

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Fixace dusíku v půdách malých lesních povodí
v České republice**

Bakalářská práce

Petra Michalčáková

Školitelka: RNDr. Karolína Tahovská, Ph.D.

České Budějovice 2023

Michalčáková, P., 2023: Fixace dusíku v půdách malých lesních povodí v České republice. [Nitrogen fixation in soils of the temperate forest catchments in the Czech Republic. Bachelor thesis, in Czech]- 50p; Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Tato bakalářská práce sjednocuje informace týkající se fixace dusíku v půdě. Detailněji se věnuje biologické nesymbiotické fixaci (fixaci volně žijících organismů) se zaměřením na půdy jehličnatých lesů a zabývá se faktory, které ovlivňují její rychlost. Experimentální část spočívá ve stanovení rychlosti nesymbiotické fixace v půdách odebraných v rámci monitoringu čtrnácti malých lesních povodí v Čechách. Rychlost fixace byla měřena metodou inkorporace $^{15}\text{N}_2$, která byla doplněna stanovením kvantity bakteriálního *nifH* genu kódujícího jeden z proteinů enzymu nitrogenázy.

Anotation

This bachelor thesis summarises the information about nitrogen fixation with an emphasis on the biological non-symbiotic (free-living organisms) fixation in soil of temperate coniferous forests and it also discusses critical factors, which have an impact on the fixation efficiency. The experimental part evaluates the potential rate of non-symbiotic nitrogen fixation in soil samples from fourteen temperate forest catchments in the Czech Republic. The $^{15}\text{N}_2$ -incorporation method was used, complemented by the determination of the quantity of the bacterial *nifH* gene, which encodes one of the nitrogenase's proteins.

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala především své školitelce Karolině Tahovské za velkou trpělivost, odborné vedení při psaní práce a všem věnovaný čas. Dále děkuji pracovníkům České Geologické služby za poskytnutí odebraných a přesetých vzorků k analýze a technikovi Ondřeji Žampachovi za stanovení poměru izotopů u vzorků. Velký dík také patří mé rodině, která mi vytvořila klidné prostředí pro studium.

Podíl práce studenta v praktické části bakalářské práce

Odběr a přesetí půdních vzorků provedli pracovníci České Geologické Služby. Samostatně jsem prováděla stanovení fixace pomocí izotopové inkorporační metody včetně přípravy vzorků pro hmotnostní spektrometrii (mletí a vážení). Stanovení poměru izotopů bylo prováděno technikem. Extrakci DNA a kvantifikaci *nifH* genu metodou qPCR jsem prováděla samostatně.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem teoretickou část vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

České Budějovice, 8. 12. 2023



Petra Michalčáková

Obsah

1. Úvod a literární rešerše	1
1.1. Fixace dusíku.....	4
1.1.2 Abiotická fixace dusíku.....	5
1.1.3 Antropogenní fixace dusíku.....	5
1.1.4 Biologická fixace a její význam v cyklu dusíku.....	6
1.1.4.1 Symbiotická fixace dusíku.....	9
1.1.4.2 Nesymbiotická fixace dusíku.....	10
1.1.4.3 Fixace specifických prostředí (mechy, lišejníky a biokrusty).....	13
1.1.4.3.1 Faktory ovlivňující nesymbiotickou fixaci N v lesních půdách.....	14
1.2. Měření fixace dusíku v půdách.....	17
1.1.5 Inkorporační izotopová metoda.....	18
1.1.6 Kvantifikace bakteriálního genu <i>NifH</i>	19
1.3. Hypotézy.....	19
2. Materiál a metody	20
2.1 Lokality odběru půdních vzorků.....	20
2.2 Odběr půdních vzorků.....	21
2.3 Půdní analýzy.....	21
2.3.1 Stanovení suché hmotnosti půdy.....	21
2.3.2 Kvantifikace <i>NifH</i> genu.....	21
2.3.2.1 Extrakce půdní DNA.....	21
2.3.2.2 Stanovení koncentrace půdní DNA.....	21
2.3.2.3 Kvantifikace <i>nifH</i> genu metodou qPCR.....	22
2.2.3 Stanovení potenciálu biologické fixace pomocí inkorporace ¹⁵ N ₂	24
2.2.3.1 Inkubace vzorků s ¹⁵ N ₂	24
2.2.3.2 Příprava vzorků pro analýzu poměru izotopů.....	24
2.2.3.3 Analýza poměru izotopů pomocí poměrové hmotnostní spektrometrie ...	24
2.2.3.4 Výpočet rychlosti fixace.....	25
2.2.3.5 Analýza dat.....	25
3. Výsledky	26
3.1. Změna $\delta^{15}\text{N}$ během inkubace půdy s ¹⁵ N ₂	26
3.2. Rychlost fixace.....	27

3.3.	Kvantita <i>nifH</i> genu	30
3.4	Vztah mezi kvantitou <i>nifH</i> genu a rychlostí fixace N ₂	32
4.	Diskuze	33
4.1.	Rychlost fixace	33
4.2.	Kvantita <i>nifH</i> genu a její vztah k rychlosti fixace	36
5.	Závěr	38
6.	Použitá literatura	39
7.	Přílohy	48

1. Úvod a literární rešerše

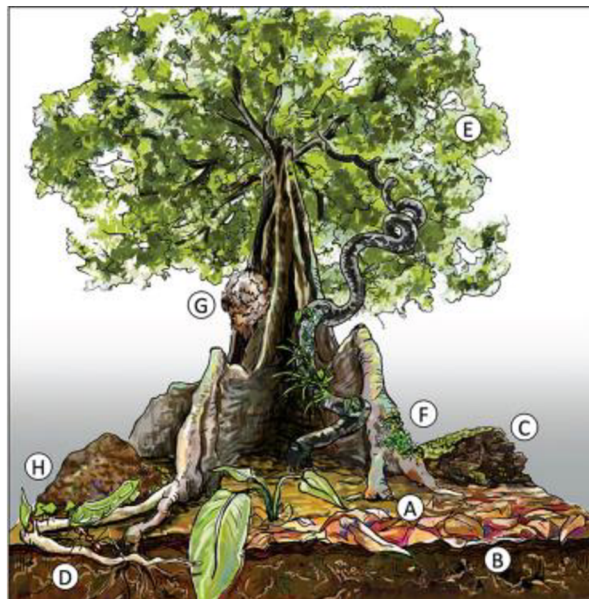
Dusík (N) je po uhlíku druhým nejdůležitějším prvkem pro život. Zároveň je to limitující živina primární produkce. Je součástí mnoha biomolekul, například proteinů, nukleových kyselin nebo lipidů. Dále je nedílnou součástí fotosyntézy, protože je obsažen v zeleném barvivu chlorofylu a zároveň je i limitujícím prvkem pro fungování enzymu RUBISCO, který je významný katalyzátor při fixaci CO₂ v Calvinově cyklu (Warren et al., 2000).

Atmosféra a horninové podloží jsou dva největší zásobníky dusíku. V atmosféře je dusík vázán převážně v molekule N₂ a to pevnou trojnou vazbou. Biologickou fixací, kterou provádí mikroorganismy v různých ekologických nikách, se však dusík i takto silně vázaný může dostávat do půdy a je využíván rostlinami a mikroorganismy pro stavbu biomasy (Šantrůčková et al., 2018).

Přestože celosvětový nárůst antropogenní depozice N (aplikace hnojiv, spalování fosilních paliv, doprava) způsobil zvýšení celkové dostupnosti dusíku v ekosystémech (Galloway et al 2004), většina dusíku, který se dostává do neobhospodařovaných ekosystémů, pochází stále převážně z biologické fixace (Wieder et al., 2015). Wieder et al. (2015) uvádí, že míra biologické fixace ovlivňuje globální cyklus uhlíku i klima. Odhady rychlosti biologické fixace jsou však v literatuře stále spíš nejisté.

Biologickou fixaci provádí mnoho druhů organismů symbioticky žijících (např. nodulující bakterie s krytosemennými rostlinami), ale i volně žijících (např. anaerobní a aerobní bakterie a řasy) a může být ovlivněna mnoha faktory prostředí. Proto se v různých biomech její míra liší. Může být ovlivněna teplotou prostředí nebo jeho vlhkostí. Dále to však může být i například množstvím a druhem (složením) rostlinného opadu, který vstupuje do půdy. Z tohoto důvodu se biologická fixace může lišit nejen v rámci větších biomů, ale zároveň i v rámci jednotlivých ekosystémů (Šantrůčková et al., 2018).

I když je tento proces pro přírodu velmi důležitý, není mnoho studií, které by se fixací dusíku v půdách zabývaly komplexně. Fixace se totiž může odehrávat v mnoha ekologických nikách každého ekosystému (obrázek 1). Většina prací se doposud orientovala na symbiotickou fixaci, kdy je dusík do půdy fixován skrze vzájemně prospěšný vztah vaskulárních rostlin a bakterií. Druhý, méně prozkoumaný druh fixace, je fixace nesymbiotická (tzv. cryptic fixation, Cleveland *et al.*, 2022), která je zajišťovaná volně žijícími mikroorganismy. Ojedinele také skupinami organismů, které jsou schopny mutualismu. Recentní studie odhadují, že by mohl tento méně probádaný způsob fixace být chybějícím zdrojem dusíku pro 13 - 22 % z jeho celkové dostupnosti v agrikulturních ekosystémech (Ladha *et al.*, 2016). Davies-Barnard *et al.* (2020) se dokonce domnívají, že napříč různými terestrickými ekosystémy může být dusík fixován volně žijícími organismy z 22 až 45 %, přičemž větší zastoupení tohoto druhu fixace se očekává v chladnějších a sušších oblastech. Studie, které by cílily na nesymbiotickou fixaci s užším zaměřením na vybraný ekosystém, však nejsou dostupné.



Obrázek 1: Zobrazení ekologických nik, ve kterých se může odehrávat nesymbiotická – cryptic fixace – dusíku. A – opad listů, B – půda, C – rozkládající se dřevo, D – kořeny a rizosféra, E – rostlinné epifyty, F – mechy a lišejníky, G – termiti, H – těla mravenců (převzato z: Cleveland *et al.*, 2022).

Hlavním cílem práce je zkompletovat informace o biologické fixaci dusíku v půdách terestrických ekosystémů se zaměřením na jehličnaté lesy a definovat faktory, které ovlivňují její rychlost. Dalším cílem je stanovit potenciál nesymbiotické biologické fixace v půdách malých lesních povodí sítě Geomon v České republice.

1.1. Fixace dusíku

Dusík tvoří až 78 % atmosféry, to z ní dělá největší zásobárnu dusíku pro organismy (Oses et al., 2018). Houlton et al. (2018) se však domnívají, že by velkou, ale neprobádanou, zásobárnou dusíku pro organismy mohly být také horniny. Výsledky ukazují, že v ekosystémech s vyšší zeměpisnou šířkou, kde je biologická fixace limitována (např. teplotou), se může pomalým zvětráváním hornin uvolnit až 20 % z celkového vstupu N daného ekosystému (Houlton et al., 2018)

Navzdory velkým zásobárnám dusíku v horninách i atmosféře, ale i antropogennímu znečištění, je dostupnost dusíku stále jedním z důležitých limitujících faktorů pro produkci mnoha terestrických i vodních ekosystémů (Dalton and Kramer, 2006). Hlavní důvod limitace je, že atmosférický N₂ je spojen silnou trojnou vazbou. Její rozdělení a tím i následné využití dusíku dalšími organismy je velmi energeticky náročné (Galloway et al., 2004). Dusík je fixován do půdy třemi způsoby: abiotickou fixací, biologickou fixací a fixací v důsledku antropogenní činnosti (antropogenní fixace).

Celková míra vstupu dusíku do ekosystémů se v průběhu století výrazně měnila. Předpokládá se, že v době před industrializací byla globální míra vstupu dusíku celkově 111 Tg N rok⁻¹. Z toho tvořila biologická fixace 99 Tg N rok⁻¹ (Green et al., 2004). Některé studie však odhadují celkový vstup menší, asi 40 Tg N rok⁻¹ (Vitousek et al., 2013). K roku 2013 byl celkový vstup dusíku do ekosystémů odhadnut na 410 Tg N rok⁻¹, kdy za více než polovinu z toho je zodpovědná fixace způsobená antropogenní činností (Fowler et al., 2013). Green *et al.* (2004) odhadli celkový vstup dusíku do ekosystémů na 223 Tg N rok⁻¹. Z toho 81 Tg N rok⁻¹ bylo tvořeno biologickou a abiotickou fixací a 142 Tg N rok⁻¹ fixací způsobenou novodobou antropogenní činností. V dnešní době se předpokládá stálý nárůst množství dusíku vstupujícího do ekosystémů, zejména v důsledku zemědělské činnosti (hnojení) a jen pomalé reakce ekosystémů na kontrolní opatření snižování eutrofizace (Fowler et al., 2013).

1.1.2 Abiotická fixace dusíku

Abiotická fixace N_2 je způsobena geochemickými procesy, jako jsou blesky při bouři, vulkanická činnost, nebo požáry. Energie, která vzniká při blesku, je schopna rozštěpit trojnou vazbu mezi dvěma atomy N. Při kontaktu s vodou dochází k jejich následnému sloučení s atomy vodíku a ve vzduchu vzniká amoniak (NH_3). Ten se splavuje na zemský povrch, kde je tato forma dusíku rostlinami přímo využitelná (Gruber and Galloway, 2008). Tento způsob fixace se většinou podílí přibližně na deseti procentech celkové globální fixace N_2 (Warembourg, 1993).

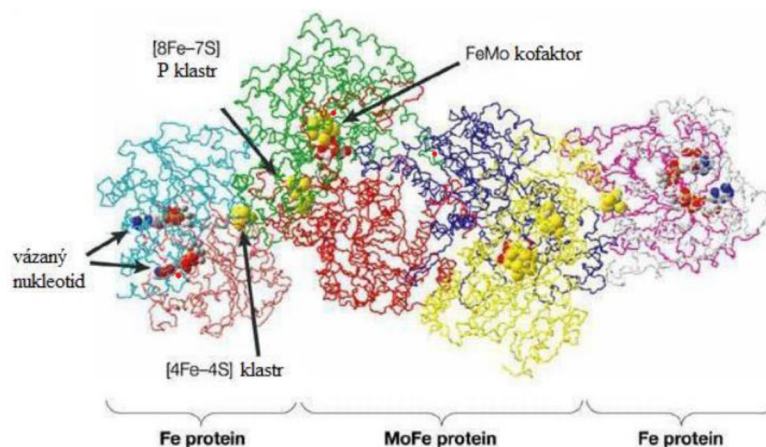
1.1.3 Antropogenní fixace dusíku

Už od 19. století byla dusíkatá minerální hnojiva využívána v zemědělství jako přidaný zdroj živin pro zrychlení růstu zemědělských plodin a hnojení tak představuje významný antropogenní vstup N do ekosystémů (antropogenní fixace). Nejčastěji se k hnojení využívají hnojiva na bázi amoniaku (Ladha et al., 2022). Nitráty se hojně používají jak v zemědělství, tak také v pyrotechnice, kde slouží k výrobě střelného prachu (Augustyn, 2023). Na začátku 20. století se v důsledku začínající 1. světové války zvedla poptávka po dusičnanu draselném (KNO_3), který je kvůli své povaze silného oxidačního činidla mimo jiné využíván právě i k výrobě výbušnin (Steward, 2023). V této době se vědci začali věnovat i možnostem, jak kontrolovaně fixovat dusík, a tím synteticky získávat jeho sloučeniny. Jako nejvíce ekonomicky výhodný způsob přímé fixace dusíku se prokázal tzv. Haber-Boschův proces (Bezdicek and Kennedy, 1998). Při tomto procesu je při vysoké teplotě a tlaku konvertován atmosférický dusík s vodíkem na amoniak (Balinski and Watson, 2017). Nadměrné používání dusíkatých hnojiv však má i své negativní dopady. Vystavení vysokým koncentracím amoniaku je pro mnoho organismů toxické (Padappayil and Borger, 2023) a může v dlouhodobém horizontu docházet k okyselení půd. Nadměrné hnojení může také vést k eutrofizaci půd i vod a spolu s fosforem přispívat k přemnožení vodního květu. Ten, pokud pokryje celou plochu vodní hladiny, zabraňuje průniku slunečního záření k vodním organismům a zároveň se snižuje dostupnost kyslíku. Tím se snižuje diversita organismů (Bottomley and Myrold, 2007). Nadbytek dusíku v atmosféře navíc vede k produkci troposférického ozónu, který u lidí může vyvolávat respirační problémy, rakovinu nebo srdeční potíže (Townsend et al., 2003). Přeměna přebytečného dusíku v ekosystémech až na N_2O zvyšuje potenciál skleníkového efektu (Galloway et al., 2003). Část aplikovaných hnojiv se také může přímo a velmi rychle po aplikaci uvolnit do atmosféry volatilizací, kdy dusík

uniká ze systému ve formě NH_3 . Ve 21. století se zvýšilo využití Haber-Bosch procesu a Gruber and Galloway (2008) se domnívají, že globální roční antropogenní a biologické procesy fixace N_2 by mohly dosahovat stejných hodnot. Potenciálně by rychlost antropogenní fixace mohla vstupy N biologickou cestou fixace i překonávat.

1.1.4 Biologická fixace a její význam v cyklu dusíku

Biologická fixace atmosférického dusíku probíhá prostřednictvím bakterií a archeí, které mají enzymový komplex zvaný nitrogenáza (obrázek 2). Spadají do skupiny tzv. diazotrofů, tedy organismů schopných redukovat trojnou vazbu v molekule N_2 (Gruber and Galloway, 2008).



Obrázek 2: Struktura enzymového komplexu nitrogenáza (upraveno podle: Bishop and Joerger, 1990).

Na rozbití trojné vazby N_2 je potřeba velké množství energie, konkrétně 16 molekul ATP (adenosintrifosfát). Tuto reakci katalyzuje enzymový komplex nitrogenáza:

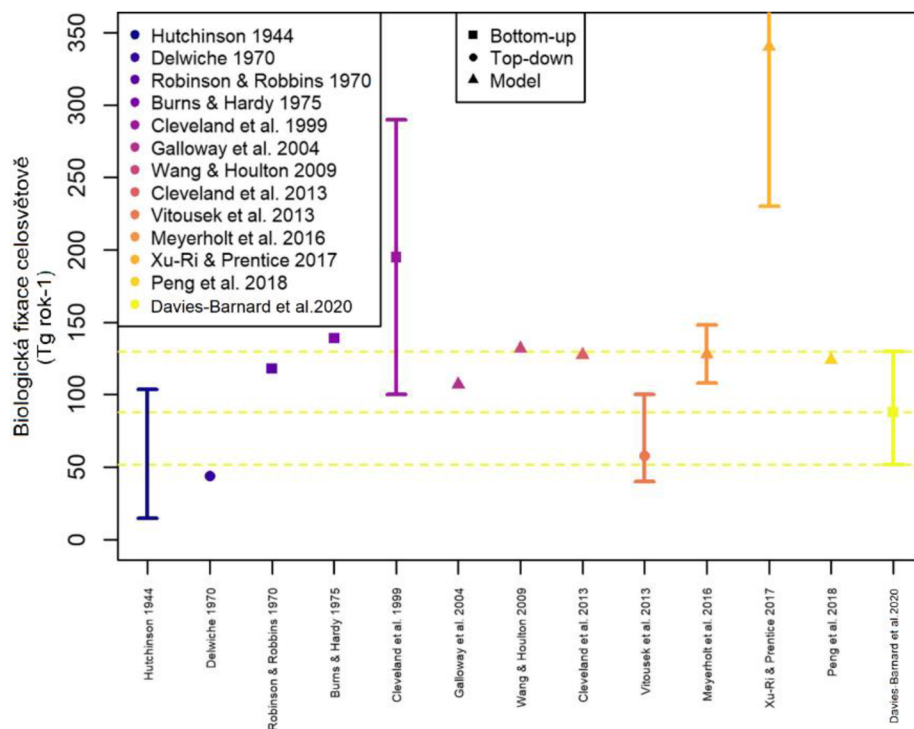


Výsledným produktem reakce je amoniak, který je dále využit na stavbu aminokyselin, nebo ho při přebytku symbiont pošle rostlině. Tím přispívá do koloběhu dusíku a podporuje růst rostlinné biomasy. Dusík v rostlinné biomase se pak navrácí do půdy ve formě nadzemního i podzemního opadu z rostliny a jako rhizodepozice (produkce organických látek kořeny). Kořeny rostlin mohou vylučovat do půdy ale i minerální N. Rostlinný opad je v půdě v procesech dekompozice a depolymerizace (Schimel and Bennett, 2004) rozkládán mikroorganismy až na jednoduché organické látky, které jsou poté mineralizovány na amoniak (NH_3 , NH_4^+). Amoniak je forma dusíku již přímo dostupná rostlinám a mikroorganismům

k zabudování do biomasy. Zároveň se však váže na sorpční komplex půdy. Nitrifikaci amoniaku, což je autotrofní proces sloužící k získání energie, vznikají nitrity (NO_2) a následně i nitráty (NO_3), které mohou být také asimilovány mikroorganismy a rostlinami, ale jsou i velmi mobilní formou dusíku a náchylné na vyplavování z půdy. Nitráty mohou být denitrifikací přeměněny mikroorganismy až na plynný dusík, který se uvolňuje zpět do atmosféry a tím se cyklus dusíku uzavírá (Britton et al., 2023).

Diazotrofové mohou žít volně, ale velmi časté jsou organismy tvořící symbiózu s rostlinami (Oses et al., 2018). Vztah mezi symbionty (bakterie nebo archea s rostlinami) je důležitý pro výměnu energie a živin. Na základě vztahů mezi organismy můžeme tedy biologickou fixaci rozdělit na dvě hlavní kategorie: a) symbiotickou fixaci, kam spadají nodulující bakterie a diazotrofní endofyty a b) nesymbiotickou fixaci, kterou zajišťují volně žijící organismy.

Fixací atmosférického dusíku se do ekosystému může biologickou dráhou dostat většinové množství dostupného N pro terestrický ekosystém (Vitousek et al., 2013; Wieder et al., 2015). Kvantifikací fixace N_2 do ekosystému biologickou cestou se zabývaly mnohé studie. Předpokládaná míra fixace se však napříč studiemi poměrně liší (obrázek 3).



Obrázek 3: Odhady globální míry biologické fixace N₂, přiřazeny barevně k jednotlivým publikovaným pracím. Studie jsou seřazeny od nejstarší k nejnovější podle data vydání. Všechny hodnoty jsou vykreslené jako potenciál. Poslední žlutá studie je autorův nejnovější odhad globální biologické fixace. Průměr tohoto globálního odhadu a jeho nejvyšší a nejnižší hodnoty, jsou přerušovanou čarou promítnuty do celé délky grafu pro porovnání s ostatními studiemi. Citované studie: Hutchinson, 1944; Delwiche, 1970; Robinson and Robbins, 1970; Galloway et al., 2004; Wang and Houlton, 2009; Burns and Hardy, 2012; Cleveland et al., 2013; Vitousek et al., 2013; Meyerholt, Zaehle and Smith, 2016; Xu-Ri and Prentice, 2017; Peng et al., 2018; Davies-Barnard and Friedlingstein, 2020 (upraveno podle: Davies-Barnard and Friedlingstein, 2020).

Ukazuje se také, že v první polovině prací citovaných ve studii Davies-Barnard and Friedlingstein (2020) se odhady globální biologické fixace během let v průměru postupně navyšovaly. Mimo dvou studií, kdy byly odhady celkové globální fixace dusíku několikanásobně vyšší, se její odhady pohybují v rozmezí 50 - 150 Tg N rok⁻¹.

1.1.4.1 Symbiotická fixace dusíku

Jedna z nejčastějších symbióz, která využívá fixaci N_2 , je vztah mezi nodulujícími bakteriemi a krytosemennými rostlinami. Symbiotická rostlina vypouští skrz kořeny chemické látky, které přilákají bakterie schopné fixace dusíku. Ty se přichytí na kořeny, zabudují se do kořenových nodulů a výměnou za energeticky bohaté organické látky (uhlík) poskytují rostlinám nafixovaný atmosférický dusík ve formě amoniaku (NH_3) (Dawson, 2011). Jsou známé dvě skupiny, které jsou tohoto vztahu schopny. Jednou z nich jsou zástupci z kmene půdních bakterií *Actinobacteria*, rod *Frankia*. Ti jsou schopni vztahu s rostlinnými řády *Fagales* (bukotvaré), *Rosales* (růžotvaré) a *Cucurbitales* (tykvotvaré) (Werner et al., 2014). Dále je známý vztah mezi půdními bakteriemi rodu *Rhizobia*, patřící do polyfyletického kmene bakterií *Proteobacteria*, s rostlinami z řádu *Fabales* (bobotvaré). Jediným dalším známým rodem rostlin mimo řád *Fabales*, které jsou schopné vztahu s bakteriemi rodu *Rhizobia*, je rod *Parasponia* (Remigi et al., 2016).

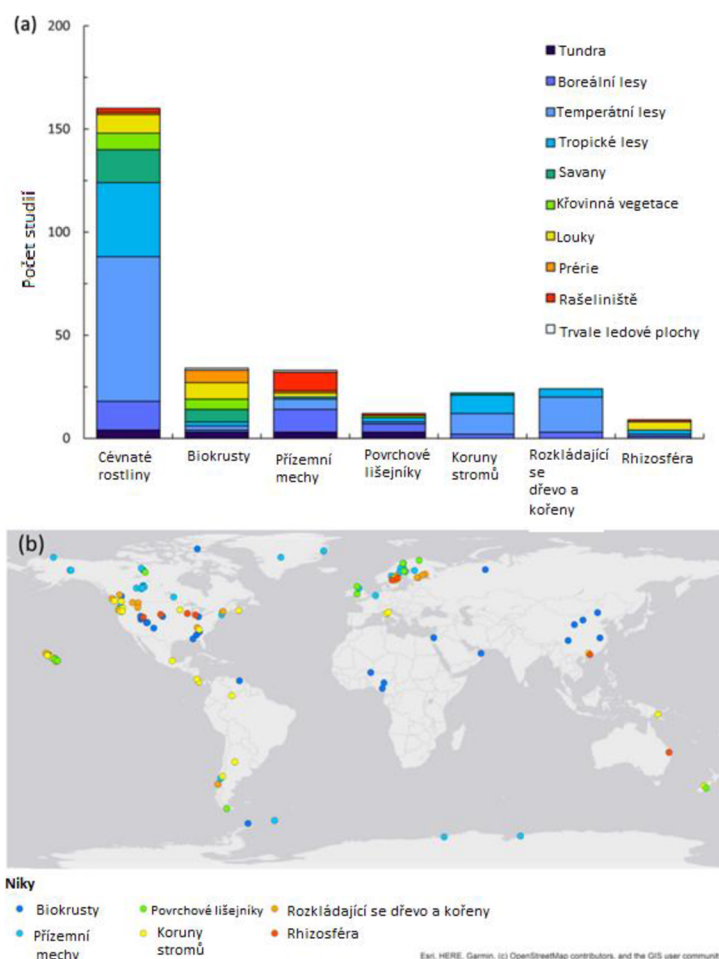
Dalšími symbioticky žijícími organismy jsou endofyty, kteří se vyznačují tím, že část svého života nebo celý životní cyklus žijí v těle svého hostitelského organismu, aniž by mu jakkoliv škodily (Gouda et al., 2016). Do skupiny diazotrofních endofytických bakterií patří rody *Azoarcus*, *Herbaspirillum* a *Gluconacetobacter*. Jsou charakteristické tím, že se dokáží v rostlinné tkáni množit a tvořit kolonie, aniž by hostitele poškodily nebo na sebe upoutávaly větší obrannou reakci hostitelské rostliny (Nair and Padmavathy, 2014). Dobře prozkoumané symbiózy tvoří i diazotrofní sinice z rodu *Anabaena* a *Nostoc* s kapradinami, houbami nebo mechorosty (konkrétněji např. sinice *Anabaena azolae* s kapradinou *Azolla*, de Vries and de Vries, 2018).

Skrze symbiotickou biologickou fixaci se globálně váže v ekosystémech odhadem 57 Tg N rok⁻¹ (Davies-Barnard and Friedlingstein, 2020).

1.1.4.2 Nesymbiotická fixace dusíku

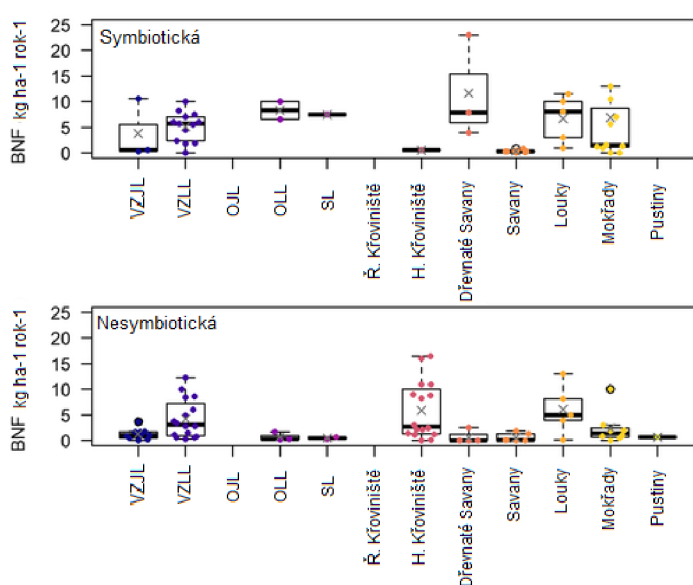
Nesymbioticky fixovat N_2 jsou schopni i volně žijící půdní mikroorganismy, např. bakterie z rodu *Bacillus* (Yousuf et al., 2017) nebo rodu *Azotobacter* (Roper and Gupta, 2016). Nesymbiotická fixace se tak jejich prostřednictvím odehrává například v rostlinném opadu, rozkládajícím se dřevě a kořenech, mechu, v mravencích, a dalších specifických mikroprostředích (obrázek 4). Napříč studiemi je nazývána jako fixace volně žijících organismů, cryptic fixace, fixace asymbiotických organismů či fixace nesymbiotických organismů (zjednodušeně nesymbiotická fixace) (Cleveland et al., 2022).

Za poslední dvě desetiletí se většina studií zaměřovala zejména na popis fixace symbiotické v domnění, že nesymbiotická fixace N_2 přináší do koloběhu pouze zanedbatelnou část dusíku (obrázek 4).



Obrázek 4: a) Počty studií zabývající se biologickou fixací dusíku v různých typech terestrických ekosystémů. (b) Mapa světa se zakreslenými lokacemi, kde byla data o fixaci dusíku shromážděna (upraveno podle: Cleveland et al., 2022).

V dnešní době se ale objevuje stále více prací, které se zabývají nesymbiotickou fixací dusíku. Reed et al. (2011) tvrdí, že tento způsob fixace je schopen globálně přidat do ekosystémů až $20 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ rok}^{-1}$. Další ze studií poukazuje na schopnost nesymbiotické fixace celosvětově přidat do ekosystémů srovnatelné množství dusíku, jako fixace symbiotická (obrázek 5; Davies-Barnard and Friedlingstein, 2020). Zároveň je nesymbiotická fixace považována za zdroj pro 13 - 22 % dusíku z jeho celkové dostupnosti v terestriálních agrikulturních ekosystémech na světě (Ladha et al., 2016). Předpokládá se, že tento druh fixace je ve skutečnosti ještě významnější, než je v dnešní době odhadováno a to právě z důvodu neprobádanosti tohoto procesu (Roley et al., 2018; Stewart et al., 2011).



Obrázek 5: Míra globální biologické fixace v jednotlivých biomech, rozdělená na symbiotickou a nesymbiotickou fixaci. V každém vyznačeném biomu je prostřední linie boxu medián, horní linie značí kvartily a křížek (x) značí aritmetický průměr. Jednotlivé body značí individuální naměřené hodnoty. Biomy jsou definovány v souladu s *International Geosphere-Biosphere Programme* ("IGBP - IGBP," 2023). Použité zkratky: VZJL – vždyzelené jehličnaté lesy, VZLL – Vždyzelené listnaté lesy, OJL – Opadavé jehličnaté lesy, OLL – Opadavé listnaté lesy, SL – smíšené lesy, Ř. Křoviniště – řídká křoviniště, H. Křoviniště – hustá křoviniště (upraveno podle: Davies-Barnard and Friedlingstein, 2020).

Nesymbiotická fixace se může odehrávat v mnohých nikách daného ekosystému (obrázek 1). Každá z nik může do ekosystému fixovat rozdílné množství N_2 a každá je i ovlivňována různými abiotickými i biotickými faktory (Cleveland et al., 2022).

Rozkládající se dřevo a kořeny rostlin

V lesních ekosystémech se předpokládá, že jedna z významných nik, kde nesymbiotická fixace probíhá, je v rozkládajícím se dřevě a kořenech. Fixace zde může být významná hlavně kvůli příznivým podmínkám, jako jsou: vysoká vlhkost, potenciálně vysoký poměr uhlíku ku dusíku (C/N) nebo dostatečná dostupnost ostatních živin. Například byl zaznamenán pozitivní vztah mezi vyšší vlhkostí rozkládajícího se dřeva a fixací N_2 (Hicks et al., 2003). Studie, které by se měřením fixace v těchto konkrétních nikách přímo zabývaly, jsou však ojedinělé (Son, 2001). Proto průměrná fixace z většiny dostupných měření pro rozkládající se dřevo činí jen $0,8 - 2,5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ rok}^{-1}$ (obrázek 3a). Odhad pro fixaci dusíku spojenou s dekompozicí kořenů je maximálně $6,3 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ rok}^{-1}$. Tato měření byla prováděna převážně v temperátních lesích. Očekává se, že když budou přibývat studie z více typů lesů, může i průměrná hodnota fixace dusíku v těchto nikách narůstat (Cleveland et al., 2022). Pro rozkládající se kořeny rostlin jsou ovlivňující faktory rychlosti fixace N_2 neprobádané. Byla změřena pouze vyšší míra fixace u kořenů s průměrem nad 2 mm než s $<2 \text{ mm}$ (McCormack et al., 2015).

Rhizosféra a volná půda

Nesymbiotická fixace N_2 se může ve zvýšené míře odehrávat i v blízkosti kořenů rostlin, tzv. rhizosféře, ale může probíhat pravděpodobně i ve volné půdě. Smercina et al. (2019) se domnívají, že většina dusíku v půdě je pravděpodobně fixována v bezprostřední blízkosti kořenů, spíše než v okolní volné půdě vzhledem k vysoké aktivitě mikroorganismů podporovaných rhizodepozicemi. Hodnota fixace byla stanovena až na $47 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ rok}^{-1}$ (Cleveland et al., 2022), což z této niky dělá potenciálně nejvýznamnější místo pro nesymbiotickou fixaci N_2 v lesích. Do dnešní doby není příliš mnoho studií, které by se touto nikou konkrétněji zabývaly (obrázek 4a). Data z volné půdy jsou velmi vzácná (Hyodo et al., 2021). Craine et al. (2015) naměřili mírné zvýšení $\delta^{15}N$ u vzorků z volné půdy, což dokazuje, že i v této nise fixace probíhá. Hodnoty rychlosti fixace dusíku pro tuto niku jsou však zanedbatelné.

Jiná prostředí nesymbiotické fixace

Na nesymbiotické fixaci se mohou podílet i termity, mravenci nebo další hmyz. Například termity jsou schopni ve svých střevech fixovat až 80 % dusíku, který potřebují pro život a nejsou schopni ho přijmout v potravě (Breznak et al., 1973).

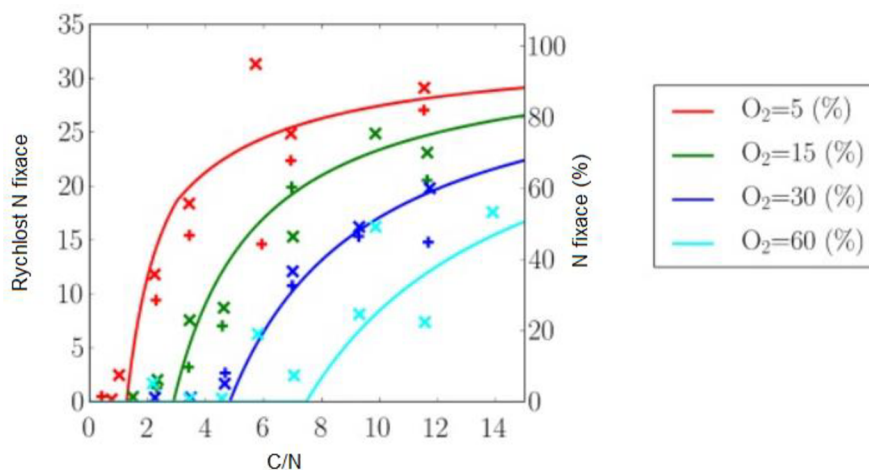
Dalšími odlišnými prostředími, kde fixace probíhá, jsou například krunýře krabů houslistů, které mají mikrobiální ochranný film plný sinic a bakterií schopných fixovat dusík. Tím se stávají jedním z hlavních míst pro biologickou fixaci dusíku v mangrovových ekosystémech (Zilius et al., 2020). Fixace byla objevena i v arktických ledovcích, kdy byla zpozorována aktivita nitrogenázy v dutinách ledovců, kam se postupem času navály zbytky prachu a částic kamenů s mikroorganismy (Telling et al., 2011). Bylo zjištěno, že fixace N₂ probíhá i ve výkalech některých druhů savců, například hrabošů (Li and Maser, 1986).

1.1.4.3 Fixace specifických prostředí (mechy, lišejníky a biokrusty)

Tato specifická prostředí jsou kombinací většího zastoupení volně žijících fixujících organismů a minoritních symbioticky žijících fixátorů. Mnoho terestrických povrchů je pokryto skupinami organismů, z nichž některé získávají živiny z anorganických zdrojů s pomocí energie ze slunečního záření (Elbert et al., 2012). Tyto povrchy se můžou skládat z kombinace mechtů, lišejníků, sinic, řas a hub a dalších organismů (Cleveland et al., 2022). V ekosystémech nacházejících se ve větších nadmořských výškách jsou důležitými fixátory N₂ mechy rodu *Sphagnum*. V boreálních a arktických ekosystémech dosahují značně velké biomasy a mohou být schopny fixovat až 35 kg N ha⁻¹ rok⁻¹ (Rousk et al., 2016). Naproti tomu povrchové lišejníky jsou hojně rozšířené napříč různými ekosystémy (obrázek 4a). Odhady míry jejich fixace N₂ se pohybují 0,1 - 100 kg N ha⁻¹ rok⁻¹. Odhadované míry v jednotlivých studiích se však velmi liší, ale většina jim připisuje velký význam (obrázek 7; Cleveland et al., 2022). V ne příliš příznivých podmínkách, např. místa vystavená intenzivním teplotám nebo po velkých disturbancích, tvoří mikroorganismy tzv. biologické krusty. Často se skládají z částic půdy, sinic, řas, lišejníků nebo mechtů žijících na nejsvrchnějších milimetrech půdy (Belnap and Lange, 2003). Tyto specifické povrchy jsou schopny fixovat až 25 kg N ha⁻¹ rok⁻¹ (Zhao et al., 2010). Celkově jsou tyto skupiny organismů schopny fixovat až 30 % dusíku z celkové míry biologické fixace v Evropě (Elbert et al., 2012). V lesních ekosystémech se však biokrusty příliš často nevyskytují (Cleveland et al., 2022). Jako v ostatních skupinách jsou i zde nejvýznamnějšími faktory ovlivňující fixaci: teplota, voda a kvůli převažujícímu foto-autotrofnímu způsobu života i intenzita slunečního záření. Vlhkost je pro fungování biokrust kritická, protože jsou fyziologicky aktivní pouze v mokřem stavu (Cleveland et al., 2022).

1.1.4.3.1 Faktory ovlivňující nesymbiotickou fixaci N v lesních půdách

Z abiotických faktorů nejvýznamněji ovlivňuje fixaci teplota, vlhkost a dostupnost kyslíku. Bylo zjištěno, že optimální teplota pro aktivitu enzymu nitrogenázy je 25 °C. Nitrogenáza je velmi citlivá také na přítomnost kyslíku. Přesycení okolí kyslíkem proto může vést k jejímu neostatečnému fungování, a tak i k menšímu množství fixovaného dusíku (obrázek 6; Mohammadi et al., 2012). Optimální obsah kyslíku byl stanoven na 2 % (Hicks et al., 2003). Právě voda zajišťuje, aby byla nitrogenáza částečně oddělena od vysoké koncentrace kyslíku. Dostatečná vlhkost je důležitá i pro přeměnu atmosférického dusíku na amoniak a dále zajišťuje transport amoniaku skrze rostlinu nebo půdu (Seuss et al., 2022). Podle Son (2001) se míra biologické fixace může lišit také v rámci vývojových stádií lesa, kdy její míra s postupem času klesá tím, jak les dospívá. Jako důvod se uvádí, že s postupem času se v lese snižuje počet rozkládajícího se dřeva (podzemního i nadzemního) a tím se zmenšuje i jedna z nejhojnějších zdrojů dusíku fixujících nik v lesních ekosystémech (Son, 2001).



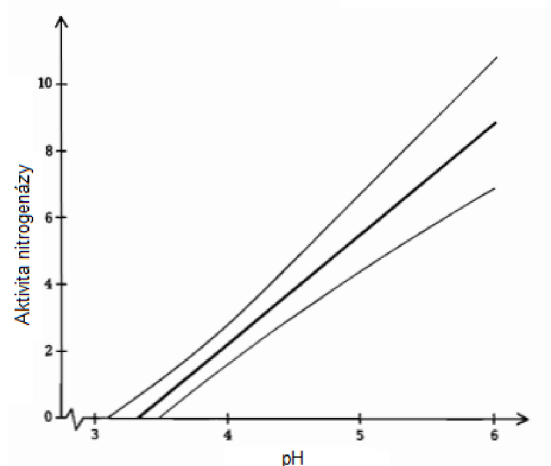
Obrázek 6: Výsledky laboratorního experimentu měření rychlosti fixace N₂ s kulturou *Azotobacter vinelandii* v závislosti na poměru C/N substrátu a koncentraci kyslíku v prostředí. Rozdílné barvy křivek reprezentují odlišné koncentrace O₂ v kulturách. 100 % O₂ je rovno 225 μM. „+“ reprezentuje výsledky z metody acetylenové redukce. „x“ znázorňuje data inkorporace dusíku. Poměr C/N byl stanoven při konstantní dostupnosti amoniaku 2,5 mol m⁻³. Rychlost fixace je uváděna v nmol min⁻¹ mg proteinu⁻¹ (upraveno podle: Inomura et al., 2018)

Fixaci ovlivňuje i přítomnost ostatních prvků. Nejdůležitějším z nich je uhlík. Fixace dusíku souvisí s poměrem uhlíku a dusíku v půdě (C/N), podle kterého se odvíjí rychlost rozkladu organické hmoty. Pokud je poměr C/N v půdě vysoký, organismy zvyšují poptávku po dusíku a míra jeho zafixování z atmosféry je vyšší (obrázek 6; Gundersen, 1991). Poměr C/N obvykle klesá do hloubky půdního profilu tím, jak se snižuje obsah organické hmoty.

Obecně by tedy minerální horizonty měly mít nižší míru fixace N_2 , než výše se nacházející a na organickou hmotu, tím i uhlík, bohatší opadové a organické horizonty. Nohrstedt (1985) v jehličnatých a smíšených lesech naměřil v průměru 9-krát menší aktivitu nitrogenázy ve vzorkách odebraných z půdních profilů v hloubce 3 - 6 cm, oproti vzorkům z povrchové vrstvy půdy (0 - 3 cm). S hloubkou by mohl klesat i genový potenciál mikroorganismů pro fixaci dusíku (*nifH* gen) (Piotrowska-Długosz et al., 2022).

Další z živin, která fixaci dusíku v půdách může limitovat, je molybden (Mo). Molybden je koofaktorem pro nitrogenázu. Studie v půdách boreálního lesa odhalila, že po přidání molybdenu do půdy byla biologická fixace dusíku až čtyřnásobná oproti kontrole (Rousk et al., 2017). Barron et al. (2008) se domnívají, že lesy rostoucí na kyselém podloží budou obsahem molybdenu v půdě spíše omezeny. Molybden je totiž v kyselém prostředí náchylný k vyplavování, z půd se ztrácí (Reed et al., 2013) a stává se limitujícím prvkem. Nitrogenáza může obsahovat i jiné prvky než molybden. Těmi jsou vanad (V) a železo (Fe). Vliv těchto prvků na fixaci dusíku je málo prozkoumán, avšak předpokládá se, že budou ovlivňovat rychlost fixace dusíku stejně jako molybden. Největší výskyt těchto druhů nitrogenáz s V a Fe byl objeven v biokrustách (Bellenger et al., 2020).

Jiným faktorem ovlivňujícím fixaci dusíku je pH půdy. Nohrstedt (1985) uvádí, že čím je půda kyselější, tím je míra biologické fixace N_2 nižší (obrázek 7). Neina (2019) tvrdí, na základě vlastních stanovení, že pH optimum půdy pro biologickou fixaci je mezi 6 - 8. Hlavní příčinou může jednoduše být, že s klesajícím pH půdy obecně klesá i její mikrobiální aktivita (Nohrstedt, 1985). V jehličnatých lesích se pH půdy pohybuje v průměru okolo 5,5 (Granhall and Lindberg, 1978), ale může klesat až k 3,5. Kyselost půdy v jehličnatých lesích způsobuje zejména jehličnatý opad, který je kvůli vysokému obsahu ligninu a pryskyřici (terpeny) jen pomalu rozložitelný. K pomalému rozkladu přispívá také vyšší vlhkost a nízká teplota systémů, kde převažují temperátní a boreální jehličnaté lesy. Samotné jehlice obsahují i organické kyseliny, které půdu přirozeně okyselují. V jehličnatých lesech je proto očekávána nižší rychlost biologické fixace N_2 , než v lesech listnatých (Kyveryga et al., 2004). Na druhou stranu Berg (1986) uvádí, že s vysokým obsahem ligninu v opadu jehličnatých lesů roste poměr C/N a tím pádem by mohla růst i fixace N_2 .



Obrázek 7: Regresní přímka ($Y = -11,09 + 3,33X$; $r = 0,9257$) a 95 % interval spolehlivosti pro vztah mezi aktivitou nitrogenázy a pH ve svrchním minerálním horizontu půd jehličnatých lesů. Aktivita nitrogenázy je v jednotkách $\text{nmol C}_2\text{H}_4$ v jádře $^{-1}$ h $^{-1}$ (upraveno podle: Nohrstedt, 1985).

Celosvětově jsou v současnosti jehličnaté lesy v důsledku lidské činnosti dusíkem spíše přesyceny (saturovány). Celkově bylo zjištěno, že přebytek dusíku v půdě snižuje fixaci atmosférického dusíku (Gundersen et al., 1998) v průměru o 19 % (například ekosystémy 17,7 - 20,3 %) (Zheng et al., 2019). Přebytek dostupného minerálního dusíku v půdě stimuluje růst větví na úkor kořenů. Stromy se tak stávají strukturně slabšími a náchylnějšími k útoku hmyzu a obecně k disturbancím (Rotter et al., 2020). Pokud je les často narušován, může se pravděpodobně míra biologické fixace lišit i v důsledku zvýšené heterogenity prostředí po disturbanci. Obecně řečeno, přebytek dusíku v půdě také zvyšuje mikrobiální aktivitu, což vede ke zvýšené mobilitě N v půdách a převaze procesů nitrifikace a denitrifikace. Dusík se proto buď z půdy vyplavuje, nebo je denitrifikován na plynné formy (např. N_2O), které se uvolňují zpět do atmosféry (Britton et al., 2023). Oulehle et al. (2021) pomocí měření přirozeného výskytu $^{15}\text{N}_2$ v temperátních lesích stanovili míru ztráty N v plynných skupenstvích na $2,5 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ rok}^{-1}$, což tvoří až 20 % celkové depozice. Celkově v dusíkem více saturovaných systémech (s nízkým C/N půd) mohou ztráty N v plynné a rozpuštěné formě dosahovat i $16 \text{ kg ha}^{-1} \text{ g N rok}^{-1}$ (Oulehle et al., 2021). Tahovská et al. (2023) následně zjistili, že v půdách s nízkými plynnými ztrátami N, tedy v půdách spíše dusíkem limitovaných, může být fixace N_2 významným procesem. Nadměrný vstup dusíku do ekosystémů mění i složení celých lesních rostlinných společenstev (Rotter et al., 2020). Tím pádem se může měnit i rychlost fixace N_2 , protože bylo ukázáno, že rychlost fixace závisí také na složení vegetace (Gruber and Galloway, 2008).

1.2. Měření fixace dusíku v půdách

Měření fixace dusíku v půdě se může provádět různými metodami. Metoda se většinou vybírá na základě toho, jaký druh fixace chceme stanovit, společně s tím, za jakých podmínek (např. *in vitro*, nebo *in vivo*) (Herridge and Giller, 2016). Například **ureidová metoda** se používá při měření nedávné biologické fixace N₂ symbiontem. Technika spočívá v měření koncentrace dusíkatých látek (alantoinu, kyseliny alantoové, aminosloučenin a dusičnanů), které jsou spojeny s fixací N₂, v odebrané míze xylému rostlinných hostitelů. Výsledné hodnoty určují zdroje dusíků, které jsou v nízkém čase (do 30 minut) asimilovány rostlinami. S využitím půdního N (NO₃⁻, α amino-N) a výslednými daty z ureidové metody se odhadne parametr *Pfix* (podíl rostlinného N pocházejícího z fixace N₂). Tato metoda se nejčastěji využívá u bylinných druhů luštěnin (čeledi *Phaseoleae* a *Desmoieae*). Nevýhody této metody bývají v nutnosti kalibrovat výpočty podle hostitele a symbionta, kdy je občas nutné kalibraci provést znovu i během experimentu. Výhodou této metody je časová a finanční nenáročnost (Peoples et al., 2002).

Dvě z hlavních metod, které se používají pro stanovení rychlosti nesymbiotické fixace, jsou **technika acetylové redukce a inkorporační izotopová metoda** využívající ¹⁵N značený N₂ (Herridge and Giller, 2016). Acetylenová redukce měří aktivitu nitrogenázy, kdy dochází k redukci trojvazebných molekul acetylenu na etylen. Výhodou metody acetylové redukce je její jednoduchost a finanční nenáročnost (Peoples et al., 2002). Jde však zároveň o metodu nepřímou, což je jedna z jejích nevýhod. Nepřesnosti mohou vznikat tím, že acetylen může být zároveň inhibitorem koenzymu nitrogenázy. Výsledný etylén je složkou potřebnou pro růst rostlin a k přenosu jejích signálů, tudíž je také produkován rostlinami a bakteriemi přirozeně, což může také ovlivňovat výslednou rychlost fixace N₂. Rychlosti stanovené touto metodou tedy bývají často nadhodnocené (obrázek 6).

1.1.5 Inkorporační izotopová metoda

Přesnější, ale časově i finančně náročnější než metoda acetylenové redukce je inkorporační izotopová metoda. Ta přímo porovnává množství zafixovaného izotopu $^{15}\text{N}_2$ u vzorků, kterým byl izotop poskytnut během inkubace za optimalizovaných podmínek, s kontrolními vzorky (izotopu nevystavené) (Warembourg, 2012). Jde tedy o potenciál fixace N_2 v kontrolovaných podmínkách. K výzkumu se využívá izotop ^{15}N (výskyt 0,36 %), protože se v přírodě přirozeně vyskytuje v mnohem menším množství než ^{14}N (výskyt 99,64 %) (Wannicke et al., 2018). Výsledný poměr izotopů N v půdě se analyzuje na izotopovém hmotnostním spektrometru (Šantrůček et al., 2018). Tato metoda jde snadno rozšířit o faktory, které mohou inkorporaci $^{15}\text{N}_2$ ovlivnit (např. koncentrace O_2 , přidání zdroje uhlíku). Jako nevýhoda byla zjištěna náchylnost ke kontaminaci vzorků při provádění metody a to jinými plyny ze zdrojového zásobníku $^{15}\text{N}_2$ (např. amoniakem) (Smrcina et al., 2019).

Velká část půdních diazotrofů jsou zároveň i heterotrofové. Jsou proto velmi náchylní na výkyvy resp. stabilitu podmínek prostředí, což zahrnuje dostatečnou vlhkost, dostupnost potřebných živin a optimální výměnu plynů. Nedosažením optimálních podmínek při experimentu se může stát, že naměřené hodnoty biologické nesymbiotické fixace N_2 mohou být nulové nebo umělé (Warembourg, 2012). Smrcina et al. (2019b) zjistili, že míru fixace při inkorporační metodě ovlivňuje i doba inkubace. Pro své vzorky stanovili optimální dobu na 7 dní při 60 % maximální vodní kapacity vzorků a 5 % O_2 . Vše ale doporučují individuálně změnit podle charakteristiky vlastností vzorků půdy, protože rozdíly při optimalizaci inkorporační metody byly velké. Například u 7 denní inkubace byly naměřeny hodnoty 163 x větší než u inkubace jednodenní (Smrcina et al., 2019), což naznačuje, že se mikrobiální společenstvo diazotrofů postupně během inkubace stávalo aktivnějším, pravděpodobně v důsledku postupného přizpůsobení podmínkám prostředí. V případě, že se očekává vysoká rychlost fixace dusíku, tak se může stát, že delší doba inkubace nemusí ale přesně odhadnout potenciál diazotrofů pro fixaci N_2 . Doporučuje se proto přizpůsobit dobu inkubace podle typu ekosystému za účelem minimalizovat změny v mikrobiálních komunitách. V ekosystémech s potenciálně vysokou mírou fixace N_2 (tropické deštné lesy) se doporučuje doba inkubace nižší. Avšak ekosystémy s nižším potenciálem fixace N_2 , jako například tundry nebo temperátní lesy, vyžadují prodloužit dobu inkubace minimálně na 7 dnů (Smrcina et al., 2019).

1.1.6 Kvantifikace bakteriálního genu *NifH*

S rychlým vývojem techniky, a tím i metod molekulární biologie, se v posledních letech rozšířily i způsoby měření biologické fixace N_2 . Jedna z těchto novějších metod zahrnuje kvantifikaci bakteriálního genu *nifH*. Pomocí této metody můžeme určit množství (kvantitu) genu zodpovědného za fixaci N_2 v odebraném vzorku půdy. Gen zde slouží jako takzvaný biomarker biologické fixace N_2 . Určuje pouze genový potenciál pro biologickou fixaci, a proto je často doplňován i jinými typy měření. Princip této metody spočívá v extrakci veškeré bakteriální DNA ze vzorku půdy, namnožení sledovaného genu a určení jeho početnosti pomocí metody qPCR (kvantitativní polymerázové řetězové reakce) (Wallenstein and Vilgalys, 2005). Pro studium fixace dusíku se používá gen *nifH*, který kóduje jeden ze dvou proteinů (Fe protein), jenž je obsažen v komplexu nitrogenáza (obrázek 2; Jones et al., 1993). V genové bance je uloženo okolo 33 000 osekvenovaných vzorků *nifH* genu, které napomáhají k sestavení jeho fylogenetického stromu. S jeho pomocí se např. kompletují informace o rozšíření nitrogenázy napříč organismy a zároveň i o její evoluci (Gaby and Buckley, 2014).

1.3. Hypotézy

- I. Ve vzorcích půd malých lesních povodí ČR bude rychlost fixace N_2 měřitelná laboratorně pomocí $^{15}N_2$ inkorporační metody. Rychlosti se budou lišit napříč povodími, a i v rámci odebraných horizontů s tím, že v organickém horizontu (směs horizontů Of+h) bude naměřen potenciál vyšší než v minerálním (A horizont).
- II. Rychlost fixace bude odpovídat kvantitě *nifH* genu, která bude také vyšší v organickém horizontu, než v minerálním.

2. Materiál a metody

2.1 Lokality odběru půdních vzorků

Použila jsem půdy z malých lesních povodí z výzkumné sítě projektu GEOMON (**Geochemický Monitoring** – projekt České Geologické Služby, obrázek 6) (“O projektu — GEOMON,” 1994). Vybraná povodí (o rozlohách 21 - 254 ha) se nachází v podhorských až horských částech České republiky (průměrná nadmořská výška od 471 do 1301 m n. m.). Všechna povodí, až na dvě, mají kyselá podloží. Lokalita Pluhův Bor leží na hadci a povodí Na Zeleném má jako podklad břidlice. Převládajícími půdními typy jsou kambizemě, podzoly a stagnosoly (Oulehle et al., 2017). Vegetační pokryv většiny lokalit tvoří smrk ztepilý (*Picea abies*). Pouze dvě povodí mají jako dominantní pokryv listnaté stromy (buk lesní, *Fagus sylvatica*, lokality: Lesní potok a Polomka) a povodí Modrý potok má vegetaci alpského charakteru.



Obrázek 6: Mapa rozmístění povodí sítě GEOMON - JEZ – Jezeří, LYS – Lysina, PLB – Pluhův bor, LIT – Litavka, LES – Lesní potok, LIZ – Liz, ANE – Anenský potok, SAL – Salačova Lhota, LKV – Loukov, POM – Polomka, UDL – U Dvou louček, CER – Červík, UHL – Uhlířská, MOD-Modrý potok (převzato z: O projektu — GEOMON, 1994)

2.2 Odběr půdních vzorků

Půda byla odebrána z kvantitativních půdních sond (Oulehle et al., 2021b) během vegetační doby rostlin a rozdělena na kombinovaný organický horizont (Of+h) a svrchní minerální, na organický materiál bohatý, horizont (A), do maximální hloubky 10 cm. Počet odebraných vzorků v daném povodí se pohyboval v rozmezí 5 - 13 v závislosti na velikosti povodí. Pozice sond byla vybírána tak, aby charakterizovala nejčastěji se vyskytující lesní vegetační pokryv a topografii v každém povodí. Čerstvě odebrané vzorky byly na místě přesety přes 0,5 mm síto. Pro molekulární analýzu byla část vzorků ihned po přesetí zamražena. Ke stanovení míry fixace byly vzorky skladovány při 4°C po dobu jednoho týdne.

2.3 Půdní analýzy

2.3.1 Stanovení suché hmotnosti půdy

Podíl sušiny jsem stanovila zvážením půdních vzorků před a po vysušení po dobu 5 h při 105 °C.

2.3.2 Kvantifikace *NifH* genu

2.3.2.1 Extrakce půdní DNA

Ze zamražených vzorků jsem navážila přesné množství půdy v rozsahu 0,245 - 0,255 g do PowerBead Pro Tubes (DNeasy PowerSoil Pro Kit, QIAGEN, Německo) a dále jsem postupovala podle protokolu kitu. Vzorky jsem drtila po dobu 45s v beadbeatru (BioSpec Mini-BeadBeateru 8, USA), a poté jsem vzorky centrifugovala při 14000 g (Hettich MIKRO 185, Německo). Finální objem vyextrahované DNA byl 80 µl. Získaná půdní DNA byla uskladněna při -80 °C.

2.3.2.2 Stanovení koncentrace půdní DNA

Koncentraci DNA jsem měřila na spektrometru (Quantus, Promega, USA). TE Buffer jsem namíchala z 20x zředěného roztoku TE (Thermo Scientific, USA) a molekulární H₂O v poměru 1:20 µl. Výsledný buffer jsem použila k vytvoření QuantiFluor Dye Solution v poměru 199:1 µl s QuantiFluor Dye (Promega, USA). Pro kalibraci přístroje jsem použila blank a standard (tabulka I). Následně jsem měřila koncentraci DNA u jednotlivých vzorků.

Tabulka I: Podíl jednotlivých složek pro přípravu blanku, standardu a měřených vzorků pro přístroj Quantus (Promega, USA).

VZOREK	96 μ l	1x TE	BLANK	100 μ l	1x TE	STANDARD	4 μ l	DNA standard
	4 μ l	DNA vzorek		100 μ l	DYE solution		196 μ l	1x TE
	100 μ l	DYE solution					200 μ l	DYE solution

2.3.2.3 Kvantifikace *nifH* genu metodou qPCR

Vyextrahovanou DNA jsem podle změřené koncentrace naředila v takovém poměru, aby si byly vzorky výslednou koncentrací co nejpodobnější. Nejčastěji jsem používala koncentraci 2:78, vzorek ku molekulární vodě. Takto naředěné vzorky byly připravené na nanesení na destičku (tabulka II) pro stanovení kvantity *nifH* genu pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR).

Tabulka II.: Obecné schéma rozložení produktů na destičku při qPCR.

pořadí na qPCR	DNA				
A1	NEG. KONTROLA-H ₂ O	B7	Vzorek II.	E1	Vzorek XI.
A2	<i>Azotobacter vinelandii</i> Stand.Křiv-koncentrace 10 ⁻³	B8	Vzorek III.	E2	Vzorek XII.
A3	<i>Azotobacter vinelandii</i> Stand.Křiv-koncentrace 10 ⁻³	C1	Vzorek III.	E3	Vzorek XII.
A4	<i>Azotobacter vinelandii</i> Stand.Křiv-koncentrace 10 ⁻⁴	C2	Vzorek IV.	E4	Vzorek XIII.
A5	<i>Azotobacter vinelandii</i> Stand.Křiv-koncentrace 10 ⁻⁴	C3	Vzorek IV.	E5	Vzorek XIII.
A6	<i>Azotobacter vinelandii</i> Stand.Křiv-koncentrace 10 ⁻⁵	C4	Vzorek V.	E6	Vzorek XIV.
A7	<i>Azotobacter vinelandii</i> Stand.Křiv-koncentrace 10 ⁻⁵	C5	Vzorek V.	E7	Vzorek XIV.
A8	<i>Azotobacter vinelandii</i> Stand.Křiv-koncentrace 10 ⁻⁶	C6	Vzorek VI.	E8	Vzorek XV.
B1	<i>Azotobacter vinelandii</i> Stand.Křiv-koncentrace 10 ⁻⁶	C7	Vzorek VI.	F1	Vzorek XV.
B2	<i>Azotobacter vinelandii</i> Stand.Křiv-koncentrace 10 ⁻⁷	C8	Vzorek VII.	F2	Vzorek XVI.
B3	<i>Azotobacter vinelandii</i> Stand.Křiv-koncentrace 10 ⁻⁷	D1	Vzorek VII.	F3	Vzorek XVI.
B4	Vzorek I.	D2	Vzorek VIII.	F4	Vzorek XVII.
B5	Vzorek I.	D3	Vzorek VIII.	F5	NEG. KONTROLA-MMix
B6	Vzorek II.	D4	Vzorek XI.	F6	Vzorek XVII.
		D5	Vzorek XI.	F7	POZ. KONTROLA
		D6	Vzorek X.	F8	POZ. KONTROLA
		D7	Vzorek X.		
		D8	Vzorek XI.		

Pro stanovení standartní křivky, která obsahuje známé množství kopie genu *nifH* (Gupta et al., 2019), jsem použila plazmidy z kultur *Azotobacter vinelandii*. První roztok jsem namíchala v koncentraci 2:18 μ l. Podle desítkového násobného ředění jsem vytvořila dalších 6 standardů, které měly vždy o desetinásobek nižší koncentraci *nifH* genu. Standardy s koncentracemi *nifH* genu v rozmezí 10^{-3} - 10^{-7} jsem používala jako standartní křivku při všech následujících qPCR měřeních.

Jako pozitivní kontrolu, která slouží k ověření, zda byly veškeré ostatní komponenty připraveny dobře, či jestli primery fungují (Moldovan and Moldovan, 2020), jsem používala jeden ze vzorků DNA, který byl 40 x naředěný molekulární vodou o poměru 78:2. Jako negativní kontroly (Moldovan and Moldovan, 2020) jsem používala molekulární H₂O a čistý namíchaný MasterMix (tabulka III).

Jako primery jsem používala dvojici IGK3/DVV v koncentraci 1 μ M. BSA, neboli *bovine serum albumin*, jsem používala ze zásobního 1,2 % roztoku.

Tabulka III.: Schéma poměrů jednotlivých složek, podle kterých jsem míchala Master Mix

	základ	MasterMix
	1x vzorek (μl)	Pro 20 vzorků (μl)
voda	5,86	146,5
FastStartSybrGreenMix (Roche)	10,000	250,0
primer IGK3	0,200	5,0
primer DVV	0,200	5,0
BSA	0,240	6,0
DMSO	0,500	12,5

Do všech jamek na destičce jsem pipetovala vždy 20 μ l MasterMixu. Poté jsem podle předem rozvrženého schématu pipetovala vždy 3 μ l vzorku DNA, standartní křivky, pozitivní kontroly nebo negativní kontroly. Vše ve dvou opakováních. Přístroj qPCR (StepOne qPCR Tower, Applied Biosystems, USA) jsem nastavila na 40 cyklů (95°C/45s, 58 °C/30s, 72 °C/1 min) a počáteční kvantitu 0,33971551. Celková délka qPCR byla 170 minut. První analýzu dat jsem prováděla v systému StepOne qPCR Tower Software (Applied Biosystems, USA), kdy jsem používala threshold hodnotu 0,672482. Na závěr jsem pomocí elektroforézy prováděla kontrolu výsledků ze všech vzorků použitých přímo při qPCR. Výslednou kvantitu *nifH* genu (průměr z obou opakování každého vzorku) jsem přepočítala na gram suché hmotnosti půdy.

2.2.3 Stanovení potenciálu biologické fixace pomocí inkorporace $^{15}\text{N}_2$

2.2.3.1 Inkubace vzorků s $^{15}\text{N}_2$

Navázila jsem 1 g přeseťého čerstvého půdního vzorku do 12 ml plynotěsně uzavíratelných skleněných zkumavek. Půdu jsem ovlhčila 0,25 ml destilované vody, zkumavky lehce uzavřela šroubovacím uzávěrem a před-inkubovala po dobu tří týdnů v inkubátoru (Sanyo, Japonsko) o teplotě 20 °C. Vždy po sedmi dnech inkubace jsem zkumavky otevřela a nechala 10 minut vyvětrat, zároveň jsem je po 14 dnech znovu ovlhčila 0,25 ml destilované vody. Po před-inkubaci jsem vzorky vyvětrala a posléze plynotěsně uzavřela víčky s gumovými septy. Z každé zkumavky jsem injekční stříkačkou s jehlou přes septum odsála 2 ml vzduchu z plynné fáze nad vzorkem a následně vstříkla 2 ml izotopově značeného dusíku N_2 ($^{15}\text{N}_2$, 98 %+, Cambridge Isotope Laboratories, Inc., USA). Po označení jsem vzorky inkubovala po dobu jednoho týdne při 20 °C. Po uplynutí doby inkubace jsem zkumavky otevřela a vzorky sušila v sušárně (Memmert, Německo) při 60 °C po dobu 5 dnů.

2.2.3.2 Příprava vzorků pro analýzu poměru izotopů

Vysušené vzorky značených půd a kontrol jsem rozdrtila v oscilačním kulovém mlýnu (Retsch, MM 400, Německo), vždy po dobu 2 minut na frekvenci 29/s. Namleté vzorky jsem vážila na mikrováhách (Sartorius, Německo) v rozmezí 6 - 7 mg do cínových kapslí (5x9 mm, Sercon, Anglie), které jsem poté zabalila.

2.2.3.3 Analýza poměru izotopů pomocí poměrové hmotnostní spektrometrie

Poměr $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ společně s celkovým množstvím N ve vzorku byl stanoven pomocí izotopového hmotnostního spektrometru (Delta X Plus, Finnigan, Německo) propojeného s NC analyzátozem (Elementar FLASH 2000, Thermo Fisher Sci., Německo).

2.2.3.4 Výpočet rychlosti fixace

Rychlost fixace N₂ jsem spočítala následujícím způsobem (1):

$$\frac{(AE_i \times TN_i)}{(AE_{atm} \times t)} \quad (1)$$

kde AE_i reprezentuje atomprocentický nadbytek (*atompresent excess*), vypočítaný jako rozdíl atomprocenta (%) ¹⁵N půdy vzorků obohacených oproti atomprocentu (%) ¹⁵N půdy kontrolních vzorků. TN_i je celkové množství N ve vzorku v gramech, t je čas inkubace ve dnech a AE_{atm} charakterizuje atomprocentický nadbytek v atmosféře nad vzorkem po zohlednění obsahu ¹⁵N₂ přidaného v průběhu experimentu a veškerého N v atmosféře nad vzorkem (i s předpokladem přirozené koncentrace ¹⁴N₂ a ¹⁵N₂). Výsledná rychlost fixace je uváděna v ng N g⁻¹ d⁻¹ (Roley et al., 2018).

2.2.3.5 Analýza dat

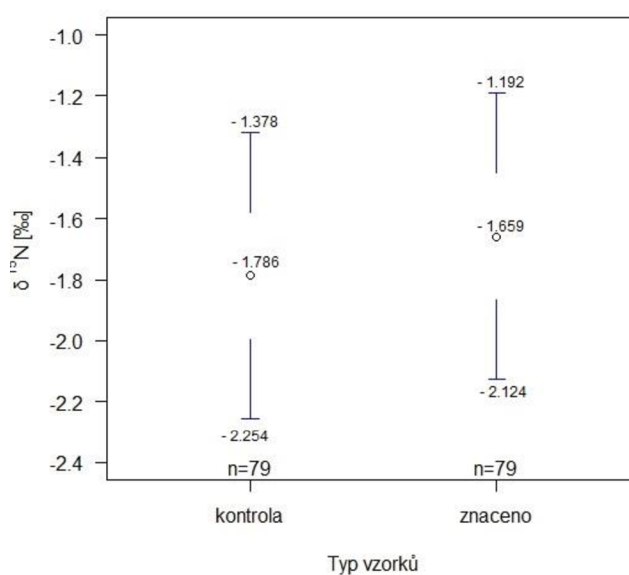
Data jsem analyzovala v programovacím jazyce R (R Core team, 2021) a aplikaci RStudio (RStudio team, 2020) se zvolenou hladinou signifikance p<0,05. Analýzu normálního rozdělení dat (pro deltu ¹⁵N, rychlost fixace N₂ a kvantitu *nifH* genu) jsem provedla pomocí Shapiro-Wilkova testu, který mi potvrdil normalitu rozdělení, a data nebylo třeba transformovat.

Rozdílnost δ¹⁵N značených vzorků a kontrol jsem analyzovala párovým t-testem. Pro vizualizaci výsledků jsem využila balíček *gplots* (Warnes et al., 2022). Rozdíly v rychlosti fixace N₂ a v kvantitě *nifH* mezi jednotlivými povodími a horizonty jsem podrobila, po ověření homogenity variancí Bartlettovým testem, dvoucestné analýze variance (ANOVA) s následným Tukeyho HSD testem (*post-hoc* mnohonásobného porovnání). Vztah kvantity *nifH* genu a rychlosti fixace, jsem ověřila pomocí Personova korelačního koeficientu, jelikož očekávám lineární vztah proměnných. Dále jsem použila jednostranný t-test. Vizualizaci výsledné korelace jsem vytvořila s pomocí knihovny *lattice* (Sarkar, 2008).

3. Výsledky

3.1. Změna $\delta^{15}\text{N}$ během inkubace půdy s $^{15}\text{N}_2$

Pro všech 221 kontrolních vzorků (příloha 1) byla naměřena $\delta^{15}\text{N}$ v průměru $-1,219 \pm 2,089$ ‰. Delta ^{15}N vzorků experimentálně vystavených $^{15}\text{N}_2$ byla v průměru $-1,653 \pm 2,056$ ‰. Dále jsem tedy porovnávala pouze změnu $\delta^{15}\text{N}$ jen u vzorků, které inkorporovaly ^{15}N (celkem 80 z 221 vzorků). $\delta^{15}\text{N}$ ve vzorcích z tohoto výběru se zvýšila v průměru o $0,128 \pm 2,056$ ‰ ($t_{80}=-6,280$, $p<0,001$; obrázek 7).



Obrázek 7: Změna $\delta^{15}\text{N}$ jen pro vzorky, které vykazovaly inkorporaci $^{15}\text{N}_2$. Směrodatná odchylka pro kontrolní vzorky je $\pm 2,189$ ‰ a pro vzorky vystavené $^{15}\text{N}_2$ (znaceno) $\pm 2,056$ ‰. Úsečky značí 95 % konfidenční intervaly a symbol \circ značí průměry hodnot.

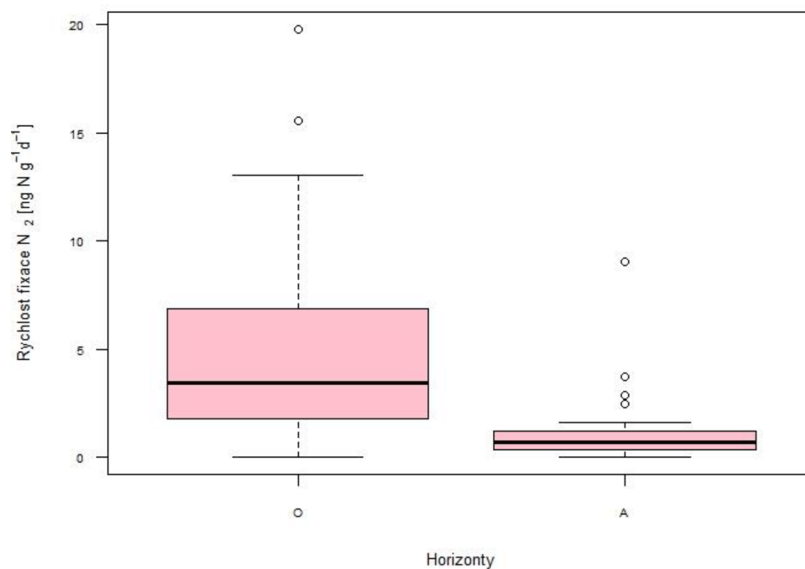
3.2. Rychlost fixace

Fixace byla zaznamenána u 80 vzorků z 221, což odpovídá 36 % z celkového počtu vzorků napříč všemi povodími. Z celkového počtu 14 povodí byla fixace, alespoň v některém z odebraných vzorků, naměřena u 13 z nich (tabulka IV, obrázek 9). V rámci pravých opakování půdních vzorků odebraných v jednotlivých povodích bylo N₂ fixujících od 22 do 57 % (tabulka IV). Pouze ve vzorcích z povodí U Dvou louček (UDL) nebyla zjištěna inkorporace ¹⁵N₂ do půdy v žádném z odebraných půdních vzorků. Zároveň v žádném z povodí se nestalo, že by byla rychlost fixace měřitelná u všech odebraných vzorků. Nejvyšší rychlost fixace byla zaznamenána u vzorku z povodí Modrý potok z organického horizontu (19,779 ng N g⁻¹ d⁻¹). Nevyšší průměrnou rychlost fixace vykazovaly vzorky odebrané v povodí Červík (tabulka IV; 6,107 ± 5,669 ng N g⁻¹ d⁻¹). Naopak nejnižší průměrná rychlost (tabulka IV; 0,991 ± 0,536 ng N g⁻¹ d⁻¹) byla zjištěna u povodí Na Zeleném (obrázek 9).

Tabulka IV: Průměrné rychlosti fixace dusíku v jednotlivých povodích pro oba půdní horizonty dohromady. Zkratky povodí: JEZ – Jezeří, LYS – Lysina, PLB – Pluhův bor, LES – Lesní potok, LIZ – Liz, ANE – Anenský potok, SAL – Salačova Lhota, LKV – Loukov, POM – Polomka, UDL – U Dvou louček, CER – Červík, UHL – Uhlířská, MOD-Modrý potok, NAZ- Na Zeleném. Zkratka SD značí směrodatnou odchylku.

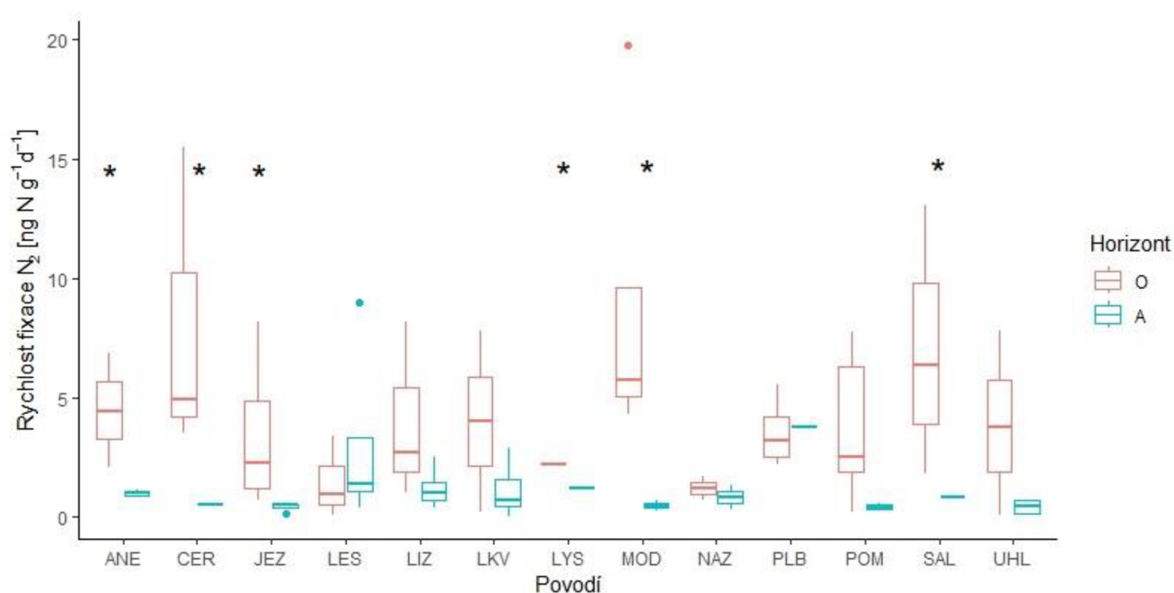
Povodí	Celkový počet odebraných vzorků	Procento fixujících vzorků	Průměrná hodnota fixace [ng N g ⁻¹ d ⁻¹]
ANE	10	40%	2,711 (SD ±2,101)
CER	20	20 %	6,107 (SD ±5,669)
JEZ	26	38 %	2,159 (SD ±2,552)
LES	16	44 %	2,238 (SD ±2,901)
LIZ	20	35 %	2,376 (SD ±2,496)
LKV	14	50 %	1,934 (SD ±2,559)
LYS	9	22 %	1,698 (SD ±0,502)
MOD	17	35 %	6,084 (SD ±6,517)
NAZ	13	31 %	0,991 (SD ±0,536)
PLB	10	50 %	3,559 (SD ±1,176)
POM	14	57 %	2,869 (SD ±2,906)
SAL	20	45 %	5,585 (SD ±4,281)
UHL	20	35 %	1,887 (SD ±2,701)

V organickém horizontu byla průměrná rychlost fixace čtyřikrát vyšší, než v minerálním horizontu a dosáhla výše $4,645 \pm 3,185 \text{ ng N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($F= 15,070$; $p<0,001$; $SD \pm 3,736$; obrázek 8). Rychlost fixace v minerálním horizontu byla v průměru $1,112 \pm 1,611 \text{ ng N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$.



Obrázek 8: Rychlost fixace N₂ v organickém a minerálním horizontu všech povodí. Vodorovné čáry uvnitř boxu značí mediány, obdélník ohraničuje 1. a 3. kvartil dat, vousy dosahují do hodnot minima a maxima a mimo se nacházející kroužky vyznačují odlehle hodnoty. O – organický horizont, A – svrchní minerální horizont.

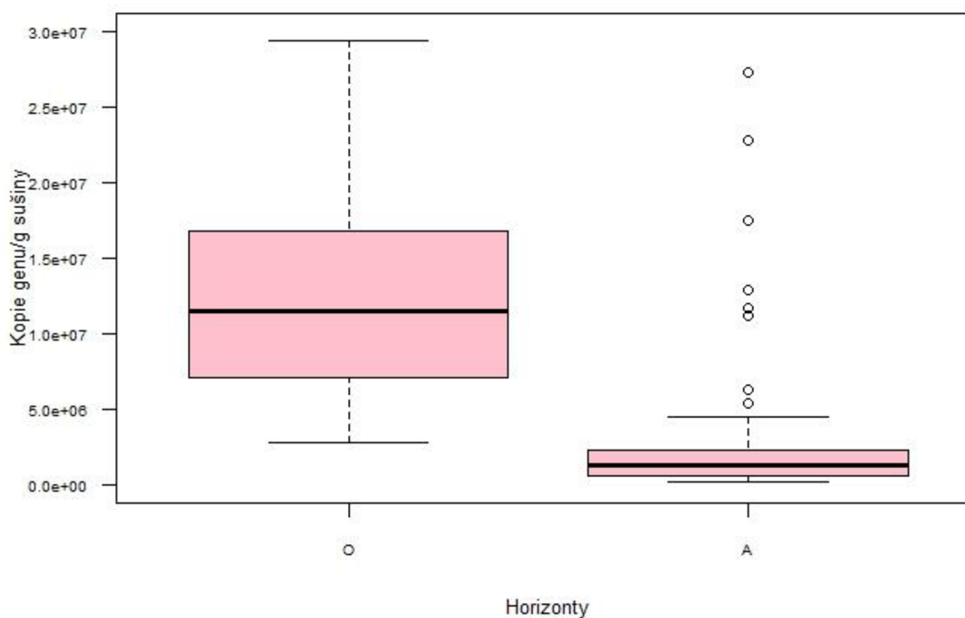
Mezi jednotlivými povodími, ani ve společné interakci obou faktorů (horizont x povodí), nebyl ve fixaci dusíku zjištěn rozdíl (obrázek 9). V rámci jednotlivých povodí byly v šesti případech průkazně vyšší rychlosti v organických, než v minerálních horizontech (Obrázek 9).



Obrázek 9: Rychlosti fixace N₂ v jednotlivých povodích a horizontech. Vodorovné čáry značí mediány, obdélníkové boxy ohraničují 1. a 3. kvartil dat, vousy dosahují do hodnot minima a maxima a mimo se nacházející body vyznačují odlehle hodnoty. Hvězdičky značí signifikantní rozdíly (TukeyHSD) mezi horizonty v rámci jednotlivých povodí. Zkratky povodí: JEZ – Jezeří, LYS – Lysina, PLB – Pluhův bor, LES – Lesní potok, LIZ – Liz, ANE – Anenský potok, SAL – Salačova Lhota, LKV – Loukov, POM – Polomka, UDL – U Dvou louček, CER – Červík, UHL – Uhlířská, MOD-Modrý potok, NAZ-Na Zeleném; O – organický horizont, A – svrchní minerální horizont.

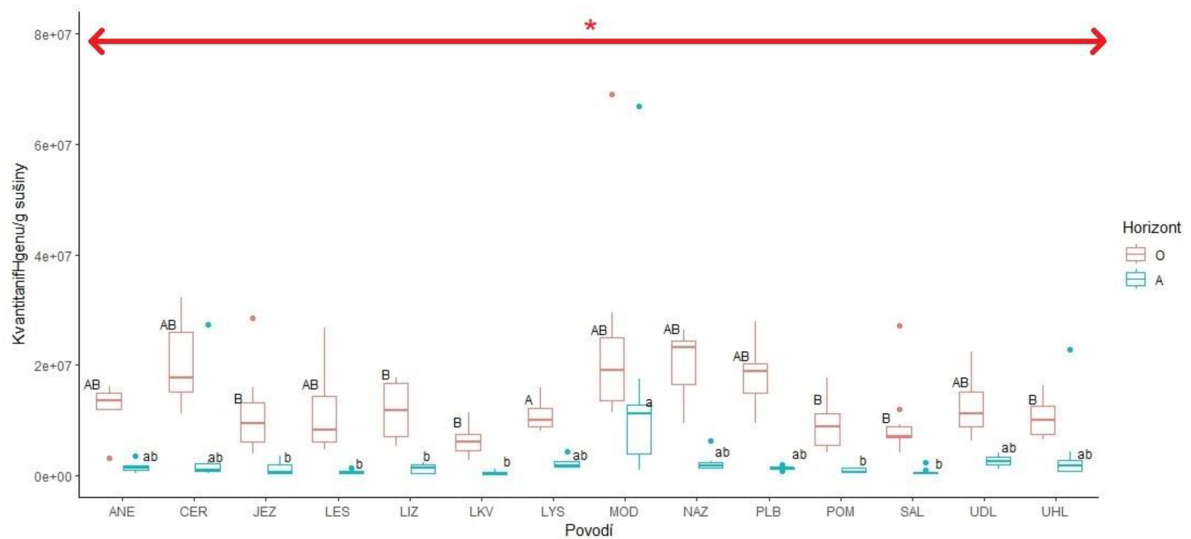
3.3. Kvantita *nifH* genu

Kvantita *nifH* genu byla stanovena a úspěšně ověřena elektroforézou (příloha 3) u 219 vzorků z 221. V povodí Salačova Lhota, v horizontu A, nebyla zaznamenána přítomnost *nifH* genu u jednoho vzorku. Druhý vzorek, který měl nulovou kvantitu genu, pochází z povodí Loukov, také z horizontu A. U obou těchto vzorků byla zároveň nulová fixace N₂. Průměrná kvantita *nifH* genu pro všechny vzorky byla $9,029 \times 10^6 \pm 2,202 \times 10^7$ kopií *nifH* genu g⁻¹ sušiny (příloha 3). Organický horizont měl v průměru $1,479 \times 10^7 \pm 1,767$ kopií *nifH* genu g⁻¹ sušiny. Pro minerální horizont byla jeho kvantita nižší $3,154 \times 10^6 \pm 7,927 \times 10^6$ kopií *nifH* genu g⁻¹ sušiny (obrázek 10).



Obrázek 10: Kvantita *nifH* genu v organickém a minerálním horizontu ve všech povodích. Vodorovné čáry uvnitř boxu značí mediány, obdélník ohraničuje 1. a 3. kvartil dat, vousy dosahují do hodnot minima a maxima a mimo se nacházející kroužky vyznačují odlehle hodnoty. O – organický horizont, A – svrchní minerální horizont.

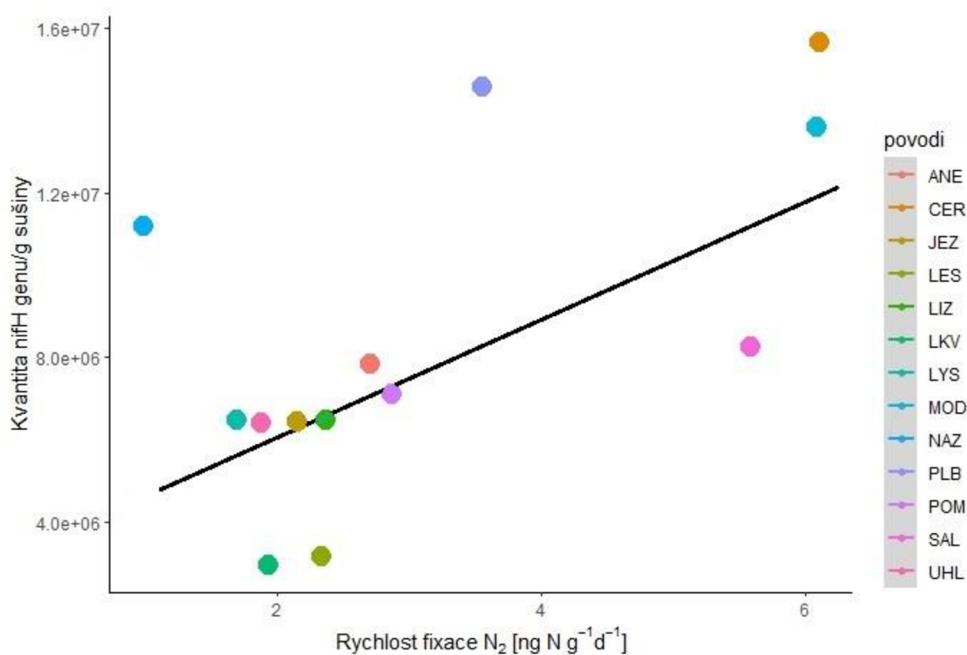
Více se kvantita *nifH* genu liší mezi půdními horizonty ($F_{1,190}=46,718$; $p>0,001$; SD $2,202\times 10^7$ kopií *nifH* genu g^{-1} sušiny; obrázek 11), než mezi jednotlivými povodími ($F_{1,190}=2,816$; $p=0,001$; SD $2,202\times 10^7$ kopií *nifH* genu g^{-1} sušiny), avšak oba rozdíly jsou signifikantní (obrázek 11).



Obrázek 11: Kvantita *nifH* genu rozdělena podle povodí a půdních horizontů. Vodorovné čáry uvnitř boxu značí mediány, obdélník ohraničuje 1. a 3. kvartil dat, vousy dosahují do hodnot minima a maxima a mimo se nacházející kroužky vyznačují odlehle hodnoty. Písmena nad box ploty znázorňují výsledky mnohonásobného porovnávání kvantity genu mezi povodími (Tukey HSD), velká písmena pro organický horizont, malá písmena pro minerální horizont. Hvězdička s červenou šipkou značí, že ve všech povodích byly průkazné rozdíly mezi horizonty (Tukey HSD). O – organický horizont, A – svrchní minerální horizont. Zkratky povodí: JEZ – Jezeří, LYS – Lysina, PLB – Pluhův bor, LES – Lesní potok, LIZ – Liz, ANE – Anenský potok, SAL – Salačova Lhota, LKV – Loukov, POM – Polomka, UDL – U Dvou louček, CER – Červík, UHL – Uhlířská, MOD-Modrý potok, NAZ-Na Zeleném UHL-Uhlířská.

3.4 Vztah mezi kvantitou *nifH* genu a rychlostí fixace N₂

Pro zhodnocení vztahu jsem uvažovala pouze vzorky s naměřenou nenulovou rychlostí fixace a k nim přiřadila odpovídající kvantitativní *nifH* genu. Byla potvrzena pozitivní korelace mezi průměrnou rychlostí fixace N₂ a průměrným výskytem *nifH* genu (obrázek 12) ($r=0,628$, $n=13$, $p=0,01$), čili pokud byla fixace měřitelná, zvyšovala se její rychlost s kvantitou *nifH* genu. Korelace přes všechny dusík fixující vzorky byla také potvrzena (příloha 4).



Obrázek 12: Korelace mezi průměrnou rychlostí fixace N₂ pouze v povodích, kde byla fixace zjištěna, a průměrnou kvantitou *nifH* genu. Hodnoty pro povodí jsou vyobrazeny v průměrech. Zkratky povodí: JEZ – Jezeří, LYS – Lysina, PLB – Pluhův bor, LES – Lesní potok, LIZ – Liz, ANE – Anenský potok, SAL – Salačova Lhota, LKV – Loukov, POM – Polomka, UDL – U Dvou louček, CER – Červík, UHL – Uhlířská, MOD-Modrý potok, NAZ-Na Zeleném. Obrázek je vytvořen v knihovně *gplots* (Warnes et al., 2022).

4. Diskuze

4.1. Rychlost fixace

Nesymbiotická fixace N_2 v půdách je obecně méně prozkoumaným procesem, avšak v novodobějších studiích se tomuto způsobu fixace přidává na stále větší důležitosti (Cleveland et al., 2022). Reed et al. (2011) předpokládají, že nesymbiotická fixace by měla do některých ekosystémů dodávat stejné množství dusíku, jako fixace symbiotická. Navíc, Ladha et al. (2016) stanovili, že má nesymbiotická fixace N_2 potenciál do ekosystémů obecně dodat 13 - 22 % potřebného dusíku, což není zanedbatelná část celkových vstupů dusíku. Předpokládané odhady rychlosti nesymbiotické fixace dusíku se v jednotlivých studiích pohybují na poměrně široké škále (Davies-Barnard and Friedlingstein, 2020). Každá další studie tedy může pomoci tyto odhady pro jednotlivé ekosystémy zpřesnit.

V této práci jsem měřila rychlost nesymbiotické fixace N_2 ve volné půdě metodou inkorporace $^{15}N_2$. Vzorčky pocházely ze 14 lesních povodí v České republice z organického a svrchního minerálního horizontu. Rychlost fixace N_2 , za optimalizovaných laboratorních podmínek, se pohybovala od 1 do 20 $ng\ N\ g^{-1}d^{-1}$, s průměrem $5 \pm 3\ ng\ N\ g^{-1}d^{-1}$ a $1 \pm 2\ ng\ N\ g^{-1}d^{-1}$ v organickém a minerálním horizontu, v tomto pořadí. Rozdíl byl mezi horizonty průkazný. Mezi povodími se však rychlost fixace nelišila.

Rychlost fixace N_2 v jiných studiích se obecně pohybuje v rozmezí 70 $ng\ N\ g^{-1}d^{-1}$ - 52 $\mu g\ N\ g^{-1}d^{-1}$ (Gupta et al., 2019; Reed et al., 2008; Roley et al., 2018; Smercina et al., 2019). Vyšší hodnoty pochází spíše z tropických nebo nížinných systémů. Hodnoty pro rychlost fixace v jehličnatých lesích dosahují v průměru $3 \pm 4\ ng\ N\ g^{-1}d^{-1}$ (Lovett et al., 2004). Högberg et al. (2017) uvádějí pro boreální lesy hodnotu rychlosti fixace v rozmezí 1 – 3 $kg\ N\ ha^{-1}\ rok^{-1}$. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s mou zjištěnou průměrnou rychlostí fixace, která je 2,19 $kg\ N\ ha^{-1}\ rok^{-1}$.

Dvě nejčastěji využívané metody jsou technika acetylové redukce a inkorporační izotopová metoda $^{15}N_2$ (Herridge and Giller, 2016), která byla využita v této práci. Smercina et al. (2019) ve své práci prezentují, že v minulosti hojně využívaná metoda acetylové redukce může způsobovat nepřesné měření rychlosti fixace. Zaznamenali rozdíly v rozmezí 1,3 - 52 $\mu g\ N\ g^{-1}d^{-1}$ při použití metody acetylové redukce a inkorporační izotopové metody u stejných vzorků půd napříč různými ekosystémy. Tyto nepřesnosti v měření jsou podle autorů způsobeny principem acetylové redukce, která výsledky nadhodnocuje. Problémovým se zdá

vznikající etylen, který je zároveň potřebný pro růst rostlin a přenos jejich signálů. Vyskytuje se proto v blízkosti rostlin a mikroorganismů naprosto přirozeně. Jeho hodnoty z tohoto důvodu bývají nadhodnocené (obrázek 6; Peoples et al., 2002). Mnou naměřené rychlosti fixace inkorporační metodou se pohybují v jednotkách až desítkách $\text{ng g}^{-1} \text{d}^{-1}$, tedy srovnatelně s výsledky jiných studií tohoto typu. Hodnoty rychlosti fixace ze studií, které používaly metodu acetylenovou (Reed et al., 2008; Roley et al., 2018; Smercina et al., 2019), se pohybovaly v jednotkách až desítkách $\mu\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$, tedy řádově vyšší.

Výsledky ukazují, že vliv horizontu byl významný (obrázek 8). Očekávala jsem, že minerální horizont, který se nachází ve větší hloubce půdního profilu a obsahuje menší množství organické hmoty, která je navíc již více přetvořená v porovnání s organickým horizontem, bude mít nižší rychlost fixace N_2 což se potvrdilo. V spodnějších půdních horizontech je i následkem nižšího množství substrátu i nižší mikrobiální aktivita (Šantrůčková et al., 2018). S tím, jak klesá v půdě množství a kvalita organické hmoty, a tedy i poměr C/N substrátu pro mikroorganismy, poptávka organismů po nově fixovaném N_2 a i jejich aktivita může být nižší z důvodu větší limitace uhlíkem. Stejně významný rozdíl v hodnotách fixace napříč horizonty zaznamenali Kreibrich and Kern (2002), když naměřili metodou acetylenové redukce 3x větší rychlost fixace u vzorků z hloubky do 5 cm než v těch od 5 cm do 10 cm hloubky. Negativní korelace rychlosti fixace s hloubkou půdy byla potvrzena do hloubky až 50 cm v půdách lesních ekosystémů (Son, 2001).

Řádově rozdílné hodnoty rychlostí fixace napříč studiemi ze stejných ekosystémů a fakt, že u většiny vzorků (64 %) povodí GEOMON jsem fixaci N_2 nezaznamenala, můžou být dány jednak (i) vysokou přirozenou variabilitou prostředí lesních půd (Baldrian, 2017), nebo (ii) rozdílnou manipulací se vzorky a nastavením parametrů inkubace půd. Jsou známy různé alternativy při provádění techniky inkorporační izotopové metody $^{15}\text{N}_2$. Inkubační teploty můžou být rozdílné, je důležité dbát na nižší procento O_2 a dostatečnou vlhkost vzorků. Odebrané vzorky se můžou před inkubací obohatit nejen o vodu, ale i o zdroj organického uhlíku. Jedním z faktorů, který ovlivňuje rychlost fixace N_2 je teplota. Rousk et al. (2016) zjistili vztah mezi rychlostí fixace N_2 a nadmořskou výškou. Jedna z příčin tohoto jevu může být, že ve vyšších nadmořských výškách je nižší průměrná teplota, což může ovlivňovat funkci enzymu nitrogenázy, který katalyzuje reakci štěpení trojné vazby N_2 , a který má teplotní optimum funkce $25\text{ }^\circ\text{C}$ (Mohammadi et al., 2012). My jsme pro inkubaci půd použili teplotu $20\text{ }^\circ\text{C}$, tedy o pět stupňů nižší než je optimum, ale která více odpovídá nižším naměřeným

průměrným ročním teplotám vzduchu pro lokace sítě GEOMON (6°C - 9°C; Oulehle et al., 2021a). Nadmořská výška zkoumaných lokací se pohybuje v rozmezí 500 - 1300 m n. m.. Průměrně nízké teploty a vyšší nadmořská výška pak proto můžou vysvětlovat nižší a častokrát i nulové rychlosti fixace N₂. Například půdy v povodí Polomka fixovaly dusík v 57 procentech případů odebraných vzorků (nejvyšší procento fixovaných vzorků ze všech povodí; tabulka IV) a zároveň se průměrná teplota povodí pohybuje na vyšší škále (8°C). Pro přesnější stanovení maximálního potenciálu rychlosti fixace v půdách by bylo potřeba inkubovat vzorky při více teplotách a zjistit optimální teplotu, na kterou jsou mikroorganismy v těchto spíše výše položených půdách adaptováni. Teplotu inkubace jsem pro mé vzorky pozměnila od všeobecného optima, protože se vzorky převážně nacházely ve vyšších nadmořských výškách a tím se může optimální teplota metabolických procesů snížit (Briones, 2018). Dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje fixaci dusíku, je pH půdy (obrázek 7; Nohrstedt, 1985). Většina půdních vzorků se odebírala v lesích, kde dominoval smrk. Na třech lokacích (Jezeří, Lesní Potok a Polomka) se nacházely i listnaté druhy vegetace. V GEOMON lokacích se pH půdy pohybovalo od 4,5 až do 3,7 (Oulehle et al., 2021b). Pro půdy povodí se smíšenými lesy byly naměřené vyšší hodnoty pH (4,6 - 4,3). Průměrné míry fixace pro ně nebyly ale vyšší než u ostatních povodí. U povodí s nejnižším naměřeným pH půdy (Salačova Lhota; pH 3,7) také nebyly naměřeny průkazně nižší hodnoty než v ostatních povodích.

V některých studiích, se kterými jsem svá data porovnávala, nebyly vzorky po odebrání přesety (Gupta et al., 2019; Reed et al., 2008), takže obsahovaly i zbytky kořenů rostlin. Mikroorganismy se více vyskytují a jsou aktivnější v oblasti kořenů a kořenových vlásků z důvodů využívání rhizodepozice (Šantrůčková et al., 2018). Z tohoto důvodu lze předpokládat, že na množství dostupného uhlíku (energie) náročným diazotrofům, se lépe bude dařit v přítomnosti kořenů a rychlost fixace N₂ by mohla být v jejich přítomnosti vyšší. Mé vzorky byly homogenizovány přes síto s velikostí oka 0,5 mm, tudíž šlo spíše o volnou půdu, která byla kořenů v podstatě zbavena. Jelikož se vzorky nebylo ihned po odběru pracováno, byly skladovány při teplotě 4 °C. Následně byly před vlastním stanovením fixace N₂ tři týdny před-inkubovány při 20°C, a ovlhčeny na jejich 50 – 80 % maximální vodní kapacity. Přestože tedy byly mikroorganismy pravděpodobně uvyklé teplotě 20°C a půdy nebyly suché, nemohu vyloučit, že propracovanější optimalizací parametrů inkubace, případně měřením fixace N₂ ihned po odběru, by mohlo být dosaženo vyšších rychlostí fixace N₂, případně by mohlo větší procento vzorků v povodích dusík fixovat.

Při umělému přidání uhlíku do vzorků, dochází ke zvýšení poměru C/N a zároveň s tím se zvýší poptávka mikroorganismů po N₂ (Šantrůčková et al., 2018). Při tomto způsobu provedení metody byly naměřeny až 17x větší míry rychlosti nesymbiotické fixace než u těch, které byly obohaceny jen o vodu (Smercina et al., 2019) a tedy srovnatelné s rychlostmi stanovenými v této práci. Lze předpokládat, že přidáním uhlíku při inkubaci by se mohly zvýšit hodnoty rychlosti fixace N₂. Například u povodí U Dvou louček, kde jsem vůbec nezaznamenala inkorporaci izotopu ¹⁵N₂ byl zároveň změřen jeden z nejnižších poměrů C/N půdy (20; Oulehle et al., 2021a).

Nulově naměřené rychlosti fixace u některých vzorků mohou být způsobeny také kontaminací O₂. Přítomnost O₂ zabraňuje správnému fungování nitrogenázy (Son, 2001). Optimální vlhkost vzorků je důležitá nejen pro metabolismus diazotrofií, zároveň se voda upíná na nitrogenázu, čímž jí obklopuje a zamezuje tak kontaktu s O₂ (Davidson and Janssens, 2006). Ideální koncentrace O₂ při inkorporaci ¹⁵N₂ byla stanovena na 5 % (obrázek 6; Inomura et al., 2018). Já jsem ve fázi pre-inkubace vzorky dostatečně ovlhčila a uzavřela do plynotěsných zkumavek malého objemu. Podmínka pro optimální koncentraci O₂ by proto měla být splněna a tento faktor byl neměl příliš ovlivňovat mé výsledky. V budoucnu by však bylo vhodné ověřit koncentrace O₂ během inkubace přímo, např. pomocí čidel, nebo plynového chromatografu.

4.2. Kvantita *nifH* genu a její vztah k rychlosti fixace

Pro vzorky odebrané v rámci sítě GEOMON se kvantita *nifH* pohybovala od 0 (pro dvě lokace nebyl zaznamenán žádný výskyt *nifH* genu) do $1,7 \times 10^8$ kopií *nifH* genu g⁻¹ sušiny (povodí Lysina), s průměrnou kvantitou $9,0 \times 10^6 \pm 2,2 \times 10^7$ kopií *nifH* genu g⁻¹ sušiny (příloha 3). Ve studiích prováděných v podobných temperátních/boreálních lesích se kvantita *nifH* pohybovala v rozmezí 8,8 - $9,0 \times 10^7$ kopií *nifH* genu g⁻¹ sušiny (Levy-Booth and Winder, 2010; Meng et al., 2019), což je v průměru více než ukazují moje výsledky. Některé z mých vzorků však vykazovaly hodnoty i vyšší např. z povodí Lysina ($1,7 \times 10^8$ kopií *nifH* genu g⁻¹ sušiny, nebo Modrý potok ($6,9 \times 10^7$ kopií *nifH* genu g⁻¹ sušiny).

Kvantity genu se na rozdíl od fixace N₂ signifikantně liší napříč povodími (obrázek 11). Jelikož přítomnost genu nezaručuje jeho reálné fungování v ekosystému, využívají se ve studiích hodnoty kvantity genů spolu s výsledky jiných metod. Hodnoty kvantity genů fungují jako podpůrné hodnoty, které slouží k pochopení fungování mikroorganismů a pomáhají

uplatnit tyto poznatky ve funkční ekologii (Zhu et al., 2022). Přítomnost genu tedy nezaručuje jeho aktivitu. To může být jedno z vysvětlení, proč se kvantita genu napříč povodími signifikantně liší, i když fixace N_2 ne a proč v některých povodích byl v půdách gen přítomen, ale fixace N_2 nebyla měřitelná. Nulové hodnoty pro kvantitu *nifH* genu byly zároveň naměřeny u stejných vzorků, u kterých nebyla zjištěna fixace N_2 inkorporační izotopovou metodou. Stejně jako výsledky z inkorporační izotopové metody byla kvantita genu *nifH* ovlivněna faktorem půdního horizontu (obrázek 10). U organického horizontu byla naměřena vyšší kvantita genu pro fixaci N, než v horizontu minerálním. Mergel at. al. (2001) naměřili dvakrát vyšší kvantitu genu *nifH* u vzorků ze svrchního horizontu lesních půd, než tomu bylo u vzorků z hloubky 10 cm. Pozitivní vztah kvantity *nifH* genu a rychlosti fixace N_2 (obrázek 12), i když nepřilíší těsný, tedy naznačuje, že stejné faktory, které ovlivňují rychlost fixace v jednotlivých horizontech, zejména kvalita a množství organického substrátu a pH, mohou ovlivňovat i kvantitu *nifH* genu.

Nedohledala jsem žádnou studii, která by se obecně zabývala korelací kvantity *nifH* genu s rychlostí fixace N_2 . V této společné interakci je proto stále mnoho neobjasněného. Další práce s daty by mohla spočívat v porovnání biochemických parametrů půd všech povodí s kvantitami genu a rychlostmi fixace s cílem najít faktory, které by variabilitu v datech pomohly vysvětlit.

5. Závěr

V této práci jsem změřila rychlost nesybiotické fixace N_2 pomocí $^{15}N_2$ inkorporační metody ve vybraných lesních půdách ČR a porovnála je s kvantitou *nifH* genu. Rychlosti fixace se mezi povodími nelišily, zatímco genový potenciál pro fixaci N průkazně ano. Fixace N_2 byla zaznamenána jen u 36 % vzorků, ale geny jsme našla téměř ve všech odebraných půdách (u 99,1 %). To znamená, že přítomnost *nifH* genu určitě neznamená jeho aktivitu ani v optimalizovaných podmínkách. Byly zaznamenány průkazné rozdíly v rychlosti fixace N_2 i v kvantitě *nifH* genu mezi půdními horizonty. Několikanásobně vyšší rychlost fixace N_2 byla naměřena v organickém horizontu než ve svrchním minerálním horizontu, stejně tak kvantita *nifH* genu byla vyšší v horizontu organickém než v minerálním. Korelace mezi rychlostí fixace N_2 a kvantitou *nifH* genu byla pozitivní. Z výsledků je zřejmé, že i nesybiotická fixace N_2 může být významná ve volné půdě lesních ekosystémů.

6. Použitá literatura

- Arnosti, C., Bell, C., Moorhead, D.L., Sinsabaugh, R.L., Steen, A.D., Stromberger, M., Wallenstein, M., Weintraub, M.N., 2014. Extracellular enzymes in terrestrial, freshwater, and marine environments: perspectives on system variability and common research needs. *Biogeochemistry* 117, 5–21. <https://doi.org/10.1007/s10533-013-9906-5>
- Augustyn, A., 2023. Nitrogen fixation: chemical reaction. *Britannica*.
- Baldrian, P., 2017. Forest microbiome: diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 109–130. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw040>
- Balinski, A., Watson, J., 2017. Nitrogenase; Nitrogen Fixation vs Haber-Bosch Process.
- Barron, A., Wurzburger, N., Bellenger, J.-P., Wright, S.J., Kraepiel, A., Hedin, L., 2008. Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils. *Nat. Geosci. - NAT GEOSCI* 2, 42–45. <https://doi.org/10.1038/ngeo366>
- Bellenger, J.P., Darnajoux, R., Zhang, X., Kraepiel, A.M.L., 2020. Biological nitrogen fixation by alternative nitrogenases in terrestrial ecosystems: a review. *Biogeochemistry* 149, 53–73. <https://doi.org/10.1007/s10533-020-00666-7>
- Belnap, J., Lange, O.L. (Eds.), 2003. *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management, Ecological Studies*. Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-56475-8>
- Bezdicek, D.F., Kennedy, A.C., 1998. *Microorganisms in action*, 1. ed. Blackwell, Oxford.
- Bishop, P.E., Joerger, R.D., 1990. Genetics and Molecular Biology of Alternative Nitrogen Fixation Systems. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 109–125. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.41.060190.000545>
- Bottomley, P.J., Myrold, D.D., 2007. 14 - BIOLOGICAL N INPUTS, in: Paul, E.A. (Ed.), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Third Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 365–387. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047514-1.50018-4>
- Breznak, J.A., Brill, W.J., Mertins, J.W., Coppel, H.C., 1973. Nitrogen Fixation in Termites. *Nature* 244, 577–580. <https://doi.org/10.1038/244577a0>
- Briones, M.J.I., 2018. Book Review: *Fundamentals of Soil Ecology (Third Edition)*. *Front. Environ. Sci.* 6.
- Britton, A., Fielding, D., Pakeman, R., 2023. Nitrogen and climate A review of the interactive effects of nitrogen deposition and climate change on Scottish semi-natural ecosystems. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7547364>
- Burns, R.C., Hardy, R.W.F., 2012. *Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants*. Springer Science & Business Media.

- Cleveland, C.C., Houlton, B.Z., Smith, W.K., Marklein, A.R., Reed, S.C., Parton, W., Grosso, S.J.D., Running, S.W., 2013. Patterns of new versus recycled primary production in the terrestrial biosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 12733.
- Cleveland, C.C., Reis, C.R.G., Perakis, S.S., Dynarski, K.A., Batterman, S.A., Crews, T.E., Gei, M., Gundale, M.J., Menge, D.N.L., Peoples, M.B., Reed, S.C., Salmon, V.G., Soper, F.M., Taylor, B.N., Turner, M.G., Wurzbarger, N., 2022. Exploring the Role of Cryptic Nitrogen Fixers in Terrestrial Ecosystems: A Frontier in Nitrogen Cycling Research. *Ecosystems* 25, 1653–1669. <https://doi.org/10.1007/s10021-022-00804-2>
- Craine, J.M., Brookshire, E.N.J., Cramer, M.D., Hasselquist, N.J., Koba, K., Marin-Spiotta, E., Wang, L., 2015. Ecological interpretations of nitrogen isotope ratios of terrestrial plants and soils. *Plant Soil* 396, 1–26. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2542-1>
- Dalton, D., Kramer, S., 2006. Nitrogen-fixing bacteria in non-legumes, in: *Plant-Associated Bacteria*. pp. 105–130. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_3
- Davidson, E.A., Janssens, I.A., 2006. Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature* 440, 165–173. <https://doi.org/10.1038/nature04514>
- Davies-Barnard, T., Friedlingstein, P., 2020. The Global Distribution of Biological Nitrogen Fixation in Terrestrial Natural Ecosystems. *Glob. Biogeochem. Cycles* 34. <https://doi.org/10.1029/2019GB006387>
- Dawson, J., 2011. Dinitrogen fixation on forested ecosystems. *Can. Joournal Microbiol.* 29, 979–992.
- de Vries, S., de Vries, J., 2018. Azolla: A Model System for Symbiotic Nitrogen Fixation and Evolutionary Developmental Biology, in: Fernández, H. (Ed.), *Current Advances in Fern Research*. Springer International Publishing, Cham, pp. 21–46. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75103-0_2
- Delwiche, C.C., 1970. The nitrogen cycle. *Sci. Am.* 223, 137–146.
- Elbert, W., Weber, B., Burrows, S., Steinkamp, J., Büdel, B., Andreae, M.O., Pöschl, U., 2012. Contribution of cryptogamic covers to the global cycles of carbon and nitrogen. *Nat. Geosci.* 5, 459–462. <https://doi.org/10.1038/ngeo1486>
- Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M., Cape, J., Reis, S., Sheppard, L., Jenkins, A., Grizzetti, B., Galloway, J., Vitousek, P., Leach, A., Bouwman, A., Butterbach-Bahl, K., Dentener, F., Amann, M., Voss, M., 2013. The Global Nitrogen Cycle in the Twenty-First Century. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368, 20130164. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>
- Gaby, J.C., Buckley, D.H., 2014. A comprehensive aligned nifH gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria. *Database J. Biol. Databases Curation* 2014, bau001. <https://doi.org/10.1093/database/bau001>

- Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J.W., Seitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, E.B., Cosby, B.J., 2003. The Nitrogen Cascade. *BioScience* 53, 341–356. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2003\)053\[0341:TNC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2003)053[0341:TNC]2.0.CO;2)
- Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., Karl, D.M., Michaels, A.F., Porter, J.H., Townsend, A.R., Vöösmary, C.J., 2004. Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry* 70, 153–226. <https://doi.org/10.1007/s10533-004-0370-0>
- Gouda, S., Das, G., Sen, S.K., Shin, H.-S., Patra, J.K., 2016. Endophytes: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. *Front. Microbiol.* 7, 1538. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01538>
- Granhall, U., Lindberg, T., 1978. Nitrogen Fixation in Some Coniferous Forest Ecosystems. *Ecol. Bull.* 178–192.
- Green, P., Vöösmary, C., Meybeck, M., Galloway, J., Peterson, B., Boyer, E., 2004. Pre-Industrial and Contemporary Fluxes of Nitrogen Through Rivers: A Global Assessment Based on Typology. *Biogeochemistry* 68, 71–105. <https://doi.org/10.1023/B: BIOG.0000025742.82155.92>
- Gruber, N., Galloway, J.N., 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451, 293–296. <https://doi.org/10.1038/nature06592>
- Gundersen, P., 1991. Nitrogen deposition and the forest nitrogen cycle: role of denitrification. *For. Ecol. Manag., Denitrification in Forest Ecosystems* 44, 15–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(91\)90194-Z](https://doi.org/10.1016/0378-1127(91)90194-Z)
- Gupta, V.V.S.R., Zhang, B., Penton, C.R., Yu, J., Tiedje, J.M., 2019. Diazotroph Diversity and Nitrogen Fixation in Summer Active Perennial Grasses in a Mediterranean Region Agricultural Soil. *Front. Mol. Biosci.* 6.
- Herridge, D., Giller, K., 2016. Measurement of nitrogen fixation.
- Hicks, W.T., Harmon, M.E., Griffiths, R.P., 2003. Abiotic controls on nitrogen fixation and respiration in selected woody debris from the Pacific Northwest, U.S.A. *Écoscience* 10, 66–73. <https://doi.org/10.1080/11956860.2003.11682752>
- Högberg, P., Näsholm, T., Franklin, O., Högberg, M.N., 2017. Tamm Review: On the nature of the nitrogen limitation to plant growth in Fennoscandian boreal forests. *For. Ecol. Manag.* 403, 161–185. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.04.045>
- Houlton, B.Z., Morford, S.L., Dahlgren, R.A., 2018. Convergent evidence for widespread rock nitrogen sources in Earth's surface environment. *Science* 360, 58–62. <https://doi.org/10.1126/science.aan4399>
- Hutchinson, G.E., 1944. Nitrogen in the Biogeochemistry of the Atmosphere. *Am. Sci.* 32, 178–195.
- Hyodo, F., Takebayashi, Y., Makabe, A., Wardle, D.A., Koba, K., 2021. Changes in stable nitrogen isotopes of plants, bulk soil and soil dissolved N during ecosystem

- retrogression in boreal forest. *Ecol. Res.* 36, 420–429. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.12208>
- IGBP - IGBP [WWW Document], 2023. URL <http://www.igbp.net> (accessed 8.20.23).
- Inomura, K., Bragg, J., Riemann, L., Follows, M.J., 2018. A quantitative model of nitrogen fixation in the presence of ammonium. *PLoS ONE* 13, e0208282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208282>
- Jones, R., Woodley, P., Birkmann-Zinoni, A., Robson, R.L., 1993. The *nifH* gene encoding the Fe protein component of the molybdenum nitrogenase from *Azotobacter chroococcum*. *Gene* 123, 145–146. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90555-h](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90555-h)
- Kreibich, H., Kern, J., 2003. Nitrogen fixation and denitrification in a floodplain forest near Manaus, Brazil. *Hydrol. Process.* V17 1431-1441 2003 17. <https://doi.org/10.1002/hyp.1294>
- Kyveryga, P.M., Blackmer, A.M., Ellsworth, J.W., Isla, R., 2004. Soil pH Effects on Nitrification of Fall-Applied Anhydrous Ammonia. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 68, 545–551. <https://doi.org/10.2136/sssaj2004.5450>
- Ladha, J.K., Peoples, M.B., Reddy, P.M., Biswas, J.C., Bennett, A., Jat, M.L., Krupnik, T.J., 2022. Biological nitrogen fixation and prospects for ecological intensification in cereal-based cropping systems. *Field Crops Res.* 283, 108541. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2022.108541>
- Ladha, J.K., Tirol-Padre, A., Reddy, C.K., Cassman, K.G., Verma, S., Powlson, D.S., van Kessel, C., de B. Richter, D., Chakraborty, D., Pathak, H., 2016. Global nitrogen budgets in cereals: A 50-year assessment for maize, rice and wheat production systems. *Sci. Rep.* 6, 19355. <https://doi.org/10.1038/srep19355>
- Levy-Booth, D.J., Winder, R.S., 2010. Quantification of Nitrogen Reductase and Nitrite Reductase Genes in Soil of Thinned and Clear-Cut Douglas-Fir Stands by Using Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7116–7125. <https://doi.org/10.1128/AEM.02188-09>
- Li, C.Y., Maser, C., 1986. New and modified techniques for studying nitrogen-fixing bacteria in small mammal droppings. Res Note PNW-RN-441 Portland US Dep. Agric. For. Serv. Pac. Northwest Res. Stn. 4 P 441. <https://doi.org/10.2737/PNW-RN-441>
- Lovett, G.M., Weathers, K.C., Arthur, M.A., Schultz, J.C., 2004. Nitrogen cycling in a northern hardwood forest: Do species matter? *Biogeochemistry* 67, 289–308. <https://doi.org/10.1023/B:BIOG.0000015786.65466.f5>
- McCormack, M.L., Dickie, I.A., Eissenstat, D.M., Fahey, T.J., Fernandez, C.W., Guo, D., Helmisaari, H.-S., Hobbie, E.A., Iversen, C.M., Jackson, R.B., Leppälampi-Kujansuu, J., Norby, R.J., Phillips, R.P., Pregitzer, K.S., Pritchard, S.G., Rewald, B., Zadworny, M., 2015. Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. *New Phytol.* 207, 505–518. <https://doi.org/10.1111/nph.13363>

- Meng, H., Zhou, Z., Wu, R., Wang, Y., Gu, J.-D., 2019. Diazotrophic microbial community and abundance in acidic subtropical natural and re-vegetated forest soils revealed by high-throughput sequencing of *nifH* gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 995–1005. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9466-7>
- Meyerholt, J., Zaehle, S., Smith, M.J., 2016. Variability of projected terrestrial biosphere responses to elevated levels of atmospheric CO₂ due to uncertainty in biological nitrogen fixation. *Biogeosciences* 13, 1491–1518. <https://doi.org/10.5194/bg-13-1491-2016>
- Mohammadi, K., Sohrabi, Y., Heidari, G., Khalesro, S., Majidi, M., 2012. Effective factors on biological nitrogen fixation. *Afr J Agric Res* 7. <https://doi.org/10.5897/AJARX11.034>
- Moldovan, E., Moldovan, V., 2020. Controls in Real-Time Polymerase Chain Reaction Based Techniques. *Acta Medica Marisiensis* 66, 79–82. <https://doi.org/10.2478/amma-2020-0025>
- Nair, D.N., Padmavathy, S., 2014. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *ScientificWorldJournal* 2014, 250693. <https://doi.org/10.1155/2014/250693>
- Nohrstedt, H.-Ö., 1985. Nonsymbiotic nitrogen fixation in the topsoil of some forest stands in central Sweden. *Can. J. For. Res.* 15, 715–722. <https://doi.org/10.1139/x85-116>
- O projektu — GEOMON [WWW Document], 1994. URL <http://www.geology.cz/geomon/o-projektu> (accessed 8.17.23).
- Oses, R., Frank, A.C., Valenzuela, S., Rodríguez, J., 2018. Nitrogen Fixing Endophytes in Forest Trees, in: Pirttilä, A.M., Frank, A.C. (Eds.), *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications*, Forestry Sciences. Springer International Publishing, Cham, pp. 191–204. https://doi.org/10.1007/978-3-319-89833-9_9
- Oulehle, F., Chuman, T., Hruška, J., Krám, P., McDowell, W.H., Myška, O., Navrátil, T., Tesař, M., 2017. Recovery from acidification alters concentrations and fluxes of solutes from Czech catchments. *Biogeochemistry* 132, 251–272. <https://doi.org/10.1007/s10533-017-0298-9>
- Oulehle, F., Fischer, M., Hruška, J., Chuman, T., Krám, P., Navrátil, T., Tesař, M., Trnka, M., 2021a. The GEOMON network of Czech catchments provides long-term insights into altered forest biogeochemistry: From acid atmospheric deposition to climate change. *Hydrol. Process.* 35. <https://doi.org/10.1002/hyp.14204>
- Oulehle, F., Goodale, C.L., Evans, C.D., Chuman, T., Hruška, J., Krám, P., Navrátil, T., Tesař, M., Ač, A., Urban, O., Tahovská, K., 2021b. Dissolved and gaseous nitrogen losses in forests controlled by soil nutrient stoichiometry. *Environ. Res. Lett.* 16, 064025. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ac007b>
- Padappayil, R.P., Borger, J., 2023. Ammonia Toxicity, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

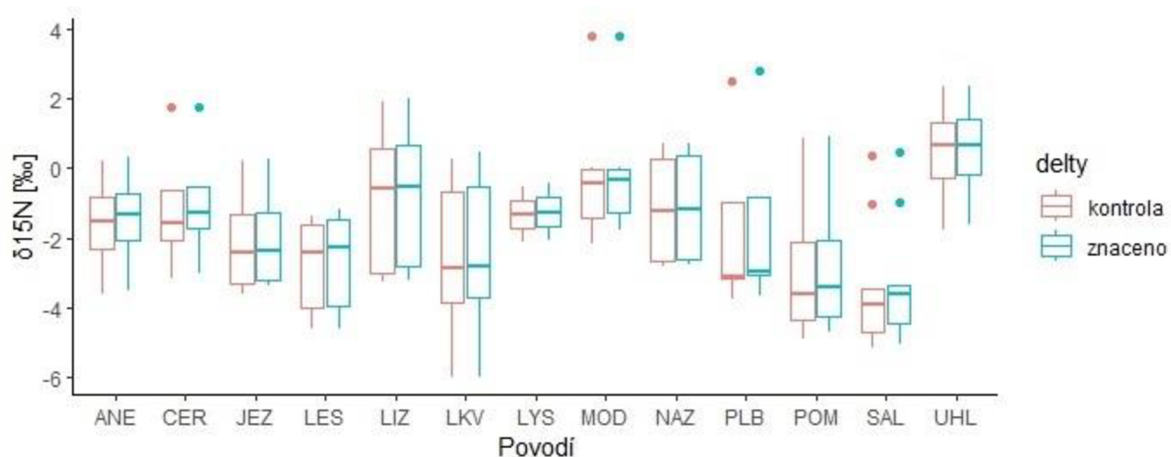
- Peng, J., Dan, L., Wang, Y., Tang, X., Yang, X., Yang, F., Lu, X., Pak, B., 2018. How biological nitrogen fixation and climate change contribute to future terrestrial carbon sequestration from the global to biome scale. *J. Clean. Prod.* 202. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.08.089>
- Peoples, M., Boddey, R., Herridge, D., 2002. Quantification of Nitrogen Fixation. pp. 357–389. <https://doi.org/10.1016/B978-044450965-9/50013-6>
- Piotrowska-Długosz, A., Długosz, J., Gryta, A., Frąc, M., 2022. Responses of N-Cycling Enzyme Activities and Functional Diversity of Soil Microorganisms to Soil Depth, Pedogenic Processes and Cultivated Plants. *Agronomy* 12, 264. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020264>
- R Core team, 2021. R: A language and environment for statistical computing.
- Reed, S., Cleveland, C., Townsend, A., 2011. Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 42, 489–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145034>
- Reed, S.C., Cleveland, C.C., Townsend, A.R., 2013. Relationships among phosphorus, molybdenum and free-living nitrogen fixation in tropical rain forests: results from observational and experimental analyses. *Biogeochemistry* 114, 135–147. <https://doi.org/10.1007/s10533-013-9835-3>
- Reed, S.C., Cleveland, C.C., Townsend, A.R., 2008. Tree Species Control Rates of Free-Living Nitrogen Fixation in a Tropical Rain Forest. *Ecology* 89, 2924–2934.
- Remigi, P., Zhu, J., Young, J.P.W., Masson-Boivin, C., 2016. Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. *Trends Microbiol.* 24, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.007>
- Robinson, E., Robbins, R.C., 1970. Gaseous Atmospheric Pollutants from Urban and Natural Sources, in: Singer, S.F. (Ed.), *Global Effects of Environmental Pollution: A Symposium Organized by the American Association for the Advancement of Science Held in Dallas, Texas, December 1968*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 50–64. https://doi.org/10.1007/978-94-010-3290-2_7
- Roley, S.S., Duncan, D.S., Liang, D., Garoutte, A., Jackson, R.D., Tiedje, J.M., Robertson, G.P., 2018. Associative nitrogen fixation (ANF) in switchgrass (*Panicum virgatum*) across a nitrogen input gradient. *PLOS ONE* 13, e0197320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197320>
- Roper, M.M., Gupta, V.V.S.R., 2016. Enhancing Non-symbiotic N Fixation in Agriculture. *Open Agric. J.* 10. <https://doi.org/10.2174/1874331501610010007>
- Rotter, P., Loreau, M., de Mazancourt, C., 2020. Why do forests respond differently to nitrogen deposition? A modelling approach. *Ecol. Model.* 425, 109034. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2020.109034>

- Rousk, K., Degboe, J., Michelsen, A., Bradley, R., Bellenger, J.-P., 2017. Molybdenum and phosphorus limitation of moss-associated nitrogen fixation in boreal ecosystems. *New Phytol.* 214, 97–107. <https://doi.org/10.1111/nph.14331>
- Rousk, K., Sorensen, P., Michelsen, A., 2016. Nitrogen Transfer from Four Nitrogen-Fixer Associations to Plants and Soils. *Ecosystems* 19. <https://doi.org/10.1007/s10021-016-0018-7>
- RStudio team, 2020. R studio: Integrated Development for R.
- Šantrůček, J., Šantrůčková, H., Kaštovská, E., Květoň, J., Tahovská, K., Vrábl, D., Vráblová, M., 2018. *Stabilní izotopy biogenních prvků*, 1. ed. Academia, Praha.
- Šantrůčková, H., Kaštovská, E., Bárta, J., Miko, L., Tajovský, K., 2018. *Ekologie půdy*, 1. ed. Episteme. Natura, České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Sarkar, D., 2008. *Lattice: Multivariate Data Visualization with R*.
- Schimel, J.P., Bennett, J., 2004. Nitrogen Mineralization: Challenges of a Changing Paradigm. *Ecology* 85, 591–602. <https://doi.org/10.1890/03-8002>
- Seuss, I., Scheibe, A., Spohn, M., 2022. N₂ fixation is less sensitive to changes in soil water content than carbon and net nitrogen mineralization. *Geoderma* 424, 115973. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2022.115973>
- Silvester, W.B., 1989. Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in forests of Pacific Northwest America. *Soil Biol. Biochem.* 21, 283–289. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(89\)90106-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(89)90106-5)
- Smercina, D., Evans, S., Friesen, M., Tiemann, L., 2019. Optimization of the ¹⁵N₂ incorporation and acetylene reduction methods for free-living nitrogen fixation. *Plant Soil* 445. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04307-3>
- Son, Y., 2001. Non-symbiotic nitrogen fixation in forest ecosystems. *Ecol. Res.* 16, 183–196. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1703.2001.00385.x>
- Steward, K., 2023. Potassium nitrate-chemical compound. *Britannica*.
- Stewart, K.J., Coxson, D., Grogan, P., 2011. Nitrogen Inputs by Associative Cyanobacteria across a Low Arctic Tundra Landscape. *Arct. Antarct. Alp. Res.* 43, 267–278. <https://doi.org/10.1657/1938-4246-43.2.267>
- Telling, J., Anesio, A.M., Tranter, M., Irvine-Fynn, T., Hodson, A., Butler, C., Wadham, J., 2011. Nitrogen fixation on Arctic glaciers, Svalbard. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 116. <https://doi.org/10.1029/2010JG001632>
- Townsend, A.R., Howarth, R.W., Bazzaz, F.A., Booth, M.S., Cleveland, C.C., Collinge, S.K., Dobson, A.P., Epstein, P.R., Holland, E.A., Keeney, D.R., Mallin, M.A., Rogers, C.A., Wayne, P., Wolfe, A.H., 2003. Human health effects of a changing global nitrogen cycle. *Front. Ecol. Environ.* 1, 240–246. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2003\)001\[0240:HHEOAC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2003)001[0240:HHEOAC]2.0.CO;2)

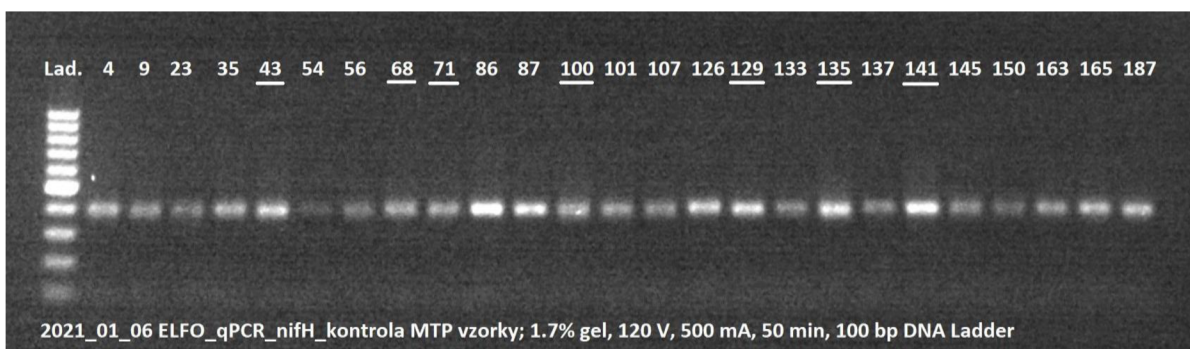
- Vitousek, P.M., Menge, D.N.L., Reed, S.C., Cleveland, C.C., 2013. Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368, 20130119. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0119>
- Wallenstein, M.D., Vitousek, D.M., 2005. Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soils. *Pedobiologia* 49, 665–672. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2005.05.005>
- Wang, Y., Houlton, B., 2009. Nitrogen constraints on terrestrial carbon uptake: Implications for the global carbon-climate feedback. *Geophys. Res. Lett.* - GEOPHYS RES LETT 36. <https://doi.org/10.1029/2009GL041009>
- Wannicke, N., Benavides, M., Dalsgaard, T., Dippner, J.W., Montoya, J.P., Voss, M., 2018. New Perspectives on Nitrogen Fixation Measurements Using $^{15}\text{N}_2$ Gas. *Front. Mar. Sci.* 5.
- Warembourg, F., 2012. *Nitrogen Isotope Techniques*. Elsevier.
- Warembourg, F., 1993. Nitrogen fixation in soil and plant systems, in: *Nitrogen Isotope Techniques*. p. 654.
- Warnes, G. et al., 2022. *gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data*.
- Warren, C.R., Adams, M.A., ZuLiang, C., 2000. Is photosynthesis related to concentrations of nitrogen and Rubisco in leaves of Australian native plants? *Aust. J. Plant Physiol.* 27, 407–416.
- Werner, G.D.A., Cornwell, W.K., Sprent, J.I., Kattge, J., Kiers, E.T., 2014. A single evolutionary innovation drives the deep evolution of symbiotic N_2 -fixation in angiosperms. *Nat. Commun.* 5, 4087. <https://doi.org/10.1038/ncomms5087>
- Wieder, W.R., Cleveland, C.C., Lawrence, D.M., Bonan, G.B., 2015. Effects of model structural uncertainty on carbon cycle projections: biological nitrogen fixation as a case study. *Environ. Res. Lett.* 10, 044016. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/10/4/044016>
- Xu-Ri, Prentice, I., 2017. Modelling the demand for new nitrogen fixation by terrestrial ecosystems. *Biogeosciences* 14, 2003–2017. <https://doi.org/10.5194/bg-14-2003-2017>
- Yousuf, J., Thajudeen, J., Rahiman, M., Krishnankutty, S., P Alikunj, A., A Abdulla, M.H., 2017. Nitrogen fixing potential of various heterotrophic *Bacillus* strains from a tropical estuary and adjacent coastal regions. *J. Basic Microbiol.* 57, 922–932. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700072>
- Zhao, Y., Xu, M., Belnap, J., 2010. Potential nitrogen fixation activity of different aged biological soil crusts from rehabilitated grasslands of the hilly Loess Plateau, China. *J. Arid Environ.* 74, 1186–1191. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2010.04.006>
- Zheng, M., Zhou, Z., Luo, Y., Zhao, P., Mo, J., 2019. Global pattern and controls of biological nitrogen fixation under nutrient enrichment: A meta-analysis. *Glob. Change Biol.* 25, 3018–3030. <https://doi.org/10.1111/gcb.14705>

- Zhu, C., Friman, V., Li, L., Xu, Q., Guo, J., Guo, S., Shen, Q., Ling, N., 2022. Meta-analysis of diazotrophic signatures across terrestrial ecosystems at the continental scale. *Environ. Microbiol.* 24, 2013–2028. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15984>
- Zilius, M., Bonaglia, S., Broman, E., Chiozzini, V.G., Samuiloviene, A., Nascimento, F.J.A., Cardini, U., Bartoli, M., 2020. N₂ fixation dominates nitrogen cycling in a mangrove fiddler crab holobiont. *Sci. Rep.* 10, 13966. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70834-0>

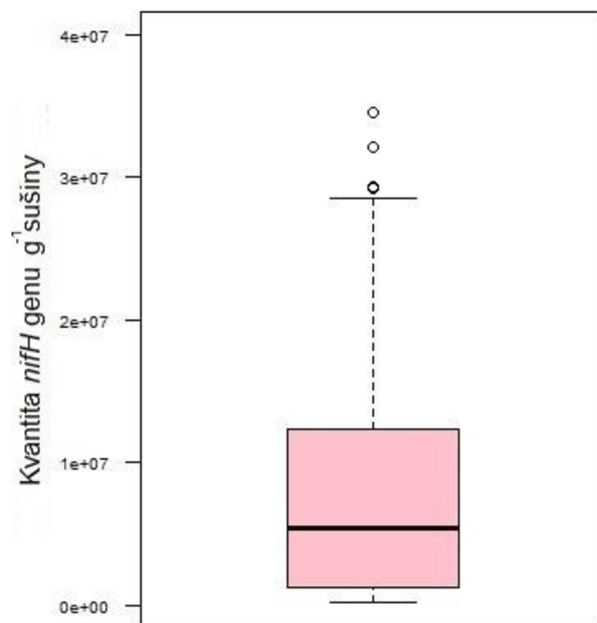
7. Přílohy



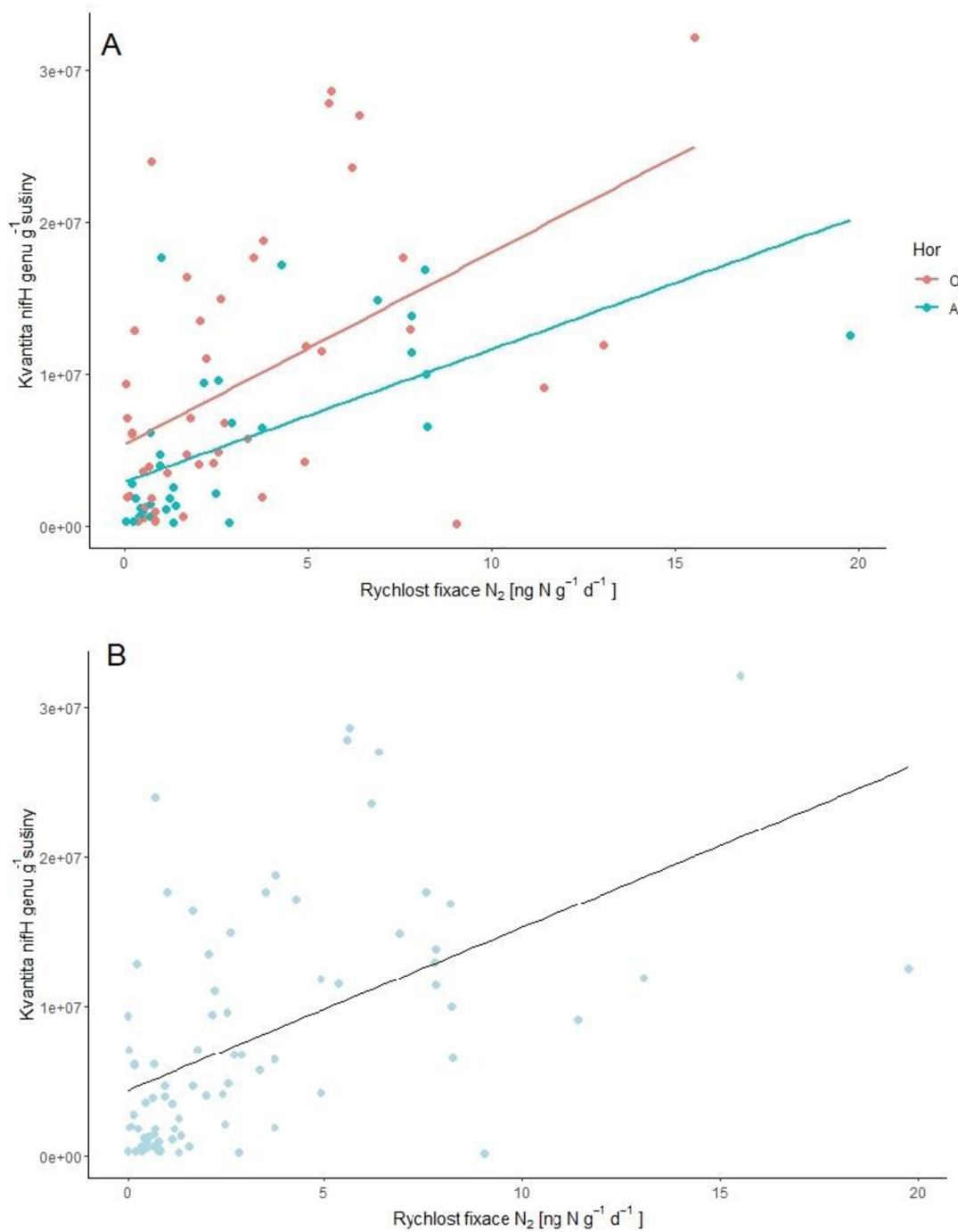
Příloha 1: Změna $\delta^{15}\text{N}$ v jednotlivých povodích, která fixovala $^{15}\text{N}_2$. Vodorovné čáry uvnitř boxu značí mediány, obdélník ohraničuje 1. a 3. kvartil dat, vousy dosahují do hodnot minima a maxima a mimo se nacházející kroužky vyznačují odlehle hodnoty. Zkratky povodí: JEZ – Jezeří, LYS – Lysina, PLB – Pluhův bor, LES – Lesní potok, LIZ – Liz, ANE – Anenský potok, SAL – Salačova Lhota, LKV – Loukov, POM – Polomka, UDL – U Dvou louček, CER – Červík, UHL – Uhlířská, MOD-Modrý potok, NAZ-Na Zeleném.



Příloha 2: Gel z elektroforézy s náhodným výběrem vzorků napříč všemi qPCR destičkami. Hodnoty dosahují okolo 365 bp. Zkratky: Lad- Žebříček (*Ladder*).



Příloha 3: Průměrná kvantita *nifH* genu ve všech vzorcích. Vodorovné čáry uvnitř boxu značí mediány, obdélník ohraničuje 1. a 3. kvartil dat, vousy dosahují do hodnot minima a maxima a mimo se nacházející kroužky vyznačují odlehlé hodnoty.



Příloha 4: **A**-korelace kvantitativy *nifH* genu a rychlosti fixace N_2 v jednotlivých půdních horizontech. Červená barva je pro organický půdní horizont (O), modrá pro svrchní minerální horizont (A). Pro oba horizonty byla potvrzena pozitivní korelace (O: $r=0,519$, $n=46$, $p<0,001$; A: $r=0,6157$, $df=35$, $p<0,001$). **B**-korelace kvantitativy *nifH* genu s rychlostí fixace N_2 pro všechny vzorky, které inkorporovaly $^{15}N_2$ ($r=0,525$, $n=80$, $p<0,001$).