

# **JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**Přírodovědecká fakulta**

**2009**



**bakalářská práce**

**Vliv odlesnění na diverzitu a množství denitrifikačních  
bakterií v půdních horizontech smrkového lesa**

**vypracovala: Tereza Melichová**

**školitel: Ing. Jiří Bárta Ph.D.**

**Melichová T. 2009. Vliv odlesnění na diverzitu a množství denitrifikačních bakterií v půdních horizontech smrkového lesa [Influence of deforestation on quantity and diversity of denitrifying bacteria in Norway spruce forest soil horizons. Bc. Thesis, in Czech] – 25 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.**

**Annotation:**

The aim of this study was to find out the differences in number of denitrifiers in litter and organic soil horizon of Norway spruce site in Jizerské mountains and deforestrated site in Šumava. The effect of local pH on soil denitrifying bacterial communities was discussed.

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

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích dne .....

## **Poděkování**

Tímto děkuji především svému vedoucímu práce Jirkovi Bártovi za pomoc a trpělivost. Dále děkuji zástupcům Správy CHKO Jizerské hory za vstřícnost a především panu Šnytovi za doprovod při odběrech vzorků a za poskytnuté informace. V neposlední řadě děkuji také rodině za podporu.

## Obsah

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | Úvod.....   | 1  |
| 2     | Literární přehled .....   | 2  |
| 2.1   | Koloběh N v půdě .....  | 2  |
| 2.2   | Různé cesty redukce $\text{NO}_3^-$ .....                       | 3  |
| 2.3   | Způsoby kvantifikace denitrifikačních enzymů .....              | 5  |
| 2.3.1 | DEA (denitrification enzyme activity) .....                     | 5  |
| 2.3.2 | Kvantitativní real-time PCR (qPCR) .....                        | 6  |
| 2.4   | Další metody studia společenstva denitrifikačních bakterií..... | 7  |
| 2.4.1 | Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) .....       | 7  |
| 2.4.2 | Terminal restriction fragment length polymorfism (T-RFLP) ..... | 8  |
| 2.5   | Faktory ovlivňující denitrifikaci .....                         | 8  |
| 2.6   | Půdní horizonty ve vztahu k denitrifikačním bakteriím.....      | 11 |
| 2.6.1 | Opadový horizont .....  | 11 |
| 2.6.2 | Humusový horizont.....  | 11 |
| 3     | Materiály a metody .....  | 12 |
| 3.1   | Popis lokalit.....  | 12 |
| 3.1.1 | Šumava.....   | 12 |
| 3.1.2 | Jizerské hory (JH) .....  | 13 |
| 3.2   | Metody odběru a skladování vzorků .....                         | 13 |
| 3.3   | Analýzy půdy .....  | 14 |
| 3.3.1 | Stanovení C a N ve vodných výluzech.....                        | 14 |
| 3.3.2 | Stanovení pH.....   | 14 |
| 3.3.3 | Stanovení sušiny .....  | 14 |
| 3.4   | Kvantitativní real-time PCR (qPCR) .....                        | 15 |
| 3.5   | Zpracování dat.....   | 15 |
| 4     | Výsledky .....  | 16 |
| 4.1   | Analýzy půdy .....  | 16 |
| 4.2   | Molekulárně biologické analýzy .....                            | 17 |
| 5     | Diskuse.....  | 19 |
| 6     | Závěr .....   | 20 |
| 7     | Literatura.....   | 21 |

# 1 Úvod

Smrkové porosty v povodí Plešného jezera na Šumavě se dlouhodobě vzpamatovávají z negativních dopadů zvýšených atmosférických depozic síranových ( $\text{SO}_4^-$ ) a dusičnanových ( $\text{NO}_3^-$ ) aniontů, kterým podléhaly v druhé polovině minulého století. Acidifikace a celkové oslabení horských smrčín vyústilo v roce 2000 v kůrovcovou kalamitu a odumření téměř čtvrtiny lesního porostu během sedmi let. Tato narušení pak dále ovlivnila i půdní procesy, kdy došlo ke zvýšenému vyplavování  $\text{NO}_3^-$  z poškozených ploch (Svoboda a Hájek 2007 in Čapek 2008).

Přírodní rezervace Černá hora v Jizerských horách byla také v minulosti zasažena kyselými atmosférickými depozicemi, ale ne kůrovcovou kalamitou. Obě lokality s horskými smrčínami tedy prošly podobným vývojem, mají i podobné podloží a další charakteristiky (Plán péče CHKO JH 1997, Kopáček et al. 2002).

Vyplavování  $\text{NO}_3^-$  z půdy narušuje stabilitu a složení půdního mikrobiálního společenstva. Jednou z nejvíce ovlivňovaných skupin mikroorganismů pak mohou být denitrifikační bakterie, které  $\text{NO}_3^-$  využívají při anaerobní respiraci.

Klíčovým krokem denitrifikační respirace je přeměna nitritů ( $\text{NO}_2^-$ ) na oxid dusnatý (NO), protože v tomto kroku enzymy nitrit reduktázy katalyzují reakci se změnou skupenství. Nitrit reduktázy kodují dva geny – *nirK* a *nirS* (Philippot 2002).

Do nedávna byly v půdě studovány molekulárními metodami především denitrifikační bakterie s genem *nirS*. Avšak v poslední době se ukazuje, že přestože jsou počty *nirK* denitrifikátorů nižší, jejich aktivita ve volné půdě je také významná (Castro-González et al. 2005; Michotey et al. 2000; Henry et al. 2004).

Hlavním cílem práce bylo zjistit rozdíly v počtu *nirK* denitrifikátorů v opadovém a humusovém horizontu půdy mezi odlesněným stanovištěm na Šumavě a neodlesněnou plochou v Jizerských horách. Jelikož zvýšené depozice  $\text{NO}_3^-$  výrazně ovlivňují půdní pH, bude to mít v důsledku vliv i na počet denitrifikačních bakterií.

Hypotézy:

S nižším pH bude klesat počet denitrifikátorů

Počet *nirK* denitrifikátorů bude vyšší v humusovém horizontu oproti opadovému horizontu

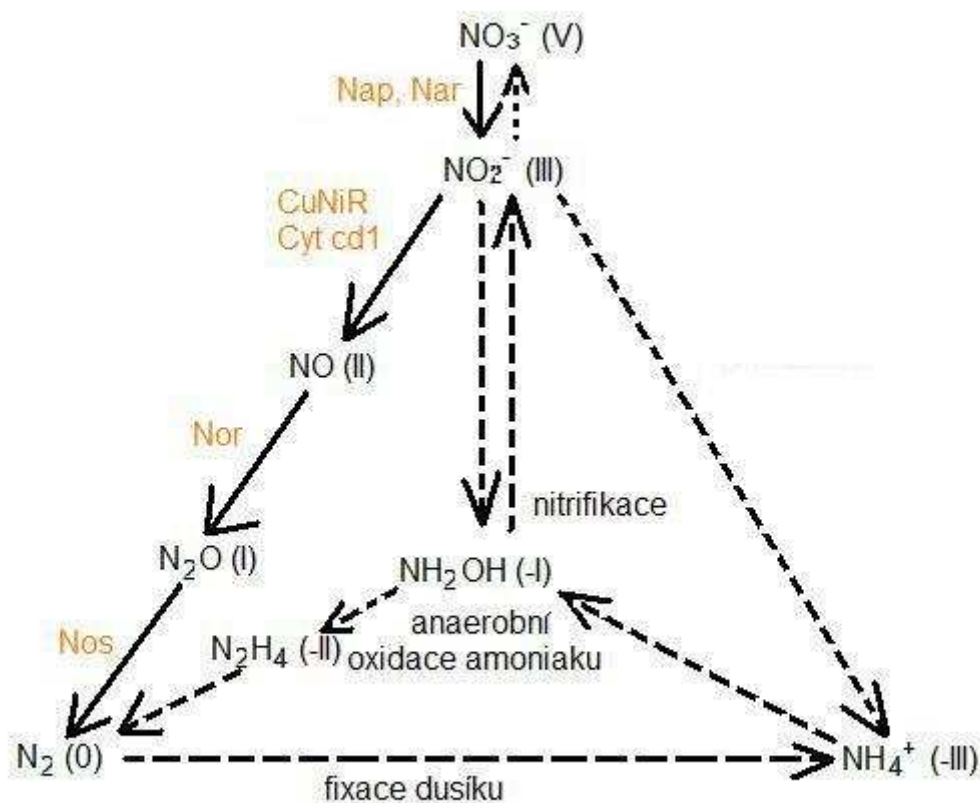
## 2 Literární přehled

### 2.1 Koloběh N v půdě

Jednou z cest vstupu N do půdy je z rozkládající se organické hmoty, kde dochází k jeho přeměně z organicky vázaných forem N (bílkoviny, nukleové kyseliny, aminokyseliny, atd.) do formy anorganické v podobě  $\text{NH}_4^+$  iontů. Cestou nitrifikace je naopak měněna forma přítomného dusíku z  $\text{NH}_4^+$  na  $\text{NO}_3^-$ , který následně může sloužit jako zdroj denitrifikačním bakteriím (Obr. 1). Ti jej využívají v energetickém metabolismu jako alternativní akceptor  $e^-$  při anaerobní respiraci a výsledkem celé denitrifikační cesty je plynný produkt, a to buď oxid dusný ( $\text{N}_2\text{O}$ ) nebo přímo molekulární dusík ( $\text{N}_2$ ), který se vrací do atmosféry.

Velmi významnými zdroji N jsou v současné době antropogenní vlivy. Na šumavských a jizerských lokalitách to byly především kyselé atmosférické depozice N a S v druhé polovině minulého století (Kopáček and Veselý 2005, Borůvka et al. 2005b). Jejich důsledkem bylo postupné okyselování půd. Se změnou pH půdy dochází jak k vymývání důležitých živin, tak i samotných  $\text{NO}_3^-$  a dále k uvolňování toxických forem hliníku (Tomlinson 2003, Borůvka et al. 2005a). Všechny tyto faktory celkově oslabují lesní ekosystém, což v případě lokality Plešného jezera vedlo k propuknutí kůrovcové kalamity a enormnímu odumření lesa.

Rychlost koloběhu ovlivňují četné faktory prostředí jako jsou klima, typ stanoviště a druhové složení vegetace. Nemenší vliv má druhové složení společenstva půdních mikroorganismů. V půdním koloběhu dusíku hrají tedy hlavní úlohu právě mikroorganismy (Šimek 1998).

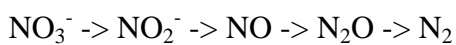


Obr. 1. Schéma přeměn dusíku v půdě. U každé formy dusíku je v závorce jeho oxidační stav. Plnou čarou znázorněna cesta denitrifikace s enzymy podílejícími se na jednotlivých krocích (upraveno podle González et al. 2006)

## 2.2 Různé cesty redukce $\text{NO}_3^-$

Jednou z cest biologických přeměn N v půdě je disimilační redukce  $\text{NO}_3^-$  (denitrifikace). Přesná kvantifikace denitrifikačních procesů a charakterizace denitrifikačních mikroorganismů však bývá často obtížná.

Souhrnná reakce denitrifikace:



Denitrifikace je však pouze jedním druhem redukce  $\text{NO}_3^-$ . Mezi další řadíme asimilační (nerespirační) redukcí  $\text{NO}_3^-$  na  $\text{NH}_4^+$ , pomocí které mikroorganismy získávají stavební dusík při biosyntéze. Ta ovšem není regulována obsahem kyslíku jako pravá denitrifikace. Může být významná zejména v kyselých půdách a ovlivňovat výsledky měření plynných produktů denitrifikace. Dalším typem je disimilační redukce  $\text{NO}_3^-$  na amoniak (DNRA), která je paralelní vlastní disimilační denitrifikaci, je také součástí energetického metabolismu, je regulována obsahem kyslíku, avšak jejím produktem je oproti denitrifikaci místo  $\text{N}_2\text{O}$  nebo  $\text{N}_2$  amoniakální dusík. Ten je pak z buňky vyloučen (Tate 2000).

Denitrifikace vyžaduje k průběhu hypoxické až anoxické podmínky, kdy se místo  $\text{O}_2$  v respiračních reakcích energetického metabolismu konečnými akceptory elektronů stávají  $\text{NO}_3^-$  či  $\text{NO}_2^-$ . Molekuly  $\text{NO}_2^-$  bývají okamžitě přeměňovány na  $\text{NO}$  a  $\text{N}_2\text{O}$ , na  $\text{N}_2$  pak jen část  $\text{N}_2\text{O}$ . Zástupci se řadí mezi bakterie nejrozličnějších fylogenetických skupin, ale funkčně jsou to převážně fakultativní aerobní chemoorganotrofové (Tate 2000, Šimek 1998).

Během redukce  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  musí organismus vykazovat růst, minimálně 80 %  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$  musí být přeměněno na  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{N}_2$ . Jednotlivé redukční kroky při respirační denitrifikaci probíhají značnou rychlostí – je to v danou chvíli hlavní proces zisku energie buňky. Aktivními buněčnými enzymy jsou reduktázy odpovídající za každý jednotlivý krok přeměn (Tate 2000). Na denitrifikačních reakcích se podílejí enzymy z třídy oxidoreduktáz, které jsou pro každý krok procesu specifické (Tab. 1). Prvními aktivními enzymy v denitrifikačním procesu jsou  $\text{NO}_3^-$  reduktázy – byly nalezeny u prokaryot i eukaryotických mikroorganismů, ne všechny tyto organismy však provádějí pravou denitrifikaci (González et al. 2006).



Tab. 1. Geny kodující katalytická místa enzymů odpovídající za jednotlivé kroky denitrifikace (González et al. 2006; Desnues, Michotey et al. 2007; Bedmar et al. 2005; Hendriks, Oubrie et al. 2000)

| krok denitrifikace                          | enzym                         | gen  |
|---|-------------------------------|--|
| $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$   | nitrát reduktáza Nar nebo Nap | <i>NarG</i> nebo <i>NapA</i>                         |
| $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$       | dva typy nitrit reduktázy Nir | <i>NirK</i> nebo <i>NirS</i>                         |
| $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$  | reduktáza oxidu dusnatého Nor | <i>NorB</i> nebo <i>NorC</i> tedy cytochrom b nebo c |
| $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ | reduktáza oxidu dusného Nos   | <i>NosZ</i>  |

## 2.3 Způsoby kvantifikace denitrifikačních enzymů

Potenciální schopnost produkovat denitrifikační enzymy lze zjistit pomocí měření počtu kopií odpovědného genu v půdě, např. cytochrom  $\text{cd}_1$ -nitrit reduktázy – *nirS* nebo v našem případě Cu-nitrit reduktázy – *nirK*, z nichž každý druh denitrifikátora obsahuje jen jeden typ, ale funkčně jsou shodné. *NirK* se vyskytuje v absolutních počtech jen u asi 30 % denitrifikátorů, ale průřezově je ve společenství organismů schopných denitrifikace více zastoupen mezi taxonomicky odlišnými skupinami. Organismy obsahující gen *nirS* se vyskytují spíše v rhizosféře, zatímco *nirK* denitrifikátoři ve volné půdě.

### 2.3.1 DEA (denitrification enzyme activity)

Je to nejvyšší naměřitelná aktivita právě v půdě přítomných (ale ne nově syntetizovaných) enzymů za optimálních podmínek. Jako umělá atmosféra je užíváno helium a k inkubované půdě jsou přidány nitráty ve formě  $\text{KNO}_3$  a glukosa k zajištění co nejvýhodnějších podmínek. Při této metodě je používán acetylenová inhibice kroku  $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ . Aktivita sledovaných enzymů je určována jako rozdíl obsahu oxidu dusného po 30 a po 60 minutách inkubace na plynovém chromatografu. Výsledky se převádějí

na gram suché půdy (Čuhel 2007). Nevýhoda této metody pro naše účely spočívá v tom, že její výsledky představují pouze potenciální denitrifikační aktivitu. Důvodem je laboratorní optimalizace podmínek pro bakterie. Její pomocí se tedy nedá zjistit skutečný stav společenstva v přirozených podmínkách *in situ*.

### 2.3.2 Kvantitativní real-time PCR (qPCR)

Kvantitativní real-time PCR (qPCR) je poměrně nová metoda studia živých organismů pomocí přesné kvantifikace specifického genu ve studovaném vzorku DNA. Po izolaci celkové DNA z půdního vzorku dojde při PCR k namnožení genu v přítomnosti fluorescenčního barviva, které se váže na ampliony DNA (tzv. SybrGreen metoda). Zvyšující se fluorescenční signál je v každém cyklu PCR zaznamenáván přístrojem. S použitím standardů o známé koncentraci genu lze tedy určit původní koncentraci genu v neznámém vzorku izolované DNA.

Jelikož gen *nirK* bývá v bakteriích na genomové DNA v jedné kopii, lze takto určit aktuální počet *nirK* denitrifikátorů ve vzorku celkové vyizolované DNA (Henry et al. 2004, Philippot 2002). Na druhou stranu nelze rozeznat právě aktivně denitrifikující bakterie, protože kvantifikace probíhá na úseku izolované celkové DNA, což nám poskytne informaci pouze o přítomnosti denitrifikátora v půdě, ale už ne o tom, zda je enzym v daný okamžik aktivní.

I metoda qPCR má svá omezení. Jelikož se při kvantifikaci denitrifikačních genů využívají zpravidla degenerované primery, vzrůstá pravděpodobnost tvorby tzv. primerových dimerů (PD) při fluorescenčním vyhodnocování po každém cyklu. Jejich přítomnost může ovlivňovat míru fluorescence produktů reakce. Henry et al. (2006) tomuto jevu předcházeli měřením fluorescence při teplotě 80 °C, při které už jsou PD nestálé. Také inhibitory jako jsou huminové látky, které se mohou koextrahovat spolu s DNA, mohou ovlivňovat výsledky. Ve zmiňované studii byl k vzorkům izolované DNA přidán kontrolní plasmid a jejich fluorescence porovnána s vzorkem samotného plasmidu. Nebylo zjištěno detekovatelné množství inhibitorů, které by pozměňovaly fluorescenční signál.

## 2.4 Další metody studia společenstva denitrifikačních bakterií

Z celého bakteriálního společenstva v půdě bývá jen asi 10 % mikroorganismů metabolicky aktivních. Ty neaktivní jsou buď dormantní (kvůli přechodným nevhodným podmínkám) nebo mrtvé. Sledování mikrobiálního půdního společenstva ztěžuje velká prostorová diverzita (kolem 5000 dominantních druhů bakterií/m<sup>2</sup>; Berg and Laskowski 2006). Z denitrifikačních bakterií byly z půdy izolované především heterotrofní aerobní gramnegativní tyčinky a koky, zástupci jsou půdní a některé vodní rody *Pseudomonas* a *Alcaligenes*. Mnoho určených denitrifikátorů jsou nitrifikační mikroorganismy s denitrifikační aktivitou a také další skupiny bakterií, sirmé, některé patogenní, termofilní (Tate 2000). Ne všichni provádějí denitrifikace způsobem odpovídajícím podmínkám respirační denitrifikace (viz kap. 2.2).

### 2.4.1 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

DGGE bývá často využívána ve spojení se studiem diverzity určitých skupin bakterií a k následné sekvenaci a identifikaci vybraných bandů z denaturačního polyakrylamidového gelu. S její pomocí lze porovnávat mezi sebou příbuznost společenstev podle hlavních společných zástupců nebo ve spojení s přímým určením izolovaných druhů organismů (Desnues et al. 2007, Kirk et al. 2004). Primery pro studium společenstev denitrifikačních bakterií jsou v současné době stále ve vývoji a ne vždy jsou schopny obsáhnout celou diverzitu cílových genů (Nocker et al. 2006).

Například Tröback et al. (2004) prověřovali využitelnost *nosZ*, *nirK* a *nirS* cílených primerů pro studium environmentálních vzorků. Posuzovali schopnost primerů amplifikovat právě cílené sekvence genů *nirK*, *nirS* a *nosZ* a také jak široké spektrum denitrifikačních bakterií s variantami daných genů primery obsáhnou. Potvrdili efektivitu primerů při vyhledávání cílové sekvence u *nosZ* a *nirK* následně i použitelnost DGGE. U všech zkoumaných primerů pak považují za dostatečné i spektrum amplifikovaných variant genů.

### **2.4.2 Terminal restriction fragment length polymorfism (T-RFLP)**

RFLP je další molekulárně biologickou metodou charakterizace mikrobiálních společenstev pomocí štěpení restrikčními endonukleasami cílenými na specifické části řetězce DNA. Fragmenty DNA jsou poté rozděleny při gelové elektroforéze. Modifikací této metody je T-RFLP, při níž se po PCR užívají fluorescenčně terminálně značné primery. Produkty PCR lze pak rozdělit kapilární elektroforézou s detekcí fluorescence nebo přímo na DNA sekvenátoru. T-RFLP je rychlá a citlivá metoda se schopností rozlišit mezi sebou jednotlivé druhy organismů, proto je využívána k studiu diverzity mikrobiálních společenstev (Liu et al. 1997). Nevýhodou jsou problémy se zvolením správně cílených restrikčních enzymů (Ranjard et al. 2000; Tjedje et al. 1999; Hartmann and Widmer 2007).

## **2.5 Faktory ovlivňující denitrifikaci**

Denitrifikační bakterie samotné i jejich enzymatický aparát jsou ovlivňovány řadou faktorů prostředí. Denitrifikace je však kromě faktorů prostředí ovlivněna i samotným složením společenstva denitrifikátorů – někteří jsou specializovaní jen na jeden nebo dva kroky celé denitrifikace, jiní ji provádějí celou nebo celou až na poslední krok  $N_2O \rightarrow N_2$  (González et al. 2006).

### **2.5.1 Vliv půdního pH**

Půdní pH je významné z hlediska optimálních podmínek pro růst denitrifikátorů a dostupnosti živin. Denitrifikační rychlost je hodnotou pH významně ovlivňována (Müller et al. 1980).

Optimální pH pro denitrifikační bakterie se pohybuje v neutrální oblasti (pro  $NO_2^-$  reduktázu je to 6,3 – 6,5 a pro NO reduktázu 7,5 – 7,7; Kuňák 2004). Redukční děje probíhají nejrychleji mezi pH 7 a 8 (Tate 2000, Yatong 1995, Šimek and Hopkins 1999).

Samotná denitrifikace pak probíhá v rozmezí pH od 3 do 9, při poklesu pH pod 5 se denitrifikace zpomaluje a se snížením pH pod 3 dochází k úplnému zastavení denitrifikační činnosti. Zároveň se zpomaluje činnost enzymů podílejících se na posledním kroku denitrifikace a tím se zvyšuje poměr  $\text{N}_2\text{O}$  /  $\text{N}_2$ , až při pH 4 se stává  $\text{N}_2\text{O}$  jediným produktem. Naopak  $\text{N}_2$  se stává hlavním produktem denitrifikace už při pH 6,9 (Weier and Gilliam 1986). Nízké pH ve smrkových lesích může být jedním z limitních faktorů aktivity denitrifikačních mikroorganismů (Müller et al. 1980). Na druhou stranu v dlouhodobě kyselých půdách se mohou bakterie přizpůsobit podmínkám a vykazovat posun optima až k pH 3,9 (Parkin et al. 1985).

Se snížením pH se stávají i samotné  $\text{NO}_3^-$  ionty ve vodě snadno rozpustnými a díky tomu jsou dobře pohyblivé v půdě. Negativní důsledky vymývání  $\text{NO}_3^-$  z půdy do vod jsou dobře známé – jsou to například následný nedostatek živin v půdě a výsledkem je často i eutrofizace vod s negativními dopady na množství vodních organismů. Oproti tomu ztráty dusíku vyplavováním z neporušených lesních porostů jsou jen malé (Berg and Laskowski 2006).

### 2.5.2 Vliv dostupného N

Nejlépe využitelné jsou pro mikroorganismy sloučeniny N, které jsou rozpustné ve vodě, tedy jednoduché a lehce rozložitelné. Ty jsou také v půdě dobře pohyblivé ve vodném roztoku (Zsolnay et al. 1999). Jednou z nejdůležitějších podmínek ovlivňujících denitrifikaci je dostupné množství vstupního reakčního substrátu, kterým jsou  $\text{NO}_3^-$  nebo  $\text{NO}_2^-$ . Jejich koncentrace v půdě se mění odběrem rostlinami, vyplavováním a využíváním dalšími mikroorganismy.  $\text{NO}_3^-$  je nejvýhodnější substrát denitrifikace – díky vysokému redox potenciálu reakčního páru  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$  (Tate 2000).

### 2.5.3 Vliv dostupného C

Limitním faktorem může být i zdroj uhlíku, který je pro život nezbytně důležitý (Mašín 1999). Je zdrojem elektronů pro redukci  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ . Aktivitu denitrifikátorů ovlivňuje množství, ale i složení půdní organické hmoty, vždy jsou výhodnější snadněji přeměnitelné zdroje uhlíku v podobě jednoduchých, ve vodě rozpustných sloučenin (Zsolnay et al. 1999). Čím více je např. dostupného uhlíku v půdě, tím vyšší množství  $\text{N}_2$  v poměru k  $\text{N}_2\text{O}$  je produkováno (Weier et al. 1993; Šimek 1998). Mimo to i druh donoru elektronů pro vlastní respirační denitrifikaci ovlivňuje aktivitu jednotlivých enzymů (Kuňák 2004).

### 2.5.4 Vliv teploty

Teplotní optimum denitrifikátorů se pohybuje okolo 30 °C (Yatong 1995), zatímco denitrifikace samotná probíhá v rozpětí 0 – 75 °C, i když s vyšší teplotou se snižuje poměr  $\text{N}_2\text{O}$  /  $\text{N}_2$  (teplotní citlivost enzymu). Nízká teplota snižuje zase aktivitu mikroorganismů samotných a také se zpomaluje tok látek v systému, hlavně těch rozpuštěných ve vodě. S vyšší teplotou se daří lépe zachovávat vyšší obsah dostupného dusíku v půdě (Tate 2000, Berg and Laskowski 2006; Oxford 2009).

### 2.5.5 Vliv provzdušnění půdy a vlhkosti

Velmi důležitým faktorem prostředí je obsah kyslíku v půdním profilu. Denitrifikace probíhá jen za sníženého parciálního tlaku kyslíku. Kyslík je daleko výhodnějším terminálním akceptorem elektronů než  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ . Nejcitlivější reduktázou na obsah kyslíku je opět reduktáza oxidu dusného (Tate 2000; Čuhel 2007).

Zvýšená vlhkost půdy a vodní prostředí v půdních porech napomáhají anaerobitě. Také je s vyšší vlhkostí půdního substrátu umožněn vyšší udržitelný obsah dostupného dusíku (Tate 2000; Berg and Laskowski 2006).

## **2.6 Půdní horizonty ve vztahu k denitrifikačním bakteriím**

### **2.6.1 Opadový horizont**

Je blíže povrchu a tím pádem s větším obsahem kyslíku, denitrifikátoři se tu nacházejí jen v omezených bezkyslíkatých prostorech jako jsou vodou vyplněné půdní pory. Blízkost povrchu s rychle se měnící teplotou i vlhkostí nutí organismy zde žijící neustále se přizpůsobovat a reagovat na nastalé změny (Desnues et al. 2007). Přesto obsah dostupných organických látek a tím i rychlost denitrifikace bývá vyšší v opadovém, než v spodních horizontech (Hoffmann et al. 2000, Henrich et al. 1997, Menyailo and Huwe 2000).

### **2.6.2 Humusový horizont**

Je pod opadovým horizontem a dále od povrchu půdy. Snížený obsah kyslíku umožňuje významnější výskyt denitrifikačních bakterií, jsou tu také stálejší podmínky pro jejich rozvoj. Rychlost denitrifikace v smrkových lesích může být vyšší ve spodních horizontech, pH je tu také méně ovlivněno kyselým opadem, a tedy pro denitrifikátory příznivější (Müller 1980).

## 3 Materiály a metody

### 3.1 Popis lokalit

Porovnávali jsme půdy dvou horských smrkových lesů, jednoho poškozeného kůrovcovou kalamitou na Šumavě a druhého nepoškozeného v Jizerských horách. Snažili jsme se vybrat území s podobnými charakteristikami jako jsou nadmořská výška, stáří a historie lesa a geomorfologické poměry. Obě horské smrčiny v minulosti trpěly kyselými atmosférickými depozicemi, v jejichž důsledku došlo k snížení pH půd a poškození lesních porostů (Borůvka et al. 2005a).

#### 3.1.1 Šumava

Národní park Šumava (od r. 1991) se nachází u jihozápadních hranic České republiky a Rakouska. Rozsáhlé pohoří Šumava je třetihorního původu a jeho geologické podloží tvoří především kyselé přeměněné horniny jako jsou žuly a svory. Nachází se zde osm ledovcových jezer, pět z nich na české straně státní hranice (Černé, Čertovo, Laka, Plešné a Prášílské).

Odběrová plocha v povodí Plešného jezera (PL, 48°46' s.š. a 13°52' v.d.) je v nadmořské výšce 1090 m n. m. na úbočí hory Plechý (1378 m n. m.) a je z 99 % pokryta více než 160 let starým smrkovým porostem (*Picea abies*) značně poškozeným kůrovcovou kalamitou. Převládajícími půdními typy jsou zde dystrické kambizemě a podzoly na žulovém podloží (Veselý 1994, in Čapek 2008). Půdní pH je nízké, nejnižších hodnot nabývá v humusovém horizontu (2,5 – 3,1) a nejvyšších v horizontu minerálním (3,2 – 4,4) (Svoboda et al. 2006).



### 3.1.2 Jizerské hory (JH)

Chráněná krajinná oblast Jizerské hory (od r. 1968) se nachází na severu České republiky a zaujímá 368 km<sup>2</sup>. Pohoří Jizerské hory je prvohorního původu. Geologické podloží tvoří z největší části krkonošsko-jizerský žulový masiv. Nacházejí se zde cenná rašeliniště a severní svahy pokrývá souvislý porost bučin (NPR Jizerskohorské bučiny). Imisní holiny na náhorní plošině jsou důsledkem dlouhodobého působení kyselých atmosférických depozic a nevhodného lesního hospodaření v minulém století (Borůvka et al. 2005a).

Studované území přírodní rezervace Černá hora (40,9 ha) se nachází na úbočí a vrcholu stejnojmenné hory na náhorní plošině Jizerských hor u hranic České republiky s Polskem. Odběrové plochy Sněžné věžičky (J1, 1055 m n. m., 50°50' s. š. a 15°12' v. d.) a Černá hora (J2, 1084 m n. m., 50°50' s. š. a 15°12' v. d.) jsou pokryty klimaxovou smrčínou (*Picea abies*). Převládajícím půdním typem Jizerských hor jsou nad 1000 m n. m. typické podzoly. Geologické podloží je žulové. V organickém horizontu měřené pH dosahuje hodnoty 3,95 (Borůvka et al. 2005a).

## 3.2 Metody odběru a skladování vzorků

Všechny vzorky byly odebírány z vrchních horizontů lesní půdy. Opadová vrstva zaujímala 5 – 10 cm a humusová 10 – 20 cm hloubky profilu. Poté, co byla půda přesáta sítem o velikosti ok 5 mm, byla uskladněna pro další laboratorní analýzy v plastových sáčcích v chladícím zařízení při teplotě 5 °C. Pro molekulární analýzy byly vzorky přesáté půdy odebrány do kryozkumavek a uchovávány v mrazícím boxe při teplotě -70 °C.

## 3.3 Analýzy půdy

### 3.3.1 Stanovení C a N ve vodných výluzích

Pro studenovou extrakci (CW) byly ve dvou opakováních vždy 3 g suché půdy zality 30 ml destilované vody a po dobu 30 minut dány třepat. Potom byly přefiltrovány a zmrazeny na -20 °C do vlastní analýzy.

Pro horkovou extrakci (HW) byly 3 g suché půdy zality 50 ml destilované vody a dány na 16 hodin inkubovat za teploty 80 °C. Poté byly vzorky přefiltrovány a zmrazeny na -20 °C. Opět byla provedena dvě opakování.

Celkový obsah extrahovatelného C a N ve výluzích byl poté změřen na TOC/TN analyzátoru (SKALAR FORMACS HT).

### 3.3.2 Stanovení pH

Hodnoty pH byly stanoveny ve studenových výluzích. Poměr voda (deionizovaná)/půda byl 1:10.

### 3.3.3 Stanovení sušiny

Půda pro analýzy byla sušena při laboratorní teplotě, proto i sušina byla stanovována za těchto podmínek. Přibližně 5 g půdy ve třech opakováních bylo naváženo na předvážkách do předem zvážených hliníkových váženek a ponecháno sušit do konstantní hmotnosti. Poté byly váženky se suchou půdou opět zváženy a určen poměr suché a čerstvé hmotnosti půdy.

**Suchá hmotnost půdy  $s$ :**

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

$m_v$  ... hmotnost váženky [g]

$m_s$  ... hmotnost váženky se suchou půdou [g]

$m_i$  ... hmotnost vlhké půdy [g]

### 3.4 Kvantitativní real-time PCR (qPCR)

Extrakce DNA z půdy byla prováděna pomocí SoilMaster DNA Extraction Kit dle pokynů výrobce. Pro zvýšení množství izolované DNA byla hmotnost vzorku půdy použitého pro extrakci upraveno na 250 mg. Vzhledem k tomu, že půdní bakterie mají silnou buněčnou stěnu, bylo k vzorku půdy pro izolaci přidáno 350 mg skleněných kuliček o průměru 0,5 mm a 350 mg o průměru 0,1 mm, a po třetím kroku extrakčního postupu přidán krok zahrnující 30 sekund bead-beatingu (MiniBeadBeater, Biospec Products, USA).

Přítomnost extrahované DNA ve vzorku byla ověřena po izolaci na spektrofotometru (BioPhotometer, Eppendorf, Německo) při 260 nm a zároveň provedena kontrola čistoty izolovaného vzorku poměrem absorbancí při 260/280 nm pro kontaminaci proteiny a při 260/230 nm pro kontaminaci půdními organickými látkami. Po amplifikaci vzorků pomocí qPCR byla požadovaná velikost fragmentů DNA zkontrolována na 1,5% agarosovém gelu při elektroforéze (110 V, 45 min).

V jednotlivých horizontech byl pomocí qPCR stanoven celkový obsah DNA a zároveň obsah DNA *nirK* denitrifikátorů. Podstatná část metodiky qPCR a použité primery jsou převzaty z práce Henry et al. (2004), s malými optimalizačními úpravami. Amplifikace úseků DNA byla provedena na přístroji StepONE RealTime PCR System (AppliedBiosystems, USA). Standardní křivka byla vytvořena desítkovým řaděním linearizovaného plazmidu obsahujícího *nirK* gen. Byly použity degenerované primery (5'-3') *nirK876* (ATYGGCGGVAYGGCGA) a *nirK1040* (GCCTCGATCAGRTRTGGTT) amplifikující 165 bp dlouhý úsek *nirK* genu (Henry et al. 2004).

Pro PCR byla použita reakční směs SybrGreen PCR Master Mix (AppliedBiosystems, UK) a detekce amplifikované DNA SybrGreenem.

### 3.5 Zpracování dat

Naměřená data byla vyhodnocena v programu Microsoft Excel. Data pro qPCR byla vyhodnocena v programu SteOne Software v. 2.0.

## 4 Výsledky

### 4.1 Analýzy půdy

V Tab. 2 jsou shrnuty výsledky laboratorních analýz půdních vzorků z J1 a J2 a pro porovnání uvedeny stejné charakteristiky i z PL. Hlavní referenční charakteristika, pH, je pro všechny lokality vyšší v opadovém horizontu. Ovšem nejnižší rozdíl v pH mezi horizonty vykazuje lokalita PL, nejvyšší pak – a to téměř o jeden řád – plocha J2.

Obsah živin N a C měřený ve vyluzích je na všech lokalitách (až na HW extrakt N v PL) vyšší v opadovém horizontu. Nejvyšší rozdíly vykazují koncentrace N a C mezi horizonty na lokalitě J2, kdy jsou ve většině případů (až na HW extrakt C) přibližně dvojnásobné.

Tab. 2. Vybrané fyzikálně-chemické charakteristiky (C (CW)- celkový uhlík ve studenovodném extraktu; C (HW)- celkový uhlík v horkovodném extraktu; N (CW)-celkový dusík ve studenovodném extraktu; N (HW)-celkový dusík v horkovodném extraktu) půdních horizontů ve 3 zkoumaných lokalitách (PL – lokalita u Plešného jezera, J1-1. lokalita v Jizerských horách (Sněžné věžičky), J2-2. lokalita v Jizerských horách (Černá hora)). V závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky.

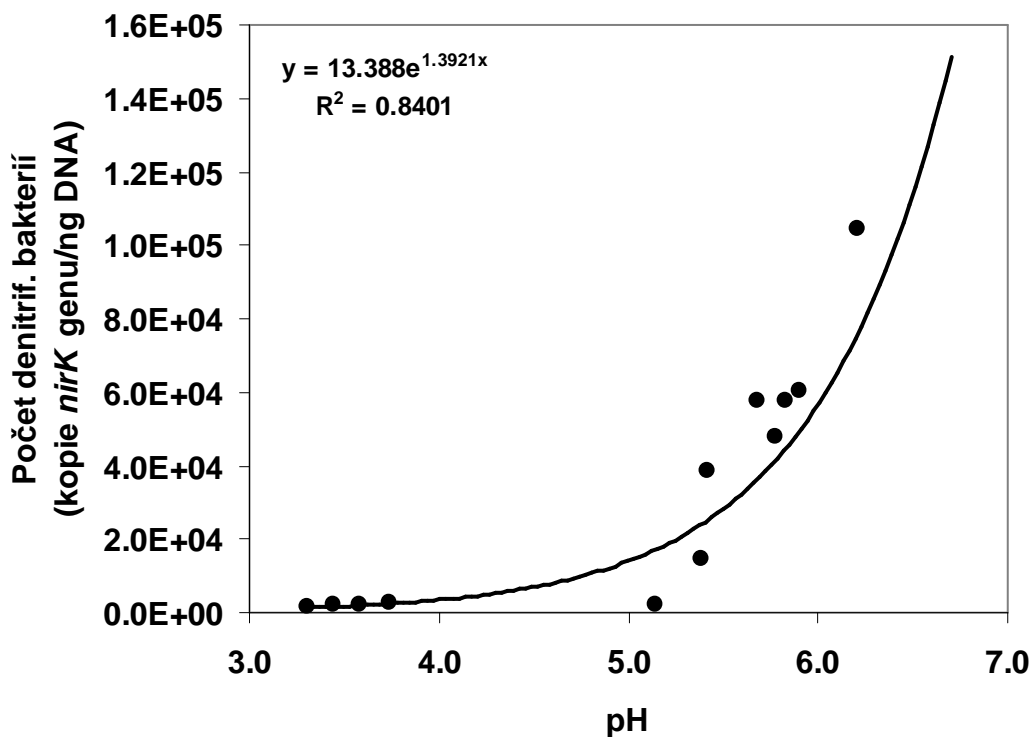
|                          |    | C (CW)              | C (HW)        | N (CW)  | N(HW)       | pH (H <sub>2</sub> O) | C/N<br>CW | C/N<br>HW |
|--------------------------|----|---------------------|---------------|---------|-------------|-----------------------|-----------|-----------|
|                          |    | mg.kg <sup>-1</sup> |               |         |             |                       |           |           |
| <b>Opadový horizont</b>  | PL | 1489 (88)           | 24205 (10195) | 74 (4)  | 2609 (19)   | 3.59                  | 20        | 9         |
|                          | J1 | 5280 (589)          | 84480 (886)   | 78 (14) | 5771 (133)  | 5.75                  | 20        | 5         |
|                          | J2 | 2991 (46)           | 86350 (8557)  | 58 (1)  | 4294 (131)  | 5.58                  | 68        | 15        |
| <b>Humusový horizont</b> | PL | 1462 (120)          | 15105 (750)   | 73 (1)  | 2947 (602)  | 3.45                  | 49        | 14        |
|                          | J1 | 6160 (178)          | 65429 (1425)  | 126 (1) | 6128 (1290) | 6.05                  | 51        | 15        |
|                          | J2 | 2214 (338)          | 61481 (197)   | 59 (18) | 3785 (115)  | 5.28                  | 40        | 16        |

## 4.2 Molekulárně biologické analýzy

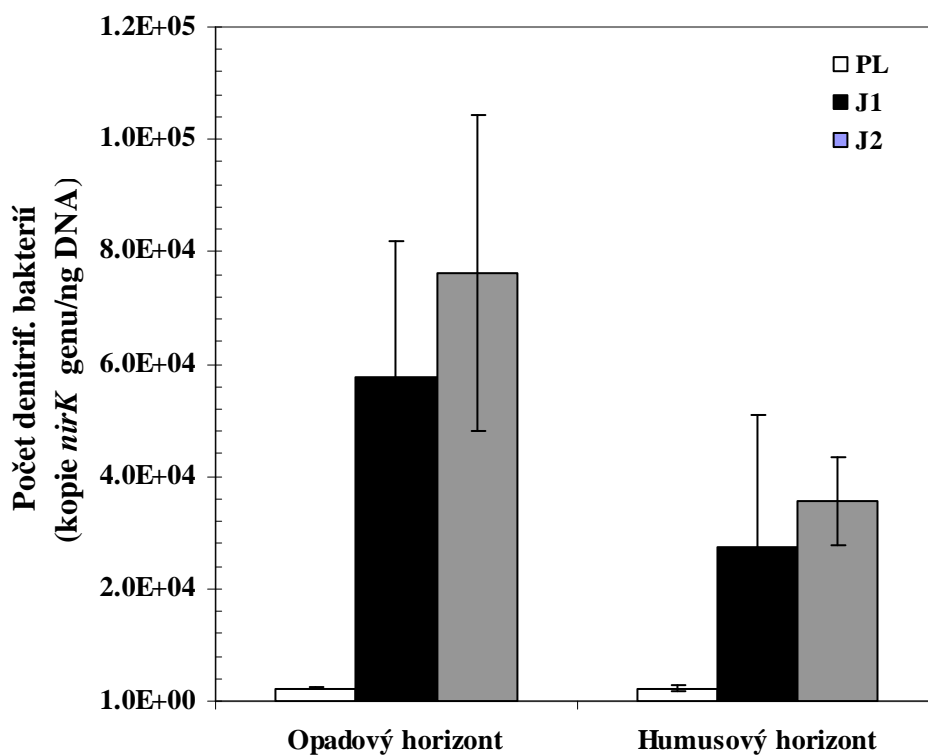
Na Obr. 2 je jasně rozpoznatelná závislost množství přítomných denitrifikátorů na půdním pH. Závislost je exponenciální.

V grafu (Obr. 3) jsou vyneseny průměrné hodnoty se směrodatnými odchylkami (n=4) počtů *nirK* v obou horizontech jednotlivých ploch. Vyšší zastoupení *nirK* bakterií bylo ve vzorcích z Jizerských hor pomocí qPCR zjištěno ve vrchním opadovém horizontu. Ale v zastoupení denitrifikačních bakterií plochy PL nejsou mezi horizonty patrné rozdíly. V Jizerských horách (J1 a J2) jsou počty denitrifikátorů u obou horizontů několikanásobně vyšší, než na PL.

Obr 2. Korelace mezi pH a množstvím *nirK* denitrifikátorů



Obr 3: Porovnání počtu denitrifikačních bakterií mezi jednotlivými lokalitami (PL- lokalita Plešné jezero, J1 – 1. lokalita v Jizerských horách (Sněžné věžičky), J2-2. lokalita v Jizerských horách (Černá hora))



## 5 Diskuse

Při vyhodnocování dat (zvláště molekulárních analýz) jsme vycházeli z faktu, že *nirK* gen je v genomu daných denitrifikátorů zastoupen jen v jedné kopii, proto jsme mohli porovnávat absolutní počty denitrifikačních bakterií v půdě (Henry et al. 2004, Philippot 2002).

Nižší pH ve spodních horizontech studovaných půd naznačuje správnost předpokladu o vyplavování  $\text{NO}_3^-$  v důsledku kyselých atmosférických depozic (Svoboda a Hájek 2007 in Čapek 2008). Příčinou zvýšené acidity nemusejí být jen ionty  $\text{NO}_3^-$ , ale i organické kyseliny vyplavované ze smrkového opadu (Smemo et al. 2006). Ty však nemohou ovlivnit humusový horizont více, než opadový, musíme tedy hlavní původce zvýšené kyselosti hledat jinde. Vzhledem k tomu, že pokles pH s hloubkou profilu vykazují všechny lokality a všechny se vyvíjely na stejné matečné hornině – kyselotvorné žule, může být zvýšená kyselost částečně odrazem také této stanovištní charakteristiky.

Na Obr. 2 je závislost půdních denitrifikátorů na pH exponenciální nejspíše proto, že optimum tohoto typu bakterií se pohybuje v neutrálních hodnotách (Tate 2000, Yatong 1995, Šimek and Hopkins 1999). V kyselém prostředí je omezena funkce citlivých reduktáz (Kuňák 2004). Při zvyšování pH nad 5 počty denitrifikátorů začnou rychleji narůstat, protože prostředí je pro ně daleko příznivější a také je v půdě více dostupných živin, jak ukazuje Tab.2.

Různý počet *nirK* bakterií v půdních horizontech může být opět potvrzením předpokladu o vlivu pH na denitrifikátory. Snížené pH v humusovém horizontu mohlo mít za následek úbytek denitrifikátorů, kteří jsou na změnu pH citliví (Müller et al. 1980). Na druhou stranu, netečnost bakterií k změně pH na lokalitě PL by mohla znamenat, že společenstvo denitrifikátorů se přizpůsobilo dlouhodobě nepříznivým podmínkám (Parkin et al. 1985). Počty denitrifikátorů mohou stejně dobře kopírovat obsah využitelných živin, protože ty vykazují dle Tab. 2 stejné trendy, jako pH.

Rozdíly mezi PL a JH by mohly reflektovat kalamitní stav PL po poškození kůrovcem, kdy došlo k odlesnění lokality. JH byly také postiženy odumíráním stromů, ale jen jednotlivých exemplářů, nikoli v takovém rozsahu, jako PL. Tyto výsledky by

mohly naznačovat, že přestože *nirK* bakterie bývají ve větší míře zastoupeny ve volné půdě, než v rhizosféře, může na ně odumření lesa mít podobný vliv, jako na zastoupení *nirS*, u kterých je v případě odlesnění předpokládán pokles početnosti.

Vyšší zastoupení *nirK* ve vrchních horizontech je také častěji zmiňováno v literatuře jako přirozené (Hoffmann et al. 2000, Henrich et al. 1997, Menyailo and Huwe 2000) oproti zmíenkám o posunech ve funkci a přizpůsobení společenstva (Müller 1980).

## 6 Závěr

Počet *nirK* denitrifikačních bakterií závisí mimo jiné i na pH a při poklesu pH klesá i zastoupení denitrifikátorů. Zároveň je zastoupení *nirK* nižší v humusovém horizontu nebo se mezi horizonty významně neliší, což vyvrací naši hypotézu o nižších počtech denitrifikátorů v opadovém horizontu.



## 7 Literatura

Bedmar E. J., Robles E. F., Delgado M. J. 2005. The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemical Society Transactions*, 33, 141-144.

Berg B., Laskowski R. 2006. Litter decomposition: A guide to carbon and nutrient turnover (Decomposers: Soil microorganisms and animals, Nitrogen dynamics in decomposing litter, Origin and structure of secondary organic matter and sequestration of C and N). In: Caswell, H. (Ed.), *Advances in ecological research*, vol. 38. San Diego, California.

Borůvka L., Mládková L., Drábek O. 2005a. Factors controlling spatial distribution of soil acidification and Al forms in forest soils. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 1796–1806.

Borůvka L., Mládková L., Drábek O., Vašát R. 2005b. Factors of spatial distribution of forest floor properties in the Jizerské Mountains. *Plants, Soils and Environment*, 51, 447–455.

Březina P., Burda J., Dolak J., Farský K., Hušek J., Mejzrová J., Pavlů L., Pelc F., Švejdrová K., Vetešník P., Vlk Z., Vonička P., Vršovský V. 1997. Plán péče CHKO Jizerské hory. Liberec.

Castro-González M., Braker G., Farías L., Ulloa O. 2005. Communities of nirS-type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific. *Environmental Microbiology*, 7, 1298-306.

Čapek P. 2008. Fosfor v lesních půdách v povodí šumavských jezer dostupný *in-situ*. Bc. práce. Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Čuhel J. 2007. Kinetické parametry produkce a redukce oxidu dusného v půdách s různým stupněm pastevní zátěže skotem. Mgr. práce. Biologická fakulta Jihočeské university v Českých Budějovicích.

Desnues C., Michotey V. D., Wieland A., Zhizang C., Fourçans A., Duran R., Bonin P. C. 2007. Seasonal and diel distributions of denitrifying and bacterial communities in a hypersaline microbial mat (Camargue, France). *Water Research*, 41, 3407–3419.

González P. J., Correia C., Moura I., Brondino C. D., Moura J. J. G. 2006. Bacterial nitrate reductases: Molecular and biological aspects of nitrate reduction. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 1015-1023.

Hartmann M., Widmer F.; 2007; Reliability for detecting composition and changes of microbial communities by T-RFLP genetic profiling; *FEMS Microbiology Ecology*, 63, 249–260.

Hendriks J., Oubrie A., Castresana J., Urbani A., Gemeinhardt S., Saraste M. 2000. Nitric oxide reductases in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta– Bioenergetics*, 1459, 266-273.

Henrich M., Haselwandter K. 1997. Denitrification and gaseous nitrogen losses from an acid spruce forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 29, 1529-153.

Henry S., Baudoin E., López-Gutiérrez J. C., Martin-Laurent F., Brauman A., Philippot L. 2004. Quantification of denitrifying bacteria in soils by *nirK* gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 59, 327– 335.

Henry S., Bru D., Stres B., Hallet S., Philippot L. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5181-5189.

Hoffmann C. C., Rysgaard S., Berg P. 2000. Denitrification rates predicted by nitrogen-15 labeled nitrate microcosms studies, in situ measurements, and modeling. *Journal of Environmental Quality*, 29, 2020-2028.

Kirk J. L., Beaudette L. A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J. N., Lee H., Trevors J. T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58, 169– 188.

Kopáček J., Kaňa J., Šantrůčková H., Porcal P., Hejzlar J., Píček T., Veselý J., 2002. Physical, chemical and biochemical characteristics of soils in watersheds of the Bohemian Forest lakes. *Silva Gabreta* 8, 43 – 94.

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

Kuňák M. 2004. Dynamika elektronového toku v periplazmatické části respiračního řetězce bakterie *Paracoccus denitrificans*. Disertační práce. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně.

Liu W.-T., Marsh T. L., Cheng H., Forney L. J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4516–4522.

Mašín M. 1999. Regulační faktory denitrifikace v půdě. Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Michotey V., Me´jean V., Bonin P. 2000. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd1-denitrifying bacteria in environmental marine sample. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1564–1571.

Müller M. M., Sundman V., Skujinš J. 1980. Denitrification in low pH spodzols and peats determined with the acetylene inhibition method. *Applied and Environmental Microbiology*, 40, 235-239.

- Nocker A., Burr M., Camper A. K. 2006. Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. *Microbial Ecology*, 54, 276–289.
- Parkin T. B., Sextone A. J., Tiedje J. M. 1985. Adaptation of denitrifying populations to low soil pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1053-1056.
- Philippot L. 2002. Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1577, 355– 376.
- Ranjard L., Poly F., Nazaret S. 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Research in Microbiology*, 151, 167-177.
- Smemo K. A., Zak, R. D., Pregitzer K. S. 2006. Chronic experimental  $\text{NO}_3^-$  deposition reduces the retention of leaf litter DOC in a northern hardwood forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 1340-1347.
- Smith C. J., Nedwell D. B., Dong L. F., Osborn A. M. 2007. Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3612–3622.
- Svoboda M., Matějka K., Kopáček J. 2006. Biomass and element pools of understory vegetation in the catchments of Čertovo Lake and Plešné Lake in the Bohemian Forest. *Biologia*, Bratislava, 61, 509-521.
- Šimek M. 1998. Denitrifikace v půdě – metodologie a terminologie (studie). *Rostlinná výroba* 44.
- Šimek M., Hopkins D. W. 1999. Regulation of potential denitrification by soil pH in long-term fertilized arable soils. *Biology and Fertility of Soils*, 30, 41-47.

Tate R. L. 2000. Soil microbiology (2nd ed. – Process control in soil, Denitrification). John Wiley and Sons (no editors). 508 p.

Tomlinson G. H. 2003. Acidic deposition, nutrient leaching and forest growth. *Biochemistry*, 65, 51-81.

Trobäck I. N., Enwall K., Jarvis Å., Hallin S. 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 401 – 417.

Weier K. L. and Gilliam J. W. 1986. Effect of acidity on denitrification and nitrous oxide evolution from Atlantic coastal plain soils. *Soil Science Society of America*, 50, 1202-1205.

Weier K. L., Power J. F., Doran J. W., Walters D. T. 1993. Denitrification and the dinitrogen/nitrous oxide ratio as affected by soil water, available carbon, and nitrate. *Soil Science Society of America*, 57, 66-72.

Yatong Xu 1995. Influence of pH and temperature on denitrification. *Water treatment*, 10, 81-88.

Zsolnay A., Baigar E., Jimenez M., Steinweg B., Saccomandi F. 1999. Differentiating with fluorescence spectroscopy the sources of dissolved organic matter in soils subjected to drying. *Chemosphere*, 38, 45-50.