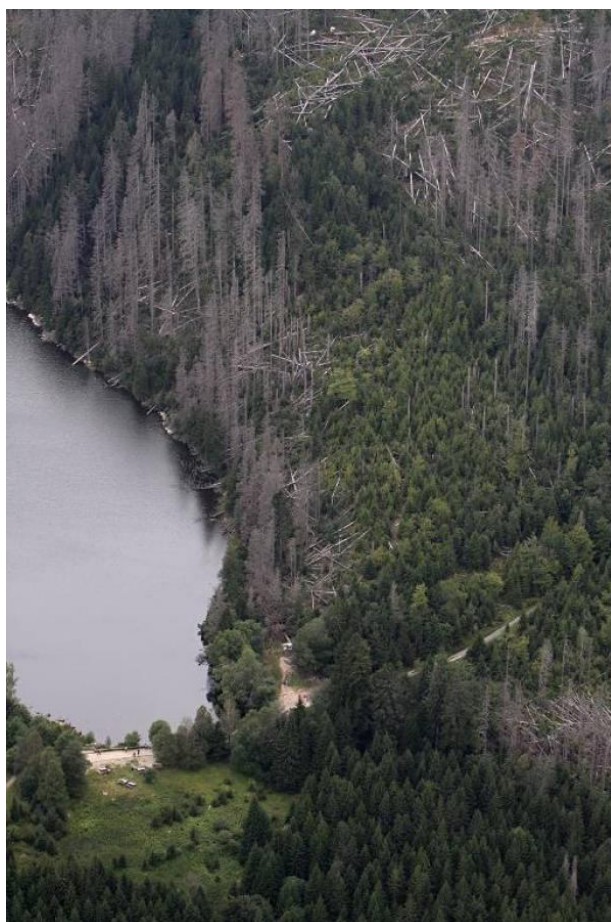


**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**Přírodovědecká fakulta
České Budějovice**

2011



diplomová práce

**Odpověď denitrifikačních bakterií na zvýšené
atmosférické depozice dusíku v půdách smrkového lesa**

vypracovala: Bc. Tereza Melichová

školitel: Ing. Jiří Bárta Ph.D. (JCU)

Melichová T. 2011. Odpověď denitrifikačních bakterií na zvýšené atmosférické depozice dusíku v půdách smrkového lesa [Effect of enhanced atmospheric nitrogen deposition on denitrification bacteria in Norway spruce forest soils. Mgr. Thesis, in Czech] – 55 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of this thesis was to describe the effect of enhanced atmospheric nitrogen deposition on amount of denitrification genes in litter soil horizon of Norway spruce site in Šumava. Nitrous oxide production, soil chemical characteristics, changes in amount of denitrification genes and diversity of bacterial community were determined during incubation experiment.

Anotace:

Cílem práce bylo popsat reakce denitrifikačního společenstva na zvýšené atmosférické depozice dusíku ve smrkovém lese na Šumavě. Během inkubačního experimentu byly měřeny produkce oxidu dusného, chemické parametry půdy, změny v množství denitrifikačních genů a diverzita bakteriálního společenstva.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce.

Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Poděkování

Tímto děkuji především svému vedoucímu práce Jirkovi Bártovi za pomoc a trpělivost. Dále děkuji kolegům z Katedry biologie ekosystémů za vstřícnost a všem, kteří mi poskytovali informace ke zdárnému vypracování práce, za ochotu. Za souhlas s použitím fotografií z NP Šumava děkuji panu Marku Drhovi. V neposlední řadě děkuji také rodině za podporu.

Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1	Denitrifikace	2
2.2	Denitrifikace v opadovém půdním horizontu	3
2.3	Faktory prostředí ovlivňující denitrifikaci	4
2.3.1	Kyslík	4
2.3.2	Teplota	5
2.3.3	pH.....	6
2.3.4	Obsah nitrátů v půdě	7
2.3.5	Organické sloučeniny	8
2.3.6	Vlhkost.....	9
2.3.7	Délka inkubace.....	9
2.4	Fyziologie jednotlivých kroků denitrifikace.....	10
2.4.1	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$	10
2.4.2	$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$	10
2.4.3	$\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$	12
2.4.4	$\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$	13
2.4.5	16S rDNA	13
2.5	qPCR.....	14
2.6	DGGE.....	15
3	Materiály a metody	16
3.1	Popis lokality	16
3.2	Metody odběru a skladování vzorků	16
3.3	Podmínky inkubace a chemické analýzy.....	16
3.4	Molekulární analýzy.....	17
3.4.1	Kvantitativní real-time PCR (qPCR)	17
3.4.2	Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)	18
3.5	Zpracování dat.....	18
4	VÝSLEDKY	19
4.1	Chemické parametry.....	19
4.1.1	Základní chemické charakteristiky použité půdy.....	19
4.1.2	Změny pH v průběhu inkubace	19
4.1.3	Produkce oxidu dusného	20

4.1.4	Změny koncentrace dusičnanu v půdním výluhu	22
4.1.5	Změny obsahu celkového rozpustného dusíku	23
4.1.6	Změny obsahu rozpustných forem uhlíku	24
4.1.7	Změny koncentrace amoniaku v půdním výluhu.....	25
4.1.8	Analýza vzájemného propojení vývoje chemických parametrů	25
4.2	Změny v abundanci denitrifikačních genů	27
4.2.1	Korelace denitrifikačních genů v průběhu inkubace.....	30
4.2.2	Analýzy vztahu obsahu genů k podmínkám prostředí během inkubace.....	31
4.3	Vliv přídavku nitrátů na vývoj bakteriálního společenstva	32
5	DISKUSE	33
5.1	Sledované chemické parametry	33
5.1.1	Produkce oxidu dusného.....	33
5.1.2	Změny koncentrace dusičnanu v půdním výluhu	34
5.1.3	Změny obsahu rozpustných forem uhlíku.....	35
5.1.4	Vliv teploty na denitrifikaci.....	35
5.2	Změny v abundanci denitrifikačních genů	36
5.2.1	Analýzy vztahu obsahu genů k podmínkám prostředí během inkubace.....	38
5.2.2	Vliv přídavku nitrátů na vývoj bakteriálního společenstva	38
6	ZÁVĚRY	39
7	LITERATURA	40
8	Rejstřík zkratk.....	49
9	Přílohy.....	50

1 ÚVOD

Šumavský národní park (založen 1991) se nachází na jihozápadě České republiky a zahrnuje převážně horské a podhorské území. Součástí parku je osm ledovcových jezer, z nichž pět se nachází na české straně hranic s Rakouskem (Černé, Čertovo, Laka, Plešné a Prášílské). Jednou z nejpřirozenějších a nejzachovalejších lesních partií Šumavy je Trojmezenský prales a okolí Plešného jezera v jeho těsné blízkosti (Svoboda 2005, NP Šumava).

Šumava prošla negativními ekologickými změnami v důsledku industriálního rozvoje regionu. V průběhu 20. století se, především díky nárůstu využití fosilních paliv, zvýšily výrazně emise polutantů NO_x a SO_2 (Kopáček and Veselý 2005). Vlhké atmosférické depozice dusíku se zvýšily z 53-75 $\text{mmol/m}^2/\text{rok}$ (v letech 1880-1950) až na přibližně 160 $\text{mmol/m}^2/\text{rok}$ v 80. letech 20. století. Samotné dusičnanové depozice v druhé polovině 80. let činily přibližně 100 $\text{mmol/m}^2/\text{rok}$ (throughfall) (Kopáček *et al.* 2001). Aktuální atmosférické depozice dusíku na Šumavě dosahují hodnoty 62 $\text{mmol/m}^2/\text{rok}$, z toho NO_3^- činí přibližně 29,5 $\text{mmol/m}^2/\text{rok}$ (údaje z roku 2009, data poskytl Jiří Kopáček).

V důsledku vysokých kyselých depozic nastaly změny v chemismu půdy – například se zvýšilo vyplavování dusičnanů z půdy (Kopáček *et al.* 2001), zvýšená kyselost půdy také umožňuje rychlejší vyplavování Ca^{2+} a dalších bazických kationtů (Tomlinson 2003).

Vyplavování NO_3^- z půdy narušuje stabilitu a složení půdního mikrobiálního společenstva. Jednou z nejméně ovlivňovaných skupin mikroorganismů pak mohou být denitrifikační bakterie, které NO_3^- využívají při anaerobní respiraci.

Hlavním cílem práce bylo popsat reakce denitrifikačního společenstva na měnící se vnější podmínky – zvýšený přísun dusičnanů a teplotu inkubace.

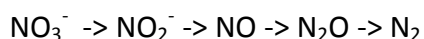
Pracovní hypotézy:

- Zvýšený přísun dusičnanů bude mít za následek nárůst kopií genů odpovědných za denitrifikaci v půdě.
- Při nižší teplotě budou obsahy denitrifikačních genů v půdě nižší, než za vyšší inkubační teploty.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Denitrifikace

Denitrifikace je alternativní respirační metabolismus k získávání energie při nastolení hypoxických až anoxických podmínek prostředí. Je to disimilační redukce dusičnanu (nitrátu, NO_3^-) a dusitanu (nitritu, NO_2^-) v několika krocích na plynné produkty - oxid dusný (N_2O) a molekulární dusík (N_2) přes intermediátor oxid dusnatý (NO). Reakci katalyzuje funkční řetězec enzymů z třídy oxidoreduktáz, specifických pro každý krok reakce (Knowles 1982). Souhrnná schematická reakce denitrifikace:



Denitrifikační bakterie jsou převážně schopny běžného aerobního vývoje s využitím kyslíku jako akceptoru elektronů ve svém energetickém metabolismu, a proto jsou označovány za substrátově nespecifické (Valera and Alexander 1961, Knowles 1982). Pro nastartování denitrifikace je klíčový nízký obsah kyslíku, jakmile začne být pro bakterie limitní, přecházejí na anaerobní respiraci (Bedmar *et al.* 2005). Konečnými akceptory elektronů se následně stávají jiné sloučeniny, než vzdušný kyslík. V denitrifikaci jsou to oxidované sloučeniny dusíku (Desnues *et al.* 2007, Braker *et al.* 1998). Molekuly NO_2^- bývají okamžitě přeměňovány na NO a N_2O , na N_2 pak jen část N_2O (Šimek 1998).

Denitrifikátoři se řadí mezi bakterie nejrůznějších fylogenetických typů, ale funkčně jsou to převážně fakultativní aerobní chemoorganotrofové (Tate 2000, Desnues *et al.* 2007). Jejich zástupci pocházejí ze všech hlavních fyziologicky definovaných skupin kromě *Enterobacteriaceae*, obligátních anaerobů a gram-pozitivních bakterií (vyjma *Bacillus* spp) (Braker *et al.* 1998). Poslední výzkumy ukazují, že geny odpovídající za denitrifikaci se mohou přenášet horizontálním genovým transferem, čímž se schopnost denitrifikace rozšiřuje i mezi fylogeneticky vzdálené organismy (Braker and Tiedje 2003).

Hlavní zájem při studiu denitrifikace se soustřeďuje na pochody z hlediska globálních vlivů produkce skleníkových plynů na zemskou atmosféru. Denitrifikace je nejdůležitějším procesem uvolňujícím dusíkaté sloučeniny do atmosféry z hnojených zemědělských (Braker *et al.* 1998, Dandie *et al.* 2007) nebo podmáčených půd (Mathieu *et al.* 2006). Denitrifikace spolu s nitrifikací také do atmosféry uvolňují

dusíkaté plyny z odpadních vod (Knowles 1982, Braker *et al.* 1998). Vznikající NO a N₂O ve vyšších vrstvách atmosféry narušují ozonovou vrstvu (Conrad 1996). Oxid dusný (N₂O) má jako skleníkový plyn 296krát vyšší potenciál, než oxid uhličitý (CO₂) a díky antropogenním vlivům jeho koncentrace v ovzduší vzrůstá (Lashof and Ahuja 1990 in Henderson *et al.* 2010, IPCC 2001).

2.2 Denitrifikace v opadovém půdním horizontu

Opadový horizont je nejsvrchnější vrstva půdy. Denitrifikující bakterie se tu nacházejí jen v prostorech s nízkým obsahem kyslíku jako jsou vodou vyplněné půdní póry. 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).

Denitrifikace probíhá v půdě v největším měřítku právě v opadovém horizontu, kde mají bakterie nejvydatnější zdroje organických látek i výchozích dusíkatých sloučenin (Parkin *et al.* 1985, Henrich and Haselwandter 1997). V lesní půdě je v opadovém horizontu také nejvyšší množství denitrifikátorů (Henrich and Haselwandter 1997). Platí to jak ve zdravém (revitalizovaném), tak v poškozeném lese (Melichová 2009). Půda v jehličnatém smrkovém lese bývá kyselá díky těžko rozložitelnému kyselému opadu.

Změny společenstev půdních mikroorganismů vykazují vyšší závislost na heterogenitě prostředí, v němž žijí, než na sezonních změnách počasí, teplot a množství srážek nad povrchem půdy (Desnues *et al.* 2007). Půda je v daných parametrech stabilní prostředí, které většinu těchto změn různými mechanismy zmírňuje. Jsou to především stálější obsah vody a půdní organické hmoty zmírňující kolísání teplot i vlhkosti nad povrchem. Stresory v půdě lokálně přítomné mají v krátkodobém časovém horizontu (dny) vyšší účinek než vlivy z vnějšího prostředí. Půda je heterogenní vertikálně (obsah rozložitelné organické hmoty, teplota, obsah kyslíku) i horizontálně (kořenový systém rostlin, biocentra, typ vstupujících látek).

Henrich a Haselwandter (1997) studovali půdní denitrifikaci ve smrkovém lese a výsledky jsou zobecnitelné: Abundance a aktivita denitrifikátorů je vyšší v organických horizontech než v minerálních. Byl porovnáván pozitivní efekt přidavku nitrátů na aktivitu denitrifikátorů v organickém a minerálním horizontu. Denitrifikace byla více podpořena v organickém horizontu, a to i bez přidání jiných stimulantů. S přidáním glukosy se tento trend ještě zvyšoval. V minerálních horizontech pozorovali

významnější nárůst denitrifikační aktivity, než v organických. Zde jsou ovšem denitrifikátoři i při zvýšeném přísunu nitrátů limitováni obsahem organické hmoty. Vyšší abundanci denitrifikátorů ve svrchních vrstvách půdy také napovídá to, že množství vyvinutého oxidu dusnatého bylo řádově vyšší v organickém horizontu. Podle autorů ve spodních horizontech nepodleh denitrifikaci všechen přidaný dusičnan.

2.3 Faktory prostředí ovlivňující denitrifikaci

Vnější podmínky průběhu denitrifikace jsou důležité nejen pro samotné enzymy, které bakterie produkují (Tab. 1), ale také právě pro denitrifikátory samotné. Určující je parciální tlak kyslíku, při hodnotách nelimitujících aerobní metabolismus denitrifikace téměř neprobíhá. Pro průběh reakce samotné jsou hlavní faktory dostupnost živin a substrátu pro denitrifikaci. Ty určují podíl r- a K-strategických funkčních skupin ve společenstvu (Dandie *et al.* 2007, Stenström *et al.* 2001). Dalším klíčovým faktorem jsou pH a teplota, a to především z hlediska složení denitrifikačního společenstva (Conrad 1996).

Půdy obecně odpovídají za přibližně 70 % vstupu N_2O do atmosféry (Conrad 1996). Lesní půdy jsou považovány za významné zdroje N_2O . Emise z temperátních lesů jsou odhadovány na 0,7 – 1,5 Tg N/rok (Schulze and Mooney 1994). Denitrifikace spolu s nitrifikací jsou odpovědné za nejvyšší produkci N_2O z půd ve většině terestrických ekosystémů (Knowles 1982, Henrich and Haselwandter 1997). Nitrifikace má vliv na poměr N_2O / N_2 .

Tab. 1 Geny kodující katalytická místa enzymů odpovídající za jednotlivé kroky denitrifikace

krok denitrifikace	enzym	gen
$NO_3^- \rightarrow NO_2^-$	nitrát reduktáza Nar nebo Nap (EC 1.7.99.4)	<i>NarG</i> nebo <i>NapA</i>
$NO_2^- \rightarrow NO$	dva typy nitrit reduktázy <i>NirK</i> (EC 1.7.1.4) a <i>NirS</i> (EC 1.7.2.1)	<i>NirK</i> nebo <i>NirS</i>
$NO \rightarrow N_2O$	reduktáza oxidu dusnatého Nor (EC 1.7.99.7)	<i>NorB</i> nebo <i>NorC</i> tedy cytochrom b nebo c
$N_2O \rightarrow N_2$	reduktáza oxidu dusného Nos (EC 1.7.99.6)	<i>NosZ</i>

2.3.1 Kyslík

Velmi důležitým faktorem prostředí ovlivňujícím rychlost denitrifikace je obsah kyslíku v půdním profilu (Henrich and Haselwandter 1997, Berks *et al.* 1995, Tate 2000, Davidson and Swank 1986). Kyslík je výhodnějším terminálním akceptorem elektronů

než NO_3^- a NO_2^- (Tate 2000). Je jedním z inhibičních faktorů nejen pro funkci denitrifikačních enzymů, ale také jedním z regulátorů exprese genů kodujících dané enzymy (Conrad 1996, Henrich and Haselwandter 1997). Takto je zajištěna i kontrola spouštění denitrifikačního metabolismu – produkty genů řídících expresi potřebných enzymů odpovídají také za spouštění metabolických pochodů za mikroaerobních a anaerobních podmínek (Bedmar *et al.* 2005, Betlach and Tiedje 1981). Stejně reductázy vykazují v různých bakteriálních kmenech různou citlivost na koncentrace kyslíku (Conrad 1996, Berks *et al.* 1995).

Obsah kyslíku odpovídající 0,2 - 0,5 mg O_2 /l vody již redukuje významně rychlost denitrifikace (Haandel and Lubbe 2007). Castle a kol. (1998) považují za anaerobní podmínky až 5% obsah kyslíku ve vzduchu nad inkubovanou půdou, kde byl ještě prokázán vliv na evoluci N_2O jako hlavního ukazatele denitrifikační aktivity.

Při nadlimitním obsahu kyslíku byla reakce zaznamenána pouze u aerobních denitrifikátorů, kterých je ovšem jen zlomek z celého denitrifikačního společenstva. Aerobní denitrifikace ovšem často běží v případě, že zdroje neumožňují bakterii plně využít aerobní formy zisku energie (Robertson and Kuenen 1990). I u aerobních denitrifikátorů často běží zároveň aerobní metabolismus a denitrifikace - metabolismus bakterie se na hraniční koncentraci kyslíku může „přepínat“ z aerobního na anaerobní a zpět (Zumft 1997). Denitrifikace v aerobních podmínkách běží pomalu a často využívá produktů nitrifikace, která s těmito procesy běží současně. I rychlost aerobní denitrifikace je vyšší za snížených koncentrací kyslíku (Robertson and Kuenen 1990, Chen *et al.* 2003). Enzymy v aerobní denitrifikaci mohou být pozůstatkem z anaerobních podmínek (Zumft 1997).

Obsah kyslíku v půdě je určující pro spuštění metabolismu denitrifikátorů, ale zdá se, že má svůj specifický vliv i na poměr N_2O a N_2 : při mikroaerofilních podmínkách je do jisté míry snížena denitrifikační aktivita, nejcitlivější enzym katalyzující přeměnu $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ je inhibován a zároveň nitrifikátoři mají nedostatek kyslíku pro vlastní metabolismus. Tak se v obou metabolických pochodech zvýší podíl vyvíjeného N_2O . (Betlach and Tiedje 1981, Klemetsson *et al.* 1988, Knowles 1982, Conrad 1996, Tate 2000)

2.3.2 Teplota

Teplota v půdě kolísá daleko méně kolem průměrné teploty, než v atmosféře nad půdním povrchem. Je to především díky půdní vlhkosti, proto jsou v některých

ohledech vlivy teploty i vlhkosti na půdu provázané. Nízká teplota obecně snižuje aktivitu mikroorganismů a také se zpomaluje tok látek v půdním roztoku (Davidson and Swank 1986, Andersson and Nilsson 2001). Při nižších teplotách se však zároveň zvyšuje rozpustnost plynů v půdním roztoku (ovšem distribuce NO a N₂O je důležitá jen pro část denitrifikátorů).

Teplotní optimum denitrifikátorů se pohybuje mezi 25-35 °C (Brady and Weil 1999) v závislosti na ekosystému (podle Haandel and Lubbe 2007 až 40 °C). Denitrifikace samotná probíhá v rozpětí 0 – 75 °C. S teplotou nad optimem ale rychlost denitrifikace rychle klesá – bakterie jsou citlivější na příliš vysokou teplotu než na příliš nízkou. Při měřeních v přírodě vykazují denitrifikátoři nízkou závislost na teplotě v porovnání s jinými faktory prostředí (Henrich and Haselwandter 1997). Davidson a Swank (1986) nepotvrdili závislost na teplotě v laboratorních podmínkách, přestože *in situ* byla v jejich pozorováních silná. V *in situ* podmínkách autoři nedokázali rozlišit produkci N₂O od difuze.

S vyšší teplotou se daří lépe zachovávat vyšší obsah dostupného dusíku v půdě (Tate 2000, Berg and Laskowski 2006).

Vzhledem k tomu, že v přírodě je půda při nižších teplotách v chladných měsících také vlhčí a v letních měsících naopak, vlivy těchto dvou parametrů (teplota a vlhkost) se mohou navzájem rušit (Davidson and Swank 1986).

Nízké teploty zvyšují produkci N₂O na úkor N₂. Öquist a kol. (2007) při teplotách pod nulou potvrdili N₂O jako jediný produkt denitrifikace. Szukics a kol. (2010) vysvětlují tento nárůst citlivostí reduktázy oxidu dusného na nízké teploty.

2.3.3 pH

Půdní pH je významné z hlediska optimálních podmínek pro růst denitrifikátorů a dostupnosti živin. Vyšší obsah NO₃⁻ pH snižuje. Denitrifikační rychlost je stanovištním pH významně ovlivňována (Müller *et al.* 1980).

Optimum pro denitrifikační bakterie se pohybuje v neutrální oblasti.

Redukční děje probíhají nejrychleji mezi pH 7 a 8 (Tate 2000, Šimek and Hopkins 1999, Schulze and Mooney 1994, Valera and Alexander 1961). Denitrifikace probíhá v rozmezí pH od 2,8 do 9, při poklesu pH pod 6 klesá rapidně počet denitrifikátorů v půdě a při pH 5 se denitrifikace zpomaluje (Melichová 2009, Schulze and Mooney 1994). Liu a kol. (2010) zkoumali vliv pH na počty kopií denitrifikačních genů v půdě a došli k výsledku, že nejrychleji stoupají počty při nárůstu pH ze 4 na 6,1.

Nízké pH ve smrkových lesích může být jedním z limitních faktorů aktivity denitrifikačních mikroorganismů (Müller *et al.* 1980, Klemendtsson *et al.* 1977). Zároveň se zpomaluje činnost enzymu katalyzujícího poslední krok denitrifikace a tím se zvyšuje poměr $N_2O / (N_2O + N_2)$. Na druhou stranu v dlouhodobě kyselých půdách se mohou bakterie přizpůsobit podmínkám a vykazovat posun optima do nižších hodnot pH (až 3,9 podle Parkin *et al.* 1985, Šimek *et al.* 2002). Stanovištní pH má významnější vliv na početnost denitrifikátorů, než na celkovou populaci všech bakterií (Valera and Alexander 1961), ale může to být také zprostředkovaný vliv pH prostřednictvím snížené dostupnosti uhlikatých sloučenin (Parkin *et al.* 1985). Valera a Alexander (1961) sledovali velikost populace denitrifikátorů v environmentálních vzorcích a produkci N_2O a N_2 v závislosti na pH. V pH 4 byli denitrifikátoři přítomni. V pH 5 bylo denitrifikátorů přítomno více, ale denitrifikace neprodukovala měřitelná množství N_2O a N_2 . V pH 6 byla populace denitrifikátorů vysoká, až třetina denitrifikátorů produkovala N_2O a N_2 . Pozitivní korelace pH a počtu denitrifikátorů nabývala hodnot od 0,66 do 0,97.

S nižším pH se zvyšuje poměr ve prospěch N_2O , a to při denitrifikaci i nitrifikaci (Henrich and Haselwandter 1997, Klemedtsson *et al.* 1988). N_2O byl dokonce uváděn v kyselých půdách jako jediný plynný produkt díky této inhibici (Sitaula *et al.* 1995, Henrich and Haselwandter 1997). Často jsou to lesní půdy, které jsou kyselé natolik, že je v nich produkce N_2 potlačena (Schulze and Mooney 1994, Sitaula *et al.* 1995). Inhibice kroku $N_2O \rightarrow N_2$ podle různých autorů nastává v různých hodnotách pH, ale je zřejmé, že pod hodnotou pH 4 se již vliv acidity projevuje. Valera a Alexander (1961) popsali jako hraniční pH 5 a hodnoty vyvíjeného plynu N_2 v půdách o vyšší kyselosti již označili za nevýznamné. Jiní autoři uvádějí jako limitní pH 4, kdy je již jediným produktem reakcí N_2O (Knowles 1982, Schulze and Mooney 1994). Nejnižší měřené hodnoty pH ve studiích jsou pak doprovázeny i úbytkem samotného N_2O (pH 2,5 a 3 podle Sitaula *et al.* 1995), což odpovídá inhibici celé denitrifikační aktivity v půdě.

2.3.4 Obsah nitrátů v půdě

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). Jejich koncentrace v půdě se mění odběrem rostlinami, vyplavováním a využíváním dalšími mikroorganismy.

Jednou z nejdůležitějších podmínek ovlivňujících denitrifikaci je dostupné množství vstupního reakčního substrátu, kterým jsou NO_3^- nebo NO_2^- . NO_3^- je z těchto dvou energeticky výhodnější díky vysokému redox potenciálu reakčního páru $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ (Tate 2000). Dostatek dusíkatého substrátu nebo produktu předchozí reakce je také potřebný pro optimální expresi genů odpovídajících za syntézu denitrifikačních reductáz. Některé z těchto genů mohou zvyšovat též svoji expresi za přítomnosti produktů reakce v prostředí (NO_2^- , NO) (Bedmar *et al.* 2005).

Snížení rychlosti denitrifikace nižší dostupností NO_3^- bylo potvrzeno laboratorními experimenty (Parkin *et al.* 1985). Takto může být rychlost reakce snížena zejména v lesích s nedostatkem dusíku (Henrich and Haselwandter 1997, Schulze and Mooney 1994). Na druhou stranu denitrifikátoři neumějí zužitkovat prudký nárůst obsahu NO_3^- v půdě např. po holoseči. Limitní obsah NO_3^- pro denitrifikaci představuje 0,5 mg NO_3^- -N/l (Schulze and Mooney 1994).

Potřebou přísunu NO_3^- a NO_2^- může být denitrifikace závislá na nitrifikaci, která je jí schopna tyto látky poskytovat. Limitace nitrifikace v pH pod 6 se tedy může projevit v nižším přísunu NO_3^- a NO_2^- pro denitrifikátory. V kyselých půdách, které nejsou saturované NO_3^- , může být denitrifikace silně inhibována (Haandel and Lubbe 2007).

Podíl N_2O je kladně závislý na obsahu nitrátů, který také prospívá vlastní denitrifikaci (Sitaula *et al.* 1995). Nejvíce pozitivní efekt na produkci N_2O má dostatek nitrátů i zdroje uhlíku (Henrich and Haselwandter 1997, Weier *et al.* 1993).

2.3.5 Organické sloučeniny

Denitrifikační bakterie jsou převážně organotrofové (Henrich and Haselwandter 1997). Limitním faktorem tedy může být i zdroj uhlíku, který je pro život nezbytně důležitý. Uhlíkaté sloučeniny představují pro denitrifikační společenstvo zdroj elektronů v energetickém metabolismu, který končí odevzdáním elektronu oxidovaným dusíkatým sloučeninám (Haandel and Lubbe 2007). Aktivitu denitrifikátorů ovlivňuje množství, ale i složení půdní organické hmoty, vždy jsou výhodnější lépe přeměnitelné zdroje uhlíku v podobě jednoduchých sloučenin. Druh donoru elektronů pro vlastní respirační denitrifikaci může ovlivňovat pH optimum jednotlivých enzymů (Kuňák 2004).

V kyselých půdách se snižuje dostupnost organických sloučenin pro denitrifikátory (Parkin *et al.* 1985). V lesních půdách se limitace uhlíkem projevuje častěji (Henrich and Haselwandter 1997). Tvorba a srážení nerozpustných sloučenin,

adsorpce na jílové materiály a tvorba komplexů s vícevazebnými kationty jsou hlavní mechanismy vázání organických sloučenin v kyselé půdě (Greenland 1971). V extrémně kyselých půdách se vyvazování organických sloučenin zúčastňují ionty hliníku (Tomlinson 2003). Nízký obsah organických sloučenin vede k vyšší produkci N_2O na úkor N_2 (Weier et al. 1993, Šimek 1998).

2.3.6 Vlhkost

Vlhkost půdy určuje úhrn srážek na stanovišti, sklon svahu, na kterém se lokalita nachází, pokryvnost a funkční typ flory. 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).

Zvýšená vlhkost podporuje dostupnost organických sloučenin, nitrifikační a mineralizační potenciál a snižuje difusní poměry půdních plynů (Davidson and Swank 1986). Díky snížení difusního pohybu plynů v ovlhčené půdě může docházet k zadržení N_2O a díky tomu k podhodnocení denitrifikační aktivity. Szukics a kol. (2010) ve svém experimentu s *nirK* denitrifikátory popsali výraznou závislost na obsahu vody a přímo počet kopií genu vzrůstal s narůstající vlhkostí media, dokud nenastala limitace obsahem NO_3^- .

Vysoká vlhkost zvyšuje podíl produkovaného N_2 z půdy, ale při snížených difusních podmínkách to může také znamenat pouze zdržení N_2O v půdním roztoku a vyplavení (Davidson and Swank 1986).

2.3.7 Délka inkubace

Délky inkubací půdy za účelem studia denitrifikační aktivity se různí. Kratší inkubace (v řádu hodin) může mít výhodu v tom, že přesněji zaznamená reakci bakterií přímo na danou použitou metodu (přídavek), ale musíme počítat s efektem manipulace s půdou před založením experimentu. Delší inkubace (v řádu dní) a popřípadě různé formy předinkubací se používají k nastolení rovnovážných podmínek po manipulaci s půdou. Je u nich ale nutné zahrnout možnost, že společenstvo reaguje rychle a může nejbouřlivějšími změnami projít právě v předinkubaci (Szukics et al. 2010). Tento fakt bývá často opomíjen. Vzhledem k rychlým reakcím denitrifikátorů přítomných v šumavských půdách bylo nutné v experimentu zajistit sledování změn již od začátku inkubace (Melichová 2009, Conrad 1996). (Sitaula et al. 1995, Henrich and

Haselwandter 1997, Watts and Seitzinger 2000, Mathieu *et al.* 2006, Waldrop *et al.* 2004)

2.4 Fyziologie jednotlivých kroků denitrifikace

2.4.1 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$

Prvními aktivními enzymy v denitrifikačním procesu jsou nitrát reduktázy – byly nalezeny u prokaryot i eukaryot, ne všechny tyto organismy však provádějí pravou denitrifikaci (González *et al.* 2006), tj. celou denitrifikační dráhu. Některé tento krok zahrnují do disimilační redukce na amoniak (DNRA) (Bedmar *et al.* 2005, Desnues *et al.* 2007, Philippot 2005, Tate 2000) a některé ho využívají v asimilační (nerespirační) redukci na amoniak, pomocí které mikroorganismy získávají stavební dusík při biosyntéze (Bedmar *et al.* 2005, Tate 2000). Studie denitrifikace se proto často soustřeďují až na reakce následující po redukci dusičnanu (Dandie *et al.* 2007, Philippot 2005).

Při denitrifikaci katalyzují nitrát reduktázy dvouelektronovou redukci dusičnanu na dusitan. Rozlišují se na dva hlavní typy, jedním je Nar a druhým Nap. Následně se u každé z nich rozlišuje několik subtypů (Bedmar *et al.* 2005, Bru *et al.* 2007). Nar je vázána na cytoplasmatickou membránu, kdežto Nap je přítomna periplasmě (Zumft 1997, Richardson *et al.* 2001).

Nar byla identifikována u proteobakterií, *Firmicutes*, aktinobakterií a archaeí, zatímco Nap pouze u proteobakterií (Philippot and Højberg 1999, Richardson *et al.* 2001). Proteobakterie schopné redukce dusičnanů mohou být vybavené jak Nar, tak Nap a dokonce oběma typy enzymu najednou (Philippot 2002, Zumft 1997).

Lépe prostudována je prozatím reduktáza Nar (Bru *et al.* 2007). Nap zřejmě z fyziologického hlediska u různých skupin bakterií nachází různá uplatnění (González *et al.* 2006, Richardson *et al.* 2001). Reduktázu Nar koduje gen *narG*. Bylo zjištěno, že jeden organismus může obsahovat jednu až tři kopie tohoto genu (Philippot 2002).

2.4.2 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$

Vzhledem k unikátnosti enzymů za ni odpovídajících je za skutečně pravou denitrifikační reakci považována až druhá přeměna, kterou představuje jednoelektronová redukce dusitanu na oxid dusnatý (Bedmar *et al.* 2005). Tato reakce je považována za klíčovou také vzhledem k vzniku prvního plynného meziprojektu, a

tím prvním ztrátám dusíku z půdy do atmosféry. Díky tomuto upřednostnění je to jeden z nejlépe prostudovaných kroků denitrifikace (Desnues *et al.* 2007).

Tato reakce je katalyzována enzymem nitrit reduktáza, Nir. V denitrifikačních reakcích se objevují dva typy nitrit reduktázy. Cu-Nir, jejíž metalické redox-aktivní centrum tvoří měď, je kodována jediným genem *nirK*. Druhým typem je reduktáza *cd1-Nir*, jejíž účinnou složkou je cytochrom-*cd1*. Jejím redox-aktivním centrem jsou c-hem a *d1*-hem a je kodována komplexem genů, který je pro účely molekulárních studií zastupován genem *nirS* (Desnues *et al.* 2007, Castro-González *et al.* 2005, Zumft 1997, Bedmar *et al.* 2005).

Jelikož geny *nirK* a *nirS* bývají v bakteriích na genomové DNA v jedné kopii, lze pomocí cílené kvantitativní PCR určit aktuální počet obou typů denitrifikátorů ve vzorku celkové vyizolované DNA (Henry *et al.* 2004, Philippot 2002).

Oba enzymy jsou i přes svoji strukturální odlišnost funkčně a fyziologicky ekvivalentní. Geny *nirK* a *nirS* jsou specifické pro danou skupinu bakterií a vyskytují se u svých nositelů izolovaně, nikdy nebyly nalezeny v jednom kmeni či v jedné bakterii současně (Bedmar *et al.* 2005). Navzdory tomu byly identifikovány i u dvou kmenů jednoho bakteriálního druhu (Braker *et al.* 1998). *NirS* je mezi denitrifikátory více zastoupen, *nirK* obsahuje menší část z nich. Na druhou stranu *nirK* lze najít u více taxonomicky, fyziologicky a funkčně vzdálených skupin než *nirS* (Coyne *et al.* 1989). *NirK* gen neodpovídá fylogenetické segregaci podle 16S rDNA, přestože *nirS* ano (Heylen *et al.* 2006). Horizontální přenos *nirK* genů je možným vysvětlením jeho rozšíření i výskytu v stejných prostředích nezávisle na taxonomické příslušnosti jeho nositelů.

NirK byl identifikován u nitrifikačních, halofilních, fototrofních bakterií a u bakterií pseudomonádového typu, dále byl prokázán u symbiotického fixátora dusíku (*B. japonicum*), gram-pozitivní bakterie (*Bacillus azotoformans*) a vodík oxidující bakterie (*Alcaligenes eutrophus*). *NirS* byl nalezen především ve veliké míře u početné skupiny bakterií pseudomonádového typu, následně ale také u *Aquaspirillum*, *Azospirillum* a *Flavobacterium* (Coyne *et al.* 1989).

Denitrifikátory typu *nirS* ovlivňují výrazně faktory prostředí jako je obsah kyslíku, dusičnanů a samozřejmě i jejich vstupní sloučeniny, dusitanů (Castro-González *et al.* 2005). Optimální pH pro průběh reakce se pohybuje mezi hodnotami 6,3 a 6,5 (Kuňák 2004). Denitrifikátoři *nirS* se zdají být více citliví na obsah kyslíku, než *nirK* (Desnues *et*

al. 2007, Hallin *et al.* 2006). Environmentální regulace exprese enzymů řídících tuto reakci v anaerobních podmínkách je prozatím málo prostudovaná (Conrad 1996). Szukics a kol. (2010) také uvádějí obsah vody v půdě jako jeden z významných environmentálních faktorů ovlivňujících *nirK* denitrifikátory. V neposlední řadě závisí aktivita enzymů s metalickým aktivním místem na dostupnosti stopových kovů pro denitrifikátora (Zumft 1997). Pro *nirK* a *nirS* jsou pochopitelně důležité měď a železo.

2.4.3 NO -> N₂O

Tento krok denitrifikace je některými také považován za klíčový vzhledem k tvorbě vazby mezi atomy dusíku, na rozdíl od vazeb s kyslíkem dosahovaných v reakcích předešlých (Braker and Tiedje 2003, Dermastia *et al.* 1991). Přesto studium genů odpovídajících za expresi katalytických enzymů v environmentálních vzorcích unikalo do nedávné doby pozornosti (Dandie *et al.* 2007).

U bakteriální reduktázy oxidu dusnatého, Nor, jsou rozlišovány opět dva typy (Zumft 2005). Typ označovaný cNor využívá jako donor elektronů cytochrom *c* (či pseudoazurin, dle Bedmar *et al.* 2005) a typu qNor poskytuje elektrony chinol/hydrochinol (Zumft 1997, Hendriks *et al.* 2000, Braker and Tiedje 2003). Reduktázu cNor kodují dva geny (*cnorC* a *cnorB*), za syntézu qNor odpovídá pouze *qnorB* (Zumft 2005). Gen *qnorB* se může v bakteriích v ojedinělém případě vyskytovat ve dvou kopiích – jedna je přítomna na chromozomu a druhá je součástí plazmidu (potvrzeno pouze u jednoho organismu) (Hendriks *et al.* 2000, Zumft 2005).

Mezi denitrifikátory je běžně přítomen cNor, kdežto qNor byl nalezen i u nedenitrifikujících organismů. Zdá se, že u nich má funkci detoxifikačního enzymu odstraňujícího z buněk cytotoxický oxid dusnatý, který také inhibuje funkci metaloproteinů v bakteriálních respiračních řetězcích. qNor může fungovat tímto způsobem například u patogenů, kde odstraňuje NO produkovaný imunitními makrofágy (př. *Neisseria gonorrhoeae* aktivuje qNor v hostiteli). V přírodním prostředí může tento enzym odstraňovat NO produkovaný nitrifikátory, aktinomycetami, sinicemi, řasami i vyššími rostlinami. (Conrad 1996, Dandie *et al.* 2007, Braker and Tiedje 2003, Richardson 2000)

Conrad (1996) poukazuje na to, že vlastní syntéza Nar a Nir nastává již během prvních hodin inkubace, kdežto syntéza Nor může být zpožděna až o den, přičemž je tedy zpožděna i produkce N₂O a v prostředí se může krátkodobě hromadit NO. Přesto

v zahrnutých studiích nebylo zohledněno složení společenstva či sledován další osud produkovaného NO v přírodních vzorcích. Možnost hromadění NO podporuje výsledek studie Mesy a kol. (2002), kdy mutanti s nefunkčními geny *nor* akumulovali NO v mikroaerobních podmínkách.

Aktivitu enzymů typu Nor opět výrazně ovlivňuje pH - optimální pH reduktázy oxidu dusnatého se pohybuje v rozmezí 7,5 – 7,7 (Kuňák 2004). Produkce N₂O byla donedávna z hlediska koncentrace kyslíku v prostředí pouze okrajově studována, neprobíhaly experimenty v anaerobních podmínkách (Firestone and Tiedje 1979, Smith and Tiedje 1979).

2.4.4 N₂O -> N₂

Poslední krok denitrifikace zahrnuje vznik trojné vazby mezi atomy dusíku. Tuto reakci katalyzuje enzym reduktáza oxidu dusného s označením Nos (Bedmar *et al.* 2005).

Aktivní centrum Nos obsahuje měď podobně jako jeden z typů Nir (Schulze and Mooney 1994). Enzym Nos je kodován genem *nosZ*. Tento gen posloužil jako cíl pro specifické i širokospektrální primery vyvinuté pro účely molekulárních studií (Henry *et al.* 2006, Dandie *et al.* 2007).

Nos je velmi citlivá na podmínky prostředí a hlavně různé chemické látky, čehož je často využíváno ve výzkumu. Nos přestává být aktivní při pH prostředí nižší než 4 a také je jeho činnost inhibována látkami jako jsou acetylen, oxid uhelnatý, kyanosloučeniny, nitrapyrin (agrochemikálie) a další (Schulze and Mooney 1994).

Produktem je plynný dusík, jehož nárůst je obtížně měřitelný, a tak je tento krok ve studiích často záměrně inhibován acetylenem (Henrich and Haselwandter 1997). Mimoto produkci dusíku z půdy mohou ovlivňovat také další skupiny organismů. Valera a Alexander (1961) kromě denitrifikátorů popsali jeden typ mikroorganismu tvořící N₂, ale nedenitrifikující.

2.4.5 16S rDNA

16S rDNA je označení pro úsek genetické informace odpovídající za expresi řetězce 16S rRNA neboli za stavbu části malé podjednotky ribozomu v bakteriích (Macrae 2000). Tento gen se nenalézá v jiném organismu, než v bakteriích, a proto lze cílením molekulární metodiky na něj podchytit pouze společenstvo bakterií ve vzorku (Dandie *et al.* 2007).

S pomocí analýzy variant tohoto genu lze odvozovat fylogenetickou příbuznost bakteriálních kmenů a z tohoto hlediska i posuzovat podobnost společenstev v různých přírodních podmínkách. Diverzita bakteriálního společenstva je nejčastěji studována molekulárními metodami právě v podání PCR *16S rDNA* ve spojení s gradientovou elektroforézou (DGGE či TGGE). Jejich výhoda tkví v tom, že zachycují i tu podstatnou část bakterií, která je nekultivovatelná, a proto do zavedení těchto metod nestudovaná. (Macrae 2000)

Přestože kvantitativní PCR poskytuje ve výsledku počet kopií genu v daném substrátu, není možno tyto výsledky přímo interpretovat, protože počty kopií *16S rDNA* genu na buňku se výrazně liší (Dandie *et al.* 2007, Bru *et al.* 2007). Fogel a kol. (1999) uvádí, že kopií může být až 12, Kandeler a kol. (2006) uvádějí dokonce až 15 kopií.

2.5 qPCR

Kvantitativní real-time PCR (qPCR) je metoda studia živých organismů pomocí přesné kvantifikace úseku specifického genu ve studovaném vzorku DNA. Výhoda qPCR tkví v rychlosti a umožňuje analyzovat velké množství vzorků. Před vyvinutím molekulárních metod nebylo možné pomocí kultivačních experimentů zkoumat i nekultivovatelné bakterie. (Dandie *et al.* 2007)

Po extrakci celkové DNA z půdního vzorku dojde při PCR k namnožení genu v přítomnosti fluorescenčního barviva, které se váže na amplikony DNA (tzv. SybrGreen metoda). Zvyšující se fluorescenční signál je v každém cyklu PCR zaznamenáván přístrojem. K určení počtu kopií cílového řetězce se používají standardy o známé koncentraci genu. Získaná data přístroj proloží kalibrační přímkou, a tak lze na jejich základě určit původní koncentraci genu v neznámém vzorku izolované DNA.

Touto metodou nelze rozeznat právě aktivně denitrifikující bakterie, protože kvantifikace probíhá na úseku izolované celkové DNA. Postup nám poskytne informaci pouze o přítomnosti zkoumaného typu denitrifikátora v půdě, ale už ne o tom, zda je enzym v daný okamžik aktivní.

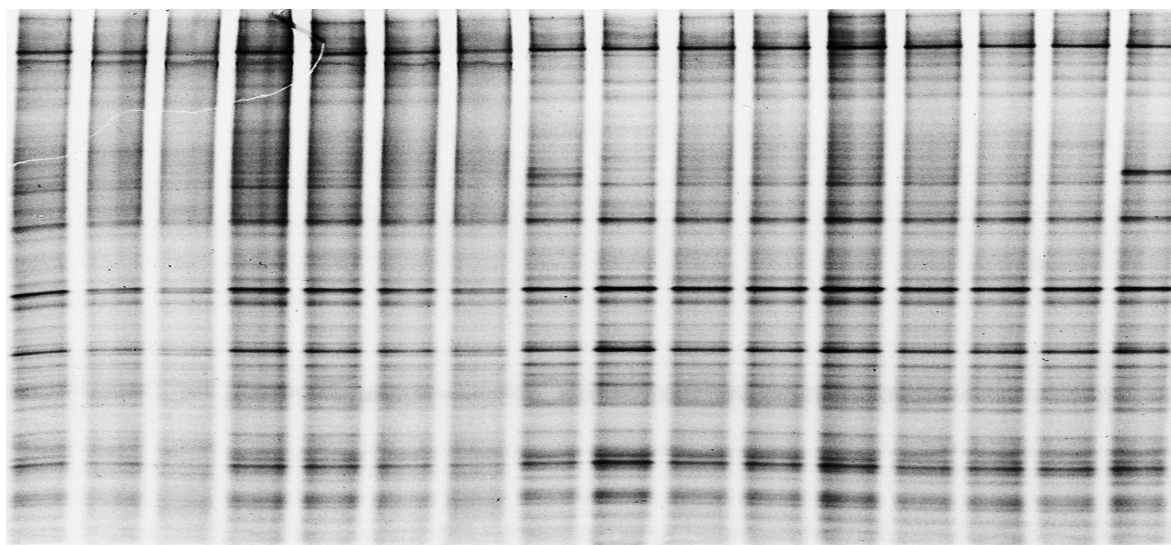
Také inhibitory jako jsou huminové látky, které se mohou koextrahovat spolu s DNA, mohou ovlivňovat výsledky. Ve zmiňované studii (Henry *et al.* 2006) byl k vzorkům izolované DNA přidán kontrolní plasmid a jejich fluorescence porovnána s vzorkem samotného plasmidu. Nebylo zjištěno detekovatelné množství inhibitorů, které by pozměňovaly fluorescenční signál.

2.6 DGGE

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) bývá často využívána pro studium diverzity určitých skupin bakterií a následné sekvenaci a identifikaci vybraných bandů z denaturačního polyakrylamidového gelu. S její pomocí lze porovnávat mezi sebou příbuznost společenstev podle hlavních společných zástupců nebo 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 Thröback *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.

Nové výzkumy však ukazují, že denitrifikační geny se přenášejí horizontálním přenosem (Braker and Tiedje 2003), což neumožňuje sledovat vývoj společenstva pomocí těchto genů. Pro lepší vystižení změn ve složení společenstev jsou vhodnější obecné geny jako je *16SrRNA*. Ten umožňuje sledovat jak změny v celkovém bakteriálním společenstvu, tak i změny v jednotlivých bakteriálních podskupinách jako např. alfa, betaproteobakterie obsahující zástupce denitrifikačních bakterií (Muhling *et al.* 2008).



Obr.č.1 Obrázek gelu denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) pro celkové bakteriální společenstvo (kap. 4.3)

3 Materiály a metody

3.1 Popis lokality

Rozsáhlé pohoří Šumava je třetihorního původu a jeho geologické podloží tvoří především kyselé přeměněné horniny jako jsou žuly a svory. 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). Roční úhrn srážek představuje 1200 – 1500 mm (v roce 2009 činil 1418 mm – údaj poskytl Jiří Kopáček) a průměrná teplota se v roce pohybuje kolem 3,5 až 4°C.

Odběrová plocha v povodí Plešného jezera (PL, 48°46' s.š. a 13°52' v.d.) na Šumavě 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. V podrostu dominuje brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus*). (Svoboda *et al.* 2006)

Na odběrových plochách v povodí Plešného jezera se nachází v O horizontu průměrně 5,5 kg jemnozeme/m² (údaj poskytl Jiří Kaňa).

3.2 Metody odběru a skladování vzorků

Vzorky byly odebrány z opadové vrstvy půdy smrkového lesa, z hloubky 0-2 cm profilu. Poté, co byla půda přesáta sítím o velikosti ok 5 mm, byla uskladněna pro další laboratorní analýzy v plastových sáčcích v mrazícím boxe při teplotě -20 °C. Před založením pokusu byla rozmrazena v chladícím zařízení při teplotě 4°C. Ze tří odběrových míst byl smísením 200 g opadového horizontu vytvořen směsný vzorek pro inkubační pokus.

3.3 Podmínky inkubace a chemické analýzy

Inkubační experiment byl naplánován tak, aby podmínky průběhu co nejlépe odpovídaly přírodním podmínkám původního stanoviště. Přídavek dusičnanů představoval týdenní vlhkou atmosférickou depozici odpovídající imisní situaci v roce 1985 (0,36 umol N/g sušiny opadového horizontu) (údaje poskytla Karolína Tahovská).

Do 104 NTS lahví (100ml) bylo ze směsného vzorku odebráno 5 g půdy. Pro simulaci srážek byl každý vzorek v NTS lahvi ovlhčen 2 ml roztoku 5 ug NO₃⁻-N/g suché půdy (0,36 umol N/g sušiny - simulace depozic) a nebo pouze 2 ml vody (kontrola). Poté byly NTS lahve uzavřeny pryžovou zátkou.

Před vlastním zahájením inkubace byly vzorky propláchnuty heliem k zajištění anaerobního prostředí. Poté bylo po 52 vzorcích (26 x 2 pravá opakování) vloženo do dvou inkubátorů (SANYO, MIR-253) s přednastavenými teplotami 0°C a 10°C (simulace zimních a letních průměrných teplot).

Odběry vzorků probíhaly likvidačním způsobem v časech od 1 h do 7 dnů (příl. č. 1 – rozpis odběrů). Ihned po odebrání byl měřen obsah vyvíjeného N₂O. Následně byly z každého vzorku odebrány 2 g půdy do kryozkumavek a uchovány v mrazícím boxe při teplotě -80°C pro molekulární analýzy.

Zbylé 3 g každého vzorku po inkubaci byly užity po přidání 30 ml 0,5 M K₂SO₄ výluhu pro zjištění obsahu rozpustných forem C a N (TOC/TN analyzátor SKALAR FORMACS HT) a iontů NO₃⁻ a NH₄⁺ (FIA, QuickChem 8500, Lachat Instruments, USA). Obsah DIN byl určen jako součet obsahů NO₃⁻ a NH₄⁺ a obsah DON byl spočítán jako rozdíl DN a DIN. Obsah C_{tot} a N_{tot} byl změřen v mletém vzorku půdy (NC Thermo-Quest, Germany). Dále bylo ve výluhu K₂SO₄ změřeno výměnné pH.

3.4 Molekulární analýzy

3.4.1 Kvantitativní real-time PCR (qPCR)

Extrakce DNA z půdy byla prováděna pomocí kitu Epicentre 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 inkubaci s proteinasou K přidán krok zahrnující 30 sekund bead-beatingu (45 Hz, MiniBeadBeater, Biospec Products, USA). V extrahovaných vzorcích byla stanovena koncentrace DNA metodou měření SybrGreenové fluorescence.

Po amplifikaci vzorků pomocí qPCR byla požadovaná velikost fragmentů DNA zkontrolována na 2% agarosovém gelu při elektroforéze (100 V, 60 min).

Pomocí qPCR byly následně stanoveny obsahy *16S rRNA* genu, *narG* genu, *nirS* genu a *qnorB* genu. Podstatné části metodiky qPCR a použité primery pro stanovení genů jsou převzaty z prací López-Gutiérrez *et al.*, 2004 (*narG*), Thröback *et al.*, 2004 (*nirS*), Braker and Tiedje, 2003 (*qnorB*) a López-Gutiérrez *et al.*, 2004 (*16S rRNA*) s malými optimalizačními úpravami. Amplifikace úseků DNA byla provedena na přístroji StepONE RealTime PCR System (AppliedBiosystems, USA). Standardní křivka byla vytvořena desítkovým ředěním linearizovaného plazmidu obsahujícího daný gen. Byly použity degenerované primery (Tab. 2). Pro PCR byla použita reakční směs FastStart Universal SYBR Green Master (Roche, Germany) a detekce amplifikované DNA SybrGreenem. Velikost amplifikovaných úseků DNA byla potvrzena na 2% agarosovém gelu při elektroforéze (100 V, 60 min).

Tab. 2: Charakteristika použitých primerů

gen	označení	délka ampl. úseku	sekvence (5' - 3')
<i>narG</i>	narG1960m2f	173 bp	TA(CT)GT(GC)GGGCAGGA(AG)AAACTG
	narG2050m2r		CGTAGAAGAAGCTGGTGCTGTT
<i>nirS</i>	nirScd3aF	365 bp	GT(CG)AACGT(CG)AAGGA(AG)AC(CG)GG
	nirSR3cd		GA(CG)TTCGG(AG)TG(CG)GTCTTGA
<i>qnorB</i>	qnorB2F	262 bp	GGNCAYCARGGNTAYGA
	qnorB5R		ACCCANAGRTGNACNACCCACCA
<i>16S</i>	341f	174 bp	CCTACGGGAGGCAGCAG
<i>rRNA</i>	534r		ATTACCGCGGCTGGCA

3.4.2 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

PCR byla provedena metodou nested PCR (Muhling *et al.* 2008). Kvalita PCR produktů byla ověřena elektroforézou na 1,5% agarozovém gelu (8V/cm, 45min). DGGE PCR produktů byla provedena na 8% (w/v) polyakryamidovém gelu denurátý močovinou a formamidem. Denaturační gradient pro všechny tři skupiny (all bacteria, alphaproteobacteria, betaproteobacteria) byl v rozmezí 40-60%. Elektroforéza probíhala v 1x TAE pufru při 60°C, 60V, 18h na přístroji DCode System (Biorad Co., USA). Gely byly poté obarveny SybrGreen roztokem (Sigma Aldrich) po dobu 1h.

3.5 Zpracování dat

Získaná data byla vyhodnocena v programech Microsoft Excel (Office 2007), SteOne Software v. 2.0 (data z qPCR) a v programu Statistica v.9 (BACI, korelační matice, t-test). Obrazová analýza pro DGGE byla provedena v programu Quantity One (Biorad Co., USA). Statistické zhodnocení diverzity proběhlo na základě přítomnosti či nepřítomnosti bandu pomocí programu Canoco 4.0 (multivariační PCA analýza).

4 VÝSLEDKY

4.1 Chemické parametry

4.1.1 Základní chemické charakteristiky použité půdy

Tab.3 Vybrané chemické parametry opadového horizontu odběrové plochy u Plešného jezera (v závorkách uvedeny směrodatné odchylky, uvedené jednotky jsou vztaženy na g sušiny)

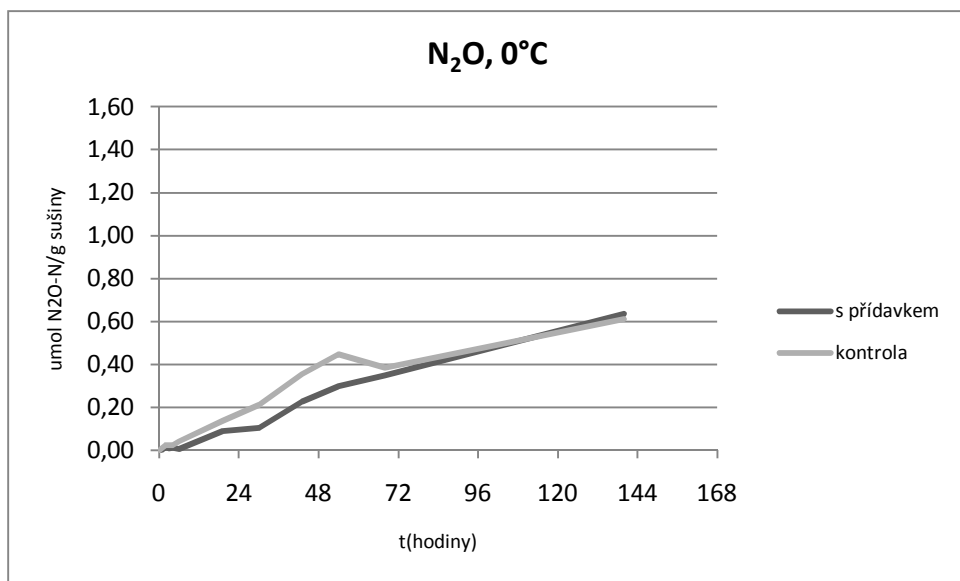
C _{tot} mmol/g	N _{tot} mmol/g	C _{tot} /N _{tot}	DOC umol/g	DN umol/g	NH ₄ ⁺ -N umol/g	NO ₃ ⁻ -N umol/g
38,2 (0,03)	1,42 (0,00)	26,98	69,42 (8,5)	70,6 (13,71)	40,33 (7,7)	8,73 (0,98)

4.1.2 Změny pH v průběhu inkubace

Měřené pH půdy se během inkubace s teplotou ani přidanými nitráty průkazně neměnilo (BACI, F(5, 10)=1,82, p=0,2 při zvolené p=0,05). Jeho průměrná hodnota byla 3,75 (n=24, směr.odchylka=0,04).

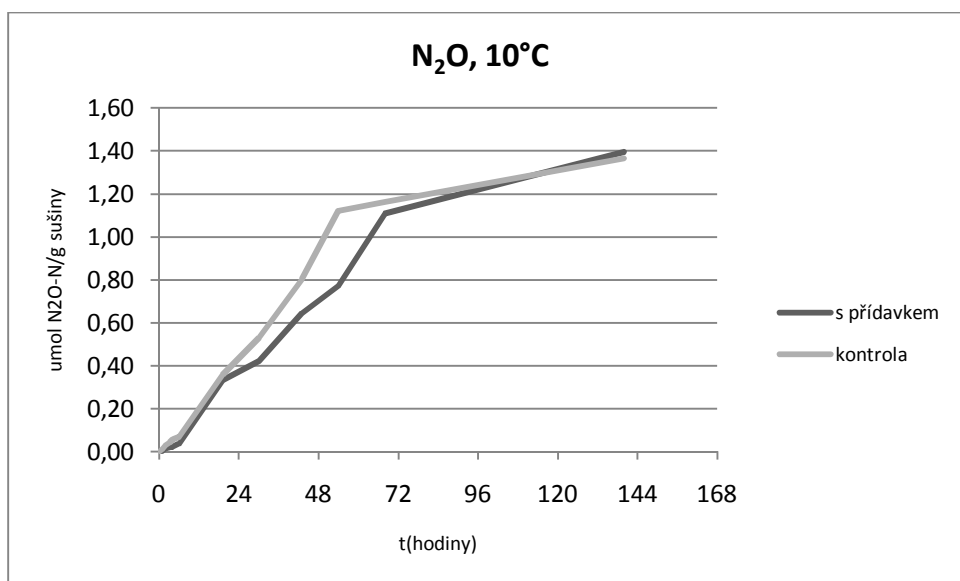
4.1.3 Produkce oxidu dusného

Množství plynného N_2O během inkubace narůstalo (Graf č.1 a 2). V kontrolních vzorcích byly koncentrace N_2O vyšší oproti přidavku během prvních tří dnů inkubace. Nebyly nalezeny průkazné rozdíly mezi kontrolou a variantou s přidavkem při $0^\circ C$ ani $10^\circ C$ na konci inkubace (bod po 140 h inkubace, t-test, $p=0,92$ resp. $0,89$ při zvolené $p=0,05$).



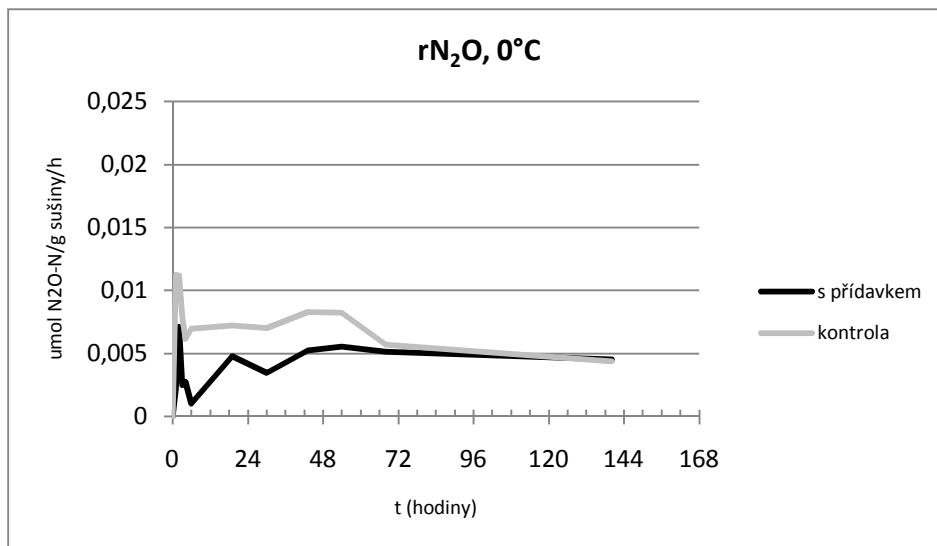
Graf č.1 Porovnání nárůstu obsahu N_2O po přidavku a v kontrole při $0^\circ C$

Koncentrace N_2O v obou variantách při $10^\circ C$ (Graf č.2) rychleji narůstala a na konci inkubace dosáhla u obou variant více než dvojnásobku vyprodukovaného N_2O při teplotě $0^\circ C$ (Graf č.1).



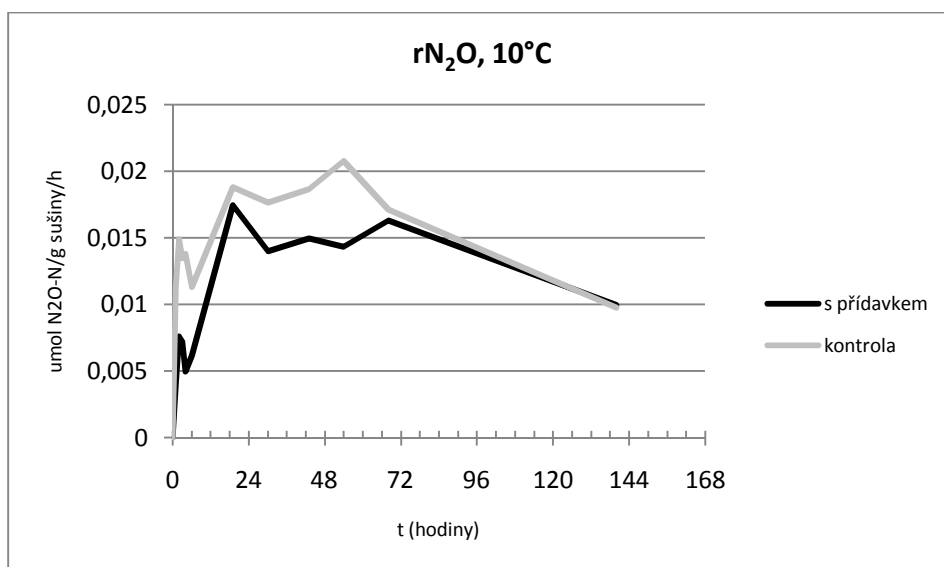
Graf č.2 Porovnání nárůstu obsahu N_2O po přidavku a v kontrole při $10^\circ C$

Rychlost tvorby N_2O (r_{N_2O}) během prvních dvou dnů inkubace kolísala a v následujících dnech začala klesat (Graf č.3 a 4). Vyšší rychlost nárůstu byla pozorována u kontrolních vzorků. Zpomalení nárůstu koncentrace po přidavku i v kontrole nastalo dříve při $0^\circ C$ (Graf č.3). Na konci inkubace byla r_{N_2O} u obou variant při $0^\circ C$ shodná.



Graf č.3 Porovnání průběhu rychlosti produkce oxidu dusného po přidavku a v kontrole při $0^\circ C$ ($n=12$, směř. odchylky: s přidavkem=0,002, kontrola=0,003)

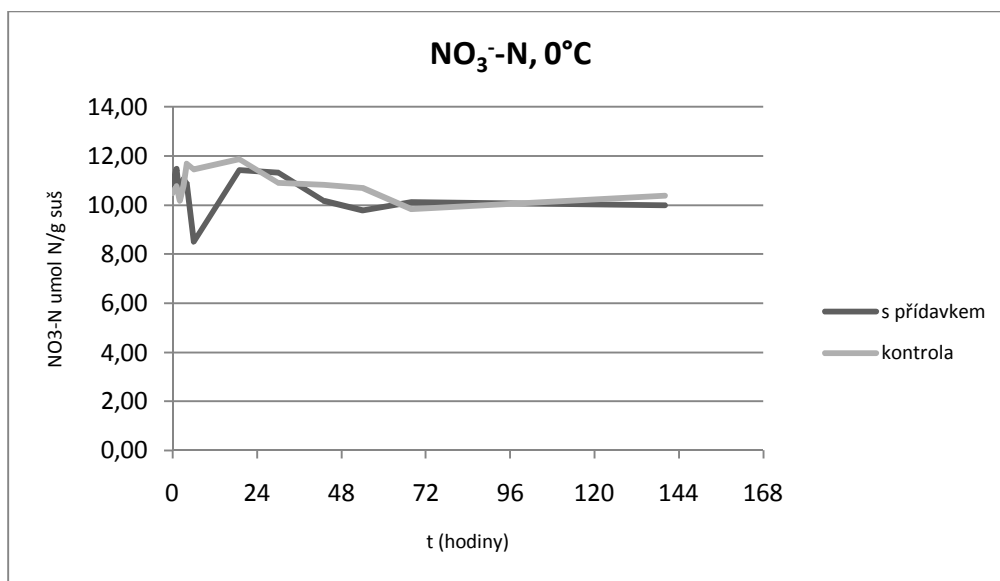
Vyšší r_{N_2O} po přidavku i v kontrole byla pozorována při inkubaci v $10^\circ C$ (Graf č.4). Rychlost produkce N_2O při $10^\circ C$ u obou variant po první dva dny inkubace mezi výkyvy narůstala. Následný pokles rychlosti byl rychlejší v $10^\circ C$ (Graf č.4) u obou variant oproti vývoji v $0^\circ C$ (Graf č.3). Na konci inkubace byla r_{N_2O} u obou variant při $10^\circ C$ shodná, ale oproti hodnotám při $0^\circ C$ dvojnásobná.



Graf č.4 Porovnání průběhu rychlosti produkce oxidu dusného po přidavku a v kontrole při $10^\circ C$ ($n=12$, směř. odchylky: s přidavkem=0,006, kontrola=0,006)

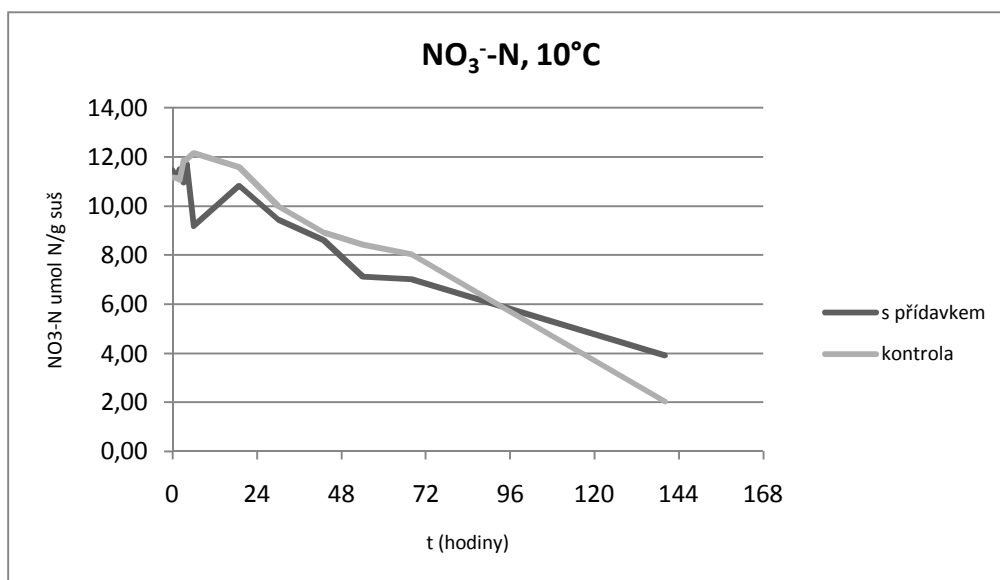
4.1.4 Změny koncentrace dusičnanu v půdním výluhu

Obsah NO_3^- -N při 0°C zůstával během inkubace s nepatrným poklesem přibližně na původních hodnotách (Graf č.5). Výkyvy obsahu NO_3^- -N v prvním dni inkubace byly extrémnější u fáze s přidavkem při obou inkubačních teplotách.



Graf č.5 Porovnání průběhu koncentrace dusičnanového dusíku po přidavku a v kontrole při 0°C

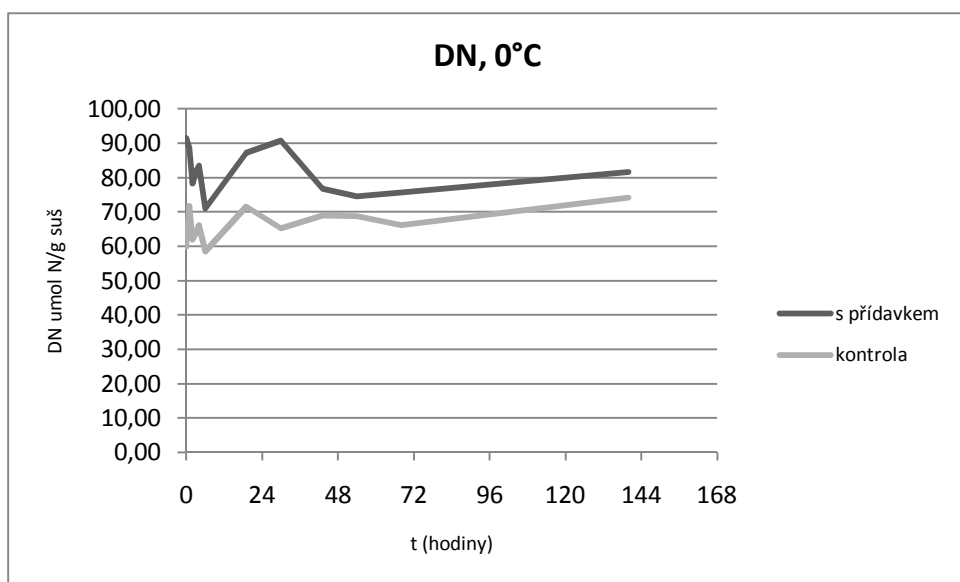
Při 10°C obsah NO_3^- -N během inkubace klesnul významně více, než při 0°C (BACI, $F(6,12)=32,7$, $p=10^{-6}$ při zvolené $p=0,05$), v kontrolním vzorku klesnul více, než ve vzorku s přidavkem (Graf č.6). Obsah dusičnanů v půdě se v průběhu inkubace při obou teplotách snížil (BACI, $F(6, 12)= 3,69$, $p=0,036$ při zvolené $p=0,05$).



Graf č.6 Porovnání průběhu koncentrace dusičnanového dusíku po přidavku a v kontrole při 10°C

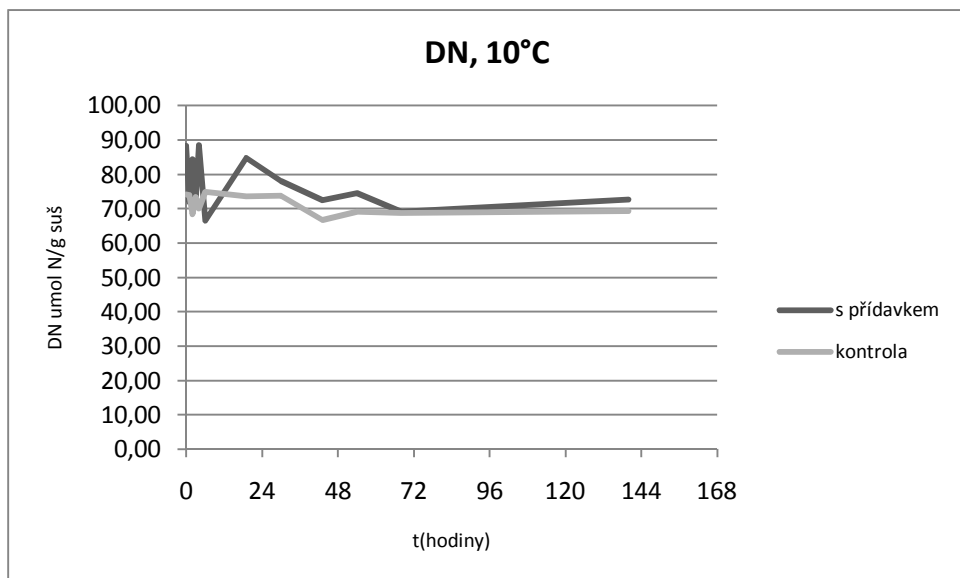
4.1.5 Změny obsahu celkového rozpustného dusíku

Obsah rozpuštěného dusíku procházel v prvním dni inkubace výraznými výkyvy, přičemž obsah dusíku ve fázi s přidavkem byl v obou teplotách v průběhu celé inkubace vyšší (Graf č.7 a 8). Statistická analýza nepotvrdila ani trend vývoje obsahu dusíku v čase ani významný vliv přidavku dusičnanů na celkový obsah rozpustných forem dusíku v průběhu experimentu.



Graf č.7 Porovnání průběhu obsahu celkového dusíku po přidavku a v kontrole při 0°C

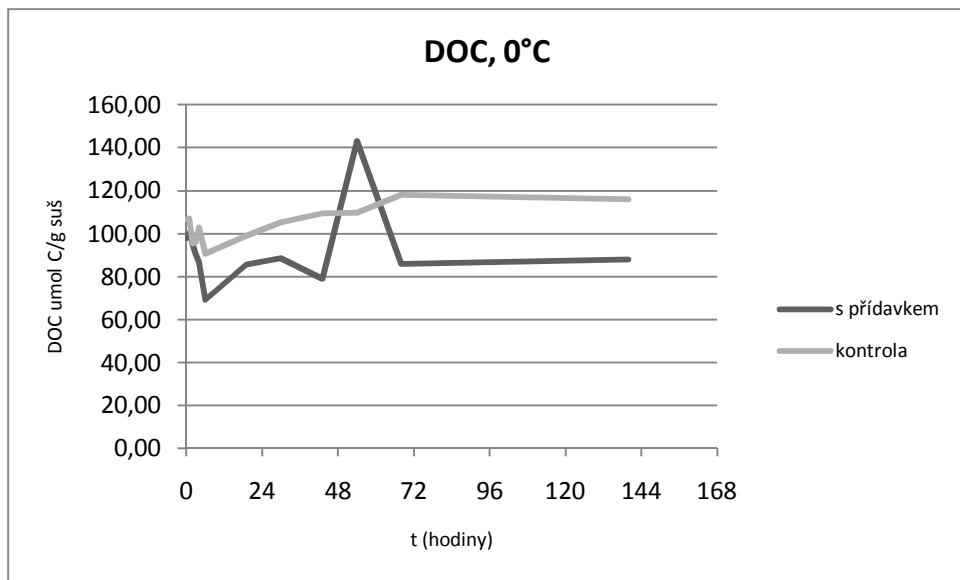
Při 10°C dosahoval DN v kontrole vyšších hodnot, než při 0°C. Obsah DN v kontrole tak při 10°C častěji odpovídal obsahu po přidavku (Graf č.8).



Graf č.8 Porovnání průběhu obsahu celkového dusíku po přidavku a v kontrole při 10°C

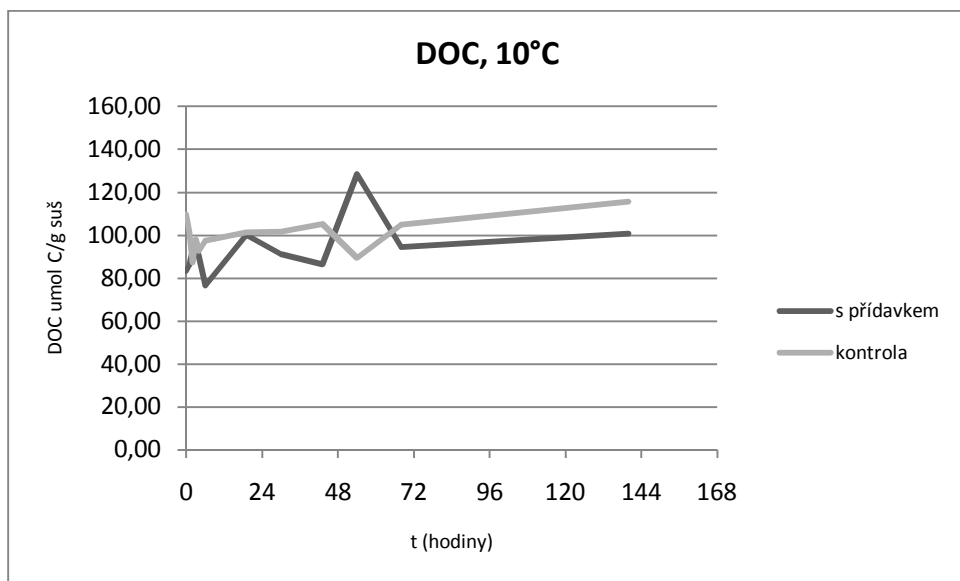
4.1.6 Změny obsahu rozpustných forem uhlíku

Kontrolní vzorky obsahovaly více rozuštěného uhlíku než vzorky po přidavku při 0°C (kromě výkyvu vzorku po přidavku v bodě po 54 h inkubace). Koncentrace DOC se v kontrole během inkubace při 0°C zvýšila, naopak po přidavku se celkově mírně snížila (Graf č.9). Byl prokázán silný vliv přidaného dusičnanu a zároveň délky inkubace na nárůst obsahu uhlíku v půdním výluhu (BACI, interakce, $F(6, 12)=8,26$, $p=0,001$ při zvolené $p=0,05$).



Graf č.9 Porovnání průběhu obsahu celkového uhlíku po přidavku a v kontrole při 0°C

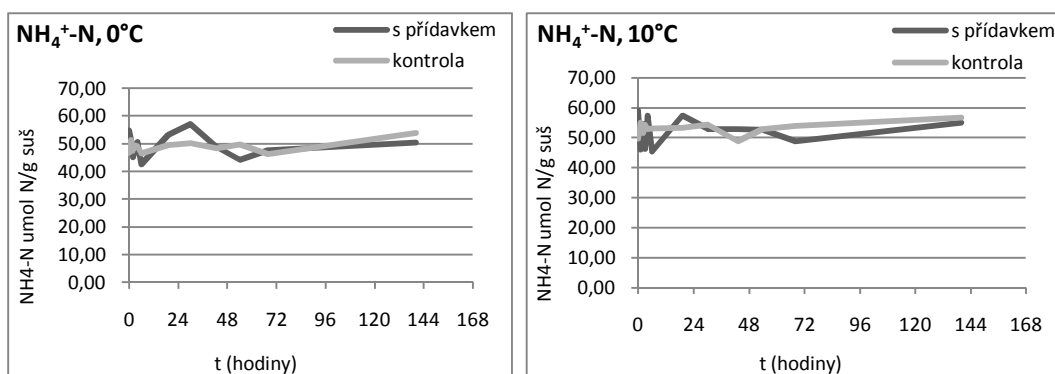
Na rozdíl od inkubace při 0°C se koncentrace DOC celkově zvýšila při 10°C u kontroly i přidavku. V kontrolních vzorcích byly koncentrace rozpustného uhlíku po celou dobu inkubace vyšší (kromě výkyvu v bodě po 54 h inkubace) (Graf č. 10).



Graf č.10 Porovnání průběhu obsahu celkového dusíku po přidavku a v kontrole při 10°C

4.1.7 Změny koncentrace amoniaku v půdním výluhu

Obsah $\text{NH}_4^+\text{-N}$ se mezi výkyvy pohyboval přibližně na počátečních hodnotách (Graf č.11). Při 0°C byl jeho obsah nižší po celou dobu inkubace. Žádný účinek přidávaných dusičnanů na obsah amoniaku nebyl prokázán (BACI, $F(6, 12)=2,36$, $p=0,097$ při zvolené $p=0,05$), pouze výkyvy byly výraznější u fáze s přidavkem při obou teplotách.



Graf č.11 Porovnání průběhu obsahu amoniakálního dusíku po přidavku a při kontrole při 0°C a 10°C

4.1.8 Analýza vzájemného propojení vývoje chemických parametrů

Množství produkovaného N_2O korelovalo v kontrole při 0°C s DOC ($r=0,76$, Tab.4) oproti přidavku, kde tato závislost nebyla pozorována. Dále N_2O silně korelovalo v kontrole (Tab.6) i po přidavku (Tab.7) při 10°C negativně s NO_3^- ($r=-0,89$ resp. $-1,00$). Korelace N_2O s DON a DON/DIN po přidavku při 10°C dosahovala hodnot $-0,78$ a $-0,83$.

Rychlost produkce $r\text{N}_2\text{O}$ korelovala při 0°C v kontrole negativně s DOC/DN ($r=-0,85$, Tab.4) a po přidavku s DN ($r=-0,79$, Tab.5), při 10°C korelace nebyly prokázány.

DOC koreloval při 10°C v kontrole s DOC/DN ($r=0,93$), s DON ($r=0,79$) a DON/DIN ($r=0,80$) (Tab.6) a po přidavku s DOC/DN ($r=0,94$, Tab.7). DOC/DN koreloval v jediném případě s NO_3^- ($r=-0,78$, Tab.6) v kontrole při 10°C .

Dále byla korelace průkazná pouze u zástupců jednotlivých rozpustných forem dusíku.

Tab.4 Korelace sledovaných chemických parametrů v průběhu inkubace v kontrole při 0°C
(n=7, p<0,05)

	rN ₂ O	DOC	DN	DOC/DN	DON	DIN	DON/DIN	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺
N ₂ O	ns	0,76	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rN ₂ O	-	ns	ns	-0,85	ns	ns	ns	ns	ns
DOC		-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DN			-	ns	0,95	0,93	0,94	ns	0,94
DOC/DN				-	ns	ns	ns	ns	ns
DON					-	0,78	1,00	ns	0,80
DIN						-	ns	ns	0,99
DON/DIN							-	ns	0,76
NO ₃ ⁻								-	ns
NH ₄ ⁺									-

Tab.5 Korelace sledovaných chemických parametrů v průběhu inkubace po přidavku při 0°C
(n=7, p<0,05)

	rN ₂ O	DOC	DN	DOC/DN	DON	DIN	DON/DIN	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺
N ₂ O	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rN ₂ O	-	ns	-0,79	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DOC		-	ns	0,97	ns	ns	ns	ns	ns
DN			-	ns	ns	0,96	ns	0,80	0,95
DOC/DN				-	ns	ns	ns	ns	ns
DON					-	ns	ns	ns	ns
DIN						-	ns	ns	1,00
DON/DIN							-	ns	ns
NO ₃ ⁻								-	ns
NH ₄ ⁺									-

Tab.6 Korelace sledovaných chemických parametrů v průběhu inkubace v kontrole při 10°C
(n=7, p<0,05)

	rN ₂ O	DOC	DN	DOC/DN	DON	DIN	DON/DIN	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺
N ₂ O	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0,89	ns
rN ₂ O	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DOC		-	ns	0,93	0,79	ns	0,80	ns	ns
DN			-	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DOC/DN				-	ns	ns	ns	-0,78	ns
DON					-	ns	1,00	ns	ns
DIN						-	ns	ns	ns
DON/DIN							-	ns	ns
NO ₃ ⁻								-	ns
NH ₄ ⁺									-

Tab.7 Korelace sledovaných chemických parametrů v průběhu inkubace po přidavku při 10°C (n=7, p<0,05)

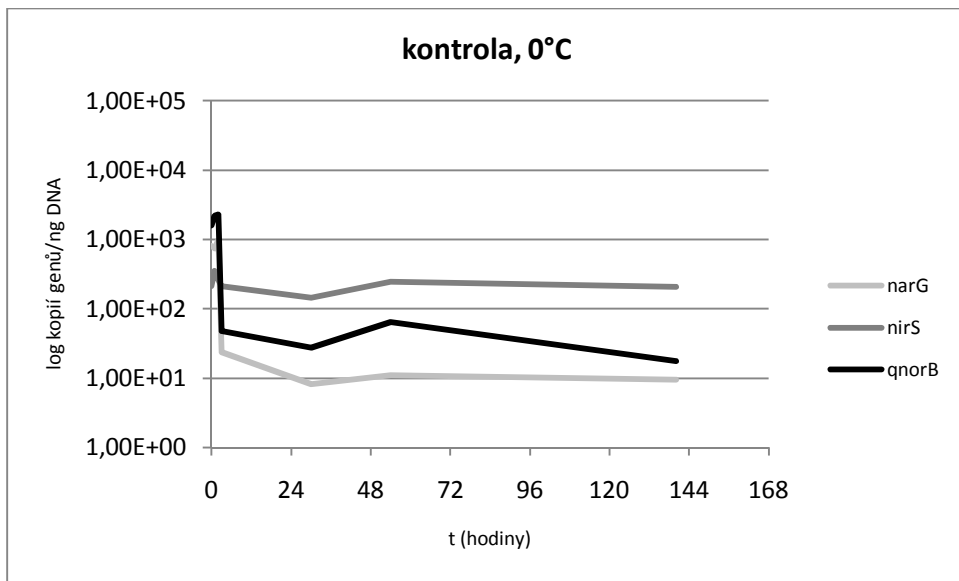
	rN ₂ O	DOC	DN	DOC/DN	DON	DIN	DON/DIN	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺
N ₂ O	ns	ns	ns	ns	-0,78	ns	-0,83	-1,00	ns
rN ₂ O	-	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DOC		-	ns	0,94	ns	ns	ns	ns	ns
DN			-	ns	ns	0,99	ns	ns	0,77
DOC/DN				-	ns	ns	ns	ns	ns
DON					-	ns	0,90	0,81	ns
DIN						-	ns	ns	0,83
DON/DIN							-	0,84	ns
NO ₃ ⁻								-	ns
NH ₄ ⁺									-

4.2 Změny v abundanci denitrifikačních genů

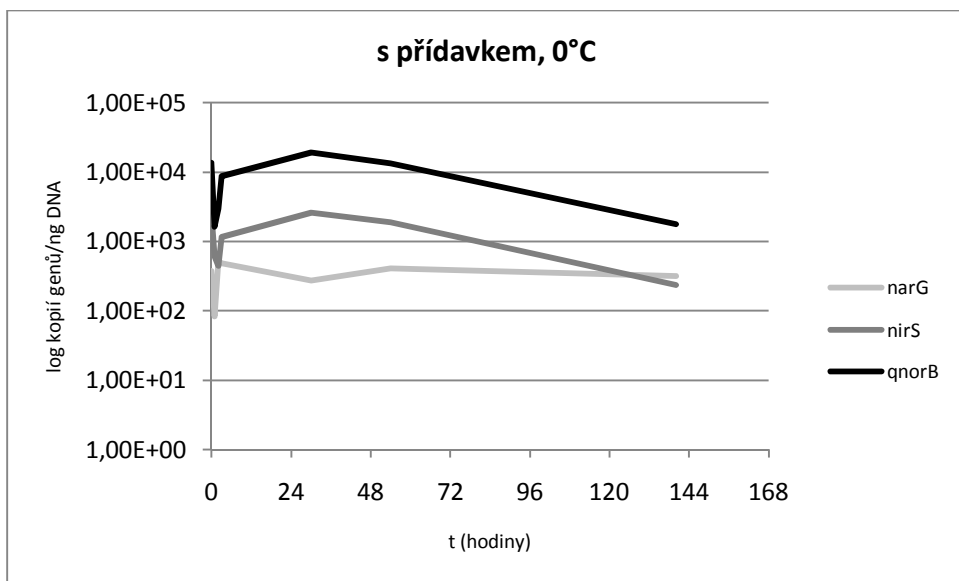
Geny *qnorB* a *nirS* procházely v inkubaci vzájemně velmi podobným vývojem (Graf č. 12, 13, 15). Obsah genu *narG* byl během inkubace nejnižší, s výjimkou posledního bodu v obou teplotách po přidavku, kdy byl nejnižší obsah genu *nirS* (Graf č. 13 a 15). Gen *nirS* převyšoval gen *qnorB* v kontrole (Graf č. 12 a 14) a po přidavku naopak dominoval gen *qnorB* (Graf č. 13 a 15).

Vyšší množství denitrifikačních genů byla pozorována po přidavku dusičnanů v obou teplotách. Gen *narG* byl početnější o dva řády, *nirS* byl početnější o jeden řád a *qnorB* o tři řády (Graf č. 13 až 15). Porovnání proběhlo na zprůměrovaných počtech genů mezi 3. a 140. h inkubace (po ustálení výkyvů).

Průkazně vyšší množství genů *nirS* a *qnorB* byla pozorována v obou teplotách při inkubacích po přidavku dusičnanů (BACI, F(6, 12)=50,97, p=0,019 resp. F(6, 12)=50,8, p=0,019 při zvolené p=0,05). Vliv samotného přidavku na abundanci *narG* byl zanedbatelný (BACI, F(6, 12)=7,43, p=0,11 při zvolené p=0,05), ale významný byl rozdíl mezi přidavkem a kontrolou v průběhu inkubace - množství genu v kontrole kleslo, zatímco po přidavku vzrostlo (BACI, interakce, F(6, 12)=6,05, p=0,003 při zvolené p=0,05).

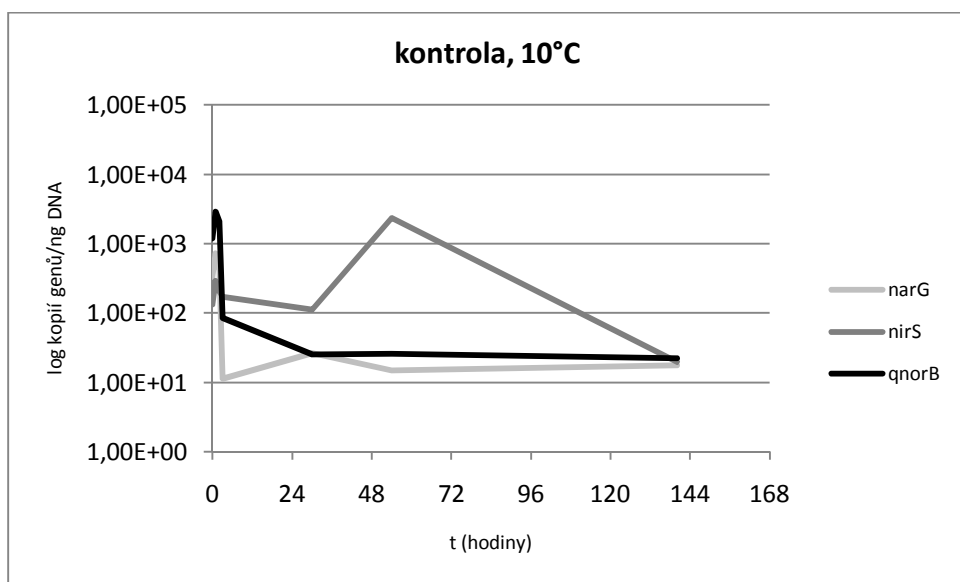


Graf č.12 Porovnání počtů kopíí denitrifikačních genů genů v kontrole při 0°C

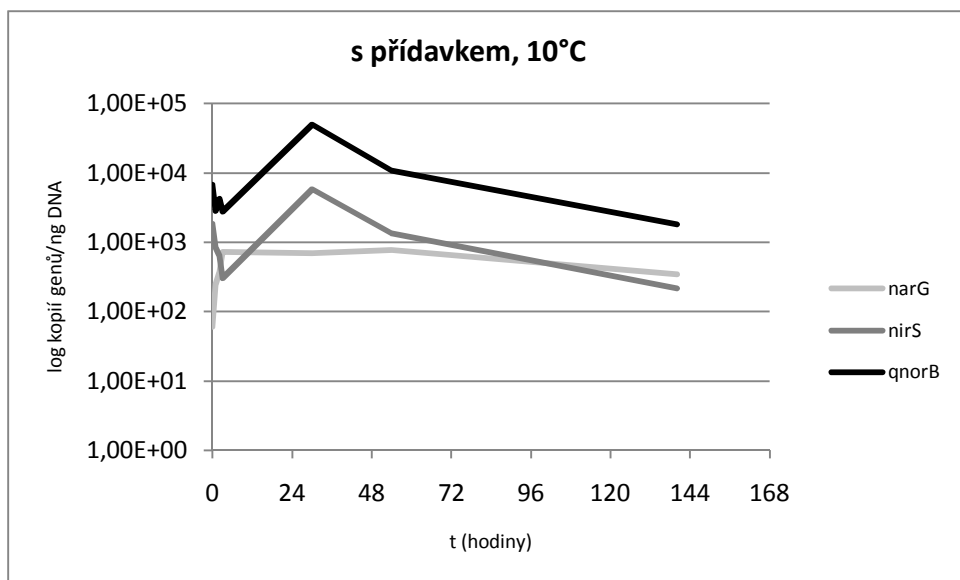


Graf č.13 Porovnání počtů kopíí denitrifikačních genů genů po přídavku při 0°C

Při teplotě 10°C byly pozorovány vyšší abundance všech denitrifikačních genů oproti 0°C. Rozdíly ovšem nebyly řádové (Graf č.14 a 15). Porovnání proběhlo na zprůměrovaných počtech genů mezi 3. a 140. h inkubace (po ustálení výkyvů).



Graf č.14 Porovnání počtů kopií denitrifikačních genů v kontrole při 10°C



Graf č.15 Porovnání počtů kopií denitrifikačních genů po přidavku při 10°C

4.2.1 Korelace denitrifikačních genů v průběhu inkubace

Statistický rozbor výsledků qPCR ukázal především korelace vývoje obsahů genu *qnorB* s *narG* v kontrolních vzorcích a s *nirS* ve vzorcích s přidavkem dusičnanů při obou inkubačních teplotách (Tab. 8 a 9). Ve variantě inkubace při 10°C s přidavkem dusičnanů se objevuje korelace genu *16S rRNA* a genů *nirS* a *qnorB* (Tab.9).

Tab.8 Korelační koeficienty vývoje zastoupení genů v DNA v průběhu experimentu (n=7, p < 0,05) při 0°C

	kontrola				s přidavkem nitrátů			
	<i>narG</i>	<i>nirS</i>	<i>qnorB</i>	<i>16S rRNA</i>	<i>narG</i>	<i>nirS</i>	<i>qnorB</i>	<i>16S rRNA</i>
<i>narG</i>	-	ns	0,98	ns	-	ns	ns	ns
<i>nirS</i>		-	ns	ns		-	0,96	ns
<i>qnorB</i>			-	ns			-	ns
<i>16S rRNA</i>				-				-

Tab.9 Korelační koeficienty vývoje zastoupení genů v DNA v průběhu experimentu (n=7, p < 0,05) při 10°C

	kontrola				s přidavkem nitrátů			
	<i>narG</i>	<i>nirS</i>	<i>qnorB</i>	<i>16S rRNA</i>	<i>narG</i>	<i>nirS</i>	<i>qnorB</i>	<i>16S rRNA</i>
<i>narG</i>	-	ns	0,99	ns	-	ns	ns	ns
<i>nirS</i>		-	ns	ns		-	0,98	0,83
<i>qnorB</i>			-	ns			-	0,88
<i>16S rRNA</i>				-				-

4.2.2 Analýzy vztahu obsahu genů k podmínkám prostředí během inkubace

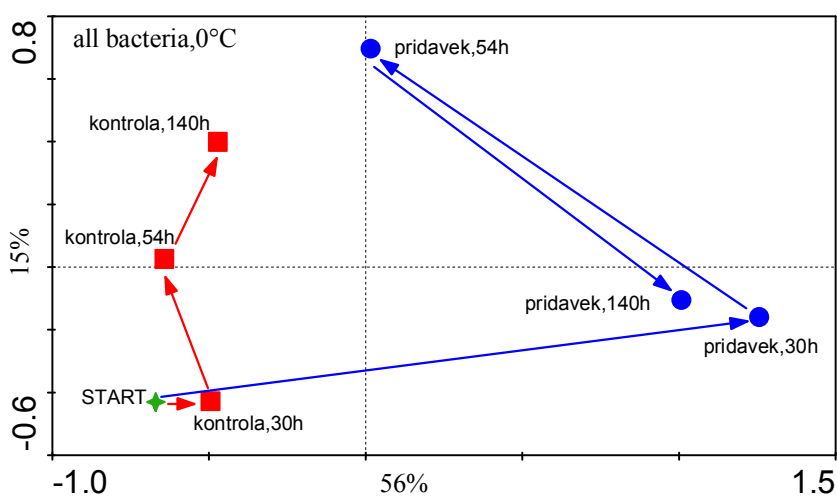
Při 0°C byla prokázána provázanost nárůstu množství *16S rRNA* se změnami celkového rozpuštěného dusíku, rozpuštěného anorganického dusíku a obsahu amoniaku v kontrolním vzorku a vztah ke změnám organického rozpuštěného dusíku ve variantě s přidavkem dusičnanů (Tab.10). Při 10°C je významná pouze korelace genu *narG* a rychlosti produkce oxidu dusného (za hodinu) ve variantě s přidavkem dusičnanu. Průkazně dále korelují obsahy genů *qnorB* a *narG* s poměrem rozpustného organicky a anorganicky vázaného dusíku.

Tab.10 Korelace zastoupení jednotlivých genů v DNA a chemických parametrů v průběhu experimentu (n=7, p < 0,05). Parametr rN₂O je rychlost přírůstu oxidu dusného za hodinu v průběhu inkubace, ostatní veličiny udávají kumulativní změnu daného parametru v průběhu inkubace. *Kurzívou* jsou označeny korelační koeficienty průkazné pro inkubaci při teplotě 0°C, **tučně** při teplotě 10°C.

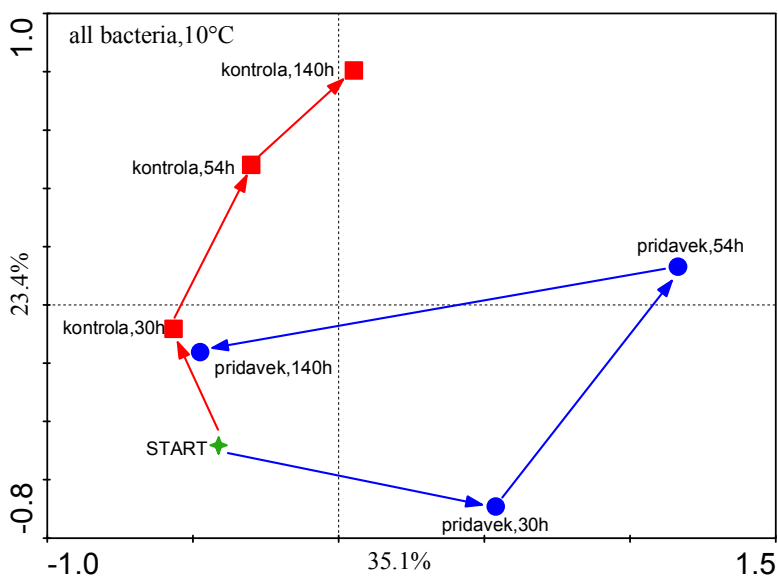
	kontrola				s přidavkem nitrátů			
	<i>narG</i>	<i>nirS</i>	<i>qnorB</i>	<i>16S rRNA</i>	<i>narG</i>	<i>nirS</i>	<i>qnorB</i>	<i>16S rRNA</i>
N₂O	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
rN₂O	ns	ns	ns	ns	0,82	ns	ns	ns
DOC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DN	ns	ns	ns	<i>-0,86</i>	ns	ns	ns	ns
DOC /DN	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DON	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<i>0,77</i>
DIN	ns	ns	ns	<i>-0,89</i>	ns	ns	ns	ns
DON/DIN	ns	ns	ns	ns	<i>-0,81</i>	ns	<i>0,77</i>	ns
NO₃⁻	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
NH₄⁺	ns	ns	ns	<i>-0,85</i>	ns	ns	ns	ns

4.3 Vliv přídavku nitrátů na vývoj bakteriálního společenstva

Celkové mikrobiální společenstvo se po přídavku vyvíjelo zcela odlišně v porovnání s kontrolou při 0 i 10°C (Graf č.16 a 17). Po přídavku byly patrné výrazné výkyvy v prvních třech dnech inkubace, což by mohlo vysvětlovat i podobné výkyvy ve sledovaných chemických parametrech a abundanci denitrifikačních genů. Na konci inkubace při 0°C se bakteriální společenstvo po přídavku výrazně lišilo od kontrolního, což ukazuje na výrazný posun ve druhovém složení (Graf č.16). V 10°C prošlo společenstvo rychlou změnou během třech dnů inkubace, ale ke konci se opět svým složením přiblížilo počátečnímu stavu (Graf č.17).



Graf č.16 Porovnání vývoje společenstev v kontrole a po přídavku při 0°C



Graf č.17 Porovnání vývoje společenstev v kontrole a po přídavku při 10°C

5 DISKUSE

5.1 Sledované chemické parametry

Vzhledem k tomu, že pH se mezi sadami vzorků neměnilo a ostatní parametry byly neměnně nastaveny, lze veškeré rozdíly, které jsme naměřili, přičíst rozdílu koncentrací dusičnanů a inkubační teplotě či kombinací obou faktorů.

Podobný experiment jako my provedli Dalmonech a kol. (2010), kdy čtyři měsíce inkubovali lesní půdu s týdně aplikovanými 5 různými přídávky dusičnanů (0, 0.3, 0.7, 1.3 and 2 mg N/g sušiny) při 28°C. Následně sledovali reakce společenstva na pomalý nárůst dostupného N a změny chemických parametrů. Všechny sledované chemické parametry na konci inkubace byly ovlivněny přímo vzrůstajícím obsahem dusíku (negativně: pH; pozitivně: DOC, TN, DIN; BACI, $p < 0,05$), autoři předpokládají, že TOC je více ovlivněn samotnými změnami společenstva, protože u něj tato závislost na přídávce dusičnanů neplatila. Nutno podotknout, že v našem případě přídávky byly o tři řády nižší (5 ug NO_3^- -N/g sušiny), protože jsme simulovali reálné depozice. Díky tomu jsme měli příležitost sledovat reálnou odezvu společenstva i souvislosti s ostatními půdními charakteristikami.

5.1.1 Produkce oxidu dusného

Nárůst koncentrace oxidu dusného v průběhu experimentu ukázal, že enzym reduktáza oxidu dusnatého (Nor, kodovaná genem *qnorB*) je činný i při pH dosahujícím hodnot pod 4, přestože jeho optimum bylo pozorováno v neutrálních až zásaditých podmínkách (Kuňák 2004). Přítomnost N_2O již v prvních hodinách experimentu dokazuje, že aktivní enzym byl ve vzorcích přítomen ještě před započítáním experimentu. Samotné měření nárůstu N_2O můžeme považovat v našem případě za absolutní míru schopnosti společenstva denitrifikovat, a to díky faktorům silně inhibujícím přeměnu N_2O na N_2 . Je to hlavně vysoká kyselost půdy (Sitaula et al. 1995, Henrich and Haselwandter 1997, Valera and Alexander 1961) a v obou případech nízká inkubační teplota (Öquist et al. 2007).

Podle statisticky neprůkazných rozdílů kontroly a vzorků s přídávkem na konci inkubace se zdá, že po šestidenním časovém úseku nemá jednorázová dusičnanová depozice na produkci N_2O výrazný vliv. I když neprůkazně, průměrné hodnoty kumulativní produkce ukazují, že v kontrole při obou teplotách byla produkce N_2O vyšší

o 0,05 umol N₂O-N/g sušiny (n=24, směr. odchylka=0,08). První tři dny inkubace byly hodnoty produkovaného N₂O o málo vyšší v kontrolních vzorcích. To by mohlo ukazovat na (I) inhibiční vliv jednorázově dodaného dusičnanu na aktivitu denitrifikačního společenstva, (II) přímou asimilaci dusičnanu do mikrobiální biomasy, která zároveň stimulovala asimilaci již přítomného poolu dusičnanů (tzv. priming efekt) nebo (III) rychlé prodýchání přidaných dusičnanů na plynný N₂ a tudíž viditelný pokles produkovaného N₂O. Tuto možnost zatím podporují nárůsty genů v denitrifikační cestě. K zodpovězení těchto hypotéz by bylo třeba provést experiment s izotopově značeným dusičnanem a sledovat jeho transformační dráhu.

Na neschopnost bakteriálního společenstva reagovat na skokově zvýšený přísun dusíku upozorňuje i Gundersen (1991, in Schulze and Mooney 1994). Po holoseči v lesní půdě pozoroval zvýšení denitrifikační rychlosti z původního <1 kg N/ha/rok pouze na 3-6 kg N/ha/rok. Holoseč způsobí vyplavení velkého množství mikroorganismy využitelných látek z odumřelých kořenů, pro denitrifikátory jsou to dusičnany, které se uvolní do půdního roztoku. Proto byl v práci Gundersena předpokládán vyšší nárůst denitrifikace, i vzhledem k tomu, že v jiných pracích jsou rychlosti denitrifikace i na nenarušených stanovištích řádově vyšší. Nejvyšší rychlost v minerální půdě naměřená Wattsovou a Seitzingerovou (2000) je 183 kg N/ha/rok, Schulze and Mooney (1994) uvádějí denitrifikační rychlost v buko-dubovém lese 20 kg N/ha/rok. V našem experimentu odpovídaly ztráty N z půdy v pořadí: po přidavku při 10°C - kontrola při 10°C - po přidavku při 0°C - kontrola při 0°C hodnotám 65,39 > 63,98 > 29,7 > 28,53 kg N/ha/rok.

5.1.2 Změny koncentrace dusičnanu v půdním výluhu

Průběhu rychlejšího nárůstu N₂O odpovídá ve vyšší teplotě i výrazný pokles koncentrace NO₃⁻. Souvislost trendů obou sloučenin v inkubaci při 10°C potvrzuje i vysoký korelační koeficient (89 % v kontrole a 100 % s přidavkem). To je v souladu se zjištěními mnoha dalších studií. Sitaula a kol. (1995) provedli inkubaci půdních profilů v lysimetrech. Vzorky byly odebrány z ploch s různou intenzitou hnojení NH₄NO₃ (0 kg, 30 kg a 90 kg N/ha/rok) a během experimentu byla měřena produkce N₂O. Pozitivní závislost produkce N₂O na množství přidaného dusičnanu při hnojení byla prokázána na hladině významnosti 0,001. Moiser a kol. (1991) měřili plynné emise N₂O *in situ* komorovou metodou na plochách s různým managementem. Zvýšení emisí N₂O v závislosti na přidaném dusičnanu také prokázali (p<0,05), nárůst byl nejvíce patrný

na vlhčích plochách, což odpovídá i našemu schématu (ovlhčení při simulaci srážek). Henrich a Haselwandter (1997) prováděli měření produkce N_2O v terénu a také pomocí acetylenové inhibice v inkubačním pokusu na lesní půdě. Kromě potvrzení závislosti emisí N_2O na obsahu dusičnanu prokázali i vliv obsahu vody v půdě ($p=0,028$).

Podobný experiment jako my provedli Deiglmayr a kol. (2006) - inkubovali opadový horizont luční půdy s třemi přídávky dusičnanů (0, 100 a 300 $\mu\text{g/g}$ sušiny, zatímco my jsme přidávali 5 $\mu\text{g NO}_3^- \text{-N/g}$ sušiny) při 25°C. Inkubace probíhala po dobu 4, 7 a 14 dnů a následně kromě chemických parametrů měřili aktivitu a diverzitu *narG* denitrifikačního genu. Během inkubace vzorků po přídávku v jejich experimentu klesal obsah dusičnanů, což je v souladu s naším výsledkem při 10°C.

5.1.3 Změny obsahu rozpustných forem uhlíku

Výsledky ukazují, že obsah rozpustného uhlíku v prvních hodinách po založení experimentu poměrně prudce klesal. Po nastolení anaerobních podmínek došlo ke zvýšení abundance fakultativně anaerobních a anaerobních bakterií, které snížily obsah dostupných uhlíkatých sloučenin. Následný nárůst obsahu uhlíku ve vodném roztoku může být způsoben degradací nerozpustných C-sloučenin a následně postupným vymíráním skupin aerobních bakterií a ostatních skupin, které se nebyly schopny anaerobitě přizpůsobit.

Naše výsledky se rozcházejí s Waldropovými (2004), který neprokázal vliv atmosférických dusičnanových depozic na koncentraci rozpustných forem uhlíku. Waldrop ovšem sledoval reakci vzorků na depozice až po určité době, protože simuloval depozice *in situ*. Takto časově vzálené úseky mezi přídávkem dusičnanů a vlastním odběrem půdy pro chemické analýzy mohou zamaskovat rychlou odezvu denitrifikačního společenstva.

Nízký ale průkazný koeficient korelace DOC a N_2O (Tab.4) ukazuje, že bakterie jsou na obsahu DOC při 0°C více závislé než při 10°C, jelikož může být za těchto podmínek pro bakterie limitující při budování enzymů odpovědných za produkci N_2O .

5.1.4 Vliv teploty na denitrifikaci

Rychlejší nárůst koncentrace N_2O při vyšší teplotě odpovídá citlivosti enzymu na teplotu i vyššímu teplotnímu optimu bakteriálního společenstva (kap.2.3.2). Produkce N_2O při 10°C byla v obou variantách dvojnásobná oproti produkci při 0°C.

Davidson a Schwank (1986) sledovali vliv teploty na emise N_2O z půdy komorovou metodou v listnatém lese. V *in situ* experimentu vysvětlovaly změny teploty 25 % z variability výsledků měření N_2O . Se zvyšující se teplotou se zvyšovala i produkce N_2O . Avšak tento výsledek se jim nepodařilo potvrdit v laboratorním experimentu (s acetylenovou inhibicí), kdy nebyla korelace potvrzena ($p < 0,05$). Autoři tento vztah vysvětlují spíše společným efektem zvyšující se teploty a vysychání substrátu v přírodních měřeních, než ovlivňování denitrifikačního společenstva přímo teplotními podmínkami, což souhlasí s výsledky dalších výzkumů, které také přisuzují hlavní roli jiným faktorům. Henrich and Haselwandter (1997) například popsali závislost v produkci N_2O na obsahu dusičnanu v půdě, což souhlasí i s našimi výsledky, kdy ztráty dusičnanů při 10°C velmi silně korelovaly s nárůstem N_2O .

Efekt inkubační teploty je popisován jako nízký a v přírodních podmínkách řídí aktivitu denitrifikačního společenstva jiné mechanismy, jako obsah organických látek, anaerobita podpořená vlhkostí a půdní pH. V našem experimentu jsme měli příležitost sledovat reakce denitrifikátorů na teplotní podmínky jen z toho důvodu, že se neměnily jiné faktory prostředí kromě obsahu dusičnanů.

5.2 Změny v abundanci denitrifikačních genů

Geny *nirS* a *qnorB* sledované v našem pokusu, byly identifikovány v genomové DNA v jedné kopii (Henry *et al.* 2004, Philippot 2002, Hendriks *et al.* 2000, Zumft 2005), naopak *narG* byl pozorován až ve třech kopiích (Philippot 2002). Proto můžeme změny v abundanci *nirS* a *qnorB* genů vztáhnout přímo na změny v abundanci denitrifikačního společenstva.

Očekávaně byly ve variantě s přidavkem ve srovnání s kontrolou více zastoupeny všechny sledované denitrifikační geny. Nárůst genů o jeden až tři řády naznačuje, jak významným faktorem prostředí je koncentrace dusičnanů a zvýšená atmosférická depozice je příčinou řadového namnožení denitrifikačních bakterií. K získání ucelené představy o chování denitrifikačního společenstva a možného vysvětlení poklesu rN_2O v posledních třech dnech inkubace bude třeba změřit obsah *nosZ*, genu kodujícího enzym katalyzující poslední krok denitrifikační reakce. Vzhledem k tomu, že jsme neinhibovali funkci enzymu Nos, mohla být i navzdory nepříznivým podmínkám část produkovaného N_2O přeměněna na N_2 . Skutečnost, že půdy o pH 3,7 jsou schopny produkovat N_2 , popsali ve své práci Henrich a Haselwandter (1997).

Deiglmayr a kol. (2006) sledovali aktivitu dusičnanové reductázy kodované genem *narG* po přidavku dusičnanů 0, 100 a 300 NO_3^- -N ug/g sušiny v inkubačním pokusu při 25°C. To je 20x a 60x více, než v našem pokusu. Po přidavku 300 NO_3^- -N ug/g pozorovali průkazný nárůst oproti kontrole po prvních 4 dnech inkubace. Po 7 dnech a po 14 dnech byl však již rozdíl neprůkazný ($p < 0,05$). Porovnání přidavkem 100 ug NO_3^- -N/g suš Deiglmayra a kol. by bylo pro náš experiment příhodnější, ovšem Nar aktivita byla v jejich experimentu při přidavku 100 ug NO_3^- -N/g suš nejnižší ve všech případech. Autoři předpokládali, že hodnoty aktivit u tohoto přidavku budou mezi hodnotami kontrolních vzorků a vzorků s nejvyšším přidavkem dusičnanů (300 ug NO_3^- -N/g suš). Výsledek přisoudili chybám v extrakci a omezením měřících technik. Za možný důsledek omezení použité metody označili také vyrovnání aktivit Nar na konci inkubace, kdy se akumulace dusitanu mohla stát pro bakterie toxickou.

Dalším očekávaným trendem byl nižší počet denitrifikačních genů v nižší inkubační teplotě, což se potvrdilo. Z toho vyplývá, že denitrifikátoři jsou citliví na teplotní podmínky stejně jako jiné mikroorganismy (Andersson a Nilsson 2001 sledovali reakci mikroorganismů v půdním výluhu na teplotu a zjistili, že 15°C jim vyhovuje více, než 4°C). Preferovali teplotu, která se více blížila jejich optimu. Pokud bylo v předchozích studiích pozorováno, že jejich aktivita je vyšší v nižší teplotě, potom to způsobily jiné faktory. To mohl být případ studie Henricha a Haselwandtera (1997), kdy pozorovali nejvyšší produkci N_2O (metoda acetylenové inhibice) při teplotě 3,5°C, zatímco při teplotách okolo 20°C byla o dva řády ($\text{ug N}_2\text{O-N/m}^2$) nižší, ale sami to vysvětlují snížením obsahu vody v půdě.

V obou teplotách ve variantě s přidavkem se projevil trend návaznosti genu *qnorB* na vývoj genu *nirS*. Tato korelace nebyla překvapivá vzhledem k tomu, že *qnorB* katalyzuje krok denitrifikace následující po genu *nirS*. Tate (2000) upozorňuje na rychlost přeměn forem dusíku katalyzovaných denitrifikačními enzymy. Probíhají rychle, protože jsou hlavním ziskem energie buňky v anaerobním prostředí a v našem případě v kontrolních vzorcích byla činnost enzymu *nirS* dostupným dusitanem možná i limitována. Korelace genů *narG* a *qnorB* v kontrolních vzorcích obou teplot naznačuje, že v podmínkách s nízkým přísunem dostupných dusičnanů je krok $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ (katalyzovaný *nirS*) tak rychlý, že funkce *qnorB* závisí na přísunech produktů reakce od *narG* k *nirS*.

5.2.1 Analýzy vztahu obsahu genů k podmínkám prostředí během inkubace

Zápornou korelaci *16S rRNA* genu s DN (a dalšími formami dusíku) ukazuje na nárůst bakteriálního společenstva na úkor volně dostupných dusíkatých látek.

Závislost rychlosti produkce N_2O na množství *narG* genu by mohla být opět projevem v předchozí kapitole zmiňované možné závislosti funkce genu *qnorB* na *narG*, ovšem korelace těchto dvou genů ve variantě s přidavkem nebyla prokázána.

Vysvětlení korelace obsah genů *qnorB* na DON/DIN může být totéž jako v případě *16S rRNA*, avšak negativní korelace *narG* a DON/DIN by mohla naopak svědčit o tom, že bakterie obsahující *narG* gen preferují prostředí, kde je vyšší obsah anorganicky vázaného dusíku. Tomu nasvědčují i pozorování, že organismy (nejen denitrifikující) využívají funkce *narG* k získávání stavebních dusíkatých sloučenin a dalším účelům (kap.2.4.1).

5.2.2 Vliv přidavku nitrátů na vývoj bakteriálního společenstva

Bakteriální společenstvo varianty po přidavku procházelo skokovým vývojem v reakci na zvýšenou koncentraci dusičnanů. Tendence společenstva po přidavku k návratu do předchozího stavu napovídá, že se teprve začalo přizpůsobovat novým podmínkám a začaly se ustavovat v čase stabilnější poměry zastoupených skupin organismů.

Dalmonech a kol. (2010) sledovali reakce společenstva na pomalý nárůst dostupného N. Zjistili, že všechny přidavky v průběhu inkubace snížily funkční diverzitu společenstva (Shannonův index, $p < 0,05$) a snížil se i obsah uhlíku vázaného v biomase.

Deiglmayr a kol. (2006) zjistili, že ani při extrémně vysokém přidavku se společenstvo nezměnilo a svůj výsledek vysvětlili vysokou schopností společenstva *narG* - denitrifikátorů přizpůsobit se vyšším přísunům NO_3^- . Protože jsme nesledovali diverzitu jednotlivých zástupců, nemůžeme porovnat přímo výsledky týkající se *narG*, ale pokud je tato skupina takto přizpůsobivá, mohli bychom uvažovat o tom, že námi pozorované posuny ve složení společenstva jsou důsledkem změn ostatních denitrifikačních ale i nedenitrifikujících skupin mikroorganismů (a to i z důvodu, že naše přidavky dusičnanů byly v porovnání s Deiglmayrovými o tři řády nižší).

6 ZÁVĚRY

Studie ukázala, jak výrazně reagují denitrifikační bakterie a zvláště celkové společenstvo bakterií na relativně nízký přídavek dusičnanů. Několikařádrový nárůst denitrifikačních genů v obou inkubačních teplotách je dokladem o tom, jak výrazný dopad můžou mít krátkodobě zvýšené vlhké dusičnanové depozice. K důkladnému prostudování problému by byla třeba dlouhodobější studie sledující reakce společenstva v přirozených podmínkách.

Odpovědi na pracovní hypotézy:

- Zvýšený přídavek dusičnanů bude mít za následek nárůst kopií genů odpovědných za denitrifikaci v půdě.

-> Tuto hypotézu výsledky potvrdily (s opominutím výkyvu nirS) v obou variantách ve všech vzorcích.

- Při nižší teplotě budou obsahy denitrifikačních genů v půdě nižší, než za vyšší inkubační teploty.

-> Tento předpoklad byl potvrzen u všech sledovaných denitrifikačních genů.

7 LITERATURA

Lashof D. A. and Ahuja D.R. 1990. Relative contributions of greenhouse gas emissions to global warming. *Nature*, 334, 529-531.

Andersson S. and Nillson Ingvar S. 2001. Influence of pH and temperature on microbial activity, substrate availability of soil-solution bacteria and leaching of dissolved organic carbon in a mor humus. *Soil Biology & Biochemistry*, 33, 1181-1191.

Avrahami S., Conrad R. and Braker G. 2002. Effect of Soil Ammonium Concentration on N₂O Release and on the Community Structure of Ammonia Oxidizers and Denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 5685–5692.

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.

Berks B. C., Ferguson S. J., Moir J. W. B., Richardson D. J. 1995. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1232, 97-173.

Betlach M. R. and Tiedje J. M. 1981. Kinetic Explanation for Accumulation of Nitrite, Nitric Oxide, and Nitrous Oxide During Bacterial Denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42, 1074-1084.

Brady N. C. and Weil R. R. 1999. *The nature and properties of soils* (13th edition). Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA. 960 p.

Braker G., Fesefeldt A. and Witzel K.-P. 1998. Development of PCR Primer Systems for Amplification of Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) To Detect Denitrifying Bacteria in Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3769–3775.

Braker G. and Tiedje J. M. 2003. Nitric Oxide Reductase (*norB*) Genes from Pure Cultures and Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 3476–3483.

Bru D., Sarr A. and Philippot L. 2007. Relative Abundances of Proteobacterial Membrane-Bound and Periplasmic Nitrate Reductases in Selected Environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 5971–5974.

Castle K., Arah J. R. M., Vinten A. J. A. 1998. Denitrification in intact subsoil cores. *Bio. Fertil. Soils*, 28, 12-18.

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.

Chen F., Xia Q. and Ju L. 2003. Aerobic Denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* Monitored by Online NAD(P)H Fluorescence. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 6715–6722.

Conrad R. 1996. Soil Microorganisms as Controllers of Atmospheric Trace Gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). *Microbiological Reviews*, 60, 609–640.

Coyne M. S., Arunakumari A., Averill B. A. and Tiedje J. M. 1989. Immunological Identification and Distribution of Dissimilatory Heme cdi and Nonheme Copper Nitrite Reductases in Denitrifying Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2924-2931.

Čapek P. 2008. Fosfor v lesních půdách v povodí šumavských jezer dostupný *in-situ*. Bakalářská práce. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice. 38 p.

Dalmonech D., Lagomarsino A., Moscatelli M. C., Chiti T., Valentini R. 2010. Microbial performance under increasing nitrogen availability in a Mediterranean forest soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 42, 1596-1606.

Dandie C. E., Miller M. N., Burton D. L., Zerbath B. J., Trevors J. T. and Goyer C. 2007. Nitric Oxide Reductase-Targeted Real-Time PCR Quantification of Denitrifier Populations in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 4250–4258.

Davidson E. A. and Swank W. T. 1986. Environmental Parameters Regulating Gaseous Nitrogen Losses from Two Forested Ecosystems via Nitrification and Denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1287-1292.

Deiglmayr K., Philippot L., Kandeler E. 2006. Functional stability of the nitrate-reducing community in grassland soils towards high nitrate supply. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 2980-2984.

Dermastia M., Turk T. and Hollocher T. C. 1991. Purification from *Paracoccus denitrificans* with use of a single column and some characteristics. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 10899-10905.

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.

Firestone M. K. and Tiedje J. M. 1979. Temporal Change in Nitrous Oxide and Dinitrogen from Denitrification Following Onset of Anaerobiosis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 673-679.

Fogel G. B., Collins C. R., Li J., Brunk C. F. 1999. Prokaryotic Genome Size and SSU rDNA Copy Number: Estimation of Microbial Relative Abundance from a Mixed Population. *Microb. Ecol.*, 38, 93-113.

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.

Greenland D. J. 1971. Adsorption of humic and fulvic acids by soils. *Soil. Sci.*, 111, 34-43.

Grüntzig V., Nold S. C., Zhou J. and Tiedje J. M. 2001. *Pseudomonas stutzeri* Nitrite Reductase Gene Abundance in Environmental Samples Measured by Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 760-768.

Haandel A. and Lubbe J. 2007. Handbook Biological Wastewater Treatment - Design and optimisation of activated sludge systems. Quist Publishing, Netherlands (no editors). 550 p.

Hallin S., Throbäck I. N., Dicksved J. and Pell M. 2006. Metabolic Profiles and Genetic Diversity of Denitrifying Communities in Activated Sludge after Addition of Methanol or Ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 5445–5452.

Hatch D. J., Jarvis S. C. and Parkinson R. J. 1998. Concurrent measurements of net mineralization, nitrification, denitrification and leaching from field incubated soil cores. *Biol Fertil Soils*, 26, 323–330.

Henderson S. L., Dandie C. E., Patten C. L., Zebarth B. J., Burton D. L., Trevors J. T. and Goyer C. 2010. Changes in denitrifier abundance, denitrification gene mRNA levels, nitrous oxide emissions and denitrification in anoxic soil microcosms amended with glucose and plant residues. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 2155-2164.

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

Henrich M., Haselwandter K. 1997. Denitrification and gaseous nitrogen losses from an acid spruce forest soil. *Soil Biol. Biochem.*, 29, 1529-1537.

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. and 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 5181–5189.

Heylen K., Gevers D., Vanparys B., Wittebolle L., Geets J., Boon N. and De Vos P. 2006. The incidence of *nirS* and *nirK* and their genetic heterogeneity in cultivated denitrifiers. *Environmental Microbiology*, 8, 2012–2021.

IPCC 2001: Houghton J. T., Ding Y., Griggs D. J., Noguer M., Van der Linden P. J., Dai X., Maskell K. and Johnson C. A. (ed.). 2001. *Climate change 2001: the scientific basis. Contribution of Working Group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

Kandeler E., Deiglmayr K., Tschirko D., Bru D. and Philippot L. 2006. Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* Genes of Denitrifying Bacteria during Primary Successions of a Glacier Foreland. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 5957–5962.

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.

Klemetsson L., Svensson B. H., Rosswall T. 1988. Relationships between soil moisture content and nitrous oxide production during nitrification and denitrification. *Biol. Fertil. Soils*, 6, 106-111.

Knowles R. 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews*, 46, 43-70.

Kopáček J., Hejzlar J. 1998. Chemismus povrchových přítoků okyselených Šumavských jezer. *Silva Gabreta*, 2, 175-197.

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

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., Veselý J. and Stuchlík E. 2001. Sulphur and nitrogen fluxes and budgets in the Bohemian Forest and Tatra Mountains during the industrial revolution (1850–2000). *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 5, 391–405.

Kuňák M. 2004. Dynamika elektronového toku v periplazmatické části respiračního řetězce bakterie *Paracoccus denitrificans*. Disertační práce. Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně. 46 p.

Liu B., Mørkved P. T., Frostegård Á. and Bakken R. L. 2010. Denitrification gene pools, transcription and kinetics of NO, N₂O and N₂ production as affected by soil pH. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 72, 407–417.

López-Gutiérrez J. C., Henry S., Hallet S., Martin-Laurent F., Catroux G., Philippot L. 2004. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 57, 399–407.

Macrae A. 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 77-82.

Mathieu O., Hénault C., Lévêque J., Baujard E., Milloux M.-J. and Andreux F. 2006. Quantifying the contribution of nitrification and denitrification to the nitrous oxide flux using ¹⁵N tracers. *Environmental Pollution*, 144, 933-940.

Mesa S., Velasco L., Manzanera E., Delgado M. J., Bedmar E. J. 2002. Characterization of the norCBQD genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiology*, 148, 3553–3560.

Melichová T. 2009. Vliv odlesnění na diverzitu a množství denitrifikačních bakterií v půdních horizontech smrkového lesa. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice. 25 p.

Moiser A., Schimel D., Valentine D., Bronson K. and Parton W. 1991. Methane and nitrous oxide fluxes in native, fertilized and cultivated grasslands. *Nature* 350, 330-332.

Muhling M., Woolven-Allen J., Murrell J. C., Joint I. 2008. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *The ISME Journal* 2, 379–392.

Müller M. M., Sundman V. and Skujinš J. 1980. Denitrification in Low pH Spodosols and Peats Determined with the Acetylene Inhibition Method. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 235-239.

Národní park Šumava (NP Šumava) – webové stránky <http://www.npsumava.cz>

Nocker A., Burr M., Camper A. K. 2006. Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. *Microbial Ecology*, 54, 276–289.

Öquist M. G., Petrone K., Nilsson M., Klemedtsson L. 2007. Nitrification controls N₂O production rates in a frozen boreal forest soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 39, 1809-1811.

- 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.
- Philippot L. 2005. Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. *Biochemical Society Transactions*, 33, 200-204.
- Philippot L. and Højberg O. 1999. Dissimilatory nitrate reductases in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1446, 1-23.
- Richardson D. J. 2000. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology*, 146, 551–571.
- Richardson D. J., Berks B. C., Russell D. A., Spiro S. and Taylor C. J. 2001. Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 165–178.
- Robertson L. A. and Kuenen J. G. 1990. Physiological and ecological aspects of aerobic denitrification, a link with heterotrophic nitrification? In the series analytic: Denitrification in soil and sediment. Eds. Revsbech N. P. and Sorensen J. *Proceedings of a Symposium*, June 6-9, 1990, Aarhus, Denmark. Literature review, 56, 91-104.
- Schulze E.-D. and Mooney H. A., eds. 1994. *Biodiversity and ecosystem function*. Springer, New York. 525 p.
- Sitaula B. K., Bakken L. R. and Abrahamsen G. 1995. N-fertilization and soil acidification effects on N₂O and CO₂ emission from temperate pine forest soil. *Soil Biol. Biochem.*, 27, 1401-1408.
- Smith M. S. and Tiedje J. M. 1979. Phases of denitrification following oxygen depletion in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 11, 261-267.
- Stenström J., Svensson K., Johansson M. 2001. Reversible transition between active and dormant microbial states in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 36, 93-104.

Svoboda M. 2005. Struktura horského smrkového lesa v oblasti Trojmezí ve vztahu k historickému vývoji a stanovištním podmínkám. *Silva Gabreta*, 11 (1), 43–62.

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.

Szukics U., Abell G. C. J., Hödl V., Mitter B., Sessitch A., Hackl E. and Zechmeister-Boltenstern S. 2010. Nitrifiers and denitrifiers respond rapidly to changed moisture and increasing temperature in a pristine forest soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 72, 395–406.

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.

Šimek M., Jíšová L., Hopkins D. W. 2002. What is the so-called optimum pH for denitrification in soil? *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 1227–1234.

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

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

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

Valera C. L., Alexander M. 1961. Nutrition and physiology of the denitrifying bacteria. *Plant and Soil*, 15, 268-280.

Veselý J. 1994. Investigation of the nature of the Šumava lakes: a review. *Časopis Národního Muzea, Řada přírodovědná*, 163, 103–120.

Vrba, J., Kopáček J., Fott J., Kohout L., Nedbalová L., Pražáková M., Soldán T. and Schaumburg J. 2002. Long-term studies (1871–2000) on acidification and recovery of lakes in the Bohemian Forest (central Europe). *The Science of the Total Environment*, 310 (2003), 73–85.

Waldrop M. P., Zak D. R. and Sinsabaugh R. L. 2004. Microbial community response to nitrogen deposition in northern forest ecosystems. *Soil Biol. Biochem.*, 36,1443–1451.

Watts S. H. and Seitzinger S. P. 2000. Denitrification rates in organic and mineral soils from riparian sites: a comparison of N₂ flux and acetylene inhibition methods. *Soil Biology & Biochemistry*, 32, 1383-1392.

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.

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

Zumft W. G. 1997. Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 533-616.

Zumft W. G. 2005. Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme–copper oxidase type. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99, 194-215.

8 Rejstřík zkratk

16S rDNA – gen kodující 16S rRNA

16S rRNA – úsek ribozomální nukleové kyseliny

BACI - before-after-control-impact, repeated measurement ANOVA, ANOVA při opakovaných měřeních

cNor – reduktáza oxidu dusnatého s donorem elektronů cytochromem c

cnorB,C – gen kodující reduktázu cNor

C_{tot} – celkový (rozpustný i nerozpustný) uhlík

DGGE – denaturační gradientová gelová elektroforéza

DIN – obsah dusíku v rozpustných anorganických formách

DN – celkový obsah dusíku v rozpustných formách

DOC – celkový obsah uhlíku v rozpustných formách

DON – obsah dusíku v rozpustných organických formách

EC – enzym code, mezinárodní kodové označení enzymů

N_{tot} – celkový (rozpustný i nerozpustný) dusík

Nap – nitrát reduktáza

Nar – nitrát reduktáza

narG – gen kodující nitrát reduktázu

NH₄⁺-N – dusík ve formě kationtu amoniaku

Nir – nitrit reduktáza

nirK – gen kodující měď obsahující nitrit reduktázu

nirS – gen kodující cytochrom *cd1* obsahující nitrit reduktázu

NO₃⁻-N – dusík ve formě dusičnanového aniontu

nor – geny kodující reduktázy Nor

Nor – reduktáza oxidu dusnatého

Nos – reduktáza oxidu dusného

nosZ – gen kodující Nos

NP Šumava – webové stránky správy národního parku Šumava

PCA – principle component analysis, analýza hlavních komponentů

qNor – reduktáza oxidu dusnatého s donorem elektronů chinolem/hydrochinolem

qnorB – gen kodující reduktázu qNor

qPCR – real-time kvantitativní PCR

rN₂O - rychlost přírůstku oxidu dusného za hodinu

TGGE – teplotní gradientová gelová elektroforéza

9 Přílohy

PŘÍLOHA Č. 1 – Průběh experimentu

6denní inkubace:

den v týdnu	odběry	délka inkubace
út	- založení pokusu 11.50 - nultý odběr v 11.50 - další odběry: 13.00, 14.10, 15.10, 16.10, 18.10	1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h
st	7.10, 18.10	19 h, 30 h
čt	7.10, 18.10	43 h, 54 h
pá	7.10	68 h
po	7.10	140 h

Počet vzorků:

13 odběrů

2 teploty (0°C a 10°C) – v jednom týdnu

2 opakování (přídavek dusičnanů) a 2 kontroly (původně přítomné v půdě) – do dvou týdnů

1 přídavek nitrátů (zvýšené - 5 ug N/g sušiny ve formě NaNO₃, kontrola - přítomné v půdě)

5 g směsi opadové půdy na jedno opakování/kontrolu

=> založit celkem 52 vzorků na jeden týdenní experiment pro přídavek/kontrolu zvlášť

=> potřeba celkem 520 g půdy (směsný vzorek opadového horizontu, pravděpodobně PL) (52 vzorků x dvě teploty x 5 g/vzorek) -> 600/3 = 200 g na jedno odběrové místo

- bez přídavků uhlíku a předběžné inkubace, anaerobita navozena proplachem inertním heliem, přídavek nitrátů formou NaNO₃ 5ug N-NO₃/g suché půdy

Postup založení experimentu (pro jednu ze dvou teplot):

1. ze tří podílů opadového horizontu PL promícháním vytvořit směsný vzorek – 200 g z každého odběrového místa
2. do igelitu a do chladicího boxu (přes noc odležet)
3. připravit roztok NaNO₃ pro ovlhčení 5 g vzorku 2 ml roztoku 5ug N-NO₃/g suché půdy
4. do 52 NTS 100ml lahví (popsat) navážít po 5 g směsného vzorku a uzavřít pryžovou zátkou kvůli měření N₂O a víčkem s otvorem a uschovat zbytek směsného vzorku pro počáteční analýzy
5. všechny NTS s 5 g půdy ovlhčit 2 ml roztoku s přídavkem nitrátů (vody)
6. proplach heliem, do otvoru víčka na pryž. zátku nakapat vodu k zabránění průniku vzduchu
7. uložit do inkubátorů přednastavených na 10°C a 0°C po skupinách, v jakých se budou odebírat – po dvojicích

Postup jednotlivého odběru (pro jednu ze dvou teplot):

1. odebrat z inkubátoru danou sadu NTS (dvojici)
2. odebrat 0,2 ml plynu injekční jehlou skrz pryžovou zátku, změřit na plyn. chromatografu obsah N_2O (O_2) ve vzorcích atmosféry z inj. stříkaček a zapsat
3. odebrat 2 g půdy do kryogenní zkumavky, popsát a uložit do -70°C mrazáku pro DNA analýzy
4. zbylou půdu v NTS zalít 30 ml K_2SO_4
5. třepat při 150 ot/min po dobu 1 h za pokoj. teploty
6. zcentrifugovat vytřepané vzorky půdy (přelít cca 25 ml z NTS do centrifugačních zkumavek) při 4000 RPM po dobu 12 min za pokoj. teploty
7. zfiltrovat přes skleněný filtr (výtěžek asi 20 ml) a uložit do nádobky s víčkem, popsát
8. změřit v roztoku pH, zapsat
9. zmrazit v mrazničce pro další analýzy

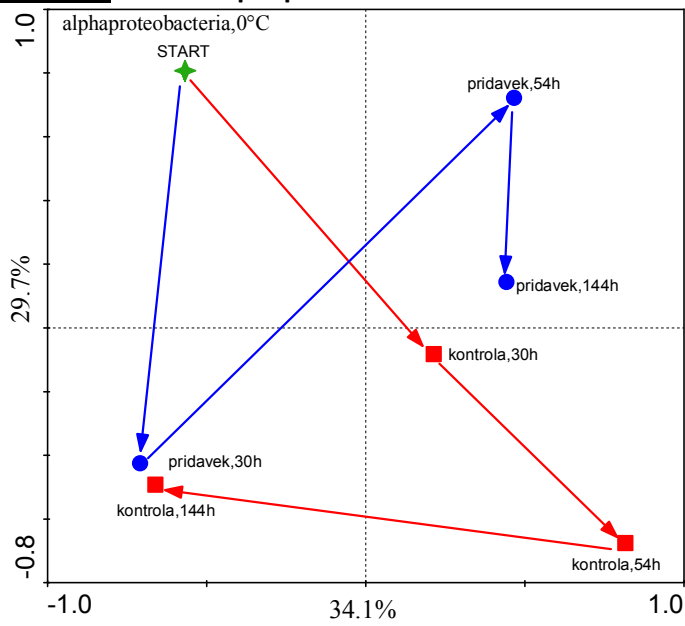
Prvotní analýzy (z půdy ještě před založením pokusu, po smíchání opadových horizontů z PLH):

- DNA analýzy – odebrat a zmrazit 2g půdy v kryogenní zkumavce (popsát)
- změřit výměnné pH, v K_2SO_4 (3 opakování)
- celkový rozpustný N, C, NO_3^- , NH_4^+ atd. – FIA a liqui-TOC, výluh K_2SO_4 z půdy před založením pokusu, tři opakování
- celkový obsah N a C – mletí 1 g půdy

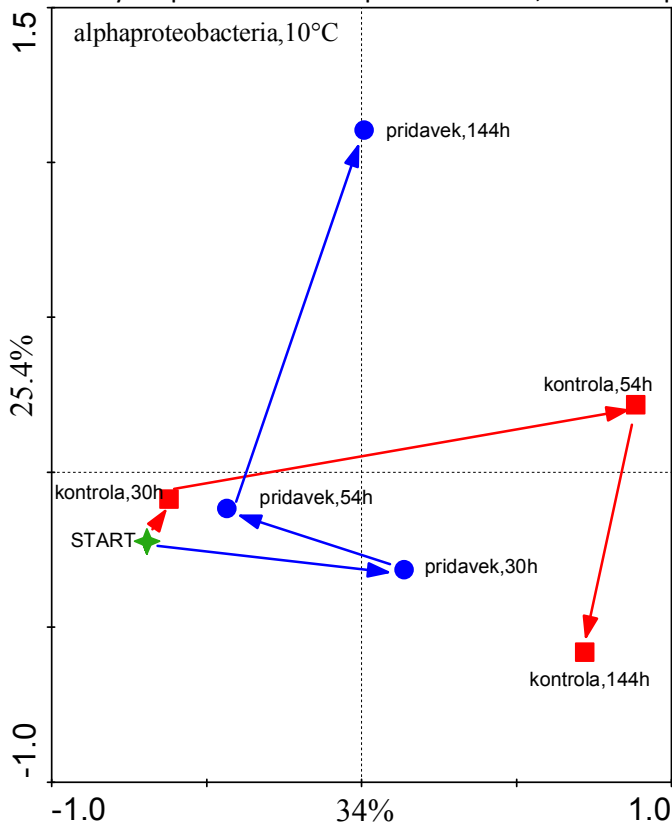
Průběžné analýzy (z půdy po přidavku nitrátů (čas nula) a po inkubaci):

- měřit obsah oxidu dusného (kyslíku) na GC
- celkový rozpustný N, C, NO_3^- , NH_4^+ atd. – FIA a liqui-TOC, výluh K_2SO_4 , odebrat 3 g na výluh
- DNA analýzy – zmrazit 2 g
- měřit výměnné pH v K_2SO_4 před zamražením

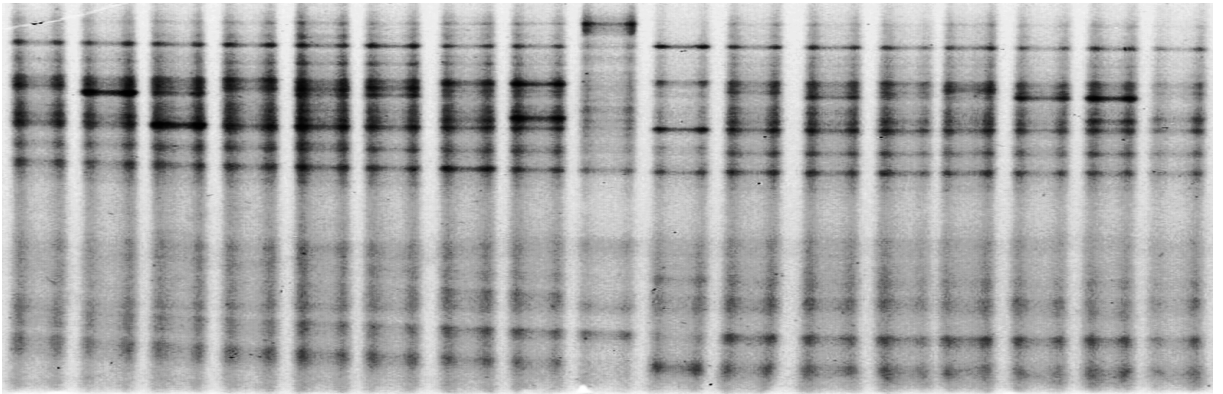
PŘÍLOHA Č.2 – DGGE alphaproteobacteria



Obr. I PCA analýza společenstva alfaproteobakterií, inkubace při 0°C

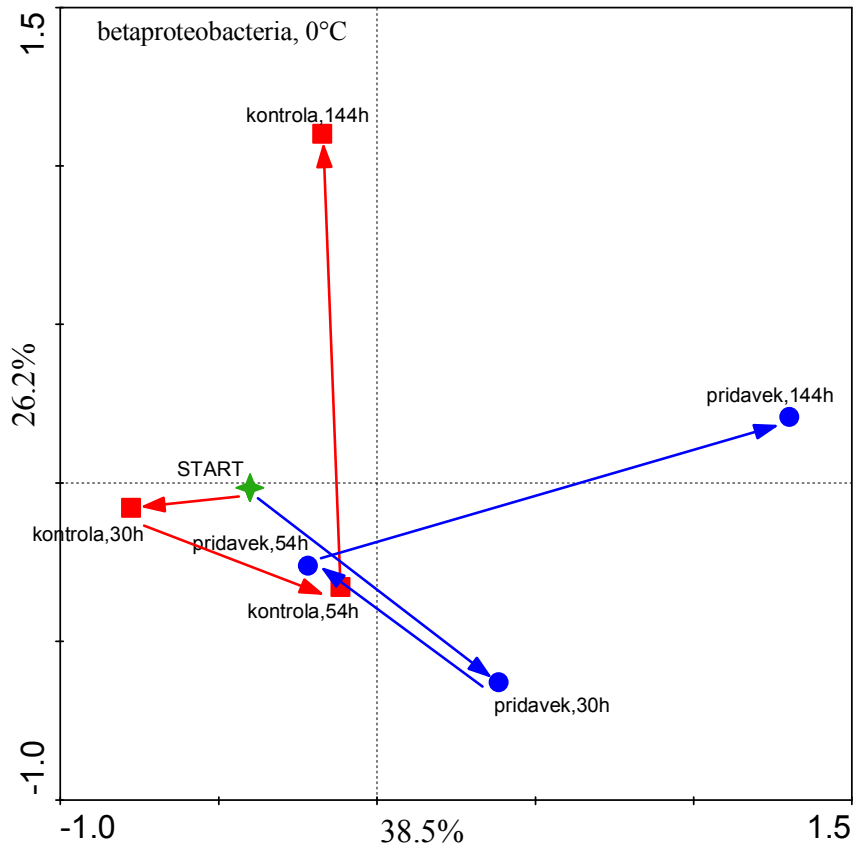


Obr. II PCA analýza společenstva alfaproteobakterií, inkubace při 10°C

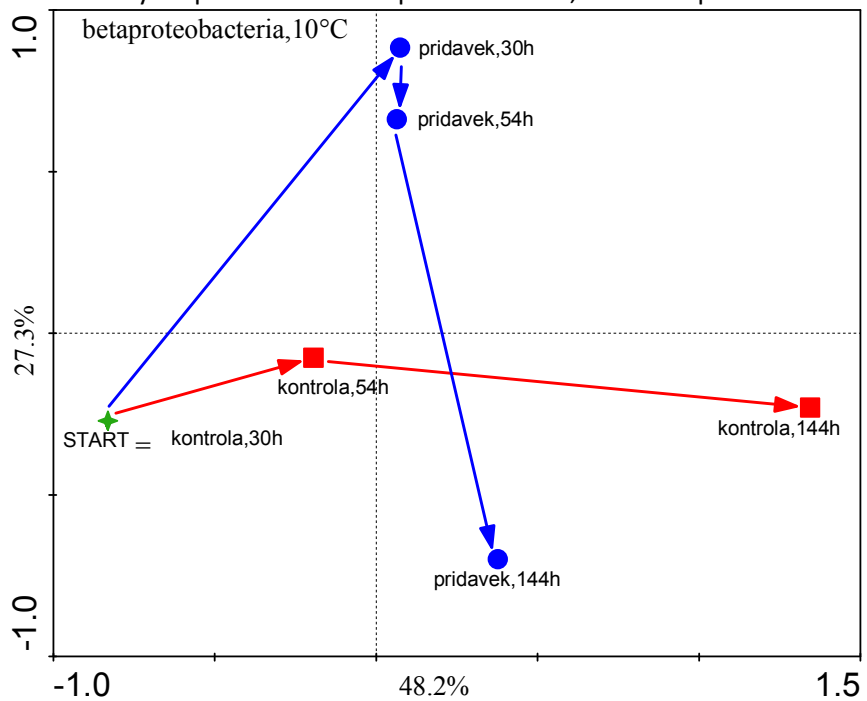


Obr.č.2 Proužky gelu denaturační gradientové gelové elektroforézy pro společenstvo α -proteobakterií

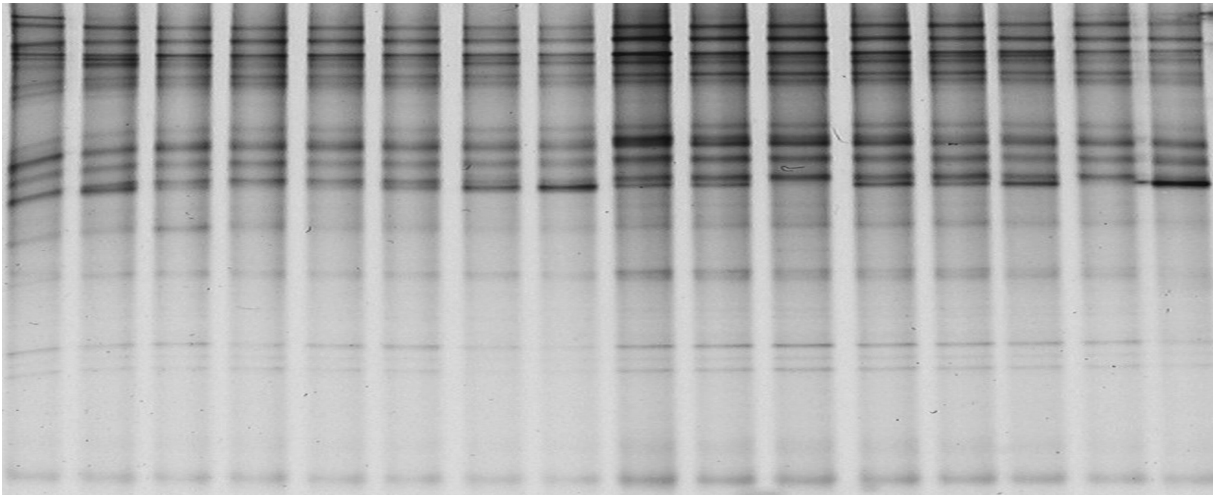
PŘÍLOHA Č.3 – DGGE betaproteobacteria



Obr.III PCA analýza společenstva betaproteobakterií, inkubace při 0°C



Obr.IV PCA analýza společenstva betaproteobakterií, inkubace při 10°C



Obr.č.3 Proužky gelu denaturační gradientové gelové elektroforézy pro společenstvo β -proteobakterií