

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Vliv kyselé a dusíkové zátěže na dostupnost dusičnanů  
v lesních půdách**

Diplomová práce

**Bc. Adéla Kotounová**

Školitelka: RNDr. Karolína Tahovská, Ph.D.

České Budějovice 2020

Kotounová, A., 2020: Vliv kyselé a dusíkové zátěže na dostupnost dusičnanů v lesních půdách. [Impact of acid and nitrogen load on nitrate availability in forest soils. Mgr. Thesis, in Czech.] – 50 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

Česká republika čelila historicky vysokým dávkám depozic síry (S) a dusíku (N). Depozice změnily půdní chemismus, a tím i koloběh N v půdě. Není ovšem jisté, které ze změn jsou důsledkem acidifikace půd, a které v důsledku vlivu N jako živiny. Cílem této práce bylo stanovit dostupnost dusičnanů v půdách bukového a smrkového lesa a určit, jak se mění v důsledku dusíkové a kyselé zátěže (aplikace kyseliny sírové a dusičnanu amonného; šestiletý terénní experiment Krušné hory). Byly vyhodnoceny další parametry ovlivňující dostupnost dusičnanů: rychlost čisté mineralizace a nitrifikace, dostupnost amonných iontů a velikost mikrobiální biomasy. Okyselení snížilo nitrifikaci v půdách smrkového lesa, zatímco N zvýšil mikrobiální biomasu v půdách bukového lesa.

**Annotation:**

The Czech Republic faced high acid deposition in the past that altered soil chemistry and nitrogen (N) cycle. However, it is not clear whether the changes are related to soil acidification or to the nutritional effect of N. The aim of this study was to determine the availability of nitrates in the beech and spruce forest soils and to determine how it is influenced by acid and N addition (application of sulfuric acid and ammonium nitrate; a six-year field experiment in the Ore Mountains). Other soil characteristics influencing nitrates were evaluated: net N mineralization and nitrification, the availability of ammonium and microbial biomass. Soil acidification affected spruce forest nitrification while N addition increased beech forest microbial biomass.

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 jejich 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

Datum: .....

Podpis: .....

Adéla Kotounová

## **Poděkování**

Ráda bych zde poděkovala především mé školitelce RNDr. Karolině Tahovské, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady, trpělivost a čas během vypracovávání mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Petru Šmilauerovi Ph.D. za odbornou pomoc při statistickém zpracování dat. Poděkování také patří všem, kteří mi pomáhali při zpracování vzorků v laboratoři. A v neposlední řadě patří velký dík také mé rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

# Obsah

1. Úvod .....	1
2. Literární rešerše .....	4
2. 1. Dusík jako nepostradatelná živina .....	4
2.2. Zásobníky N, jeho vstupy do půdy .....	4
2. 3. Dusičnany – nejmobilnější forma N .....	5
2. 3. 1. Vznik $\text{NO}_3^-$ – nitrifikace .....	5
2. 3. 2. pH půdy a nitrifikace.....	6
2. 3. 3. Imobilizace $\text{NO}_3^-$ v půdě a jeho ztráty .....	7
2. 3. 4. Dostupnost $\text{NO}_3^-$ v půdách – shrnutí.....	9
2. 4. Zvýšený vstup N do ekosystému .....	10
2. 5. Hypotézy.....	13
3. Materiál a metody.....	14
3. 1. Lokalita výzkumu .....	14
3. 2. Terénní experiment.....	15
3. 3. Analýzy půdních vzorků.....	16
3. 3. 1. Stanovení suché hmotnosti půdy .....	16
3. 3. 2. Stanovení rychlosti čisté mineralizace N a nitrifikace.....	16
3. 3. 3. Stanovení C a N mikrobiální biomasy .....	16
3. 3. 4. Statistické vyhodnocení dat .....	17
4. Výsledky.....	18
4. 1. Dostupnost N- $\text{NH}_4$ .....	18
4. 2. Dostupnost N- $\text{NO}_3$ .....	21
4. 3. Rychlost čisté mineralizace N .....	23
4. 4. Rychlost čisté nitrifikace .....	26
4. 5. Mikrobiální biomasa.....	28
5. Diskuze.....	35
5. 1. Výchozí charakteristika půd obou porostů .....	35
5. 2. Změny dostupnosti N půd vlivem experimentálních zásahů.....	36
5. 2. 1. Vliv N jako živiny.....	37
5. 2. 2. Vliv zvýšené kyselé zátěže .....	38
6. Závěr.....	40
7. Literatura .....	41

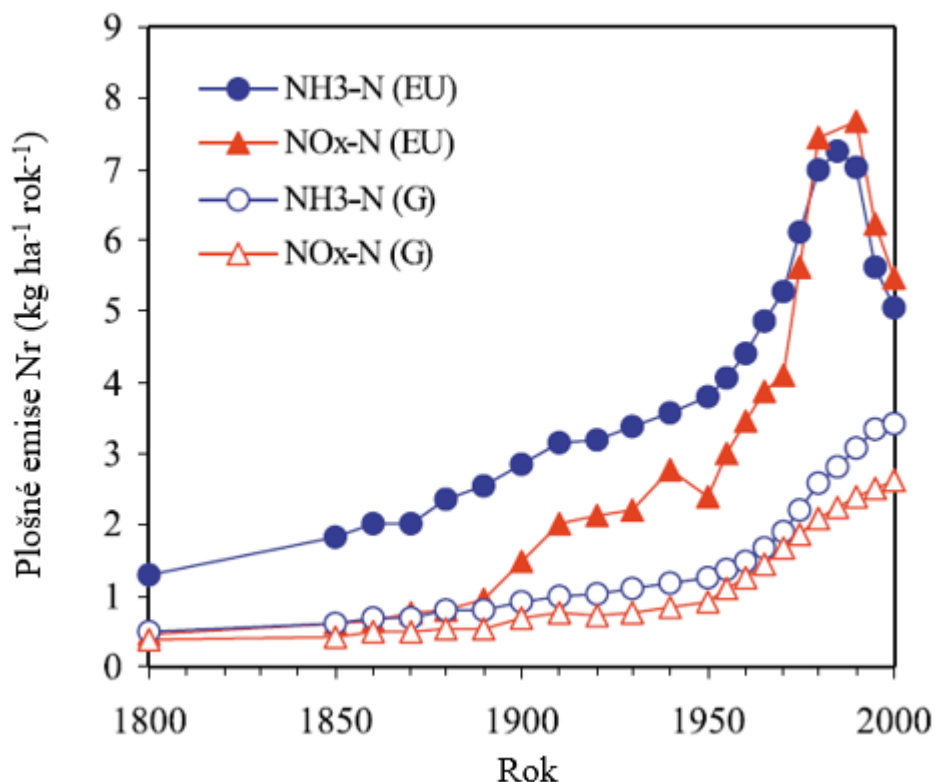
# 1. Úvod

V posledních několika desítkách let došlo vlivem zvýšených depozic dusíku (N) a síry (S) k narušení fungování ekosystémů, což vedlo ke změnám koloběhů prvků a jejich přirozených procesů přeměn odehrávajících se především v půdě (Schulze, 1989). Nadměrné vstupy okyselujících látek ve formě síranů, dusičnanových a amonných iontů ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NH}_4^+$ ) do půdy způsobily její acidifikaci, ztrátu bazických kationtů a uvolnění toxických hlinitých iontů ( $\text{Al}^{3+}$ , Blaser a kol., 1999). Přílišný přísun N, který je též významnou živinou, pak v některých typech ekosystémů způsobil zrychlení mineralizace půdního organického N a následné vyplavování N ve formě  $\text{NO}_3^-$  z půd do vod (teorie dusíkové saturace; Aber a kol., 1998; Ågren a Bosatta, 1988). Vyplavování  $\text{NO}_3^-$  však není jednoznačným důsledkem a znakem, že ekosystém již další N nedokáže využít. Existují ekosystémy, které i přes vysoké nebo i dlouhodobé dávky stále N v podobě  $\text{NO}_3^-$  neztrácí nebo je jeho dostupnost v půdách jen nízká (Curtis a kol., 2011; Kopáček a kol., 2013; Tahovská a kol., 2020). Bylo zdokumentováno, že s okyselením i zvýšením N živinové úrovně ekosystémů může být spojeno mnoho dalších změn, jednak cyklů ostatních prvků (Högberg a kol., 2006), zejména uhlíku (C), a také změn v množství a druhové skladbě a bohatosti organismů (Schulte-Uebbing a de Vries, 2018; Storkey a kol., 2015; Treseder, 2008). Doposud však není jednoznačně prokázáno, které změny jsou dány spíše okyselujícím vlivem zvýšeného přísunu N, nebo vlivu N jako živiny.

Ve střední Evropě byly antropogenní depozicí nejvíce zasaženy horské lesy. Ty jsou v našich podmínkách tvořeny porosty s převahou smrku (*Picea abies*). V nižších polohách jde o lesy s příměsí jiných (*Abies alba*), i listnatých dřevin (*Fagus sylvatica*, *Betula pendula*, *Sorbus aucuparia*, *Acer pseudoplatanus*), ale od ~1050 m n. m. jsou pak už přirozeně smrkové (Šantrůčková a kol., 2010). Rostou povětšinou na kyselých horninách (žula, rula, svor aj.) a i jejich rostlinný opad je kyselý. Proto mají půdy takových ekosystémů přirozeně nižší pH, a tudíž jsou i citlivější ke změnám způsobeným zvýšenou kyselou depozicí. Kromě toho jsou to však ekosystémy původně přirozeně limitované N (Vitousek a Howarth, 1991). Je pro ně typická vyšší vlhkost a nižší průměrná teplota (Angelstam a Kuuluvainen, 2004). V důsledku toho se rostlinný opad rozkládá pomalu, půdy jsou charakteristické vysokou akumulací organické hmoty a vysokým poměrem C:N (Elliott-Fisk a Persson, 1988). Nedostatek (limitace N), či naopak přebytek N (saturace N) pak přímo ovlivňuje nejen primární produkci celého ekosystému (LeBauer a Treseder, 2008), ale může významně ovlivnit půdní mikrobiální

biomasu, její aktivitu a tedy i mineralizaci organického N (Treseder, 2008), dostupnost anorganického N a jeho případné ztráty (Gao a kol., 2015).

V České republice byly kyselou depozicí nejvíce postiženy Krušné hory, které se historicky nachází v oblasti tzv. Černého trojúhelníku. Toto území leží na pomezí hranic Česka, Polska a Německa. Během 50. let 20. století zde došlo k prudkému nárůstu produkce emisí oxidů N a S do ovzduší a tedy i nárůstu kyselé depozice (Kopáček a Veselý, 2005). Zdrojem těchto znečišťujících látek byly elektrárny spalující hnědé uhlí. V 80. letech 20. století rychlost produkce emisí dosáhla maximálních hodnot 125 kg S a 25 kg N ha<sup>-1</sup> rok<sup>-1</sup> (Hruška a Kopáček, 2005). Poté jejich množství v ovzduší rychle kleslo v důsledku politických a ekonomických změn v České republice (Kopáček a Veselý, 2005). Podobný trend dlouhodobě klesající produkce emisí N a S si od té doby zachovala celá Evropa (Obr. 1). Ve světovém měřítku však emise nadále rostou v důsledku rozvoje průmyslu a zemědělství a nárůstu populace, zejména v Asii a rozvojových zemích (Kopáček a Posch, 2011; Smith a kol., 2011; Galloway, Levy a Kasibhatla, 1994). Vliv zvýšené kyselá a N zátěže na ekosystémy a procesy v nich probíhající tak nadále zůstává důležitým tématem environmentálního výzkumu.



Obr. 1: Evropské (EU; 1,05 Gha) a globální (G; 13,6 Gha, kromě Antarktidy) rychlosti emisí reaktivního dusíku ( $N_r$ ) přepočítané na plochu půdy. Převzato a upraveno dle Kopáček a Posch (2011).

Cílem této práce bylo porovnat dostupnost  $NO_3^-$  v půdách dvou lesních porostů v oblasti Krušných hor ( $50^{\circ}35'24,0''S$   $13^{\circ}15'36,0''V$ ) během dlouhodobého terénního experimentu se zvýšenou kyselou (přídavek kyseliny sírové) a živinovou (přídavek dusičnanu amonného) zátěží. Monokulturní smrkový porost představoval variantu lesa s více kyselými půdami, zatímco v monokulturně bukovém porostu bylo pH půdy přirozeně vyšší. Během experimentu se podařilo aplikací kyseliny ještě více snížit pH půdní vody v obou porostech v průměru o 0,5 jednotky (Oulehle a kol., 2018). Přídavek N nevyvolal změnu pH. Dalším cílem bylo zjistit, zda existuje souvislost mezi dostupnostmi dusičnanů v těchto půdách, rychlostí čisté mineralizace N a velikostí mikrobiální biomasy, a zda se s oběma typy zátěže vztahy změní. V diplomové práci jsem zpracovala data z let 2013–2019. Laboratorní analýzy půd v letech 2018–2019 jsem prováděla vlastnoručně, data z předchozích let mi byla poskytnuta se svolením autorů.



## 2. Literární rešerše

### 2.1. Dusík jako nepostradatelná živina

Dusík je jedním z nejdůležitějších prvků na Zemi. Je hned po uhlíku, kyslíku a vodíku nejběžněji zastoupeným prvkem v tělech rostlin a živočichů (Son, 2001). Je nepostradatelný pro všechny živé organismy, protože je součástí esenciálních biomolekul potřebných pro život, mezi něž patří aminokyseliny a z nich složené bílkoviny, nukleové kyseliny tvořící genetickou informaci, zelené barvivo rostlin chlorofyl a enzym RuBisCo, který je nezbytný při fotosyntéze k fixaci vzdušného oxidu uhličitého rostlinami. Dusík se v životním prostředí vyskytuje v několika různých formách, v oxidačních stavech od -II až po V. Zahrnuje jak látky organické (aminokyseliny, aminy, aj.), tak i anorganické (amoniak a amonný iont –  $\text{NH}_3$  a  $\text{NH}_4^+$ , dusičnanový iont –  $\text{NO}_3^-$ , oxid dusný –  $\text{N}_2\text{O}$ , molekulární dusík –  $\text{N}_2$  a oxidy dusíku –  $\text{NO}_x$ ; Martínez-Espinosa a kol., 2011). V koloběhu N hrají významnou roli mikroorganismy, které pomocí enzymů štěpí N uložený v organické hmotě na jednodušší sloučeniny a poté je mineralizují. Minerální N využívají buď k zabudovávání do vlastní biomasy, tedy k růstu, nebo ho využívají v energetickém metabolismu jako donory a akceptory elektronů. Tímto způsobem přeměňují jednu formu N na jinou a mineralizací zpřístupňují N znovu v anorganické formě rostlinám. Proto je cyklus N jedním z nejsložitějších v porovnání s ostatními cykly živin.

### 2.2. Zásobníky N, jeho vstupy do půdy

Většina N je uložena v litosféře, přibližně 98% (Šimek a Cooper, 2006). Z ní se N do půdy dostává mechanickým a chemickým zvětráváním hornin. Horniny bohaté na N obsahují 500–600 mg N  $\text{kg}^{-1}$  horniny (pokrývají 75 % zemského povrchu; Houlton, Morford a Dahlgren, 2018). Ty chudší obsahují méně než 100 mg N  $\text{kg}^{-1}$  horniny (Holloway a Dahlgren, 2002). V průměru se uvádí, že celosvětově není přísun N do půdy zvětráváním úplně zanedbatelný. Odhady rychlosti uvolňování N do půd jsou v průměru 19–31 Tg N za rok (Houlton, Morford a Dahlgren, 2018), což je přibližně jedna třináctina globální fixace N (Fowler a kol., 2013).

Největším aktivním zdrojem N je však atmosféra. Zde N tvoří většinu objemu rozpuštěných plynů (78%), především v inertní formě molekulárního N ( $\text{N}_2$ ), ale je zde zastoupený i v dalších formách ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  a  $\text{NO}_x$ ; Šimek a Cooper, 2006). Ačkoli je  $\text{N}_2$  v atmosféře tak hojný, není přímo využitelný. Je to kvůli pevné trojně vazbě mezi oběma atomy, která ho činí jen málo reaktivním. Některé specializované druhy prokaryot (sinice, hlízkové

i některé volně žijící bakterie) dokáží  $N_2$  navázat a zpřístupnit ho pro rostliny a mikroorganismy ve formě  $NH_4^+$  (biologická fixace N; Son, 2001). Další zdroj N pro půdu představuje N uvolněný emisemi, který poté vstupuje do ekosystému jako atmosférická depozice. Rozptýlené částice N přecházejí z atmosféry přímo na zemský povrch. Emise N (a tudíž i depozice) jsou buď antropogenního (spalovací procesy a zemědělství; Gundersen, 1991) nebo přirozeného původu (sopečná činnost, fixace N blesky, aktivita mikroorganismů v půdě; Zhang a kol., 2012). Dále se N do půdy dostává rozkladem odumřelé organické hmoty (rostlinný opad, odumřelá biomasa mikroorganismů a živočichů, exudáty rostlin apod.). Pomocí enzymů produkovaných mikroorganismy, zejména houbami, jsou štěpeny složité organické látky na jednodušší rozpustné organické látky (rozpuštěný organický N: např. aminokyseliny, aminocukry apod.; proces depolymerizace organické hmoty; Schimel a Bennett, 2004). Ty jsou pak dále mineralizovány mikroorganismy a slouží zejména k tvorbě biomasy. Přebytek N pak v podobě  $NH_3$  uvolňují zpět do prostředí (proces mineralizace N). Amoniak (resp. amonné ionty) může být znovu využit mikroorganismy a rostlinami (proces asimilace N) nebo dochází k jeho využití v energetickém metabolismu mikroorganismů a je procesem nitrifikace přeměněn na  $NO_3^-$  (Martínez-Espinosa a kol., 2011).

## **2. 3. Dusičnany – nejmobilnější forma N**

### **2. 3. 1. Vznik $NO_3^-$ – nitrifikace**

Dusičnany ( $NO_3^-$ ) se v nenarušených půdách vyskytují obvykle v nízké koncentraci (Davidson, Hart a Firestone, 1992) a zároveň jsou nejmobilnější formou N. Jak už bylo zmíněno, vznikají v půdě v aerobním procesu nitrifikace primárně prostřednictvím nitrifikačních autotrofních mikroorganismů. Z hlediska výživy rostlin jde o klíčový krok v biogeochemickém cyklu N. Samotné mikroorganismy skrze nitrifikaci získávají energii, oxidací  $NH_4^+$  a  $NO_2^-$ , k fixaci anorganického C. Autotrofní nitrifikace probíhá ve dvou krocích. První krok (nitritace) je přeměna  $NH_3/NH_4^+$  na dusitanové ionty ( $NO_2^-$ ), která je prováděna autotrofními bakteriemi (z anglického ammonia oxidizing bacteria; AOB) a autotrofními Archei (z anglického ammonia oxidizing Archaea; AOA; Prosser a Nicol, 2012). Obě tyto skupiny disponují enzymy: ammonia monooxygenasa a hydroxylamin dehydrogenasa, které zajišťují přeměnu  $NH_4^+$  na  $NO_2^-$ . Při druhém kroku (nitratice) dochází k přeměně  $NO_2^-$  na  $NO_3^-$ . Tuto přeměnu provádějí autotrofní bakterie (z anglického nitrite-oxidizing bacteria; NOB), které disponují enzymem nitrit oxidoreduktázou (De Boer a Kowalchuk, 2001; Hu a He, 2017). Mezi AOB patří dva rody

vyskytující se v půdě: *Nitrosospira* a *Nitrosomonas* (Head a kol., 1993). Zástupcem AOA je např. *Nitrososphaera viennensis* (Tourna a kol., 2011). Mezi NOB patří zástupci rodu *Nitrobacter* (Teske a kol., 1994). Nedávný objev odhalil mikroorganismus, který dokáže provést celou nitrifikaci v jediném kroku a proces byl nazván „comammox“ (complete ammonia oxidizer; Pjevac a kol., 2017). Mikroorganismus rodu *Nitrospira* totiž disponuje geny, které kódují enzymy zodpovědné jak za oxidaci amoniaku (ammonia monooxygenasa a hydroxylamin dehydrogenasa), tak za oxidaci  $\text{NO}_2^-$  (nitrit oxidoreduktáza; Daims a kol., 2015; Hu a He, 2017). Tento mikroorganismus se běžně vyskytuje v terestrických i vodních ekosystémech (Pjevac a kol., 2017). Dusičnany mohou vznikat i v procesu heterotrofní nitrifikace. Heterotrofní nitrifikační bakterie (např.: *Thiosphaera pantotropha*, *Alcaligenes faecalis*; Kuenen a Robertson, 1994) a houby oxidují jak organické, tak anorganické formy N (Zhang a kol., 2014). Předpokládá se, že heterotrofní nitrifikace probíhá zejména v kyselých půdách (Kreitinger a kol., 1985), jelikož autotrofní nitrifikátoři mohou být citliví na nízké pH (Weber a Gainey, 1962). Heterotrofní nitrifikace je významný proces z hlediska produkce dusičnanů, avšak není zcela jasné, jak z tohoto procesu heterotrofové profitují.

### 2. 3. 2. pH půdy a nitrifikace

Jedním z faktorů, který zásadně ovlivňuje rychlost nitrifikace je kyselost nebo zásaditost půdy, přesněji půdního roztoku (zjednodušeně pH půdy). Dřívější studie předpokládaly, že rychlost nitrifikace je v kyselých půdách velmi nízká, v důsledku neschopnosti AOB oxidovat  $\text{NH}_4^+$  (Li a kol., 2018). Pokusy v laboratorních podmínkách na čistých kulturách ukázaly, že AOB jsou schopny oxidovat  $\text{NH}_4^+$  až od  $\text{pH} > 5,5$  (De Boer a Kowalchuk, 2001; Prinčič a kol., 1998). Při snížení pH je  $\text{NH}_3$  ionizován na  $\text{NH}_4^+$  (Frijlink a kol., 1992). V této souvislosti dochází ke snížení difúze  $\text{NH}_3$  a zvýšení požadavků na transport  $\text{NH}_4^+$  za spotřeby energie. Jak se však později ukázalo, nitrifikaci při nízkém pH mohou provádět AOA, která jsou schopná na rozdíl od AOB využít i  $\text{NH}_4^+$  (Zhang a kol., 2012). To poskytuje AOA výhodu v půdách s nízkým pH a vyšší koncentrací  $\text{NH}_4^+$ , a tím se AOA stávají převažující aktivní skupinou nad AOB v kyselých půdách (Prosser a Nicol, 2012). Nitrifikace tak pravděpodobně může probíhat i při velice nízkém pH okolo 3 (De Boer a Kowalchuk, 2001). Z výše řečeného vyplývá, že dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje rychlost nitrifikace a dostupnost  $\text{NO}_3^-$  v půdě je dostupnost substrátu, tedy  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ . Amoniak/amonné ionty se do půdy dostávají skrze biologickou fixaci N (Cusack, Silver a McDowell, 2009), mineralizací DON (rozpuštěný organický dusík; Schimel a Bennett, 2004), hnojením (Sponseller a kol., 2016) a také atmosférickými

depozicemi. Skrze atmosférické depozice se do lesních ekosystémů dostává různé množství N, obvykle rychlostí v rozmezí od 1 až do 60 kg N ha<sup>-1</sup> rok<sup>-1</sup> (Macdonald a kol., 2002). V našich podmínkách České republiky se v současnosti do půdy dostává množství reaktivního N v rozsahu 16–30 kg N ha<sup>-1</sup> rok<sup>-1</sup> (Oulehle a kol., 2006). Rychlost mineralizace organického N v lesních půdách se pohybuje do 10 kg N ha<sup>-1</sup> rok<sup>-1</sup> (Adams a kol., 1989). Dostupnost NH<sub>4</sub><sup>+</sup> v půdě je pak, kromě pH, ovlivněna ještě celou řadou jejích vlastností např. obsahem organické hmoty a tedy i množstvím vazebných míst (půdní sorpční komplex), typem vegetace (Chu a Grogan, 2010) a může se měnit i během sezóny v závislosti na aktivitě mikroorganismů a růstu vegetace.

V laboratorních podmínkách bývá nitrifikace obvykle měřena jako čistá změna koncentrace dostupného NO<sub>3</sub><sup>-</sup> za určitý časový úsek (Verchot a kol., 2001). Čistá nitrifikace, a tedy i koncentrace dusičnanů je v nenarušených půdách nízká, přestože hrubá produkce NO<sub>3</sub>, tedy přímo přeměna z NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (měřena obvykle zřed'ovací izotopovou metodou s pomocí značení <sup>15</sup>N; Šantrůček a Šantrůčková, 2014) může být velmi významná. Stark a Hart (1997) zjistili, že rychlost hrubé nitrifikace je v lesních půdách vysoká, ale mikrobiální biomasa je zároveň schopna asimilovat téměř všechny vyprodukované dusičnany. Rychlost čisté nitrifikace v lesních půdách se pohybuje v rozmezí od -0,07 do 2,80 mg N kg<sup>-1</sup> den<sup>-1</sup> (Hart a kol., 1994) a rychlost hrubé nitrifikace od 0,0 do 6,1 mg N kg<sup>-1</sup> den<sup>-1</sup> (Kuroiwa a kol., 2011). Další faktory, které ovlivňují nitrifikaci jsou: vlhkost, aerace, teplota a C:N poměr půdy (Sahrawat, 2008).

### **2. 3. 3. Imobilizace NO<sub>3</sub><sup>-</sup> v půdě a jeho ztráty**

Dusičnany jsou z půdy spotřebovávány zejména rostlinami, ale i mikroorganismy (imobilizace N). Preference rostlin pro příjem NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se liší na základě druhu rostliny (Haynes a Goh, 1978). Rostliny preferují N ve formě NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ale podle potřeby přijímají i NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Oaks a Hirel, 1985) nebo jednoduché organické látky (Dannenmann a kol., 2009). Při dočasném vyčerpání dostupného NH<sub>4</sub><sup>+</sup> v půdě, např. při odlesnění, byliny využívají zvýšený NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Kronzucker, Siddiqi a Glass, 1997). Dusičnany pak rostliny ve svých buňkách přeměňují zpět na NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a aminoskupiny (-NH<sub>2</sub>, enzym *nitrátreduktáza*; Nadelhoffer, Aber a Melillo, 1984), aby je mohly zapojit do syntézy aminokyselin (Oaks a Hirel, 1985). Jelikož jsou dusičnany v půdním prostředí různě dostupné a N je v půdách obvykle limitující živinou, rostliny využívají symbiotické vztahy s houbami (mykorrhizy), aby získávaly více minerálního N a to i z míst s jeho vyšší koncentrací, kam by kořeny rostlin nedosáhly (Wallander a kol., 1997). Dusík tak

může být v půdě transportován mycelii mykorrhizních hub i na poměrně velké vzdálenosti (Whiteside a kol., 2012), zejména v lesních ekosystémech.

Dusičnany mohou být z půdního roztoku imobilizovány také mikroorganismy. Ačkoli byl tento proces dříve spíše ignorován, bylo zjištěno, že významně ovlivňuje zásobník dostupného  $\text{NO}_3^-$  v půdě (Stark a Hart, 1997). Obecně bylo považováno za platné, že mikroorganismy přijímají preferenčně  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ , jelikož přijaté  $\text{NO}_3^-$  musí nejprve redukovat na  $\text{NH}_4^+$ , aby je mohly dále využít v metabolismu a zabudovat do aminokyselin (glutamin/glutamát; Hart a kol., 1994; Moir a Wood, 2001). Proces redukce  $\text{NO}_3^-$  je ale pro mikroorganismy energeticky náročný, a tudíž by pro ně mělo být výhodnější využít rovnou  $\text{NH}_4^+$ . Při zvýšené dostupnosti  $\text{NO}_3^-$  v půdě jsou bakterie schopné vytvářet specifické enzymy (nitrát reduktáza), které jim umožňují příjem  $\text{NO}_3^-$  (González a kol., 2006). Dusičnany jsou mikroorganismy přijímány zejména při nízké koncentraci  $\text{NH}_4^+$  v půdním roztoku. Existují ale i studie, které ukazují, že mikroorganismy imobilizují  $\text{NO}_3^-$  i při vysokých koncentracích  $\text{NH}_4^+$  v půdě (Bengtson a Bengtsson, 2005). Je totiž nutno zohlednit i význam rychlosti hrubé nitrifikace a mikrobiální imobilizace  $\text{NO}_3^-$ , které se ukázaly být značné, přestože v půdách byla dostupnost  $\text{NO}_3^-$  minimální. Tento proces je významný i v půdách s vyšší zátěží  $\text{NO}_3^-$  (Stark a Hart, 1997).

Imobilizace N v půdě je také, podobně jako nitrifikace, řízena půdním pH, které primárně ovlivňuje abundanci a diverzitu mikroorganismů (zejména bakterií) a velikost jejich biomasy, ale také schopnost mikroorganismů přijímat N (Rousk a kol., 2010). Nízké pH snižuje dostupnost rozpuštěného organického uhlíku (DOC, dissolved organic carbon), který slouží mikroorganismům jako zdroj energie a C. V kyselých půdách dochází k jeho vysrážení v nerozpustné agregáty (Nierop, Jansen a Verstraten, 2002) a v této podobě nejsou mikroorganismy schopny DOC plně využít. Snížení dostupnosti DOC vede k poklesu imobilizace N mikroorganismy a zvýšení mineralizace N a nitrifikace (Tahovská a kol., 2013). Přímý vliv na biomasu mikroorganismů má také uvolnění toxických  $\text{Al}^{3+}$  iontů, ke kterému dochází při poklesu půdního pH pod 5. Mikroorganismy při tak nízkých hodnotách pH v půdě nejsou schopny dobře přežít, dochází u nich k fyziologickému stresu (Piña a Cervantes, 1996) a tím by se mohla snižovat akumulace N v biomase.

Amoniak, jako substrát pro nitrifikaci, může být, kromě imobilizace rostlinami a mikroorganismy, imobilizován i abioticky vazbou na půdní sorpční komplex. Půdní sorpční komplex je tvořen souborem jílových minerálů, sesquioxidů a organických látek (půdní koloidy; Šantrůčková a kol., 2018). Díky svému velkému povrchu a náboji má půdní sorpční

komplex schopnost na sebe vázat rozpuštěné ionty z půdního roztoku, které mohou být však i zpětně uvolněny a zpřístupněny rostlinám a mikroorganismům. V literatuře je zdokumentována i abiotická sorpce  $\text{NO}_3^-$  v půdách, ale její mechanismus a rychlost není přesně znám. El Azhar a kol. (1986) prokázal reakci, při níž se dusitany při procesu nitrifikace váží na půdní organickou hmotu (POH). Jedním z faktorů majícím vliv na abiotickou imobilizaci  $\text{NO}_3^-$ , je množství a kvalita organického C v půdě. Dalším faktorem je aerace prostředí (Davidson, Chorover a Dail, 2003).

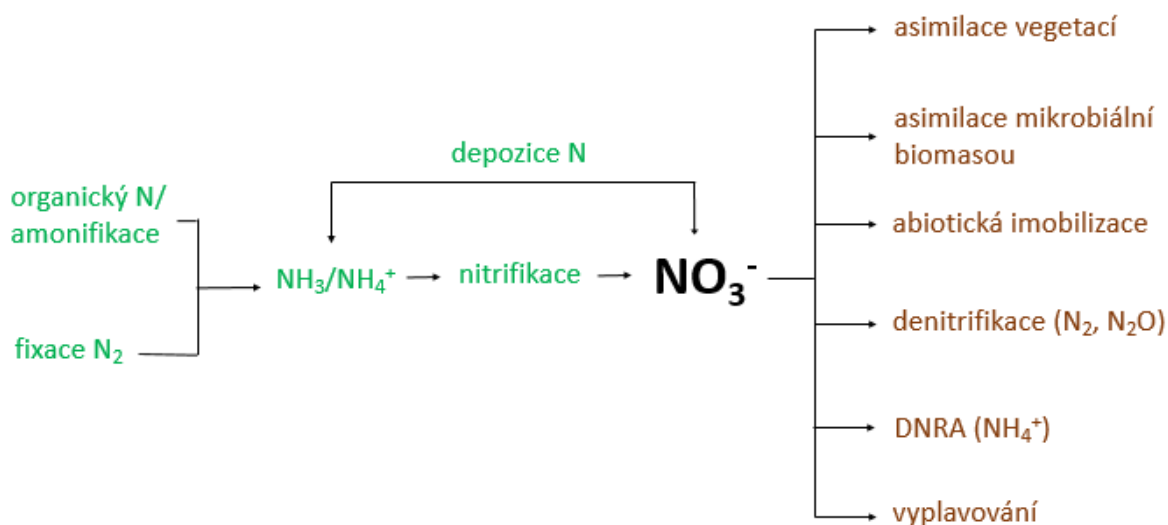
Dusičnany se mohou přeměňovat zpět na  $\text{NH}_4^+$  (disimilativní redukce nitrátů na amoniak, DNRA), což je anaerobní proces závislý na dostatečném přísunu organického C. Schopnost provádět DNRA je běžně rozšířená mezi bakteriemi (Philippot, 2005) i houbami (Zhou a kol., 2002). Obě skupiny využívají  $\text{NO}_3^-$  jako akceptoru elektronů, jde vlastně o anaerobní respiraci  $\text{NO}_3^-$  až na  $\text{NH}_4^+$ . Důležitým faktorem regulujícím DNRA je poměr dostupného C ku  $\text{NO}_3^-$  (Tiedje, 1988). Dusičnany se z půdy mohou zcela ztrácet během dalšího anaerobního procesu mikrobiální respirace, denitrifikace. V tomto případě, jsou ale redukovány až na plynné formy N ( $\text{N}_2$ , NO,  $\text{N}_2\text{O}$ ). Denitrifikace je ovlivněna několika hlavními faktory: koncentrací kyslíku v půdě, koncentrací  $\text{NO}_3^-$ , množstvím organického C v půdě a půdním pH (Tiedje, 1988). DNRA a denitrifikace probíhají obvykle při nízkých koncentracích kyslíku nebo ve zcela anoxických podmínkách (Strohm a kol., 2007). Takové podmínky v půdě nastávají při vyšších vlhkostech a nebo jsou vázány na mikroprostředí půdních agregátů (Rütting a kol., 2011).

#### **2. 3. 4. Dostupnost $\text{NO}_3^-$ v půdách – shrnutí**

Dusík do půdy vstupuje skrze suchou a mokrou depozici a biologickou fixaci molekulárního N (Obr. 2). Dalším zdrojem je rozpuštěný organický N, který je v procesu amonifikace přeměňován na  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ . Amonné ionty mohou být dále využity v procesu nitrifikace a přeměněny na  $\text{NO}_3^-$ . Dusičnany mohou být následně imobilizovány vegetací, mikrobiální biomasou nebo abioticky na pevné půdní částice. Dále se  $\text{NO}_3^-$  mohou přeměnit zpět na  $\text{NH}_4^+$  v procesu DNRA. Dusičnany se mohou také z půdy ztrácet denitrifikací jako plynný N nebo se vyplavovat do povrchových a podpovrchových vod.

## vstupy/produkce $\text{NO}_3^-$

## imobilizace/ztráty $\text{NO}_3^-$

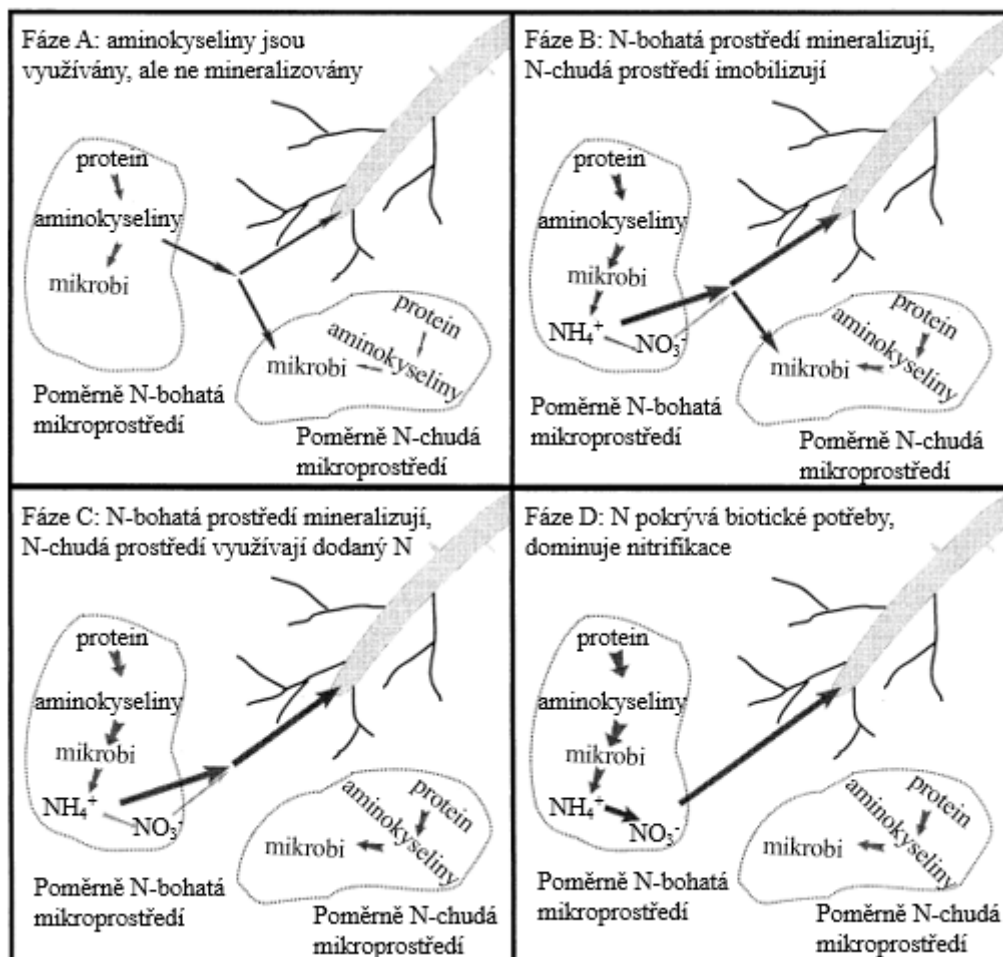


Obr. 2: Zjednodušené schéma hlavních vstupů a výstupů dusičnanů ( $\text{NO}_3^-$ ) do/z půdního roztoku. Zelená barva ukazuje vstupy a přeměny vedoucí ke vzniku dostupného  $\text{NO}_3^-$  v půdě tj. zvýšení jeho dostupnosti. Hnědá barva ukazuje procesy spotřeby  $\text{NO}_3^-$  v půdě, nebo jeho odstranění (ztráty) z půd tj. snížení jeho dostupnosti.

## 2. 4. Zvýšený vstup N do ekosystému

Při nadměrném dlouhodobém vstupu N (atmosférická depozice, hnojení) do lesních půd může docházet k tomu, že z původně přirozeně N limitovaných půd, se stávají půdy N bohaté a mohou teoreticky dojít i do stádia tzv. saturace N (Aber a kol., 1998). Dle teorie je saturace N definována jako stav, kdy N vstupující do ekosystému již není imobilizován a následně je vyplavován převážně ve formě  $\text{NO}_3^-$ . Důležitou roli při zvýšených depozicích N hraje schopnost ekosystému N zadržet, což se děje buď biotickou (rostliny, mikroorganismy) nebo abiotickou (imobilizace na půdní částice) cestou. Mikrobiálně přeměněný N pak tvoří základ pro vznik stabilní N organické hmoty, kde může být N dlouhodobě imobilizován (Kallenbach, Frey a Grandy, 2016). Schimel a Bennett (2004) popsali čtyři fáze v koloběhu N podél gradientu dostupnosti minerálního N (Obr. 3). V N-chudých půdách dochází ke kompetici mezi rostlinami a mikroorganismy o organický N, protože množství a dostupnost minerálních forem N je velmi nízká vzhledem k pomalé dekompozici. Většinu tohoto organického N získají mikroorganismy a pouze malé množství se dostane difúzí ke kořenům rostlin (Obr. 3, fáze A). V mírně N-chudých půdách, kde se rychlost dekompozice, depolymerizace a uvolnění N

zrychluje, se zvyšuje množství N-bohatých mikroprostředí, což vede ke zvýšení dostupnosti N pro mikroorganismy a rostliny. Mikroorganismy jsou méně limitovány N a mohou začít mineralizovat DON v N-bohatých mikroprostředích, ze kterých se pak přebytečný  $\text{NH}_4^+$  šíří do N-chudých mikroprostředí. Pokud tato N-bohatá mikroprostředí přetrvávají v půdě delší dobu, může se vytvářet prostředí pro malou populaci nitrifikátorů (Obr. 3, fáze B). Se stále se zvyšující rychlostí mineralizace, respektive množstvím dostupného N, mikroorganismy přestávají být závislé na N, který je dodáván z N-bohatých mikroprostředí, což může vést ke snížení kompetice o N mezi mikroorganismy a rostlinami.  $\text{NH}_4^+$  se stává dominantní formou N a rostliny jej mohou využívat. Ačkoli se dostupnost  $\text{NH}_4^+$  zvyšuje, stále ho nemusí být dostatek pro nitrifikátory (Obr. 3, fáze C). Při vysoké koncentraci dostupného N, zbývá více  $\text{NH}_4^+$  pro nitrifikátory a  $\text{NO}_3^-$  se stává dominantní formou N v půdě a jeho přebytek může být vyplavován (Obr. 3, fáze D).



Obr. 3: Gradient dostupnosti N a měnící se převaha jednotlivých mikrobiálních půdních procesů podél tohoto gradientu. Celková dostupnost N a příjem N rostlinou se zvyšuje a mění podél hypotetického gradientu dostupnosti N. Diagramy specifikují, že polymery jsou přímo proteiny,



jako typické N-obsahující organické polymery v půdě. Fáze A–D označují předpokládané procesy v půdě, které jsou regulovány podle dominantní formy N v půdě. Šířka šipek označuje relativní velikost toků. Ve fázích B–D byly toky aminokyselin ke kořenům vynechány kvůli srozumitelnosti, ne kvůli tomu, že by neprobíhaly. Podobně ve fázi D, nějaké toky  $\text{NH}_4^+$  ke kořenům pravděpodobně probíhají. Převzato a upraveno dle Schimel a Bennett (2004).

Zvýšená dostupnost minerálního N může vyvolávat v lesním ekosystému celou kaskádu dalších změn nejen v koloběhu N, ale i dalších prvků. Dochází k obohacení rostlinných tkání o N a následně tedy i k obohacení jejich opadu, což zrychluje mineralizaci N a nitrifikaci (Aber a kol., 1998). V souvislosti se změnami v imobilizaci N rostlinami i mikroorganismy a rychlostí nitrifikace může docházet ke snižování půdního pH. Ne vždy však ke zvýšení kyselosti dochází (Tahovská a kol., 2020). Další změnou může být podpoření denitrifikace a tím produkce oxidů N a ztrát N z ekosystému (Barnard, Leadley a Hungate, 2005). Dále může docházet ke snížení biomasy a aktivity mykorhizních hub a ke změnám složení půdních houbových společenstev (Lilleskov a kol., 2019). V půdách obohacených o minerální formy N rostliny využívají jeho nadbytku a tím se zbavují závislosti na N, který je dodáván mykorhizními houbami a přestávají je podporovat svými asimiláty (Lilleskov a kol., 2019). To může vést ke snížení poměru houby:bakterie a ke zvýhodnění bakterií, případně poklesu produkce oxidativních enzymů (Morrison a kol., 2018) a mineralizace organické hmoty a limitaci mikroorganismů C nebo jiným prvkem, nejčastěji fosforem (P) (Högberg, Högberg a Myrold, 2007).

## 2. 5. Hypotézy

Testovaly jsme tři druhy zásahů, které mohly ovlivnit dostupnost  $\text{NO}_3^-$  (popřípadě minerálního N) v lesních půdách a související procesy čisté mineralizace N a nitrifikace, a velikost mikrobiální biomasy: kyselý přídavek ve formě kyseliny sírové ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; S), živinový přídavek ve formě dusičnanu amonného ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; N) a jejich kombinaci (SN).

Předpokládala jsem, že:

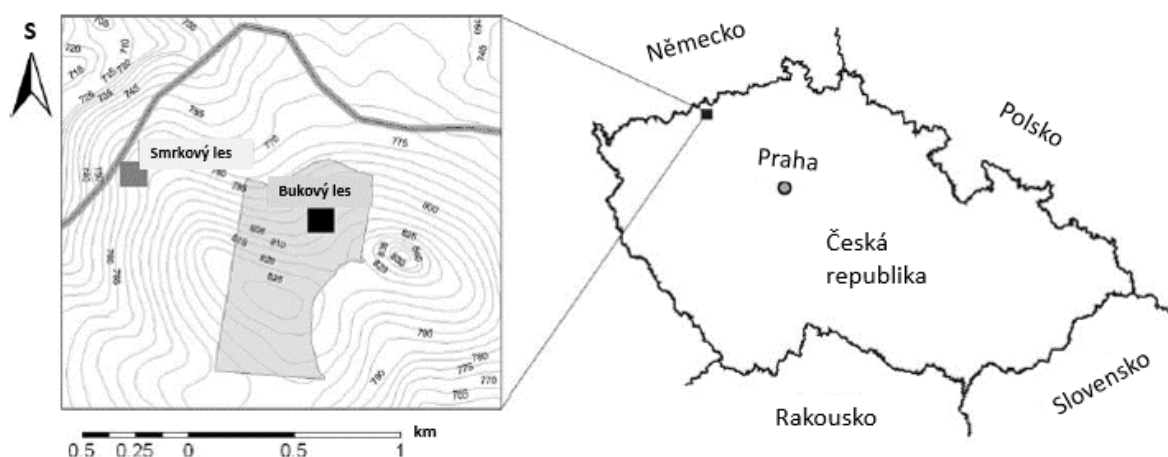
- 1) zásah N v podobě přídavku  $\text{NH}_4^+$  (jako substrátu nitrifikace) povede ke zvýšení dostupnosti  $\text{NO}_3^-$
- 2) zásah S (snížení pH půdy) povede snížení nitrifikace a k snížení dostupného  $\text{NO}_3^-$
- 3) oba kyselé zásahy (S a SN) nebudou mít stejný vliv na dostupnost  $\text{NO}_3^-$  (minerálního N) v obou lesních porostech vzhledem k jejich rozdílné výchozí půdní kyselosti – ve smrkovém lese s vyšší kyselostí půd bude reakce výraznější oproti půdám bukovým s vyšším pH

### 3. Materiál a metody

#### 3. 1. Lokalita výzkumu

Půda byla zkoumána ve dvou lokalitách vzdálených od sebe 1 kilometr. První lokalita je tvořena monokulturou smrku ztepilého (*Picea abies*, 90 let), druhá lokalita je tvořená monokulturou buku lesního (*Fagus sylvatica*, 120 let; Oulehle a Hruška, 2005). Oba zkoumané lesní porosty se nachází v Krušných horách (50°35'24,0"S 13°15'36,0"V) a můžeme je charakterizovat nadmořskou výškou 780 m n. m., průměrnou roční teplotou 6,3 °C (1991-2004) a průměrným úhrnem srážek 842 mm (Oulehle a Hruška, 2005). Podloží tvoří pararuly s nízkým obsahem MgO (2,21 %) a CaO (0,66 %). Převládajícím půdním typem je dystrická kambizem (Oulehle a kol., 2006). Během 20. století došlo k silnému narušení lesů kyselou depozicí sloučenin S a N, což vedlo k významnému snížení půdního pH, snížení bazické saturace a dalším změnám půdního chemismu (Oulehle a Hruška, 2005). Půdy smrkového porostu jsou více kyselé (3,80 a 4,07; organická a minerální půda) než půdy s porostem buku (4,34 a 4,23; organická a minerální půda) a také jejich bazická saturace je nižší (19 % vs. 70 %; Oulehle a kol., 2016).

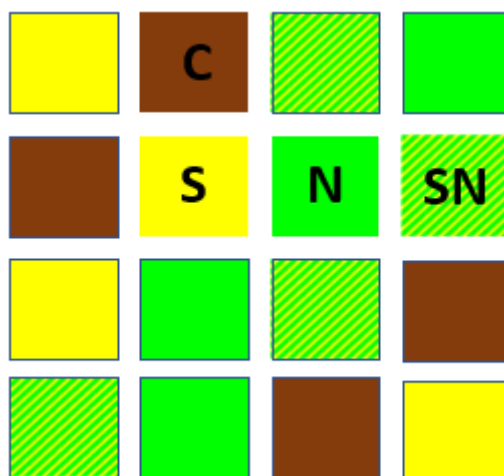
Podrost ve smrkovém lese tvoří metlička křivolaká (*Avenella flexuosa* L. Drejer), brusnice borůvka (*Vaccinium myrtillus* L.), kaprad' rozložená (*Dryopteris dilatata* (Hoffm.) A. Gray), třtina chloupkatá (*Calamagrostis villosa* (Chaix) J. F. Gmel) a svízel hercynský (*Galium saxatile* L.). V bukovém lese je to ojedinele třtina chloupkatá (*Calamagrostis villosa* (Chaix) J. F. Gmel) a metlička křivolaká (*Avenella flexuosa* L. Drejer) (Oulehle a kol., 2018) a semenáčky buku.



Obr. 4: Mapa zobrazující lokalitu výzkumu v Krušných horách. Převzato a upraveno dle Oulehle a Hruška (2005).

### 3. 2. Terénní experiment

V obou lesích byl založen pokus, ve kterém bylo manipulováno s půdní kyselostí a dostupností N pomocí pravidelné aplikace roztoků  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  do půdy anebo jejich směsi. V každém porostu byly ohraničeny plochy o velikosti 3 x 3 m, ve čtyřech opakováních pro každý zásah (celkem 16 ploch), v designu úplně znáhodněných bloků: kontrola – srážková voda (ctrl),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (N),  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (S),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (SN). Experiment byl založen na jaře roku 2013 (pre-treatment) a k prvnímu zásahu došlo v dubnu 2014. Dále byly roztoky aplikovány pravidelně v měsíčních intervalech (duben-listopad) až do podzimu 2019.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a/nebo  $\text{H}_2\text{SO}_4$  byly přidávány do půdy se srážkovou vodou, která byla nasbírána v místě výzkumu. V jedné zálivce se na jeden čtverec aplikovalo 15 l roztoku a následně se půda zalila dalšími 15 l čisté srážkové vody. Celková roční dávka síry činila  $50 \text{ kg S ha}^{-1} \text{ rok}^{-1}$  a dusíku  $50 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ rok}^{-1}$  (Oulehle a kol., 2018). Vzorke půd byly odebírány z LFH horizontu vždy na konci května (po odtátí sněhu) v letech 2013 až 2019. Vzorke byly na místě homogenizovány přes síto (4 mm), transportovány do laboratoře, kde byly uchovány při  $4^\circ\text{C}$  a vždy maximálně do týdne zpracovány. S a SN zásah snížil pH LFH horizontu půd v obou porostech přibližně o polovinu jednotky (Oulehle a kol., 2018). V obou těchto zásazích došlo také k poklesu rozpuštěného organického C o 30–50%, přičemž ve smrkovém porostu byla tato změna větší (Oulehle a kol., 2018).



Obr. 5: Znázornění designu terénního experimentu: C – kontrolní plocha; S – aplikace  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , N – aplikace  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , SN – kombinace aplikace  $\text{H}_2\text{SO}_4$  +  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

### **3. 3. Analýzy půdních vzorků**

#### **3. 3. 1. Stanovení suché hmotnosti půdy**

Všechna data byla přepočítána na gram suché půdy, což je bezrozměrné číslo, které vyjadřuje podíl sušiny ve vzorku. Čerstvé půdní vzorky byly naváženy do váženek o známé hmotnosti, poté byly vzorky vysušeny (105 °C, 5 hodin), znovu zváženy a byl vypočítán podíl suché hmoty.

#### **3. 3. 2. Stanovení rychlosti čisté mineralizace N a nitrifikace**

Čerstvé půdní vzorky byly rozváženy po 5 gramech do centrifugačních zkumavek (50 ml) ve dvou sadách. Vzorky byly ovlhčeny na optimální vlhkost (~60% maximální vodní kapacity), uzavřeny perforovaným parafilmem a inkubovány aerobně ve tmě při stálé teplotě v inkubátoru (15 °C) po dobu tří týdnů. První sada vzorků byla extrahována po 1 týdnu a druhá po třech týdnech. Extrakce probíhala tak, že do každé zkumavky bylo přidáno 20 ml 0,5 M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Poté byly vzorky míchány na horizontální třepačce (45 minut, 160 rpm) a následně stočeny v centrifuze (15 minut, 4000 rpm). Supernatant byl přefiltrován přes filtr ze skleněných vláken a uchován při teplotě -20 °C do analýzy koncentrace minerálního N. Koncentrace NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> byly měřeny spektrofotometricky pomocí FIA (QuickChem 8500, Lachat Instruments, USA). Rychlosti čisté mineralizace a nitrifikace byly stanoveny jako rozdíl v koncentraci N-NH<sub>4</sub>, respektive N-NO<sub>3</sub> mezi prvním a třetím týdnem inkubace za čas (děleno 14 dní) a přepočteny na gram suché hmotnosti půdy. Koncentrace N-NH<sub>4</sub> a N-NO<sub>3</sub> byly také vyjádřeny na gram suché půdy a odpovídají dostupnému N-NH<sub>4</sub> a N-NO<sub>3</sub> v půdách po prvním týdnu inkubace.

#### **3. 3. 3. Stanovení C a N mikrobiální biomasy**

Množství uhlíku (C<sub>mic</sub>) a dusíku (N<sub>mic</sub>) v mikrobiální biomase bylo stanoveno fumigačně-extrakční metodou (Vance, Brookes a Jenkinson, 1987) jako rozdíl v koncentraci celkového C, respektive N, v extraktu vzorku před fumigací (C<sub>org<sub>nefumig</sub></sub>; SN<sub>nefumig</sub>) a po fumigaci (C<sub>org<sub>fumig</sub></sub>; SN<sub>fumig</sub>) po jednom týdnu aerobní inkubace při 15°C (obdobné parametry inkubace viz kapitola 3. 3. 2.).

Půdní vzorky byly rozváženy po 5 gramech do centrifugačních zkumavek (50 ml), ovlhčeny (~60% MVK), inkubovány jeden týden a poté byla jedna sada vzorků vložena do exikátoru, kde byly vystaveny párám chloroformu po dobu 24 hodin a druhá byla ihned extrahována 20

ml 0,5 M roztoku K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (postup viz kapitola 3. 3. 2.). Po fumigaci bylo do vzorků přidáno 20 ml 0,5 M roztoku K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a byly opět extrahovány stejným způsobem jako vzorky nefumigované. Přefiltrované vzorky byly do analýzy uchovány ve scintilačních zkumavkách při teplotě -20 °C jeden měsíc. Množství celkového N, respektive C bylo stanoveno pomocí přístroje LiquiTOC II (Elementar, Germany). Při přepočtu byly použity konverzní faktory pro C (K<sub>EC</sub>) a N (K<sub>EN</sub>) mikrobiální biomasy, jejichž hodnoty jsou K<sub>EC</sub> = 0,45 a K<sub>EN</sub> = 0,54 (Vance, Brookes a Jenkinson, 1987):

$$C_{mic} [\mu\text{g C g}^{-1}] = \frac{(C_{orgfumig} - C_{orgnefumig})}{K_{EC}}$$

$$N_{mic} [\mu\text{g N g}^{-1}] = \frac{(SN_{fumig} - SN_{nefumig})}{K_{EN}}$$

Z C<sub>mic</sub> a N<sub>mic</sub> byl spočítán jejich poměr prostým vydělením. Lze předpokládat, že čím nižší je tento poměr, tím je mikrobiální společenstvo bohatší na bakterie.

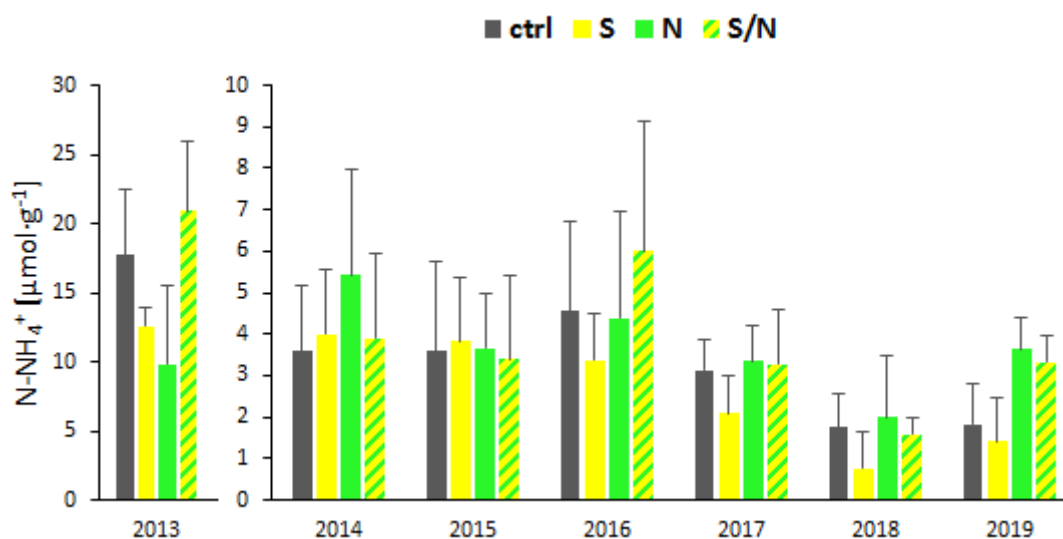
### 3. 3. 4. Statistické vyhodnocení dat

Testovala jsem normalitu dat vynesemím histogramů a použitím Komolgorova-Smirnova testu a homogenitu variancí Cochran–Bartlett testy. Následně jsem použila logaritmickou (log n, kde n je daná proměnná) transformaci pro proměnné N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>3</sub>, C<sub>mic</sub>, N<sub>mic</sub> a C/N<sub>mic</sub>. Pro proměnné mineralizace a nitrifikace jsem použila logaritmickou transformaci ve tvaru: log (n+0,5), kde n je daná proměnná. Pro vyhodnocení závislosti proměnných (N-NH<sub>4</sub>, N-NO<sub>3</sub>, mineralizace, nitrifikace C<sub>mic</sub>, N<sub>mic</sub> a C/N<sub>mic</sub>) na faktorech (ošetření, porost, rok) byla použita Repeated measures ANOVA (Statistica 64 ver. 13, Dell Inc.). Dále byl použit Tukey HSD post-hoc test k určení signifikantních rozdílů mezi jednotlivými průměry. Testovala jsem vzájemnou souvislost mezi rychlostí nitrifikace a mineralizace a rychlostí nitrifikace a dostupností N-NH<sub>4</sub> pomocí korelační analýzy. Další použitou metodou byla analýza Response ratios (RR), která zohledňovala počáteční variabilitu ploch (rok 2013) a výsledného (kumulativního) efektu ošetření (rok 2019) na všechny dané proměnné. Response ratios byly počítány jako přirozený logaritmus podílu průměru proměnné v roce 2013 ku dané proměnné v roce 2019 (Hedges, Gurevitch a Curtis, 1999). Rozdíly v RR mezi jednotlivými zásahy byly vyhodnoceny jednocestnou ANOVOU (Statistica 64 ver. 13, Dell Inc.).

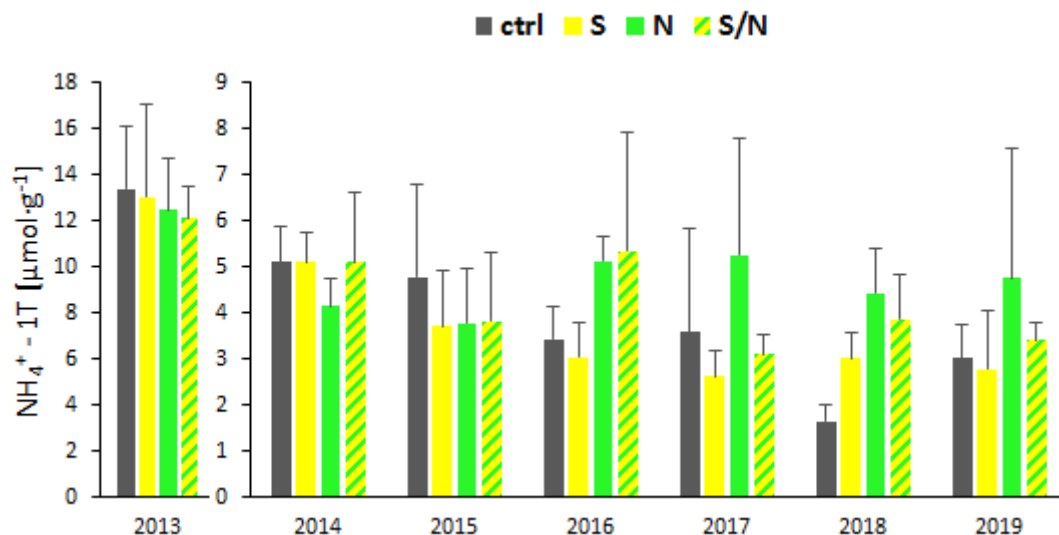
## 4. Výsledky

### 4. 1. Dostupnost N-NH<sub>4</sub>

Dostupnost N-NH<sub>4</sub> v půdách bukového lesa se během celé doby studie pohybovala v rozmezí od 0,76 do 21 μmol g<sup>-1</sup> (Obr. 6) a v půdách smrkového lesa od 1,7 do 13 μmol g<sup>-1</sup> (Obr. 7). V průměru byla dostupnost N-NH<sub>4</sub> vyšší (46,32 μmol g<sup>-1</sup>) v půdách bukového než smrkového lesa (41,48 μmol g<sup>-1</sup>; Tab. 1, F = 4,79; p = 0,039). Experimentální zásah nezpůsobil statisticky průkazný rozdíl v dostupnosti N-NH<sub>4</sub> ani v jednom ze sledovaných porostů (Tab. 1, faktor zásah; ns). Od roku 2016 lze však pozorovat navýšení dostupného N-NH<sub>4</sub> v obou zásazích obsahujících N (N a SN) zejména v bukovém lese (Obr. 6 a 7), což se projevilo v analýze RR jako průkazný vliv zásahu (4,48; p = 0,025) a rozdíl zásahu N od kontroly a zásahu S (Obr. 8). V zásahu N tedy nedošlo k tak velkému snížení dostupnosti N-NH<sub>4</sub> v roce 2019 jako v ostatních zásazích (Obr. 8). V půdách smrkového lesa klesla dostupnost N-NH<sub>4</sub> v roce 2019 stejně ve všech variantách zásahů.



Obr. 6: Dostupnost N-NH<sub>4</sub> v půdách bukového lesa pro jednotlivé experimentální zásahy v letech 2013 (pre-treatment) až 2019 (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).



Obr. 7: Dostupnost N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> v půdách smrkového lese pro jednotlivé experimentální zásahy v letech 2013 (pre-treatment) až 2019 (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).

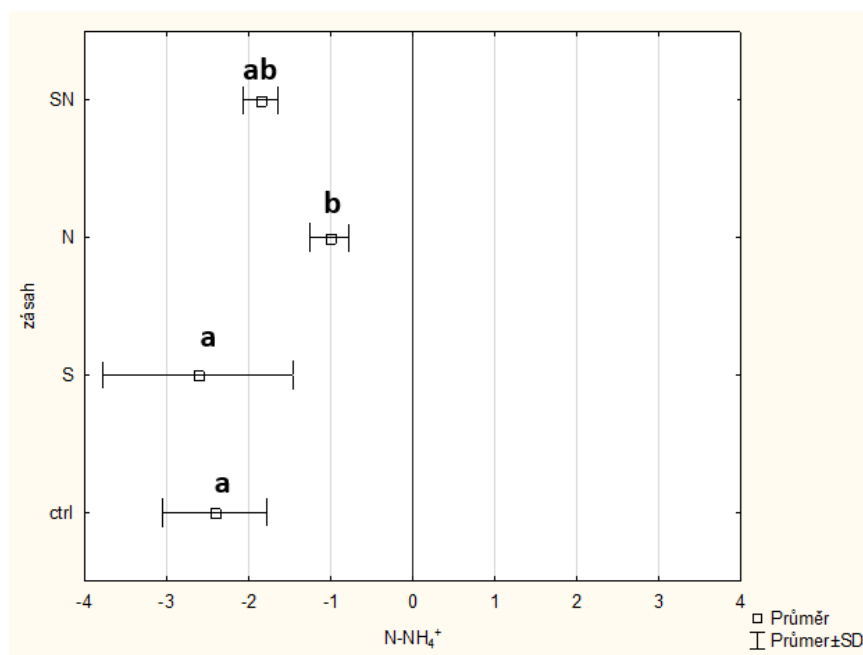
Tab. 1: Vliv faktorů na dostupnost amoniaku (N-NH<sub>4</sub>), dusičnanů (N-NO<sub>3</sub>), rychlost čisté mineralizace N (mineralizace), rychlost čisté nitrifikace (nitrifikace), mikrobiální C (Cmic) a N (Nmic) a jejich poměr (C/Nmic) v půdách smrkového a bukového lesa. Jsou ukázány výsledky analýzy Repeated measures ANOVA (F, p) pro jednotlivé faktory a jejich významné interakce: porost (buk vs. smrk), zásah (S, N, SN a ctrl) a rok (2013–2019).

	porost		zásah	rok		rok*porost		rok*zásah	
	F	p		F	p	F	p	F	p
N-NH <sub>4</sub>	4,79	0,039	ns	57,4	p<0,001	3,23	0,005	ns	
N-NO <sub>3</sub>	200	p<0,001	ns	31,3	p<0,001	8,21	p<0,001	ns	
mineralizace	ns		ns	4,32	p<0,001	4,59	p<0,001	ns	
nitrifikace	97,1	p<0,001	ns	6,27	p<0,001	10,6	p<0,001	ns	
Cmic	8,47	0,008	ns	41,9	p<0,001	7,69	p<0,001	1,75	0,038
Nmic	26,7	p<0,001	ns	10,6	p<0,001	5,86	p<0,001	1,78	0,034
C/Nmic	32,8	p<0,001	ns	43,8	p<0,001	23,25	p<0,001	ns	

ns = nesignifikantní vliv

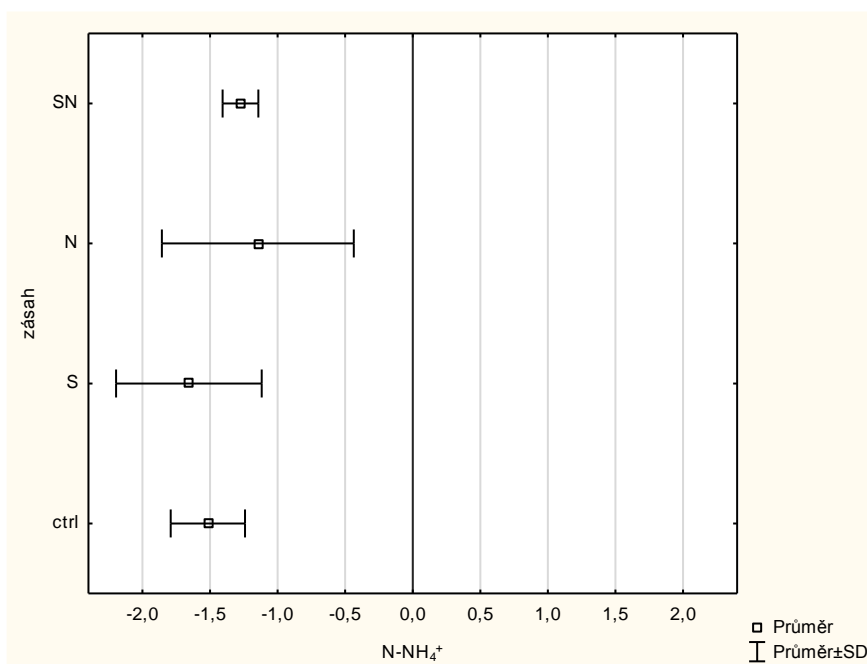


F = 4,482; p = 0,025



Obr. 8: RR pro dostupnost  $N-NH_4$  v půdách bukového lesa pro jednotlivé zásahy (S –  $H_2SO_4$ , N –  $NH_4NO_3$ , SN – kombinace  $H_2SO_4$  a  $NH_4NO_3$ , ctrl – kontrola). Písmenka ukazují porovnání průměrů (ANOVA, Tukey test) pro jednotlivé zásahy ( $p < 0,05$ ).

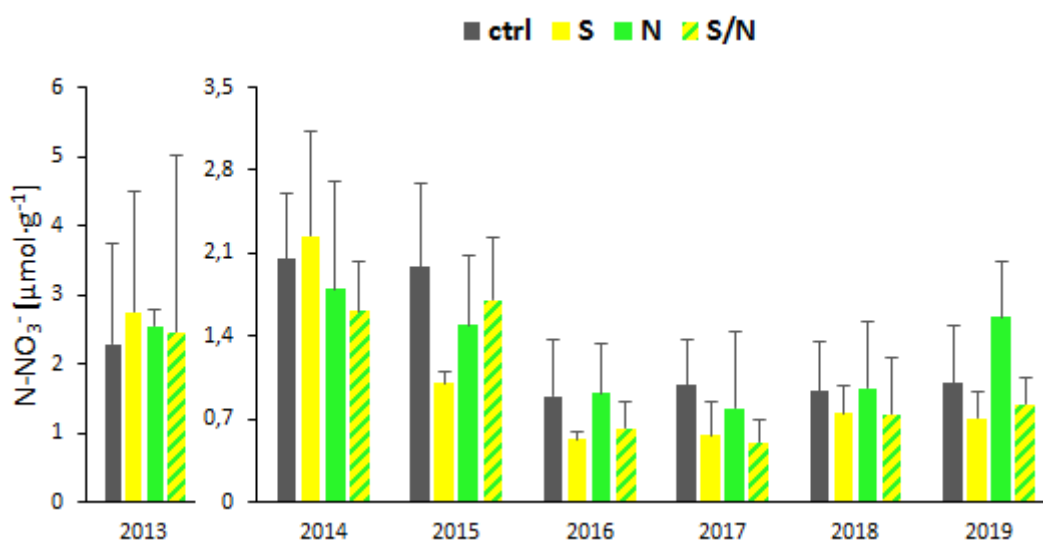
F = 0,957; p = 0,445



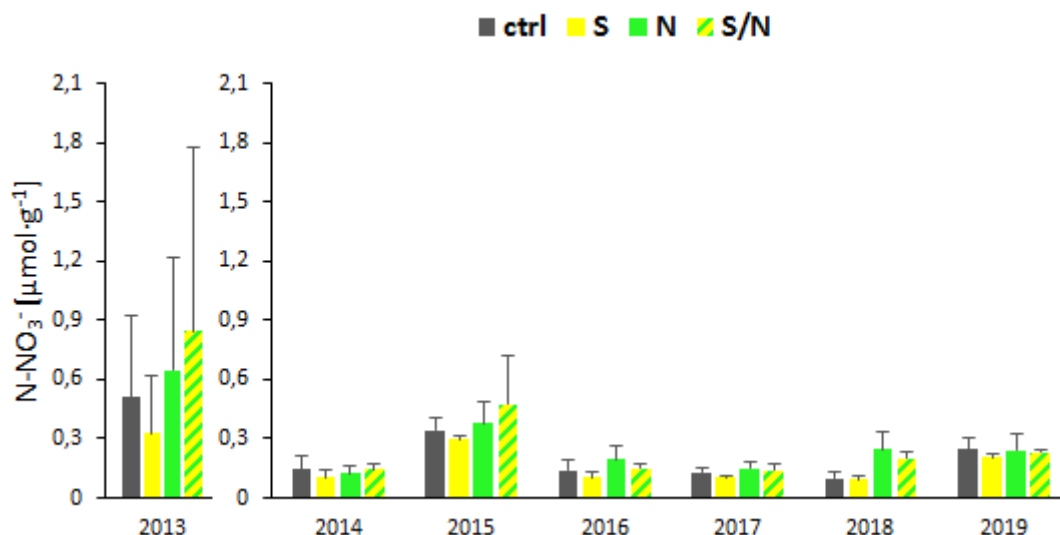
Obr. 9: RR pro dostupnost  $N-NH_4$  v půdách smrkového lesa pro jednotlivé zásahy (S –  $H_2SO_4$ , N –  $NH_4NO_3$ , SN – kombinace  $H_2SO_4$  a  $NH_4NO_3$ , ctrl – kontrola).

## 4. 2. Dostupnost N-NO<sub>3</sub>

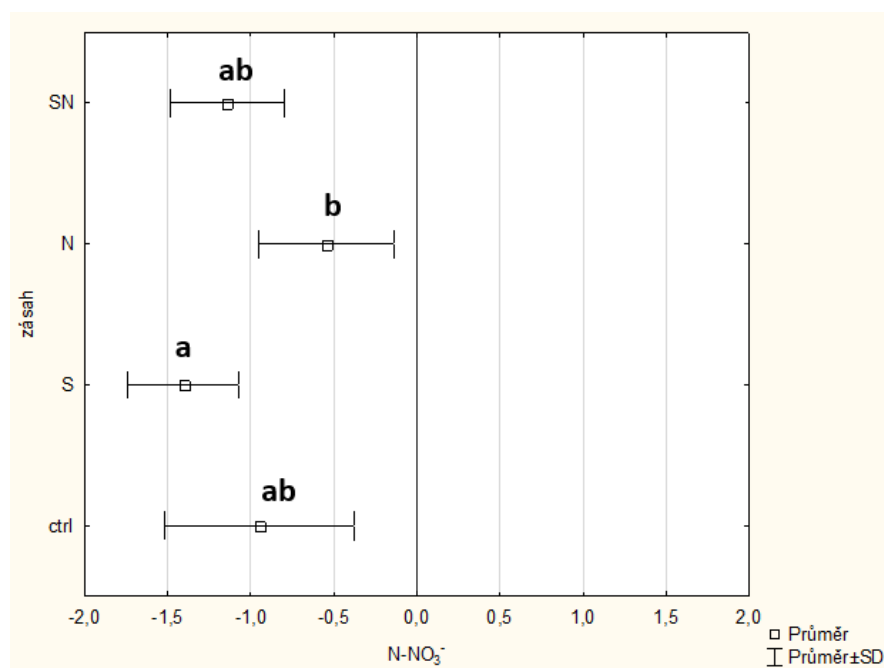
Dostupnost N-NO<sub>3</sub> se v půdách bukového lesa pohybovala v rozmezí od 0,51 do 2,74 μmol g<sup>-1</sup> (Obr. 10) a v půdách smrkového lesa od 0,10 do 0,85 μmol g<sup>-1</sup> (Obr. 11). Dostupnost N-NO<sub>3</sub> byla v průměru 1krát vyšší v půdách bukového lesa než v půdách smrkového lesa ( $F = 200$ ;  $p < 0,001$ ). Nebyl prokázán vliv zásahu na dostupnost N-NO<sub>3</sub> ani v jednom z porostů (Obr. 10 a 11, Tab. 1). Z analýzy RR vyplynul rozdílný vliv zásahů S a N na dostupnost N-NO<sub>3</sub> v obou porostech v posledním roce experimentu. Zatímco v půdách bukového lesa přídavek S snížil dostupnost N-NO<sub>3</sub> nejvíce ze všech zásahů, N snížil dostupnost nejméně (Obr. 12,  $p < 0,06$ ), ale ani jeden ze zásahů nebyl odlišný od kontroly. Lišily se tak tyto zásahy pouze mezi sebou. V půdách smrkového porostu oba zásahy s přídavkem N (N a SN) nejvíce snížily dostupnost N-NO<sub>3</sub>, ale od kontroly k průkazně rozdílnému snížení došlo pouze v kombinovaném zásahu (SN, Obr. 13). Průkazný rozdíl v SN zásahu byl dán tím, že v r. 2013 byla dostupnost N-NO<sub>3</sub> na plochách náhodně vybraných ke kombinovanému zásahu nejvyšší v porovnání s ostatními plochami, zejména S a kontrolní (Obr. 11, rok 2013).



Obr. 10: Dostupnost N-NO<sub>3</sub> v půdách bukového lesa pro jednotlivé experimentální zásahy v letech 2013 (pre-treatment) až 2019 (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).

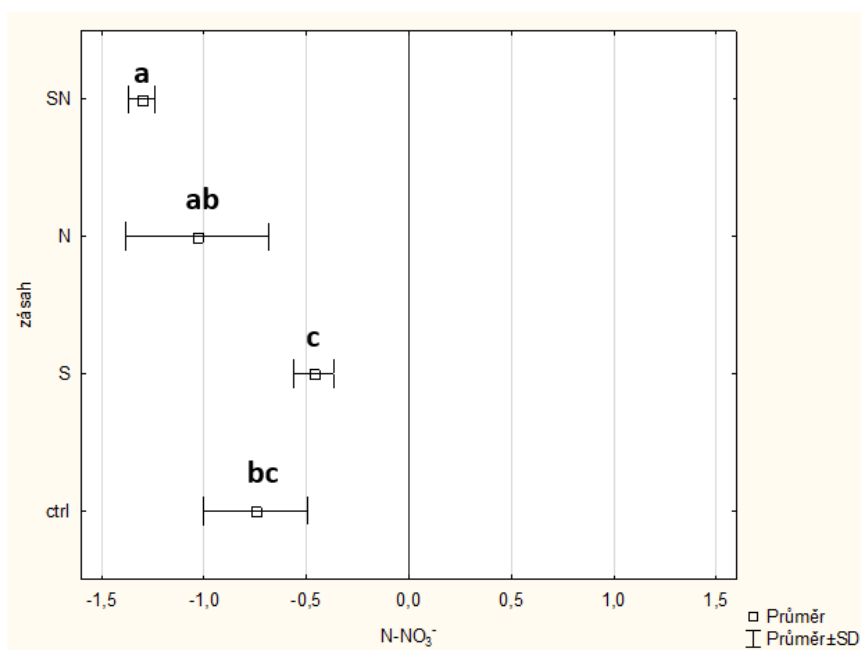


Obr. 11: Dostupnost N-NO<sub>3</sub> v půdách smrkového lesa pro jednotlivé experimentální zásahy v letech 2013 (pre-treatment) až 2019 (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).



F = 2,888; p = 0,080

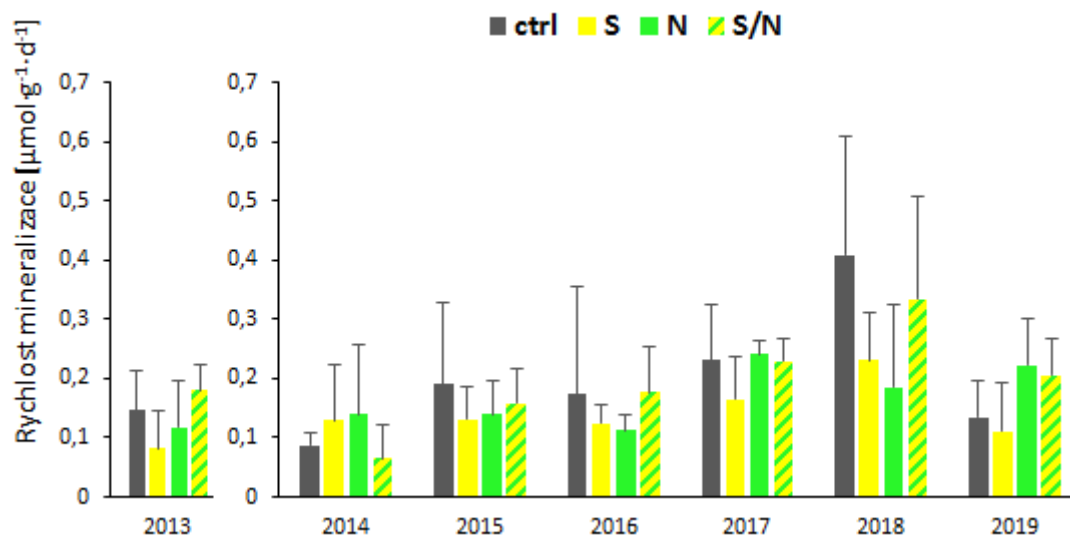
Obr. 12: RR pro dostupnost N-NO<sub>3</sub> v půdách bukového lesa pro jednotlivé zásahy (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola). Písmenka ukazují porovnání průměrů (ANOVA, Tukey test) pro jednotlivé zásahy (**p < 0,06**).



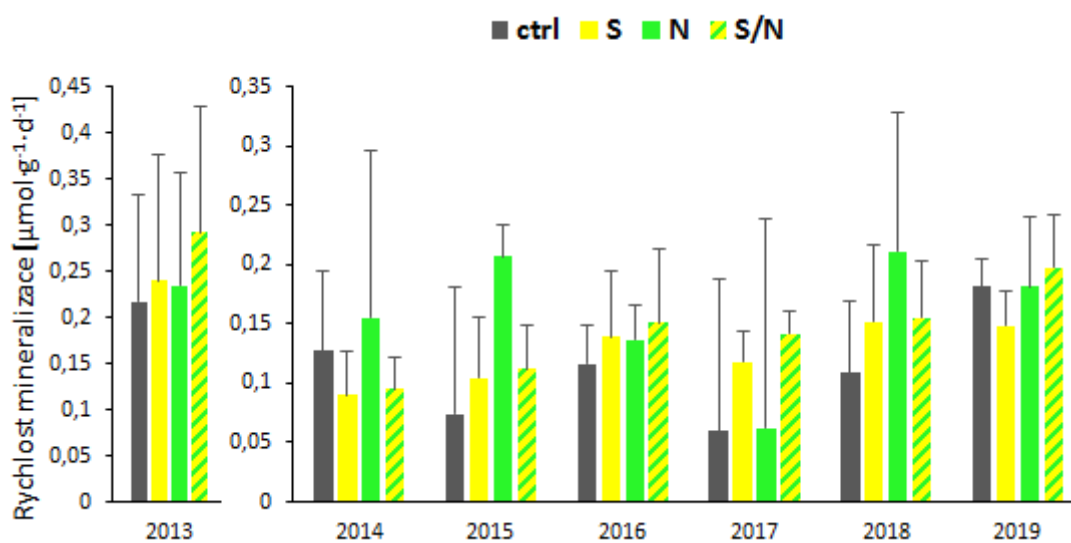
Obr. 13: RR pro dostupnost N-NO<sub>3</sub> v půdách smrkového porostu pro jednotlivé zásahy (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola). Písmenka ukazují porovnání průměrů (ANOVA, Tukey test) pro jednotlivé zásahy (p < 0,05).

#### 4. 3. Rychlost čisté mineralizace N

Porosty se v rychlosti mineralizace N v průměru nelišily (Tab. 1). V půdách bukového lesa se hodnoty mineralizace N pohybovaly od 0,07 do 0,41 μmol g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> a ve smrkovém byl rozsah rychlostí velmi podobný, od 0,06 do 0,29 μmol g<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> po celou dobu trvání experimentu. Analýza kumulativního efektu zásahu pomocí RR také neprokázala žádnou změnu způsobenou zásahy (Obr. 16 a 17).

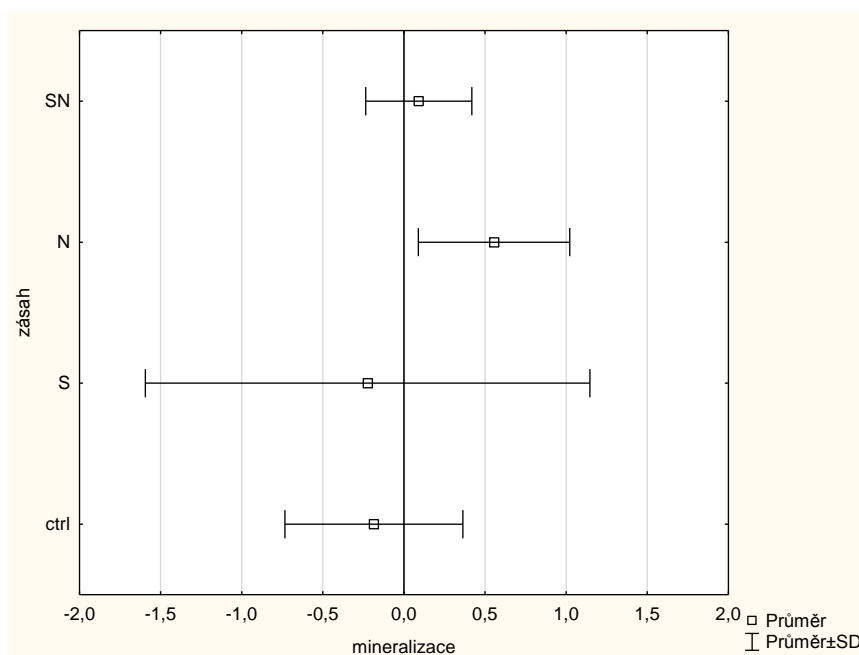


Obr. 14: Rychlost čisté mineralizace N v půdách bukového lesa pro jednotlivé experimentální zásahy v letech 2013 (pre-treatment) až 2019 (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).

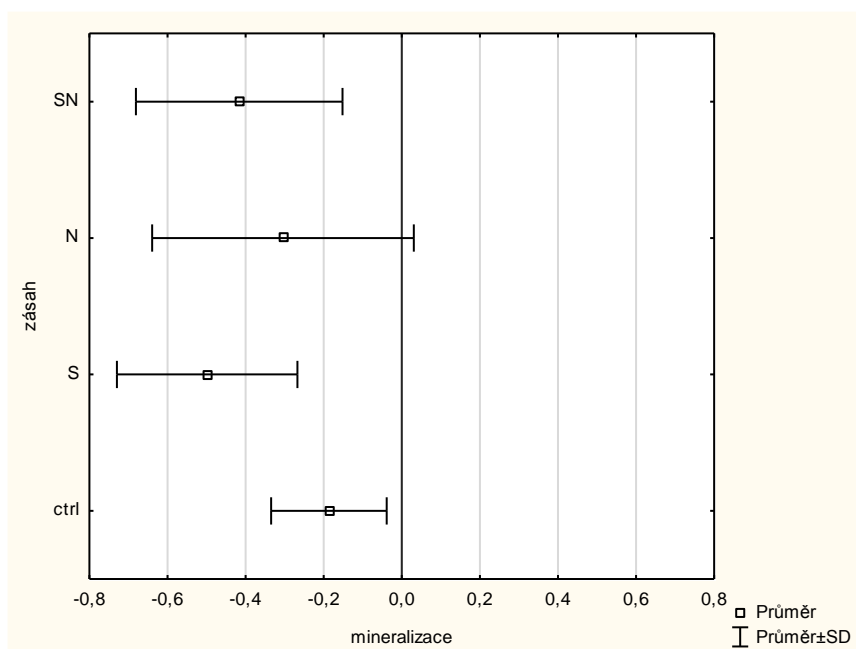


Obr. 15: Rychlost čisté mineralizace N v půdách smrkového lesa pro jednotlivé experimentální zásahy v letech 2013 (pre-treatment) až 2019 (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).

F = 0,826; p = 0,505



Obr. 16: RR pro rychlost mineralizace N v půdách bukového porostu pro jednotlivé zásahy (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).

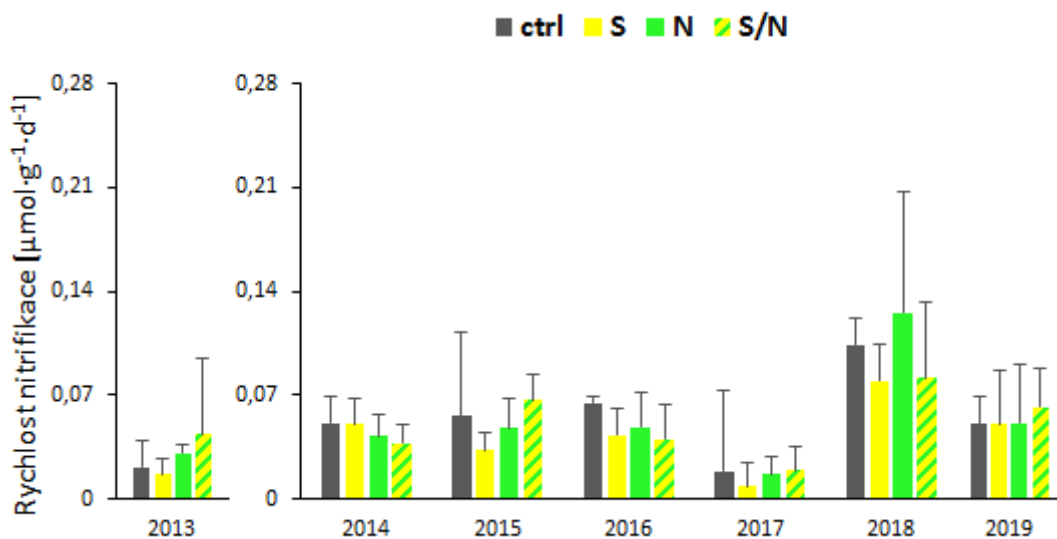


F = 1,143; p = 0,371

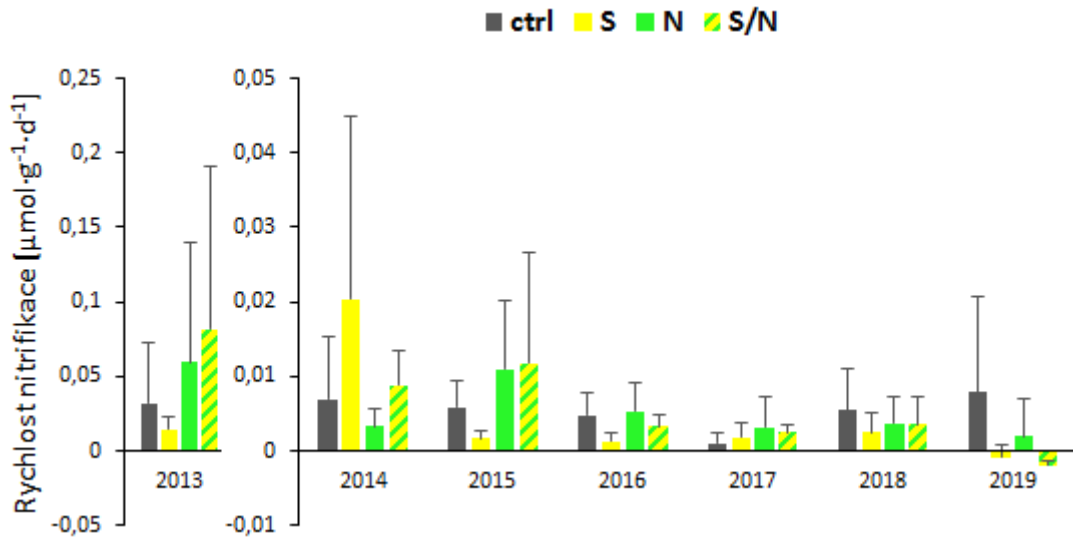
Obr. 17: RR pro rychlost mineralizace N v půdách smrkového porostu pro jednotlivé zásahy (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).

#### 4. 4. Rychlost čisté nitrifikace

Rychlost čisté nitrifikace se lišila v půdách obou porostů (Tab. 1,  $F = 97,13$ ;  $p < 0,001$ ). Vyšší rychlost byla zaznamenána v bukovém porostu v rozsahu od  $0,009$  do  $0,126 \mu\text{mol g}^{-1} \text{d}^{-1}$  (Obr. 18). V půdách smrkového lesa byla nitrifikace velmi nízká a v posledním roce dosahovala dokonce do záporných hodnot, od  $-0,002$  do  $+0,081 \mu\text{mol g}^{-1} \text{d}^{-1}$  (Obr. 19). Přestože nebyl nalezen významný vliv zásahu na rychlosti nitrifikace ani v jednom z porostů (Tab. 1), je zřejmé, že ve smrkovém porostu vlivem obou okyselujících zásahů (S a SN) došlo ke změně rovnováhy spotřeby a produkce  $\text{N-NO}_3$  (rok 2019, Obr. 19). Analýza RR neprokázala významný rozdíl mezi zásahy v bukovém porostu (Obr. 21). V půdách smrkového lesa RR nemohla být z důvodu záporné nitrifikace pro zásahy S a SN spočítána (Obr. 22). N zásah nebyl odlišný od kontrolního. Nenalezla jsem průkaznou korelaci rychlosti nitrifikace a dostupnosti  $\text{N-NH}_4$  jako jejího substrátu, ani souvislost rychlosti N s nitrifikací ani v jednom z porostů (data nejsou ukázána).

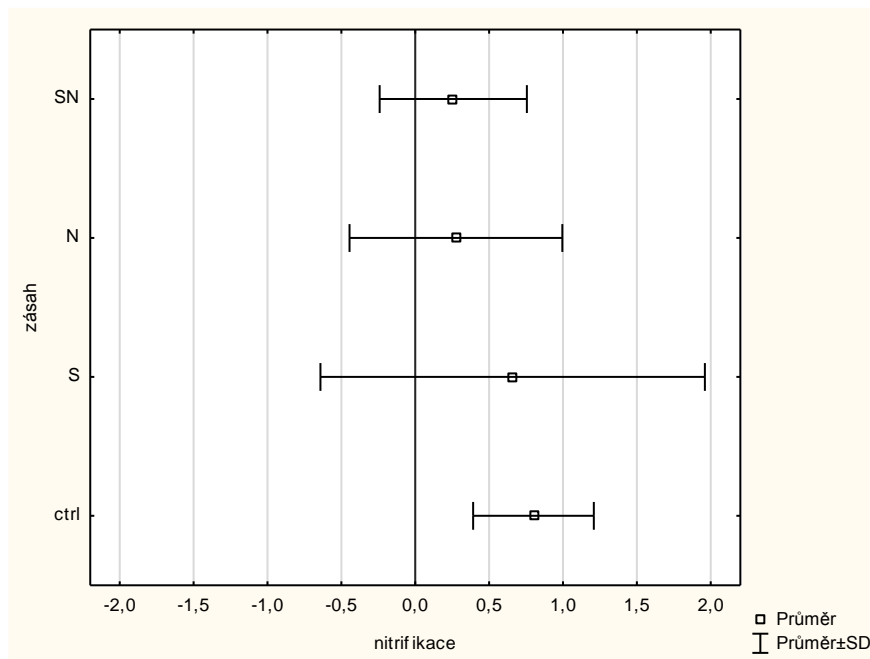


Obr. 18: Rychlost čisté nitrifikace v půdách bukového lesa pro jednotlivé experimentální zásahy v letech 2013 (pre-treatment) až 2019 (S –  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , N –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , SN – kombinace  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , ctrl – kontrola).



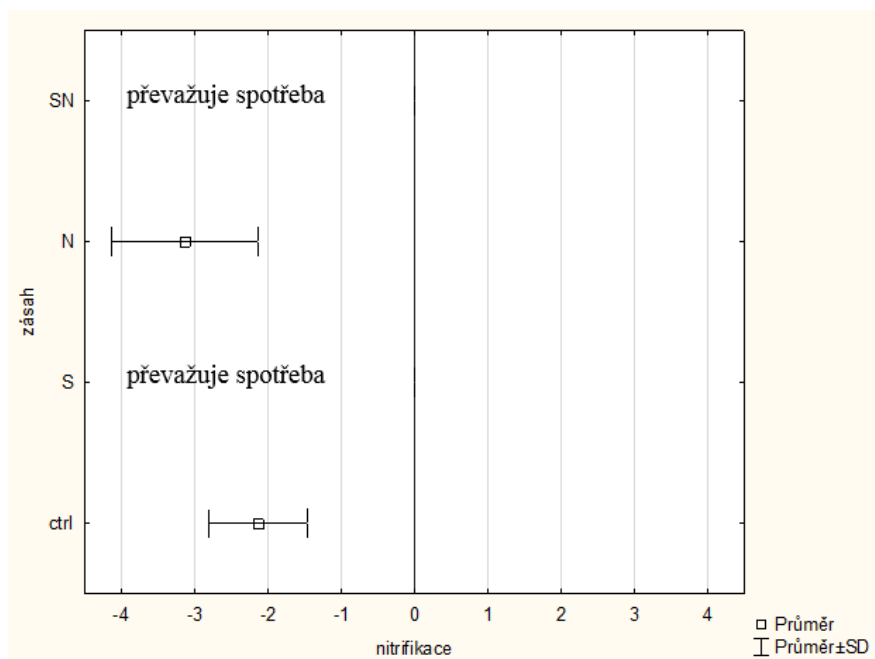
Obr. 19: Rychlost čistě nitrifikace v půdách smrkového lesa pro jednotlivé experimentální zásahy v letech 2013 (pre-treatment) až 2019 (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).

F = 0,456; p = 0,718



Obr. 20: RR pro rychlost nitrifikace N v půdách bukového porostu pro jednotlivé zásahy (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).



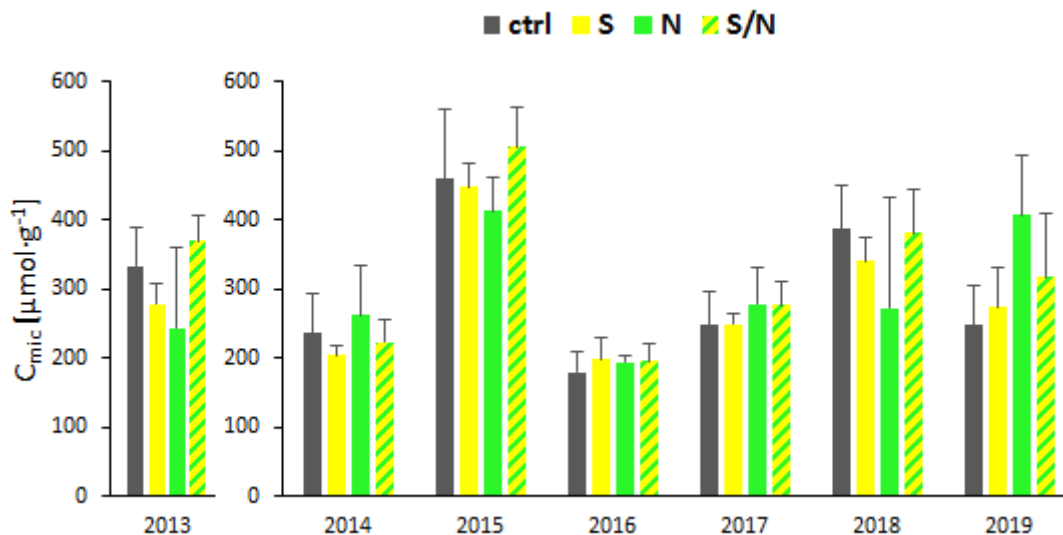


Obr. 21: RR pro rychlost nitrifikace N v půdách smrkového porostu pro jednotlivé zásahy (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola). „Převažuje spotřeba“ znamená, že byla změřena záporná net nitrifikace a RR nebyl spočítán.

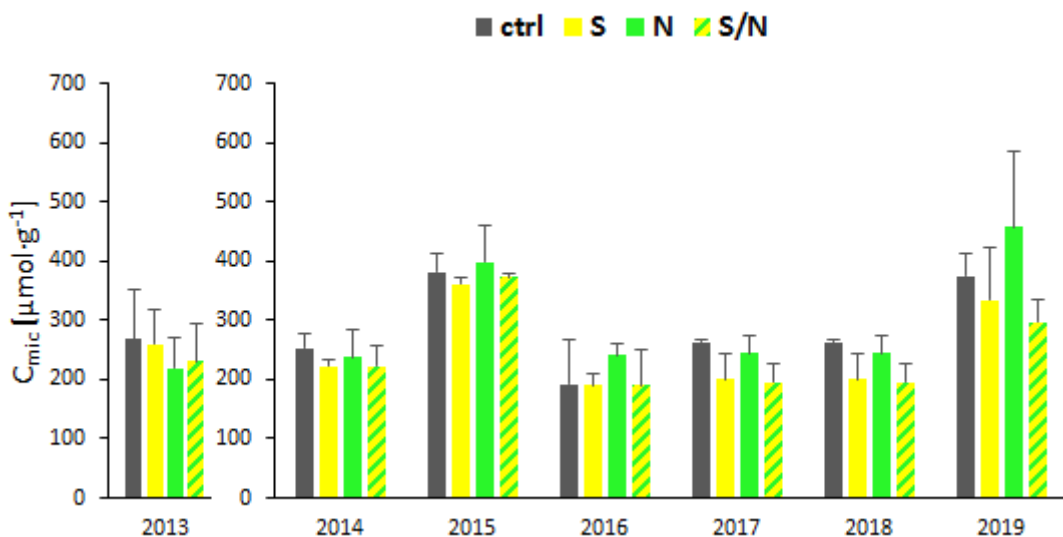
#### 4. 5. Mikrobiální biomasa

Mikrobiální biomasa byla v obou případech, Cmic (F = 8,5; p < 0,01) i Nmic (F = 27; p < 0,001), v průměru vyšší v půdách bukového lesa než v půdách smrkového lesa (Tab. 1, Obr. 22–23; 26–27). Cmic v bukovém porostu dosahovala hodnot v rozmezí od 180 do 505 μmol g<sup>-1</sup> (Obr. 22), zatímco ve smrkovém porostu byla maximálně 458 μmol g<sup>-1</sup> (Obr. 23). Nmic v bukovém porostu byla v rozmezí od 19 do 45 μmol g<sup>-1</sup> (Obr. 26), zatímco ve smrkovém porostu dosahovala hodnot od 17 do 34 μmol g<sup>-1</sup> (Obr. 27). C:N poměr mikrobiální biomasy byl ale v průměru vyšší v půdách smrkového lesa (11 ± 1,5; Obr. 30), v porovnání s půdami bukového lesa (10 ± 1,2; Obr. 3; F= 33, p < 0,001). V půdách obou lesů vzhledem k vysokému C:N mikrobiální biomasy dominují spíše houby. Nebyl nalezen vliv zásahu na velikost mikrobiální biomasy, což bylo pravděpodobně spojeno s velkou variabilitou Cmic i Nmic v čase (průkazné interakce zásah\*rok, Tab. 1). Analýza RR, zohledňující kumulativní efekt zásahů, prokázala vliv N v půdách bukového porostu, kde N zásah zvýšil Cmic i Nmic zatímco v ostatních zásazích došlo ke snížení biomasy (Obr. 23–24; 28–29). Ve smrkovém porostu k signifikantním změnám nedošlo (p<0.08), ale je patrné, že zásah N se začíná od ostatních zásahů lišit a

pravděpodobně by mohl vést také spíše ke zvýšení mikrobiální biomasy (Obr. 25 a 29). Zásahy neměly vliv na C:N poměr mikrobiální biomasy ani v jednom z porostů (Tab. 1; Obr. 32 a 33).

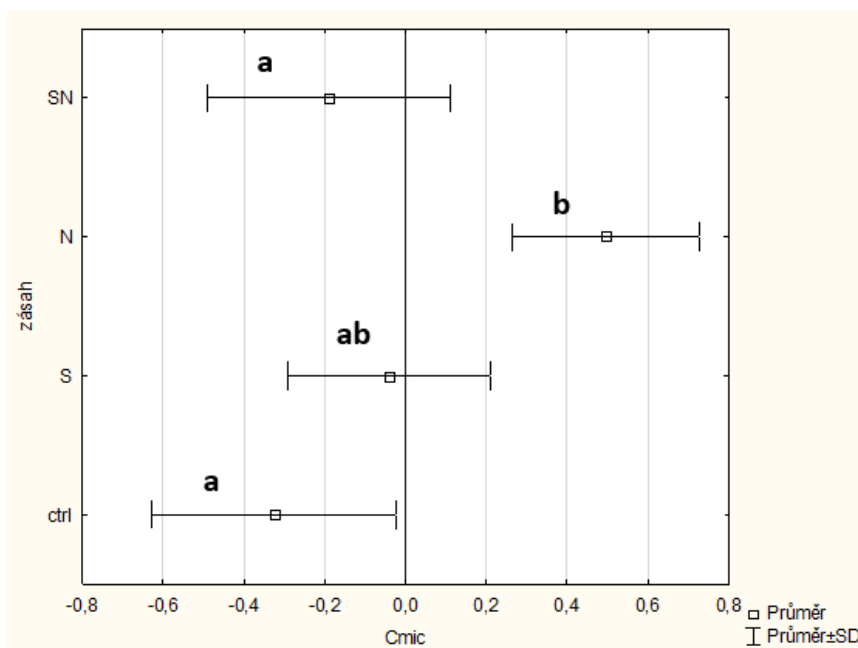


Obr. 22: Mikrobiální C ( $C_{mic}$ ) v půdách bukového lesa pro jednotlivé experimentální zásahy v letech 2013 (pre-treatment) až 2019 (S –  $H_2SO_4$ , N –  $NH_4NO_3$ , SN – kombinace  $H_2SO_4$  a  $NH_4NO_3$ , ctrl – kontrola).

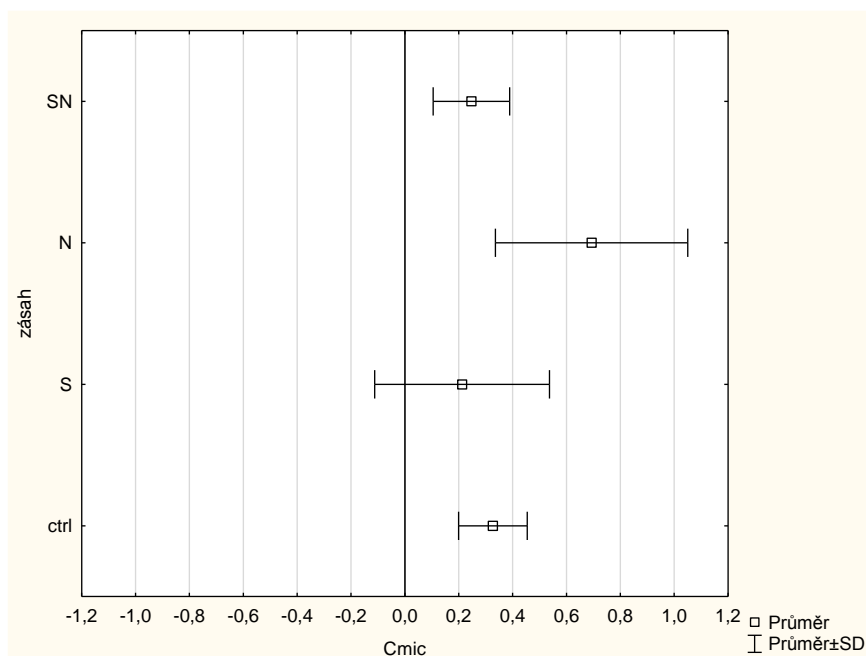


Obr. 23: Mikrobiální C ( $C_{mic}$ ) v půdách smrkového lesa pro jednotlivé experimentální zásahy v letech 2013 (pre-treatment) až 2019 (S –  $H_2SO_4$ , N –  $NH_4NO_3$ , SN – kombinace  $H_2SO_4$  a  $NH_4NO_3$ , ctrl – kontrola).

F = 6,908; p = 0,006

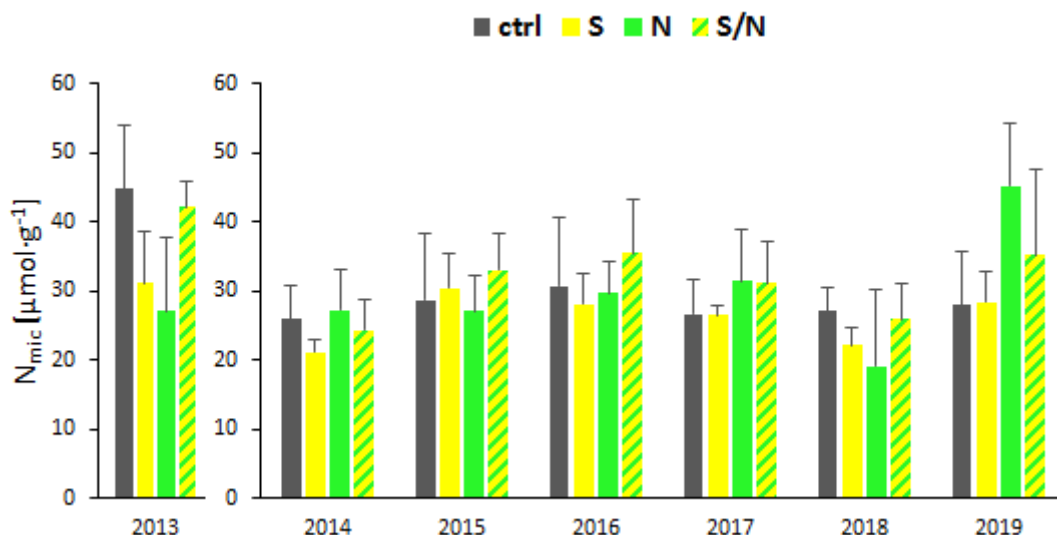


Obr. 24: RR pro mikrobiální C (Cmic) v půdách bukového porostu pro jednotlivé zásahy (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola). Písmenka ukazují porovnání průměrů (ANOVA, Tukey test) pro jednotlivé zásahy (p < 0,05).

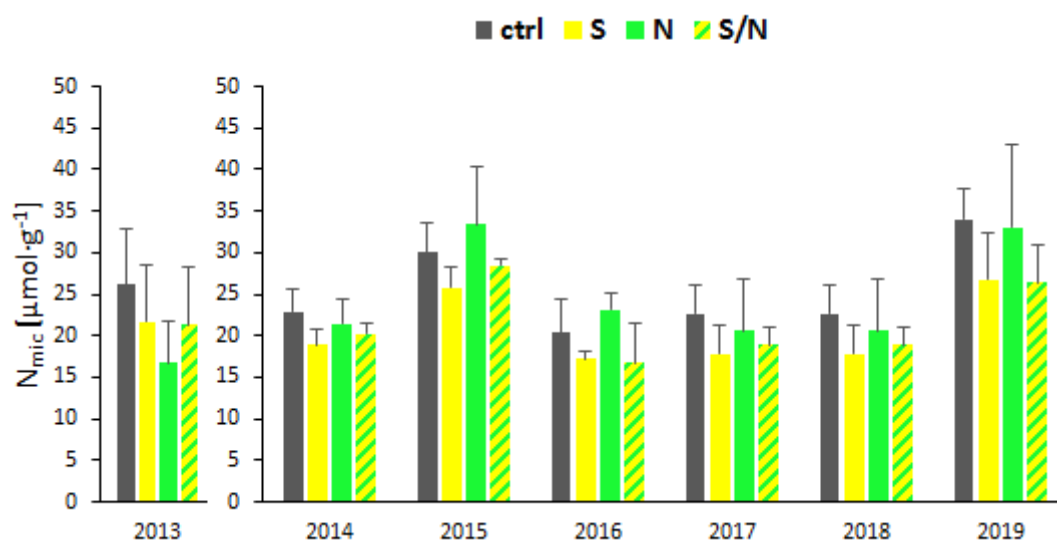


F = 2,9; p = 0,079

Obr. 25: RR pro mikrobiální C (Cmic) v půdách smrkového porostu pro jednotlivé zásahy (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).

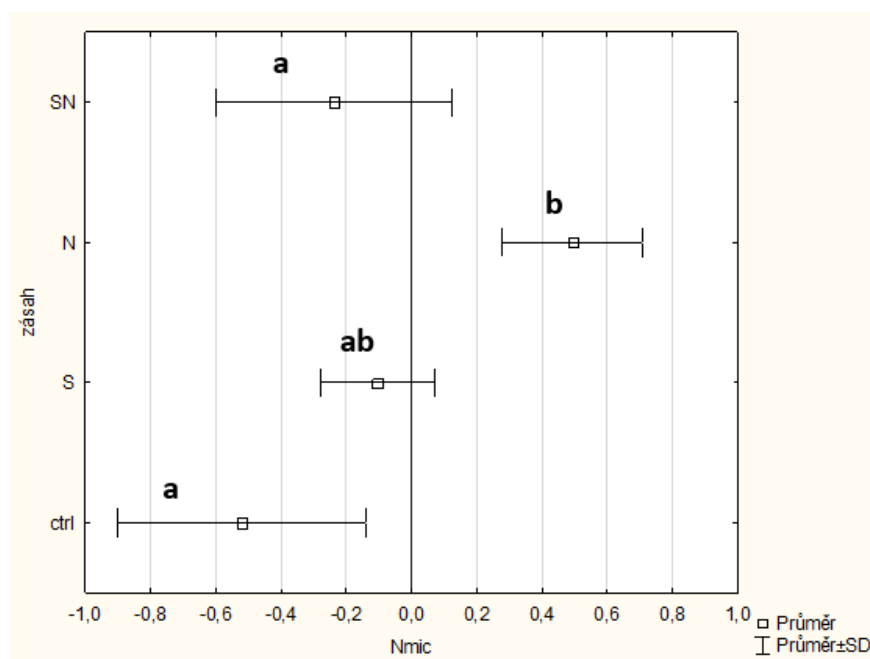


Obr. 26: Mikrobiální N (N<sub>mic</sub>) v půdách bukového lesa pro jednotlivé experimentální zásahy v letech 2013 (pre-treatment) až 2019 (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).



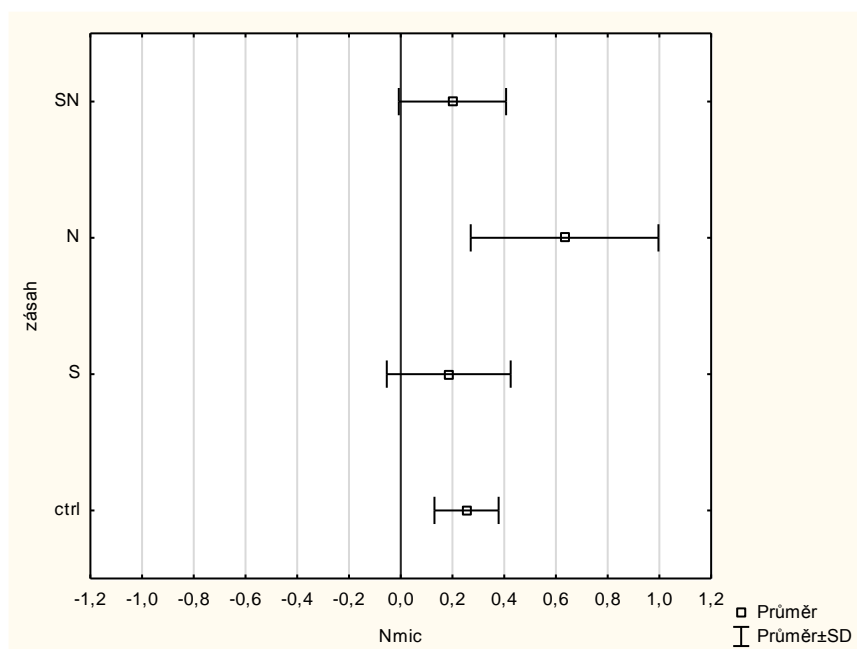
Obr. 27: Mikrobiální N (N<sub>mic</sub>) v půdách smrkového lesa pro jednotlivé experimentální zásahy v letech 2013 (pre-treatment) až 2019 (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).

F = 8,256; p = 0,003

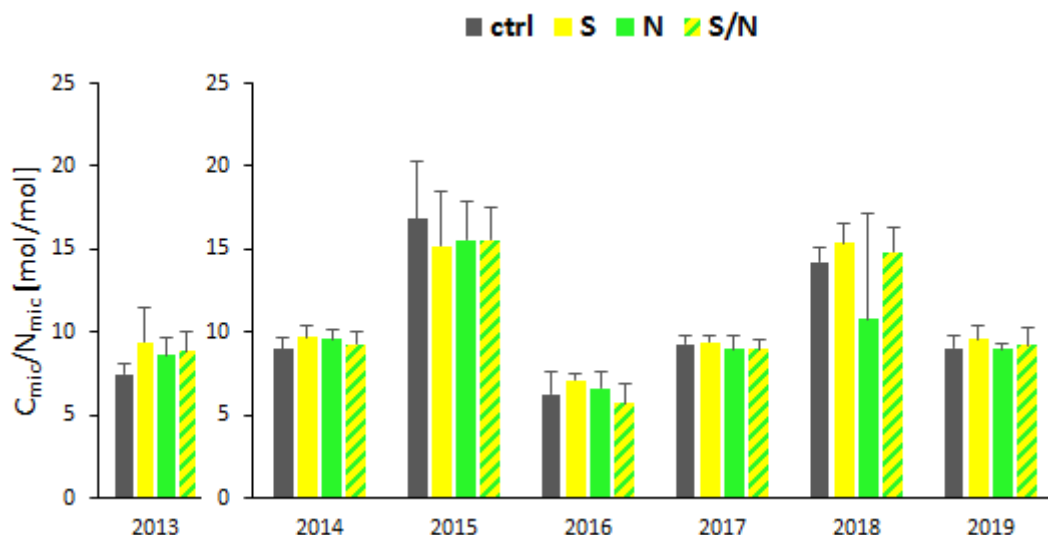


Obr. 28: RR pro mikrobiální N (Nmic) v půdách bukového porostu pro jednotlivé zásahy (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola). Písmenka ukazují porovnání průměrů (ANOVA, Tukey test) pro jednotlivé zásahy (p < 0,05).

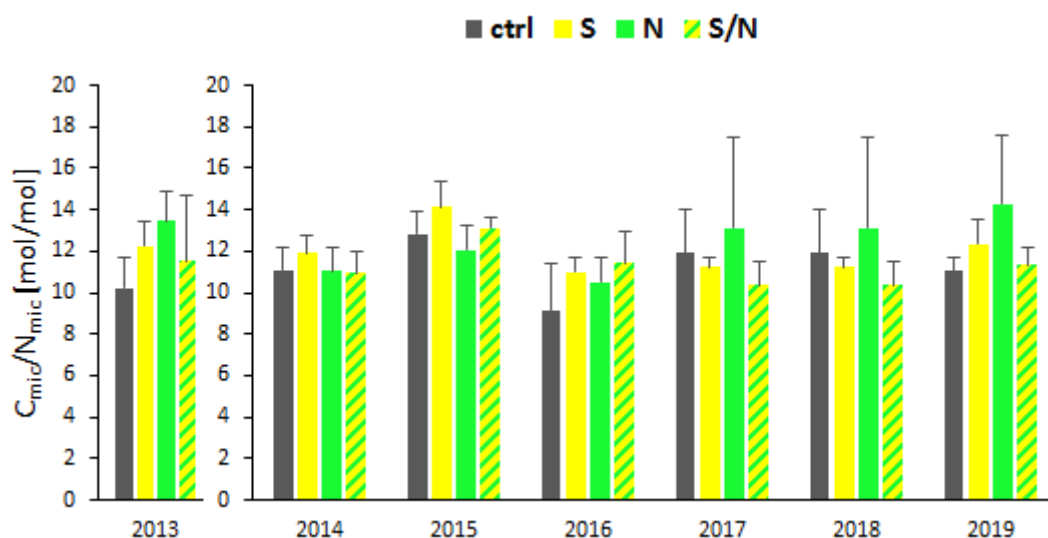
F = 2,914; p = 0,078



Obr. 29: RR pro mikrobiální N (Nmic) v půdách smrkového porostu pro jednotlivé zásahy (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).

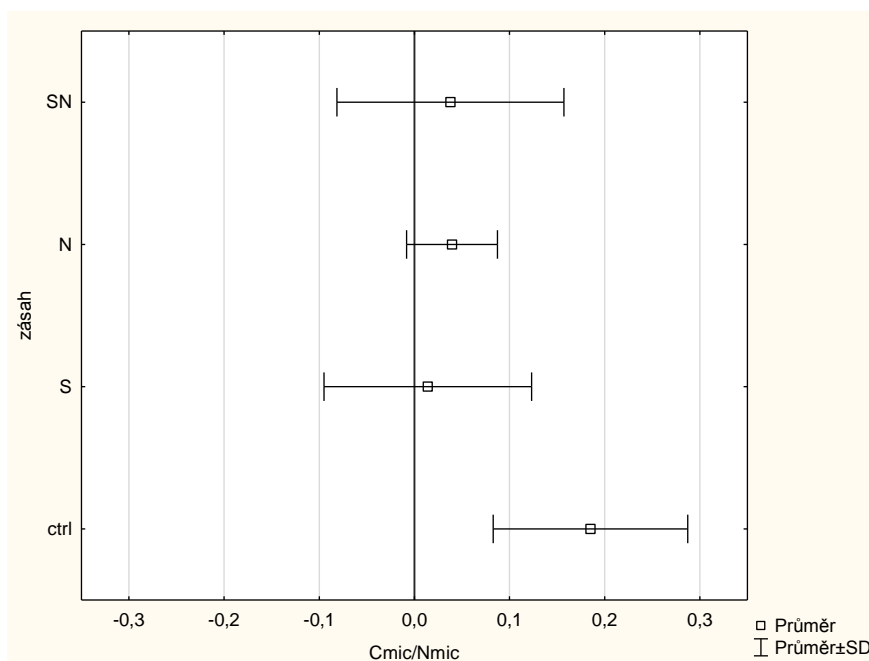


Obr. 30: Poměr C:N mikrobiální biomasy ( $C_{mic}/N_{mic}$ ) v půdách bukového lesa pro jednotlivé experimentální zásahy v letech 2013 (pre-treatment) až 2019 (S –  $H_2SO_4$ , N –  $NH_4NO_3$ , SN – kombinace  $H_2SO_4$  a  $NH_4NO_3$ , ctrl – kontrola).



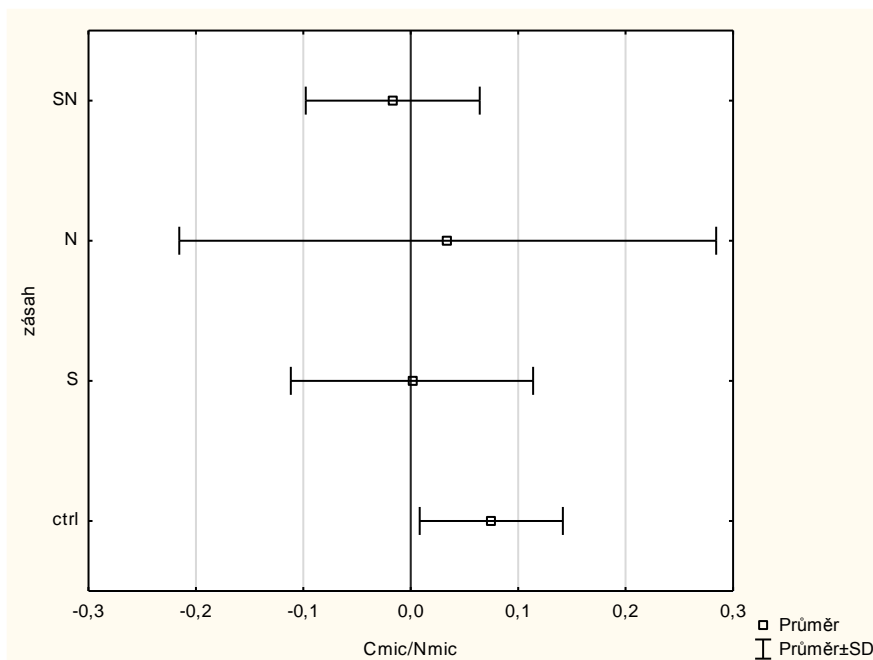
Obr. 31: Poměr C:N mikrobiální biomasy ( $C_{mic}/N_{mic}$ ) v půdách smrkového lesa pro jednotlivé experimentální zásahy v letech 2013 (pre-treatment) až 2019 (S –  $H_2SO_4$ , N –  $NH_4NO_3$ , SN – kombinace  $H_2SO_4$  a  $NH_4NO_3$ , ctrl – kontrola).

F = 2,514; p = 0,108



Obr. 32: RR pro mikrobiální C:N poměr (Cmic/Nmic) v bukového porostu pro jednotlivé zásahy (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).

F = 0,302; p = 0,823



Obr. 33: RR pro mikrobiální C:N poměr (Cmic/Nmic) ve smrkovém porostu pro jednotlivé zásahy (S – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N – NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, SN – kombinace H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, ctrl – kontrola).

## 5. Diskuze

### 5. 1. Výchozí charakteristika půd obou porostů

Půdy obou lesních porostů se od sebe již před zahájením manipulativního experimentu lišily v pH, přičemž půdy smrkového lesa byly kyselější než půdy v bukovém lese (4,3 vs. 3,8; Oulehle a kol., 2016). Již v prvním roce experimentu (2014) došlo ke snížení půdního pH v obou kyselých zásazích (S a SN) přibližně o 0,5 jednotky v obou porostech a ke snížení DOC o 30–50% (Oulehle a kol., 2016). Ve variantě N k těmto změnám nedošlo (Oulehle a kol., 2018). Dalšími rozdíly půd, které byly významné již před zahájením experimentu, ale i po celou dobu trvání experimentu, byly mnohem vyšší rychlosti čisté nitrifikace, dostupnost  $\text{NO}_3^-$  a celkově vyšší mikrobiální biomasa C i N v půdách bukového porostu oproti smrkovému. Nicméně, výchozí poměr C:N mikrobiální biomasy byl vyšší v půdách smrkového porostu (Obr. 30 a 31, roky 2013). Rozdíl v poměrech poukazuje na možné vyšší nároky na dostupnost C relativně k N mikrobů půd smrkového porostu a naopak vyšší nároky na dostupnost N relativně k C mikrobiálních společenstev organických horizontů půd bukového lesa (Bárta a kol., 2017; Oulehle a kol., 2018). Bárta a kol. (2017) zjistili nižší poměr C:N enzymatické aktivity v bukovém porostu, což ukazuje, že zde převažovala produkce enzymů zaměřených spíše na získávání N z půdní organické hmoty, než investování do enzymů získávajících C. To může souviset právě i s nižším C:N poměrem mikrobiální biomasy v bukovém porostu.

Velmi nízká dostupnost  $\text{NO}_3^-$  a nízká rychlost čisté nitrifikace v půdách smrkového porostu může znamenat buď nízkou rychlost hrubé nitrifikace nebo vysokou spotřebu vznikajících  $\text{NO}_3^-$  (imobilizace; Bengtsson, Bengtson a Månsson, 2003). Omezení prvního kroku nitrifikace jako přímé oxidace  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  na  $\text{NO}_2^-$  je možné při kyselém půdním pH, pokud by v půdách smrkového porostu dominovaly amoniak oxidující bakterie (AOB) nad amoniak oxidujícími Archei (AOA; Prosser a Nicol, 2012). Mikrobiální biomasa (C i N) zde byla relativně k bukovému porostu nižší a navíc s vyšším poměrem C:N. Proto je spíše nepravděpodobné, že by zde docházelo k vyšší imobilizaci N než v půdách bukového lesa. Bárta a kol. (2017), kteří porovnávali celkovou abundanci Archei v obou lesích, poukázali na jejich vyšší abundanci v bukovém porostu, a to  $2,0 \times 10^3$  SSU kopií genů /ng DNA, než ve smrkovém porostu –  $0,9 \times 10^3$  SSU kopií genů /ng DNA. Archea (zahrnující AOA) dokáží provádět oxidaci amoniaku i v kyselých půdách, na rozdíl od AOB. Amoniak se v kyselých půdách protonuje na  $\text{NH}_4^+$  (Zhang a kol., 2012). AOA však disponují speciálními přenašeči na membráně, kterými získávají  $\text{NH}_4^+$ , zatímco AOB tyto přenašeče nemají (Offre a kol., 2014).



Vyšší abundance Archeí v bukovém porostu by proto mohla být jedním z důvodů v průměru vyšších rychlostí nitrifikace, ačkoli je zde pH půdního prostředí také poměrně kyselé. Rychlost čisté mineralizace N byla v obou porostech stejná, dostupnost  $\text{NH}_4^+$  byla v průměru dokonce vyšší v půdách smrkového porostu (Tab. 1). Z toho vyplývá, že limitace nitrifikace substrátem je v půdách smrkového lesa spíše nepravděpodobná.

Celkově nízká mikrobiální biomasa (Cmic a Nmic) ve smrkovém porostu než v bukovém porostu (v průměru o 20 % v Cmic a o 41 % v Nmic) ukazuje na její možné omezení vlivem nízkého pH půdního prostředí. Půdní pH je jedním z nejdůležitějších abiotických faktorů ovlivňující mikrobiální biomasu. Působí na řadu dalších důležitých půdních vlastností, mezi něž patří dostupnost C a ostatních živin, rozpustnost kovů (včetně toxického  $\text{Al}^{3+}$ ; Piña a Cervantes, 1996) a také na složení mikrobiálního společenstva (Rousk, Brookes a Bååth, 2009). Fierer a Jackson (2006) uvádějí, že druhová bohatost mikroorganismů (diverzita) napříč terestrickými ekosystémy je přímo ovlivněna půdním pH. Konkrétně zjistili, že kyselé půdy jsou obecně charakteristické nízkou diverzitou bakterií.

Bárta a kol. (2017) pozorovali, že diverzita mikrobiálního společenstva a množství vzájemných interakcí mezi mikroorganismy byla větší v půdách bukového než v půdách smrkového porostu. Nejvíce variability ve složení mikrobiálních společenstev vysvětlilo pH půdního roztoku (43 %). Dalšími faktory, které měly vliv na rozdíly ve složení mikrobiálních společenstev, byly poměr  $\text{DOC}:\text{NO}_3^-$  a koncentrace bazických kationtů. Prescott a Grayston (2013) také poukázaly na význam druhového složení stromového patra, zejména z hlediska rozdílů mezi jehličnatými a listnatými typy lesů, při utváření specifického půdního prostředí. Půdy jehličnatých a listnatých lesů se vzájemně lišily svými mikrobiálními společenstvy, zejména v F horizontu, v souvislosti s hodnotami půdního pH a množstvím bazických kationtů. Výše zmíněné rozdíly mezi půdami dané charakterem porostu tak mohly zapříčinit i rozdíly v reakci dostupnosti N, a s ní souvisejících procesů přeměn N, na provedený experimentální zásah

## **5. 2. Změny dostupnosti N půd vlivem experimentálních zásahů**

V souladu s předpoklady měly kyselé a N zátěž rozdílný vliv na dostupnost  $\text{NO}_3^-$  (respektive dostupnost minerálního N) v půdách obou porostů, a navíc charakter reakce půd závisel na typu porostu. Ve shodě s hypotézou (H3) převládal ve smrkovém porostu vliv okyselení půd, zatímco v půdách bukového lesa byl více patrný vliv N jako živiny. Výsledky poukazují na

význam druhového složení vegetace lesních porostů a jejich specifického půdního prostředí (Prescott a Grayston, 2013) a na důležitou roli půdní mikrobiální biomasy a složení mikrobiálního společenstva při utváření reakce půd na zvýšený vstup kyselé depozice.

### 5. 2. 1. Vliv N jako živiny

Zvýšený vstup N v podobě pravidelných měsíčních dávek dusičnanu amonného do půdy po dobu šesti let (kumulativně  $300 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) zvýšil půdní mikrobiální biomasu  $C_{mic}$  o 68 % a  $N_{mic}$  o 40 % v bukovém lese, aniž by došlo ke změně jejího C:N poměru. Ve smrkovém lese byl nárůst mikrobiální biomasy blízko hranice průkaznosti ( $p < 0,08$ ). Významnější a rychlejší reakce mikrobiální biomasy v bukovém porostu patrně souvisí s jejím nižším C:N poměrem (Obr. 30), a tedy větší závislostí na dostupnosti N. Mikrobiální biomasa v bukovém porostu mohla být více limitována N než mikrobiální biomasa ve smrkovém porostu. Oulehle a kol. (2018) zjistili, že vlivem přídatku N se změnilo zaměření produkce enzymů spíše na získávání C a P, což poukazuje na posun limitace mikrobiální biomasy od N k limitaci C a P. Poměr aktivity enzymů C:N byl však stále vyšší ve smrkovém porostu ( $C:N_{enz} = 4,3$ ) oproti bukovému ( $C:N_{enz} = 1,9$ ), z čehož plyne, že ve smrkovém porostu bylo potřeba získávat stále více C relativně k N než v bukovém porostu, aby mikroorganismy mohly růst a imobilizovat N.

Nárůst mikrobiální biomasy se však neprojevil snížením dostupnosti N vlivem možné větší imobilizace minerálního N mikroorganismy. Dostupnost  $NO_3^-$  se nezměnila a dostupnost  $NH_4^+$  se dokonce v půdách bukového lesa zvýšila. Tato změna však nebyla způsobena zvýšením rychlosti mineralizace N, protože ta zůstala v obou porostech po celou dobu experimentu shodná s kontrolou. Pravděpodobně došlo pouze ke zvýšení  $NH_4^+$  navázaného na půdním sorpčním komplexu, jelikož svrchní organické vrstvy jsou hlavní zásobárnou kationtů (Prescott, Maynard a Laiho, 2000). V půdách smrkového lesa k takovému navýšení dostupnosti  $NH_4^+$  nedošlo. Kationtová výměnná kapacita (CEC) je větší v bukovém porostu ( $49,6 \text{ mequiv. kg}^{-1}$ ) než ve smrkovém ( $37,9 \text{ mequiv. kg}^{-1}$ ; Oulehle, Hofmeister a Hruška, 2007), což mohlo být jedním z důvodů zjištěného rozdílu. Vzhledem ke stejnému množství přidaného N do půd v obou porostech se naskytá otázka, kam se N z půd smrkového lesa „ztrácí“, když se jeho dostupnost přídatkem N nijak významně nezvýšila.  $N_{mic}$  zde sice v průměru narostla (93 %; 2019 oproti roku 2013), ale změna nebyla statisticky průkazná vůči kontrole.

Čistá nitrifikace se s přídatkem N nijak nezměnila, což však nevypovídá o ostatních procesech, které čistá nitrifikace v sobě zahrnuje. Čistá nitrifikace stanovená v laboratorních

podmínkách je výsledkem několika procesů: imobilizace N mikroorganismy, abiotická imobilizace a redukční procesy  $\text{NO}_3^-$  v anaerobních mikroprostředích půdních agregátů. Bárta a kol. (2017) zjistili, že mikroorganismy zodpovědné za denitrifikaci, se v půdách smrkového porostu hojně vyskytují a dominují v něm nad „DNRA mikroorganismy“ redukujícími  $\text{NO}_3^-$  zpět na  $\text{NH}_4^+$ , které byly dominantní spíše v půdách bukového lesa. Tudíž mohou být  $\text{NO}_3^-$  ve větší míře z půd smrkového lesa ztraceny denitrifikací, zatímco v půdách bukového lesa by se mohly  $\text{NO}_3^-$  redukovat zpět na  $\text{NH}_4^+$  a dále se akumulovat v půdě. Oulehle a kol. (2018) uvádějí, že pouze asi 6 % přidaného N bylo vyplaveno ve formě  $\text{NO}_3^-$  z půd do vod ve smrkovém porostu. Dusík mohl také být ve větší míře imobilizován rostlinami přímo v terénu, a proto by již nemohl být z odebraných půdních vzorků extrahován. To, zda by imobilizace rostlinami byla vyšší v půdách smrkového lesa než v půdách bukového lesa, však v laboratorním pokusu nebylo možno ověřit. Bylo však zjištěno, že obsah N v biomase smrku je srovnatelný v obou porostech (1447 kg ha<sup>-1</sup> a 1454 kg ha<sup>-1</sup> pro buk a smrk, v tomto pořadí; Oulehle a kol., 2016), takže je možné předpokládat i podobnou míru imobilizace N z půdy oběma dřevinami.

Nitrifikace se přidavkem  $\text{NH}_4^+$  nezměnila ani v jednom z porostů. Ani mineralizace N, která byla podobná v obou lesních porostech, se přidavkem N nezměnila. Akumulace  $\text{NH}_4^+$  na půdním sorpčním komplexu v bukovém porostu naznačuje, že tato část N pravděpodobně nebyla nitrifikována (pokud neprošla procesem DNRA). Z toho vyplývá, že populace nitrifikátorů mohla být pravděpodobně nějakým způsobem i v bukovém porostu částečně limitována. Nitrifikátoři, jako autotrofové, jsou spíše pomalu rostoucí mikroorganismy, které v půdě tvoří jen menší biomasu (Šantrůčková a kol., 2018). Je proto možné, že mohli být ovlivněni velikostí v prostředí převažující, a po přidavku N, narůstající biomasy heterotrofů a jejich imobilizací  $\text{NH}_4^+$  (Strauss a Lamberti, 2000). Schimel a Bennett (2004) popsali, že proces nitrifikace, a tedy i zvýšení dostupnosti  $\text{NO}_3^-$  převáží až tehdy, když je  $\text{NH}_4^+$  v půdě v přebytku (po imobilizaci rostlinami a heterotrofy), což se zde, vzhledem k průkaznému nárůstu Nmic pravděpodobně nestalo.

### **5. 2. 2. Vliv zvýšené kyselé zátěže**

Během šesti let kontinuálních přidavků roztoku kyseliny sírové do půdy, a i přes významné snížení půdního pH, nebyl pozorován negativní vliv S a SN zásahů na mikrobiální biomasu. Tudíž nelze zatím usuzovat snížení imobilizace N do mikrobiální biomasy vlivem okyselení půdního prostředí. Na základě jiných studií (Anderson, 1998) lze však předpokládat, že, pokud bude experiment zachován, dojde pravděpodobně postupně k omezení obojího.

V souladu s H2 došlo ke snížení nitrifikace ve smrkovém porostu vlivem kyselého zásahu (S, SN) dokonce do záporných hodnot a zároveň se v kombinovaném SN zásahu snížila i dostupnost  $\text{NO}_3^-$ . Kombinovaný zásah SN (pH = 3,2) znamenal podle Oulehle a kol. (2018) největší snížení pH (S zásah pH = 3,3). Mikrobiální biomasa se celkově významně nezměnila, proto nedošlo pravděpodobně k nižší imobilizaci  $\text{NO}_3^-$ . Vše tedy spíše ukazuje na omezení hrubé nitrifikace vlivem vysoké kyselosti půdy. Jak bylo uvedeno v kapitole 5. 1., předpokládáme, že v půdách smrkového porostu převládají AOB nad AOA, a tudíž zde mohlo dojít k většímu omezení nitrifikace indukovanou kyselostí. Pokud nedojde k prvnímu kroku nitrifikace, může dojít k pozastavení celého procesu a spotřeba  $\text{NO}_3^-$  imobilizací, i když se zásahem nijak nezvýší, může převážit nad jejich produkcí. V bukovém porostu k omezení nitrifikace nedocházelo. Jsou dvě pravděpodobná vysvětlení. Buď kyselý zásah nesrazil pH tak nízko, aby došlo k omezení zde se vyskytujících populací amoniak oxidujících organismů anebo zde opravdu převažují populace AOA nad AOB, které jsou schopny oxidovat amoniak i při nízké kyselosti. Došlo tak k ověření platnosti hypotézy, že oba kyselý zásahy (S a SN) nebudou mít stejný vliv na dostupnost  $\text{NO}_3^-$  (minerálního N) v obou lesních porostech vzhledem k jejich rozdílné výchozí půdní kyselosti. Ve smrkovém porostu s vyšší kyselostí půd byla reakce opravdu výraznější oproti půdám bukového lesa s vyšším výchozím pH. Kyselý zásah ovlivnil především smrkový porost, a ještě více snížil pH, které bylo už tak nízké, a tím omezil rychlost nitrifikace.

## 6. Závěr

Cílem této práce bylo porovnat dostupnost  $\text{NO}_3^-$  v půdách dvou, pro Českou republiku typických, lesních porostů (smrkového a bukového) během dlouhodobého terénního experimentu se zvýšenou kyselou (S; přídavek  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a živinovou (N; přídavek  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) zátěží. Zásah N podpořil mikrobiální biomasu, avšak její nárůst se neprojevil snížením dostupnosti N. Naopak v bukovém porostu došlo ke zvýšení  $\text{NH}_4^+$ , což mohlo být způsobeno větším množstvím navázaného  $\text{NH}_4^+$  na půdním sorpčním komplexu. Přídavek  $\text{NH}_4^+$ , jako substrátu pro nitrifikaci, nevedl k zvýšení dostupného  $\text{NO}_3^-$  a ukazuje spíše na jiný limitující faktor nitrifikace. Zásah S nezpůsobil snížení  $\text{N}_{\text{mic}}$ , což nevedlo ani ke zvýšení dostupnosti  $\text{NO}_3^-$  případnou sníženou imobilizací N do mikrobiální biomasy. Naopak kombinovaným zásahem SN došlo ke snížení dostupnosti  $\text{NO}_3^-$  ve smrkovém porostu. Dále došlo vlivem obou kyselých zásahů (S a SN) ke snížení rychlosti čisté nitrifikace ve smrkovém porostu až do záporných hodnot (spotřeba  $\text{NO}_3^-$  převážila nad jeho produkcí nitrifikací) a zároveň se snížila i dostupnost  $\text{NO}_3^-$  v kombinovaném zásahu SN. Tento výsledek lze vysvětlit omezením prvního kroku nitrifikace indukovanou půdní kyselostí. Je pravděpodobné, že limitace autotrofních mikroorganismů zprostředkovávajících oxidaci amoniaku na nitrit může souviset i s rozdílným složením půdního mikrobiálního společenstva v obou porostech a zasloužila by si bližší zkoumání v příštích letech experimentu. Kyselé zásahy (S a SN) výrazněji ovlivnily půdy ve smrkovém porostu, což souvisí s nízkým výchozím pH půdy. Druhové složení stromového patra lesů, které utváří specifické půdní prostředí, tak může hrát významnou roli při reakci lesních ekosystémů na vstup kyselé depozice.

## 7. Literatura

**Aber, J. D. a kol., 1998.** Nitrogen Saturation in Temperate Forest Ecosystems - Hypothesis revisited. *BioScience* 48, 921–934.

**Adams, M. A., Polglase, P. J., Attwill, P. M., Weston, C. J., 1989.** In situ studies of nitrogen mineralization and uptake in forest soils; some comments on methodology. *Soil Biology and Biochemistry* 21, 423–429.

**Ågren, G. I., Bosatta, E., 1988.** Nitrogen saturation of terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution* 54, 185–197.

**Anderson, T. H., 1998.** The influence of acid irrigation and liming on the soil microbial biomass in a norway spruce (*Picea abies* [L.] K.) stand. *Plant and Soil* 199, 117–122.

**Angelstam, P., Kuuluvainen, T., 2004.** Boreal forest disturbance regimes, successional dynamics and landscape structures: A European perspective. *Ecological Bulletins*, 117–136.

**El Azhar, S., Verhe, R., Proot, M., Sandra, P., Verstraete, W., 1986.** Binding of nitrite-N on polyphenols during nitrification. *Plant and Soil* 94, 369–382.

**Barnard, R., Leadley, P. W., Hungate, B. A., 2005.** Global change, nitrification, and denitrification: A review. *Global Biogeochemical Cycles* 19.

**Bárta, J., Tahovská, K., Šantrůčková, H., Oulehle, F., 2017.** Microbial communities with distinct denitrification potential in spruce and beech soils differing in nitrate leaching. *Scientific Reports* 7, 1-15.

**Bengtson, P., Bengtsson, G., 2005.** Bacterial immobilization and remineralization of N at different growth rates and N concentrations. *FEMS Microbiology Ecology* 54, 13–19.

**Bengtsson, G., Bengtson, P., Månsson, K. F., 2003.** Gross nitrogen mineralization-, immobilization-, and nitrification rates as a function of soil C/N ratio and microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 143–154.

**Blaser, P., Zysset, M., Zimmermann, S., Luster, J., 1999.** Soil acidification in Southern Switzerland between 1987 and 1997: A case study based on the critical load concept. *Environmental Science and Technology* 33, 2383–2389.

- De Boer, W., Kowalchuk, G. A., 2001.** Nitrification in acid soils: Micro-organisms and mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 853–866.
- Chu, H., Grogan, P., 2010.** Soil microbial biomass, nutrient availability and nitrogen mineralization potential among vegetation-types in a low arctic tundra landscape, *Plant and Soil* 329, 411–420.
- Curtis, C. J., Evans, C. D., Goodale, C. L., Heaton, T. H., 2011.** What have stable isotope studies revealed about the nature and mechanisms of N saturation and nitrate leaching from semi-natural catchments? *Ecosystems* 14, 1021–1037.
- Cusack, D. F., Silver, W., McDowell, W. H., 2009.** Biological nitrogen fixation in two tropical forests: ecosystem-level patterns and effects of nitrogen fertilization. *Ecosystems* 12, 1299–1315.
- Dannenmann, M., Simon, J., Gasche, R., Holst, J., Naumann, P. S., Kögel-Knabner, I., Knicker, H., Mayer, H., Schloter, M., Pena, R., Polle, A., Rennenberg, H., Papen, H., 2009.** Tree girdling provides insight on the role of labile carbon in nitrogen partitioning between soil microorganisms and adult European beech. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 1622–1631.
- Davidson, E. A., Chorover, J., Dail, D. B., 2003.** A mechanism of abiotic immobilization of nitrate in forest ecosystems: The ferrous wheel hypothesis. *Global Change Biology* 9, 228–236.
- Davidson, E. A., Hart, S. C., Firestone, M. K., 1992.** Internal cycling of nitrate in soils of a mature coniferous forest. *Ecology* 73, 1148–1156.
- Elliott-Fisk, D. L., Persson, T., 1988.** Structure and Function of Northern Coniferous Forests- An Ecosystem Study. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 115, 60.
- Evans, C. D., Goodale, C. L., Caporn, S. J., Dise, N. B., Emmett, B. A., Fernandez, I. J., Field, C. D., Findlay, S. E. G., Lovett, G. M., Meesenburg, H., Moldan, F., Sheppard, L. J., 2008.** Does elevated nitrogen deposition or ecosystem recovery from acidification drive increased dissolved organic carbon loss from upland soil? A review of evidence from field nitrogen addition experiments. *Biogeochemistry* 91, 13–35.
- Fierer, N., Jackson, R. B., 2006.** The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 626–631.

- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M. A., Cape, J. N., Reis, S. a kol., 2013.** The global nitrogen cycle in the Twentyfirst century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368.
- Frijlink, M. J., Abee, T., Laanbroek, H. J., de Boer, W., Konings, W. N., 1992.** The bioenergetics of ammonia and hydroxylamine oxidation in *Nitrosomonas europaea* at acid and alkaline pH. *Archives of Microbiology* 157, 194–199.
- Galloway, J. N., Levy, H. I. I., Kasibhatla, P. S., 1994.** Year 2020: Consequences of population growth and development on deposition of oxidized nitrogen. *Ambio* 23, 120–123.
- Gao, W., Yang, H., Kou, L., Li, S., 2015.** Effects of nitrogen deposition and fertilization on N transformations in forest soils: A review. *Journal of Soils and Sediments* 15, 863–879.
- 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.
- Gundersen, P., 1991.** Nitrogen deposition and the forest nitrogen cycle: Role of denitrification. *Forest Ecology and Management* 44, 15–28.
- Hart, S. C., Nason, G. E., Myrold, D. D., Perry, D. A., 1994.** Dynamics of gross nitrogen transformations in an old-growth forest: The carbon connection. *Ecology* 75, 880–891.
- Haynes, R. J., Goh, K. M., 1978.** Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biological Reviews* 53, 465–510.
- Head, I. M., Hiorns, W. D., Embley, T. M., McCarthy, A. J., Saunders, J. R., 1993.** The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Microbiology* 139, 1147–1153.
- Hedges, L. V., Gurevitch, J., Curtis, P. S., 1999.** The meta-analysis of response ratios in experimental ecology. *Ecology* 80, 1150–1156.
- Högberg, M. N., Högberg, P., Myrold, D. D., 2007.** Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three? *Oecologia* 150, 590–601.



- Högberg, P., Fan, H., Quist, M., Binkley, D. A. N., Tamm, C. O., 2006.** Tree growth and soil acidification in response to 30 years of experimental nitrogen loading on boreal forest. *Global Change Biology* 12, 489–499.
- Holloway, J. M., Dahlgren, R. A., 2002.** Nitrogen in rock: Occurrences and biogeochemical implications. *Global Biogeochemical Cycles* 16, 65-1.
- Houlton, B. Z., Morford, S. L., Dahlgren, R. A., 2018.** Convergent evidence for widespread rock nitrogen sources in Earth's surface environment. *Science* 360, 58–62.
- Hruška, J., Kopáček, J., 2005.** Kyselý déšť stále s námi-zdroje, mechanismy, účinky, minulost a budoucnost. Ministerstvo životního prostředí, Praha.
- Hu, H. W., He, J. Z., 2017.** Comammox - a newly discovered nitrification process in the terrestrial nitrogen cycle. *Journal of Soils and Sediments* 17, 2709–2717.
- Kallenbach, C. M., Frey, S. D., Grandy, A. S., 2016.** Direct evidence for microbial-derived soil organic matter formation and its ecophysiological controls. *Nature Communications* 7, 13630.
- Kopáček, J., Cosby, B. J., Evans, C. D., Hruška, J., Moldan, F., Oulehle, F., Šantrůčková, H., Tahovská, K., Wright, R. F., 2013.** Nitrogen, organic carbon and sulphur cycling in terrestrial ecosystems: linking nitrogen saturation to carbon limitation of soil microbial processes. *Biogeochemistry* 115, 33–51.
- Kopáček, J., Posch, M., 2011.** Anthropogenic nitrogen emissions during the Holocene and their possible effects on remote ecosystems. *Global Biogeochemical Cycles* 25.
- Kopáček, J., Veselý, J., 2005.** Sulfur and nitrogen emissions in the Czech Republic and Slovakia from 1850 till 2000. *Atmospheric Environment* 39, 2179–2188.
- Kreitinger, J. P., Klein, T. M., Novick, N. J., Alexander, M., 1985.** Nitrification and Characteristics of Nitrifying Microorganisms in an Acid Forest Soil. *Soil Science Society of America Journal* 49, 1407–1410.
- Kronzucker, H. J., Siddiqi, M. Y., Glass, A. D. M., 1997.** Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. *Nature* 385, 59–61.
- Kuenen, J. G., Robertson, L. A., 1994.** Combined nitrification-denitrification processes. *FEMS Microbiology Reviews* 15, 109–117.

- Kuroiwa, M., Koba, K., Isobe, K., Tateno, R., Nakanishi, A., Inagaki, Y. a kol., 2011.** Gross nitrification rates in four Japanese forest soils: heterotrophic versus autotrophic and the regulation factors for the nitrification. *Journal of Forest Research* 16, 363–373.
- LeBauer, D. S., Treseder, K. K., 2008.** Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology* 89, 371–379.
- Li, Y., Chapman, S. J., Nicol, G. W., Yao, H., 2018.** Nitrification and nitrifiers in acidic soils. *Soil Biology and Biochemistry* 116, 290–301.
- Lilleskov, E. A., Kuyper, T. W., Bidartondo, M. I., Hobbie, E. A., 2019.** Atmospheric nitrogen deposition impacts on the structure and function of forest mycorrhizal communities: A review. *Environmental Pollution* 246, 148–162.
- MacDonald, J. A., Dise, N. B., Matzner, E., Armbruster, M., Gundersen, P., Forsius, M., 2002.** Nitrogen input together with ecosystem nitrogen enrichment predict nitrate leaching from European forests. *Global Change Biology* 8, 1028–1033.
- Martínez-Espinosa, R. M., Cole, J. A., Richardson, D. J., Watmough, N. J., 2011.** Enzymology and ecology of the nitrogen cycle. *Biochemical Society Transactions* 39, 175–178.
- Moir, J. W. B., Wood, N. J., 2001.** Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 215–224.
- Morrison, E. W., Pringle, A., van Diepen, L. T., Frey, S. D., 2018.** Simulated nitrogen deposition favors stress-tolerant fungi with low potential for decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 125, 75–85.
- Nadelhoffer, K. J., Aber, J. D., Melillo, J. M., 1984.** Seasonal patterns of ammonium and nitrate uptake in nine temperate forest ecosystems. *Plant and Soil* 80, 321–335.
- Nierop, K. G. J., Jansen, B., Verstraten, J. M., 2002.** Dissolved organic matter, aluminium and iron interactions: Precipitation induced by metal/carbon ratio, pH and competition. *Science of the Total Environment* 300, 201–211.
- Oaks, A., Hirel, B., 1985.** Nitrogen metabolism in roots. *Annual Review of Plant Physiology* 36, 345–365.
- Offre, P., Kerou, M., Spang, A., Schleper, C., 2014.** Variability of the transporter gene complement in ammonia-oxidizing archaea. *Trends in Microbiology* 22, 665–675.

- Oulehle, F., Hofmeister, J., Cudlín, P., Hruška, J., 2006.** The effect of reduced atmospheric deposition on soil and soil solution chemistry at a site subjected to long-term acidification, Načetín, Czech Republic. *Science of the Total Environment* 370, 532–544.
- Oulehle, F., Růžek, M., Tahovská, K., Bárta, J., Myška, O., 2016.** Carbon and nitrogen pools and fluxes in adjacent mature Norway spruce and European beech forests. *Forests* 7, 1–17.
- Oulehle, F., Tahovská, K., Chuman, T., Evans, C. D., Hruška, J., Růžek, M., Bárta, J., 2018.** Comparison of the impacts of acid and nitrogen additions on carbon fluxes in European conifer and broadleaf forests. *Environmental Pollution* 238, 884–893.
- Oulehle, F., Hofmeister, J., Hruška, J., 2007.** Modeling of the long-term effect of tree species (Norway spruce and European beech) on soil acidification in the Ore Mountains. *Ecological Modelling* 204, 359–371.
- Oulehle, F., Hruška, J., 2005.** Tree species (*Picea abies* and *Fagus sylvatica*) effects on soil water acidification and aluminium chemistry at sites subjected to long-term acidification in the Ore Mts., Czech Republic. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99, 1822–1829.
- Philippot, L., 2005.** Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. *Biochemical Society Transactions*, 200–204.
- Piña, R. G., Cervantes, C., 1996.** Microbial interactions with aluminium. *BioMetals* 9, 311–316.
- Pjevac, P., Schauburger, C., Poghosyan, L., Herbold, C. W., Van Kessel, M. A., Daebeler, A., Steinberger, M., Jetten, M. S. M., Lückner, S., Wagner, M., Daims, H., 2017.** AmoA-targeted polymerase chain reaction primers for the specific detection and quantification of comammox *Nitrospira* in the environment. *Frontiers in Microbiology* 8, 1508.
- Prescott, C. E., Grayston, S. J., 2013.** Tree species influence on microbial communities in litter and soil: Current knowledge and research needs. *Forest Ecology and Management* 309, 19–27.
- Prescott, C. E., Maynard, D. G., Laiho, R., 2000.** Humus in northern forests: Friend or foe? *Forest Ecology and Management* 133, 23–36.
- Prinčič, A., Mahne, I., Megušar, F., Paul, E. A., Tiedje, J. M., 1998.** Effects of pH and oxygen and ammonium concentrations on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3584–3590.

**Prosser, J. I., Nicol, G. W., 2012.** Archaeal and bacterial ammonia-oxidisers in soil: The quest for niche specialisation and differentiation. *Trends in Microbiology* 20, 523–531.

**Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., Knight, R., Fierer, N., 2010.** Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME Journal* 4, 1340–1351.

**Rousk, J., Brookes, P. C., Bååth, E., 2009.** Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1589–1596.

**Rütting, T., Boeckx, P., Müller, C., Klemetsson, L., 2011.** Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. *Biogeosciences* 8, 1779–1791.

**Sahrawat, K. L., 2008.** Factors affecting nitrification in soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39, 1436–1446.

**Strauss, E. A., Lamberti, G. A., 2000.** Regulation of nitrification in aquatic sediments by organic carbon. *Limnology and Oceanography* 45, 1854–1895.

**Šantrůček, J. and Šantrůčková, H. (2014).** Stabilní izotopy biogenních prvků. Použití v biologii a ekologii. Academia, Praha.

**Šantrůčková, H., Kaštovská, E., Bárta, J., Miko, L., Tajovský, K., 2018.** Ekologie půdy. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.

**Šantrůčková, H., Vrba, J., Křenková, Z., Svoboda, M., Benčoková, A., Edwards, M., Fuchs, R., Hais, M., Hruška, J., Kopáček, J., Matějka, K., Rusek, J., 2010.** Co vyprávějí šumavské smrčiny. Správa NP a CHKO Šumava, Vimperk.

**Schimel, J. P., Bennett, J., 2004.** Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. *Ecology* 85, 591–602.

**Schulte-Uebbing, L., de Vries, W., 2018.** Global-scale impacts of nitrogen deposition on tree carbon sequestration in tropical, temperate, and boreal forests: a meta-analysis. *Global Change Biology* 24, e416–e431.

**Schulze, E. D., 1989.** Air pollution and forest decline in a spruce (*Picea abies*) forest. *Science* 244, 776–783.

**Šimek, M., Cooper, J., 2006.** Biogeochemical Cycles of Elements: An Introduction to Behaviour of the Main Mineral Nutrients of Plants and Microorganisms. University of South Bohemia, Faculty of Biological Science, České Budějovice.

**Smith, S. J., van Aardenne, J., Klimont, Z., Andres, R. J., Volke, A., Delgado Arias, S., 2011.** Anthropogenic sulfur dioxide emissions: 1850–2005. *Atmospheric Chemistry and Physics* 11, 1101–1116.

**Son, Y., 2001.** Non-symbiotic nitrogen fixation in forest ecosystems. *Ecological Research* 16, 183–196.

**Sponseller, R. A., Gundale, M. J., Futter, M., Ring, E., Nordin, A., Näsholm, T., Laudon, H., 2016.** Nitrogen dynamics in managed boreal forests: Recent advances and future research directions. *Ambio* 45, 175–187.

**Stark, J. M., Hart, S. C., 1997.** High rates of nitrification and nitrate turnover in undisturbed coniferous forests. *Nature* 385, 61–64.

**Storkey, J., Macdonald, A. J., Poulton, P. R., Scott, T., Köhler, I. H., Schnyder, H., Goulding, K. W. T., Crawley, M. J., 2015.** Grassland biodiversity bounces back from long-term nitrogen addition. *Nature* 528, 401–404.

**Strohm, T. O., Griffin, B., Zumft, W. G., Schink, B., 2007.** Growth Yields in Bacterial Denitrification and Nitrate Ammonification. *Appl. Environ. Mikrobiol.* 73, 1420–1424.

**Tahovská, K., Kaňa, J., Bárta, J., Oulehle, F., Richter, A., Šantrůčková, H., 2013.** Microbial N immobilization is of great importance in acidified mountain spruce forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 59, 58–71.

**Tahovská, K., Choma, M., Kaštovská, E., Oulehle, F., Bárta, J., Šantrůčková, H., Moldan, F., 2020.** Positive response of soil microbes to long-term nitrogen input in spruce forest: Results from Gårdsjön whole-catchment N-addition experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 143.

**Teske, A., Alm, E., Regan, J. M., Toze, S., Rittmann, B. E., Stahl, D. A., 1994.** Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology* 176, 6623–6630.

**Tiedje, J. M., 1988.** Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *Environmental Microbiology of Anaerobes* 717, 179–244.

- Tourna, M., Stiegelmeier, M., Spang, A., Könneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., Engel, M., Schloter, M., Wagner, M., Richter, A., Schleper, C., 2011.** Nitrososphaera viennensis, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 8420–8425.
- Treseder, K. K., 2008.** Nitrogen additions and microbial biomass: a meta-analysis of ecosystem studies. *Ecology Letters* 11, 1111–1120.
- Vance, E. D., Brookes, P. C., Jenkinson, D. S., 1987.** An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19, 703–707.
- Verchot, L. V., Holmes, Z., Mulon, L., Groffman, P. M., Lovett, G. M., 2001.** Gross vs. net rates of N mineralization and nitrification as indicators of functional differences between forest types. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1889–1901.
- Vitousek, P. M., Howarth, R. W., 1991.** Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13, 87–115.
- Wallander, H., Arnebrant, K., Östrand, F., Kårén, O., 1997.** Uptake of <sup>15</sup>N-labelled alanine, ammonium and nitrate in *Pinus sylvestris* L. ectomycorrhiza growing in forest soil treated with nitrogen, sulphur or lime. *Plant and Soil* 195, 329–338.
- Weber, D. F., Gainey, P. L., 1962.** Relative sensitivity of nitrifying organisms to hydrogen ions in soils and in solutions. *Soil Science* 94, 138–145.
- Whiteside, M. D., Digman, M. A., Gratton, E., Treseder, K. K., 2012.** Organic nitrogen uptake by arbuscular mycorrhizal fungi in a boreal forest. *Soil Biology and Biochemistry* 55, 7–13.
- Zhang, J., Sun, W., Zhong, W., Cai, Z., 2014.** The substrate is an important factor in controlling the significance of heterotrophic nitrification in acidic forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 76, 143–148.
- Zhang, L., Jacob, D. J., Knipping, E. M., Kumar, N., Munger, J. W., Carouge, C. C., van Donkelaar, A., Wang, Y. X., Chen, D., 2012.** Nitrogen deposition to the United States: Distribution, sources, and processes. *Atmospheric Chemistry and Physics* 12, 4539–4554.

**Zhou, Z., Takaya, N., Nakamura, A., Yamaguchi, M., Takeo, K., Shoun, H., 2002.**  
Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi. *Journal of Biological Chemistry* 277, 1892–1896.