

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Magisterská diplomová práce

**Aktivita půdních enzymů v horských smrčínách
napadených lýkožroutem smrkovým**

Bc. Petra Šlajsová

Vedoucí práce: Ing. Jiří Bárta, Ph.D.

České Budějovice

2011

Šlajsová, P., 2011. Aktivita půdních enzymů v horských smrčínách napadených lýkožroutem smrkovým [Activity of soil enzymes in the Norway spruce forests attacked by bark beetle. Mgr. Thesis, in Czech] – 65 pp., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Activity of enzymes was investigated in the soils of Norway spruce forests in the Bohemian Forest. The aim of the study was the determination of the impact of temperature and plants dominant in understorey on the activity of extracellular enzymes in the soils in the watershed of Plešné and Čertovo Lake. The measurement of enzymes activities was conducted using the fluorometric method with model substrates.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR 526/08/0751.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské – diplomové – rigorózní - disertační práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Prohlašuji, že jsem svoji magisterskou diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím literatury uvedené v seznamu citované literatury.

V Českých Budějovicích, dne 27.4. 2011

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především svému školiteli Jirkovi Bártovi za trpělivost, obětavost a cenné rady při psaní této práce. Dále mé poděkování patří Tomášovi Pickovi, Danielu Vaňkovi a Terézii Říhové za pomoc při chemických analýzách půdy. Největší dík patří mému tátovi, který mi umožnil studium na vysoké škole a mým nejbližším za veškerou podporu, nejenom při psaní této práce.

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	2
2.1 Obecný úvod o extracelulárních enzymech	2
2.1.1 Lokalizace enzymů v půdním prostředí	2
2.1.2 Aktivita enzymů v půdním profilu	3
2.2 Extracelulární enzymy.....	4
2.2.1 Celulázy.....	4
2.2.2 Proteázy.....	5
2.2.3 Fosfatázy	5
2.3 Původ extracelulárních enzymů	6
2.4 Význam extracelulárních enzymů.....	6
2.5 Vztah extracelulárních enzymů ke koloběhům prvků.....	7
2.5.1 Enzymy a koloběh dusíku	7
2.5.2 Enzymy a koloběh fosforu	7
2.5.3 Enzymy a koloběh uhlíku.....	8
2.6 Vliv vnějších faktorů na aktivitu enzymů	9
2.6.1 Vliv vegetace.....	9
2.6.2 Vliv chemického složení rostlinného opadu	10
2.6.3 Vliv dostupnosti živin	11
2.6.4 Teplota.....	13
2.6.5 Obsah vody.....	14
2.6.6 pH.....	14
2.7 Kinetika enzymových reakcí	15
3. Materiál a metody	17
3.1 Přiblížení studované oblasti	17
3.1.1 Charakteristika výzkumné plochy povodí Čertova jezera.....	17
3.1.2 Charakteristika výzkumné plochy povodí Plešného jezera.....	18
3.2 Odběr a příprava půdních vzorků.....	18
3.3 Měření aktivity extracelulárních enzymů.....	19
3.3.1 Použitá metoda	19
3.3.2 Použitá média a roztoky	19
3.3.3 Uspořádání pokusu	20
3.3.4 Měření kinetiky enzymových reakcí	21
3.3.5 Měření aktivity enzymů v půdách PLH, CTH	26
3.3.6 Měření aktivity enzymů pod jednotlivými typy podrostu.....	27
3.3.7 Měření teplotní závislosti enzymů	27
3.4 Stanovení suché hmotnosti půdy (sušiny)	28
3.5 Analýza chemického složení půdy	28
3.5.1 Celkový obsah uhlíku (C_{TOT}) a dusíku (N_{TOT})	29
3.5.2 Celkový obsah fosforu (P_{TOT})	29
3.5.3 Obsah rozpustných forem uhlíku (C_{EXT}) a dusíku (N_{EXT}).....	29
3.6 Zpracování dat.....	30

4. Výsledky	31
4.1 Vliv povodí na aktivitu enzymů	31
4.1.1 Chemické složení půdy povodí Plešného a Čertova jezera.....	31
4.1.2 Aktivita enzymů v půdách povodí Plešného a Čertova jezera	32
4.2 Vliv podrostu povodí Plešného jezera na aktivitu enzymů	35
4.2.1 Chemické složení půdy pod jednotlivými druhy podrostu.....	35
4.2.2 Aktivita enzymů v půdě pod jednotlivými druhy podrostu.....	37
4.3 Vliv teploty na aktivitu enzymů	40
4.3.1 Teplotní závislost aktivity enzymů v půdách PLH	40
5. Diskuze	43
5.1 Vliv povodí na aktivitu enzymů	43
5.1.1 Chemické složení půdy povodí Plešného a Čertova jezera.....	43
5.1.2 Aktivita enzymů v půdách povodí Plešného a Čertova jezera	44
5.2 Vliv podrostu povodí Plešného jezera na aktivitu enzymů	48
5.2.1 Chemické složení půdy pod jednotlivými druhy podrostu.....	48
5.2.2 Aktivita enzymů v půdě pod jednotlivými druhy podrostu.....	49
5.3 Vliv teploty na aktivitu enzymů	51
5.3.1 Teplotní závislost aktivity enzymů v půdě PLH	51
6. Závěr	54
7. Literatura	55
8. Přílohy	64

Seznam použitých zkratek:

AMC	7-amino-4-methylcoumarin
ATP	adenosintrifosfát
C	koncentrace
C _{EXT}	celkový obsah extrahovatelného uhlíku
CTH	horní výzkumná plocha povodí Čertova jezera
CT	povodí Čertova jezera
C _{TOT}	celkový obsah uhlíku
DIN	rozpuštěný minerální dusík (suma NH ₄ ⁺ a NO ₃ ⁻)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DON	rozpuštěný organický dusík
EC	numerické klasifikační schéma pro enzymy
ECM	ektomykorhiza
MUF	4-methylumbelliferone
MW	molekulová hmotnost
N _{EXT}	celkový obsah extrahovatelného dusíku
N _{TOT}	celkový obsah dusíku
PLH	horní výzkumná plocha povodí Plešného jezera
PL	povodí Plešného jezera
P _{TOT}	celkový obsah fosforu
RNA	ribonukleová kyselina
S.D.	směrodatná odchylka
SOC	půdní organický uhlík
VAM	vesikulo-arbuskulární mykorhiza

1. Úvod

Na začátku 60. let 20. století se stala hlavním celosvětovým problémem antropogenní acidifikace terestrických a sladkovodních ekosystémů. Smrkové porosty na Šumavě byly vystaveny vlivu atmosférické kyselé depozice a následnému nedostatku živin, což se projevilo oslabením jejich fyziologického stavu. Oslabený lesní porost tak snadno podléhá útokům škůdců. V současné době dochází v důsledku napadení porostu lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*) k odumírání stromového patra, prosvětlování a tím výraznému rozvoji podrostu. Na výzkumných plochách námi studované lokality dochází k nahrazování smrkového porostu bylinným patrem s vysokým zastoupením trav. Se změnou vegetačního krytu a s tím související změnou kvality rostlinného opadu vstupujícího do půdy lze očekávat zvýšení aktivity půdních enzymů.

S tím je také spojena transformace uhlíku, dusíku a fosforu v půdě. To bude mít dopad na složení a funkci společenstva půdních mikroorganismů a aktivitu enzymů. Dojde-li k prosvětlení povodí obou jezer v důsledku odumírání stromového patra, zvýší se zde půdní teplota, a proto se dá předpokládat zvýšení mineralizace půdní organické hmoty a aktivity půdních enzymů. Nejenom klimatické podmínky, ale také vývoj vegetačního krytu bude mít zásadní vliv na půdní mikroorganismy.

Cíle práce:

1. Stanovit kinetiku enzymových reakcí a zvolit vhodnou koncentraci substrátu pro následné analýzy.
2. V opadovém a humusovém půdním horizontu výzkumných ploch (povodí Plešného a Čertova jezera) stanovit aktivitu enzymů fosfomonoesterázy, β -glukosidázy, celobiosidázy, alanin-aminopeptidázy a leucin-aminopeptidázy.
3. Objasnit vliv převládajících druhů podrostu (*Avenella flexuosa*, *Vaccinium myrtillus*) a opadu (*Picea abies*) na aktivitu enzymů v půdách povodí Plešného jezera.
4. Stanovit vliv teploty na aktivitu sledovaných enzymů v půdách povodí Plešného jezera.

2. Literární přehled

2.1 Obecný úvod o extracelulárních enzimech

Enzymy jsou jednoduché nebo složené proteiny, které se vyznačují svou **katalytickou aktivitou**. Pro jejich funkci v půdě je velmi důležitá živá buňka, protože jsou během jejího buněčného růstu a dělení syntetizovány. Enzymy navázané na vnějším povrchu nebo mimo buňku jsou definovány jako **extracelulární**. Většina z nich má nízkou molekulovou hmotnost (20 000 až 40 000) (Tate, 2000). Enzymovou aktivitu lze charakterizovat vlastnostmi, které se odrážejí od interakce mezi enzymem, jeho substráty (sloučeniny přeměňované enzymem) a produkty jejich reakce (Tate, 2000). Rychlost chemických a biochemických reakcí ovlivňují tím, že snižují jejich aktivační energii. Ta závisí na koncentraci substrátu, přítomnosti aktivátorů a inhibitorů, pH a teplotě.

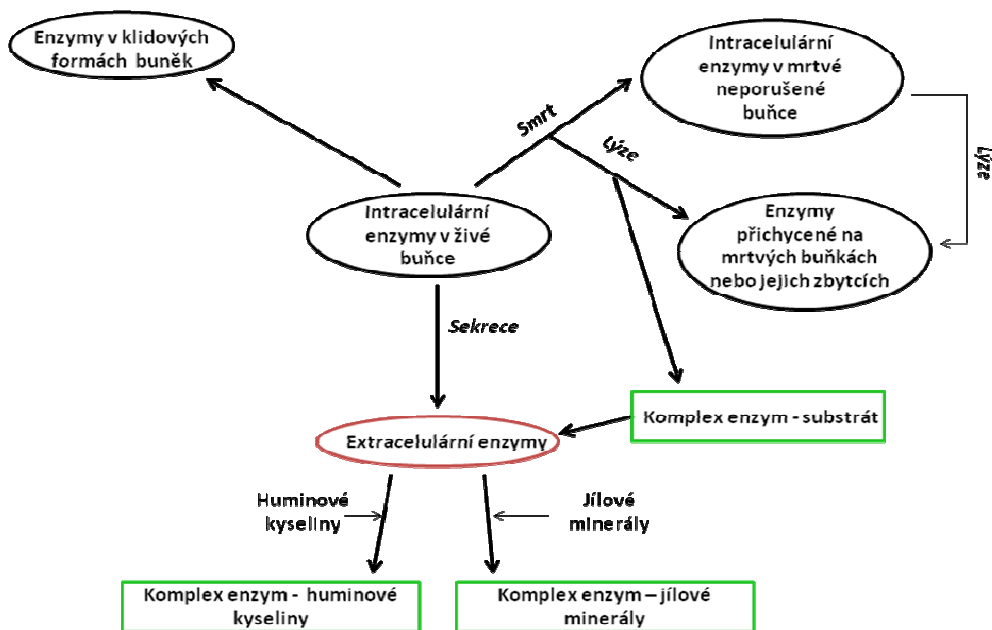
Můžeme rozlišovat mezi dvěma základními skupinami enzymů. První skupinou jsou enzymy konstitutivní, nezávislé na přítomnosti substrátu, vždy produkované buňkou a stále přítomné. Druhou skupinou jsou enzymy induktivní, produkované pouze v přítomnosti substrátu a jen když je jejich aktivita potřebná (Tate, 2000).

2.1.1 Lokalizace enzymů v půdním prostředí

Enzymy lze rozdělit do několika základních kategorií podle jejich umístění v půdním prostředí (Obr. 1) (Burns, 1986; Nannipieri et al., 2002):

1. Enzymy asociované s živými, metabolicky aktivními buňkami v půdě, bývají v cytoplasmě, navázané na buněčnou stěnu nebo jako extracelulární enzymy, které byly buňkou právě vyloučeny.
2. Enzymy asociované s živými ale nereprodukujícími se buňkami.
3. Enzymy, které jsou asociované s jejich substráty v komplexech enzym-substrát.
4. Enzymy, které jsou spojeny s mrtvými buňkami nebo s buněčnými částmi, nebo které difundují z umírajících buněk, které je produkovaly.
5. Enzymy, které jsou více méně permanentně imobilizované na jílových částicích a huminových koloidech.

Z předchozího přehledu vyplývá, že enzymy mohou být ve volné formě nebo vázané na půdních částicích (Skujinš, 1978a), v komplexech s koloidy, jílovými minerály a humusovými látkami (Burns, 1982; Nannipieri et al., 2002). V této formě se stávají rezistentními vůči proteolytické degradaci a/nebo chemicko-fyzikálnímu stresu a mohou tudíž přetrvávat v půdě po velmi dlouhou dobu.



Obr. 1. Distribuce a hlavní zdroje enzymů v půdním prostředí (upraveno podle Tate, 2000).

2.1.2 Aktivita enzymů v půdním profilu

Aktivita enzymů se v půdním prostředí mění. Půdní profil má složitou prostorovou heterogenitu díky tomu, že má každý horizont odlišné množství půdní organické hmoty, texturu, minerální obsah, obsah půdního vzduchu, vody a různé množství mikrobiální biomasy (Burns, 1986).

Opadový půdní horizont je oproti humusovému a minerálnímu více vystaven vnějším faktorům prostředí. Mikrobiální aktivita je zde více ovlivňována mikroklimatickými podmínkami. Andersson et al. (2004) zjistili, že vyšší enzymová aktivita v opadovém horizontu je spojovaná s vyšším obsahem uhlíku v mikrobiální biomase a bazální respiraci, na rozdíl od horizontu humusového a minerálního. Z toho vyplývá, že aktivita enzymů v opadovém horizontu je úzce spojena s aktivním růstem mikroorganismů.

Organický horizont obsahuje velké množství organického materiálu ve formě humusu a jemných kořenů rostlin, které podporují vývoj mikrobiální biomasy (Fisk and Fahey, 2001). Mikrobiální biomasa klesá spolu s hloubkou půdního profilu (Enowashu et al., 2009), což podporuje také výzkum Fierer et al. (2003), kteří dospěli ke stejnému výsledku při průzkumu dvou odlišných půdních profilů. Hlavním důvodem snížení mikrobiální biomasy s klesající hloubkou půdního profilu je pokles v dostupnosti substrátu, v souvislosti se změnami v obsahu půdního uhlíku a redukovanou kvalitou a množstvím půdní organické hmoty (Ajwa et al., 1998; Fierer et al., 2003). Také inaktivace enzymů jílovými minerály v hlubších půdních horizontech může být částečně odpovědná za odlišnou distribuci a sníženou aktivitu enzymů (Khaziev and Burangulova, 1965).

Životnost enzymů je tedy závislá na tom, v jaké se nacházejí asociaci s buněčnými strukturami, půdními částicemi, na vlastnostech půdního prostředí a umístění v rámci půdního profilu (Tate, 2000). V neposlední řadě jsou pro aktivitu enzymů důležité mikroklimatické faktory prostředí, vegetační kryt a horninové podloží (Burns, 1986).

2.2 Extracelulární enzymy

Extracelulární enzymy jsou katalyzátory procesů nezbytných pro dekompozici půdní organické hmoty, dále se podílejí na biodegradaci organických makromolekul a na koloběhu živin v půdě. Mezi klíčové enzymy patří enzymy hydrolytické, které štěpí chemické vazby v substrátech pomocí molekul vody. Významnými skupinami těchto enzymů zapojených do **cyklu uhlíku (C), dusíku (N) a fosforu (P)** jsou **celulázy, proteázy a fosfatázy**.

2.2.1 Celulázy

Celulázy jsou nezbytnou součástí koloběhu uhlíku. Dekompozice půdní organické hmoty, a to především celulózy, je katalyzována systémem celuláz. Jejich aktivita zahrnuje ztrátu krystalické struktury celulózy a následnou depolymerizaci. Po depolymerizaci jsou krátké řetězce glukózových jednotek (dvě jednotky – celobióza, tři jednotky – celotrióza) hydrolyzovány endoenzymy celobiázou a celotriózou do jednoduchých glukózových jednotek (Killham, 1994). Ty mohou být transportovány do mikrobiálních buněk, kde podléhají katabolismu a slouží jako důležitý zdroj uhlíku a energie (Burns, 1986).

Významným zástupcem této skupiny enzymů je **β - glukosidáza (EC 3.2.1.21)**. Tento velmi hojný enzym patří mezi nejméně variabilní enzymy. Její aktivita je nezbytná při degradaci celulózy a dalších karbohydrátových polymerů až na glukózové jednotky (Saiya-Cork et al., 2002). **Celobiosidáza (EC 3.2.1.91)** se podílí na hydrolýze 1,4 - β - D - glukosidických vazeb celulózy tím, že uvolňuje celobiózu na konci řetězců celulózy.

2.2.2 Proteázy

Extracelulární **proteázy (EC 3.4.2.21-24)** mají důležitou roli v cyklu dusíku. Účastní se hydrolýzy půdních proteinů, při které dochází k narušení peptidových vazeb mezi aminokyselinami. Uvolnění aminokyselin je první fází mineralizace dusíku a nezbytným krokem pro jeho příjem rostlinami a mikroorganismy (Sardans et al., 2008).

Čtyři odlišné mechanismy mohou charakterizovat regulaci syntézy extracelulárních proteáz (Kalisz, 1988): 1) přítomnost substrátu může zvýšit syntézu proteáz, 2) vysoký obsah cílových produktů, jako jsou aminokyseliny, NH_4^+ a snadno metabolizovatelné zdroje uhlíku, může potlačit jejich produkci, 3) na druhou stranu může být produkce proteáz zvýšena při nedostatečném množství uhlíku, dusíku nebo síry, 4) anebo mohou být extracelulární enzymy produkovány nezávisle na přítomnosti substrátu.

2.2.3 Fosfatázy

Pro cyklus fosforu v půdě jsou důležité **extracelulární fosfatázy**, které jsou zapojeny do transformace jeho organických a anorganických sloučenin (Amador et al., 1997). Fosfor vstupuje do půdy ve formě opadu a ostatních organických zbytků (Garcia et al., 2002; Sardans and Peñuelas, 2005).

Fosfatázová aktivita katalyzuje mineralizaci/hydrolýzu organicky vázaného fosforu na anorganický fosfor, který je buňkami asimilován (McGill and Cole, 1981; Enowashu et al., 2009). Mezi nejhojnější zástupce fosfatáz v půdě patří kyselá a alkalická **fosfomonoesteráza (EC 3.1.3)**, která hydrolyzuje monoesterové vazby organických sloučenin fosforu a uvolňuje fosfáty. Poskytuje tak alternativní zdroj fosforu buňkám (Goel et al., 1998). Kyselé fosfatázy jsou zapojeny především do mineralizace fosforu v kyselých půdách (Olander and Vitousek, 2000).

2.3 Původ extracelulárních enzymů

Hlavními zdroji extracelulárních enzymů v půdě jsou především **mikroorganismy, kořeny rostlin a půdní živočichové**. Enzymy tedy mohou být do půdního prostředí uvolněny během buněčného metabolismu eukaryotických i prokaryotických buněk (Masciandaro et al., 2008). V eukaryotických buňkách jsou enzymy syntetizovány ribozomy a následně transportovány přes endoplasmatické retikulum, Golgiho aparát na plasmatickou membránu, odkud jsou pomocí exocytózy vyloučeny ven z buňky (Burns, 1978). Syntéza enzymů v prokaryotických buňkách probíhá v ribozomech, odkud jsou transportovány na cytoplasmatickou membránu a pomocí sekrečních proteinů jsou vyloučeny ven z buňky (Pugsley, 1993).

Půdní mikroorganismy produkující extracelulární enzymy zahrnují především bakterie (včetně aktinomycet), houby, řasy a prvoky. Bakterie jsou nejpočetnější skupinou půdních mikroorganismů, které se podílejí na transformaci látek a dekompozici organického materiálu. Aktinomycety jsou významným kmenem grampozitivních bakterií. Hrají důležitou roli při rozkladu některých rezistentních sloučenin (celulóza, chitin) rostlinných a živočišných tkání. Houby se podílejí především na procesech tvorby humusu a stabilizace půdních agregátů (Brady and Weil, 2002). Mají ve srovnání s bakteriemi obecně vyšší toleranci k aciditě, proto se více účastní dekompozice organické hmoty v kyselejších půdách (Killham, 1994). Mezi nejznámější houby produkující extracelulární enzymy patří zástupci rodu *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* a *Trichoderma* a mezi bakterie zástupci rodu *Streptomyces*, *Pseudomonas* a *Bacillus* (Sylvia et al., 1999).

2.4 Význam extracelulárních enzymů

Většina extracelulárních enzymů katalyzuje hydrolytické štěpení chemických vazeb polymerních sloučenin za vzniku menších molekul, které mohou být buňkami absorbovány. Regulují tak rychlost reakcí, při kterých vznikají dostupnější formy živin pro rostliny a mikroorganismy (Saratchandra et al., 1984). Významně se podílejí na dekompozici půdní organické hmoty, na stabilizaci a vytváření půdní struktury, mají také nezbytnou roli při cyklech prvků a uvolňování živin (Sinsabaugh, 1994). Aktivita půdních enzymů může být měřítkem biologické diverzity, fungování ekosystému a úrodnosti půdy (Marx et al., 2001).

Půdní mikroorganismy a enzymy jsou velice citlivé na chemické a fyzikální změny v ekosystému vyvolané přirozenými nebo antropogenními procesy.

2.5 Vztah extracelulárních enzymů ke koloběhům prvků

2.5.1 Enzymy a koloběh dusíku

Dusík (N) patří mezi nejdůležitější biogenní prvky. Ve většině terestrických ekosystémů je limitujícím prvkem pro růst rostlin. Více než 90 % celkového N se v půdách nachází ve formě různých organických sloučenin (Foth and Ellis, 1997), které nejsou přímo dostupné pro rostliny na rozdíl od minerálních forem (Geisseler and Horwath, 2008). Z toho přes 40 % zahrnuje bílkovinný materiál, jako jsou proteiny, glykoproteiny, peptidy a aminokyseliny (Schulten and Schnitzer, 1998).

Dalším důležitým zdrojem je rozpuštěný organický N ve formě aminokyselin (Lipson et al., 2001). Ty se do půdního roztoku dostávají díky hydrolytickému štěpení proteinů, při kterém dochází k narušení peptidových vazeb mezi aminokyselinami za účasti **proteáz**. Tyto enzymy jsou důležitým faktorem podporujícím N cyklus v půdě. Množství přijímaných aminokyselin závisí na koncentraci volných aminokyselin v půdním roztoku, na typu aminokyseliny, hodnotě půdního pH a na kompetici mezi rostlinami a půdními mikroorganismy.

2.5.2 Enzymy a koloběh fosforu

Fosfor (P) je dalším významným biogenním prvkem. V rostlinných a mikrobiálních buňkách se vyskytuje vázaný ve fosfolipidech, nukleových kyselinách (DNA, RNA) a ATP. Tyto sloučeniny představují důležitou část ve vodě rozpustného biodostupného organického P (Fransson and Jones, 2007). Většina půdního P je v důsledku jeho chemicko – fyzikálních vlastností v těžko dostupných formách. Jeho dostupnost je řízena mineralizací a imobilizací organických sloučenin P a rozpouštěním (solubilizací) anorganických forem P (Sylvia et al., 1999).

Organický fosfor představuje 20 – 80 % celkového P (Fransson and Jones, 2007). Do půdy se dostává prostřednictvím rostlinných a živočišných zbytků. Důležitým zdrojem organického P je také mikrobiální biomasa, díky které dochází v půdě k aktivní mineralizaci

a imobilizaci P (Sylvia et al., 1999). Nezbytnou součástí mikrobiální biomasy jsou **extracelulární fosfatázy**, které katalyzují mineralizaci, při které dochází k hydrolyze esterových vazeb organických sloučenin P a uvolnění orthofosfátů (Šantrůčková et al., 2004). Část uvolněných orthofosfátů je přijímána rostlinami nebo imobilizovaná do mikrobiální biomasy, část může být ve vazbě s ionty (Fe^{3+} , Al^{3+} , Ca^{2+}), s oxidy železa (Fe) a hliníku (Al) nebo v komplexech s rozpuštěnými organickými sloučeninami v půdním roztoku (Brady and Weil, 2002). Odtud mohou být snadněji přijímány rostlinami a mikroorganismy (Solaiman et al., 2007). Tyto reakce mají za následek nízkou koncentraci orthofosfátů v půdním roztoku (Sylvia et al., 1999).

Celková koncentrace P v půdním roztoku je nízká ve srovnání s požadavky rostlin a půdních mikroorganismů. Různé kořenové exudáty ve formě organických kyselin a dalších biologicky aktivních látek, včetně fosfatáz, působí pozitivně na dostupnost P (Vance et al., 2003). Další strategie k získávání P ve fosforem limitovaných půdách, zahrnují modifikovanou morfologii kořenů a rychlost kořenového růstu zvyšující povrch aktivních kořenů (Föhse et al., 1988). Dále může zvýšit rostlina příjem P symbiózou s mykorhizními houbami. Vesikulo-arbuskulární mykorhiza (VAM) je obecně spojována s travními porosty (Powell, 1977), zatímco ektomykorhiza (ECM) je spojována s jehličnatými stromy (Chu-Chou and Grace, 1990). Obecně je ECM hyfa považována za více účinnou v příjmu P a jeho transportu k hostitelské rostlině než VAM hyfy (Marschner and Dell, 1994).

2.5.3 Enzymy a koloběh uhlíku

Uhlík (C) je základní složkou veškeré organické hmoty. Aktivním přeměnám podléhá uhlík, který je vázaný v živých organismech, organické hmotě, uhlík v atmosféře a rozpuštěný ve vodě (Šantrůčková, 2001). Velikost zásobníku uhlíku v půdě závisí na primární produkci a dekompozici organických materiálů v půdě. Většina biologických a biochemických vlastností půdy koreluje s obsahem půdního organického uhlíku (SOC).

Hlavními procesy podílejícími se na koloběhu uhlíku je dekompozice a mineralizace organické hmoty. Během dekompozice organické hmoty mikroorganismy je většina uhlíku uvolněna ve formě CO_2 nebo zabudována do biomasy. Důležitou roli v transformaci SOC mají půdní mikroorganismy, které mohou být v interakci s rhizosférou kořenů rostlin. Tok C v půdě závisí na účinnosti, se kterou mikroorganismy využívají organické zbytky jako

substrát pro získávání energie a budování biomasy (Sylvia et al., 1999). Jen malá část uhlíku je biochemicky pozměněna a zůstává v půdě jako organická hmota.

Dekompozice celulózy je zprostředkována díky specializovaným dekompozitorům a je katalyzována systémem **celuláz**. Celulolytické mikroorganismy můžeme rozdělit do dvou skupin s ohledem na jejich fyziologické vlastnosti. První skupina zahrnuje tzv. polyfágní organismy (houby, bakterie, aktinomycety), které jsou schopné využívat několik dalších zdrojů uhlíku, kromě celulózy. Pokud jsou přítomny tyto zdroje uhlíku spolu s celulózou, využívají mikroorganismy pro syntézu celuláz zdroj, který je pro ně snadněji dostupný. Druhou skupinu tvoří tzv. monofágní organismy, které využívají jako zdroj uhlíku a energie pouze celulózu a produkty její hydrolýzy (Szegi, 1988).

2.6 Vliv vnějších faktorů na aktivitu enzymů

Aktivita půdních enzymů je ovlivňována především vegetacním krytem, složením a množstvím opadu vstupujícího do půdy, zdrojem a dostupností živin, teplotou, obsahem vody a pH.

2.6.1 Vliv vegetace

Rostliny spolu s jejich opadem tvoří důležitý zdroj uhlíku a dalších živin především pro půdní mikroorganismy účastníci se dekompozice organické hmoty. Přispívají k heterogenitě půdy tím, že ovlivňují půdní vlhkost, teplotu, provzdušnění a pH. Všechny tyto faktory mohou působit na mikrobiální **syntézu enzymů** a jejich přežívání mimo mikrobiální buňky (Mummey et al., 2002).

Důležitou funkci má kořenový systém, prostřednictvím kterého jsou do půdy uvolňovány chemické sloučeniny zahrnující sacharidy, aminokyseliny, organické kyseliny, hormony, vitaminy a enzymy. Tyto tzv. kořenové exudáty fungují jako signální sloučeniny zahajující fyzikální a biologickou interakci mezi kořeny a půdními organismy, což je důležité pro vzájemnou komunikaci kořen - mikroorganismus (Porazinska et al., 2003). Dále zvyšují dostupnost živin a jejich následný příjem rostlinami a stimulují rozvoj mikrobiální populace v rhizosféře (Dakora and Phillips, 2002). Blízká interakce mezi půdním mikrobiálním společenstvem a rostlinami předpokládá, že složení a aktivita mikrobiálního společenstva se

mění a vyvíjí v závislosti na změnách vegetace. Také se může měnit v důsledku změn fyzikálních a chemických vlastností půdy (Fioretto et al., 2009). Redukce mikrobiální aktivity v půdách s narušeným vegetačním krytem může vést ke snížení mineralizace a ke zpomalení sukcesních procesů (Garcia et al., 2002).

2.6.2 Vliv chemického složení rostlinného opadu

Chemické složení rostlinného opadu a půdní organické hmoty se váže na typ vegetace na konkrétním stanovišti. Rostlinný opad je obecně tvořen z **50 % celulózu, 30 % hemicelulózu, 15 % ligninem**, ale obsahuje také další látky, jako jsou aminokyseliny, proteiny, minerální látky, pigmenty a vosky (Šantrůčková, 2001). Přidání téměř každé energeticky bohaté organické látky do půdy, včetně sloučenin vylučovaných kořeny rostlin, stimuluje růst a aktivitu mikroorganismů. Bakterie mají sklon reagovat nejrychleji na přidavek jednoduchých sloučenin jako je škrob a cukr. Houby a aktinomycety reagují aktivně, i když v přidaném organickém materiálu převládají rozkladu odolnější sloučeniny jako je celulóza (Brady and Weil, 2002). V ekosystémech smrkových lesů, kde je rozkládán především opad obsahující velké množství ligninu, mají houby enzymovou výhodu nad bakteriemi (Bárta et al., 2010).

Nejhojněji zastoupenou strukturní látkou v rostlinných zbytcích je **celulóza**, která bývá často spojována s hemicelulózu a ligninem. Je tvořena ze 44,5 % uhlíkem, 49,3 % kyslíkem a 6,2 % vodíkem (Paul and Clark, 1996). Základními stavebními jednotkami jsou molekuly D-glukózy spojené v poloze 1-4. Tato polymerní látka musí být před vstupem do mikrobiálních buněk nejprve rozštěpána extracelulárními enzymy do menších podjednotek (Wagner and Wolf, 1998). Další významnou látkou je **hemicelulóza**. Tento polysacharid je tvořen především glukózou, pentózami, hexózami a uronovou kyselinou (Sylvia et al., 1999). Hemicelulóza doprovází celulózu v buněčné stěně rostlin a je oproti ní chemicky méně stabilní.

Chemické složení rostlinných zbytků, především poměr C/N, obsah ligninu a dalších polyfenolických látek, je jedním z primárních faktorů určujících rychlost dekompozice (Tian et al., 1997). Dřevnaté rostliny mají vyšší obsah **fenolických látek** oproti bylinným druhům. Především jehličnaté stromy mají obtížně rozložitelný opad obsahující malé množství živin a až 40 % fenolických látek oproti opadu třtiny chloupkaté (*Calamagrostis villosa*), která jich obsahuje kolem 2 % (Applová, 2008). Tvorbou vysoce rezistentních komplexů s proteiny

během dekompozice rostlinných zbytků mohou tyto fenolické látky výrazně zpomalit i rychlost mineralizace (Brady and Weil, 2002) a inhibovat činnost mikroorganismů (Hofmeister, 2005). Mezi vysokomolekulární fenolické látky patří **lignin**. Základní stavební jednotku tvoří deriváty fenyylpropanu (Sylvia et al., 1999). Díky složité struktuře a velikosti molekuly je tato polymerní látka rozkládána pomaleji ve srovnání s celulózou a hemicelulózou.

Při dekompozici organické hmoty jsou nejprve rozkládány snadno rozložitelné cukry a aminokyseliny. Po několika dnech, kdy jsou tyto látky rozloženy, se rozklad zpomalí a postupně dochází k přeměně strukturních látek, které jsou hůře rozložitelné. Nejdříve se rozkládá celulóza a hemicelulóza, poté lignin a další fenolické látky (Šantrůčková, 2001). Dekompozice opadu jehličí bohatého na lignin je tedy pomalejší než dekompozice bylinného podrostu, který obsahuje snadněji rozložitelnou celulózu. O tom svědčí i výzkum Šantrůčkové et al. (2006), při kterém byla sledována rychlost dekompozice jednotlivých druhů rostlinného opadu od nejsnadněji rozložitelného opadu kapradiny (*Athyrium alpestre*) až po nejhůře rozložitelný opad jehličí v následujícím pořadí: *Athyrium alpestre* > *Calamagrostis villosa* > *Vaccinium myrtillus* > *Avenella flexuosa* > jehličí (*Picea abies*).

2.6.3 Vliv dostupnosti živin

Dostupnost živin ovlivňuje aktivitu enzymů a jejich produkci půdními mikroorganismy a rostlinami. Vztah mezi produkcí a aktivitou enzymů a dostupností živin, které jsou jimi mineralizovány, je regulovaný negativními zpětnými mechanismy (Spiers and McGill, 1979; Sinsabaugh, 1994). Pokud je obsah dostupných živin nízký, dochází k produkci enzymů a následné mineralizaci živin. Vysoká enzymová aktivita tedy signalizuje limitaci živinami (Sinsabaugh et al., 1993). Při vysokém obsahu dostupných živin může docházet k potlačení produkce enzymů a k omezení až zastavení mineralizace (Olander and Vitousek, 2000).

Organismy se skládají především z uhlíku (C), dusíku (N) a fosforu (P) a to v určitém molárním poměru. Měření poměru C:N:P v mikrobiální biomase je důležité pro porozumění limitace terestrických ekosystémů a probíhajících procesů živinami. Poměr C:N:P půdní mikrobiální biomasy je v průměru 60:7:1 (Cleveland and Liptzin, 2007). C:N poměr v mikrobiální biomase je relativně konzistentní, mění se v rozmezí 8-12:1 (Paul and Clark, 1996). Nižší poměr indikuje relativně více dusíkatých látek a je charakteristický pro bakterie,

poměr kolem 9:1 je typický pro mikromycety (Šimek, 2007). Rostlinné zbytky mají poměr C:N kolem 40:1. Poměr C:N třtiny chloupkaté (*Calamagrostis villosa*) je přibližně 30 a smrkového jehličí (*Picea abies*) přibližně 40 (Applová, 2008). Obecně lze říci, že poměr C:N vyšší než 30 indikuje nedostatek dusíku a nižší hodnoty jeho nadbytek (Brady and Weil, 2002).

Dostupnost dusíku ovlivňuje mikrobiální dekompozici (Andersson et al., 2004), stabilizaci a tvorbu půdní organické hmoty (Fog, 1988). Vysoké množství dostupného N mění aktivitu enzymů zapojených do rozkladu organických molekul (Enowashu et al., 2009). V půdách satureovaných minerálním N dochází k inhibici aktivity extracelulárních enzymů a mikroorganismů zapojených do procesů degradace organické hmoty obsahující N (Sinsabaugh et al., 2002). **Syntéza proteáz** mikroorganismy je závislá nejenom na obsahu půdního N, ale i na obsahu C (Geisseler and Horwath, 2008). Aktivita proteáz také pozitivně koreluje s obsahem P v organickém půdním horizontu (Allison et al., 2007). Rostlinné materiály, které jsou bohaté na dusík a mají nízký obsah ligninu, se obvykle rozkládají rychleji. Podrostová vegetace, která je obvykle bohatší na živiny, než je tomu u smrkového jehličí, může díky vyššímu obsahu živin výrazně ovlivnit přeměnu a mineralizaci N (Šantrůčková et al., 2006).

Většina biologických a biochemických vlastností půdy koreluje s obsahem **půdního organického uhlíku (SOC)**. Ten hraje důležitou roli při určování velikosti mikrobiální biomasy a aktivity půdních enzymů (Chaer et al., 2009). Vyšší obsah SOC může podporovat biologickou aktivitu díky zvýšenému zdroji energie a množství dostupných živin v půdě (Nourbakhsh, 2007). Přidání komplexních forem C ve formě půdní organické hmoty může tedy zvýšit produkci enzymů katalyzujících hydrolyzu C sloučenin (Fontaine et al., 2003). Aktivita **celuláz** je také podpořena přidáním N ve formě opadu (Carreiro et al., 2000). Dick et al., (1988) našli pozitivní korelaci mezi aktivitou β -glukosidázy a celkovým obsahem N. Pozitivní korelace mezi celulázovou aktivitou a C:N poměrem v opadovém horizontu, pozitivně koreluje s N depozicemi, což naznačuje, že snížení N limitace je doprovázeno zvýšenou dekompozicí (Andersson et al., 2004). Aktivita celuláz také pozitivně koreluje s obsahem P (Allison et al., 2007).

Schopnost půdních mikroorganismů a enzymů rozložit nerozpustné formy P závisí na povaze a dostupnosti uhlíkatého materiálu v půdě (Alexander, 1977). Aktivita **fosfatáz** pozitivně koreluje s obsahem půdního C v minerálním horizontu a negativně koreluje s obsahem P v horizontu organickém (Allison et al., 2007). Biotický požadavek na P řídí produkci fosfatáz a mineralizaci P, zatímco požadavek na C nebo na energii může být řízený

mineralizací N (Olander and Vitousek, 2000). V podmínkách nedostatku P mohou rostliny a mikroorganismy uvolňovat do půdy fosfatázy, které mají schopnost mobilizovat některé z jeho rezervních zdrojů (Joner et al., 2000). Fosfatázová aktivita tedy obvykle roste se sníženou dostupností P (McGill and Cole, 1981). Naopak vysoká dostupnost P produkci fosfatáz inhibuje (Olander and Vitousek, 2000).

2.6.4 Teplota

Teplota půdy je důležitým abiotickým faktorem působícím na biologické, fyzikální a chemické procesy v půdě. Ovlivňuje rychlost dekompozice, aktivitu enzymů, mikrobiální množení a také mění kinetiku enzymových reakcí (Kang and Freeman, 1999). Obecně lze říci, že teplejší klima zvyšuje rozklad organické hmoty v půdě, zatímco chladnější klima rozklad zpomaluje. V zimě při nízkých teplotách se rozklad organické hmoty úplně nezastaví, pouze se zpomalí a probíhá, dokud půda nezamrzne (Šantrůčková, 2001). Teplota může také ovlivňovat sorpci a transport vody a iontů živin. K největším změnám teploty dochází na povrchu půdy a směrem do hloubky se kolísání teploty snižuje. Teplota půdy je také ovlivněna vegetačním krytem.

Mikrobiální aktivita je přímou funkcí teploty. To znamená, že začíná při určité minimální teplotě, poté se zvyšuje a dosahuje vrcholu při optimální teplotě. Při dosažení teplot, které se většinou pohybují nad 35 až 40°C (teplotní maximum) dochází k poškození fyziologických funkcí buněk a k prudkému poklesu aktivity mikroorganismů (Šantrůčková, 2001). Podle vztahu k teplotě je možné půdní mikroorganismy rozdělit na psychrofilní, mezofilní, termofilní a psychrotrofní (Paul and Clark, 1996). Většina mikroorganismů je mezofilních a jejich aktivita je nejvyšší v rozmezí 25 až 35°C. Stejně tak většina půdních bakterií, pro jejichž růst je optimální teplotní rozmezí 15 – 35°C. Dekompozitoři celulózy jsou schopni metabolizovat substrát obsahující celulózu a lignin v teplotním rozmezí 5 až 65°C (Szegi, 1988). Rychlost mikrobiální odpovědi na zvyšující se teplotu je největší v rozmezí teplot 3 - 19°C (Sylvia et al., 1999).

Půdní mikroorganismy mohou růst i při teplotách nižších než 0°C díky tomu, že bod mrznutí půdního roztoku je v průměru okolo - 5°C (to je způsobeno koncentrací solí v půdním roztoku a vazbou vody na povrchu částic) a díky schopnosti adaptace lipidických složek membrán (membrány si uchovávají propustnost i při nízkých teplotách). Zdá se, že změny ve složení buněčných membrán jsou hlavní strategií bakterií k udržení růstové

schopnosti v podmínkách kolísání teploty. Obecně lze říci, že při každém zvýšení teploty o 10°C v rozmezí teplot od 0 do 30°C dojde ke zdvojnásobení až ztrojnásobení mikrobiální aktivity (Šantrůčková, 2001).

2.6.5 Obsah vody

Voda je hlavní složkou všech organismů a zároveň prostředím, ve kterém probíhají všechny životní pochody. Dostupnost a množství vody ovlivňuje růst rostlin, biologickou aktivitu v půdě, dynamiku dekompozice organické hmoty a uvolňování živin (Rutigliano et al., 2009). Vliv půdní vlhkosti na půdní mikroorganismy a mikrobiální procesy je aktuální otázkou mnoha výzkumů, protože většina scénářů pro globální změnu klimatu zahrnuje také změny v množství srážek (Baldrian et al., 2010a).

V období sucha lesní půdy zahrnují méně mikrobiální biomasy a dochází k redukci aktivity enzymů (Ross, 1987; Sardans and Peñuelas, 2005). Půdní vlhkost pozitivně koreluje s mikrobiální biomasou a respirací v lesním opadu (Schimel et al., 1999). Bakterie (včetně aktinomycet) a prvoci mohou přežívat pouze ve vodě. Půdní roztok je pro ně prostředím, ve kterém žijí a současně z něj čerpají rozpuštěné organické a minerální látky. Z mikroorganismů jsou k vodnímu deficitu tolerantnější více aktinomycety a houby oproti ostatním bakteriím.

Při nízké vlhkosti půdy dochází k výraznému zpomalení dekompozice. Nejrychleji se organická hmota rozkládá a mineralizuje při vlhkosti, kdy je přibližně 50 % pórů zaplněno vzduchem. V těchto podmínkách je v půdách dostatek vody a současně jsou dobře provzdušněny (Šantrůčková, 2001). Optimální vlhkost pro vyšší rostliny (vlhkostní potenciál v rozmezí od -10 do -70 kPa) je obvykle nejlepší také pro většinu aerobních mikroorganismů. Vysoký obsah vody (vysoká vlhkost) bude limitovat dostupnost kyslíku (Brady and Weil, 2002). Kombinovaný účinek teploty a vlhkosti je významnější než účinek samotné teploty (Singh and Gupta, 1977).

2.6.6 pH

pH půdního roztoku je důležité pro půdní živočichy, mikroorganismy a rostliny. Ovlivňuje aktivitu a produkci půdních enzymů a složení mikrobiálního společenstva. Působí na biodegradaci organických makromolekul a mineralizační procesy. Na pH závisí schopnost

substrátu vázat se v aktivním centru enzymu. Může také pozměnit koncentraci inhibitorů, aktivátorů a substrátů pro enzymy (Wang et al., 2006) a stabilitu imobilizovaných enzymů v půdě (Kang a Freeman, 1999).

Pro většinu organismů a rostlin je optimální neutrální pH kolem 6, kdy je většina živin v dobře dostupných formách. Aktinomycety preferují neutrální podmínky a často se také vyskytují v alkalických půdách v oblasti vyššího pH. Naproti tomu většina hub je tolerantní ke kyselějšímu pH (Killham, 1994). Některým druhům bakterií se daří v kyselých půdách, které převládají v regiorech s vysokým množstvím srážek. Rychlost enzymové reakce je nejvyšší při pH, které je označováno jako optimální. β -glukosidáza a celobiosidáza jsou neaktivnější při pH 5,5 nebo nižším. Fosfatázy jsou aktivní v široké oblasti pH, což může být důvodem účinné mineralizace (Niemi and Vepsäläinen, 2005). Pro fosfomonoesterázu je optimální pH 4 v kyselé oblasti, při příliš nízkém pH však může být nevratně inaktivována (Frankenberger and Johanson, 1982).

2.7 Kinetika enzymových reakcí

Měření kinetiky enzymových reakcí v půdě je důležité pro vhodné zvolení koncentrace substrátu a má zásadní vliv na správné stanovení aktivity sledovaného enzymu. Je tedy cenné pro objasnění vlastností enzymů a ekosystému (Tate, 2000). Pro každý typ půdy je potřeba určit vhodnou koncentraci substrátu. Vysoké koncentrace mohou mít v některých typech půdy silně inhibiční vliv na aktivitu enzymu.

Samotná enzymová reakce probíhá obvykle v tzv. aktivním místě enzymu, kde se nacházejí katalyticky aktivní aminokyselinové zbytky umožňující vazbu substrátu. Rychlost, se kterou enzymy uskutečňují svoje reakce, je ovlivňována koncentracemi reaktantů. Vztah mezi aktivitou enzymu, resp. rychlostí enzymových reakcí (v) a koncentrací jejich reaktantů/substrátů (S) je často vyjádřena pomocí kinetické rovnice podle **Michaelise a Mentenové** (Sylvia et al., 1999):

$$v = \frac{V_{\max} \cdot (S)}{K_m + (S)}$$

Kde S je počáteční koncentrace substrátu. K vyjádření afinity enzymu k určitému substrátu se používá tzv. Michaelisova konstanta (K_m), která je charakteristická pro daný komplex enzym-substrát. Označuje takovou látkovou koncentraci substrátu, při které je

rychlost enzymové reakce (v) polovinou rychlosti maximální (V_{\max}). Hodnota K_m se pro enzym může měnit v případě, kdy dojde k jeho stabilizaci půdními koloidy (Knight and Dick, 2004). Při inhibici substrátem se používá modifikovaný kinetický model rovnice Michaelise a Mentenové:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot (S)}{K_m + (S) + \frac{S^2}{K_I}}$$

Kde K_I vyjadřuje inhibiční konstantu.

3. Materiál a metody

3.1 Přiblížení studované oblasti

Výzkumné plochy se nalézají na území Národního parku Šumava, který byl vyhlášen v roce 1991 a svou rozlohou 69 030 ha je největším národním parkem nejenom v České republice, ale i v celé střední Evropě. Geomorfologický vývoj území Šumavy lze sledovat od konce druhohor. Během třetihor došlo v souvislosti s alpiským vrásněním k tektonickému zdvihu pohoří. Na detailní modelaci reliéfu se podílely především glaciální jevy probíhající ve čtvrtohorách, díky nimž vznikly ledovcové kary s jezery.

Z regionálně geologického hlediska náleží Šumava k moldanubiku (blok českého masívu zhruba mezi Vltavou a Dunajem) (Kočárek, 2003). Uplatňují se zde převážně pararuly, migmatity, kyselé hlubinné vyvřeliny – granitoidy, svory a svorové ruly (Ložek, 2001). Území NP a CHKO Šumava náleží do regionu horských podzolů se subregionem, ve kterém mezi doprovodnými složkami převažují hydromorfní půdy (Petruš a Neuhäuslová, 2001). Podle klimatického členění ČR patří hlavní část pohoří do chladné oblasti přechodného středoevropského klimatu. V průběhu roku jsou zde poměrně malé teplotní výkyvy a poměrně vysoké srážkové úhrny. Průměrná teplota je ve výšce 750 m n.m. cca 6°C, v polohách kolem 1300 m n.m. 3°C. Nejchladnějším měsícem bývá leden, výjimečně únor, nejteplejším červenec (Sorfon et al., 2001). Díky specifickým klimatickým podmínkám vyšších poloh se zde vyvinula chladnomilná horská vegetace.

Na území NP Šumava se nachází celkem pět jezer ledovcového původu – Černé, Čertovo, Laka, Plešné a Prášilské. Výzkum týkající se měření aktivity extracelulárních enzymů probíhal v půdách povodí Čertova (CT) a Plešného (PL) jezera.

3.1.1 Charakteristika výzkumné plochy povodí Čertova jezera

Čertovo jezero je plochou 10,33 ha a maximální hloubkou 36,7 m druhé největší šumavské jezero. Leží na jihovýchodním svahu Jezerní hory (1343 m n.m.) ve výšce 1030 m n.m. Povodí Čertova jezera zaujímá plochu 87,5 ha včetně plochy samotného jezera (Švambers, 1939, in Kopáček et al., 2002a). Skalní podloží je tvořeno převážně ze svoru (muskovitická rula) s intruzí křemence (Veselý, 1994). V okolní vegetaci převažuje 90 – 150

let starý porost smrku ztepilého (*Picea abies*) s rozptýleným výskytem jedle (*Abies alba*) a buku lesního (*Fagus sylvatica*). Nacházejí se zde tři dominantní typy půd: přibližně 0,5 m hluboká vrstva podzolu (21 %) a rezivé půdy (58 %) a 0,2 m nevyvinuté organicky bohaté půdy (17 %) (Kopáček et al., 2002a). Hodnoty pH půdního roztoku jsou nízké, s nejnižšími hodnotami v humusovém horizontu (2,5 – 3,3) a nejvyššími v horizontu minerálním (3,6 – 4,5) (Kopáček et al., 2002a).

3.1.2 Charakteristika výzkumné plochy povodí Plešného jezera

Plešné jezero se nachází pod 220 m vysokou žulovou stěnou na severovýchodním svahu hory Plechý (1378 m n.m.) ve výšce 1090 m n. m. Jezero dosahuje maximální hloubky 18,3 m a rozlohy 7,48 ha. Povodí Plešného jezera zaujímá plochu 66,6 ha včetně plochy samotného jezera (Švambers 1939, in Kopáček et al., 2002b). Skalní podloží je tvořeno granitem (Veselý, 1994). Povodí jezera bylo téměř z 90 % pokryto 160 let starým porostem smrku ztepilého (*Picea abies*) s menším podílem jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia*) a buku lesního (*Fagus sylvatica*). V současné době však v důsledku napadení tohoto porostu lýkožroutem smrkovým (*Ips typographus*) v kombinaci s dalšími faktory dochází k odumírání stromového patra. Nacházejí se zde tři dominantní typy půd: přibližně 0,45 m hluboká vrstva podzolu (29 %) a rezivé půdy (27 %) a 0,2 m nevyvinuté organicky bohaté půdy (38 %) (Kopáček et al., 2002b). Hodnoty pH půdního roztoku jsou nízké, s nejnižšími hodnotami v humusovém horizontu (2,5 – 3,1) a nejvyššími v horizontu minerálním (3,2 – 4,4) (Kopáček et al., 2002b).

3.2 Odběr a příprava půdních vzorků

Půda byla odebrána v listopadu roku 2009 z horní výzkumné plochy povodí Čertova (CTH) a Plešného (PLH) jezera. Na každé výzkumné ploše byly odebírány na třech náhodně vybraných místech půdní vzorky z opadového horizontu (0 - 2 cm), humusového (2 - 5 cm) a hlubšího humusového horizontu (5 - 10 cm). Na každém ze tří míst bylo odebráno deset půdních sond. Z každé půdní sondy byla odstraněna nejsvrchnější část půdy, která obsahovala živé, zelené části rostlin. Poté byly odebrány jednotlivé horizonty (viz výše) a smíchány.

Stejným způsobem byly odebrány vzorky pod jednotlivými druhy podrostu. Následně byly vzorky homogenizovány přes síto s velikostí ok 5 mm a uloženy v chladicím boxu při teplotě 4°C. Pro dlouhodobější účely při - 20°C.

3.3 Měření aktivity extracelulárních enzymů

3.3.1 Použitá metoda

Mezi nejvhodnější metodu pro měření aktivity extracelulárních enzymů patří **fluorimetrická metoda** (Hoppe, 1983, 1993). Při této metodě se nejčastěji používají fluorogenní činidla AMC substrát (7-amino-4-methylcoumarin) a MUF substrát (4-methylumbelliferone). Tyto modelové substráty jsou obvykle tvořeny fluorimetricky označenou molekulou a organickou molekulou, které jsou spojeny specifickými chemickými vazbami v závislosti na použitém substrátu (esterové nebo peptidové) (Hoppe, 1993). Hlavní výhodou jejich použití je, že umožňují změření široké řady enzymů zapojených do hydrolýzy C, N a P sloučenin (Marx et al., 2001). Krátká doba inkubace při této metodě minimalizuje změny ve struktuře mikrobiálního společenstva a změny substrátu během analýzy (Hoppe, 1993).

Principem metody je, že se molekula těchto silně fluoreskujících látek (AMC, MUF) naváže na vazebné místo komplexní molekuly, která je enzymem štěpena. Po odštěpení a excitaci molekuly AMC a MUF silně fluoreskují. Míra fluorescence je úměrná aktivitě enzymu.

3.3.2 Použitá média a roztoky

Fluorogenní substráty

Při měření aktivity extracelulárních enzymů (Tab. 1) byly použity následující zásobní roztoky substrátů (molekulová hmotnost (MW); koncentrace (C)):

- 4-methylumbelliferyl fosfate (MW = 256,2; C = 2750 μM)
- 4-methylumbelliferyl β-D-cellobiopyranoside (MW = 505,5; C = 2500 μM)
- 4-methylumbelliferyl β-D-glucopyranoside (MW = 338,3; C = 2500 μM)

- L-leucine-7-amino-4-methylcoumarin (MW = 324,8; C = 2500 μ M)
- L-alanine-7-amino-4-methylcoumarin (MW = 360,3; C = 2500 μ M)

Enzym	Substrát	Prvek	Degradované makromolekuly
β -glukosidáza (EC 3.2.1.21)	4-MUF- β -D-glukopyranosid	uhlík	celulóza
Celobiosidáza (EC 3.2.1.91)	4-MUF- β -D-celobiopyranosid	uhlík	celulóza
Leucin-aminopeptidáza (EC 3.4.11.1)	L-leucin-7-AMC	dusík	oligopeptidy \rightarrow aminokyseliny
Alanin-aminopeptidáza (EC 3.4.11.12)	L-alanin-7-AMC	dusík	oligopeptidy \rightarrow aminokyseliny
Fosfomonoesteráza (EC 3.1.3.2)	4-MUF-fosfát	fosfor	hydrolýza fosfátových esterů

Tab. 1. Fluorogenní substráty (AMC a MUF) použité při měření aktivity enzymů.

Standardní roztoky

Jako standardní roztoky byly připraveny 5 mM MUF (MW=176,2) a AMC (MW=175,2). Z těchto zásobních roztoků byla připravena ředící řada o koncentracích 1000, 500, 250, 125, 50, 25 a 5 μ M.

3.3.3 Uspořádání pokusu

Aktivita extracelulárních enzymů – fosfomonoesterázy, celobiosidázy, β -glukosidázy, alanin-aminopeptidázy a leucin-aminopeptidázy byla měřena pomocí mikrodestiček s 96 jamkami (objem 300 μ l). To umožňuje stanovení velkého počtu vzorků z několika půdních horizontů zároveň s vhodným počtem opakování v relativně krátkém čase (Marx et al., 2001). Fluorescence byla měřena pomocí mikrodestičkového analyzátoru (Infinite F200, TECAN, Switzerland) s excitací 360 nm a emisí 465 nm.

Půdní extrakt byl připravován vždy před samotným měřením. K 1 g půdy bylo přidáno 100 ml redestilované vody a umístěno na 4 minuty do ultrazvukové lázně. To slouží k uvolnění extracelulárních enzymů imobilizovaných na humusových koloidech do roztoku

(De Cesare et al., 2000). Pro každý půdní horizont (0 - 2 cm; 2 - 5 cm; 5 - 10 cm) byla vždy 3 pravá opakování.

3.3.4 Měření kinetiky enzymových reakcí

Cílem měření kinetiky enzymových reakcí bylo zvolení vhodné koncentrace jednotlivých MUF a AMC-substrátů (2750, 2500, 1500, 1000, 500, 250, 125, 50 a 25 μM) pro následné analýzy. Nejdříve bylo napipetováno 40 μl jednotlivých substrátů (MUF; AMC) o výše uvedených koncentracích a 200 μl půdního extraktu do příslušných jamek mikrodestičky. Dalších 200 μl redestilované vody a 40 μl substrátů (25; 2500; 2750 μM) bylo napipetováno do jamek, které sloužily jako negativní kontrola pro substráty. Do jamek, které měly sloužit jako negativní kontrola, bylo napipetováno 200 μl půdního extraktu a 40 μl redestilované vody. Současně probíhala kalibrace s 40 μl standardů (AMC; MUF) a 200 μl půdního extraktu. Finální koncentrace substrátů byly 500, 300, 200, 100, 50, 25 a 5 μM a standardů 200, 100, 50, 25, 10, 5 a 1 μM .

Fluorescence byla měřena během 13 kinetických cyklů každých 5 minut při teplotě 30°C. Byly proměřeny všechny 3 půdní horizonty PLH a všech 5 enzymů a zvoleny nejvhodnější koncentrace jednotlivých MUF a AMC-substrátů pro následující analýzy. Data byla proložena nelineárním regresním modelem v programu GraphPad Prism 4.0b (Obr. 2a, 2b, 2c). Z nelineárního modelu byly určeny kinetické parametry V_{\max} , K_m , u inhibičního modelu byla také určena inhibiční konstanta K_i (Tab. 2a, 2b, 2c). Kinetika enzymových reakcí byla vypočítána podle rovnice Michaelise a Mentenové.

Výpočet kinetiky enzymových reakcí:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot (S)}{K_m + (S)}$$

v rychlost enzymové reakce ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)

s počáteční koncentrace substrátu (μM)

K_m Michaelisova konstanta (afinita enzymu k substrátu)

V_{\max} maximální rychlost enzymové reakce

Modifikovaný kinetický model rovnice Michaelise a Mentenové:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot (S)}{K_m + (S) + \frac{S^2}{K_I}}$$

K_I *inhibiční konstanta*

Výpočet aktivit enzymů:

$$\text{aktivita} = \frac{A}{(B \cdot C \cdot D \cdot E)} \quad (\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1})$$

A *nárůst fluorescence po odečtení blanků (F)*

B *směrnice kalibrace ($F \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{l}^1 / \mu\text{mol}$)*

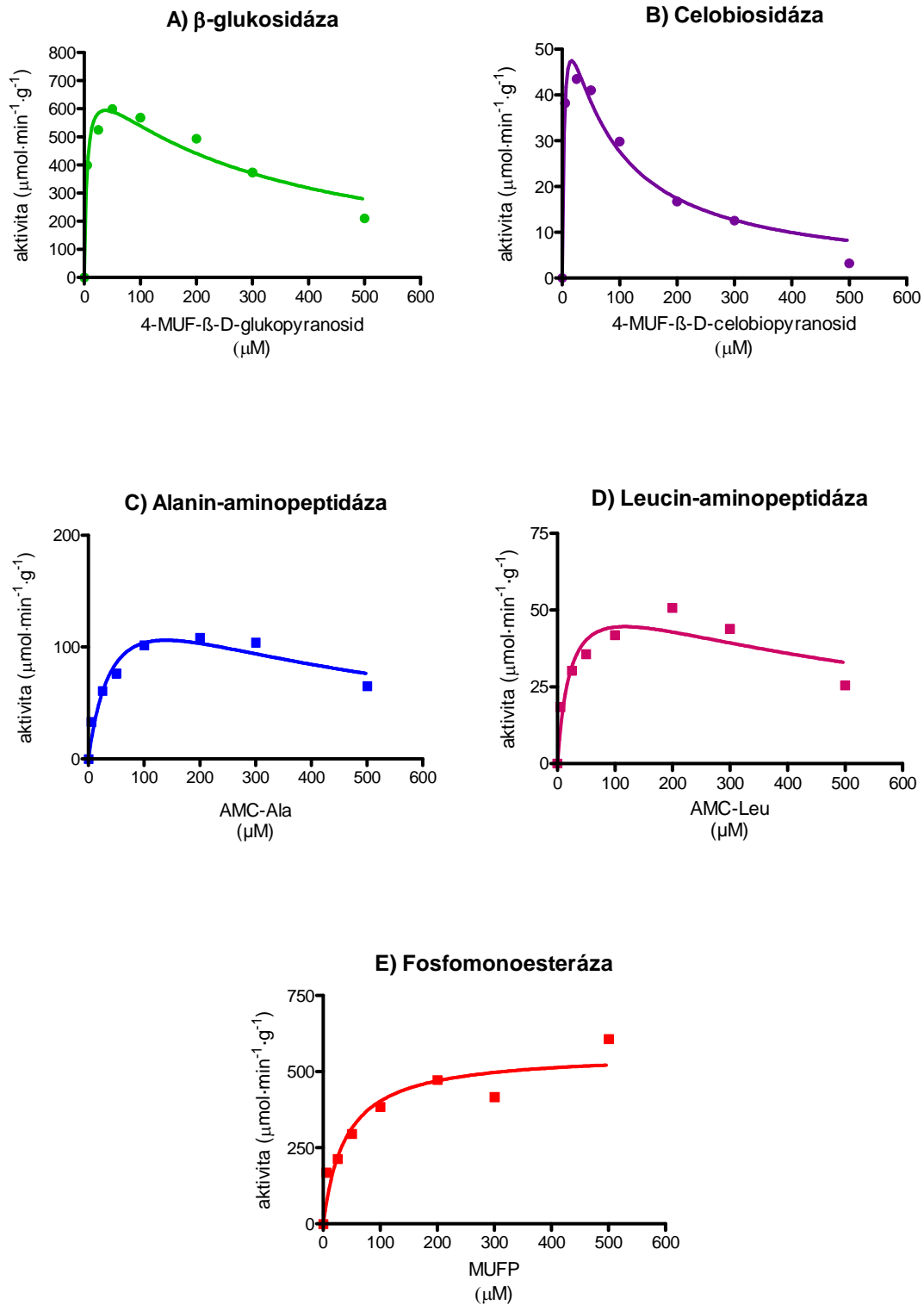
C *navážka vlhké půdy (g)*

D *sušina*

E *objem extrakčního činidla (l)*

	půdní horizont	V_{\max}	K_m	K_I
<i>β-glukosidáza</i>		743,1	4,743	303,0
<i>Celobiosidáza</i>		70,98	4,015	65,55
<i>Alanin-aminopeptidáza</i>	O (0-2 cm)	182,3	49,90	388,4
<i>Leucin-aminopeptidáza</i>		62,25	23,10	593,0
<i>Fosfomonoesteráza</i>		563,6	39,88	

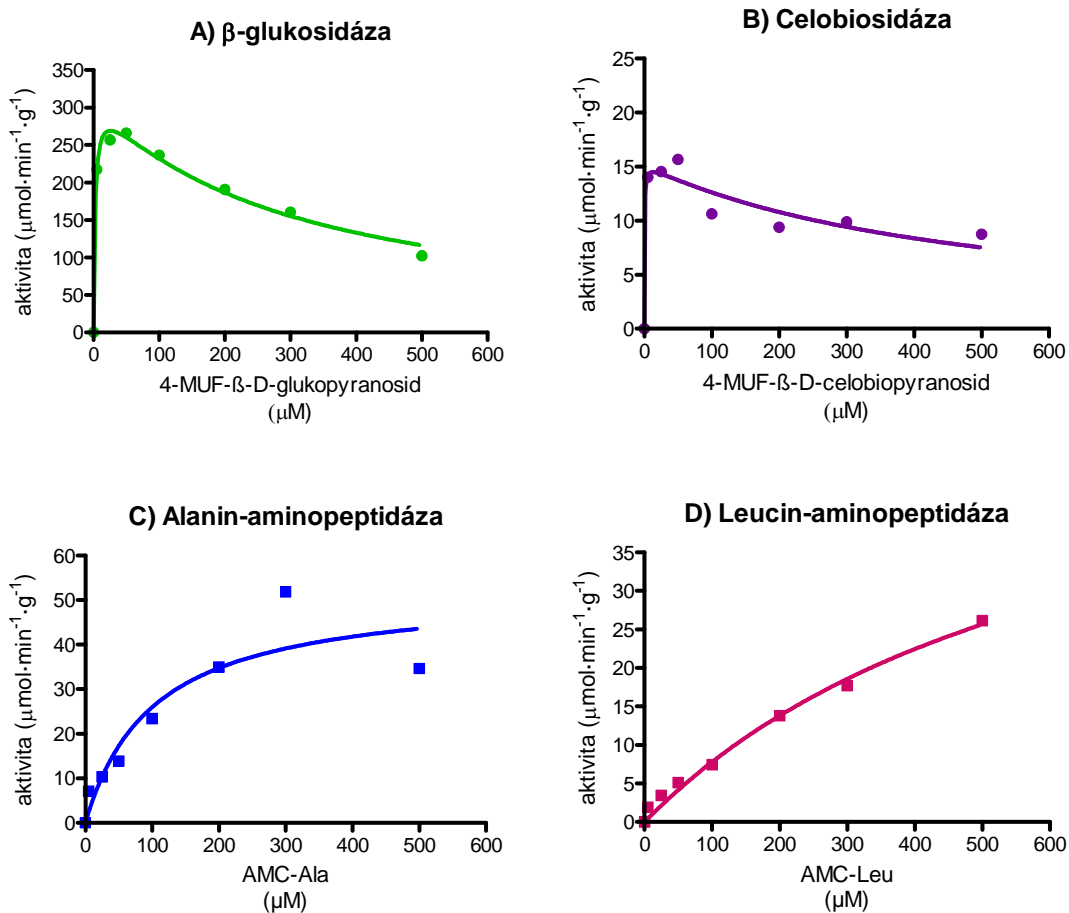
Tab. 2a. Kinetické parametry V_{\max} , K_m a inhibiční konstanta K_I pro jednotlivé enzymy v opadovém (0-2 cm) půdním horizontu.

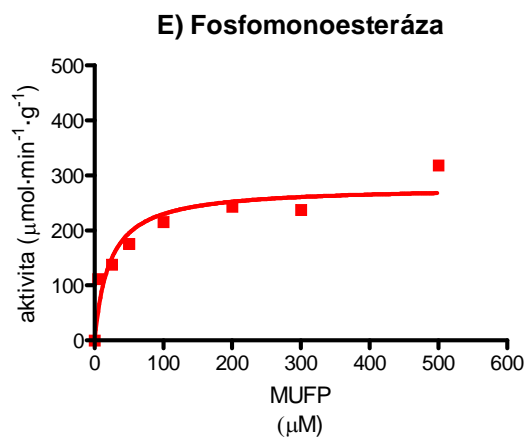


Obr. 2a. Kinetika enzymových reakcí β -glukosidázy (A), celobiosidázy (B), alanin-aminopeptidázy (C), leucin-aminopeptidázy (D) a fosfomonoesterázy (E) v opadovém (0-2 cm) půdním horizontu.

	půdní horizont	V_{max}	K_m	K_I
<i>β-glukosidáza</i>		316,8	2,290	290,8
<i>Celobiosidáza</i>		15,25	0,341	487,2
<i>Alanin-aminopeptidáza</i>	A (2-5 cm)	52,47	102,1	
<i>Leucin-aminopeptidáza</i>		60,10	671,1	
<i>Fosfomonoesteráza</i>		279,7	21,72	

Tab. 2b. Kinetické parametry V_{max} , K_m a inhibiční konstanta K_I pro jednotlivé enzymy v humusovém (2-5 cm) půdním horizontu.

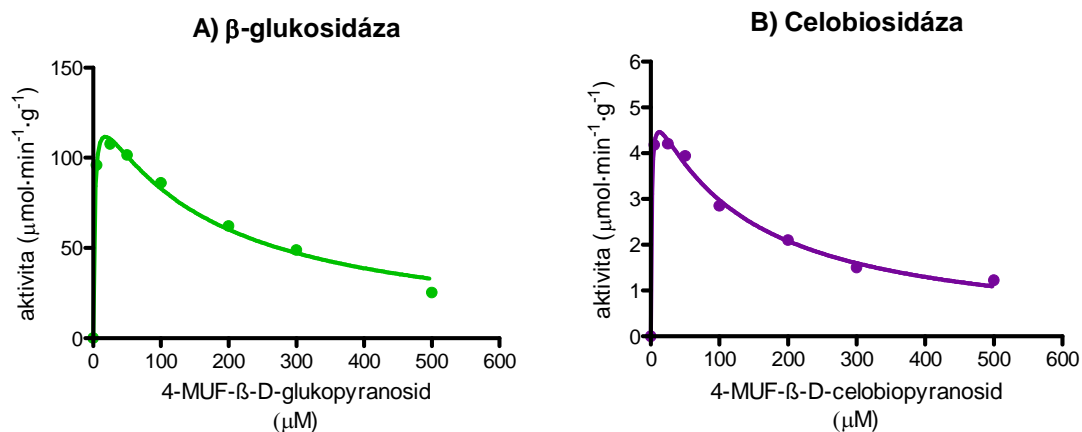


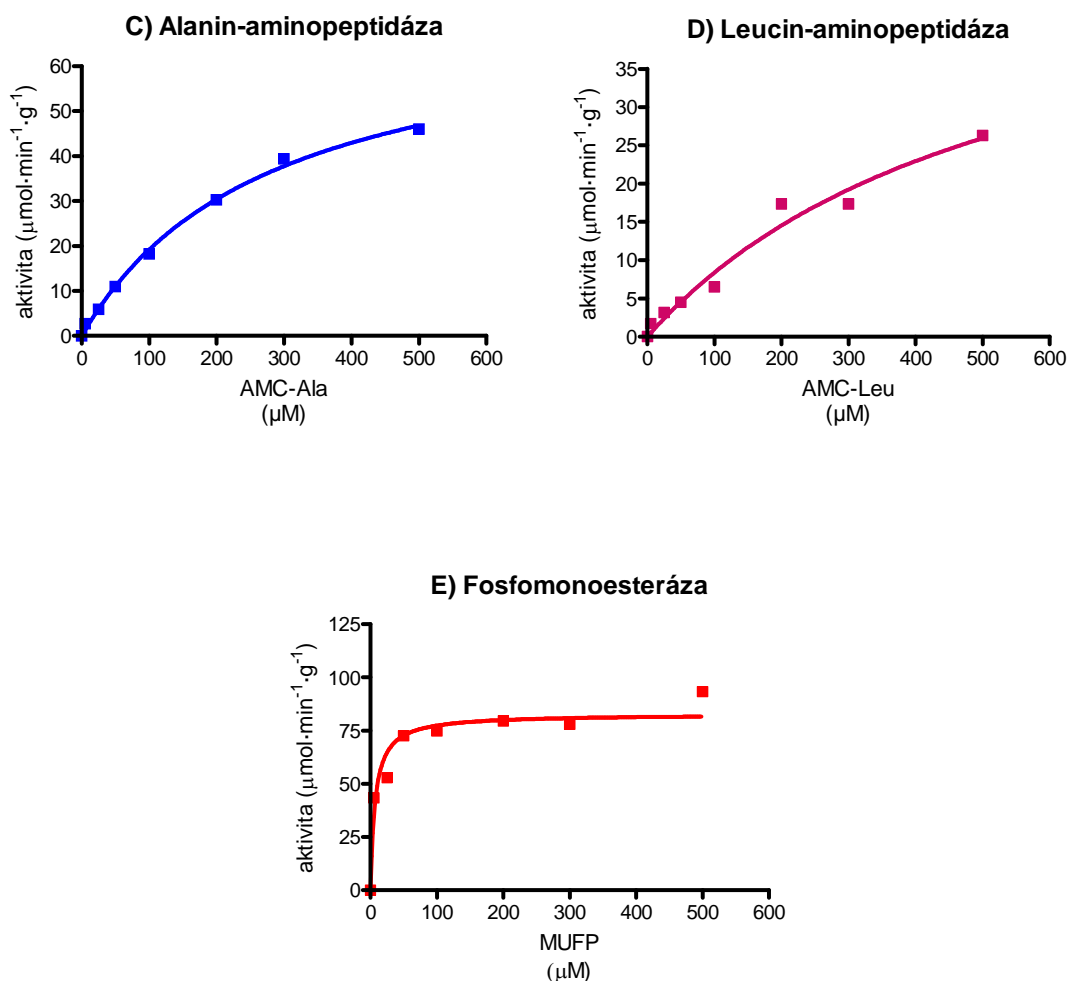


Obr. 2b. Kinetika enzymových reakcí β -glukosidázy (A), celobiosidázy (B), alanin-aminopeptidázy (C), leucin-aminopeptidázy (D) a fosfomonoesterázy (E) v humusovém (2-5 cm) půdním horizontu.

	půdní horizont	V_{max}	K_m	K_I
β -glukosidáza		137,0	2,025	158,5
Celobiosidáza		5,305	1,155	130,0
Alanin-aminopeptidáza	A (5-10 cm)	73,16	281,5	
Leucin-aminopeptidáza		54,45	549,7	
Fosfomonoesteráza		82,76	6,924	

Tab. 2c. Kinetické parametry V_{max} , K_m a inhibiční konstanta K_I pro jednotlivé enzymy hlubším (5-10 cm) humusovém půdním horizontu.





Obr. 2c. Kinetika enzymových reakcí β -glukosidázy (A), celobiosidázy (B), alanin-aminopeptidázy (C), leucin-aminopeptidázy (D) a fosfomonoesterázy (E) v hlubším (5-10 cm) humusovém půdním horizontu.

3.3.5 Měření aktivity enzymů v půdách PLH, CTH

Aktivita pěti studovaných enzymů byla měřena v jednotlivých půdních horizontech (0 - 2 cm; 2 - 5 cm; 5 - 10 cm) horních výzkumných ploch povodí Plešného (PLH) a Čertova (CTH) jezera. Na základě předchozího měření kinetiky byly zvoleny vhodné koncentrace (finální) jednotlivých substrátů: pro fosfomonoesterázu 500 μ M, pro celobiosidázu 50 μ M, pro β -glukosidázu 100 μ M (opadový horizont) a 50 μ M (humusové horizonty), pro leucin-aminopeptidázu a alanin-aminopeptidázu 300 μ M.

Nejdříve bylo napipetováno 40 µl jednotlivých substrátů (MUF; AMC) o výše uvedených koncentracích a 200 µl půdního extraktu do příslušných jamek mikrodestičky. Současně probíhala kalibrace s 40 µl standardů AMC (50, 25, 5 µM) a MUF (50, 25 µM) a 200 µl půdního extraktu. Do jamek, které měly sloužit jako negativní kontrola, bylo napipetováno 200 µl půdního extraktu a 40 µl redestilované vody. Fluorescence byla měřena během 13 kinetických cyklů každých 5 minut při teplotě 30°C.

3.3.6 Měření aktivity enzymů pod jednotlivými typy podrostu

Aktivita pěti sledovaných enzymů byla měřena v jednotlivých půdních horizontech pod dominantními druhy rostlinného podrostu brusnicí borůvkou (*Vaccinium myrtillus*), metličkou křivolakou (*Avenella flexuosa*) a opadem jehličí smrku ztepilého (*Picea abies*) horní výzkumné plochy povodí Plešného jezera. Uspořádání analýzy bylo stejné jako v kapitole 3.3.5.

3.3.7 Měření teplotní závislosti enzymů

Fluorescence byla měřena v časových intervalech 5 minut, 1 hodina a 2 hodiny inkubace půdní suspenze s příslušnými substráty (Tab. 1) za konstantní teploty (0°C, 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C). Uspořádání analýzy bylo stejné jako v kapitole 3.3.5. Aktivita pěti sledovaných enzymů byla proměřena pro jednotlivé půdní horizonty (0 - 2 cm; 2 - 5 cm; 5 - 10 cm) horní výzkumné plochy povodí Plešného jezera. Na základě teplotní závislosti aktivity enzymů (β-glukosidázy, fosfomonoesterázy) byl použit linearizovaný Arrheniovský model pro výpočet jich aktivační energie a kolizní frekvence:

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}$$

<i>k</i>	rychlostní konstanta (aktivita enzymu)
<i>A</i>	kolizní frekvence (min^{-1})
<i>e</i>	Eulerovo číslo (základ přirozeného logaritmu)
<i>E_a</i>	aktivační energie ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$)
<i>R</i>	plynová konstanta (8,314)
<i>T</i>	teplota (K)

Linearizovaný tvar Arrheniovy rovnice:

$$\ln k) = \ln(A) - \frac{Ea}{R} \left(\frac{1}{T} \right)$$

Výpočet aktivační energie (Ea):

$$Ea = -R \cdot slope$$

slope směrnice přímky

3.4 Stanovení suché hmotnosti půdy (sušiny)

Suchá hmotnost půdy je bezrozměrné číslo, které určuje podíl suché půdy na hmotnosti 1 g čerstvého vzorku. Do předem zvážené váženky byly přidány zhruba 4 g půdního vzorku a zváženy spolu s váženkou. Poté byly vysušeny do konstantní hmotnosti (3 hodiny při 105°C) a opět zváženy.

Výpočet suché hmotnosti půdy (s):

$$s = \frac{(m_s - m_v)}{(m_1 - m_v)}$$

m_s hmotnost váženky se suchou půdou po vysušení (g)

m_v hmotnost váženky (g)

m_1 hmotnost váženky s vlhkou půdou před vysušením (g)

3.5 Analýza chemického složení půdy

Byla provedena analýza chemického složení půdy CTH a PLH pod jednotlivými typy dominantních druhů rostlinného podrostu (*Avenella flexuosa*, *Vaccinium myrtillus*) a opadu jehličí (*Picea abies*).

3.5.1 Celkový obsah uhlíku (C_{TOT}) a dusíku (N_{TOT})

Vzorky půdy byly vysušeny na vzduchu a namlety na kulovém mlýně na velmi jemné částičky. Půdního vzorku z opadového (0 - 2 cm) a humusového (2 - 5 cm) horizontu bylo naváženo přibližně 7 mg a z hlubšího humusového horizontu (5 - 10 cm) přibližně 10 mg. Pomocí elementárního analyzátoru (Elementar Analysensysteme GmbH, Germany) byl stanoven C_{TOT} a N_{TOT} .

3.5.2 Celkový obsah fosforu (P_{TOT})

Ke 2,5 mg jemně mletého vzorku bylo přidáno 0,25 ml koncentrované HNO_3 a umístěno do mineralizačního bloku (30 minut, $115^\circ C$). Po zchladnutí se přidalo 0,6 ml zředěné $HClO_4$ a vložilo zpět do bloku (2 hodiny, $165^\circ C$). Po zchladnutí se přidalo 10 ml redestilované vody a hydrolyzovalo se 1 hodinu ($100^\circ C$). Z odstátého vzorku se odebral alikvotní podíl (2 ml) a přidala se zředěná $HClO_4$ (8 ml). Celkový obsah fosforu se následně stanovil spektrofotometricky pomocí FIA (Flow Injection Analyzer, Foss Tecator, Sweden).

3.5.3 Obsah rozpustných forem uhlíku (C_{EXT}) a dusíku (N_{EXT})

Do NTS lahví bylo naváženo 5 g půdy a přidáno 50 ml destilované vody. Následovalo třepání půdních vzorků (1 hodina) a centrifugace (10 minut). Poté byly přefiltrovány přes skleněný filtrační papír. U vzniklých půdních výluhů byly stanoveny koncentrace rozpustného uhlíku (C_{EXT}) a dusíku (N_{EXT}) pomocí TOC/TN analyzátoru (LiquiTOC II, Elementar, Germany) a minerální formy dusíku (NH_4^+ , NO_3^-) pomocí FIA (Flow Injection Analyzer, Foss Tecator, Sweden).

3.6 Zpracování dat

Data byla zpracována v programu Microsoft Excel (grafické výstupy, průměry a směrodatné odchylky). Ke statistickému zhodnocení dat byl použit program Statistika 9.1 pro Windows. One-way Anova s následným Tukey post-hoc testem byla použita na zhodnocení signifikantnosti rozdílu mezi aktivitami sledovaných enzymů v půdách povodí PLH, CTH a druhy podrostu a opadu v jednotlivých půdních horizontech PLH.

4. Výsledky

4.1 Vliv povodí na aktivitu enzymů

4.1.1 Chemické složení půdy povodí Plešného a Čertova jezera

Půdy horních výzkumných ploch povodí Plešného (PLH) a Čertova (CTH) jezera měly podobné chemické složení (Tab. 3a, 3b). Půdní vzorky byly v povodí obou jezer odebrány pod podrostem metličky (*Avenella flexuosa*). Pro většinu chemických charakteristik nebyly zjištěny mezi jednotlivými půdními horizonty povodí obou jezer statisticky významné rozdíly. Průkazně vyšší byl celkový obsah extrahovatelného uhlíku (C_{EXT}) v opadovém (O) a humusovém (A1) horizontu CTH v porovnání s odpovídajícími horizonty PLH. Stejně jako v případě vyššího obsahu amonných iontů (NH_4^+) v humusovém horizontu CTH. Poměr rozpuštěného organického (DON) a minerálního (DIN) dusíku DON/DIN byl průkazně vyšší v hlubším (A2) humusovém horizontu CTH. Při porovnání jednotlivých půdních horizontů povodí obou jezer byl patrný obecný trend v poklesu obsahu chemických parametrů spolu s hloubkou půdního profilu.

	N_{TOT} mg·g ⁻¹	C_{TOT} mg·g ⁻¹	P_{TOT} mg·g ⁻¹	C_{EXT} mg·g ⁻¹	N_{EXT} mg·g ⁻¹	NH_4^+ mg·g ⁻¹	NO_3^- mg·g ⁻¹
PLH O	19,56^a (0,44)	446,50^a (26,32)	0,91^a (0,27)	0,92^a (0,21)	0,59^a (0,19)	0,23^a (0,10)	0,29^a (0,05)
CTH O	20,22^a (0,22)	453,12^a (22,45)	0,86^a (0,06)	1,91^b (0,35)	0,60^a (0,30)	0,34^a (0,11)	0,17^a (0,13)
PLH A1	17,12^a (4,03)	374,75^a (25,73)	1,02^a (0,57)	0,65^a (0,04)	0,32^a (0,11)	0,09^a (0,01)	0,20^a (0,06)
CTH A1	17,00^a (3,70)	378,64^a (95,53)	1,00^a (0,05)	0,86^b (0,09)	0,42^a (0,02)	0,18^b (0,01)	0,19^a (0,04)
PLH A2	13,83^a (5,29)	275,17^a (130,05)	1,12^a (0,54)	0,37^a (0,20)	0,16^a (0,06)	0,02^a (0,01)	0,13^a (0,04)
CTH A2	13,20^a (5,04)	260,25^a (103,70)	1,26^a (0,06)	0,40^a (0,20)	0,23^a (0,11)	0,07^a (0,04)	0,13^a (0,04)

Tab. 3a. Chemické složení opadového (O) (0-2 cm), humusového (A1) (2-5 cm) a hlubšího humusového (A2) (5-10 cm) půdního horizontu horní výzkumné plochy povodí Plešného (PLH) a Čertova (CTH) jezera ($n = 3$, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, odlišná písmena u hodnot označují signifikantní rozdíly, $p < 0,05$).

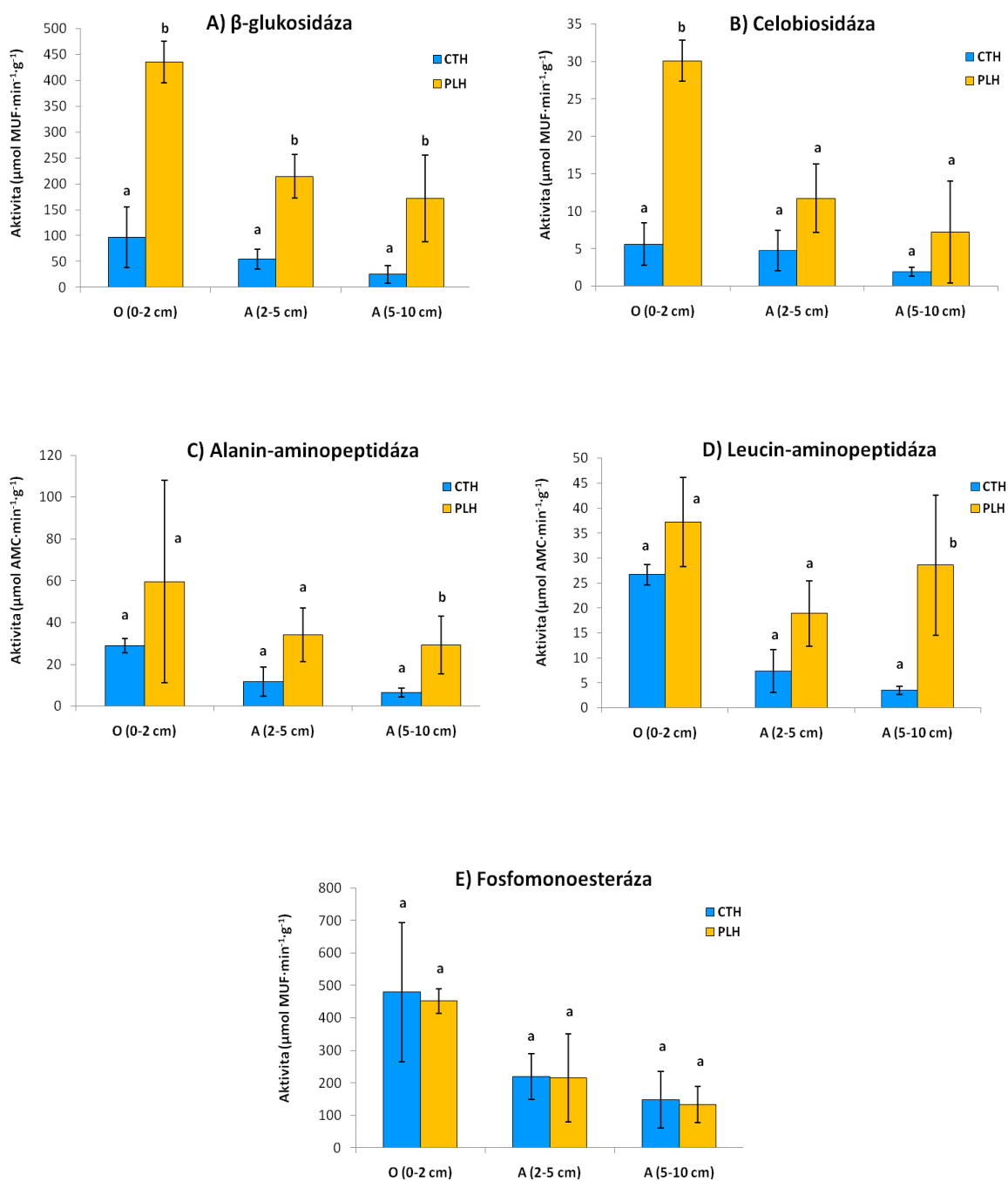
	DIN mg·g ⁻¹	DON mg·g ⁻¹	C _{TOT} /N _{TOT}	C _{EXT} /N _{EXT}	DON/DIN
PLH O	0,52^a (0,14)	0,07^a (0,06)	26,62^a (1,12)	1,89^a (0,37)	0,13^a (0,08)
CTH O	0,52^a (0,24)	0,08^a (0,06)	26,13^a (1,02)	5,15^a (4,29)	0,14^a (0,08)
PLH A1	0,28^a (0,07)	0,04^a (0,04)	26,27^a (5,02)	2,59^a (0,98)	0,12^a (0,10)
CTH A1	0,37^a (0,05)	0,04^a (0,04)	25,84^a (1,06)	2,43^a (0,34)	0,13^a (0,11)
PLH A2	0,15^a (0,05)	0,01^a (0,01)	22,90^a (3,75)	2,66^a (0,52)	0,04^a (0,06)
CTH A2	0,20^a (0,09)	0,04^a (0,02)	22,87^a (0,66)	1,94^a (0,53)	0,19^b (0,01)

Tab. 3b. Chemické složení opadového (O) (0-2 cm), humusového (A1) (2-5 cm) a hlubšího humusového (A2) (5-10 cm) půdního horizontu horní výzkumné plochy povodí Plešného (PLH) a Čertova (CTH) jezera ($n = 3$, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, odlišná písmena u hodnot označují signifikantní rozdíly, $p < 0,05$).

4.1.2 Aktivita enzymů v půdách povodí Plešného a Čertova jezera

V půdách povodí PLH byla celkově vyšší aktivita **β -glukosidázy, celobiosidázy, alanin-aminopeptidázy a leucin-aminopeptidázy** oproti půdám CTH (Obr. 3). S výjimkou aktivity **fosfomonoesterázy**, která byla v jednotlivých půdních horizontech povodí obou jezer srovnatelná. Aktivita β -glukosidázy byla průkazně vyšší ve všech třech půdních horizontech PLH (Obr. 3). Aktivita celobiosidázy dosahovala prokazatelně nejvyšších hodnot v opadovém horizontu PLH. V případě alanin-aminopeptidázy a leucin-aminopeptidázy byla jejich aktivita vyšší v hlubším humusovém (5-10 cm) horizontu PLH oproti CTH (Obr. 3).

Obecně byl patrný pro obě povodí trend poklesu aktivity enzymů spolu s hloubkou půdního profilu. Celkově nejvyšších hodnot dosahovaly aktivity β -glukosidázy a fosfomonoesterázy. Nejnižší aktivita byla naměřena u celobiosidázy. Aktivita alanin-aminopeptidázy a leucin-aminopeptidázy byla řádově stejná.



Obr. 3. Aktivita enzymů β -glukosidázy (A), celobiosidázy (B), alanin-aminopeptidázy (C), leucin-aminopeptidázy (D) a fosfomonoesterázy (E) v jednotlivých půdních horizontech horní výzkumné plochy povodí Plešného (PLH) a Čertova (CTH) jezera ($n = 3$, chybové úsečky znázorňují S.D., odlišná písmena označují signifikantní rozdíly, $p < 0,05$).

V půdách povodí PLH nejsilněji korelovala ($p < 0,001$) aktivita fosfomonoesterázy s obsahem dusičnanových iontů (NO_3^-) a aktivita β -glukosidázy s obsahem rozpuštěného minerálního dusíku (DIN) (Tab. 4). Dále korelovala ($p < 0,01$) aktivita fosfomonoesterázy s celkovým obsahem extrahovatelného dusíku (N_{EXT}), DIN a aktivita β -glukosidázy s celkovým obsahem extrahovatelného uhlíku (C_{EXT}), N_{EXT} , NH_4^+ a NO_3^- . Aktivita celobiosidázy korelovala ($p < 0,01$) s celkovým obsahem uhlíku (C_{TOT}), C_{EXT} , N_{EXT} , NO_3^- a DIN (Tab. 4). Pro tyto enzymy byly nalezeny další slabší korelace ($p < 0,05$) s chemickými charakteristikami (Tab. 4). Negativně korelovala aktivita fosfomonoesterázy s poměrem $\text{C}_{\text{EXT}}/\text{N}_{\text{EXT}}$ (Tab. 4). V případě aktivity alanin-aminopeptidázy a leucin-aminopeptidázy nebyla nalezena žádná průkazná vazba s chemickými charakteristikami (Tab. 4).

V půdách povodí CTH nejsilněji korelovala ($p < 0,001$) aktivita alanin-aminopeptidázy s obsahem C_{EXT} , s níž korelovaly ($p < 0,01$; $0,05$) i zbylé enzymy (Tab. 5). S celkovým obsahem fosforu (P_{TOT}) negativně korelovaly ($p < 0,01$; $0,05$) všechny studované enzymy. Negativní korelace byla také nalezena mezi aktivitou celobiosidázy a poměrem DON/DIN (Tab. 5). Poměr $\text{C}_{\text{EXT}}/\text{N}_{\text{EXT}}$ průkazně ovlivňoval aktivitu β -glukosidázy, celobiosidázy a fosfomonoesterázy. Aktivita alanin-aminopeptidázy korelovala ($p < 0,01$; $0,05$) s obsahem NH_4^+ a leucin-aminopeptidázy s obsahem N_{EXT} , NH_4^+ a DIN (Tab. 5).

	β -glukosidáza	Celobiosidáza	Ala-aminopeptidáza	Leu-aminopeptidáza	Fosfomonoesteráza
N_{TOT}	<i>ns</i>	0,70*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,78*
C_{TOT}	0,75*	0,81**	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,74*
P_{TOT}	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
C_{EXT}	0,88**	0,81**	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,74*
N_{EXT}	0,89**	0,84**	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,87**
NH_4^+	0,89**	0,79*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,78*
NO_3^-	0,87**	0,88**	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,93***
DIN	0,91***	0,86**	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,87**
DON	0,74*	0,67*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,76*
$\text{C}_{\text{TOT}}/\text{N}_{\text{TOT}}$	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
$\text{C}_{\text{EXT}}/\text{N}_{\text{EXT}}$	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	- 0,69*
DON/DIN	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Tab. 4. Korelační koeficienty mezi chemickým složením půdy horní výzkumné plochy povodí Plešného (PLH) jezera a aktivitou enzymů ($n = 9$). Míra signifikance korelací: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; *ns* – nesignifikantní.

	β -glukosidáza	Celobiosidáza	Ala-aminopeptidáza	Leu-aminopeptidáza	Fosfomonoesteráza
N _{TOT}	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
C _{TOT}	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
P _{TOT}	- 0,70*	- 0,73*	- 0,83**	- 0,81**	- 0,72*
C _{EXT}	0,80**	0,67*	0,90***	0,90**	0,86**
N _{EXT}	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,72*	<i>ns</i>
NH ₄ ⁺	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,78*	0,89**	<i>ns</i>
NO ₃ ⁻	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
DIN	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,73*	<i>ns</i>
DON	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
C _{TOT} /N _{TOT}	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
C _{EXT} /N _{EXT}	0,89**	0,72*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,87**
DON/DIN	<i>ns</i>	- 0,67*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Tab. 5. Korelační koeficienty mezi chemickým složením půdy horní výzkumné plochy povodí Čertova (CTH) jezera a aktivitou enzymů ($n = 9$). Míra signifikance korelací: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; *ns* – nesignifikantní.

4.2 Vliv podrostu povodí Plešného jezera na aktivitu enzymů

4.2.1 Chemické složení půdy pod jednotlivými druhy podrostu

Při porovnání chemického složení **opadových (O)** horizontů pod jednotlivými druhy podrostu PLH byl nalezen průkazně vyšší obsah N_{TOT} pod podrostem metličky (*Avenella flexuosa*) oproti borůvčí (*Vaccinium myrtillus*) (Tab. 6a). Na druhou stranu byl pod podrostem metličky v tom samém půdním horizontu významně nižší poměr C_{TOT}/N_{TOT} a DON/DIN (Tab. 6b). Opadový horizont pod opadem jehličí (*Picea abies*) obsahoval celkově méně N_{EXT}, DIN, zanedbatelné množství NO₃⁻, ale vyšší poměr C_{EXT}/N_{EXT} (Tab. 6a, 6b). Pod podrostem borůvčí byl průkazně vyšší obsah DON (Tab. 6b).

V **humusovém (A1)** horizontu pod opadem jehličí byl zjištěn průkazně vyšší obsah C_{TOT} v porovnání s metličkou a vyšší obsah C_{EXT} oproti borůvčí. Naopak obsahoval ze tří uvedených horizontů (A1) nejméně N_{EXT}, NO₃⁻, DIN a měl nejvyšší poměr C_{EXT}/N_{EXT} (Tab. 6a, 6b). Humusový (A1) horizont pod podrostem borůvčí obsahoval více DON než pod jehličím. Ze všech horizontů (A1) zde byl nejvyšší poměr DON/DIN (Tab. 6b).

Hlubší **humusový (A2)** horizont pod opadem jehličí obsahoval celkově více C_{EXT} , C_{EXT}/N_{EXT} a nejméně NO_3^- (Tab. 6a, 6b). Dále zde byl vyšší obsah NH_4^+ v porovnání s borůvčí a vyšší poměr C_{TOT}/N_{TOT} oproti metličce (Tab. 6a, 56). V horizontu (A2) pod metličkou byl v porovnání s jehličím vyšší obsah DIN (Tab. 6a, 6b).

	N_{TOT} $mg \cdot g^{-1}$	C_{TOT} $mg \cdot g^{-1}$	P_{TOT} $mg \cdot g^{-1}$	C_{EXT} $mg \cdot g^{-1}$	N_{EXT} $mg \cdot g^{-1}$	NH_4^+ $mg \cdot g^{-1}$	NO_3^- $mg \cdot g^{-1}$
borůvčí O	16,91^a (1,19)	464,63^a (40,46)	0,73^a (0,05)	0,79^a (0,06)	0,79^a (0,05)	0,28^a (0,01)	0,33^a (0,05)
jehličí O	18,25^{ab} (0,70)	479,89^a (3,51)	0,77^a (0,05)	1,90^a (0,96)	0,20^b (0,08)	0,15^a (0,07)	0,00^b (0,00)
metlička O	19,56^b (0,44)	446,50^a (26,32)	0,91^a (0,27)	0,92^a (0,21)	0,59^a (0,19)	0,23^a (0,10)	0,29^a (0,05)
borůvčí A1	16,42^a (2,05)	420,24^{ab} (53,34)	0,75^a (0,06)	0,49^a (0,06)	0,30^a (0,09)	0,05^a (0,02)	0,17^a (0,05)
jehličí A1	17,35^a (0,53)	475,49^b (4,81)	0,68^a (0,07)	0,73^b (0,13)	0,07^b (0,03)	0,06^a (0,02)	0,00^b (0,00)
metlička A1	17,12^a (4,03)	374,75^a (25,73)	1,02^a (0,57)	0,65^{ab} (0,04)	0,32^a (0,11)	0,09^a (0,01)	0,20^a (0,06)
borůvčí A2	13,33^a (1,81)	325,13^a (86,84)	0,64^a (0,01)	0,32^a (0,13)	0,16^a (0,07)	0,01^a (0,01)	0,11^a (0,05)
jehličí A2	15,09^a (0,93)	458,14^a (22,88)	0,59^a (0,01)	0,77^b (0,07)	0,04^a (0,01)	0,03^b (0,00)	0,00^b (0,00)
metlička A2	13,83^a (5,29)	275,17^a (130,05)	1,12^a (0,54)	0,37^a (0,20)	0,16^a (0,06)	0,02^{ab} (0,01)	0,13^a (0,04)

Tab. 6a. Chemické složení opadového (O) (0-2 cm), humusového (A1) (2-5 cm) a hlubšího humusového (A2) (5-10 cm) půdního horizontu pod jednotlivými druhy podrostu horní výzkumné plochy povodí Plešného (PLH) jezera ($n = 3$, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, odlišná písmena u hodnot označují signifikantní rozdíly, $p < 0,05$).

	DIN mg·g ⁻¹	DON mg·g ⁻¹	C _{TOT} /N _{TOT}	C _{EXT} /N _{EXT}	DON/DIN
borůvčí O	0,61^a (0,05)	0,18^b (0,00)	32,06^a (2,05)	1,17^a (0,09)	0,29^a (0,03)
jehličí O	0,16^b (0,07)	0,05^a (0,02)	30,70^a (0,97)	10,70^b (1,66)	0,31^a (0,02)
metlička O	0,52^a (0,14)	0,07^a (0,06)	26,62^b (1,12)	1,89^a (0,37)	0,13^b (0,08)
borůvčí A1	0,21^a (0,06)	0,09^b (0,03)	29,86^a (0,73)	2,00^a (0,65)	0,41^b (0,08)
jehličí A1	0,06^b (0,02)	0,01^a (0,01)	31,99^a (0,71)	12,57^b (3,58)	0,13^a (0,07)
metlička A1	0,28^a (0,07)	0,04^{ab} (0,04)	26,27^a (5,02)	2,59^a (0,98)	0,12^a (0,10)
borůvčí A2	0,12^{ab} (0,05)	0,04^a (0,02)	28,13^{ab} (3,52)	2,38^a (0,11)	0,36^a (0,05)
jehličí A2	0,03^a (0,00)	0,01^a (0,01)	35,46^b (1,47)	21,32^b (3,54)	0,32^a (0,32)
metlička A2	0,15^b (0,05)	0,01^a (0,01)	22,90^a (3,75)	2,66^a (0,52)	0,04^a (0,06)

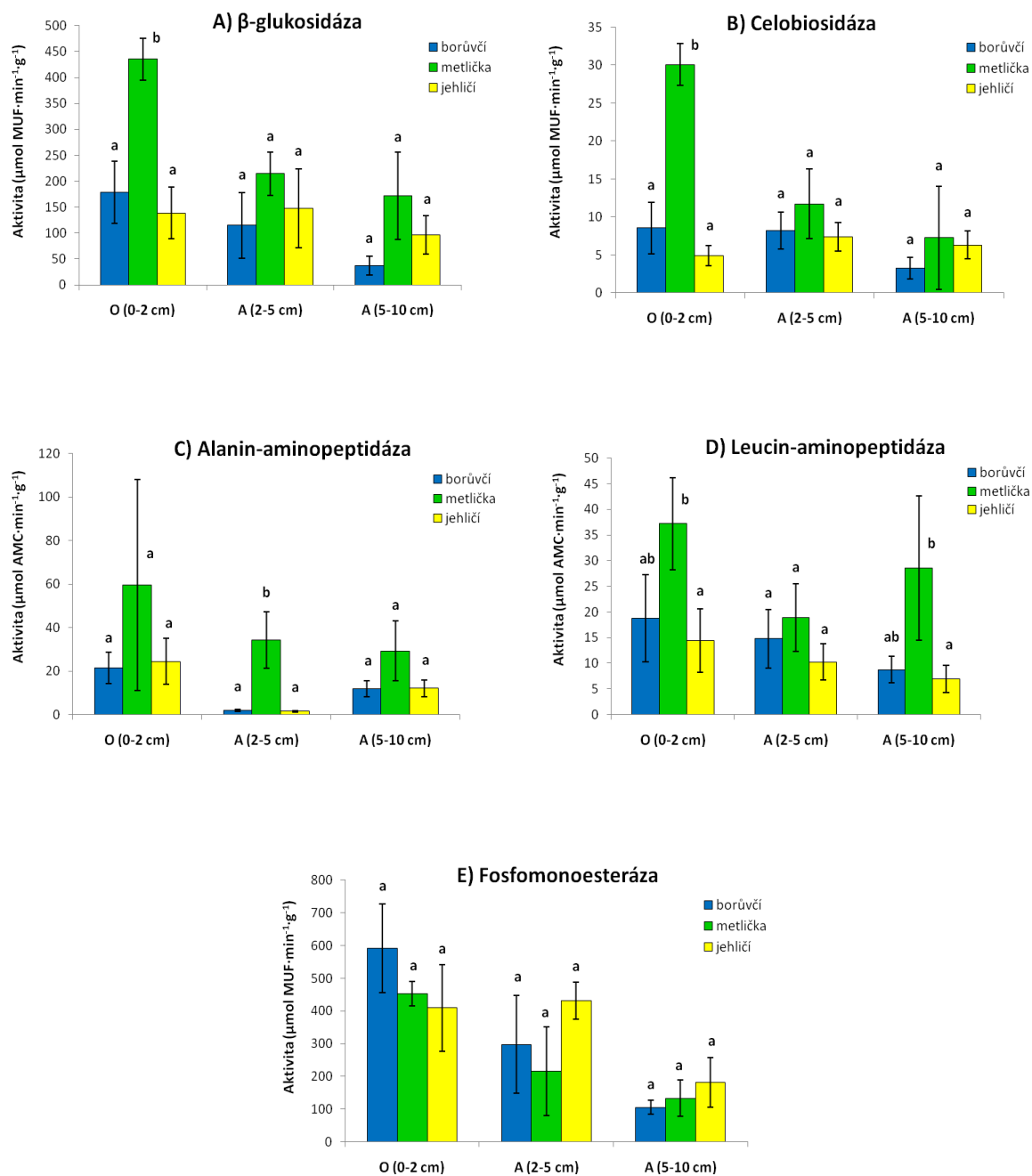
Tab. 6b. Chemické složení opadového (O) (0-2 cm), humusového (A1) (2-5 cm) a hlubšího humusového (A2) (5-10 cm) půdního horizontu pod jednotlivými druhy podrostu horní výzkumné plochy povodí Plešného (PLH) jezera ($n = 3$, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky, odlišná písmena u hodnot označují signifikantní rozdíly, $p < 0,05$).

4.2.2 Aktivita enzymů v půdě pod jednotlivými druhy podrostu

Celkově nejvyšší aktivity dosahovaly enzymy β -glukosidáza, celobiosidáza, alanin-aminopeptidáza a leucin-aminopeptidáza v půdních horizontech pod podrostem metličky (Obr. 4). Výjimku tvořila fosfomonoesteráza, jejíž aktivita byla v půdních horizontech pod jednotlivými druhy studovaného podrostu srovnatelná. Nejvyšších hodnot dosahovaly prokazatelně aktivity β -glukosidázy a fosfomonoesterázy. Nejnižší aktivita byla naměřena u celobiosidázy. Aktivita alanin-aminopeptidázy a leucin-aminopeptidázy byla řádově stejná.

Aktivita **β -glukosidázy** a **celobiosidázy** byla průkazně nejvyšší v opadovém horizontu pod podrostem metličky. Hodnoty jejich aktivit ve zbylých půdních horizontech pod dalšími druhy podrostu nevykazovaly žádné statisticky významné rozdíly (Obr. 4). **Alanin-aminopeptidáza** dosahovala průkazně nejvyšší aktivity, v rámci humusových (2-5 cm) horizontů, pod podrostem metličky. Aktivita **leucin-aminopeptidázy** byla průkazně vyšší v opadovém a hlubším (5-10 cm) humusovém horizontu pod podrostem metličky ve srovnání

s jehličím (Obr. 4). Žádné statisticky významné rozdíly nebyly nalezeny pro aktivitu fosfomonoesterázy v půdních horizontech pod jednotlivými druhy podrostu (Obr. 4).



Obr. 4. Aktivita enzymů β -glukosidázy (A), celobiosidázy (B), alanin-aminopeptidázy (C), leucin-aminopeptidázy (D) a fosfomonoesterázy (E) v půdních horizontech horní výzkumné plochy povodí Plešného jezera pod jednotlivými druhy podrostu ($n = 3$, chybové úsečky znázorňují S.D., odlišná písmena označují signifikantní rozdíly, $p < 0,05$).

Byla nalezena silná korelace ($p < 0,001$) mezi aktivitou fosfomonoesterázy a obsahem N_{EXT} , NH_4^+ , DIN a DON. Aktivita tohoto enzymu také korelovala ($p < 0,01$) s obsahem C_{TOT} , N_{TOT} , C_{EXT} (Tab. 7). Silná korelace byla také mezi obsahem NH_4^+ , DIN a aktivitou β -glukosidázy, slabší potom ($p < 0,01$) s obsahem N_{TOT} , N_{EXT} a NO_3^- . Aktivita celobiosidázy korelovala ($p < 0,01$) s obsahem N_{TOT} , N_{EXT} , NO_3^- , NH_4^+ a DIN (Tab. 7). Negativní korelace byla nalezena mezi aktivitou alanin-aminopeptidázy a poměrem DON/DIN, C_{TOT}/N_{TOT} a leucin-aminopeptidázou a poměrem C_{EXT}/N_{EXT} , DON/DIN (Tab. 7). Leucin-aminopeptidáza korelovala ($p < 0,01$) s obsahem NO_3^- (Tab. 7).

	β -glukosidáza	Celobiosidáza	Ala-aminopeptidáza	Leu-aminopeptidáza	Fosfomonoesteráza
N_{TOT}	0,52**	0,58**	<i>ns</i>	0,41*	0,57**
C_{TOT}	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,60**
P_{TOT}	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
C_{EXT}	0,41*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,54**
N_{EXT}	0,57**	0,52**	<i>ns</i>	0,40*	0,64***
NH_4^+	0,62***	0,53**	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,74***
NO_3^-	0,58**	0,56**	<i>ns</i>	0,50**	0,44*
DIN	0,64***	0,59**	<i>ns</i>	0,47*	0,62***
DON	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	0,63***
C_{TOT}/N_{TOT}	<i>ns</i>	<i>ns</i>	- 0,46*	<i>ns</i>	<i>ns</i>
C_{EXT}/N_{EXT}	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	- 0,41*	<i>ns</i>
DON/DIN	<i>ns</i>	<i>ns</i>	- 0,40*	- 0,45*	<i>ns</i>

Tab. 7. Korelační koeficienty mezi chemickým složením půdy horní výzkumné plochy povodí Plešného jezera pod dominantními druhy podrostu a aktivitou enzymů ($n = 27$). Míra signifikance korelací: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; *ns* – nesignifikantní.

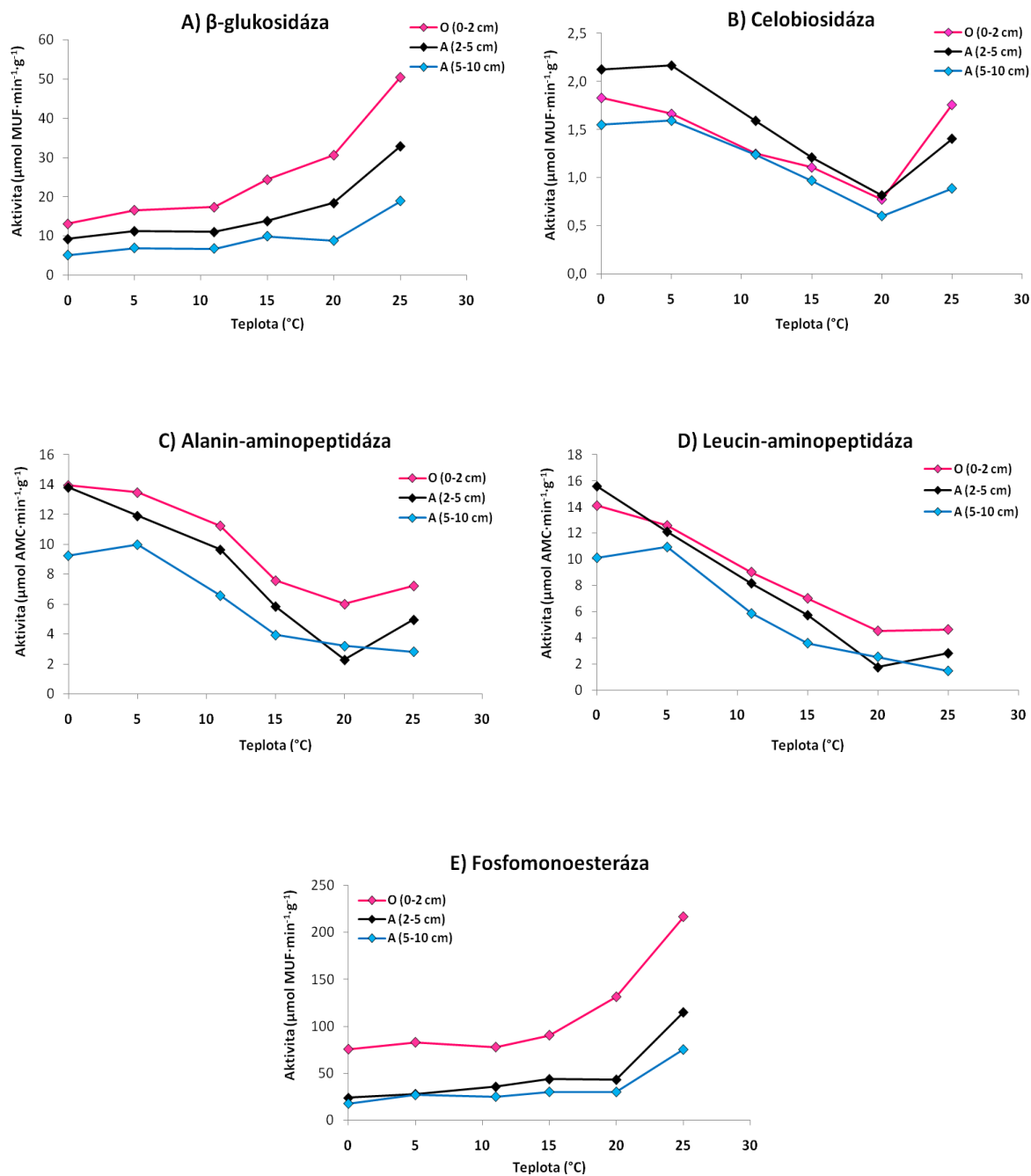
4.3 Vliv teploty na aktivitu enzymů

4.3.1 Teplotní závislost aktivity enzymů v půdách PLH

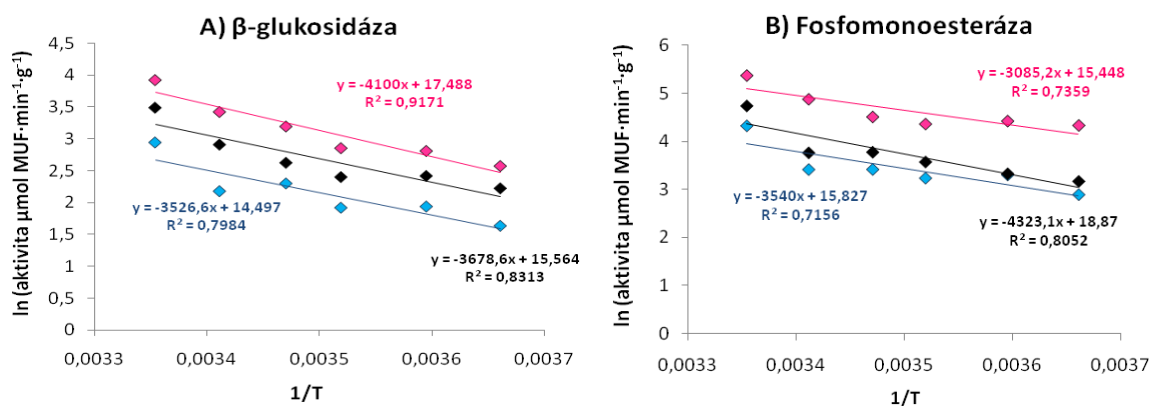
Aktivitu studovaných enzymů v jednotlivých půdních horizontech horní výzkumné plochy povodí Plešného jezera v závislosti na šesti různých teplotách znázorňuje Obr. 5. Průběh aktivity v závislosti na různé teplotě se u jednotlivých enzymů lišil. Teplotní odpověď byla podobná u **β -glukosidázy a fosfomonoesterázy** ve všech půdních horizontech. K výraznému růstu jejich aktivit docházelo mezi 15 a 20°C a nejvyšších hodnot dosahovaly kolem 25°C. Aktivita **celobiosidázy** se výrazně v průběhu teploty neměnila a zůstávala řádově stejná pouze s mírným snížením při teplotě kolem 20°C.

Změny aktivity **alanin-aminopeptidázy a leucin-aminopeptidázy** v závislosti na teplotě se podobně jako u celobiosidázy pohybovaly v řádově stejných jednotkách. V obou případech dosahovaly tyto enzymy nejvyšší aktivity při teplotě 0 až 5°C a s rostoucí teplotou jejich aktivita klesala (Obr. 5). Pro všechny studované enzymy byl patrný obecný trend v poklesu aktivity spolu s hloubkou půdního profilu (Obr. 5). Průměrné hodnoty aktivity jednotlivých enzymů spolu se směrodatnými odchylkami jsou v příloze 1a-e.

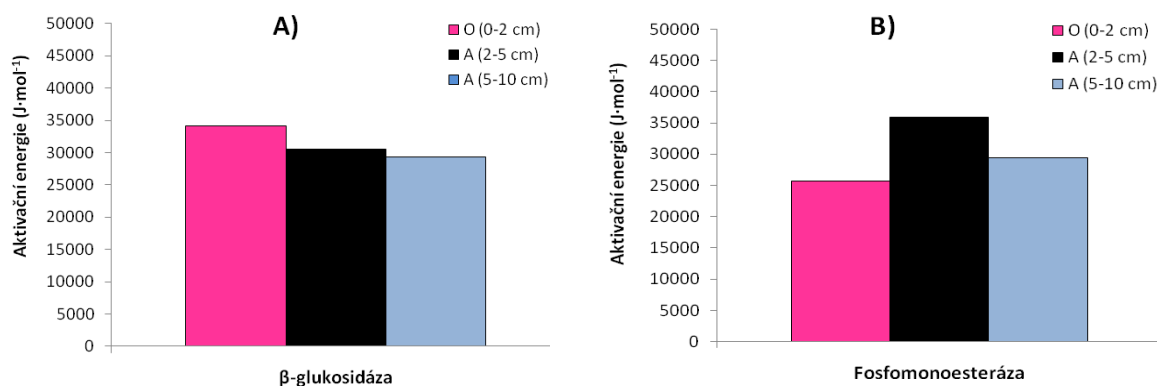
Ze všech enzymů pouze u β -glukosidázy a fosfomonoesterázy docházelo spolu s růstem teploty i k růstu jejich aktivity (Obr. 5). Proto byla pro tyto dva enzymy použita Arrheniova rovnice (linearizovaná forma) (Obr. 6) pro výpočet jejich aktivační energie a kolizní frekvence. Aktivační energie a kolizní frekvence β -glukosidázy klesala spolu s hloubkou půdního profilu (Obr. 7, 8). Oproti fosfomonoesteráze, jejíž aktivační energie a kolizní frekvence byly nejvyšší v humusovém (2-5 cm) půdním horizontu (Obr. 7, 8).



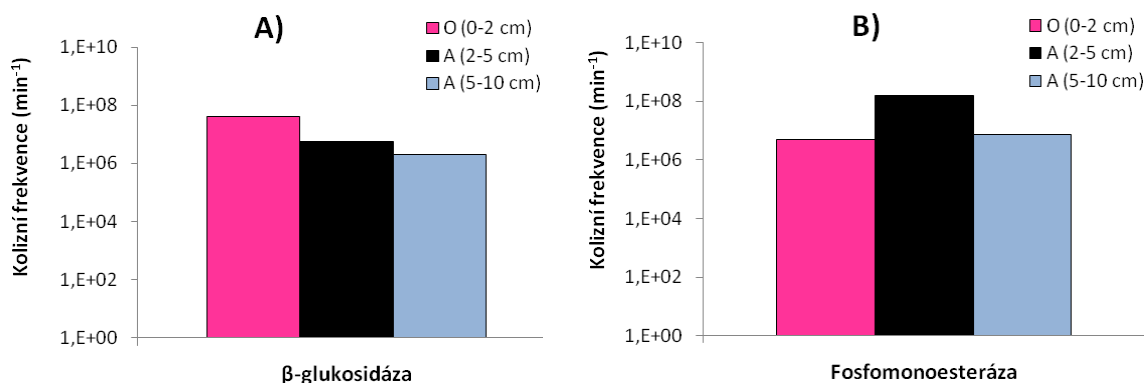
Obr. 5. Aktivita enzymů β -glukosidázy (A), celobiosidázy (B), alanin-aminopeptidázy (C), leucin-aminopeptidázy (D) a fosfomonoesterázy (E) v jednotlivých půdních horizontech horní výzkumné plochy povodí Plešného jezera v závislosti na 6 teplotách ($n = 3$).



Obr. 6. Linearizovaný Arrheniovský model pro výpočet E_a - aktivační energie a A - kolizní frekvence β -glukosidázy (A) a fosfomonoesterázy (B) v jednotlivých půdních horizontech výzkumné plochy povodí Plešného (PLH) jezera ($n = 3$).



Obr. 7. Aktivační energie β -glukosidázy (A) a fosfomonoesterázy (B) v jednotlivých půdních horizontech horní výzkumné plochy povodí Plešného (PLH) jezera ($n = 3$).



Obr. 8. Kolizní frekvence β -glukosidázy (A) a fosfomonoesterázy (B) v jednotlivých půdních horizontech horní výzkumné plochy povodí Plešného (PLH) jezera ($n = 3$).

5. Diskuze

5.1 Vliv povodí na aktivitu enzymů

5.1.1 Chemické složení půdy povodí Plešného a Čertova jezera

Povodí Plešného (PL) a Čertova (CT) jezera jsou vystavena podobným klimatickým podmínkám, ale liší se v podloží a složení půdy, ve stupni saturace dusíkem (N) a schopnosti půdy vázat fosfor (P). Půdy povodí CT jsou kyselejší, saturované N a P akumulující, na rozdíl od povodí PL s čistými ztrátami P a s jeho vyšším vyplavováním z půd povodí (Kopáček et al., 2008). Granity v podloží PL jsou v kyselých podmínkách náchylnější k uvolňování P oproti svorům v povodí CT (Kopáček et al., 1998). Zvýšené vyplavování P z povodí PL může být způsobeno kombinací chemických, biochemických a mikrobiálních procesů (Šantrůčková et al., 2004). Se zvýšeným vyplavováním N z půd obou povodí souvisí zrychlená transformace N, mineralizace a dekompozice (Vaněk, 2004; Skopcová and Šantrůčková, 2006).

Půdní vzorky byly v povodí obou jezer odebírány pod podrostem metličky (*Avenella flexuosa*). Během analýzy chemického složení se půdy povodí obou jezer lišily v několika parametrech. V půdách CTH byl oproti PLH vyšší obsah C_{EXT} v opadovém a humusovém (2-5 cm) horizontu, vyšší obsah NH_4^+ v tomtéž horizontu a vyšší poměr DON/DIN v hlubším (5-10 cm) humusovém horizontu. Zbylé chemické parametry byly v půdách povodí obou jezer ve srovnatelném množství. Korelace aktivit enzymů s chemickými parametry vykazovaly odlišnosti mezi povodími obou jezer. V půdách povodí PLH korelovaly s chemickými parametry pouze aktivity β -glukosidázy, celobiosidázy a fosfomonoesterázy. Pro aktivity alanin-aminopeptidázy a leucin-aminopeptidázy a chemické parametry nebyly nalezeny žádné průkazné korelace. Naproti tomu v půdách povodí CTH všechny enzymy korelovaly jen s několika chemickými parametry a silnější korelace byly nalezeny pro aktivitu alanin-aminopeptidázy a obsah C_{EXT} , NH_4^+ . Leucin-aminopeptidáza korelovala s obsahem C_{EXT} , NH_4^+ , N_{EXT} , DIN.

Celkově vyšší aktivita enzymů a početnější korelace s chemickými parametry byly v půdách PLH oproti CTH. Vyšší aktivity hydrolytických enzymů v lesních půdách (oproti zemědělským) mohou souviset s obsahem půdní organické hmoty (Skujiňš, 1978b; Keeler et al., 2009). V důsledku napadení smrkových porostů povodí obou jezer lýkožroutem

smrkovým došlo v letech 2004 – 2005 k velkému opadu jehličí a celkové disturbanci ekosystémů. V současnosti je především v povodí PLH stromové patro nahrazováno rychle se rozvíjejícím rostlinným podrostem s vysokým zastoupením trav. S tím souvisí množství a kvalita opadu vstupujícího do půdy, která může významně ovlivnit mikrobiální společenstva a chemismus půdy. Trávy mohou sloužit jako důležitý zásobník atmosférického N, některé druhy mohou částečně snížit negativní procesy spojené s půdní acidifikací a působit pozitivně na redukci ztráty živin z půdy (Svoboda et al., 2006). Přidání téměř každé energeticky bohaté organické látky do půdy stimuluje mikrobiální růst a aktivitu mikroorganismů. Vyšší obsah a kvalita půdní organické hmoty může více podporovat biologickou aktivitu, protože se zvýší množství dostupných živin a potřebné energie (Nourbakhsh, 2007). Na základě chemické analýzy obsahů C_{EXT} a N_{EXT} pod podrostem metličky a opadem jehličí však nebyly nalezeny významné rozdíly v obsahu těchto látek.

5.1.2 Aktivita enzymů v půdách povodí Plešného a Čertova jezera

Fosfomonoesteráza

Z našich výsledků vyplývá, že byla celkově vyšší aktivita extracelulárních enzymů v půdách PLH. Výjimku tvořila aktivita fosfomonoesterázy, která byla v jednotlivých půdních horizontech PLH a CTH srovnatelná. Naproti tomu, Šantrůčková et al. (2004) naměřili vyšší fosfatázovou aktivitu v opadovém a humusovém horizontu půdy PLH oproti CTH. To zřejmě ukazuje na posun v dostupnosti živin v půdách Plešného jezera v posledních šesti letech. Vysoká enzymová aktivita může signalizovat limitaci půdy živinami (Sinsabaugh et al., 1991; Allison et al., 2007). Ke zvýšení aktivity fosfatáz dochází obvykle právě v podmínkách snížené dostupnosti P (McGill and Cole, 1981). Vliv půdní acidifikace na rychlost transformací P může vést ke snížení v zásobě P v půdním roztoku a nižší dostupnosti P v kyselých půdách (Carreira et al., 2000). Nárůst aktivity fosfomonoesterázy v půdách v povodí Plešného jezera může být způsoben posunem ve složení aktivního mikrobiálního společenstva a vyššímu rozvoji půdních mikromycet, které dominují právě v kyselých půdách (Harrison, 1983). Navíc v odumřelém lese dochází k vyšším teplotním výkyvům ve svrchních půdních horizontech. Houby mohou být tedy více účinné v získávání P a v jeho začleňování do biomasy než bakterie (Allison et al., 2007).

Analýza chemického složení půdy CTH odhalila negativní korelace mezi aktivitou všech enzymů a obsahem P_{TOT} , na rozdíl od PLH, kde nebyla nalezena žádná průkazná korelace mezi aktivitou enzymů a obsahem P_{TOT} . Speir and Ross (1978) také objevili negativní korelaci mezi aktivitou fosfatázy a obsahem P v půdě. Stejně jako ve výzkumu Naseby et al. (1998) aktivita enzymů zapojených do cyklu P negativně korelovala s množstvím snadno dostupného P. Zvýšená dostupnost rozpustného anorganického P snižuje fosfatázovou aktivitu. Vysvětlením aktuálně srovnatelné aktivity fosfomonoesterázy v půdách povodí obou jezer může být limitace P v půdách CTH, která se projevila na zvýšení aktivity oproti výsledkům předchozího výzkumu Šantrůčkové et al. (2004).

Fosfomonoesteráza korelovala v půdách PLH především s rozpustnými formami N a C (C_{EXT} , N_{EXT}) a slaběji také s C_{TOT} , N_{TOT} . Schopnost půdních mikroorganismů a enzymů zpřístupnit P ze špatně rozpustných forem závisí především na povaze a dostupnosti uhlíkatého materiálu v půdním ekosystému (Alexander, 1977). Aktivita fosfatáz může být podpořena obsahem dostupných forem C a N v půdě (Allison and Vitousek, 2005). Pokud mají půdní mikroorganismy dostatek C a N, mohou syntetizovat ve vyšší míře extracelulární enzymy, umožňující získávat hůře dostupné živiny. Dále byla zjištěna silná korelace fosfomonoesterázy s NH_4^+ , NO_3^- , DIN a DON. To je v souladu s novějšími studiemi, kde po přidavku minerálního N dochází ke stimulaci mikrobiální aktivity. Zároveň se zvyšuje požadavek na C a P, vedoucí ke zvýšení jejich příjmu enzymy (Keeler et al., 2009).

Celulázy

Aktivita β -glukosidázy byla průkazně vyšší ve všech třech půdních horizontech PLH oproti CTH. Půdní vzorky byly v povodí obou jezer odebrány pod podrostem metličky (*Avenella flexuosa*). Na základě analýzy chemického složení půdy PLH byla zjištěna pozitivní korelace aktivity tohoto enzymu s obsahem C_{TOT} , rozpustnými formami N a C (C_{EXT} , N_{EXT} , NH_4^+ , NO_3^- , DIN, DON) a nejsilnější korelace s obsahem DIN. Zatímco v půdách CTH pozitivně korelovala pouze s C_{EXT} a poměrem C_{EXT}/N_{EXT} . Kyselé lesní půdy mohou být chudé na obsah P a je pravděpodobné, že nízká dostupnost P je dalším limitujícím faktorem dekompozice opadu, což může ovlivňovat právě uvolňování DIN (Bárta et al., 2010). Bylo zjištěno, že opad metličky (*Avenella flexuosa*) vyvolává vysokou mikrobiální aktivitu a uvolňování DIN. Opady trav uvolňují akumulovaný dusík ve formě DIN, především ionty NH_4^+ , v počáteční fázi dekompozice a mohou tak dočasně zvýšit tok NH_4^+ do půdy během podzimních a zimních měsíců (Šantrůčková et al., 2006). Půdní vzorky pro naše analýzy byly odebrány právě na podzim, kdy dochází ke zvýšení obsahu rozpustných forem N v půdě.

K rychlému rozvoji tohoto druhu trávy dochází v současné době právě v povodí PL. C_{EXT} a N_{EXT} ze studenovodních extraktů představují sloučeniny, které jsou snadněji dostupné pro další mikrobiální procesy nebo mohou být vymývány do hlubších vrstev půdního profilu (Šantrůčková et al., 2006). Ke zvýšení obsahu C_{EXT} v půdě dochází právě během dekompozice opadu metličky (*Avenella flexuosa*) (Šantrůčková et al., 2006). Námi zjištěnou pozitivní korelaci aktivity β -glukosidázy s C_{EXT} podporují také další výzkumy (Turner et al., 2002; Fontaine et al., 2003). Vyšší obsah dostupného C pravděpodobně vytváří příznivější podmínky pro mikrobiální růst a produkci enzymu (Keeler et al., 2009) podobně jako u fosfomonoesterázy. Tyto poznatky mohou vysvětlovat pozitivní korelaci aktivity β -glukosidázy s uvedenými chemickými parametry půd PLH a prokazatelně vyšší aktivitu ve všech půdních horizontech PLH oproti CTH.

Co se týče korelace aktivity celobiosidázy s chemickými parametry půd povodí obou jezer, byla situace podobná jako u β -glukosidázy. Byla zjištěna pozitivní korelace aktivity tohoto enzymu s obsahem C_{TOT} , N_{TOT} a rozpustnými formami N, C (C_{EXT} , N_{EXT} , NH_4^+ , NO_3^- , DIN, DON) v půdách PLH. To může být ve spojitosti s chemismem opadu trav a dostupnými formami živin (viz výše). Zatímco v půdách CTH pozitivně korelovala pouze s C_{EXT} a poměrem C_{EXT}/N_{EXT} a negativně s poměrem DON/DIN.

Aktivita celobiosidázy dosahovala prokazatelně nejvyšších hodnot v opadovém půdním horizontu PLH, kde měla zřejmě dostatek vhodného substrátu. Patřila ovšem mezi enzymy s celkově nejnižší aktivitou. Ke snížení účinnosti tohoto enzymu může docházet v důsledku zvýšené koncentrace dostupného C_{EXT} , což je vyrovnáváno zvýšenou mikrobiální biomasou (Allison et al., 2007). Lignin může inhibovat syntézu celuláz celulolytickými houbami (Varadi, 1971). Což naše výsledky jednoznačně nepotvrzují.

Proteázy

V případě alanin-aminopeptidázy a leucin-aminopeptidázy byla jejich aktivita vyšší v hlubším humusovém (5-10 cm) horizontu půdy PLH oproti CTH. Celkově vykazovaly obě tyto proteázy nižší aktivitu a nebyla pro ně nalezena žádná průkazná vazba s chemickými parametry v půdách PLH. Z naměřené kinetiky enzymových reakcí těchto dvou enzymů může být možným vysvětlením nižší aktivity nízká afinita k substrátům v porovnání s β -glukosidázou a fosfomonoesterázou. Podle Enowashu et al. (2009) nízké hodnoty aktivit proteáz v půdách smrkových lesů mohou být způsobeny limitací substrátem nebo tím, že upřednostňují dekompozici alternativních zdrojů substrátu. K inhibici aktivity extracelulárních proteáz dochází v půdách, které jsou satureovány minerálním N (Sinsabaugh

et al., 2002). Při vysokém obsahu dostupných živin může dojít k potlačení produkce enzymů a k omezení až zastavení mineralizace (Olander and Vitousek, 2000). To je možné vysvětlení pro nízké aktivity námi sledovaných aminopeptidáz v půdách povodí obou jezer, která jsou saturována N.

Opačná situace byla v půdách povodí CTH, kde korelovaly s chemickými parametry více právě proteázy. Aktivita alanin-aminopeptidázy silně korelovala s obsahem C_{EXT} , slaběji s ionty NH_4^+ . Aktivita leucin-aminopeptidázy slaběji korelovala s obsahem C_{EXT} , N_{EXT} , NH_4^+ a DIN.

Syntéza proteáz mikroorganismy je závislá nejenom na obsahu půdního N, ale i na obsahu C (Geisseler and Horwath, 2008). To odpovídá výzkumu Bastida et al. (2008), kteří našli pozitivní korelaci aktivity β -glukosidázy, proteázy, fosfatázy s obsahem C_{EXT} . C_{EXT} obsahuje nestabilní substráty, které fungují jako energetický zdroj pro mikrobiální metabolismus (Cook and Allan, 1992). Tyto ve vodě extrahovatelné deriváty mohou vzniknout degradací stabilnějších sloučenin SOC v půdě (Campbell and Zentner, 1993) nebo z kořenových exudátů uvolněných rostlinami (Cook and Allan, 1992). Možným vysvětlením korelací těchto enzymů v půdách CTH je, že zde pravděpodobně budou využívat tyto energetické substráty.

Aktivita enzymů v půdním profilu

Obecně byl patrný pro obě povodí trend v poklesu aktivity enzymů spolu s hloubkou půdního profilu. Je známo, že mikrobiální biomasa klesá spolu s hloubkou půdního profilu (Enowashu et al., 2009). To je podpořeno také výzkumem Fierer et al. (2003), kteří dospěli ke stejnému výsledku při průzkumu dvou odlišných půdních profilů. Hlavním důvodem ve snížení mikrobiální biomasy a aktivity enzymů s hloubkou půdního profilu je pokles v dostupnosti substrátu, obsahu živin (N_{TOT} , SOC) a redukovanou kvalitou a množstvím půdní organické hmoty (Ajwa et al., 1998; Fierer et al., 2003; Enowashu et al., 2009). Tyto výsledky svědčí o tom, že mikrobiální biomasa a aktivita enzymů byla nejvyšší v horních vrstvách půdy a klesala s hloubkou půdního profilu (Enowashu et al., 2009), což je dobře patrné na aktivitě β -glukosidázy ve všech třech půdních horizontech PLH. Také při chemické analýze půdních horizontů obou povodí byl patrný pokles v obsahu jednotlivých chemických parametrů spolu s hloubkou půdního profilu.

Nerovnoměrný vstup opadu do půdního profilu kvůli nadzemnímu opadu, který je začleněný na povrchu půdy, odpovídá za vyšší enzymovou aktivitu v 0 - 15 cm, než-li v hlubších vrstvách půdy 15 - 30 cm (Sardans and Peñuelas, 2005). Baldrian et al. (2010b)

zjistili, že aktivita β -glukosidázy a kyselá fosfatázy byla 9-13 krát vyšší v opadovém horizontu půdy.

5.2 Vliv podrostu povodí Plešného jezera na aktivitu enzymů

5.2.1 Chemické složení půdy pod jednotlivými druhy podrostu

Půda pod podrostem metličky (Avenella flexuosa)

V opadovém horizontu pod podrostem metličky byl nalezen průkazně vyšší obsah N_{TOT} proti borůvčí. Trávy mohou sloužit jako důležitý zásobník atmosférického N (Svoboda et al., 2006). Jejich opad obsahuje v porovnání s opadem borůvčí a jehličí vyšší obsah minerálního N a dostupného P (Vaněk, 2008). Zřejmě proto byl v opadovém horizontu pod podrostem metličky vyšší obsah N_{TOT} .

Byl zde také nižší poměr C_{TOT}/N_{TOT} a DON/DIN. Poměr C_{TOT}/N_{TOT} byl nejnižší pod metličkou v hlubším (5-10 cm) humusovém horizontu ve srovnání s jehličím. Hodnota tohoto poměru byla 22. Pokud je v půdách s opadem poměr C/N nižší než 25 dochází buď k významnému vyplavování N, nebo ke zvýšení jeho koncentrace v půdě (Gundersen et al., 1998). V humusovém (2-5 cm) horizontu pod metličkou byl nižší obsah C_{TOT} v porovnání s jehličím. V hlubším (5-10 cm) humusovém horizontu pod metličkou byl v porovnání s jehličím vyšší obsah DIN. Opady trav uvolňují akumulovaný dusík ve formě DIN, především ionty NH_4^+ , v počáteční fázi dekompozice a mohou tak dočasně zvýšit tok NH_4^+ do půdy během podzimních a zimních měsíců (Šantrůčková et al., 2006).

Půda pod opadem jehličí (Picea abies)

Všechny tři půdní horizonty pod opadem jehličí (*Picea abies*) obsahovaly průkazně vyšší poměr C_{EXT}/N_{EXT} , nízký DIN a zanedbatelný obsah NO_3^- (μg) v porovnání s půdami pod borůvčí a metličkou. Nízké až zanedbatelné množství NO_3^- bylo naměřeno také přímo v opadu jehličí (Vaněk, 2008). To potvrzuje naše výsledky z jednotlivých půdních horizontů.

Smrkové jehličí se vyznačuje oproti ostatním druhům opadu nejnižším obsahem celkového N, rozpustného P a nejvyšším obsahem fenolických látek (Šantrůčková et al., 2006). Šantrůčková et al. (2006) našli vyšší obsah N a P ve stárnoucím smrkovém jehličí (ze stromů napadených lýkožroutem smrkovým) oproti jehličí zelenému. Opad jehličí může

obsahovat až 40 % těžko rozložitelných fenolických látek (Applová, 2008), což negativně ovlivňuje jeho dekompozici. Nízký obsah N_{TOT} a N_{EXT} v samotném opadu jehličí (Šantrůčková et al., 2006) bude pravděpodobně ovlivňovat také jejich nízký obsah v půdě pod ním.

Půda pod podrostem borůvčí (*Vaccinium myrtillus*)

Opadový a humusový (2-5 cm) horizont pod podrostem borůvčí obsahoval průkazně vyšší obsah DON a méně N_{TOT} . V humusovém (2-5 cm) horizontu pod podrostem borůvčí byl zjištěn průkazně nižší obsah C_{EXT} a naopak vyšší obsah DON oproti jehličí. Ze všech horizontů (2-5 cm) zde byl nejvyšší poměr DON/DIN. V hlubším (5-10 cm) humusovém horizontu byl nižší obsah NH_4^+ oproti jehličí.

Opad borůvky se vyznačuje druhým nejvyšším obsahem fenolických látek hned po opadu jehličí (Vaněk, 2008). Je také bohatý na obsah N_{TOT} , P_{TOT} , P_{OX} (obsah fosforu v oxalátovém výluhu), proto je rozkládán rychleji než opad jehličí (Šantrůčková et al., 2006). Vyšší vstup fenolických látek opadu borůvčí do půdy může negativně působit na mikrobiální procesy.

5.2.2 Aktivita enzymů v půdě pod jednotlivými druhy podrostu

Celkově nejvyšší aktivity dosahovaly enzymy β -glukosidáza, celobiosidáza, alanin-aminopeptidáza a leucin-aminopeptidáza v půdních horizontech pod podrostem metličky. V půdách pod ostatními druhy zkoumaného rostlinného podrostu nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly v aktivitě enzymů. V případě aktivity fosfomonoesterázy nebyly nalezeny žádné průkazné rozdíly v půdě pod jednotlivými druhy podrostu, což je obdobné s výsledky její srovnatelné aktivity v povodí obou studovaných jezer.

Aktivity enzymů β -glukosidázy, celobiosidázy a fosfomonoesterázy korelovaly především s rozpustnými formami N, C a s obsahem N_{TOT} . Leucin-aminopeptidáza korelovala pozitivně opět s obsahem N_{TOT} , N_{EXT} , NO_3^- , DIN. Aktivita alanin-aminopeptidáza a leucin-aminopeptidázy byla vyšší v humusovém horizontu pod podrostem metličky, kde podle našich výsledků byl i nízký obsah C_{EXT} , N_{EXT} , DON. Z naměřené kinetiky enzymových reakcí těchto dvou enzymů může být možným vysvětlením nižší aktivity nízká afinita k substrátům v porovnání s β -glukosidázou a fosfomonoesterázou.

Na základě našich výsledků, které poukazují na zvýšenou aktivitu enzymů v půdě pod podrostem metličky a výše uvedených korelací, lze usuzovat, že bude tento druh vegetace významně ovlivňovat mikrobiální aktivitu a chemismus půdy. Opad metličky (*Avenella flexuosa*) podporuje mikrobiální aktivitu a uvolňování DIN do půdy (Šantrůčková et al., 2006). Tyto rostlinné materiály, které jsou bohaté na obsah N a mají nízký obsah ligninu, se obvykle rozkládají rychleji. Opad metličky a třtiny (*Calamagrostis villosa*) vykazoval ze všech opadů nejvyšší hodnoty C_{EXT} a N_{EXT} (Vaněk, 2008). Ke zvýšení obsahu C_{EXT} v půdě dochází během její dekompozice (Šantrůčková et al., 2006). Celkové množství N_{EXT} z bylinného patra tvoří dokonce až 95 % z minerálního N uvolňujícího se z rostlinného opadu (Vaněk, 2008). To vysvětluje silné korelace aktivit námi sledovaných enzymů s rozpustnými formami N a C v souladu s novějšími studiemi, kde po přidavku minerálního N dochází ke stimulaci mikrobiální aktivity a syntéze extracelulárních enzymů. Tyto sloučeniny jsou snadno dostupnými pro další mikrobiální procesy nebo mohou být vymývány do hlubších vrstev půdního profilu (Šantrůčková et al., 2006). Silná korelace aktivity β -glukosidázy a fosfomonoesterázy s obsahem NH_4^+ může souviset s jeho uvolňováním právě trávami. Podle výzkumu Šantrůčkové et al. (2006) dochází k nejvyššímu uvolňování NH_4^+ z opadu trav a pouze polovina tohoto množství je uvolňována z opadu borůvčí a nejméně z opadu jehličí.

Naopak materiály bohaté na lignin a chudé na obsah N požadují další N a dekompozice není doprovázena jeho uvolňováním do půdy (Meentemeyer, 1978). Podle výzkumu Vaňka (2008), opad smrkového jehličí obsahuje téměř 48 % fenolických látek z jeho celkové hmotnosti, naproti tomu trávy pouze 1 - 7 % těchto látek. Proto v půdních horizontech pod podrostem borůvčí a opadem jehličí, které oproti trávám obsahují vyšší obsah obtížněji rozložitelných fenolických látek, může docházet k limitaci aktivity studovaných enzymů. Zřejmě zde nejprve musí dojít k rozkladu fenolických látek jako je lignin a až poté mohou nastoupit celulólytické a proteolytické enzymy.

Změna v zastoupení vegetace na výzkumné ploše PLH s sebou přináší nejenom změny v kvalitě a množství opadu, ale také změny v podílu hlavních skupin uvnitř půdního mikrobiálního společenstva (Paul and Clark, 1996). V ekosystémech smrkových lesů, kde je rozkládán především opad obsahující velké množství ligninu, mají houby enzymovou výhodu nad bakteriemi (Bárta et al., 2010). Mají ve srovnání s bakteriemi obecně vyšší toleranci k aciditě, proto se více účastní dekompozice organické hmoty v kyselějších půdách (Killham, 1994). Přítomnost saprotrofních hub v lesních půdách má za následek zvýšení aktivity lignolytických i hydrolytických enzymů (Šnajdr et al., 2008). Právě saprotrofní houby jsou považovány za hlavní skupinu, která je zodpovědná za dekompozici opadu v temperátních

lesích (Baldrian et al., 2010b). Pokud dojde ke změnám v mikrobiálním společenstvu, lze očekávat, že bude účinnost enzymů korelovat více s mírou změny v mikrobiálním společenstvu, než-li s koncentrací živin v půdě (Allison et al., 2007). K takovýmto změnám může docházet na výzkumných plochách PLH, kde se v důsledku změny vegetace a rozvoje trav mohou rozvíjet jiná mikrobiální společenstva a ovlivňovat tak aktivitu enzymů v půdě a jejich požadavky na zdroje substrátů.

5.3 Vliv teploty na aktivitu enzymů

5.3.1 Teplotní závislost aktivity enzymů v půdě PLH

Z našich výsledků nelze jednoznačně určit vliv teploty na enzymovou aktivitu, protože se teplotní odpověď mezi jednotlivými enzymy výrazně lišila. Pouze u β -glukosidázy a fosfomonoesterázy docházelo spolu s růstem teploty i k růstu jejich aktivity mezi 15 a 20°C. Nejvyšších naměřených hodnot dosahovaly kolem 25°C. Odběr půdních vzorků probíhal na podzim. Deboz et al. (1999) našli signifikantní vliv doby odběrů vzorků na aktivitu β -glukosidázy, s nízkou aktivitou v období srpen až duben a relativně vysokou aktivitou v ostatních měsících (červen, červenec). Pro aktivitu fosfatázy v mokřadních ekosystémech byla nalezena také pozitivní korelace s teplotou v letních měsících s výrazným poklesem její aktivity na podzim (Kang and Freeman, 1999). Naopak Harrison and Pearce (1979) ukazují sezónní zvýšení aktivity kyselé fosfatázy v půdě během zimy. Půdní vzorky odebrané během podzimu měly nižší mikrobiální aktivity (respiraci, enzymovou aktivitu) ve srovnání s jarem (Chaer et al., 2009). Tyto odlišné výsledky aktivit mohou odrážet sezónní změny v produkci těchto kyselých fosfatáz mikroorganismy (Criquet et al., 2004).

Pro enzymy je vztah mezi teplotou a aktivitou funkcí aktivační energie reakce enzym-substrát (Sinsabaugh et al., 1991). Aktivační energie určuje rychlost změn enzymové aktivity s teplotou. Vzhledem k pozitivní korelaci aktivity β -glukosidázy a fosfomonoesterázy s teplotou byla pro tyto dva enzymy použita Arrheniova rovnice pro výpočet jejich aktivační energie a kolizní frekvence. Aktivační energie a kolizní frekvence β -glukosidázy klesala spolu s hloubkou půdního profilu oproti fosfomonoesteráze, jejíž aktivační energie a kolizní frekvence byly nejvyšší v humusovém (2-5 cm) půdním horizontu. Aktivita těchto dvou enzymů by mohla být také ovlivňována díky zvýšené teplotě v půdách PLH, kde došlo v současné době k odumření stromového patra a prosvětlení porostu.

Aktivita celobiosidázy se výrazně v průběhu teploty neměnila a zůstávala řádově stejná pouze s mírným snížením při teplotě kolem 20°C. Hodnoty její aktivity byly na mezi stanovitelnosti metody, proto nelze jednoznačně určit vliv teploty na tento enzym.

Změny aktivity alanin-aminopeptidázy a leucin-aminopeptidázy v závislosti na teplotě se pohybovaly v porovnání s β -glukosidázou a fosfatázou opět řádově v nižších hodnotách. V obou případech dosahovaly tyto enzymy nejvyšší aktivity při teplotě 0 až 5°C a s rostoucí teplotou jejich aktivita klesala. Lipson et al. (1999) v půdě alpínské tundry objevili, že pokles v mikrobiální biomase při tání sněhu způsobil uvolnění proteinů, které vyvolaly impuls ke zvýšení aktivity proteáz. Jinak byla aktivita těchto enzymů silně limitována substrátem. Podle Enowashu et al. (2009) dochází ke změnám aktivity proteáz v závislosti na dostupnosti substrátu a období odběru půdních vzorků (podzim; jaro). Niemi et al. (2007) předpokládají, že vyšší aktivita těchto dvou enzymů v květnu může souviset se zdrojem substrátu z podzimního jehličí. Je také možné, že jsou tyto enzymy adaptované na nižší teploty. Mikroorganismy adaptované na nízké teploty mohou na rozdíl od mezofilních mikroorganismů produkovat enzymy katalyzující reakce při nízkých teplotách díky přizpůsobení jejich chemické struktury (Gerday et al., 1997). Aktivační energie těchto enzymů je v porovnání s enzymy mezofilními nižší.

Existuje mnoho prací zkoumajících vliv teploty na mikrobiální teplotu, ale s odlišnými výsledky. Také Vaněk (2008) ve své práci sledoval závislost mineralizační rychlosti na dekompoziční teplotě bez průkazných výsledků. Vliv teploty na aktivitu fenolických enzymů v půdách našich výzkumných ploch nebyl zjištěn ani v práci Applové (2010). V několika pracích byly potvrzeny nezanedbatelné mikrobiální aktivity spojené s přeměnami půdní organické hmoty při teplotách blízkých 0°C (Skopcová and Šantrůčková, 2006; Vaněk, 2008; Applová, 2010). Podle výzkumu Šantrůčkové et al. (2006) je dekompozice opadu ovlivňována především jeho kvalitou, než-li vlivem teploty.

Teplotní závislost extracelulárních enzymů se v průběhu sezóny mění v závislosti na ročním období, ve kterém je půda odebírána a analyzována (Baum et al., 2003; Fenner et al. 2005). Například aktivita fosfatázy, β -glukosidázy a proteázy byla 2-3 krát vyšší v 0-15 cm půdy na jaře oproti podzimu (Sardans and Peñuelas, 2005). V ekosystémech ve středomoří byla naměřena vysoká aktivita enzymů na jaře v souvislosti s nejaktivnějším růstem rostlin a mikrobiální aktivitou (Garcia et al., 2002), ale podzim byl dalším enzymaticky nejaktivnějším obdobím roku v těchto ekosystémech. Odlišná sezónní aktivita extracelulárních enzymů může být vysvětlena tím, že se měřený enzymatický pool skládá v průběhu sezóny z různých isoenzymů (enzymy se stejnou funkcí, ale odlišnou strukturou).

Ty mohou být produkovány různými druhy organismů nebo pouze jedním druhem, který je schopný produkovat rozmanité isoenzymy (Loveland et al., 1994).

Proto by bylo vhodné odebrat půdní vzorky také v teplejším období roku a proměřit v nich aktivitu sledovaných enzymů. Aktivita enzymů bude také ovlivňována rozvojem odlišného mikrobiálního společenstva v průběhu roku. Odlišná teplotní citlivost enzymů může být díky rozdílům v aktivační energii (Wallenstein et al., 2011). Na druhé straně Sinsabaugh et al. (2008) předpokládají, že extracelulární enzymy rychle odpovídají na impulzní události ve vlhkosti, teplotě nebo dostupnosti živin a že vzorkování mnohokrát během jedné růstové sezóny nemusí zachytit plnou sezónní dynamiku enzymové aktivity.

6. Závěr

Cílem práce bylo zkoumání rozdílů v aktivitě vybraných extracelulárních enzymů v půdních horizontech povodí Plešného a Čertova jezera. Dalšími cíli bylo objasnění vlivu druhu podrostu (*Avenella flexuosa*, *Vaccinium myrtillus*) a opadu (*Picea abies*) a stanovení vlivu teploty na aktivitu enzymů v půdách povodí Plešného jezera.

- V půdních horizontech povodí Plešného jezera byla naměřena celkově vyšší aktivita extracelulárních enzymů oproti půdám Čertova jezera. Na základě tohoto zjištění bylo potvrzeno očekávané zvýšení aktivity enzymů v půdách povodí Plešného jezera v souvislosti se změnou vegetačního krytu. V obou případech byla aktivita měřena v půdních horizontech pod podrostem metličky (*Avenella flexuosa*).
- Pod podrostem metličky (*Avenella flexuosa*) byla naměřena vyšší enzymová aktivita v porovnání s půdními horizonty pod podrostem borůvčí (*Vaccinium myrtillus*) a opadem jehličí (*Picea abies*).
- Arrheniovská teplotní závislost byla prokázána pouze pro aktivitu β -glukosidázy a fosfomonoesterázy. Aktivita proteáz s teplotou klesala. Na základě těchto výsledků bylo podpořeno jen částečně očekávané zvýšení aktivity enzymů v souvislosti se zvýšením teploty v půdách povodí Plešného jezera. Tím se může zároveň potvrzovat vyšší vliv chemického složení opadu a půdy oproti vlivu teploty.
- Na základě získaných výsledků této práce je vidět, že jsou chemické a biologické procesy v půdách povodí Plešného jezera významně ovlivněny v důsledku změny vegetačního krytu s převládajícím zastoupením trav oproti původnímu smrkovému porostu.

7. Literatura

Ajwa, H.A., Rice, W.C., Sotomayor, D., 1998. Carbon and nitrogen mineralization in tallgrass prairie and agricultural soils. *Water Air and Soil Pollution* 75, 141–158.

Alexander, M., 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. Wiley, New York, in: Kim, K.Y., Jordan, D., McDonald, G.A., 1998. *Enterobacter Agglomerans*, phosphatase solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon source. *Soil Biology & Biochemistry* 30, 995-1003.

Allison, S.D., Vitousek, P.M., 2005. Responses to extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 937-944.

Allison, V.J., Condon, L.M., Peltzer, D.A., Richardson, S.J., Turner, B.L., 2007. Changes in enzyme activities and soil microbial community composition along carbon and nutrient gradients at the Franz Josef chronosequence, New Zealand. *Soil Biology & Biochemistry* 39, 1770-1781.

Amador, J.A., Glucksman, A.M., Lyons, J.B., Gorres, J.H., 1997. Spatial distribution of soil phosphatase activity within a riparian forest. *Soil Science* 162, 808-825.

Andersson, M., Kjoller, A., Struwe, S., 2004. Microbial enzyme activities in leaf litter, humus and mineral soil layers of European forests. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 1527-1537.

Applová, M., 2008. Aktivita fenoloxidáz a peroxidáz v opadech jehličnatého lesa v povodí Plešného a Čertova jezera. Bakalářská diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita, v České Budějovice. 38 pp.

Applová, M., 2010. Je aktivita ligninolytických enzymů při rozkladu opadu závislá na obsahu fenolických látek? Magisterská diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice. 76 pp.

Baldrian, P., Merhautová, V., Petránková, M., Cajthaml, T., Šnajdr, J., 2010a. Distribution of microbial biomass and activity of extracellular enzymes in a hardwood forest soil reflect soil moisture content. *Applied Soil Ecology* 46, 177-182.

Baldrian, P., Merhautová, V., Cajthaml, T., Petránková, M., Šnajdr, J., 2010b. Small-scale distribution of extracellular enzymes, fungal, and bacterial biomass in *Quercus petraea* forest topsoil. *Biology & Fertility of Soils* 46, 717-726.

Bárta, J., Applová, M., Vaněk, D., Křišťůvková, M., Šantrůčková, H., 2010. Effect of available P and phenolics on mineral N release in acidified spruce forest: connection with lignin-degrading enzymes and bacterial and fungal communities. *Biogeochemistry* 97, 71-87.

Bastida, F., Barberá, G.G., García, C., Hernández, T., 2008. Influence of orientation, vegetation and season on soil microbial and biochemical characteristics under semiarid conditions. *Applied Soil Ecology* 38, 62-70.

- Baum, C., Leinweber, P., Schlichting, A., 2003. Effects of chemical conditions in re-wetted peats temporal variation in microbial biomass and acid phosphatase activity within the growing season. *Applied Soil Ecology* 22, 167-174.
- Brady, N.C., Weil, R.R., 2002. *The Nature and Properties of Soils*: Prentice Hall, New Jersey. 960 pp.
- Burns, R.G., 1978. *Soil Enzymes*, Academic Press, London. 380 pp.
- Burns, R.G., 1982. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology & Biochemistry* 14, 423-427.
- Burns, R.G., 1986. Interaction of Enzymes with Soil Mineral and Organic Colloids, in: Huang, P.M., Schnitzer, M. (Eds.), *Interaction of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes*. SSSA, Madison, pp. 429-451.
- Campbell, C.A., Zentner, R.P., 1993. Soil organic-matter as influenced by crop rotations and fertilization. *Soil Science Society of America journal* 57, 1034-1040.
- Carreira, J.A., García-Ruiz, R., Liétor, J., Harrison, A.F., 2000. Changes in soil phosphatase activity and P transformation rates induced by application of N- and S-containing acid-mist to a forest canopy. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 1857-1865.
- Carreiro, M.M., Sinsabaugh, R.L., Repert, D.A., Parkhurst, D.F., 2000. Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. *Ecology* 81, 2359-2365.
- Cleveland, C.C., Liptzin, D., 2007. C:N:P stoichiometry in soil: is there a ‘‘Redfield ratio’’ for the microbial biomass? *Biogeochemistry* 85, 235-252.
- Cook, B.D., Allan, D.L., 1992. Dissolved organic matter in old field soils: total amounts as a measure of available resources for soil mineralization. *Soil Biology & Biochemistry* 24, 585-594.
- Criquet, S., Ferre, E., Farnet, A.M., Le petit, J., 2004. Annual dynamics of phosphatase activities in an evergreen oak litter: influence of biotic and abiotic factors. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 1111-1118.
- Dakora, F.D., Phillips, D.A., 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* 245, 35-47.
- Debosz, K., Rasmussen, P.H., Pedersen, A.R., 1999. Temporal variations in microbial biomass C and cellulolytic enzyme activity in arable soils: effects of organic matter input. *Applied Soil Ecology* 13, 209-218.
- De Cesare, F., Garzillo, A.M.V., Buonocore, V., Badalucco, L., 2000. Use of sonication for measuring acid phosphatase activity in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 825-832.
- Dick, R.P., Rasmussen, P.E., Kerle, E.A., 1988. Influence of long-term residue management on soil enzyme activity in relation to soil chemical properties of a wheat-fallow system. *Biology & Fertility of Soils* 6, 159-164.

- Enowashu, E., Poll, C.H., Lamersdorf, N., Kandeler, E., 2009. Microbial biomass and enzyme activities under reduced nitrogen deposition in a spruce forest soil. *Applied Soil Ecology* 43, 11-21.
- Fenner, N., Freeman, C., Reynolds, B., 2005. Observations of a seasonally shifting thermal optimum in peatland carbon-cycling processes; implications for the global carbon cycle and soil enzyme methodologies. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 1814-1821.
- Fierer, N., Schimel, J.P., Holden, P.A., 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology & Biochemistry* 35, 167-176.
- Fioretto, A., Papa, S., Pellegrino, A., Ferrigno, A., 2009. Microbial activities in soils of a Mediterranean ecosystem in different successional stages. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 2061-2068.
- Fisk, M.C., Fahey, T.J., 2001. Microbial biomass and nitrogen cycling responses to fertilization and litter removal in young northern hardwood forests. *Biogeochemistry* 53, 201-223.
- Fog, K., 1988. The effect of added nitrogen on the rate of decomposition of organic matter. *Biological Reviews* 63, 433-462.
- Föhse, D., Claassen, N., Jungk, A., 1988. Phosphorus efficiency in plants. I. External and internal P requirement and P uptake efficiency of different plant species. *Plant and Soil* 110, 101-109.
- Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L., 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology & Biochemistry* 35, 837-843.
- Foth, H.D., Ellis, B.G., 1997. *Soil Fertility*. CRC Press, Boca Raton, FL, 290 pp, in: Geisseler, D., Horwath, W.R., 2008. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. *Soil Biology & Biochemistry* 40, 3040-3048.
- Frankenberger, W.T.J., Johanson, J.B., 1982. Effect of pH on enzyme stability in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 14, 433-437.
- Fransson, A.M., Jones, D.L., 2007. Phosphatase activity does not limit the microbial use of low molecular weight organic-P substrates in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 39, 1213-1217.
- Garcia, C., Hernandez, T., Roldan, A., Martin, A., 2002. Effect of plant cover decline on chemical and microbiological parameters under Mediterranean climate. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 635-642.
- Geisseler, D., Horwath, W.R., 2008. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. *Soil Biology & Biochemistry* 40, 3040-3048.

Gerday, C., Aittaleb, M., Arpigny, J.L., Baise, E., Chessa, J.P., Garsoux, G., Petrescu, I., Feller, G., 1997. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1342, 119-131.

Goel, R., Mino, T., Satoh, H., Matsup, T., 1998. Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor. *Water Research* 32, 2081-2088.

Gundersen, P., Callesen, I., De Vries, W., 1998. Nitrate leaching in forest ecosystems is related to forest floor C/N ratios. *Environmental Pollution* 102, 403-407.

Harrison, A.F., Pearce, T., 1979. Seasonal variation of phosphatase activity in woodland soils. *Soil Biology & Biochemistry* 11, 405-41.

Harrison, A.F., 1983. Relationship between intensity of phosphatase activity and physico-chemical properties in woodland soils. *Soil Biology & Biochemistry* 15, 93-99.

Hofmeister, J., 2005. Vliv sloučenin dusíku na lesní ekosystémy, in: Cienciala, E., Hruška, J. (Eds.), *Dlouhodobá acidifikace a nutriční degradace lesních půd – limitující faktor současného lesnictví*. Česká geologická služba, pp. 25-26.

Hoppe, H.G., 1983. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Marine Ecology Progress Series* 11, 299-308.

Hoppe, H.G., 1993. Use of fluorogenic model substrates for extracellular enzyme activity (EEA) measurement of bacteria, in: Kemp, P.F., Sherr, B.F., Sherr, E.B., Cole, J.J. (Eds.), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishing, Boca Raton, pp. 423-431.

Chaer, G.M., Myrold, D.D., Bottomley, P.J., 2009. A soil quality index based on the equilibrium between soil organic matter and biochemical properties of undisturbed coniferous forest soils of the Pacific Northwest. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 822-830.

Chu-Chou, M., Grace, L.J., 1990. Mycorrhizal fungi of radiata pine seedlings in nurseries and trees in forests. *Soil Biology & Biochemistry* 22, 959-966.

Joner, E.J., van Aarle, I.M., Vosatka, M., 2000. Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae: A review. *Plant and Soil* 226, 199-210.

Kalisz, H.M., 1988. Microbial proteinases. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 36, 1-65.

Kang, H., Freeman, Ch., 1999. Phosphatase and arylsulphatase activities in wetland soils: annual variation and controlling factors. *Soil Biology & Biochemistry* 31, 449-454.

Keeler, B.L., Hobbie, S.E., Kellogg, L.E., 2009. Effects of Long-Term Nitrogen Addition on Microbial Enzyme Activity in Eight Forested and Grassland Sites: Implications for Litter and Soil Organic Matter Decomposition. *Ecosystems* 12, 1-15.

Khaziev, F.K.H., Burangulova, M.N., 1965. Activity of enzymes which dephosphorylate organic phosphorus compounds of soil. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 1, 373-379, in: Burns, R.G., 1978. *Soil Enzymes*, Academic Press, London, p. 216.

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

Knight, T.R., Dick, R.P., 2004. Differentiating microbial and stabilized β -glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 2089-2096.

Kočárek, E. st., 2003. *Geomorfologie Šumavy: Šumava, Baset*, p. 119.

Kopáček, J., Veselý, J., Hejzlar, J., 1998. Bedrock and soil composition: crucial factors governing phosphorus input and trophic status of forest lakes in Bohemian Forest. *Acta Universitatis Carolinae - Geologica* 42, 55-59.

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

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

Lipson, D.A., Schmidt, S.K., Monson, R.K., 1999. Links between microbial population dynamics and nitrogen availability in an alpine ecosystem. *Ecology* 80, 1623-1631.

Lipson, D.A., Näsholm, T., 2001. The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. *Oecologia* 128, 305-316.

Loveland, J., Gutshall, K., Kasmir, J., Prema, P., Brenchley, J.E., 1994. Characterization of psychrotrophic microorganisms producing β -galactosidase activities. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 12-18.

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

Marschner, H., Dell, B., 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* 159, 89-102.

Marx, M.C., Wood, M., Jarvis, S.C., 2001. A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 33, 1633-1640.

Masciandaro, G., Macci, C., Doni, S., Maserti, B.E., Calvo-Bado Leo, A., Ceccanti, B., Wellington, E., 2008. Comparison of extraction methods for recovery of extracellular β -glucosidase in two different forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* 40, 2156-2161.

McGill, W.B., Cole, C.V., 1981. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma* 26, 267-286.

Meentemeyer, V., 1978. Macroclimate and lignin control of litter decomposition rates. *Ecology* 59, 465-472.

- Mummey, D.L., Stahl, P.D., Buyer, J.S., 2002. Soil microbiological properties 20 years after surface mine reclamation: spatial analysis of reclaimed and undisturbed sites. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 1717-1725.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil, in: Burns, R.G., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 1-33.
- Naseby, D.C., Moenne-Loccoz, Y., Powell, J., O'Gara, F., Lynch, J.M., 1998. Soil enzyme activities in the rhizosphere of field-grown sugar beet inoculated with the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* F113. *Biology and Fertility of Soils* 27, 39-43.
- Niemi, R.M., Vepsäläinen, M., 2005. Stability of the fluorogenic enzyme substrates and pH optima of enzyme activities in different Finnish soils. *Journal of Microbiological Methods* 60, 195– 205.
- Niemi, R.M., Vepsäläinen, M., Erkomaa, K., Ilvesniemi, H., 2007. Microbial activity during summer in humus layers under *Pinus silvestris* and *Alnus incana*. *Forest Ecology and Management* 242, 314-323.
- Nourbakhsh, F., 2007. Decoupling of soil biological properties by deforestation. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 121, 435-438.
- Olander, L.P., Vitousek, P.M., 2000. Regulation of soil phosphatase and chitinase activity by N and P availability. *Biogeochemistry* 49, 175-190.
- Paul, E.A., Clark, F.E., 1996. *Soil Microbiology and Biochemistry*, Second Edition. Academic Press, San Diego. 340 pp.
- Petruš, J., Neuhäuslová, Z., 2001. Pedologie Národního parku Šumava. *Silva Gabreta, Supplementum* 1, 21-22.
- Porazinska, D.L., Bardgett, R.D., Blaauw, M.B., Hunt, H.W., Parsons, A.N., Seastedt, T.R., Wall, D.H., 2003. Relationships at the aboveground–belowground interface: plants, soil biota, and soil processes. *Ecological Monographs* 73, 377-395.
- Powell, C.L., 1977. Mycorrhizas in hill country soils. V Growth response in ryegrass. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 20, 495-502.
- Pugsley, A.P., 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiological Reviews* 57, 50-108, in: Sylvania, D. M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G., Zuberer, D.A., 1999. *Principles and applications of soil microbiology*. Prentice Hall. p. 50.
- Ross, D.J., 1987. Soil microbial biomass estimated by the fumigation–incubation procedure: seasonal fluctuations and influence of soil moisture content. *Soil Biology & Biochemistry* 19, 397-404.
- Rutigliano, F.A., Castaldi, S., D'Ascoli, R., Papa, S., Carfora, A., Marzaioli, R., Fioretto, A., 2009. Soil activities related to nitrogen cycle under three plant cover types in Mediterranean environment. *Applied Soil Ecology* 43, 40-46.

- Saiya-Cork, K.R., Sinsabaugh, R.L., Zak, D.R., 2002. The effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 1309-1315.
- Saratchandra, S.U., Perrott, K.W., Upsdell, M.P., 1984. Microbiological and biochemical characteristics of a range of New Zealand soils under stabilized pasture. *Soil Biology & Biochemistry* 16, 177-183.
- Sardans, J., Peñuelas, J., 2005. Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean *Quercus ilex* L. forest. *Soil Biology & Biochemistry* 37, 455-461.
- Sardans, J., Peñuelas, J., Estiarte, M., 2008. Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. *Applied Soil Ecology* 39, 223-235.
- Schimel, J.P., Gulledge, J.M., Clein-Curley, J.S., Lindstrom, J.E., Braddock, J.F., 1999. Moisture effects on microbial activity and community structure in decomposing birch litter in the Alaskan taiga. *Soil Biology & Biochemistry* 31, 831-838.
- Schulten, H.R., Schnitzer, M., 1998. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biology & Fertility of Soils* 26, 1-15.
- Singh, J., Gupta, S.R., 1977. Plant decomposition and soil respiration in terrestrial ecosystems. *The botanical review* 43, 449-528.
- Sinsabaugh, R.L., Antibus, R.K., Linkins, A.E., 1991. An enzymic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. *Agriculture, Ecosystems and Environments* 34, 43-53.
- Sinsabaugh, R.L., Antibus, R.K., Linkins, A.E., McClaugherty, C.A., Rayburn, L., Repert, D., Weiland, T., 1993. Wood decomposition: nitrogen and phosphorus dynamics in relation to extracellular enzyme activity. *Ecology* 74, 1586-1593.
- Sinsabaugh, R.L., 1994. Enzymic analysis of microbial pattern and process. *Biology and Fertility of Soils* 17, 69-74.
- Sinsabaugh, R.L., Carreiro, M.M., Repert, D.A., 2002. Allocation of extracellular enzyme activity in relation to litter composition, N deposition, and mass loss. *Biogeochemistry* 60, 1-24.
- Sinsabaugh, R.L., Lauber, C., Weintraub, M., Ahmed, B., Allison, S., Crenshaw, C., Contosta, A., Cusack, D., Frey, S., Gallo, M., Gartner, T., Hobbie, S., Holland, K., Keeler, B., Powers, J., Stursova, M., Takacs-Vesbach, C., Waldrop, M., Wallenstein, M., Zak, D., Zeglin, L., 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters* 11, 1-13.
- Skopcová, K., Šantrůčková, H., 2006. The effect of temperature on nitrogen transformations in mountain forest soils of Plešné, Černé, and Čertovo Lake watersheds. *Silva Gabreta* 12, 3-14.

Skujiňš, J., 1978a. History of Abiotic Soil Enzyme Research, in: Burns, R.G. (Ed.), *Soil Enzymes*, Academic Press, London, pp. 1-33.

Skujiňš, J., 1978b. Extracellular enzymes in soils. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 4, 383-421.

Solaiman, Z., Marschner, P., Wang, D., Rengel, Z., 2007. Growth, P uptake and rhizosphere properties of bea and canola genotypes in an alkaline soil with low P availability. *Biology & Fertility of Soils* 44, 143-153.

Sorfon, J., Neuhäuslová, Z., Wild, J., 2001. Podnebí Národního parku Šumava. *Silva Gabreta, Supplementum* 1, 22-24.

Speir, T.W., Ross, D.J., 1978. Soil phosphatase and sulphatase, in: Burns, R.G. (Ed.), *Soil Enzymes*. Academic Press, London, pp. 198–250.

Speir, G.A., McGill, W.B., 1979. Effect of phosphorus addition and energy supply on acid phosphatase production and activity in soils. *Soil Biology & Biochemistry* 11, 3-8.

Svoboda, M., Matějka, K., Kopáček, J., 2006. Biomass and element pools of understory vegetation in the catchments of Čertovo Lake and Plešné Lake in the Bohemian Forest. *Biologia (Bratislava)* 61, 509-521.

Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G., Zuberer, D.A., 1999. Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall. 550 pp.

Szegi, J., 1988. Cellulose decomposition and soil fertility. *Académiai Kiado, Budapest*. 186 pp.

Šantrůčková, H., 2001. *Ekologie půdy*. BF JU a ÚPB AV ČR v Českých Budějovicích. 29 pp.

Šantrůčková, H., Vrba, J., Pícek, T., Kopáček, J., 2004. Soil biochemical activity and phosphorus transformations and losses from acidified forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 1569-1576.

Šantrůčková, H., Křišťůvková, M., Vaněk, D., 2006. Decomposition rate and nutrient release from plant litter of Norway spruce forest in the Bohemian Forest. *Biologia* 61, S499-S508.

Šimek, M., 2007. *Základy nauky o půdě*. 1. Neživé složky půdy, Druhé vydání. Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 158 pp.

Šnajdr, J., Valášková, V., Merhautová, V., Cajthaml, T., Baldrian, P., 2008. Activity and spatial distribution of lignocellulose-degrading enzymes during forest soil colonization by saprotrophic basidiomycetes. *Enzyme and Microbial Technology* 43, 186-192.

Tate, R.L. III., 2000. *Soil microbiology*, Second Edition. New York: Wiley, pp. 159-188.

Tian, G., Brussaard, L., Kang, B.T., Swift, M.J., 1997. Soil fauna-mediated decomposition of plant residues under constrained environmental and residue quality conditions, in: Cadisch, G., Giller, K.E. (Eds.), *Driven by nature: Plant litter quality and decomposition*. CAB International, Wallingford, pp. 125-134.

Turner, B.L., Hopkins, D.W., Haygarth, P.M., Ostle, N., 2002. β -Glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology* 20, 157-162.

Vance, C.P., Uhde-Stone, C., Allan, D.L., 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157, 423-447.

Vaněk, D., 2004. Rychlost dekompozice organické hmoty v půdách povodí ledovcových jezer na Šumavě. Bakalářská diplomová práce, Biologická fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice. 32 pp.

Vaněk, D., 2008. Rychlost dekompozice rostlinného opadu v půdách ledovcových jezer na Šumavě. Magisterská diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice. 64 pp.

Varadi, J., 1971. The effects of aromatic compounds on cellulase and xylanase production of fungi *Schizophyllum commune* and *Chaetomium globosum*. *Biodeterioration Mater.*, 2, 129-135, in: Sinsabaugh, R.L., Antibus, R.K., Linkins, A.E., 1991. An enzymatic approach to the analysis of microbial activity during plant litter decomposition. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 34, 43-54.

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

Wagner, G.H., Wolf, D.C., 1998. Carbon transformations and soil organic matter formation, in: Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G., Zuberer, D.A. (Eds.), *Principal and applications of soil microbiology*. Prentice Hall Upper Saddle River, New Jersey, pp. 218-258.

Wallenstein, M., Allison, S.D., Ernakovich, J., Steinweg, J.M., Sinsabaugh, R., 2011. Controls on the Temperature Sensitivity of Soil Enzymes: A Key Driver of In Situ Enzyme Activity Rates, in: Shukla, G., Varma, A. (Eds.), *Soil Enzymology, Soil Biology* 22, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 245-258.

Wang, A.S., Angle, J.S., Chaney, R.L., Delorme, T.A., McIntosh, M., 2006. Changes in soil biological activities under reduced soil pH during *Thlaspi caerulescens* phytoextraction. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 1451-1461.

8. Přílohy

	0°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C
β-glukosidáza O	3,14	16,63	17,39	24,40	30,62	50,43
	(2,98)	(1,12)	(5,39)	(13,85)	(6,56)	(10,83)
β-glukosidáza A1	9,28	11,28	11,08	13,85	18,43	32,88
	(1,89)	(2,57)	(1,10)	(3,51)	(6,16)	(4,72)
β-glukosidáza A2	5,10	6,91	6,78	9,93	8,79	18,91
	(2,34)	(3,15)	(2,43)	(4,96)	(5,20)	(5,26)

Příloha 1a. Průměrná aktivita β-glukosidázy v opadovém (O) (0-2 cm), humusovém (A1) (2-5 cm) a hlubším humusovém (A2) (5-10 cm) horizontu půdy horní výzkumné plochy povodí Plešného (PLH) jezera v závislosti na teplotě (n = 3, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky).

	0°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C
Celobiosidáza O	1,83	1,66	1,25	1,11	0,78	1,76
	(0,37)	(0,58)	(1,19)	(0,41)	(0,41)	(0,53)
Celobiosidáza A1	2,13	2,17	1,59	1,21	0,81	1,40
	(0,44)	(0,42)	(0,29)	(0,24)	(0,76)	(0,17)
Celobiosidáza A2	1,55	1,59	1,24	0,97	0,60	0,89
	(0,70)	(0,74)	(0,40)	(0,40)	(0,39)	(0,20)

Příloha 1b. Průměrná aktivita celobiosidázy v opadovém (O) (0-2 cm), humusovém (A1) (2-5 cm) a hlubším humusovém (A2) (5-10 cm) horizontu půdy horní výzkumné plochy povodí Plešného (PLH) jezera v závislosti na teplotě (n = 3, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky).

	0°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C
Ala-aminopeptidáza O	13,95	13,47	11,25	7,59	6,02	7,23
	(1,67)	(0,36)	(3,00)	(1,22)	(1,16)	(2,29)
Ala-aminopeptidáza A1	13,82	11,91	9,65	5,86	2,29	4,97
	(5,60)	(2,08)	(2,38)	(2,19)	(3,14)	(1,66)
Ala-aminopeptidáza A2	9,26	9,99	6,58	3,94	3,20	2,83
	(3,91)	(4,15)	(1,75)	(1,75)	(0,84)	(2,45)

Příloha 1c. Průměrná aktivita alanin-aminopeptidázy v opadovém (O) horizontu (0-2 cm), humusovém (A1) (2-5 cm) a hlubším humusovém horizontu (A2) (5-10 cm) půdy horní výzkumné plochy povodí Plešného (PLH) jezera v závislosti na teplotě (n = 3, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky).

	0°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C
Leu-aminopeptidáza O	14,10 (2,32)	12,59 (1,61)	9,03 (2,73)	7,02 (1,86)	4,54 (1,47)	4,65 (1,45)
Leu-aminopeptidáza A1	15,59 (4,41)	12,12 (3,96)	8,18 (1,03)	5,75 (1,84)	1,76 (2,73)	2,84 (1,49)
Leu-aminopeptidáza A2	10,13 (3,71)	10,96 (5,30)	5,87 (1,02)	3,59 (1,73)	2,54 (1,07)	1,47 (2,34)

Příloha 1d. Průměrná aktivita leucin-aminopeptidázy v opadovém (O) horizontu (0-2 cm), humusovém (A1) (2-5 cm) a hlubším humusovém horizontu (A2) (5-10 cm) půdy horní výzkumné plochy povodí Plešného (PLH) jezera v závislosti na teplotě ($n = 3$, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky).

	0°C	5°C	10°C	15°C	20°C	25°C
Fosfomonoesteráza O	75,75 (33,31)	83,04 (16,34)	77,97 (36,36)	90,60 (41,30)	131,43 (32,66)	216,55 (41,53)
Fosfomonoesteráza A1	23,96 (15,87)	28,07 (17,38)	35,85 (19,36)	43,94 (30,94)	43,35 (31,41)	114,91 (59,33)
Fosfomonoesteráza A2	18,00 (13,49)	27,16 (20,24)	25,38 (8,30)	30,47 (11,20)	30,39 (8,37)	75,48 (18,39)

Příloha 1e. Průměrná aktivita fosfomonoesterázy v opadovém (O) (0-2 cm), humusovém (A1) (2-5 cm) a hlubším humusovém (A2) (5-10 cm) horizontu půdy horní výzkumné plochy povodí Plešného (PLH) jezera v závislosti na teplotě ($n = 3$, v závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky).