít vyšší aktivitu ligninolytických enzymů.
- Aktivita ligninolytických enzymů se bude v průběhu inkubace opadu zvyšovat.
- Při vyšší inkubační teplotě bude aktivita ligninolytických enzymů vyšší.

2. Literární rešerše

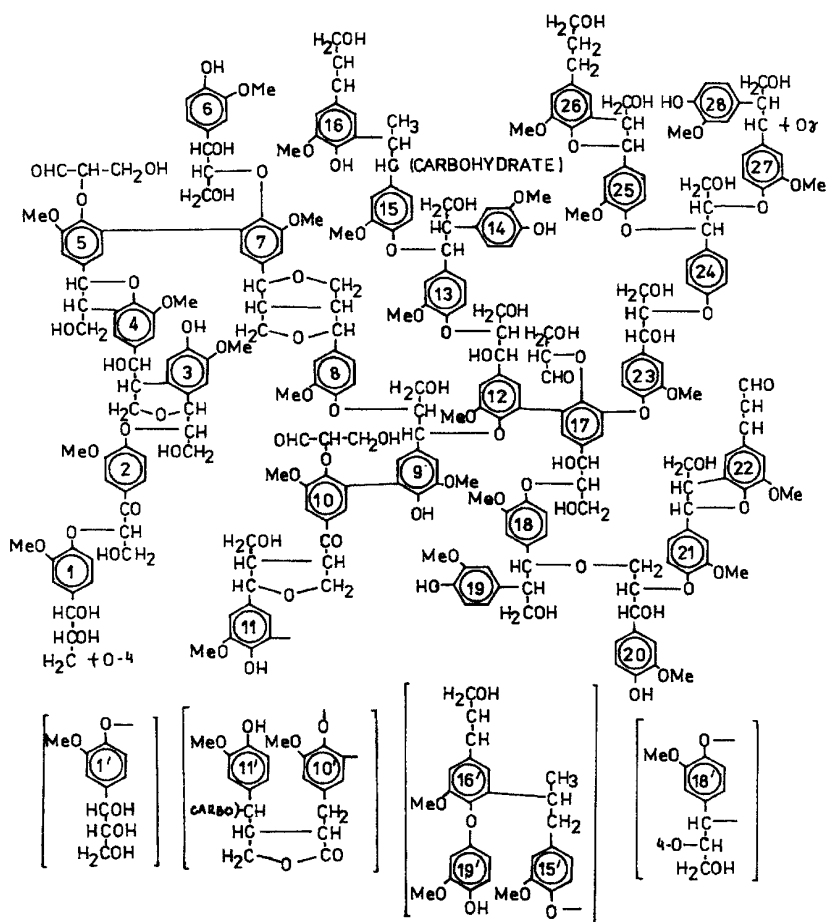
2.1. Složení rostlinného opadu

Mezi nejvíce zastoupené prvky v rostlinné sušině patří uhlík (45%), kyslík (45%), vodík (6%) a dusík (1,5%). Ze suché hmotnosti představuje cca 45% celulóza, dále tvoří 20% lignin, 18% hemicelulóza, 8% proteiny, 5% cukry a škroby, 2% tuky a vosky.

V opadech smrkového lesa jsou spolu s ligninem ve velké míře zastoupeny i fenolické látky. Vznikají jako sekundární metabolity rostlin. Dělí se do dvou základních skupin: nízkomolekulární, ve vodě rozpustné (deriváty benzenu, kyseliny benzoové, skořicové, flavonoidy, antokyany, kumariny) a vysokomolekulární, ve vodě nerozpustné (trísloviny a lignin). Obsah fenolických látek se u jednotlivých druhů opadů zásadně liší. Mezi opady s vysokým obsahem fenolických látek se řadí zástupci s obsahem fenolických látek nad 23 % (Brady and Weil, 2002). Vysoký obsah fenolických látek má smrkové jehličí a listy borůvky (*Vaccinium myrtillus*). U smrkového jehličí je z fenolických látek nejvíce zastoupen lignin, kdežto u borůvky spíše nízkomolekulární fenolické látky. Trávy řadíme obecně mezi druhy s nízkým obsahem fenolických látek.

Lignin je nejrozšířenějším zástupcem vysokomolekulárních polyfenolických látek. Jeho molekulová hmotnost se pohybuje od deseti tisíc po více než milion g/mol (Killham, 1994). Zajišťuje větší pevnost sekundární buněčné stěny, především vodivých a podpůrných pletiv. Nalezneme ho ale i v primární buněčné stěně (Procházka et al., 1998), kde se ukládá do mikropilárních prostor (Votrubová, 1996). V rostlině funguje jako výztuž pro celulózu a hemicelulózu, jejichž vlákna jsou během dekompozice uvolňována a mohou být napadána celulólytickými organismy (Killham, 1994).

Struktura ligninu je velice složitá. Obecně je založena na phenylpropanoidní jednotce, která se skládá z aromatického jádra a tříuhlíkatého vedlejšího řetězce. Poměr základních stavebních jednotek bývá druhově specifický (Paul and Clark, 1996; Votrubová, 1996; Lenowicz et al., 1999).



Obr. 1: Model struktury ligninu měkkého dřeva (Leonowicz et al., 1999)

2.2. Faktory ovlivňující dekompozici rostlinného opadu

Při dekompozici rostlinného opadu hraje klíčovou roli jeho počáteční složení (Berg, 2000; Coûteaux et al., 1995). Jednotlivé složky rostlinného opadu se nerozkládají zároveň a se stejnou intenzitou. Pokud jsou přítomny snadno dostupné látky (cukry, škrob, jednoduché proteiny), probíhá dekompozice v počátečních fázích velice rychle. V pozdějších fázích je dekompozice výrazně pomalejší, jelikož se rozkládají vysokomolekulární látky, jako jsou polyfenolické látky a lignin (Paul and Clark, 1996).

2.2.1. Vliv složení opadu

Z hlediska složení je nejdůležitější poměrné zastoupení dusíku, fosforu a fenolických látek. Zastoupení všech těchto látek se během rozkladu opadu mění: koncentrace dusíku i fosforu v opadu se v průběhu dekompozice zvyšuje (Berg and Laskowski, 2006; Kainulainen and

Holopainen, 2002). V počátečních stádiích dekompozice opadu bývá dusík i fosfor imobilizován v nových mikrobiálních buňkách, zatímco uhlík je prodýchán až na CO₂, a proto se poměry C:N a C:P snižují (Berg and Laskowski, 2006; Hyvönen et al., 2000; Ågren et al., 2001). Po první fázi rozkladu (12 – 18 měsíců) následuje období poklesu obsahu dusíku a fosforu. Tato změna je spojována s posunem společenstva mikroorganismů limitovaného nedostatkem živin ke společenstvu limitovanému nedostatkem energie (Staaf, 1980).

Novější studie dále ukazují, že množství N a P spolu úzce souvisejí a společně působí na aktivitu mikrobiálního společenstva, které opad rozkládá (Amador and Jones, 1993).

2.2.2. Vliv poměru C:N

Poměr C:N se v rostlinných pletivech pohybuje od 10:1 až k 600:1. Hodnota poměru C:N 30 bývá označována jako kritická hodnota. To znamená, že v opadu s vyšším poměrem C:N než 30 je dusíku nedostatek. Pokud je tento poměr v opadu nižší než 30, může dojít k vyplavování dusíku (Brady and Weil, 2002). Tuto hypotézu však ve své práci vyvracejí Moore et al. (2006). Zjistili, že obecně udávaná kritická hodnota zastoupení dusíku, 30:1 (Brady and Weil, 2002), neplatí vždy; kritické hodnoty C:N jsou variabilní a závisí na typu opadu: u opadů s vysokým zastoupením ligninu jsou vyšší než v opadech s nízkým obsahem. To znamená, že na rozklad opadu s vyšším zastoupením fenolických látek je potřeba méně dusíku, zřejmě vlivem specifického adaptovaného mikrobiálního společenstva (Bárta, ústní sdělení). Neprokázalo se, že by se dusík na rozdíl od fosforu při vysokém množství ztrácel a při nízkém byl zadržován (Moore et al., 2006).

Biomasa většiny hub a bakterií má poměr C:N od 12:1 do 10:1 (Griffin, 1972). Rozdíl mezi obsahem dusíku v opadu a mikrobiální biomase může indikovat nadbytek nebo deficit v potravě, který může vést k silné kompetici půdních saprofytických mikroorganismů o tento prvek. V důsledku to může vést k celkovému zpomalení dekompozice (Brady and Weil, 2002). Houby obecně mají ve své biomase dusíku méně než bakterie, a tak ho i méně vyžadují v potravě (Griffin, 1972). Byly popsány druhy hub, které jsou adaptovány na rozklad opadů s velmi nízkým obsahem dusíku, což je oproti ostatním druhům zvýhodňuje (Griffin, 1972).

Poměr C:N opadů smrku a rostlinných druhů podrostu se liší. Poměr C:N smrkového jehličí (*Picea abies*) se pohybuje mezi 30:1 a 50:1 (Lorenz et al., 2000). U jehlic smrku černého (*Picea mariana*) byl určen poměr až k 68:1, u opadu kapradě (hasivka orličí, *Pteridium*

aquilinum) 53:1 a trávy (kostřava, *Festuca hali*) 62:1 (Moore et al., 2006). U listů borůvky (*Vaccinium myrtillus*) je tento poměr 22 – 24:1 (Gallet and Lebreton, 1995).

2.2.3. Vliv fosforu v rostlinném opadu

U fosforu, stejně jako u poměru C:N, neexistuje jednotný názor na jeho vliv při dekompozici opadu. Podle Paula a Clarka (1996) je fosfor obecně v biologických systémech dominantním prvkem, který kontroluje imobilizaci C a N. Naopak McGroddy et al. (2004) nenašli souvislost mezi rychlostí rozkladu opadu a množstvím fosforu v organické hmotě (v půdě nížinného tropického lesa). Moore et al. (2006) se stejně jako u poměru C:N zabývali stanovením kritických hodnot poměru C:P. Zjistili, že uvolňování fosforu a poměr C:P na začátku rozkladu je více variabilní než u dusíku a závisí na typu opadu a na počátečním množství fosforu v opadu. Také kritické hodnoty poměru C:P se mění v závislosti na typu opadu. Zatímco Moore et al. (2006) uvádějí jako kritickou hodnotu poměru C:P 700:1, Šantrůčková (2001) udává, že k imobilizaci fosforu dochází, pokud je poměr C:P větší než 300:1, a k mineralizaci a následnému vyplavování, pokud je tento poměr menší než 200:1.

Poměry C:P opadů rostlinných druhů podobných zkoumaným druhům smrkového lesa jsou vyšší než tyto hodnoty. Poměr C:P opadu hasivky orličí (*Pteridium aquilinum*) je 702:1, trávy (kostřava, *Festuca hali*) 755:1 a jehlic smrku černého (*Picea mariana*) 627:1 (Moore et al., 2006).

2.2.4. Vliv fenolických látek v rostlinném opadu

Lignin je jedna z nejhůře rozložitelných složek rostlinné nekromasy, a to zejména kvůli své složité struktuře. Vyšší koncentrace ligninu v opadu zpomaluje dekompozici (Preston and Trofymow, 2000; Berg, 2000). Vliv ligninu na dekompozici rostlinné organické hmoty není po celou dobu rozkladu stejný, významnější je v její druhé fázi (Berg, 2000; Rutigliano et al., 1996), kdy jsou vyčerpány snadno rozložitelné organické látky. Přesto dekompozice ligninu může probíhat hned v prvních fázích rozkladu opadu (Rutigliano et al., 1996).

V prvních fázích dekompozice se v opadu rovněž snižuje množství taninů a ostatních nízkomolekulárních fenolických látek. Důvodem může být vyplavování (Schofield et al., 1998), ale i změny chemické struktury látek v opadu – z fenolických látek vznikají jiné, podobně složité,

látky (Gallet and Lebreton, 1995). Relativní zastoupení fenolických látek se také mění z důvodu rozkladu ostatní hmoty (Gallet and Lebreton, 1995).

Jedním z měřítek zastoupení a dekompozice ligninu v opadu je poměr lignin:N. Se zvyšujícím se poměrem lignin:N čistá mineralizace dusíku v lesních ekosystémech rychle klesá. Tento poměr je dobrým prediktorem mineralizace dusíku v lesích (Scott and Binkley, 1997).

2.2.4. Vliv depozic dusíku

Do prostředí se z atmosféry dostává dusík hlavně ve formě amoniaku, a nitrátů jako kyselina dusičná. Ta způsobuje okyselení půdy, vytěsňování bazických kationtů a oslabování porostů (Brady and Weil, 2002).

Při posuzování vlivu na respiraci mikroorganismů je nejdůležitější vyváženost přísunu dusíku a uhlíku. Proto také depozice dusíku mají zřejmě největší vliv na zvýšení mikrobiální aktivity tam, kde je nadbytek labilního uhlíku (Vance and Chapin, 2001).

Výsledek interakce mikrobiální aktivity a depozic dusíku však zřejmě záleží na více faktorech: na obsahu ligninu v ekosystému, ve kterém se opad rozkládá (Waldrop et al., 2004), na formě dodávaného dusíku (Lucas et al., 2007; Niladevi and Prema, 2008), na jeho množství (Waldrop et al., 2004) a na vlastnostech půdní organické hmoty (Vance and Chapin, 2001). Binkley a Högberg (1997) tvrdí, že přídatky dusíku mají tak významný vliv na dekompozici organické hmoty, že pokud nepřidáme dusík, žádná jiná přidaná živina nemá odpovídající odezvu. V tomto případě zřejmě platí, že každá živina se může stát v případě nedostatku limitující (Amador and Jones, 1993).

Výše zmíněné faktory mohou být důvodem, proč se v hodnocení vlivu zvýšených depozic dusíku na rozklad organické hmoty různí autoři příliš neshodují. Amador a Jones (1993) zjistili, že přidavek amoniaku v jakémkoli množství snižuje půdní respiraci, přičemž čím větší množství amoniaku bylo přidáváno, tím větší útlum byl pozorován. Vysvětlením může být vliv asimilace amonného dusíku, při kterém se snižuje pH půdy. Ågren et al. (2001) dodávají, že přidavek dusíku snižuje růstovou rychlost rozkladačů. Mikrobiální aktivita však vysvětluje změny v cyklu dusíku více než mikrobiální biomasa (Vance and Chapin, 2001).

Na produkci ligninolytických enzymů však mají depozice dusíku negativní vliv, protože tyto enzymy jsou produkovány převážně houbami, jejichž aktivní biomasa je snižována přídatky

dusíku (Frey et al., 2004; Berg, 2000), a protože nízkomolekulární dusíkaté sloučeniny (NH_4^+) omezují tvorbu ligninolytických enzymů některými druhy hub (Keyser et al., 1978).

Depozice nitrátů navíc snižují pH půdy. Zatímco některé druhy hub jsou vůči vyšší kyselosti odolné, jiné mohou být takovými podmínkami potlačeny (Hawker, 1950). Tento vliv ale Amador a Jones (1993) popírají a udávají, že rozdíly v pH jsou příliš malé, aby byly příčinou útlumu. Nadbytek dusíku podle nich stimuluje mikrobiální procesy, které amoniak spotřebovávají, jako je autotrofní nitrifikace.

2.2.5. Vliv teploty

Teplota půdy je do značné míry ovlivněná přítomností či nepřítomností vegetace, vlhkostí půdy a hloubkou, ve které je měřena. Povrch půdy (opadová vrstva) se obecně vyznačuje největším kolísáním teplot. Rozdíly mezi teplotami na povrchu půdy v rámci jednoho dne mohou být v mírném klimatu až 35°C (Griffin, 1972). Významnou roli zde hraje zastínění.

Mikroorganismy se liší rozmezím teplot, ve kterém žijí. Vzhledem k horským podmínkám na Šumavě, se dá předpokládat výskyt pouze mezofilních nebo psychofilních mikroorganismů. Ty mohou růst v půdě i při teplotách nižších než 0°C díky tomu, že bod mrznutí půdního roztoku je v průměru okolo -5°C (to je způsobeno koncentrací solí v půdním roztoku a vazbou vody na povrchu pevných částic), (Šantrůčková, 2001) a tvorbě protektivních enzymů, které umožňují biologickou funkci i při nízkých teplotách (Panicker et al., 2006).

Teplota významně ovlivňuje biologickou aktivitu mikroorganismů, tedy i produkci extracelulárních enzymů hub a rychlost rozkladu dřevní hmoty. Aktivita ligninolytických, celulólytických a hemicelulólytických enzymů se zvyšuje s rostoucí teplotou prostředí. Jakmile však teplota přesáhne optimum, aktivita se snižuje (Ceylan et al., 2008; Niladevi and Prema, 2008; Baborová et al., 2006). Teplotní podmínky na studijních plochách však optimální teploty většiny ligninolytických hub nepřekračují ani nedosahují.

Teplota, popřípadě klimatické podmínky, a kvalita opadu (zastoupení fenolických látek) jsou dva hlavní faktory ovlivňující rychlost rozkladu rostlinného opadu. Rozklad opadu má dvě fáze. První, během níž jsou rozkládány především snadno rozložitelné součásti, a druhou, kdy jsou snadno dostupné zdroje energie převážně vyčerpány a nastupuje rozklad hůře rozložitelných sloučenin. Rychlost rozkladu v obou těchto fázích je ovlivňována různou měrou oběma faktory. Berg (2000) tvrdil, že v první fázi má větší vliv klima. K tomu se přiklání Lorenz et al. (2000),

kteří zaznamenali v první fázi rozkladu smrkového opadu velký vliv podnebí. Později Berg a Laskowski (2006) toto popírají a prohlašují, že klimatické faktory nemají v první fázi vliv.

2.3. Vyplavování živin z povodí

Z půdy se vyplavuje organický uhlík, amoniak, nitráty, hlinité kationty, hořečnaté a vápenaté kationty, síra a fosfor.

Z dusíkatých sloučenin se vyplavují především nitráty a amoniak. Vyplavování nitrátů souvisí s mineralizací dusíku, obhospodařováním půdy: holosečné vykácení snižuje asimilaci a zvyšuje odnos (Šantrůčková, 2001; Brady and Weil, 2002), méně pak s přidavkem dusíku z atmosférických depozic a hnojení (Andersson et al., 2002). Podle Cortiny et al. (1995) nemá vyplavování dusíku vždy sezónní charakter, ale závisí především na průběhu srážek. Zatímco nitráty se vyplavovaly po celou dobu sledování přibližně stejnou měrou, organický dusík a amonné ionty se vyplavovaly nejvíce v letním období. Vyplavování nitrátů zvyšuje odnos dalších kationtů, hlavně Ca^{2+} a Mg^{2+} (Brady and Weil, 2002).

Také fosfor se vyplavuje v organické rozpuštěné podobě (DOP). Jeho mobilita závisí na několika faktorech: na obsahu jílových částic (v jílovitých půdách je více zadržován), na aniontové výměnné kapacitě (vyplavuje se v půdách s nižší kapacitou), na pH (je zadržován v půdách s velmi nízkým a vysokým pH) a na kvalitě půdní organické hmoty (Brady and Weil, 2002). Bylo zjištěno, že v povodí Plešného jezera je fosfor mobilnější a je více vyplavován než v povodí Čertova jezera. Kromě geologických poměrů může k tomuto jevu významně přispět mikrobiální transformace fosforu v povodí Plešného jezera a jeho enzymatická hydrolýza (Šantrůčková et al., 2004).

Dalšími látkami, o které je opad ochuzován, jsou ve vodě rozpustné nízkomolekulární fenolické látky (Schofield et al., 1998; Gallet and Lebreton, 1995). U jehličí může být vyplavování omezeno přítomností odolné kutikuly (Gallet and Lebreton, 1995).

2.4. Mikroorganismy rozkládající fenolické látky a jejich ligninolytický enzymatický aparát

Dominantními dekompozitory fenolických látek jsou houby (Paul and Clark, 1996). Houby jsou schopny využít fenolické látky jako zdroj uhlíku. Bakterie mají vzhledem k vysoké

koncentraci uhlíku ve fenolických látkách tuto schopnost omezenou (Souto et al., 2000). Houby rozkládající lignin lze, podle barvy konečného produktu rozkladu, rozdělit do tří skupin: „white rot Fungi“ (WR houby; produktem rozkladu je bílá celulóza), „brown rot Fungi“ (BR houby; produktem rozkladu jsou hnědé fenolické látky) a „soft rot Fungi“ (SR houby); (Griffin, 1994).

WR houby jsou asi jako jediné schopné kompletně mineralizovat lignin. Patří mezi ně zástupci třídy *Basidiomycetes* a několik zástupců třídy *Ascomycetes*. Mezi WR houby můžeme dále řadit například rody *Ganoderma*, *Trametes* a *Phellinus* (Killham, 1994).

Fenolické látky jsou v přírodě rozkládány extracelulárními enzymy, z nichž jsou nejdůležitější fenoloxidázy a peroxidázy. Jednotlivé druhy hub se liší druhy enzymů, které produkují. Všechny enzymy produkované WR houbami lze rozdělit do tří kategorií. Do první kategorie zahrnujeme enzymy rozkládající celulózu, hemicelulózu i lignin. Do rozkladu ligninu se zapojují fenoloxidázy, mezi něž se řadí lignin peroxidáza (LiP; EC 1.11.1.14), Mn-peroxidáza (MnP; EC 1.11.1.13), lakáza (LAC; EC 1.10.3.2), HLP peroxidáza (HLP; EC 1.11.1.7), a dioxygenázy. Do druhé kategorie řadíme enzymy, které spolupracují s předešlými enzymy, ale nejsou schopné lignin rozkládat samy o sobě. Tvoří je především superoxid dismutáza a glyoxal oxidáza. Enzymy z třetí kategorie hrají klíčovou roli v kombinování metabolických řetězců během rozkladu dřeva a patří mezi ně například arylalkohol oxidázy (Leonowicz et al., 1999).

Lignin peroxidáza (EC 1.11.1.14) je extracelulární enzym vyžadující peroxid vodíku (Griffin, 1994). Katalyzuje několik oxidací vedlejších uhlovodíkových řetězců, štěpí vazby mezi uhlíky ve vedlejších řetězcích ligninu, štěpí aromatická jádra, oxiduje benzylalkoholy na aldehydy. Mn-peroxidáza (EC 1.11.1.13) je rovněž závislá na přítomnosti peroxidu vodíku a navíc vyžaduje přítomnost manganatých kationtů.

BR houby rozkládají hlavně celulózu, hemicelulózy a v omezené míře lignin. Jsou to jedinci třídy *Basidiomycetes*. např. *Coniophora puteana* (Venäläinen et al., 2004), dále rody *Fomitopsis*, *Postia* a *Gloeophyllus* (Killham, 1994). Různé schopnosti rozkladu ligninu mají SR houby, které najdeme v třídách *Ascomycetes* a *Deuteromycetes* (Griffin, 1994).

Jen menší množství specializovaných druhů bakterií v půdě je schopno rozkládat komplexní, těžko rozložitelné látky. Mezi ně patří druhy, které produkují hydrolytické enzymy, působící při rozkladu ligninu nebo i taninů, například rody *Bacillus*, *Pseudomonas* a *Clostridium* (Killham, 1994). Jiné bakterie mohou hrát významnou roli v mineralizaci produktů rozkladu houbami (Rüttimann et al., 1991).

3. Materiál a metody

3.1. Studijní plochy

Studované lokality se nalézají na území Národního parku Šumava. Šumava patří mezi nejstarší a nejrozsáhlejší pohoří ve střední Evropě. Vznikla v třetihorách při alpinském vrásnění. Z geologického hlediska šumavskou oblast budují silně přeměněné horniny a hlubinné vyvřeliny moldanubika a moldanubického plutonu. Uplatňují se zde vesměs substráty kyselé, především pararuly, migmatity, granitoidy a svory (Ložek, 2001). Klimaticky patří Šumava do oblastí chladné - rozkládá se v přechodném středoevropském klimatu mírného pásma. Uplatňují se zde vlivy jak klimatu oceánského, tak i kontinentálního. Teplota půdy v roce 2001 a 2002 se pohybovala kolem 0°C v zimě a mezi 10 a 12°C v létě. Nejnižší průměrné roční srážky činí 800 - 900 mm na severovýchodních závětrných svazích oblasti (ta je také o ca 0,5 - 0,8°C teplejší proti centrální části) a maxima 1550 mm dosahují srážky při návětrí podél státní hranice. Šumava náleží do regionu horských podzolů subregionem, ve kterém mezi doprovodnými složkami převažují hydromorfní půdy (Petruš and Neuhäuslová, 2001). Nejvýznamnějšími půdními jednotkami zde tedy jsou: podzol (*Podzol*), hnědá půda kyselá (*Cambisol*) a rezivá půda (*Spodosystric Cambisol*), (klasifikace dle ČGÚ, v závorce FAO). Na Šumavě se nachází celkem osm jezer ledovcového původu, z nichž pět leží na území České republiky, jsou to jezera Plešné, Čertovo, Černé, Prášilské a Laka. Předmětem mého výzkumu byl rozklad OH v povodí jezer Plešného a Čertova.

3.1.1. Výzkumná plocha Plešné jezero (PL)

Plešné jezero se nachází v nadmořské výšce 1090 m.n.m., přímo pod vrcholem Plechý (1378 m n.m.). Povodí PL pokrývá plochu 66,7 ha včetně plochy 7,5 ha jezera samotného (Švambers, 1939, in Kopáček et al., 2002, a). Skalní podloží tvoří granit (Veselý, 1994). Zhruba 90% povodí PL pokrývá asi 150 let starý smrko - bukový les s minoritní příměsí jasanu. Většinou se řadí půdy v povodí PL do kategorie kyselých podzolů. Profil je tvořen opadovou vrstvou O, svrchním organickým horizontem A (nebo také humusový H horizont), ochuzeným šedavým E horizontem, pod nímž se nachází obohacený rezavohnědý horizont B (Kopáček et al., 2002, a).

3.1.2. Výzkumná plocha Čertovo jezero (CT)

Čertovo jezero se nachází v nadmořské výšce 1030 m n.m., na úpatí Jezerní hory (1343 m n.m.). Povodí Čertova jezera pokrývá plochu 87,5 ha včetně plochy jezera 10,3 ha. (Švampera, 1939, in Kopáček et al., 2002, a). Skalní podloží jezera tvoří svor (muskovitická rula), s intruzí křemence (Veselý, 1994). V současnosti je okolí Čertova jezera zalesněno 90 - 150ti letým sekundárním smrkovým porostem s řídkou příměsí jedle a buku. Povodí CT tvoří rezivá půda (58%), podzol (21%) a organicky bohatá nevyvinutá půda (17%); (Kopáček et al., 2002, b).

3.2. Odběr materiálu a založení pokusu

Na podzim roku 2007 byl odebrán rostlinný opad dvou dominantních rostlinných druhů podrostu (tráva *Calamagrostis villosa* a borůvka *Vaccinium myrtillus*) a opad smrku (*Picea abies*). Opad byl uchováván zmražený až do založení pokusu v prosinci 2007. Pro inkubaci byly zvoleny dvě teploty: 0 a 10°C.

Laboratorní pokusy proběhly za konstantní vlhkosti a teploty v laboratořích Katedry biologie ekosystémů Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Opad byl po rozmražení namočen na jednu hodinu do destilované vody a samotný navážen po 20g do vzduchotěsně uzavíratelných inkubačních lahví o objemu 1 L. Jehličí bylo nejdříve ostříháno z větví a pak namočeno. Inkubace probíhala v inkubátorech za teploty 0°C a 10°C. Od každé kombinace druhu opadu, teploty a lokality byla založena tři opakování.

3.3. Laboratorní analýzy

3.3.1. Počáteční a koncové analýzy opadu

Počáteční měření bylo provedeno z rozmraženého opadu a konečné po 70 dnech inkubace. U koncového měření byla zohledněna teplota, při které byl opad inkubován. Před založením pokusů byl u každého opadu a povodí stanoven celkový obsah uhlíku (C_{TOT}) a dusíku (N_{TOT}), extrahovatelného fosforu (P_{ox}) a celkových fenolických látek. Na konci inkubace byl v opadu určen C_{TOT} a N_{TOT} , obsah ve vodě extrahovatelného uhlíku a dusíku (C_{EXT} , N_{EXT}), obsah ve studené vodě extrahovatelného uhlíku a dusíku (C_{CW} a N_{CW}), obsah celkových fenolických látek a obsah extrahovatelného fosforu v oxalátu (P_{ox}).

Stanovení C_{TOT}, N_{TOT}

Celkový C a N byl analyzován v na vzduchu usušeném jemně namletém opadu. Pro určení C_{TOT} a N_{TOT} byl použit analyzátor prvků NC ThermoQuest, Germany.

Stanovení C_{EXT} a N_{EXT}

Pro určení ve vodě extrahovatelného C a N byly z opadů provedeny studenodvodné a horkovodné výluhy. K 3 g opadu bylo přidáno 30 ml destilované vody a necháno 30 minut třepat. Pak byl výluh slit, přefiltrován a zmražen. Mokrý opad byl zalit 50 ml destilované vody. Po 16 hodinách inkubace za teploty 79°C byl slit a přefiltrován horkovodný výluh a opět zmražen pro další analýzu. U každého vzorku byla provedena tři opakování.

Celkový C a N ve vodních extraktech byly poté změřeny na TOC/TN analyzátoru (SKALAR FORMACS HT).

Stanovení reaktivního fosforu v oxalátovém extraktu (P_{ox})

Extrakce byla provedena podle Cappa et al. (1987): k 1 g na vzduchu vysušeného nenamletého opadu bylo přidáno 20 ml extrakčního činidla (rozpusťlo se 16,1 g (COONH₄)₂ · H₂O a 10,9 g (COOH)₂ · 2H₂O ve 1000 ml destilované vody). U opadu trávy *Calamagrostis* a borůvky bylo použito dvojnásobné množství extrakčního činidla a naředění bylo zohledněno při výpočtu koncentrace. Vzorky byly třepány 120 minut ve tmě při konstantní teplotě 20°C. Extrakty a blank byly přefiltrovány přes skládaný filtrační papír. Analýza byla provedena podle Kopáčka et al. (2001): k 1 ml extraktu, standardu a blanku bylo přidáno 6 ml destilované vody, 2 ml 0,125M (NH₄)₄Mo₇O₂₄ · 4H₂O, 1 ml činidla B (0,53 g kyseliny askorbové bylo rozpuštěno ve 100 ml činidla A – Činidlo A bylo připraveno rozpuštěním 3 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O a 0,0725 g KSbO₃·C₄H₄O₆ v destilované vodě, přidalo se 35,25 ml koncentrované H₂SO₄ a doplnilo do 500 ml destilovanou vodou). Po 30 minutách byla změřena absorbance při 660 nm. U každého vzorku byla provedena tři opakování. Koncentrace vzorku byla odečtena z kalibrační křivky.

Výpočet množství reaktivního fosforu v opadu:

$$P_{ox} = ((Abs_{660} - A) / B) / s \quad [\mu g \cdot g^{-1}]$$

Abs₆₆₀ absorbance při vlnové délce 660 nm

A, B faktory kalibrační křivky

s sušina [g.g⁻¹]

Stanovení celkového obsahu fenolických látek

Pro stanovení dle Bärlochera a Graçy (2005) byl použit na vzduchu usušený umletý opad. K asi 100 mg takto upraveného opadu bylo přidáno po 5 ml 70% acetonu. Po 1 hodině extrakce při teplotě 4°C byly vzorky zcentrifugovány a bylo odebráno po 0,1 ml supernatantu a doplněno destilovanou vodou na 1 ml. Kalibrační křivka byla vytvořena z postupně naředěné taninové kyseliny v 70% acetonu. Další postup byl shodný pro vzorky i stanovení pro vytvoření kalibrační křivky. Bylo přidáno po 5 ml 2% Na₂CO₃, 5 minut po zamíchání bylo přidáno 0,5 ml činidla Folin-Ciocalteu a opět byly vzorky i stanovení pro vytvoření kalibrační křivky zamíchány. Po 120 minutách byla změřena absorbance při 760 nm. Celková koncentrace fenolických látek byla stanovena na základě kalibrační křivky vytvořené z různě koncentrované taninové kyseliny. U každého vzorku byla provedena tři opakování. Sušina byla určena navážením a úplným vysušením (14 hodin, 80°C) na vzduchu usušeného namletého opadu.

Zastoupení fenolických látek v 1 mg sušiny:

$$m = [(Abs_{760} - B) / A] / (2 \cdot s) \cdot 100 \quad [\%]$$

Abs₇₆₀ absorbance vzorku při vlnové délce 760 nm

A, B přepočítávací faktory kalibrační křivky

2 přepočet na 1 mg

s sušina [g.g⁻¹]

Všechny výsledky byly pomocí sušiny přepočteny na jednotku hmotnosti suché hmoty opadu.

Stanovení sušiny (s)

Suchá hmotnost (sušina) je bezrozměrné číslo, udávající podíl suchého rostlinného opadu na hmotnosti 1 g čerstvého vzorku. Obecně se určuje tak, že se nechá vysušit opad o předem známé hmotnosti do konstantní hmotnosti (14 hodin, 80°C), a zváží se. Sušina udává poměr hmotností po usušení a před usušením vzorku.

Sušina pro výpočet aktivit enzymů byla stanovována zároveň s přípravou homogenátu opadů. Homogenát, který byl připraven z naváženého množství opadu (přibližně 0,5 g), byl přefiltrován přes předem zvážené filtrační papíry. Ty byly vysušeny i se zachyceným opadem na předem zvážené hliníkové váženice do konstantní hmotnosti (14 hodin při 80°C). Po vychladnutí byla váženka s filtry a vzorkem opět zvážena.

Suchá hmotnost opadu s:

$$s = (m_s - m_v) / m_l$$

m_v	hmotnost váženky a filtračních papírů [g]
m_s	hmotnost váženky a filtračních papírů po vysušení se suchým opadem [g]
m_l	hmotnost naváženého vlhkého opadu [g]

3.3.2. Stanovení aktivit fenoloxidáz (PheOx) a peroxidáz (PerOx)

Spektrofotometrická metoda stanovení aktivit fenoloxidáz a peroxidáz podle Hendela et al. (2005) je založena na inkubaci vodního homogenátu opadu v acetátovém pufru, ke kterému se přidává aminokyselina L-DOPA. Ta slouží jako substrát pro fenoloxidázy a za přítomnosti peroxidu vodíku pro fenoloxidázy i peroxidázy. Aktivita peroxidáz se určí odečtením aktivity fenoloxidáz.

Pro přípravu homogenátu opadu ve vodě bylo odebíráno po 0,5 g směsného vzorku opadu, se zaznamenáním přesné hmotnosti. Opad byl zhomogenizován v 50 ml destilované vody a přefiltrován přes zvážený filtrační papír. Přefiltrovaný homogenát byl zmražen v plastových uzavíratelných zkumavkách uchováván při -20°C až do provedení analýzy.

Po rozmražení bylo přidáno k 1 ml homogenátu 1 ml 5mM roztoku L – DOPA v 50mM roztoku acetátového pufru o pH 5 (pH bylo navýšeno přidáním roztoku NaOH) pro stanovení fenoloxidáz a navíc 0,1 ml peroxidu vodíku pro stanovení aktivity peroxidáz. Z každého homogenátu byla provedena tři opakování. Jako blank byla použita směs homogenátu a

acetátového pufru v případě fenoloxidáz a v případě peroxidáz bylo navíc přidáno 0,1 ml peroxidu vodíku. Po hodině třepání při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při vlnové délce 460 nm. Aktivita na 1 litr homogenátu a na 1 g sušiny byla vypočítána podle následujících rovnic (Hendel et al., 2005):

a) Aktivita fenoloxidáz:

$$A(\text{PheOx}) = \text{Abs}_{460}/1,66 \text{ [mmol.h}^{-1}\text{.L}^{-1}\text{]}$$

A(PheOx)	enzymová aktivita na 1 L homogenátu za 1 hodinu inkubace	[mmol.h ⁻¹ .L ⁻¹]
Abs ₄₆₀	absorbance při vlnové délce 460 nm	
1,66	molární absorpční koeficient, který je 1,66mM pro L-DOPA v podmínkách tohoto měření	

b) Aktivita peroxidáz:

$$A(\text{PerOx}) = [\text{Abs}_{460} / 1,66] - A(\text{PheOx}) \text{ [mmol.h}^{-1}\text{.L}^{-1}\text{]}$$

A(PerOx)	enzymová aktivita na 1 L homogenátu za 1 hodinu inkubace	[mmol.h ⁻¹ .L ⁻¹]
Abs ₄₆₀	absorbance při vlnové délce 460 nm	
1,66	molární absorpční koeficient, který je 1,66mM pro L-DOPA v podmínkách tohoto měření	

c) Aktivity enzymů přepočítaná na 1g suchého opadu:

$$A_m = (A * V)/m \quad [\mu\text{mol.h}^{-1}\text{.g}^{-1}\text{]}$$

A	aktivita enzymu	[mmol.h ⁻¹ .L ⁻¹]
m	hmotnost suchého opadu	[g]
V	objem homogenátu	[50 ml]

3.4. Statistické zpracování dat

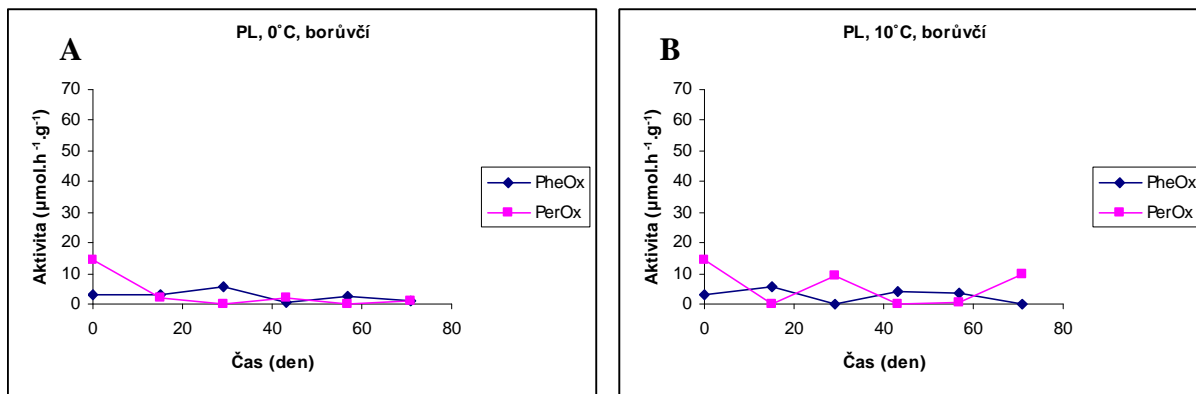
Statistická zhodnocení byla provedena v programu Microsoft Excel (aritmetické průměry a směrodatné odchylky).

4. Výsledky

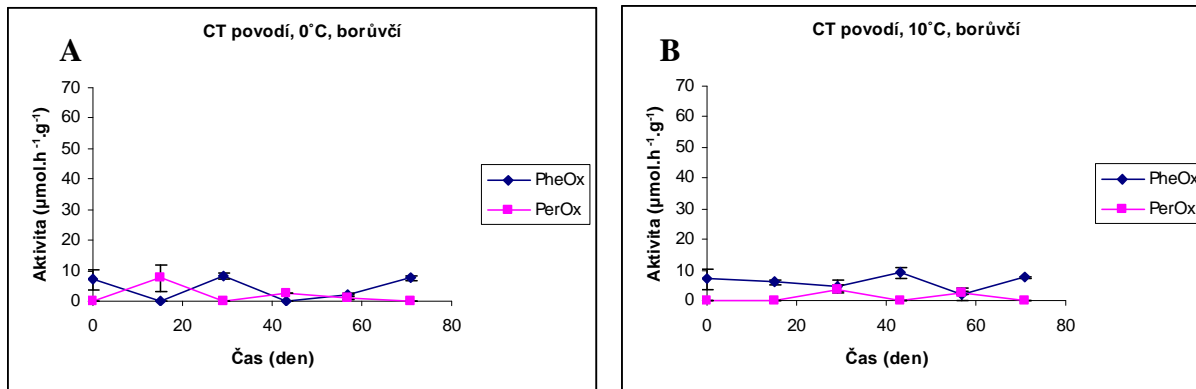
4.1. Aktivita fenoloxidáz a peroxidáz

Byly sledovány aktivity fenoloxidáz a peroxidáz po dobu cca 2 měsíců v opadu borůvky (*Vaccinium myrtillus*), třtiny chloupkaté (*Calamagrostis villosa*) a smrku (*Picea abies*) z povodí Plešného a Čertova jezera. Opad byl inkubován při dvou různých teplotách: 0 a 10°C.

a. aktivita enzymů v opadu borůvky



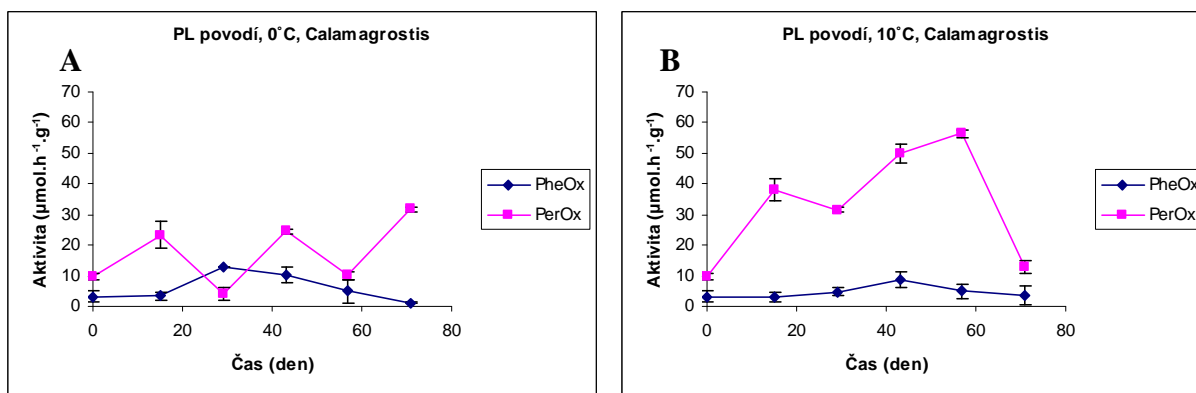
Graf 1. Porovnání aktivit fenoloxidáz (PheOx) a peroxidáz (PerOx) v opadu borůvky (*Vaccinium myrtillus*) z povodí Plešného jezera během inkubace při teplotě 0 a 10°C. Znázorněny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky.



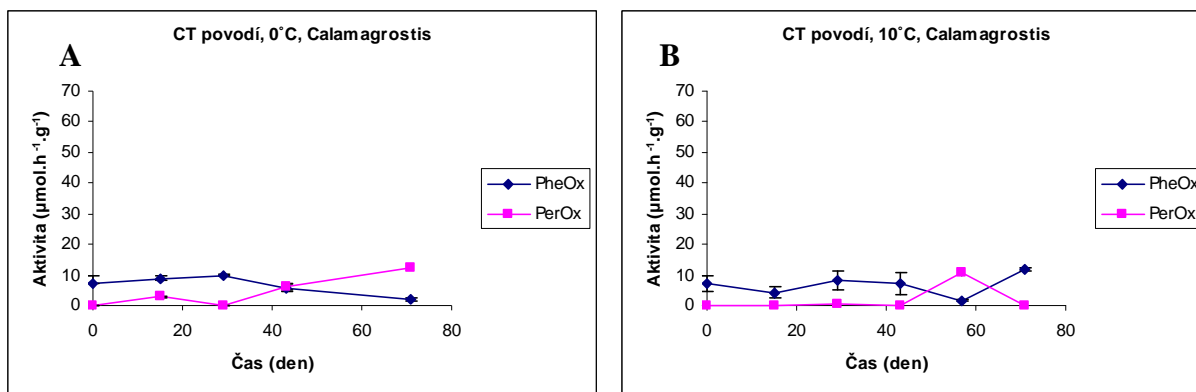
Graf 2. Porovnání aktivit fenoloxidáz (PheOx) a peroxidáz (PerOx) v opadu borůvky (*Vaccinium myrtillus*) z povodí Čertova jezera během inkubace při teplotě 0 a 10°C. Znáznorněny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky.

U opadu borůvky se výrazně neprojevil vliv různých povodí ani inkubační teploty na aktivitu ligninolytických enzymů. V průběhu inkubace se aktivity příliš neměnily, zůstávaly nízké a pohybovaly se kolem hodnoty 10 µmol.h⁻¹.g⁻¹.

b. aktivita enzymů v opadu trávy *Calamagrostis villosa*



Graf 3. Porovnání aktivit fenoloxidáz (PheOx) a peroxidáz (PerOx) v opadu třtiny chloupkaté (*Calamagrostis villosa*) z povodí Plešného jezera během inkubace při teplotě 0 a 10°C. Znáznorněny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky.

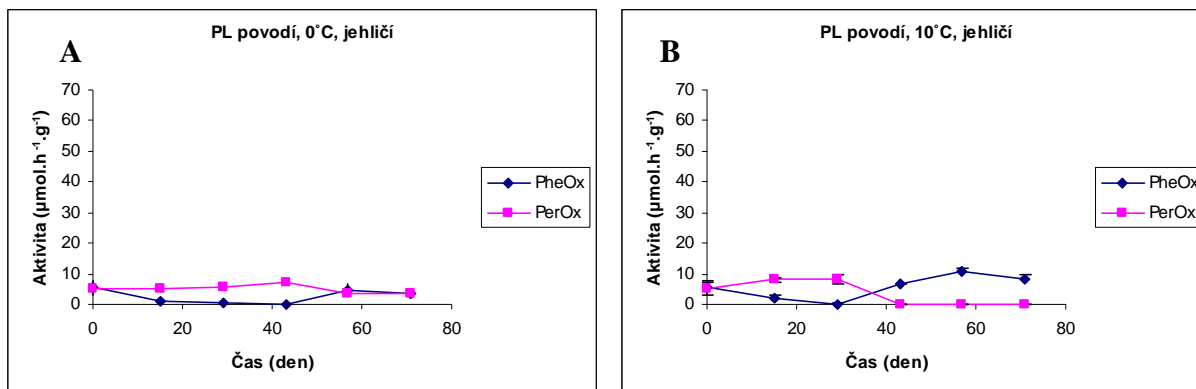


Graf 4. Porovnání aktivit fenoloxidáz (PheOx) a peroxidáz (PerOx) v opadu třtiny chloupkaté (*Calamagrostis villosa*) z povodí Čertova jezera během inkubace při teplotě 0 a 10°C. Znázorněny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky.

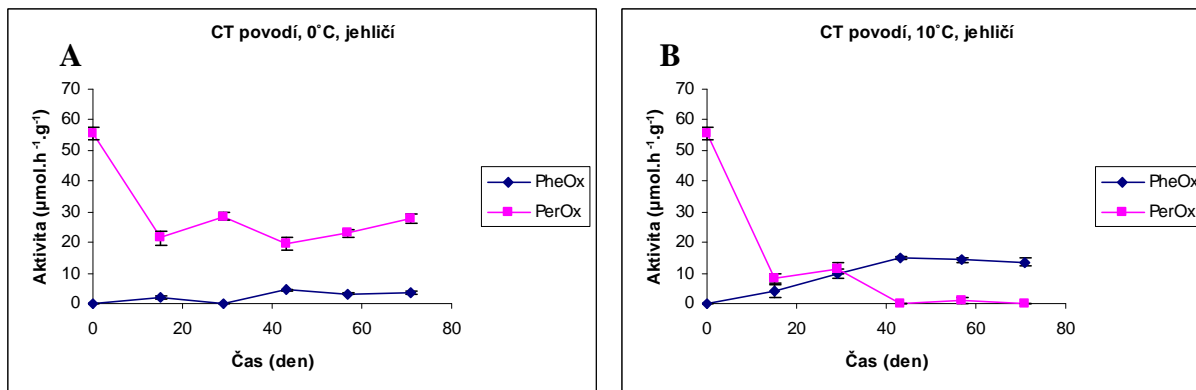
Při inkubaci trávy *Calamagrostis* se projevily rozdíly mezi povodími a v opadu z povodí Plešného jezera i mezi teplotami a enzymy. V opadu z povodí Plešného jezera při inkubaci za teploty 0°C aktivita fenoloxidáz dosáhla maxima 13 µmol.h⁻¹.g⁻¹ po 1 měsíci. Poté opět klesala (Graf 3A). Při inkubaci za teploty 10°C dosáhla maxima 8 µmol.h⁻¹.g⁻¹ po 40. dni inkubace. Poté opět mírně klesla (Graf 3B).

Aktivita peroxidáz v opadech z povodí Plešného jezera se vyvíjela odlišným způsobem. Při 0°C během inkubace kolísala s mírně stoupajícím trendem (Graf 3A). Při 10°C však výrazně stoupala a 60. den inkubace dosáhla aktivita peroxidáz maxima 56 µmol.h⁻¹.g⁻¹. Poté došlo k prudkému poklesu až téměř na hodnotu shodnou s počáteční aktivitou enzymu (Graf 3B). V opadu z povodí Čertova jezera se aktivity obou enzymů pohybují okolo 10 µmol.h⁻¹.g⁻¹. Po celou dobu inkubace se také neprojevily výraznější rozdíly mezi enzymy (Graf 4A, B).

c. aktivita enzymů v opadu smrkového jehličí



Graf 5. Porovnání aktivit fenoloxidáz (PheOx) a peroxidáz (PerOx) v opadu smrku (*Picea abies*) z povodí Plešného jezera během inkubace při teplotě 0 a 10°C. Znázorněny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky.



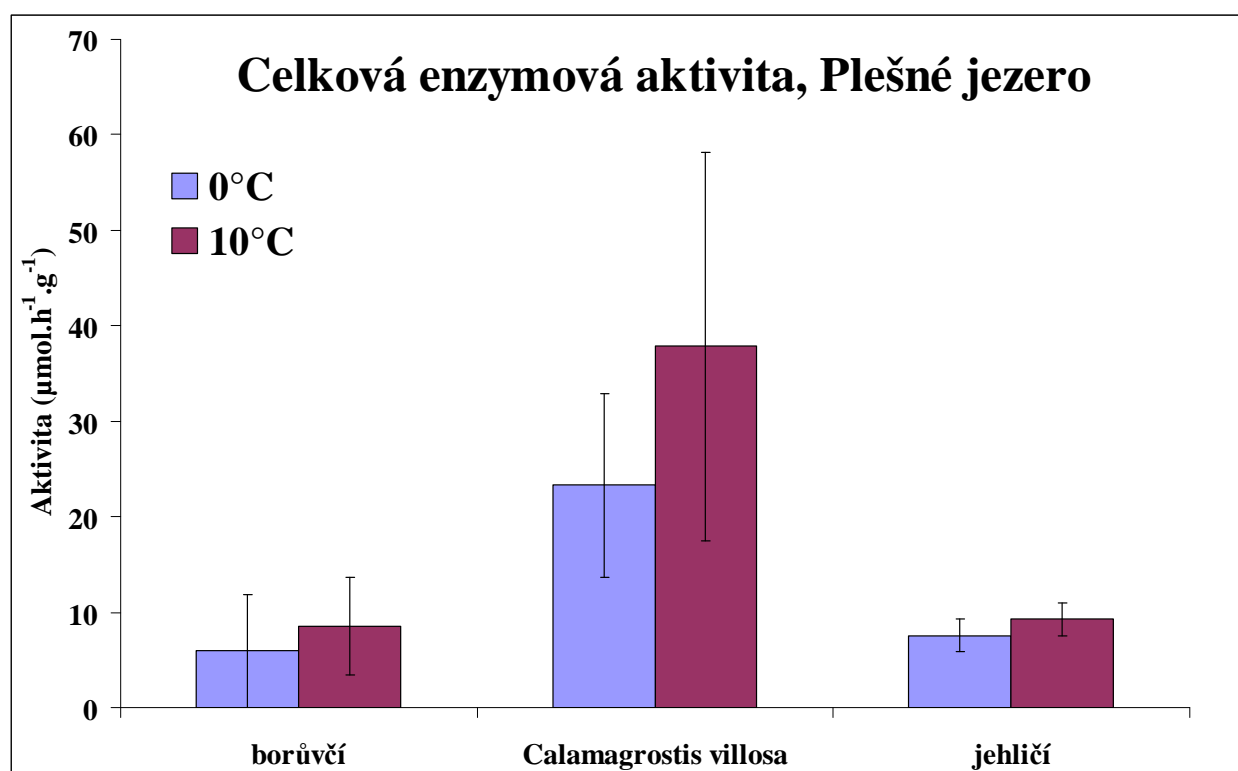
Graf 6. Porovnání aktivit fenoloxidáz (PheOx) a peroxidáz (PerOx) v opadu smrku (*Picea abies*) z povodí Čertova jezera během inkubace při teplotě 0 a 10°C. Znázorněny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky.

Také při inkubaci jehličí se projeví rozdíly mezi opadem z různých povodí a v případě opadu z povodí Čertova jezera i mezi teplotami a enzymy. V opadu z povodí Plešného jezera zůstávaly aktivity obou enzymů nízké, do 10 $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ (Graf 5A, B). V jehličí z povodí Čertova jezera na počátku inkubace byla aktivita peroxidáz asi 6x vyšší (okolo 55 $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$) než v opadu z povodí Plešného jezera, po 14 dnech však prudce klesla. Při teplotě 0°C se udržovala po celou dobu inkubace na poměrně vysoké úrovni mezi 20 a 30 $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ (Graf

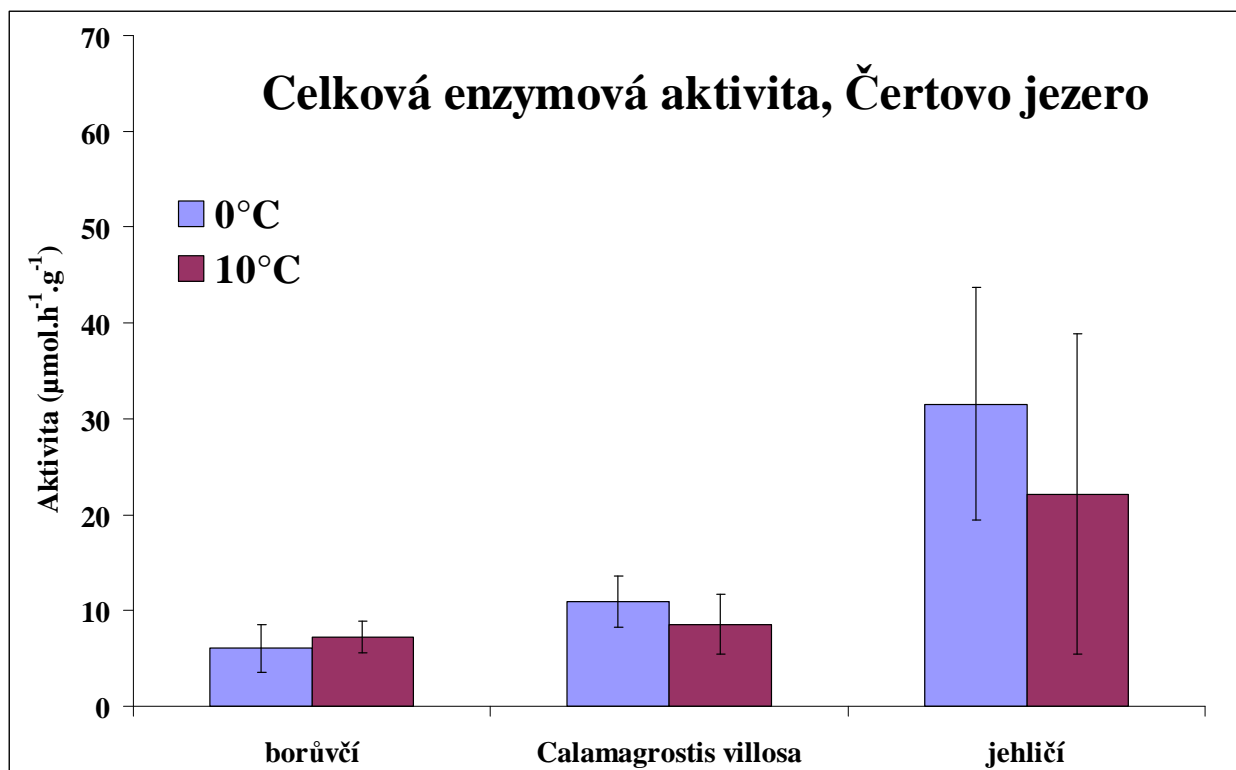
5A). Při teplotě 10°C však po 40. dnech klesla téměř až na 0 (Graf 5B). Aktivita fenoloxidáz v opadu inkubovaném při teplotě 0°C zůstávala nízká, do 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (Graf 6A), v opadu při teplotě 10°C se od počátku inkubace mírně zvyšovala, po 40. dni inkubace se nárůst zastavil a aktivita zůstávala na úrovni mezi 10 a 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ (Graf 6B).

4.2. Celkové aktivity za dobu inkubace

Průměrné celkové aktivity ligninolytických enzymů za inkubační období ukazují, že z opadů z povodí Plešného jezera je nejvyšší aktivita enzymů u opadu *Calamagrostis* (Graf 7) oproti povodí Čertovu, kde je nejvyšší aktivita u opadu jehličí (Graf 8).



Graf 7. Porovnání celkové enzymové aktivity u jednotlivých enzymů a teplot, při kterých byly opady inkubovány. Znáznorněny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky.



Graf 8. Porovnání celkové enzymové aktivity u jednotlivých enzymů a teplot, při kterých byly opady inkubovány. Znáznorněny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky.

4.3. Počáteční a konečná analýza kvality opadu

Počáteční chemické složení opadů je shrnuto v Tabulce 1 a konečné v Tabulce 2.

Počáteční kvalita opadů							
		C_{TOT}	N_{TOT}	C_{TOT}/N_{TOT}	P_{OX}	Fenoly	Fenoly/ N_{TOT}
		%	%	molární	$\mu\text{g/g}$	%	
Plešné	Borůvka (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	48,04 (0,58)	1,15 (0,04)	41,65	213,52 (27,87)	17,38 (1,14)	15,07
	<i>Calamagrostis</i> (<i>Calamagrostis villosa</i>)	45,19 (0,43)	1,76 (0,31)	25,65	232,60 (4,04)	2,92 (0,42)	1,66
	Jehličí (<i>Picea abies</i>)	51,70 (0,09)	1,18 (0,08)	42,27	61,77 (1,67)	40,62 (3,96)	34,55
Čertovo	Borůvka (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	49,03 (0,14)	1,34 (0,04)	35,02	334,75 (8,32)	21,23 (0,97)	15,81
	<i>Calamagrostis</i> (<i>Calamagrostis villosa</i>)	44,98 (0,20)	1,18 (0,03)	38,17	86,21 (27,25)	1,58 (0,63)	1,34
	Jehličí (<i>Picea abies</i>)	51,75 (0,31)	1,34 (0,06)	37,09	43,51 (6,63)	39,09 (1,85)	29,14

Tab. 1. Počáteční chemické složení opadů. Tabulka obsahuje průměrné hodnoty. V závorce jsou uvedeny směrodatné odchylky.

Opad jehličí obsahoval u obou povodí nejvíce C_{TOT} , nejméně pak opad *Calamagrostis*. Obsah N_{TOT} byl výrazně vyšší u opadu *Calamagrostis* v povodí Plešného jezera, což se projevilo na nejnižším poměru C/N. Opad borůvky a jehličí v povodí Plešného jezera obsahoval prokazatelně nižší N_{TOT} v porovnání s opadem z Čertova jezera. Opady se dále výrazně lišily v obsahu extrahovatelného fosforu (P_{OX}). Nejvíce dostupného fosforu obsahoval opad borůvky a nejméně opad jehličí u Čertova jezera. Největší rozdíl mezi povodími v obsahu fosforu nalezneme v opadu *Calamagrostis*. Výrazné rozdíly jsou v obsahu fenolických látek, jejichž nejvyšší obsah mělo jehličí a nejnižší opad *Calamagrostis* (Tab.1).

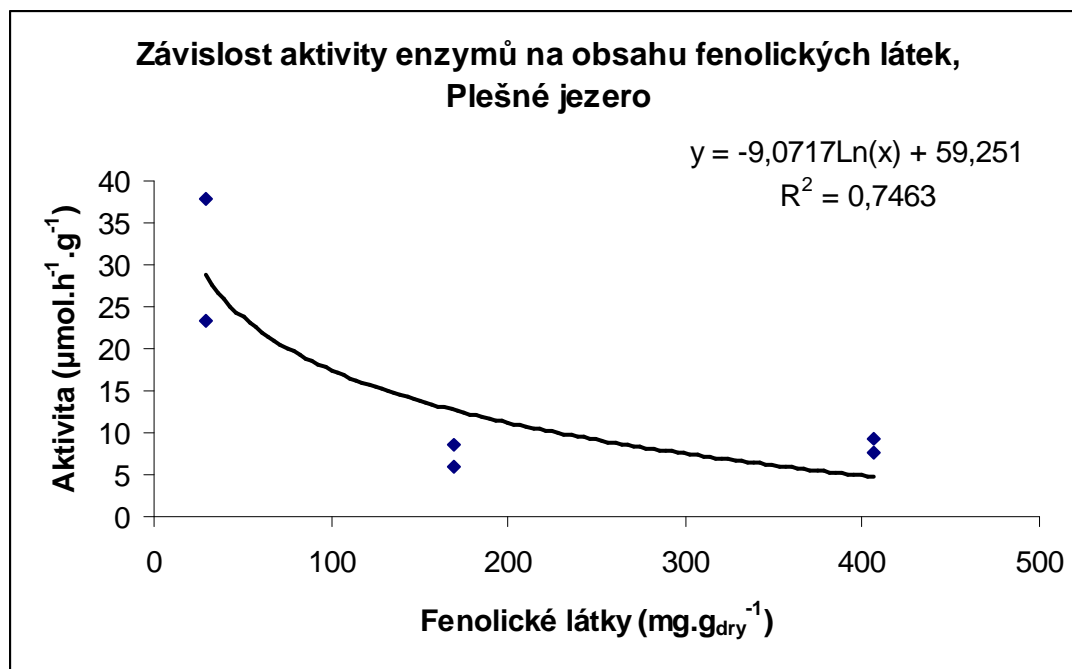
Konečná kvalita opadů														
			C _{TOT}	N _{TOT}	C _{EXT}	N _{EXT}	C _{CW}	N _{CW}	C _{TOT} :N _{TOT}	C _{EXT} :N _{EXT}	C _{CW} :N _{CW}	P _{OX}	Fenoly	Fenoly/N _{TOT}
			%	%	% C _{TOT}	% N _{TOT}	% C _{EXT}	% N _{EXT}	molární	molární	molární	µg/g	%	
Plešné	Borůvka (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	0°C	48,41 (0,23)	1,17 (0,06)	8,32 (0,62)	4,75 (0,86)	13,06 (1,62)	14,32 (2,61)	41,46	13,69 (1,55)	84,01 (33,56)	32,033 (3,233)	4,08 (0,72)	3,49
		10°C	47,18 (0,85)	1,24 (0,07)	7,34 (0,86)	4,76 (0,65)	17,06 (3,59)	17,28 (2,08)	37,94	17,09 (1,35)	60,62 (10,56)	69,976 (8,731)	2,45 (0,51)	1,97
	<i>Calamagrostis villosa</i>)	0°C	44,69 (0,56)	1,44 (0,11)	11,23 (1,19)	27,79 (1,25)	20,21 (1,68)	25,86 (2,34)	31,07	79,73 (2,23)	16,05 (0,40)	58,874 (11,583)	1,53 (0,19)	1,06
		10°C	44,41 (0,32)	1,63 (0,16)	10,53 (0,70)	23,26 (1,51)	15,01 (0,60)	24,85 (2,03)	27,19	81,02 (2,89)	20,44 (1,19)	77,436 (2,746)	1,41 (0,18)	0,86
	Jehličí (<i>Picea abies</i>)	0°C	50,38 (0,35)	1,12 (0,02)	6,47 (0,35)	3,15 (0,06)	10,84 (0,87)	23,43 (3,66)	44,88	10,86 (0,24)	199,25 (29,13)	97,651 (9,978)	31,10 (1,39)	27,70
		10°C	50,87 (0,12)	1,15 (0,06)	4,76 (0,35)	9,48 (0,87)	7,17 (2,05)	22,45 (1,22)	44,13	45,01 (0,43)	73,73 (21,96)	37,372 (10,672)	14,22 (1,05)	12,34
Čertovo	Borůvka (<i>Vaccinium myrtillus</i>)	0°C	48,40 (0,85)	1,60 (0,02)	8,58 (0,65)	3,37 (0,27)	14,00 (2,53)	18,84 (2,14)	30,32	12,96 (0,25)	104,79 (9,05)	75,279 (13,480)	3,40 (0,18)	2,13
		10°C	48,08 (0,21)	1,65 (0,01)	13,72 (0,58)	13,84 (1,38)	26,07 (6,19)	28,93 (3,76)	29,08	34,65 (2,36)	32,9 (6,19)	56,843 (10,063)	0,89 (0,28)	0,54
	<i>Calamagrostis villosa</i>)	0°C	44,46 (0,49)	1,23 (0,15)	7,63 (0,49)	15,64 (3,66)	9,07 (0,56)	18,14 (1,93)	36,08	55,73 (3,40)	35,98 (3,78)	49,694 (8,920)	2,58 (0,58)	2,10
		10°C	44,33 (0,05)	1,17 (0,01)	13,04 (0,80)	33,27 (0,82)	13,00 (0,57)	21,37 (0,47)	37,76	67,65 (2,33)	24,35 (1,43)	132,667 (2,941)	2,51 (0,59)	2,13
	Jehličí (<i>Picea abies</i>)	0°C	50,77 (0,23)	1,30 (0,03)	14,58 (0,66)	7,85 (0,67)	3,51 (0,95)	11,63 (2,15)	39,17	13,74 (0,95)	251,29 (76,07)	29,139 (6,044)	33,62 (1,98)	25,94
		10°C	51,20 (0,48)	1,41 (0,11)	7,88 (0,71)	7,64 (0,63)	8,61 (0,57)	19,65 (2,03)	36,42	26,64 (2,21)	85,85 (6,68)	205,474 (9,335)	32,47 (2,58)	23,10

Tab. 2. Konečné chemické složení opadů. Tabulka obsahuje průměrné hodnoty. V závorce jsou uvedeny směrodatné odchylky.

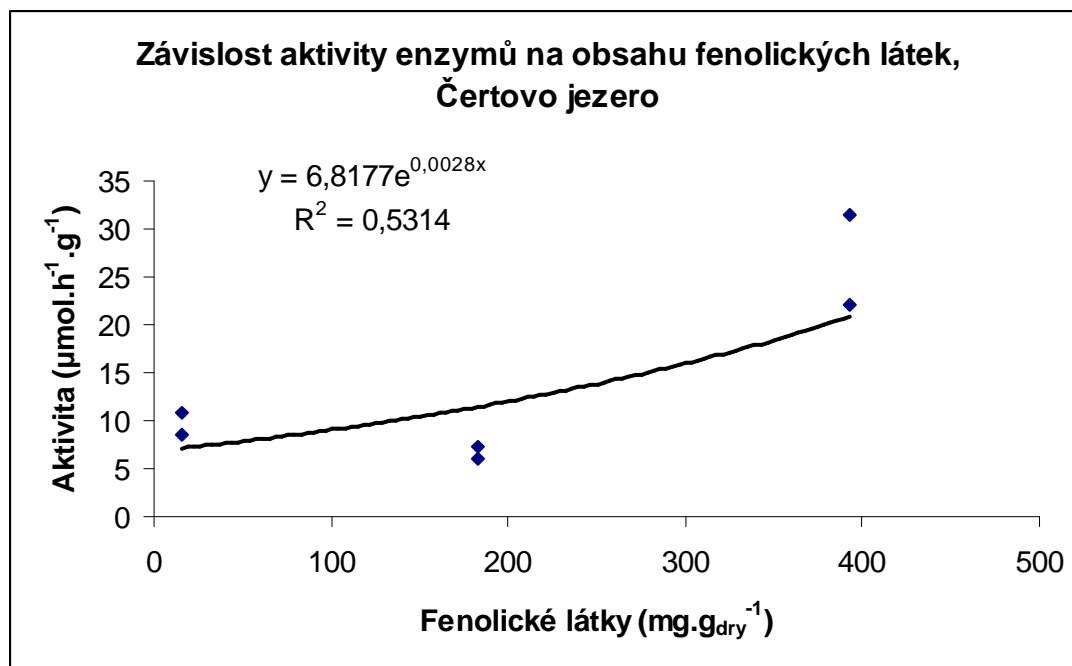
Na konci inkubace došlo u všech opadů k mírnému poklesu v obsahu celkového uhlíku (C_{TOT}). Poměr C/N je v povodí Plešného jezera nejnižší u opadu *Calamagrostis* a nejvyšší u jehličí. V povodí Čertova jezera však poměr C/N nevykazuje takové rozdíly jako u Plešného jezera. Nejnižší je u borůvky a nejvyšší u opadu jehličí inkubovaném při 0°C. U všech opadů kromě *Calamagrostis* z povodí Čertova jezera je vyšší po inkubaci při teplotě 0°C. Opad *Calamagrostis* obsahuje nejvíce C_{EXT} a N_{EXT} mezi opady z povodí Plešného jezera. Podobně je tomu u C_{CW} (Tab.2).

V povodí Čertova jezera nejsou rozdíly v obsahu C_{EXT} mezi opady inkubovanými při stejné teplotě tak výrazné. V opadech z povodí Plešného jezera je obsah C_{EXT} vždy vyšší u opadů inkubovaných při teplotě 0°C než při 10°C. Opady z povodí Čertova jezera vykazují opak, s výjimkou jehličí. Podobná situace je u C_{CW} u opadů z povodí Plešného jezera. Z opadů z povodí Čertova jezera vykazují opady inkubované při teplotě 10°C vyšší obsahy C_{CW} než opady inkubované při 0°C. Nejvyšší obsah N_{CW} v opadech z povodí Plešného jezera vykazuje opad *Calamagrostis*, z povodí Čertova jezera borůvčí. Nejvyšší poměr $C_{EXT}:N_{EXT}$ je u opadu *Calamagrostis* z obou povodí. Naproti tomu poměr $C_{CW}:N_{CW}$ je u opadu *Calamagrostis* nejnižší (kromě opadu borůvky z povodí Čertova jezera inkubovaného při teplotě 10°C). Zastoupení P_{ox} nevykazuje žádnou pravidelnost. Během inkubace se snížil obsah fenolických látek. Největší změna nastala u opadu borůvky. I po inkubaci zůstává v jehličí nejvíce fenolických látek. U všech opadů je obsah fenolických látek nižší po inkubaci při teplotě 10°C než při 0°C. Z těchto důvodů je po inkubaci poměr fenolických látek a celkového dusíku nejvyšší u jehličí (Tab.2).

4.4. Vztah mezi aktivitami enzymů a počátečním obsahem fenolických látek v opadu



Graf 9. Závislost aktivit fenoloxidáz a peroxidáz na obsahu fenolických látek na počátku inkubace v opadech z povodí Plešného jezera. Použity jsou průměry aktivit jednotlivých enzymů za sledované období.



Graf 10. Závislost aktivit fenoloxidáz a peroxidáz na obsahu fenolických látek na počátku inkubace v opadech z povodí Čertova jezera. Použity jsou průměry aktivit jednotlivých enzymů za sledované období.

Průměrné celkové aktivity fenoloxidáz a peroxidáz vykazují u obou povodí závislost na obsahu fenolických látek. V případě opadu z povodí Plešného jezera aktivita obou enzymů se vzrůstajícím obsahem fenolických látek na počátku inkubace klesá (Graf 9) a u opadu z povodí Čertova jezera však s rostoucím obsahem fenolických látek na počátku inkubace stoupá (Graf 10).

5. Diskuze

5.1. Antropogenní vlivy

Člověk ovlivňuje šumavské lesy již dlouho. Nejdříve nahrazoval původní druhovou skladbu převážně smrkovými monokulturami. V druhé polovině 20. století se přidal vliv depozic síranových a nitrátových aniontů, které acidifikují a eutrofizují celé povodí včetně samotných šumavských ledovcových jezer (Kopáček and Veselý, 2005).

V roce 2001 postihla smrkové lesy povodí Plešného jezera kůrovcová kalamita. Ta postihuje především oslabené stromy (Jones et al., 2004). Oslabení má na svědomí několik faktorů. Patří mezi ně ochuzování půdy o živiny, zvýšená toxicita hlinitých kationtů, změna obvyklých teplot či acidifikace půdy (Jones et al., 2004).

Na Šumavě způsobuje náchylnost k acidifikaci půd několik faktorů. Matečné horniny Šumavy – pararuly, migmatity, granitoidy a svory (Ložek, 2001) – mají tendenci vytvářet kyselé půdy. Smrkové jehličí během rozkladu uvolňuje kyseliny, které snižují pH. Významným antropogenním zdrojem acidifikace jsou depozice nitrátových a síranových aniontů z druhé poloviny 20. století (Kopáček and Veselý, 2005). Ačkoliv v 90. letech minulého století depozice výrazně poklesly, jejich vliv trvá dodnes. Spolu s acidifikací se změnila dostupnost dusíku a síry a jejich vyplavování odvádí bazické ionty vápníku, hořčíku a draslíku. Uvolňování a vyplavování vápenatých kationtů z půdy je obecně spojováno s nízkým pH (Pawłowski, 1997). V takovém případě se ukazuje, že lépe na tom jsou smíšené bukovo-smrkové lesy, protože buk je schopen čerpat vápenaté ionty z větších hloubek a tím omezovat jejich vyplavování (Berger et al., 2006). Acidifikace vedla také k zpřístupnění toxických hlinitých kationtů (Pawłowski, 1997) a ke změně v dostupnosti některých živin.

K odnosu živin dále přispívá holosečné kácení s odvozem dřeva, což znemožňuje návrat živin do půdy. Kácení navíc přispívá k vyplavování živin z důvodu absence stromů, které by je přijímaly a vázaly (Šantrůčková, 2001).

K dalšímu uvolňování a následnému vyplavování živin přispívá extrémnější podnebí. Konkrétně u dusičnanových aniontů k tomu přispívají velmi chladné zimy a suchá horká léta, kdy

se tyto ionty ve zvýšené míře uvolňují (Kopáček et al., 2006). Extrémní výkyvy teplot a dlouhodobé sucho stromy smrku oslabuje (Jones et al., 2004).

Všechny tyto faktory mohly vést k tomu, že se smrk stal náchylnějším k napadání kůrovcem (Jones et al., 2004). Kůrovcová kalamita v povodí Plešného jezera v roce 2001 způsobila uschnutí smrkových porostů a opadání jehličí. Tím se do půdy dostalo najednou velké množství poměrně těžko rozložitelného opadu, který navíc při svém rozkladu způsobuje větší acidifikaci. Mrtvý strom nemůže vázat živiny, které jsou pak odplavovány. Opadáním jehličí se celý prostor prosvětřil. Wild et al. (2004) ale tvrdí, že k prosvětlování docházelo postupně již od 70. let 20. století. Kromě nastupujícího vlivu kůrovce zmiňují jako příčiny prořídnutí korun stromů již zmíněné kyselá depozice a oteplování klimatu.

Prosvětlení dovolilo rozšiřování podrostu. Především borůvčí, kapradinám a travám, jako jsou například třtiny (*Calamagrostis*) a metlička křivolaká (*Avenella flexuosa*). S těmito rostlinami se změnilo množství a složení opadu, způsob poutání živin a jejich koloběh, protože se liší v chemickém složení, které významným způsobem ovlivňuje dekompozici.

5.2. Aktivita fenoloxidáz a peroxidáz

Fenolické látky patří mezi nejhůře rozložitelné složky opadu. Jsou rozkládány některými houbami, které mají příslušný enzymatický aparát zahrnující enzymy fenoloxidázy a peroxidázy.

V první hypotéze byl obsažen předpoklad, že v opadech s vyšším zastoupením fenolických látek bude aktivita ligninolytických enzymů vyšší. V opadech z povodí Plešného jezera se ukazuje, že situace je opačná. V povodí Čertova jezera skutečně platí, že v opadech s vyšším obsahem fenolických látek je aktivita ligninolytických enzymů vyšší. Celkově však první hypotéza potvrzena nebyla.

V souladu s druhou hypotézou, zahrnující předpoklad, že se s časem bude aktivita enzymů zvyšovat, jsou jen aktivity peroxidáz v opadu *Calamagrostis* z povodí Plešného jezera, přičemž více znatelné je to u opadu *Calamagrostis* inkubovaného při teplotě 10°C.

Hned od počátku inkubace se projevovala aktivita ligninolytických enzymů ve většině druhů opadu, tedy docházelo k rozkladu ligninu. To je ve shodě s pozorováním Rutigliana et al. (1996), kteří rovněž naměřili úbytek ligninu již od počátku sledování. Naproti tomu, nedostatečná délka pozorování mohla způsobit absenci vyšších aktivit enzymů u některých druhů opadu (viz například opad borůvky). Například Fioretto et al. (2007) měřili aktivitu peroxidázy a lakázy

v terénu a naměřili maximální aktivitu peroxidáz u opadu dubu až kolem 100. dne a u myrty kolem 400. dne, a u fenoloxidáz u obou druhů opadů až kolem 500. dne.

5.3. Vliv teploty

Vliv teploty na růst mikrobiální aktivity je dobře znám. Každý mikroorganismus má za určitých podmínek teplotní optimum, ve kterém roste nejrychleji. V teplotách nižších i vyšších je růst limitován. V našem případě byly inkubační teploty zvoleny dvě: 0 a 10°C. Teplota 0°C odpovídá teplotám v zimě pod sněhovou vrstvou. 10°C je obvyklá letní denní teplota v šumavských lesích.

Jak ukazují výsledky, i při teplotě 0°C dochází k rozkladu opadu a mineralizaci organické hmoty, dokonce i ligninolytické enzymy vykazují poměrně vysokou aktivitu. Tyto výsledky podporují nově se rozšiřující názor, že při teplotě 0°C probíhá poměrně vysoká mikrobiální aktivita. Jelikož se tato teplota udržuje v zimě pod sněhovou pokrývkou, lze z toho vyvodit, že rozklad opadu probíhá intenzivně i pod sněhem v zimním období.

Teplotní optimum mají i ligninolytické enzymy. Toto optimum bývá vyšší, než teplota prostředí, ve kterém houby, které je vylučují, přirozeně žijí. Čím vyšší je tedy teplota prostředí, tím vyšší je aktivita ligninolytických enzymů (Ceylan et al., 2008; Niladevi and Prema, 2008; Baborová et al., 2006). Proto by se dalo předpokládat, že bude aktivita v opadech inkubovaných v teplotě 10°C vyšší než v opadech inkubovaných v teplotě 0°C. Na těchto předpokladech byla postavena počáteční hypotéza, že při vyšší teplotě bude aktivita ligninolytických enzymů vyšší. Tato hypotéza byla potvrzena opět částečně. Celkově jsou aktivity ligninolytických enzymů u obou teplot velice podobné. Avšak průběh je závislý na typu opadu a na povodí, z kterého byl opad odebrán. Důvodem vysokých aktivit v opadech inkubovaných při teplotě 0°C mohou být rozdíly ve složení mikrobiálních společenstev a jejich adaptace na život v teplotě okolo 0°C (Watanabe and Ito, 2008). Obdobně Criquet et al. (2000) nenašli korelaci mezi aktivitou fenoloxidáz a peroxidáz a teplotou v inkubované opadové vrstvě dubového lesa.

5.4. Vliv kvality opadu

Borůvka a *Calamagrostis* byly vybrány jako zástupci rostlinných druhů tvořících podrost smrkového lesa v povodí Plešného a Čertova jezera spolu s jehličím, který dominuje převážně

v povodí Plešného jezera. Nejvyšší aktivity ligninolytických enzymů vykazovaly opady *Calamagrostis* a jehličí.

Vliv kvality opadu na aktivitu enzymů spočíval především v jeho rozdílném chemickém složení (rozdílný obsah fenolických látek, dusíku, fosforu, extrahovatelných sloučenin). Vzhledem k tomu, že substrát rozkládaný fenoloxidázami a peroxidázami, jsou právě vysokomolekulární fenolické látky, aktivita ligninolytických enzymů by měla záviset přímo na množství těchto látek v opadu. Naopak pokles v obsahu celkových fenolických látek, který byl zaznamenán v případě opadu borůvky, nemusí přímo souviset s aktivitou fenoloxidáz a peroxidáz (Leonowicz et al., 1999). Toto by vysvětlovalo značný pokles množství fenolických látek v opadu borůvky nedoprovázený odpovídající aktivitou fenoloxidáz a peroxidáz. Opady borůvky obsahují velké množství nízkomolekulárních fenolických látek, které mohou sloužit jako zdroj C i pro jiné mikroorganismy (Gallet and Lebreton, 1995). Bohužel použitá metoda Folin-Ciocalteu neposkytuje dostatečné informace o struktuře a tedy typu fenolických látek (Kähkönen, 1999). Pokud porovnáme pokles obsahu fenolických látek u opadu inkubovaném při teplotě 0 a 10°C, výrazněji se obsah fenolů snížil inkubací při vyšší teplotě, což by mohlo souviset z vyšší mikrobiální aktivitou při této teplotě.

Jedním z faktorů ovlivňujících mikrobiální aktivitu je poměr C:N. V porovnání s literaturou (Gallet and Lebreton, 1995), opad borůvky vykazoval vysoký poměr celkového uhlíku a dusíku. Zmínění autoři uvádějí poměr 22 – 24:1, v opadech borůvky z Plešného a Čertova jezera se tento poměr pohyboval mezi 29:1 a 41:1. Aktivitu ligninolytických enzymů a růst mikroorganismů, které je produkují, však mohou ovlivňovat i obsahy dostupného dusíku a uhlíku a dostupného fosforu. Při teplotě 10°C bylo více dostupného uhlíku než u opadů inkubovaných při 0°C. To zřejmě souvisí s vyšší mikrobiální aktivitou. Poměr C:N ve studenododném výluhu byl po inkubaci nejnižší u opadu *Calamagrostis*. To znamená, že tento opad vykazoval vzhledem k přístupnému uhlíku nejvíce přístupného dusíku. Obsah fosforu v oxalátovém extraktu odpovídá přístupnému fosforu pro mikroorganismy.

Příčinou vyšších aktivit ligninolytických enzymů v opadu *Calamagrostis* může být více. Analýza kvality opadu nám tedy může pomoci tyto rozdíly vysvětlit (Zimmer, 2002; Gallet and Lebreton, 1995).

5.5. Vliv povodí

Vliv povodí se projevuje především v rozdílné kvalitě jednotlivých druhů opadu. Dalšími faktory, které mohou odlišovat obě povodí, jsou mikrobiální společenstva různá na opadu z jednotlivých povodí (Bárta, ústní sdělení) a jejich adaptace na složení opadu, popřípadě na určitou teplotu. Důsledkem toho mohou být mikroorganismy z jednoho povodí lépe adaptovány na podmínky našeho experimentu a vykazovat vyšší aktivitu enzymů, popřípadě mohou být schopné lépe využívat jednotlivé složky opadu, například fosfor. Právě v případě fosforu jsou zaznamenány rozdíly v jeho dostupnosti v jednotlivých povodích (Šantrůčková et al., 2004). V povodí Plešného jezera je dostupnější a tedy mikroorganismy mohou být adaptované na jeho vyšší příjem.

5.6. Další sledování aktivit ligninolytických enzymů

V budoucnu bude třeba experimenty zopakovat a zjištěná data potvrdit. Bude třeba dát do souvislosti aktivity enzymů a složení společenstev právě přítomných v rozkládajícím se opadu. Dále lze opady inokulovat půdním výluhem a nasimulovat tak styk opadu s půdní mikroflorou. Důležité bude pozorovat aktivity enzymů v dalších opadech, které dominují na zkoumaných plochách.

6. Závěr

1. Při teplotě 0°C byly naměřeny vysoké aktivity ligninolytických enzymů. Pod sněhovou pokrývkou tedy probíhá rozklad ligninu i v zimním období.
2. Byla prokázána odlišná závislost aktivit ligninolytických enzymů na obsahu fenolických látek mezi povodím Plešného a Čertova jezera.
3. Aktivita ligninolytických enzymů se ve většině případů v průběhu inkubace výrazně neměnila. Odlišný průběh ukazuje opad *Calamagrostis villosa* z povodí Plešného jezera inkubovaný při teplotě 10°C.
4. Nebyly nalezeny průkazné rozdíly mezi celkovými aktivitami ligninolytických enzymů v opadech inkubovaných při 0 a 10°C.

7. Literatura

Amador, J.A., Jones, R.D., 1993. Nutrient limitations on microbial respiration in peat soils with different total phosphorous content. *Soil Biology & Biochemistry* 25, 793-801.

Andersson, P., Berggren, D., Nilsson, I., 2002. Indices for nitrogen status and nitrate leaching from Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) stands in Sweden. *Forest Ecology and Management* 157, 39–53.

Ågren, G.I., Bosatta, E., Magill, A.H., 2001. Combining theory and experiment to understand effects of inorganic nitrogen on litter decomposition. *Oecologia* 128, 94–98.

Baborová, P., Möder, M., Baldrian, P., Cajthamlová, K., Cajthaml, T., 2006. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Research in Microbiology* 157, 248–253.

Bärlocher, F., Graça, M.A.S., 2005. Total Phenolics. In: Graça, M.A.S., Bärlocher, F., Gessner, M.O., 2005. *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*, Springer, Netherlands, pp. 97-100.

Berg, B., 2000. Litter decomposition and organic matter turnover in northern forest soils. *Forest Ecology and Management* 133, 13-22.

Berg, B., Laskowski, R., 2006. Litter decomposition: A guide to carbon and nutrient turnover. In: Caswell, H. (Ed.), *Advances in ecological research*, vol. 38. San Diego, California.

Berger, T.W., Swoboda, S., Prohaska, T., Glatzel, G., 2006. The role of calcium uptake from deep soils for spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*). *Forest Ecology and Management* 229, 234–246.

Binkley, D., Högberg, P., 1997. Does atmospheric deposition of nitrogen threaten Swedish forests? *Forest Ecology and Management* 92, 119-152.

Brady, N.C., Weil, R.R., 2002. *The Nature and Properties of Soils*. Prentice Hall, New Jersey. 960 p.

Cappo, K.A., Blume, L.J., Raab, G.A., Bartz, J.K., Engels, J.L., 1987. *Analytical Methods Manual for the Direct/Delayed Response Project Soil Survey*. US PA, Las Vegas, USA. Sections 8-11.

Ceylan, H., Kubilay, S., Aktas, N., Sahiner, N., 2008. An approach for prediction of optimum reaction conditions for laccase-catalyzed bio-transformation of 1-naphthol by response surface methodology (RSM). *Bioresource Technology* 99, 2025–2031.

Cortina, J., Romanya, J., Vallejo, V.R., 1995. Nitrogen and phosphorus leaching from the forest floor of a mature *Pinus radiata* stand. *Geoderma* 66, 321-330.

Coûteaux, M.-M., Bottner, P., Berg, B., 1995. Litter decomposition, climate and litter quality. *Trends in Ecology & Evolution* 10, 63-66.

Criquet, S., Farnet, A.M., Tagger, S., Le Petit, J., 2000. Annual variations of phenoloxidase activities in an evergreen oak litter: influence of certain biotic and abiotic factors. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 1505 – 1513.

Fioretto, A., Papa, S., Pellegrino, A., Fuggi, A., 2007. Decomposition dynamics of *Myrtus communis* and *Quercus ilex* leaf litter: Mass loss, microbial activity and quality change, *Applied Soil Ecology* 36, 32-40.

Frey, S.D., Knorr, M., Parrent, J.L., Simpson, R.T., 2004. Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *Forest Ecology and Management* 196, 159–171.

Gallet, C., Lebreton, P., 1995. Evolution of phenolic patterns in plants and associated litters and humus of a mountain forest ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* 27, 157 – 165.

Griffin, D.H., 1994. *Fungal physiology*. Wiley-Liss, New York, 458 p.

Griffin, D.M., 1972. *Ecology of soil fungi*. Syracuse University Press, Syracuse, 193 p.

Hawker, L.E., 1950. *Physiology of fungi*. University of London Press, London, 359 p.

Hendel, B., Sinsabaugh, R.L., Marxsen, J., 2005. Lignin-degrading enzymes: phenoloxidase and peroxidase. In: Graça, M.A.S., Bärlocher, F., Gessner, M.O., 2005. *Methods to Study Litter Decomposition: A Practical Guide*. Springer, Netherlands, p. 273 – 278.

Hyvönen, R., Olsson, B.A., Lundkvist, H., Staaf, H., 2000. Decomposition and nutrient release from *Picea abies* (L.) Karst. and *Pinus sylvestris* L. logging residues. *Forest Ecology and Management* 126, 97-112.

Jones, M.E., Paine, T.D., Fenn, M.E., Poth, M.A., 2004. Influence of ozone and nitrogen deposition on bark beetle activity under drought conditions. *Forest Ecology and Management* 200, 67–76.

Kainulainen, P., Holopainen, J. K., 2002. Concentration of secondary compounds in Scots pine needles at different stages of decomposition. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 37 – 42.

Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M., 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3954-3962.

Keyser, P., Kirk, T.K., Zeikus, I.G., 1978. Ligninolytic enzyme of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *Journal of Bacteriology* 135, 790-797.

Killham, K., 1994. *Soil ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, 242 p.

Kopáček, J., Borovec, J., Hejzlar, J., Porcal, P., 2001. Parallel spectrophotometric determination of Iron, luminum and phosphorus in soil and sediment extracts. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 32, 1431-1443.

Kopáček, J., Veselý, J., 2005. Sulfur and nitrogen emissions in the Czech Republic and Slovakia from 1850 till 2000. *Atmospheric Environment* 39, 2179-2188.

Kopáček, J., Kaňa, J., Šantrůčková, H., Porcal, P., Hejzlar, J., Pícek, T., Šimek, M., Veselý, J., 2002, a. Physical, chemical, and biochemical characteristics of soils in watersheds of the Bohemian Forest lakes I. Plešné lake. *Silva Gabreta* 8, 43 - 66.

Kopáček, J., Kaňa, J., Šantrůčková, H., Porcal, P., Hejzlar, J., Pícek, T., Šimek, M., Veselý, J., 2002, b. Physical, chemical, and biochemical characteristics of soils in watersheds of the Bohemian Forest lakes II. Čertovo and Černé lakes. *Silva Gabreta* 8, 67 - 94.

Kopáček, J., Turek, J., Hejzlar, J., Kaňa, J., Porcal, P., 2006. Element fluxes in watershed-lake ecosystems recovering from acidification: Plešné Lake, the Bohemian Forest, 2001–2005. *Biologia* 61, Supplement 20, 427-440.

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś -Wasilewska, M., Cho, N.-S., Hofrichter, M., Rogalski, J, 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27, 175–185.

Lorenz, K., Preston, C.M., Raspe, S., Morrison, I.K., Feger, K.H., 2000. Litter decomposition and humus characteristics in Canadian and German spruce ecosystems: information from tannin analysis and ¹³C CPMAS NMR. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 779-792.

Ložek, V., 2001. *Geologie Národního parku Šumava*. *Silva Gabreta, Supplementum* 1, 18 - 19.

Lucas, R.W., Casper, B.B., Jackson, J.K., Balser, T.C., 2007. Soil microbial communities and extracellular enzyme activity in the New Jersey Pinelands. *Soil Biology & Biochemistry* 39, 2508–2519.

McGroddy, M.E., Silver, W.L., de Oliveira Jr, R.C., 2004. The effect of phosphorus availability on decomposition dynamics in a seasonal lowland Amazonian forest. *Ecosystems* 7, 172 – 179.

Moore, T.R., Trofymow, J.A., Prescott, C.E., Fyles, J., Titus, B.D., 2006. Patterns of carbon, nitrogen and phosphorus dynamics in decomposing foliar litter in Canadian forests. *Ecosystems* 9, 46–62.

- Niladevi, K.N., Prema, P., 2008. Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolourization. *Bioresource Technology* 99, 4583-4589.
- Panicker, G., Aislabie, J., Bej, A.K., 2006. Analysis of aggregative behavior of *Pseudomonas* sp. 30-3 isolated from Antarctic soil. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 3152 – 3157.
- Paul, E.A., Clark, F.E., 1996. *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego. 340 p.
- Pawłowski, L., 1997. Acidification: its impact on the environment and mitigation strategies. *Ecological Engineering* 8, 271 – 288.
- Petruš, J., Neuhäuslová, Z., 2001. *Pedologie Národního parku Šumava*. Silva Gabreta, Supplementum 1, 21 - 22.
- Prechtel, A., Alewell, C., Armbruster, M., Bittersohl, J., Cullen, J.M., Evans, C.D., Helliwell, R., Kopáček, J., Marchetto, A., Matzner, E., Meesenburg, H., Moldan, F., Moritz, K., Veselý, J., Wright, R.F., 2001. Response of sulphur dynamics in European catchments to decreasing sulphate deposition. *Hydrology and Earth System Sciences* 5, 311–326.
- Preston, C.M., Trofymow, J.A., 2000. Variability in litter quality and its relationship to litter decay in Canadian forests. *Canadian Journal of Botany* 78, 1269 – 1287.
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J., 1998. *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha. 484 p.
- Rutigliano, F.A., De Santo, A.V., Berg, B., Alfani, A., Fioretto, A., 1996. Lignin decomposition in decaying leaves of *Fagus sylvatica* L. and needles of *Abies alba* Mill. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 101-106.
- Rüttimann, C., Vicuña, R., Mozuch, M.D., Kirk, T.K., 1991. Limited bacterial mineralization of fungal degradation intermediates from synthetic lignin. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3652 – 3655.
- Schofield, J.A., Hagerman, A.E., Harold, A., 1998. Loss of tannins and other phenolics from willow leaf litter. *Journal of Chemical Ecology* 24, 1409-1421.
- Scott, N.A., Binkley, D., 1997. Foliage litter quality and annual net N mineralization: comparison across North American forest sites. *Oecologia* 111, 151-159.
- Souto, X.C., Chiapusio, G., Pellissier, F., 2000. Relationships between phenolics and soil microorganisms in spruce forests: significance for natural regeneration. *Journal of Chemical Ecology* 26, 2025-2034.
- Staaf, H., 1980. Release of plant nutrients from decomposing leaf litter in a South Swedish beech forest. *Holarctic Ecology* 3, 129-136.

- Šantrůčková, H., 2001. Ekologie půdy. BF JU, České Budějovice, 6-27 p.
- Šantrůčková, H., Vrba, J., Pícek, T., Kopáček, J., 2004. Soil biochemical activity and phosphorus transformations and losses from acidified forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 1569–1576.
- Vance, E.D., Chapin, F.S., 2001. Substrate limitations to microbial activity in taiga forest floors. *Soil Biology & Biochemistry* 33, 173-188.
- Venäläinen, M., Harju, C.M., Saranpää, P., Kainulainen, P., Tiitta, M., Velling, P., 2004. The concentration of phenolics in brown-rot decay resistant and susceptible Scots pine heartwood. *Wood Science and Technology* 38, 109–118.
- Veselý, J., 1994. Investigation of the nature of the Šumava lakes: a review. *Časopis Národního muzea* 163, 103 - 120.
- Votrubová, O., 1996. Anatomie rostlin. Karolinum, Praha. 28 – 35.
- Waldrop, M.P., Zak, D.R., Sinsabaugh, R.L., 2004. Microbial community response to nitrogen deposition in northern forest ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 1443–1451.
- Watanabe, K., Ito, M., 2008. In situ observation of the distribution and activity of microorganisms in frozen soil. *Cold Regions Science and Technology*, in press.
- Wild, J., Neuhäuslová, Z., Sofron, J., 2004. Changes of plant species composition in the Šumava spruce forests, SW Bohemia, since the 1970s. *Forest Ecology and Management* 187, 117–132.
- Zimmer, M., 2002. Is decomposition of woodland leaf litter influenced by its species richness? *Soil Biology & Biochemistry* 34, 277-284.