

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra pedologie a ochrany půd



Mikrobiologické charakteristiky půd kontaminovaných thalliem

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Hana Blumentrittová

Obor studia: Technologie zpracování a využití odpadů

Vedoucí práce: doc. RNDr. Aleš Vaněk, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Markéta Marečková, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Mikrobiologické charakteristiky půd kontaminovaných thalliem" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24. 7. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. RNDr. Aleši Vaňkovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, poskytnuté materiály, vstřícnost a čas, který mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala doc. RNDr. Markétě Marečkové, Ph.D. za odborné konzultace, cenné připomínky a čas, který věnovala této práci. Poděkování taktéž patří Ing. Janu Kopeckému, Ph.D. za pomoc a cenné rady při vypracování této diplomové práce. Rovněž bych chtěla poděkovat za pomoc při práci v laboratoři členům Katedry pedologie a ochrany půd a členům týmu Epidemiologie a ekologie mikroorganismů Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v.v.i.

Mikrobiologické charakteristiky půd kontaminovaných thalliem

Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá prokaryotickými společenstvy žijícími v půdách s kontrastním hospodářským využitím, které jsou zatíženy vysokými obsahy thallia (Tl). Práce se soustřeďuje na zhodnocení vlivu různého využití půdy na chemismus Tl, a s ním spojené působení Tl na složení a diverzitu prokaryotického společenstva přítomného v půdních agregátech. Pro studium byla vybrána lokalita Erzmatt, která se nachází ve švýcarském pohoří Jura v blízkosti Basileje. Zájmová lokalita byla dříve aktivně zemědělsky využívána, dnes zde nalezneme divoký luční porost obklopený lesem. Půdy Erzmattu obsahují extrémně vysoké obsahy Tl, ale i As a Fe, jejichž zdrojem je (hydrotermální) Tl-As-Fe sulfidická mineralizace.

Vzorky půdy byly odebrány z jednotlivých půdních horizontů lučního a lesního půdního profilu. Z části vzorků půdy byly stanoveny základní fyzikálně-chemické půdní charakteristiky, celkové obsahy Tl, chemická frakcionace Tl (pomocí BCR sekvenční extrakce), podíl organické hmoty v půdních agregátech či mineralogické složení půdy prostřednictvím rentgenové práškové difrakce (XRD). Porovnáním výsledných hodnot nebyl potvrzen předpoklad, že rozdílné hospodářské využití půdy má zde vliv na chemismus Tl. Významný rozdíl nebyl zjištěn mezi půdními profilem jak v celkovém obsahu Tl, tak podílu zastoupení jednotlivých Tl frakcí. V obou půdních profilech byly zjištěny anomální obsahy Tl, z nichž až ~90 % z celkového obsahu Tl náleželo vždy reziduální Tl frakci asociované na silikáty prokazující vysokou geochemickou stabilitu Tl.

K získání mikrobiologických charakteristik byla provedena extrakce celkové DNA z půdních agregátů, amplifikace genu pro 16S rRNA metodou PCR a následně sekvenace tohoto genu technologií Illumina MiSeq. Výsledky sekvenace vedly k zhodnocení diverzity a složení prokaryotických společenstev. Statisticky významný rozdíl mezi půdními profilem v diverzitě ani ve složení archaeálního a bakteriálního společenstva se nepotvrdil. To znamená, že využití půdy nemá na této lokalitě vliv na složení půdní bioty.

Kombinací výsledků fyzikálně-chemických, geochemických a mikrobiologických měření, byla zjištěna značná variabilita prokaryotického společenstva mezi půdními agregáty jak daného půdního horizontu, tak napříč celými půdními profilem. Statistické analýzy nepotvrdily vliv koncentrace Tl ani dalších půdních parametrů měřených v této studii na variabilitu společenstev. Významná variabilita prokaryot v půdních agregátech, která je dána unikátním prostředím uvnitř agregátů, pravděpodobně zapříčinila překrytí vlivu Tl a dalších měřených vlastností půdy na složení prokaryotického společenstva. Navzdory tomu byly taxonomickým rozbohem prokaryotických společenstev v obou profilech prokázány bakteriální taxony, které byly v minulosti spojeny se schopností adaptace na prostředí zatížené rizikovými prvky.

Klíčová slova: thallium, půdní biota, speciace Tl, ekotoxicita, DNA

Microbiological characteristics of Tl-contaminated soils

Summary

This diploma thesis deals with prokaryotic communities living in soils with different land use, which are loaded by high contents of thallium (Tl). The thesis examines if the different land use influences Tl chemistry and Tl effects the composition and diversity of prokaryotic community located in soil aggregates. The locality Erzmatt situated in the Swiss Jura Mountains near the city Basel was chosen for the study. The study area was actively used for agriculture in the past, but we find there a wild meadow vegetation surrounded by forest there nowadays. Erzmatt soils contain extremely high contents of Tl but also As and Fe, whose source is (hydrothermal) Tl-As-Fe sulfide mineralization.

Soil samples were collected from individual soil horizons of meadow and forest soil profiles. The basic physico-chemical characteristics of soils, total Tl contents, chemical fractionation of Tl (using BCR sequential extraction), the soil organic matter contents in soil aggregates or mineralogical composition of soils by X-ray diffraction (XRD) were determined from a part of soil samples. The comparison of resulting values did not confirm the assumption that different land use of soils effects Tl geochemistry. No significant difference was found between soils profiles both in the total Tl content and in the percentage of individual Tl fractions. Anomalous contents of Tl were showed in both soil profiles, of which up to ~90 % of total Tl content always belonged to residual fraction associated with silicates showing high geochemical stability of Tl.

The total DNA extraction from soil aggregates, amplification of the 16S rRNA gene by PCR method and after that sequencing of this gene by Illumina Miseq technique were performed to obtain microbiological characteristics. Results of sequencing led to an evaluation of the diversity and composition of the prokaryotic communities. A statistically significant difference in diversity and composition of archaeal and bacterial communities between soil profiles was not confirmed. It means that land use of soil in the study area did not influence on composition of soil biota.

Considerable variability of prokaryotic community was found between soil aggregates as in the individual soil horizons so through the whole soil profiles by the combination of the results of physico-chemical, geochemical and microbiological experiments. Statistical analyzes did not confirm the influence of Tl concentration or other soil parameters measured in this study on the variability of communities. Significant variability of prokaryotes in soil aggregates, which is given by the unique environment inside the aggregates, probably caused an overlap of the Tl effect and other soil properties on the composition of the prokaryotic community. Despite this, taxonomy analysis of prokaryotic communities showed bacterial taxa in both soil profiles, that were associated with the ability of adaptation on the environment contaminated by risk elements.

Keywords: thallium, soil biota, Tl speciation, ecotoxicity, DNA

Obsah

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Úvod | 1 |
| 2 | Vědecká hypotéza a cíle práce | 2 |
| 3 | Literární rešerše | 3 |
| 3.1 | Obecné informace o thalliu..... | 3 |
| 3.2 | Zdroje thallia v životním prostředí | 3 |
| 3.2.1 | Přírodní zdroje | 3 |
| 3.2.2 | Antropogenní zdroje | 5 |
| 3.3 | Obsahy thallia v půdním prostředí..... | 5 |
| 3.4 | Formy thallia v půdním prostředí | 6 |
| 3.5 | Mobilita thallia v prostředí | 6 |
| 3.6 | Toxicita thallia | 8 |
| 3.7 | Půdní biota | 9 |
| 3.7.1 | Struktura mikrobiálního společenstva | 10 |
| 3.7.2 | Interakce rizikových prvků s mikroorganismy | 12 |
| 3.7.3 | Studie vlivů rizikových prvků na strukturu mikrobiálního společenstva | 13 |
| 3.7.4 | Vliv thallia na mikroorganismy | 14 |
| 4 | Materiál a metody | 16 |
| 4.1 | Materiál..... | 16 |
| 4.1.1 | Zájmová lokalita | 16 |
| 4.1.2 | Odběr a úprava půdních vzorků..... | 16 |
| 4.1.3 | Chemikálie pro mikrobiologickou část..... | 18 |
| 4.1.4 | Média a pufry..... | 19 |
| 4.1.5 | Komerční sady | 19 |
| 4.1.6 | Oligonukleotidy | 19 |
| 4.2 | Metody..... | 19 |
| 4.2.1 | Stanovení půdních fyzikálně-chemických a geochemických charakteristik | 19 |
| 4.2.2 | Stanovení organické hmoty v půdních agregátech metodou ztráty žíháním | 20 |
| 4.2.3 | Extrakce environmentální DNA | 21 |
| 4.2.4 | Elektroforéza..... | 23 |
| 4.2.5 | Polymerázová řetězová reakce a sekvenace | 23 |
| 4.2.6 | Sekvenace Illumina a zpracování výsledných dat | 25 |
| 4.2.7 | Statistické analýzy | 26 |
| 5 | Výsledky | 27 |
| 5.1 | Fyzikálně-chemické vlastnosti půdy..... | 27 |
| 5.1.1 | Základní fyzikálně-chemické a geochemické charakteristiky půdy | 27 |
| 5.1.2 | Obsah celkového a extrahovatelného Tl..... | 30 |
| 5.1.3 | Chemická frakcionace Tl..... | 31 |
| 5.1.4 | Zastoupení prvků a organické hmoty v půdních agregátech | 32 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5.1.5 | Porovnání naměřených hodnot obou studovaných půdních profilů | 36 |
| 5.2 | Izolovaná environmentální DNA a produkty PCR reakce..... | 36 |
| 5.3 | Složení prokaryotického půdního společenstva..... | 40 |
| 5.4 | Diverzita prokaryotického společenstva | 44 |
| 6 | Diskuze..... | 47 |
| 6.1 | Obsah a mobilita Tl v prostředí studovaných lokalit..... | 47 |
| 6.2 | Diverzita a složení prokaryotického společenstva v půdě kontaminované Tl..... | 51 |
| 7 | Závěr | 55 |
| 8 | Seznam literatury..... | 56 |
| 9 | Seznam obrázků | 69 |
| 10 | Seznam tabulek | 70 |
| 11 | Seznam příloh..... | 71 |
| 12 | Seznam použitých zkratk a symbolů..... | 72 |
| 13 | Samostatné přílohy | I |

1 Úvod

Kontaminace půdy stopovými (rizikovými) prvky je v řadě zemí světa zásadním problémem pro jejich potenciálně rizikové působení na ekosystémy, potravinovou bezpečnost a v konečném důsledku i na lidská zdraví (Facchinelli et al. 2001; Perotti et al. 2018). Stopové prvky (kovy ev. metaloidy) jsou všudypřítomné a široce rozšířené látky v životním prostředí v důsledku antropogenní činnosti, ale i přírodních zdrojů (Glorennec et al. 2016). Vzhledem ke své perzistentní a biologicky neobdouratelné povaze představují významný environmentální stresor pro suchozemská mikrobiální společenstva, ale i pro vyšší biotu (Rousk & Rousk 2018; Jiang et al. 2020). Přítomnost stopových prvků v půdě v množství toxickém pro organismy bývá detekováno pomocí bioindikátorů. Půdní mikroorganismy jsou považovány za jedny z nejslibnějších, jelikož jsou schopny velmi rychle reagovat na změny podmínek v prostředí, se kterými jsou v bezprostředním kontaktu díky vlastnímu velkému povrchu (Guo et al. 2017; Stefanowicz et al. 2020). Vysoké zatížení rizikovými prvky může například ovlivnit diverzitu půdních mikrobů. Jinými ukazateli hodnotícími zdraví půdy prostřednictvím mikroorganismů jsou enzymatická aktivita či velikost mikrobiální biomasy. I přestože byl popsán častý negativní vliv rizikových prvků na mikroorganismy, existují mechanismy, kterými jsou mikroby schopny dosáhnout adaptace zejména v místech s dlouhodobou přítomností polutantu. V takovém případě lze využít k zhodnocení vlivu zatížení půdy složení mikrobiálního společenstva, které může prokázat posun struktury mikrobů směrem k méně citlivým druhům. Diverzita a složení prokaryotického společenstva byly několika autory shledány jako efektivnější měřítka zdraví půdy (Hartmann et al. 2014; Stefanowicz et al. 2020). Pro studium těchto dvou ukazatelů se v posledních letech staly důležitými molekulární metody zahrnující amplifikaci a sekvenaci genu 16S rRNA (Lauber et al. 2009; Chodak et al. 2013) umožňující lepší vzhled dobakteriálních a archaeálních společenstev na rozdíl od metod založených na kultivaci mikrobů.

Řada studií se v minulosti zaměřila na stopové (rizikové) prvky jako je Pb, Hg, Cd, Cu, Zn či As obsažené v půdě a jejich vliv na mikrobiální společenstva, ale jen málo je zodpovězeno v otázce vlivu přítomnosti Tl v půdním prostředí na prokaryotická společenstva.

Thallium je neesenciální stopový prvek, jehož toxicita převyšuje či je srovnávána s toxicitou Hg, Pb, Cd či Cu (Nriagu 1998; Peter & Viraraghavan 2005). Antropogenní činnost představuje dominantní faktor zvyšující koncentraci Tl v životním prostředí. To zahrnuje především těžbu a zpracování sulfidických rud, spalování uhlí či výrobu cementu. Přirozený výskyt Tl v životním prostředí je soustředěn v zemské kůře, kde jsou jeho nositelem některé horniny. Nejčastěji se Tl asociuje na sulfidické minerály, jako například sfalerit (ZnS), galenit (PbS) či pyrit (FeS₂). Svým litofilním charakterem jej však lze nalézt také v draselných živcích, slídách nebo illitu v důsledku záměny iontů Tl⁺ za K⁺. Koncentrace Tl v životním prostředí je zpravidla nízká, ovšem objevily se lokality s anomálním obsahem Tl jak v geologickém podloží, tak i v půdním substrátu v důsledku zvětrávání či alterace hornin. Jedním z takových míst je i studovaná oblast Erzmet (Švýcarská Jura).

Pro svou závažnou ekotoxicitu projevující se akutními a chronickými účinky na organismy, byla v předložené diplomové práci testována mikrobiální společenstva ve dvou reprezentativních půdních profilech zatížených Tl. Cílem práce bylo zhodnotit mikrobiální společenstva ve vztahu k celkovému obsahu, chemické frakcionaci, potenciální dostupnosti a speciaci Tl v půdě (Vaněk et al. 2009; Grösslová et al. 2015).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce bylo testovat a charakterizovat mikrobiální společenstva v půdách s kontrastním hospodářským využitím (les × louka) v oblasti zatížené Tl-As sulfidickou mineralizací. Součástí bylo také objasnit variabilitu mikrobiálního společenstva - prokaryot v přirozených půdních agregátech a zhodnocení vlivu koncentrace Tl na jejich mikrodistribuci.

Hlavní hypotézy:

- Hypotéza 1: Využití půd má vliv na složení půdní bioty a chemismus Tl.
- Hypotéza 2: Lokální půdní biota, tj. ovlivněná Tl, je odlišná od nekontaminované půdy.
- Hypotéza 3: Variabilita mikrobiálního společenstva mezi agregáty je závislá na koncentraci Tl.

3 Literární rešerše

3.1 Obecné informace o thalliu

Thallium (Tl) je poměrně vzácným stopovým prvkem. Jeho průměrná koncentrace v zemské kůře se pohybuje v rozmezí 0,01-1 mg kg⁻¹ (Peter & Viraraghavan 2005; Wei et al. 2019). Historie objevení Tl sahá do 19. století, kdy jej v roce 1861 popsal anglický chemik William Crookes. Nezávisle na anglickém vědci bylo Tl současně zkoumáno francouzským vědcem C. A. Lamym. Thallium bylo objeveno pomocí spektroskopických metod a pojmenováno na základě charakteristické zelené linie v plamenném spektru (Greenwood & Earnshaw 1993).

Z hlediska chemického chování připomíná Tl „těžké kovy“, jako jsou olovo (Pb), zlato (Au) a stříbro (Ag), ale podobá se i alkalickým kovům, především draslíku (K), rubidiu (Rb) a cesiu (Cs) (Peter & Viraraghavan 2005).

Thallium řadíme stejně jako Al, Ga a In do III. A skupiny periodické tabulky prvků. Jedná se o neesenciální prvek, respektive kov. Protonové číslo Tl je 81, tedy liché číslo, čemuž odpovídá i jeho nízký počet stabilních izotopů (²⁰³Tl, ²⁰⁵Tl) (Greenwood & Earnshaw 1993). Průměrná relativní atomová hmotnost Tl činí 204,37.

Thallium se v životním prostředí vyskytuje ve dvou oxidačních stavech, a to ve formě monovalentní Tl(I) a trivalentní Tl(III) (Ralph & Twiss 2002). Thallium(I) je převládající a termodynamicky stabilnější formou v přírodním prostředí, ale například v povrchových vodách může významně narůstat množství rozpuštěného Tl(III). Monovalentní Tl je vysoce rozpustné ve vodných roztocích. Trivalentní forma Tl je vysoce reaktivní a může být lehce hydrolyzována za podmínek neutrálního pH prostředí (Aguilar-Carrillo et al. 2020).

3.2 Zdroje thallia v životním prostředí

3.2.1 Přirozené zdroje

Nedílnou součástí tvorby půd je zvětrávání minerálů, přičemž se ale také současně uvolňují anorganické živiny nebo kontaminanty (včetně Tl), které mohou dále vstupovat do půdního roztoku nebo být stabilizovány pomocí mechanismů adsorpce a/nebo srážení, ev. spolusrážení. Koncentrace stopových (toxických) prvků v přirozeném prostředí značně závisí na jejich obsahu v podloží, povaze primárních minerálů, půdním typu a geochemických parametrech jako jsou: pH, redoxní potenciál (Eh), vlhkost, teplota (Herrmann et al. 2018).

Obsah Tl v životním prostředí je dominantně spojen s přítomností iontů Tl(I). Vzhledem ke svému litofilnímu charakteru je Tl schopno nahrazovat ionty Rb(I)⁺ či K(I)⁺ díky podobnému iontovému poloměru a stejné valenci (Nriagu 1998), a tak jej lze nalézt například v granitech, kde dochází k substituci K v draselných živcích či slídách (Tremel et al. 1997b), nebo v jílových minerálech, jako např. illitu (Voegelin et al. 2015).

Nejčastějším výskytem Tl v přírodě jsou sulfidické rudy řady rizikových prvků (Kazantzis 2000). To je dáno chalkofilní povahou Tl, která spočívá ve vysoké afinitě Tl k síře (S) (Rader et al. 2018). Nejvýznamnějšími oblastmi z hlediska vysokého obsahu Tl v sulfidech

jsou například: Severní Makedonie - ložiska realgaru (As_4S_4) v oblasti Allchar (Anderson et al. 1999; Kazantzis 2000; Alderton et al. 2005; Bačeva et al. 2014), Čína (Xiao et al. 2004), Francie (Tremel et al. 1997b), Polsko (Karbowska et al. 2014; Vaněk et al. 2013a), Švýcarsko (Voegelin et al. 2015; Herrmann et al. 2018). V oblasti Lanmuchang v jihozápadní provincii Guizhou v Číně se koncentrace Tl ve vzorcích sulfidických rud pohybovala mezi 100 až 35 000 mg kg^{-1} (Xiao et al. 2004). Některé studie poukazují na existenci významné geochemické korelace mezi sulfidy Fe a Tl.

V hydrotermálních systémech je Tl vázáno na sulfidy, jako jsou zejména pyrit (FeS_2), sfalerit (ZnS) a markazit (FeS_2) (Karbowska 2016). Například bylo zjištěno, že sfalerit (ZnS) a pyrit (FeS_2) z oblasti Horního Slezska (Slezsko-Krakovská ložiska v Polsku - Olkusz, Bukowno) obsahují extrémní koncentrace Tl. V Fe sulfidech tam bylo naměřeno 80- 1000 mg Tl kg^{-1} , u sulfidů Zn pak 60-280 mg Tl kg^{-1} . Rovněž v oblasti Lodares nacházející se ve středním Španělsku v provincii Soria bylo detekováno vysoké množství, a to 188 mg Tl kg^{-1} v hydrotermálním pyritu (Garrido et al. 2020). Zvětrávání těchto sulfidů vede k disperzi Tl v sedimentárních horninách, jakož i v hydroxidech železa a manganu a organických látkách, včetně uhlí (Lis et al. 2003).

Thallium v uhlí bývá asociováno většinou se sulfidy Fe, tedy především s pyritem (FeS_2). I přestože Tl může být zde přítomno také v souvislosti s jílovými minerály (převážně illitem, $(\text{K},\text{H}_3\text{O})\text{Al}_2(\text{Si},\text{Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$), dominantní koncentrace Tl byla zaznamenána primárně u sulfidů (Spears & Tewalt 2009; Lopéz-Antón et al. 2013). Uvádí se, že koncentrace Tl ve většině uhlí se pohybuje v rozmezí 0,5-3 mg kg^{-1} (Lopéz-Antón et al. 2013). Paulo et al. (2007) studovali obsah Tl ve vzorcích černého uhlí odebraných v oblasti Horního a Dolního Slezska, a hnědého uhlí z dolů Turów, Bełchatów a Koźmin (Polsko) pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Ukázalo se, že koncentrace Tl v hnědém uhlí se pohybovala v rozmezí 0,2-2,4 mg kg^{-1} a v černém uhlí to bylo 0,2-5,3 mg kg^{-1} . V oblasti Lanmuchang (Čína) byly zaznamenány extrémní koncentrace Tl v uhlí, a to 12-46 mg Tl kg^{-1} (Xiao et al. 2004). Vaněk et al. (2016) naměřili v uhelném pyritu tvořícím příměs hnědého uhlí z dolu Turów koncentraci Tl $\sim 24,5 \text{ mg kg}^{-1}$.

Vzácněji se Tl vyskytuje ve formě minerálů Tl jako jsou lorandit (TlAsS_2), carlinit (Tl_2S) (Xiong 2007), hutchinsonit ($\text{PbTlAs}_5\text{S}_9$), crookesit ($(\text{Cu}, \text{Tl}, \text{Ag})_2\text{Se}$) či urbait ($\text{TlAs}_2\text{SbS}_5$), který může obsahovat až 30% příměs Tl (Karbowska 2016).

Thallium jako litofilní prvek má vysokou afinitu ke kyslíku, která způsobuje jeho přítomnost také v aluminosilikátových minerálech (Clarke & Sloss 1992).

Dalšími nositeli Tl v přirozeném prostředí jsou některé druhotné minerály. Mezi ně patří například avicennit (Tl_2O_3) či substituovaný Tl(I)-jarosit, které vznikly v důsledku intenzivního zvětrávání žil Tl-As-Fe sulfidické mineralizace probíhající v uhličitanové hornině. Tento jev je znám například na lokalitě Erzmatt ve Švýcarsku (Voegelin et al. 2015). Také lze Tl identifikovat jako součást určitých typů Mn-oxidů.

3.2.2 Antropogenní zdroje

Obecně se Tl nachází v přírodním prostředí ve velmi nízkých koncentracích. Lidský faktor však významně přispívá ke zvyšování jeho obsahů na všech jeho úrovních (voda, půda, rostlina apod.).

Aktuálně řadíme mezi nejdůležitější antropogenní zdroje Tl průmyslové procesy spojené se spalováním uhlí, výrobou cementu, dále pak tuhé či kapalné odpady z těžby a metalurgie železných a neželezných rud (Kazantzis 2000; Kersten et al. 2014; Gomez-Gonzalez et al. 2015; Vaněk et al. 2018).

Tavení rud obsahujících Tl (PbS, FeS₂, ZnS apod.) za velmi vysokých teplot je obvykle považováno za dominantní lokální zdroj kontaminace Tl životního prostředí (Yang et al. 2009; Vaněk et al. 2013a). Převážná část sloučenin Tl je v prostředí vysokých teplot (>600 °C) volatilní (Lopéz-Antón et al. 2013; Liu et al. 2016), a tak nedochází k účinnému zachytávání volatilizovaných sloučenin Tl pomocí elektrostatických nebo mechanických odlučovačů emitovaných spalin (Peter & Viraraghavan 2005; Vaněk et al. 2016). V důsledku toho lze předpokládat, že významné množství Tl může být mobilizováno do atmosféry a dalších složek životního prostředí. Průměrné koncentrace Tl ve svrchních půdních horizontech v oblastech ovlivněných metalurgií obohacených rud obvykle přesahují 10 mg kg⁻¹ (Lis et al. 2003; Boughriet et al. 2007).

Za další potenciální antropogenní zdroj Tl je považována výroba kyseliny sírové, která se získává zpracováním pyritové rudy (FeS₂) (Yang et al. 2009).

V průběhu spalování uhlí a výroby cementu se Tl oxiduje při vyšší teplotě na plynné fáze, přičemž ale v oblastech s nízkou teplotou často kondenzují na povrchu částic popela (Karbowska 2016). Odhaduje se, že je každoročně do životního prostředí mobilizováno 5000 t Tl prostřednictvím průmyslové výroby a 1000 t Tl pak je emitováno v důsledku spalování uhlí (Kazantzis 2000). Vaněk et al. (2016) uvádějí roční produkci Tl plynoucí z využití uhlí ~600 t, což představuje dle jejich bilance zhruba jednu čtvrtinu světové produkce Tl.

3.3 Obsahy thallia v půdním prostředí

Podle autorů Jia et al. (2018) se zdá, že celosvětově je obsah Tl v půdách do značné míry ovlivněn geologickým původem matečné horniny. U nekontaminovaných povrchových půd dosahuje obsah Tl hodnot od 0,1 do 2 mg kg⁻¹, nejčastěji předkládané koncentrace Tl činí méně než 1 mg kg⁻¹ (Xiao et al. 2004).

V lidskou činností kontaminovaných půdách se koncentrace Tl mohou výrazně lišit. V půdách nedaleko německých cementáren byly zjištěny hodnoty Tl 15 mg Tl kg⁻¹, půdy kontaminované důlním odpadem v Číně obsahovaly 61 mg Tl kg⁻¹ (Jia et al. 2018) a půdy poblíž huti zpracovávající Zn rudy/sulfidy v polské Boleslawi obsahovaly více než 50 mg kg⁻¹ Tl (Vaněk et al. 2018).

V některých půdách je ale zvýšená pozadlová koncentrace tohoto prvku přirozeným jevem. Jedná se o půdy vyvinuté na magmatitech bohatých K, kde jej Tl nahrazuje formou iontové výměny (např. žula, syenit). Dále jsou to půdy vyvinuté na vápenci nebo obsahující jíly či sekundární oxidy, na které může být Tl do značné míry adsorbováno (Vaněk et al. 2009). Příkladem jsou jílovité půdy vzniklé na sinemurském vápenci ve Francii, kde je udáván

přirozený obsah Tl až 55 mg kg⁻¹ (Tremel et al. 1997b). Na lokalitě Erzmatt ve Švýcarsku je vysoký obsah Tl zaznamenán v půdě vzniklé na dolomitové hornině obsahující Fe-As-Tl sulfidickou mineralizaci. Byly zde naměřeny koncentrace až 10 000 mg Tl kg⁻¹, přičemž se koncentrace Tl v půdě zvyšuje v souvislosti s hloubkou půdního profilu směrem dolů (Herrmann et al. 2018).

3.4 Formy thallia v půdním prostředí

Thallium může být v půdě imobilizováno především na základě elementárních výměnných reakcí na oxidech, křemičitanech nebo případně organických látkách (Tremel et al. 1997b).

Z půdních fází, které jsou odpovědné za sorpci Tl v půdním prostředí, považují Jacobson et al. (2005) jako významné Mn oxidy. Afinita Tl k těmto oxidům může být vysvětlena specifickou adsorpcí Tl či substitucí Tl⁺ za K⁺ v minerálních strukturách. Dojde-li k interakci Tl s určitými Mn(III, IV) oxidy, může být Tl(I) oxidováno na Tl(III) a stabilizováno pevně adsorpcí na Mn-oxidy či precipitováno na jejich povrchu jako Tl₂O₃ (Bidoglio et al. 1993, Jacobson et al. 2005, Vaněk et al. 2009, Peacock & Moon 2012; Vaněk et al. 2013b). Mezi nejúčinnější oxidické sorbenty Tl v půdách či sedimentech se řadí zejména birnessit (δ-MnO₂) či jílové minerály, illit (Grösslová et al. 2015; Voegelin et al. 2015; Martin et al. 2018).

Kazantzis (2000) doplňuje fáze pozitivně ovlivňující retenci Tl o oxidy Fe a organickou půdní hmotu. Ve srovnání s oxidy Mn je považována sorpce Tl na Fe (hydr)oxidy za obecně nižší (Vaněk et al. 2013a), ale i přesto lze očekávat určitý vliv na fixaci Tl v redukovatelné frakci, jelikož se v půdě vyskytují v mnohem vyšší koncentraci (Jacobson et al. 2005). Martin et al. (2004) zjistili, že amorfní Fe a Al oxidy byly hlavními sorbenty Tl v kyselých (FeO_x) a neutrálně-alkalických (AlO_x) půdách znečištěných FeS₂.

Obecně se význam půdní organické hmoty na sorpci Tl jeví jako nízký (Jacobson et al. 2005), což plyne pravděpodobně ze slabé Tl komplexace s většinou organických ligandů.

3.5 Mobilita thallia v prostředí

Míru toxicity a mobility Tl v životním prostředí určuje řada parametrů, z nichž jednu z důležitých rolí hraje vazba na jednotlivé půdní/sedimentární složky jako je chemická speciace Tl, asociace s pevnou fází a komplexní chemie daného ekosystému (Tremel et al. 1997b; Grösslová et al. 2015).

V porovnání s jinými rizikovými prvky („těžkými kovy“) vykazuje Tl a sloučeniny Tl mnohem vyšší rozpustnost ve vodě. V terestrickém prostředí je ovšem Tl vázáno na půdní matici, což značně omezuje jeho transport (Karbowska 2016).

Mobilita Tl je určována mimo jiné pomocí metod sekvenční extrakce, které slouží ke stanovení odhadu dopadu Tl na životní prostředí. Principem je selektivní extrakce prvků („těžkých kovů“) v různých fyzikálně-chemických frakcích za použití specifických rozpouštědel - extrakčních činidel. V řadě studií (Jakubowska et al. 2007; Vaněk et al. 2009; Vaněk et al. 2010a; 2010b) byla stanovena chemická frakcionace Tl modifikovanou BCR sekvenční extrakcí, jejíž výstupem jsou operačně definované frakce (Vaněk et al. 2010a) označované jako:

- výměnná/slabou kyselinou extrahovatelná frakce,
- redukovatelná frakce (charakterizuje vazbu Tl na Fe/Mn ((hydr)oxydy),
- oxidovatelná frakce (vazba na půdní organickou hmotu či sulfidy),
- reziduální frakce (Tl s vazbou na aluminosilikáty a jiné krystalizované minerály) (Liu et al. 2016; Liu et al. 2018).

První tři frakce jsou považovány za labilní, tudíž v půdním prostředí za daných podmínek potenciálně mobilizovatelné (Vaněk et al. 2009; Vaněk et al. 2010a; Gomez-Gonzalez et al. 2015).

Zvýšený obsah Tl ve výměnné frakci byl detekován například v organickém horizontu lesní půdy kontaminované hutní činností v oblasti Olkusz-Polsko (Vaněk et al. 2013a), přičemž byla zaznamenána mobilita Tl napříč horizonty půdního profilu. Organický horizont O obsahoval 30 mg Tl kg⁻¹, zatímco minerální horizont C lesní půdy obsahoval 3,5 mg kg⁻¹. Jak uvádí Ettler et al. (2009), výměnná frakce podléhá změnám a je zvyšována pohyblivost uvolňujících se kovových kontaminantů v důsledku přítomnosti slabých organických kyselin, fulvokyselin či huminových látek v půdní organické hmotě (SOM). Toto tvrzení je v souladu se studií Vaněk et al. (2012), z které vyplývá, že působením organických kyselin s nízkou molekulovou hmotností dochází ke změnám v půdě, při kterých je uvolňováno litogenní Tl v případě, že je v půdě přítomno.

Redukovatelná frakce Tl je vázána na směsi Mn-Fe oxidů. Za uvolňováním Tl z redukovatelné frakce stojí významné kolísání pH a Eh (Antić-Mladenović et al. 2017).

V oxidovatelné frakci je Tl vázáno na sulfidy. Z literatury vyplývá, že zdrojem labilního Tl v prostředí může být oxidovatelná frakce i v případě zvětrávání sulfidů obsahujících Tl (Karbowska et al. 2014; Antić-Mladenović et al. 2017). Karbowska et al. (2014) se zabývali chemickou frakcionací Tl v půdě z oblasti těžby Zn-Pb rud. Byly porovnávány vzorky obsahující Tl jak z antropogenního, tak přirozeného zdroje. V říčních sedimentech z těsné blízkosti důlního areálu byla hlavní část Tl obsažena v oxidovatelné frakci (77 %). Ve vzorcích pocházejících ze spodních minerálních horizontů půd vyvinutých na dolomitech obohacených Zn-Pb rudou byla hlavní část Tl obsažena v reziduální frakci (36 %). Labilní Tl se vyskytovalo zejména ve formě redukovatelné (32 %), což Karbowska et al. (2014) považují za redistribuované Tl plynoucí z oxidace primární oxidovatelné frakce (27 %). Vzorky půdy vzniklé na dolomitech odebrané ve stejné oblasti, které však nenesou Zn-Pb rudu, vykazovaly oproti předchozím vzorkům významný podíl zachyceného Tl v reziduální frakci (více než 80 % z celkového obsahu Tl), v oxidovatelné frakci to bylo 9-13 %. Lukaszewski et al. (2018) zaznamenali v půdě vzniklé na dolomitu obohaceném Zn-Pb rudou také vysoký obsah mobilního Tl v oxidovatelné frakci (27 %) a redukovatelné frakci (32 %).

Studie prokazují, že hlavní část Tl, která je obsažena v půdě, je zachycena ve stabilní reziduální frakci vázané na primární silikáty (aluminosilikáty) či sekundární illity (Vaněk et al. 2009; Karbowska et al. 2014). Výrazný výskyt Tl v reziduální frakci byl zaznamenán, jak v přirozených systémech, tak i v kontaminovaných půdách či sedimentech (Lis et al. 2003; Jakubowska et al., 2007; Anagboso et al. 2013). Někteří autoři (Yang et al. 2005; Liu et al. 2010; Karbowska et al. 2014; Gomez-Gonzalez et al. 2015) zabývající se srovnáním Tl pocházejícího z přirozených nebo antropogenních zdrojů došli k názoru, že Tl z antropogenních

zdrojů má tendenci být redistribuováno v labilních frakcích, zatímco u Tl přirozeného původu je pravděpodobné, že bude vázáno převážně v reziduální frakci.

Parametry, které ovlivňují uvolňování Tl v labilních frakcích jsou podle Antić-Mladenović et al. (2017) redoxní potenciál (Eh) a pH prostředí. Dle Sterckeman et al. (2000) jsou obecně podmínky nízkého pH půdy zodpovědné za mobilizaci rizikových prvků (těžkých kovů) a následnou migraci směrem dolů v půdním profilu.

3.6 Toxicita thallia

Thallium je vysoce toxickým neesenciálním prvkem, jež je klasifikován Agenturou pro ochranu životního prostředí (U.S. EPA) jako prioritní polutant (Voegelin et al. 2015). Negativně působí na celé spektrum fauny i flory, vyšší i nižší živočichy, rostliny i mikroorganismy (Kazantzis 2000; Peter & Viraraghavan 2005).

Akutní a chronická toxicita je nejčastěji srovnávána s Hg, Cd, ev. Pb. Thallium je vysoce toxickým prvkem již při nízkých koncentracích. Dle Pavlíčková et al. (2006) je průměrná letální dávka pro dospělého člověka 10-15 mg Tl kg⁻¹. Liu et al. (2019b) uvádějí smrtelnou dávku pro dospělého člověka 8-10 mg Tl kg⁻¹. Nejvyšší přípustné koncentrace Tl byly definovány jen v několika málo zemích, například v USA byl stanoven limit pro pitnou vodu 2 µg Tl l⁻¹ (U.S. EPA 2009). Zatímco v Číně byl dle Liu et al. (2019b) přijat přísnější limit pro pitnou vodu 0,1 µg l⁻¹.

Podle Karbowska (2016) je toxicita Tl ovlivněna jeho oxidačním stavem. Thallium v trojmocné formě je asi 50 000-krát toxičtější v porovnání s Tl(I) speciemi. Aguilar-Carrillo et al. (2020) uvádějí, že toxicita Tl(I) a Tl(III) je ovlivněna také jejich stabilitou, která obecně souvisí s typem matrice vzorku pro dané podmínky prostředí.

Toxicita sloučenin Tl je způsobena zejména podobností mezi ionty Tl(I) a draselnými ionty (Grösslova et al. 2015), což má za následek poruchu řady metabolických drah a procesů souvisejících se zastupováním hydratovaného Tl(I) iontu v biochemickém K(I) cyklu (Linhart 2014).

Hlavní expozice člověka Tl spočívá v konzumaci kontaminované stravy a vody (Karbowska 2016). Liu et al. (2017) dále uvádí možnou inhalaci znečištěného vzduchu jako další potenciální cestu vstupu Tl do živých organismů. Chronická expozice nízkým dávkám a akutní vysokodávková expozice Tl může způsobit gastrointestinální, neurologické a dermatologické příznaky. V některých případech může dojít až k úmrtí (Wu et al. 2019).

Thallium vstupuje do krevního řečiště, přičemž je transportováno napříč celým organismem, což vede k jeho akumulaci v kostech, ledvinách a nervovém systému. V důsledku toho dochází k negativnímu ovlivnění funkcí několika důležitých enzymů. Klasickými symptomy otravy Tl jsou označovány žaludeční a střevní vředy, alopecie či polyneuropatie. Jako další příznaky jsou označovány nespavost, ochrnutí, ztráta tělesné hmotnosti, vnitřní krvácení, poškození myokardu a v důsledku toho až smrt (Kazantzis 2000; Galván-Arzate & Santamaría 1998).

Thallium má také teratogenní účinky, efektivně dokáže procházet skrz placentární bariéru a působit přímo na vyvíjející se plod (Wu et al. 2019). Podle Xia et al. (2016) mohou vysoké hladiny Tl v těle těhotných žen působit riziko v podobě nízké porodní váhy dítěte.

3.7 Půdní biota

Rejšek a Vácha (2018) označují půdní biotu (nebo také edafon) za soubor organismů, kteří dočasně či trvale žijí v půdě.

Půdní biotu můžeme rozdělit podle velikosti na: půdní mikrofaunu (velikost těla <0,1 mm), mesofaunu (velikost těla 0,1-0,2 mm), makrofaunu (2-20 mm) a megafaunu (délka těla >8 cm). Dále rozlišujeme půdní mikrobiotu, kam se řadí mikroorganismy ze všech tří domén Bacteria, Archaea a Eukarya. V půdě dominují bakterie, dále jsou zastoupeny archaea, prvoci a houby. Na povrchu půd se také vyskytují fotosyntetizující sinice a řasy (Rejšek & Vácha 2018).

Půdní mikroorganismy mají největší dopad na vývoj půdního prostředí. Podílejí se na řadě podstatných procesů jako je rozklad odumřelé organické hmoty, koloběh prvků, přenos energie, tvorba humusu, ovlivňování struktury půdy, fixace N, podpora růstu rostlin a degradace organických znečišťujících látek (Stefanowicz et al. 2010). Tyto procesy a jejich uchování jsou nezbytné nejen z hlediska zemědělství, ale také z hlediska ochrany životního prostředí (Bačmaga et al. 2020).

Prokaryotní rozmanitost v půdních ekosystémech zdaleka převyšuje eukaryotické organismy. Torsvik a Øvreås (2002) uvádí, že 1 g půdy může obsahovat až 10 miliard mikroorganismů. Nejvýznamnější skupinu, co do počtu i biomasy, představují bakterie a houby, přesto ale i ostatní skupiny půdních (mikro)organismů nelze přehlížet (Samec & Formánek 2007). Bakteriální rozmanitost je větší než rozmanitost jakékoli jiné skupiny organismů (Kennedy 1999).

Rozložení mikroorganismů v půdě není rovnoměrné (Šimek et al. 2019). Mikroby tvoří lokální shluky, ohniska aktivity, jež jsou spojená s výskytem živin, částicemi organické hmoty plynoucími z odumřelých těl živočichů či rostlin, organické hmoty segregované nebo i s výměnnými povrchy a kořeny rostlin. Mikroorganismy se podílejí na utváření půdního ekosystému, a to svým působením na vývoj a udržování struktury půdy (Bach et al. 2010). V půdě jsou mimo jiné vlivem mikroorganismů utvářeny půdní agregáty, které lze dle velikosti dělit na mikroagregáty (shluky částic s rozměry <250 μm) a makroagregáty (částice o velikosti >250 μm) (Krause et al. 2019). Jedná se o útvary spojující pevné minerální a organické částice různých velikostí. Mikroagregáty jsou tvořeny vazbou mezi primárními a jílovými částicemi, zatímco makroagregáty vznikají shlukováním mikroagregátů a menších makroagregátů. Půdní agregáty mají často hierarchickou organizaci, kde se obecně předpokládá tvorba stabilnějších mikroagregátů uvnitř makroagregátů jako součást jejich stabilizačního procesu (Six & Paustian 2014). Co se týče stability půdních agregátů, fyzikálně-chemické procesy jsou významnějšími v poutání malých minerálních částic a formování mikroagregátů, částice těchto menších agregátů jsou poutány pevnějšími vazbami a stmeleny polysacharidy, zatímco biologická aktivita má výraznější vliv na vazby makroagregátů (Tisdall & Oades 1982; Jastrow et al. 1998b; Šimek et al. 2019). Mikroorganismy významně přispívají k agregaci půdních částic svými metabolity, vytvářením bakteriálních biofilmů nebo myceliálními strukturami. Mikroby zapříčiňují zejména vznik a stabilitu mikroagregátů, zatímco stabilitu makroagregátů zajišťují kořeny rostlin a houbové hyfy (Jastrow & Miller 1998a; Šimek et al. 2019) Půdní agregáty představují poměrně oddělené a po danou dobu ustálené prostředí, ve kterém lze nalézt mikrobiální populace čítající až několik milionů jedinců a vyvíjející se zde během tvorby

půdního agregátu. Jedná se o organizovanou a rozmanitou mikrostrukturu díky specifickým fyzikálně-chemickým podmínkám uvnitř agregátů. Vzhledem k izolovanosti vnitřního prostředí agregátů, možnosti průběhu specifických biochemických procesů a zvláštních evolučních podmínek mikroorganismů, lze považovat půdní agregáty za nositele biodiverzity v půdě (Šimek et al. 2019).

3.7.1 Struktura mikrobiálního společenstva

Rozmanitost a struktura mikrobiálních společenstev je jeden z parametrů, pomocí kterého lze hodnotit kvalitu a zdraví půdy (Stefanowicz et al. 2010). Mikrobiální diverzita a související funkční vlastnosti půdy jsou dynamické v čase a prostoru, a k jejich změnám dochází v reakci na přírodní či antropogenní podmínky (Nannipieri et al. 2020).

Studie prokázaly, že struktury bakteriálních a houbových společenstev mohou být spojeny se změnami mnoha faktorů prostředí, mezi něž patří například textura půdy (Girvan et al. 2003), pH půdy (Fierer & Jackson 2006) a dostupnost půdního dusíku (Frey et al. 2004).

Půdní pH je jedním z nejdůležitějších parametrů, který se zasazuje o variabilitu a početnost mikrobiálních společenstev. Půdní pH koreluje se složením bakteriálního společenstva v různě vzdálených lokalitách (Lauber et al. 2008). Tento vztah může být spojen s potenciálem půdního pH vyvolat přímý stres u bakteriálních buněk, a to při určitých hodnotách ovlivňujících daný bakteriální taxon. Také textura půdy má významný vliv na složení bakteriálních společenstev. Fierer a Jackson (2006) uskutečnili kvantitativní srovnání složení a rozmanitosti bakteriálních společenstev napříč kontinenty. Bylo odebráno 98 vzorků půdy z celé Severní a Jižní Ameriky a provedeno několik analýz zaměřených na environmentální faktory. Bylo zjištěno, že bakteriální diverzita nesouvisí s teplotou místa či zeměpisnou šířkou, a složení společenstva nebylo závislé na geografické lokaci. Rozmanitost a bohatost půdních bakteriálních společenstev se lišila podle typu ekosystému a tyto rozdíly by mohly být do značné míry vysvětleny pomocí pH. Největší diverzita a početnost byla zaznamenána v půdách s neutrálním pH, nižší různorodost v kyselých půdách.

Další faktory, které mohou ovlivnit mikrobiální společenstva, jsou: typ vegetačního pokryvu (Mitchell et al. 2010), teplota půdy, obsah jílu, dostupnost organického uhlíku, dostupnost živin, poměr C:N a vlhkost půdy (You et al. 2014).

Dostupnost vody je důležitá obecně pro všechna terestrická společenstva. Pro mikroby představuje nejen významný aspekt růstu, ale má výrazný vliv i na celkové zastoupení taxonů v půdě. Například gramnegativní bakterie jsou považovány za citlivější na výrazné změny ve vodním potenciálu, zatímco houby jsou schopny tolerovat nízkou dostupnost vody. Drenovsky et al. (2004) zaznamenali ve své studii vliv obsahu vody na složení mikroorganismů, který byl markantnější s měnícím se obsahem organického uhlíku v půdě. Vzorky sušší půdy bez přídavku organického uhlíku vykazovaly nejvyšší hodnoty početnosti u hub, přičemž se jejich množství se zvyšující se vlhkostí půdy snižovalo. Zavodněná půda, do které byl organický uhlík přidán vykazovala mnohem větší pokles početnosti hub. Naopak vzorky ošetřené organickým uhlíkem, které nebyly zatopené, vykazovaly téměř stejný poměr hub a bakterií. Williams a Rice (2007) se zabývali reakcemi mikrobiálního společenstva na zvýšenou dostupnost vody v půdě během vegetačního období po dobu sedmi let. Autoři

zjistili, že aktinobakterie pozitivně reagovaly na trvale ovlhčenou půdu, kdy došlo k jejich hojnému nárůstu.

Obsah vody v půdě působí na strukturu společenstva mikrobů přímo i nepřímo, a to prostřednictvím vlivu na koncentrace kyslíku a dostupnost živin. Zavodnění snižuje hodnoty kyslíku v půdě, a tak je prostředí příznivé pro fakultativní a obligátně anaerobní mikroorganismy (Drenovsky et al. 2004).

Vertikální a horizontální uspořádání půdy je také významným činitelem v otázce struktury společenstev mikroorganismů. Podle Eilers et al. (2012) se mohou mikrobiální společenstva ve stejném půdním profilu (dokonce i společenstva oddělená hloubkou pouhých 10-20 cm) od sebe navzájem lišit stejně tak, jako je tomu u půdních společenstev v odlišných biomech vzdálených od sebe i několik set až tisíc kilometrů. Je to dáno zejména fyzikálně-chemickými charakteristikami jednotlivých vrstev půdních profilů, u kterých může dojít k náhlým změnám. Fierer et al. (2003) zjistili při studiu vzorků z kalifornské přírodní rezervace, že celková mikrobiální biomasa s hloubkou v půdním profilu klesá. Bylo zjištěno, že největší hustota mikrobiální biomasy je nalezena ve svrchních částech půdy v hloubce do 25 cm (Blume et al. 2002). Ze studie Fierer et al. (2003) vyplývá, že v hloubce 25-200 cm se nachází 33-35 % mikrobiální biomasy. Kromě početnosti se také významně s hloubkou změnilo složení a struktura mikroorganismů v obou studovaných profilech. Velká četnost prvoků, hub a gramnegativních bakterií byla popsána převážně ve svrchní horizontech s hloubkou do 25 cm, kdežto četnost grampozitivních bakterií včetně aktinobakterií s klesající hloubkou narůstala. Nárůst populace aktinobakterií v hlubších půdních horizontech zaznamenali ve své studii i Fritze et al. (2000).

Změny ve struktuře mikrobiálních společenstev ve vztahu k hloubce v půdním profilu bývají spojené zejména s dostupností živin/zdrojů. Ve studii byl posun ve struktuře mikrobů ve vztahu k hloubce a dostupnosti zdrojů také zaznamenán. Například ve dvou profilech koluviálních půd byla zjištěna dominance stejných bakteriálních kmenů napříč všemi horizonty. Řada kmenů zahrnujících i ty méně početné byla však specificky vertikálně rozmístěna v různých hloubkách a korelovaly s chemickými vlastnostmi v jednotlivých horizontech, kmen *Acidobacteria* se nejhojněji vyskytoval v hloubce 100 cm, kmen *Bacteroidetes* byl nejvíce zastoupen v povrchových vrstvách do 75 cm a kmen *Actinobacteria* zaznamenal svůj největší nárůst v hloubce 250-350 cm. V této studii byla potvrzena změna struktury společenstev vzhledem k dostupnosti zdrojů především pro aktinobakterie, jelikož byla zaznamenána jejich korelace s obsahem organického uhlíku a s koncentrací celkového dusíku v půdě (Sagova-Mareckova et al. 2016). Eilers et al. (2012) studovali prokaryotní společenstva (jak bakteriální, tak archaeální) v půdách lokalizovaných v horských oblastech v Coloradu (USA). Oblast je charakteristická zalesněnou oblastí s centrální loukou. Analýza fyzikálně-chemických parametrů prostředí ukázala, že obsah uhlíku a dusíku v půdě exponenciálně klesal s hloubkou, poměr C:N se snižoval, zatímco půdní pH se zvětšující se hloubkou zvyšovalo. Bylo zjištěno, že mikrobiální biomasa se exponenciálně s hloubkou snižovala. Půdním profilům dominovaly bakteriální kmene *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*. Byly však zaznamenány změny ve složení mikrobiálních společenstev napříč půdními horizonty. Například proporcionální zastoupení kmene *Bacteroidetes* klesalo exponenciálně s hloubkou, zatímco *Actinobacteria* byly nejpočetnější ve svrchních částech půdy a v nejhlubších místech vykopaných jam. Porovnáním

všech vzorků se zjistilo, že společenstva ze středních hloubek (~20-60 cm) byla ve všech profilech relativně rovnocenná nehledě na lokalizaci nebo vegetační pokryv.

Dalším významným vlivem na strukturu mikrobiálních společenstev je hospodářské využití půdy. Gelsomino a Azzellino (2011) však došli k závěru, že bakteriální společenstva jsou formována zejména jedinečnými fyzikálně-chemickými podmínkami prostředí měnícími se s hloubkovými gradienty a typem půdy. Takže druh hospodaření působí spíše jako sekundární faktor ovlivňující variabilitu půdních mikroorganismů. Toto tvrzení je v souladu s předchozí studií Girvan et al. (2003).

3.7.2 Interakce rizikových prvků s mikroorganismy

Půdní mikroorganismy se účastní mnoha půdních procesů a díky krátké generační době a velkému povrchu oproti objemu rychle reagují na změny prostředí. Rizikové (kovové) prvky ve zvýšených koncentracích narušují výkon mikrobiálních společenstev (Stefanowicz et al. 2010). V půdním prostředí závisí toxicita kovů na jejich biologické dostupnosti, která je dána frakcí, ve které se vyskytují. Za biologicky nejlépe dostupnou je považována snadno vyluhovatelná a iontově výměnná frakce, kterou mohou půdní organismy vyluhovat (Muhlbachova et al. 2015).

Účinek kovového zatížení na mikroby bývá úzce spojen s půdními vlastnostmi, jako je pH půdy, obsah organické hmoty, jílu, obsah Fe oxidů a redoxní potenciál. Z vyjmenovaných má často největší vliv půdní pH, a to vzhledem k jeho silnému vlivu na rozpustnost a speciaci kovů (Olaniran et al. 2013).

Stopové prvky (kovy) mohou představovat trvalé nebezpečí pro životní prostředí, jelikož je na rozdíl od organických znečišťujících látek není možné degradovat. Nejsou biologicky rozložitelné, a proto vykazují dlouhodobou perzistenci ve vodních a suchozemských ekosystémech (Jiang et al. 2010). Dlouhodobý vliv kovového znečištění na půdní mikroorganismy nese odpovědnost za negativní účinky na mikrobiální aktivity, početnost a strukturu mikrobiálních společenstev (Tsezos 2009). Giller et al. (1998) uvádí, že mikroorganismy jsou mnohem citlivější na stresové účinky kovů (jako jsou například Hg, Pb či Cd), než je tomu u půdních živočichů či rostlin vyskytujících se ve stejných půdách.

Kovy interagují s esenciálními buněčnými složkami mikrobů prostřednictvím kovalentní a iontové vazby. Při vyšších koncentracích mohou ionty toxických prvků poškodit buněčné membrány, pozměnit specifčnost enzymu, narušit buněčné funkce a poškodit strukturu DNA. Toxicita rizikových prvků („těžkých kovů“) spočívá ve schopnosti vytěsnit esenciální kovy z jejich přirozených vazebných míst nebo interakcí ligandů. Například Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ag^{2+} mají tendenci se vázat na thiolové skupiny enzymů nezbytných pro mikrobiální metabolismus, a v důsledku toho inhibovat aktivitu citlivých enzymů (Bruins et al. 2000; Olaniran et al. 2013).

I přes zjevné toxické účinky, dokáže mnoho mikrobů růst, a dokonce prospívat v místech znečištěných kovy díky řadě mechanismů, jak aktivních, tak náhodných, které přispívají k rezistenci vůči potenciálně toxickým kovům (Gadd 2010). Podle Bruins et al. (2000) existuje šest druhů mechanismů rezistence: vyloučení skrz propustné bariéry, intracelulární či extracelulární sekvestrace, aktivní působení efluxních systémů, enzymatická detoxikace, redukce citlivosti buněčných cílů ke kovovým iontům. Gadd (2010) uvádí jako mechanismy

tolerance kovů: redoxní transformace, produkce peptidů a proteinů vázajících se na kov (např. metalothioneiny, fytochelatiny) či organické a anorganické srážení.

Mikroorganismy největší měrou zajišťují biogenní degradaci, imobilizaci nebo sorpci škodlivých látek. Míra bioakumulace a biosorpce závisí u mikroorganismů na druhové specifitě a na esencialitě či neesencialitě prvků. Z mikroorganismů lze jmenovat některé kvasinky a bakterie, které jsou schopny účinné biosorpce kovových prvků v půdě. Biosorpční vlastnosti a projevy lze zaznamenat u různých prokaryot, z nichž je to například rod *Citrobacter*. Tento rod uskutečňuje biosorpci v pořadí Zn>Cu>Cd>Ni>Co. Biosorpci kovů lze pozorovat také u druhu *Pseudomonas cepacia* či rodu *Rhodococcus* (biosorpce v pořadí Ni>Co>Cd). Dále například kvasinka *Yarrowia lipolytica* dokáže způsobit bioakumulaci rizikových prvků a tyto vázat do struktury aminokyselin na bázi metallothioneinu. Známým širokospektrým sorbentem kovového znečištění z vod a půdního roztoku je spájivka *Rhizopus arrhizus* (Samec & Formánek 2007).

Bioremediace je přirozený proces, který se spoléhá na půdní mikroorganismy (bakterie, houby) a vyšší rostliny, které mohou svým působením dosáhnout posílení biologické dostupnosti kovů prostřednictvím bioremediace. Tento proces je účinnější v prostředí s dostatkem organické hmoty, kterou organismy využívají pro fungování přirozených fyziologických funkcí. Tyto organismy jsou pro své metabolické procesy schopny využívat anorganické kontaminanty jako zdroj energie, čímž znečišťující látky zneškodňují snížením jejich biologické dostupnosti (Park et al. 2011).

3.7.3 Studie vlivů rizikových prvků na strukturu mikrobiálního společenstva

Margesin et al. (2011) se pokusili charakterizovat mikrobiální společenstvo ve vzorcích půdy dlouhodobě kontaminovaných rizikovými prvky pomocí metod závislých a nezávislých na kultivaci. Obě studovaná místa se nacházejí v průmyslové oblasti Horního Slezska v jižním Polsku. První lokalita Tarnowskie Góry, je známá těžbou Ag, Zn, Pb, rozvojem chemického průmyslu a je uznána jako nejzávažnější zdroj kontaminace půdy a podzemní vody v Polsku. Druhá lokalita Piekary, je bývalým dolem a hutním areálem mezi městy Bytom a Piekary Śląskie. Primárními minerály zde identifikovanými byly Zn, Pb a Cd rudy, dolomit či silt. V první lokalitě byla naměřena celková koncentrace Zn v rozmezí 91-1404 mg kg⁻¹, 67-97 mg Pb kg⁻¹ a koncentrace Cd měla průměrnou hodnotu 1,3 mg kg⁻¹. U druhé lokality byly naměřeny hodnoty obsahů rizikových prvků v rozmezí 8930-16 231 mg Zn kg⁻¹, 6287-15 303 mg Pb kg⁻¹ a 262-467 mg Cd kg⁻¹. V obou půdách byly prokázány životaschopné, kultivovatelné, aerobní bakterie, jež byly adaptovány na znečištění. Vysoké procento bakteriální populace bylo schopno tolerovat vysoké množství Zn²⁺, Pb²⁺ a Cu²⁺, to však mohlo být také způsobeno vlivem některých složek půdy, jako jsou například organické ligandy či vyšší pH, které mohly způsobit snížení biologické dostupnosti toxických kovů. Byla zde zjištěna vysoká bakteriální diverzita. Na základě metody FISH (na kultivaci nezávislé - fluorescence *in situ* hybridizace) byla ve studovaných půdách prokázána přítomnost grampozitivních (kmen *Actinobacteria*) a gramnegativních bakterií (kmen *Proteobacteria*, třídy *Alpha-*, *Beta-*, *Gammaproteobacteria*).

Gremion et al. (2003) provedli studii, jež se zabývala fylogenetickým stanovením bakteriálního společenstva založeném na genu pro 16S rRNA, které obývá rhizosféru a půdu

kontaminovanou stopovými (rizikovými) prvky. Lokalitou pro odběr vzorků byla půda nedaleko města Ticino ve Švýcarsku. Půda byla v minulosti znečištěna odpady ze septiků, přičemž zde bylo zjištěno zvýšené množství potenciálně toxických prvků: 2,5 mg Cd kg⁻¹, 227 mg Cu kg⁻¹ a 1144 mg Zn kg⁻¹. Vzorky byly odebrány z rhizosféry rostliny *Thlaspi caerulescens* akumulující toxické stopové prvky (kovy) a z půdy bez vegetačního pokryvu z téže lokality. Částečná sekvenční analýza 282 klonů odhalila, že většina environmentálních sekvencí v obou půdách byla přiřazena k pěti hlavním fylogenetickým skupinám: *Actinobacteria*, α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria*, *Acidobacteria* a *Planctomycetales*. Zajímavým výsledkem bylo, že kmen *Actinobacteria* byl shledán jako dominantní část metabolicky aktivních bakterií v kovy zatížené půdě. Zhruba 75 % klonových sekvencí ze sekvencí přiřazených *Actinobacteria* náleželo k třídě *Rubrobacteria*, přičemž se jedná o první důkaz schopnosti bakterií z této skupiny být metabolicky aktivní v půdě znečištěné toxickými kovovými prvky.

3.7.4 Vliv thallia na mikroorganismy

Jak už bylo zmíněno výše, geochemické chování Tl je obvykle řízeno řadou fyzikálně-chemických parametrů, a v důsledku toho se speciace Tl a složení mikrobiálních společenstev může měnit v závislosti na lokalitě (Rasool et al. 2020).

Navzdory nepříznivým účinkům existují mikroorganismy, které mohou naopak přispět k distribuci či imobilizaci Tl, některé druhy se dokázaly na podmínky znečištění adaptovat. Mikroorganismy mohou prostřednictvím mobilizace či precipitace přispět k biogeochemickému cyklení Tl (Rasool et al. 2020). Důležitou roli hraje také aktivita mikroorganismů v oxidaci nebo redukci sulfidů, a v důsledku toho způsobená mobilita a speciace kovů či polokovů navázaných na sulfidy (Schippers et al. 2010).

Sun et al. (2012) použili pro své zkoumání půdy zatížené Tl-As-Hg mineralizací a těžbou rud z oblasti Lanmuchang v Číně. Studie byla zaměřena na charakterizaci kultivovatelných mikrobiálních skupin vyskytujících se v kontaminované půdě. I přesto, že statistické vyhodnocení přineslo výsledek potlačení značného počtu bakterií a hub, byly zde izolováni a identifikováni zástupci mikroorganismů, kteří mohou růst v prostředí obsahujícím koncentrace Tl až 1000 mg kg⁻¹. Byly to konkrétně houby rodu *Trichoderma*, *Penicillium* a *Paecilomyces* (Sun et al. 2012).

Bao et al. (2014) ve své studii zaznamenali tolerantní bakterii vůči Tl zatížení půdy. Jedná se o bakterii *Alsobacter metallidurans* z řádu *Rhizobiales*.

Boriová et al. (2014) zjistili schopnost biovolatilizace Tl u vláknité houby *Scopulariopsis brevicaulis*.

Podle Schedlbauer a Heumann (2000) zde existují mikroorganismy schopny biomethylace Tl. Jejich působením vznikají produkty, z nichž nejstabilnější formou je dimethylthallium (Me₂Tl⁺).

Liu et al. (2019a) se zabývali mikrobiálními společenstvy a jejich interakcemi s Tl v sedimentech povodí řeky v blízkosti pyritové těžby v provincii Guandong v Číně. Sedimenty vykazovaly pH v rozmezí 2,9-6,3 a vyšší hodnoty Eh. Bylo zaznamenáno zvýšené množství celkového Fe a S v sedimentech, a to zejména ve vzorcích odebraných blíže k pyritovému dolu. Byla též provedena sekvenční extrakce k určení chemické frakcionace Tl. Ukázalo se,

že převážná část Tl byla zachycena v reziduální frakci (90-97 %), menší podíly Tl byly v redukovatelné frakci (2-5 %), oxidovatelné frakci (0,2–3 %) a výměnné frakci (0,4-2 %). Analýzou založenou na metodách stanovení mikrobiální diverzity ve vzorku bylo odhaleno více než 50 kmenů z domény Bacteria a jeden kmen domény Archaea. Nejhojněji zastoupenými kmeny v sedimentech byly *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Euryarchaeota* či *Nitrospirales*. Bylo zjištěno, že sedimenty se zvýšeným obsahem Tl (2-16 mg kg⁻¹) byly bohaté na bakterie recyklující Fe a S. Dále bylo zjištěno, že mikrobiální společenstva byla formována zejména na základě Tl frakci a geochemických parametrů jako je pH a Eh. Studie prokázala, že vysoký obsah Tl v reziduální frakci a kladný vztah k mikrobiálnímu společenství může být způsoben schopností mikroorganismů převést Tl do stabilní frakce. Konkrétně byla pozorována silná pozitivní korelace mezi mikroorganismy oxidujícími Fe a S a celkovým obsahem Tl či zbytkovou frakci. Zpracování výsledků sekvenace prokázalo ve vzorcích hojně zastoupení rodů *Ferroplasma*, *Leptospirillum*, *Ferrovum*, *Metallibacterium*, *Acidithiobacillus* a *Sulfuriferula*, jež mají schopnost Fe a S oxidace. Tyto mikroby jsou schopny snášet vysoké znečištění Tl a dále udržovat metabolickou aktivitu. Dle Liu et al. (2019a) mohou některé druhy imobilizovat Tl oxidací Tl(I) volných iontů na Tl₂O₃ a/nebo dimethylthallium.

Rasool et al. (2020) charakterizovali ve své studii mikrobiální společenstva žijící v půdách znečištěných Tl v oblasti Lanmuchang, provincii Guizhou v Číně, která je známá výskytem minerálů bohatých na Tl. V jejich studii bylo zjištěno, že celkové Tl, Fe a pH půdy jsou nejdůležitějšími proměnnými ovlivňující mikrobiální společenstva. Vzorky půdy byly odebrány z břehu řeky Qingshui protékající mineralizovanou oblastí. Nejprve bylo analyzováno několik fyzikálně-chemických parametrů. Vzorky půdy, které byly odebrány v horní části toku, vykazovaly pH v rozmezí 4,8-5,4, u vzorků odebraných ze střední části břehu toku bylo zaznamenáno pH 3,5-6 a u vzorků z dolní části toku bylo naměřeno pH 4-5. Podle Rasool et al. (2020) má půda z oblasti Lanmuchang vhodné pH a dostatečné množství organického uhlíku k tomu, aby zde mohlo dojít k rozšíření mikrobiální aktivity. Veškeré vzorky obsahovaly zvýšené množství Tl, a to 5-10 mg kg⁻¹ v horní části toku, 12-13 mg kg⁻¹ ve střední části a 2-28 mg Tl kg⁻¹ v dolní části. Na základě analýzy výsledků sekvenace Illumina, bylo zjištěno, že naprostá většina sekvencí, to znamená 95 % celkových 16S rRNA sekvencí, náležela do 10 bakteriálních kmenů. Celkem bylo zjištěno více než 40 bakteriálních a archaeálních kmenů ve vzorcích studované půdy. Ve všech vzorcích půdy byly dominantními *Acidobacteria*, *Actinobacteria* a *Proteobacteria*. Dalšími hojně zastoupenými kmeny byly *Gemmatimonadetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* a *Planctomycetes*. Na úrovni rodů byly ve vzorcích půdy hojně zastoupeny *Rhodoferax*, *Hydrogenophaga*, *Microbacterium*, *Rhizobiales bacteria*, *Betaproteobacteria*, *Rhodobacter*, *Firmicutes*. Tyto rody zahrnují druhy, které jsou schopny tolerovat zatížení toxickými stopovými prvky nebo byly vyvinuty v kovy obohacené půdě oblasti Lanmuchang. Rod *Rhodobacterales* z kmene *Proteobacteria* byl identifikován jako Tl oxidující bakterie ve studovaných vzorcích. Druh *Nocardia opaca* náležející do kmene *Acidobacteria* je podle Rasool et al. (2020) považován za genetický materiál schopný mobilizace Tl. Dle zjištění se zde vyskytovaly také mikroorganismy schopné tolerance kovového znečištění půdy, a to rody: *Ralstonia*, *Nocardioides*, *Flavobacterium*, *Gemmobacter* a *Gaiella*.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Zájmová lokalita

Lokalita Erzmatt se nachází nedaleko obce Buus ve švýcarském pohoří Jura vzdálené asi 25 km od města Basilej. Erzmatt pokrývá louka, která byla v minulosti aktivně využívána pro zemědělské účely. V současné době je zde praktikován převážně ekologický přístup hospodaření, tzn. úhor s původními rostlinami.

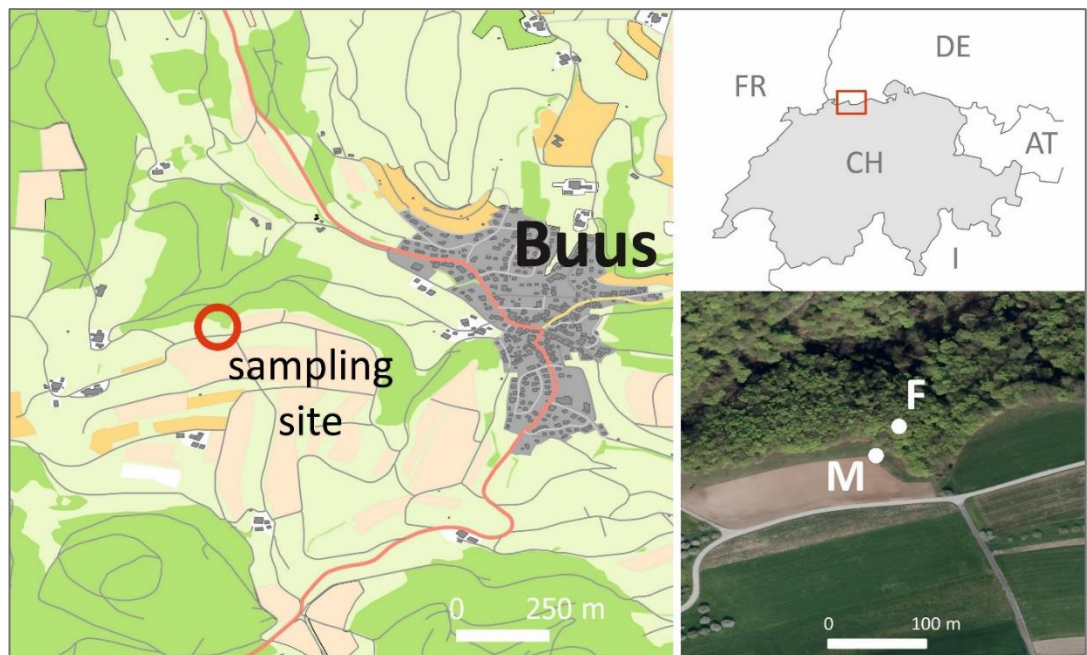
Pro oblast je typické mírné podnebí s průměrnou roční teplotou ~ 9 °C a úhrnem srážek ~ 960 mm (Voegelin et al. 2015). Půdy této lokality vznikly na karbonátovém (dolomitickém) podloží. Oblast je charakteristická vysokými koncentracemi litogenního Tl, As a Fe v půdě, a to v důsledku sulfidické (hydrotermální) mineralizace Fe-As-Tl. V nejvíce zatížené oblasti byly popsány celkové koncentrace Tl 100-1000 mg kg⁻¹ v horních vrstvách půdy (0-20 cm). Koncentrace Tl až 6000 mg kg⁻¹ byly detekovány ve spodních půdních horizontech obsahujících zvětralé fragmenty rudy. Jsou zde zastoupeny minerály jako kalcit (CaCO₃), dolomit (CaMg(CO₃)₂), K-živce (KAlSi₃O₈), křemen (SiO₂) a dále i jílové minerály typu illit ((K,H₃O)Al₂(Si,Al)₄O₁₀(OH)₂) a kaolinit (Al₄(OH)₈Si₄O₁₀), popřípadě kombinované struktury illit-smektit. Voegelin et al. (2015) zde ve své studii prokázali přítomnost minerálu avicennit (Tl₂O₃) či substituovaného Tl(I)-jarositu, které jsou dominantními sekundárními minerály Tl. Thallium je zde dále přítomno ve formě Tl(I) asociované s illitem, ve formě Tl(III) pak převážně s Mn(III,IV)-oxidy v Mn-konkrecích. Podle Herrmann et al. (2018) lze díky nalezeným sekundárním minerálům usuzovat, že zde došlo ke zvětrávání sulfidů - převážně pyritu s nadbytkem Tl a As. Pro své geologické podloží lze lokalitu Erzmatt podle Herrmann et al. (2018) srovnat s lomem Lengenbach v jižním Švýcarsku, který je známý ložisky sulfidů bohatých na Tl, Ag, Cu a Pb.

Půda na lokalitě Erzmatt byla klasifikována jako kambizem s neutrálním, až mírně kyselým pH vykazující slabé redoximorfnní vlastnosti a různorodou dekalifikaci (Voegelin et al. 2015; Herrmann et al. 2018).

4.1.2 Odběr a úprava půdních vzorků

Pro experiment byly zvoleny dva půdní profily s kontrastním hospodářským využitím. První byla zvolena zemědělská půda - louka (M), jako druhý byl vybrán půdní profil sousedícího lesa (F). Dominantním rostlinným druhem rostoucím na lesní půdě byl určen druh *Fagus sylvatica*. Rostlinný pokryv půdy louky byl tvořen lučními bylinami, mezi nimiž byl hojně zastoupen druh *Knautia arvensis*. Odběr půdních vzorků proběhl v srpnu 2018, a to na místech vyznačených na Obrázku 1 s GPS souřadnicemi, které jsou uvedeny v Tabulce 1. Vzorky byly odebrány z kopaných sond z jednotlivých vrstev půdy - horizontů (dle vývoje půdy po 1-5 cm) (Obrázek 2). Pro mikrobiální analýzu byly odebrány sterilně pomocí pinzety půdní agregáty, které byly umístěny do zkumavek (Eppendorf) a následně uloženy do mobilního mrazicího boxu s teplotou -25 °C (posléze v laboratoři uloženy

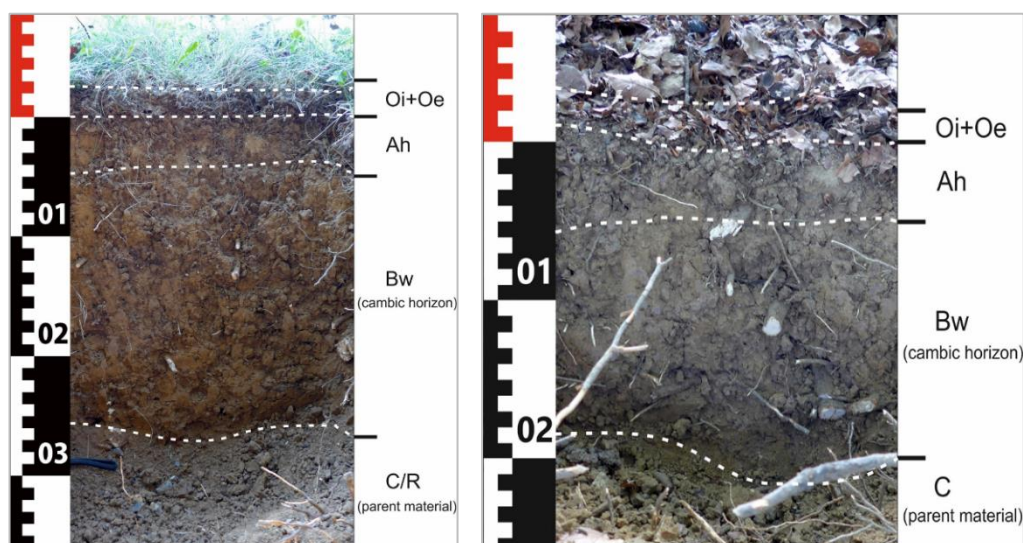
při -80 °C). Pro geochemické a fyzikálně-chemické analýzy byly vzorky odebrány do vzorkovnic, následně na vzduchu vysušeny a síťovány na frakci <2 mm.



Obrázek 1: Vyznačení zájmové lokality a místa odběru vzorků z půdních profilů louky (M) a lesu (F) na mapě, zdroj: Aleš Vaněk

Tabulka 1: Přesná lokalizace odběrových míst půdních vzorků

| Místo odběru - půdní profil | GPS souřadnice |
|-----------------------------|-------------------------|
| Louka (M) | N 47.505715, E 7.852667 |
| Les (F) | N 47.505781, E 7.852798 |



Obrázek 2: Studované půdní profily - louka (vlevo), les (vpravo) včetně konkrétního zakreslení půdních horizontů (Oe - organický, Ah - organominerální, Bw - kambický, C - půdotvorný substrát), zdroj: Aleš Vaněk

4.1.3 Chemikálie pro mikrobiologickou část

Tabulka 2: Seznam použitých chemikálií pro mikrobiologickou část

| Název | Výrobce/dodavatel | Zkratka |
|---|--|----------------------------------|
| 10X AccuPrime™ PCR Buffer II | Invitrogen, Carlsbad, Kalifornie, USA | |
| AccuPrime™ <i>Taq</i> DNA Polymerase | Invitrogen, Carlsbad, Kalifornie, USA | |
| Agaróza | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | |
| Dihydrogenfosforečnan sodný | Penta, Praha, Česká republika | NaH ₂ PO ₄ |
| Dimethylsulfoxid | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | DMSO |
| dNTP | Thermo Scientific, Massachusetts, USA | |
| Ethanol | Penta, Praha, Česká republika | |
| Fenol | MP Biomedicals, Santa Ana, Kalifornie, USA | |
| GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder | Thermo Scientific, Massachusetts, USA | |
| Hexadecyltrimethylamoniumbromid | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | CTAB |
| Chlorid hořečnatý | Invitrogen, Carlsbad - Kalifornie, USA | MgCl ₂ |
| Chlorid sodný | Penta, Praha, Česká republika | NaCl |
| Chlorid vápenatý | Penta, Praha, Česká republika | CaCl ₂ |
| Chloroform | Lach-Ner, Neratovice, Česká republika | |
| Isoamylalkohol | Penta, Praha, Česká republika | |
| Isopropylalkohol | Penta, Praha, Česká republika | |
| Kyselina 4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazinetsulfonová | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | HEPES |
| Kyselina etylendiamintetraoctová | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | EDTA |
| Octan sodný | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | |
| SYBR® Safe DNA Gel Stain | Invitrogen, Carlsbad - Kalifornie, USA | |
| Tris hydrochlorid (Tris-HCl) | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | |
| Tris-acetát | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA | |
| Yellow Load buffer | Top-Bio, Česká republika | |

4.1.4 Média a pufry

Tabulka 3: Seznam použitých médií a pufřů

| Název | Složení | Koncentrace/množství |
|---------------|--|----------------------|
| Müllerův pufr | NaH ₂ PO ₄ (pH8) | 50 mM |
| | NaCl | 50 mM |
| | Tris-HCl (pH8) | 50 mM |
| TAE | Tris-acetát | 40 mM |
| | EDTA (pH 8) | 1 mM |

4.1.5 Komerční sady

- Gene Read Size Selection Kit (50) - QIAGEN, Hilden, Německo

4.1.6 Oligonukleotidy

Tabulka 4: Název a sekvence použitých primerů

| Název | Sekvence | Dodavatel |
|-----------|--|--|
| CS1_515pF | 5'- ACACTGACGACATGGTTCTACAGA GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3' | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |
| CS2_806aR | 5'- TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTAC GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3' | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA |

4.2 Metody

4.2.1 Stanovení půdních fyzikálně-chemických a geochemických charakteristik

Aktivní a výměnná půdní reakce (pH_{H₂O}; pH_{KCl}) byly potenciometricky stanoveny v roztoku deionizované vody či 1M roztoku KCl, a to v poměru 1:5 (v/v) pomocí pH-metru (Handylab pH multimetr, Schott, Německo). Dále byl v půdních vzorcích zjišťován celkový obsah uhlíku (TC) a celkový obsah síry (TS), k jejichž stanovení byla použita katalytická oxidace při teplotě 1350 °C za pomoci analyzátoru Flash 2000 Series CNS (Thermo Scientific, Německo). Obsah jílu ve vzorcích byl určen sedimentační hustoměrnou metodou (Gee & Bauder 1986).

Kationtová výměnná kapacita (CEC) byla stanovena nasycením vzorků půdy - půdního sorpčního komplexu barnatými kationty Ba²⁺ (0,1 M BaCl₂) a následným vytěsněním Ba²⁺ iontů prostřednictvím hořečnatých iontů Mg²⁺ (roztok MgSO₄) (ISO 11260:1994).

Pro zjištění celkové půdní mineralogie byla aplikována metoda rentgenové práškové difrakce (XRD) (X'Pert Pro difraktometr; PANalytical, Nizozemsko) za standardních analytických podmínek: CuK α radiace, 40 kV, 30 mA, krok skenování 0.02°/150 s v rozmezí

3-80° 2θ. Výsledné mineralogické složení bylo vyhodnoceno pomocí programu X'Pert HighScore software 1.0 a databáze JCPDS PDF-2 database.

Pro stanovení krystalických/amorfních Fe, Mn a Al oxyhydroxidů a spoluasociovaného Tl bylo využito oxalátové extrakce, která byla provedena podle metodiky Pansu a Gautheyrou (2006). K 1 g na vzduchu vysušené půdy bylo přidáno 50 ml 0,2 M šťavelanu amonného modifikovaného kyselinou šťavelovou (pH = 3).

Výměnná Tl frakce byla stanovena jednoduchou extrakcí dusičnanem amonným (1 M NH_4NO_3) v poměru 1:2,5 (půda/roztok), přičemž reakční doba byla 2 hodiny.

Chemická frakcionace Tl byla provedena modifikovanou BCR sekvenční extrakcí dle Rauret et al. (2000) postupně ve čtyřech krocích. V prvním kroku byla stanovena výměnná/kyselinou extrahovatelná Tl frakce, a to přidáním 0,11 M CH_3COOH (pH = 3) k vzorku půdy v poměru 1:40 (půda:kapalina). V dalším kroku byla získána redukovatelná Tl frakce extrakcí 0,5 M $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (pH = 1,5) s poměrem 1:40 (půdní vzorek:kapalina), následovalo stanovení oxidovatelné Tl frakce pomocí roztoku 8,8 M H_2O_2 /1 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (pH = 2) v poměru 1:50 (půdní vzorek:roztok). Na závěr byl vzorek rozložen ve směsi HNO_3 / HCl / HF na varné desce. Takto byla získána reziduální frakce Tl.

Celkový rozklad vzorků půd byl proveden za účelem získání hodnot celkového obsahu Tl (Tl_{tot}) a dalších významných prvků. Nejprve byly půdní vzorky homogenizovány a v achátovém mlýnu rozemlety. Rozkládáno bylo vždy 0,2 g půdního vzorku (pro stanovení z půdních agregátů byla navážka vzorku různá - uvedeno v Příloze 1 a 2; stanovení proběhlo v pěti opakováních z každého půdního horizontu daného profilu) ve směsi HF/HNO_3 (Merck, Německo) v poměru 1:2 v celkovém objemu menším než 20 ml. Rozklad byl uskutečněn v 60 ml PTFE tlakových nádobkách (Saville, USA), které byly umístěny na horkou desku zahřátou na 150 °C po dobu 48 hodin. Pro vyloučení organického rezidua bylo k analyzovaným vzorkům přidáno 2-4 ml H_2O_2 .

Obsahy jednotlivých prvků obsažených ve všech výluzích a extraktech půdních vzorků byly měřeny ve třech opakováních pomocí metody optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES; iCAP 6500, Thermo Scientific, Velká Británie) či hmotnostní (kvadrupólové) spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (Q-ICP-MS; Xseries II, Thermo Scientific, Německo).

Metody byly provedeny ve spolupráci s doc. RNDr. Alešem Vaňkem, Ph.D. a Ing. Kateřinou Vejvodovou.

4.2.2 Stanovení organické hmoty v půdních agregátech metodou ztráty žiháním

Ke stanovení přibližného podílu půdní organické hmoty v jednotlivých horizontech studovaných půd bylo využito metody ztráty žiháním, tedy stanovení organických látek ve vzorcích půdy spalováním na suché cestě. Z každého horizontu půdy bylo odebráno 5 půdních agregátů o hmotnosti 0,1-0,5 g a následně vysušeno v sušárně při teplotě 105 °C. Vysušené vzorky půdy o dané hmotnosti (viz Příloha 1 a 2) byly vpraveny do předem vyžíhaných a zvážených porcelánových kelímků. Kelímky se vzorky byly opět přesně zváženy a vloženy do muflovací pece, kde byly žihány při teplotě 500 °C po dobu 30 minut. Po vyžihání byly vzorky vyjmuty z pece kovovými kleštěmi a vloženy do exsikátoru. Po řádném zchladnutí byly kelímky se vzorky opět zváženy. Zjištěním vysokého obsahu organické hmoty ve vzorcích

byly podmínky spalování upraveny na 300 °C, při kterých by měla být eliminována chyba měření (spalování karbonátů při teplotě >360 °C) (Salehi et al. 2011). Výpočet organické hmoty byl proveden dle vzorce:

$$y = ((m_1 - m_2) / m_1) * 100 [\%]$$

m_1 - hmotnost vysušeného vzorku před žiháním

m_2 - hmotnost vzorku po vyžhání

4.2.3 Extrakce environmentální DNA

Z každého horizontu dané půdy bylo vybráno 5 půdních agregátů o hmotnosti 0,1-0,5 g (přesné označení vzorků a jejich hmotnosti viz Příloha 3 a 4). Znamená to tedy, že byla uskutečněna izolace DNA vždy v pěti opakování z každého horizontu obou půdních profilů a celkem bylo získáno 65 vzorků DNA. Extrakce DNA z půdních agregátů byla provedena dle protokolu Sagova-Mareckova et al. (2008).

Do 2 ml zkumavek (Eppendorf) se šroubovacím uzávěrem bylo naváženo 250 mg skleněných kuliček o průměru 0,1 mm a 250 mg skleněných kuliček o průměru 0,5 mm. Po sterilizaci zkumavek s kuličkami byl do každé zvlášť přidán jeden půdní agregát o hmotnosti od 0,1 g do 0,5 g. Účinnost metody extrakce DNA byla následně zvýšena ovlhčením každého půdního agregátu destilovanou vodou (na 0,1 g vzorku přidat 100 μ l dH₂O). Tato úprava vedla k velmi úspěšné izolaci DNA z mikrobiálních buněk nacházejících se v daných agregátech.

V dalším kroku bylo do zkumavek přidáno 600 μ l Müllerova extrakčního pufru a 300 μ l směsi fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 25:24:1. Zkumavky byly vloženy do kulového mlýnku (3110 BX Mini-BeadBeater-1, Biospec Products, OK, USA), pomocí kterého byly vzorky s chemikáliemi homogenizovány a buňky lyzovány po dobu 1,5 minuty při 2500 kmitech za minutu. Následně byly vzorky přesunuty do centrifugy (Eppendorf Centrifuge 5418, Eppendorf, Hamburk, Německo) a zde odstředovány 2 minuty při 12 000 \times g. Vzniklý supernatant byl pipetou odebrán a umístěn do nových sterilních zkumavek.

Do původních zkumavek s půdními agregáty bylo opět přidáno 300 μ l Müllerova extrakčního pufru a byla zopakována homogenizace mlýnkem, v tomto případě však po dobu 30 sekund při 2 500 ot/min. Následovala dvouminutová centrifugace s rychlostí 12 000 \times g. Byl odebrán supernatant a smíchán s přešlým již získaným supernatantem.

Do mixu supernatantů byl přidán stejný objem směsi fenolu, chloroformu, isoamylalkoholu (poměr 25:24:1), a to vše bylo důkladně promícháno. Poté byly vzorky odstředěny po dobu 5 minut rychlostí 6000 \times g. Opět byl odňat supernatant do nové zkumavky a k němu přidán stejný objem směsi chloroform/isoamylalkoholu. Vzorky byly odstředovány 5 minut při 6000 otáčkách za minutu. Tekutina nad sedimentem byla odebrána do čistých zkumavek a zahřáta na 65 °C. Poté byl přidán 5M roztok chloridu sodného o takovém objemu, aby výsledná koncentrace byla 1,5 M. A dále byl přidán zahřátý a plně rozpuštěný 10 % CTAB na výslednou koncentraci 1 %. Vzorky byly vloženy na 30 minut do termobloku (Bio TDB-100 Dry Block Heating Thermostat, Biosan, Riga, Lotyšsko) a zde inkubovány při teplotě 65 °C. Po uplynutí dané doby byly zchlazeny v nádobě s ledem na 20 °C. Do zkumavek byla přidána směs chloroform/isoamylalkoholu o stejném objemu jako objem v nich obsaženého vzorku. Směs ve zkumavkách byla centrifugována 15 minut při 4500 ot/min. Do nové zkumavky

s odebraným supernatantem byl přidán 3M roztok octanu sodného (pH = 5) o objemu 1/10 množství supernatantu a 0,6 objemu isopropylalkoholu. Tato směs byla řádně promíchána a ponechána 30 minut při pokojové teplotě. Následně byly vzorky odstředěny v chlazené centrifuze (Eppendorf Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburk, Německo) po dobu 20 minut při 10 000 otáčkách za minutu a teplotě 4 °C.

Po centrifugaci byly vzorky zbaveny supernatantu a peleta DNA promyta 50 µl vychlazeného 70% ethanolu (uchovávaného v mrazicím boxu). Vzorky byly opět stočeny v chlazené centrifuze po dobu 5 min a 10 000 ot/min. Supernatant byl slit a zkumavky byly umístěny do vakuového koncentrátoru CentriVap (Labconco, Kansas City, MO, USA), kde byly pelety vysušeny při 40 °C. Poté bylo do zkumavek přidáno 50 µl destilované vody, ve které byla peleta DNA rozpouštěna po dobu 60 minut při teplotě 65 °C.

Následně byla určena koncentrace DNA ve vzorcích a následně byly vzorky zředěny na koncentraci 100 ng/µl. Do nových zkumavek bylo odebráno 50 µl vzorku, k nimž bylo přidáno 5 µl 1M pufru HEPES (1/10 objemu vzorku) a 5 µl 1M roztoku CaCl₂ (1/10 objemu vzorku). Směs byla jemně promíchána a ponechána 30 minut při pokojové teplotě.

Purifikace byla provedena pomocí Gene Read Size Selection Kit (50) a postupováno bylo dle upraveného přiloženého protokolu výrobce komerční sady.

Do vzorků bylo přidáno čtyřnásobné množství pufru (Buffer SB1) než byl objem daného vzorku. Vzorky byly promíchány a jednotlivě přesunuty do vychlazených přečišťovacích spin kolonek (MinElute® Spin Columns) se sběrnými zkumavkami. Vzorky byly umístěny do centrifugy a odstředovány 1 minutu při 14 000 otáčkách za minutu. Kapalný obsah sběrné zkumavky byl slit a kolonky byly dány zpět na tyto zkumavky. Na filtr kolonek bylo napipetováno 700 µl 80% ethanolu a vzorky byly centrifugovány po dobu 1 minuty nejvyšší rychlostí centrifugy (14 000 ot/min). Sběrné zkumavky byly vylity a na ně umístěny zpět přečišťovací kolonky. Na filtr kolonek bylo opět naneseno 700 µl 80% ethanolu a vzorky byly stočeny po dobu 1 minuty při maximální rychlosti centrifugy. Obsah zkumavek byl vylit a vzorky ještě jednou odstředěny 1 minutu při 14 000 ot/min. Následně byly kolonky přemístěny do čistých 1,5 ml mikrozkušavek. Přímou do středu filtru kolonek bylo naneseno 30 µl destilované vody zahřáté na 35 °C, a to bylo ponecháno/inkubováno zhruba 1 minutu. Poté byly vzorky centrifugovány po dobu 1 minuty nejvyšší rychlostí. Tímto byla extrahovaná DNA uvolněna z filtru kolonek a mikrozkušavky s DNA byly uloženy do mrazicího boxu s teplotou -80 °C.

Úspěšnost extrakce DNA a následné purifikace byla ověřena pomocí elektroforézy. Případně byl k orientačnímu zhodnocení kvality roztoku DNA použit spektrofotometr NanoPhotometer (Implen, Mnichov, Německo).

Spektrofotometrem byla změřena koncentrace vzorku DNA na základě absorbance při vlnové délce 260 nm. Pomocí poměrů absorbancí o vlnových délkách A₂₆₀/A₂₈₀ a A₂₆₀/A₂₃₀ byla určena čistota extrahované DNA. Za proteiny či rozpouštědly znečištěné vzorky DNA jsou považovány ty, které vykazovaly hodnotu A₂₆₀/A₂₈₀ menší než 1,8 a hodnota poměru A₂₆₀/A₂₃₀ byla nižší než 2,0.

4.2.4 Elektroforéza

K ověření výsledků izolace DNA a PCR reakcí byla použita agarózová elektroforéza. Pro kontrolu vzorků DNA byl připraven 0,5% agarózový gel tak, že do 50 ml TAE pufru bylo přidáno 0,5g agarózy, pro ověření produktu PCR reakcí byl připraven 1% agarózový gel (směs 100 ml TAE pufru a 1 g agarózy). Tato směs byla na 2-3 minuty umístěna do mikrovlnné trouby, kde došlo k úplnému rozpuštění agarózy. Do lehce zchlazeného roztoku bylo přidáno 5 μ l barviva SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (naředěný DMSO v poměru 1:9). Směs byla nalita do formy a ponechána zhruba 30 minut při pokojové teplotě. Po ztuhnutí byl gel vložen do elektroforézové aparatury obsahující TAE pufr. Do jamek v gelu bylo nanášeno 2 μ l DNA společně s 3 μ l pufru Yellow Load, ke 2 μ l PCR produktu bylo přidáno 8 μ l pufru Yellow load. Do jedné jamky v gelu bylo vždy nanášeno 5 μ l markeru GeneRuler[™] 1kb Plus DNA Ladder, s jehož pomocí byla určena velikost fragmentu a množství vzorku DNA. Po nanášení vzorků na gel byla spuštěna elektroforéza (napájecí zdroj EC300XL2, Thermo Scientific, Iowa, USA) při stálém napětí 100 V a proudu 95 mA po dobu 15-20 minut. Poté byl gel vyhodnocen pod UV světlem pomocí UV transluminátoru. Snímek gelu byl vytvořen pomocí programu GeneSnap 7.12. Úspěšnost je dána intenzitou zobrazení - čím je totiž větší koncentrace DNA ve vzorku, tím intenzivnější je fluorescence (vizualizace DNA pomocí fluorescenčního barviva). Tento postup byl proveden dle protokolu Madrova et al. (2018) a Patmanová (2019).

4.2.5 Polymerázová řetězová reakce a sekvenace

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla provedena v několika opakováních s různými komponenty tvořícími reakční směs pro PCR a rozdílnými podmínkami průběhu.

Nejprve bylo využito komponentů sady GoTaq[®] G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA) a TaKaRa Taq[™] (TaKaRa, Japonsko) a postupováno dle příložených protokolů výrobcem. Složení reakčních směsí s komponenty GoTaq a TaKaRa doplněných o některé další látky jsou uvedeny v Tabulce 5 a 6. Podmínky pro PCR s těmito roztoky jsou téměř totožné jako v Tabulce 8, pouze teplota fáze syntézy a závěrečné syntézy byla zvýšena na 72 °C.

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro PCR s komponenty sady GoTaq[®] G2 Flexi DNA Polymerase

| Komponenty reakční směsi | 1 vzorek [μl] |
|---|-------------------------------------|
| dH ₂ O | 11,125 |
| 5X Colorless GoTaq [®] Flexi Buffer | 5 |
| DMSO | 1,25 |
| MgCl ₂ | 4 |
| dNTP | 0,5 |
| GoTaq [®] G2 Flexi DNA Polymerase | 0,125 |
| Přímý primer (F CS1, 10x ředěný dH ₂ O) | 1 |
| Zpětný primer (R CS2, 10x ředěný dH ₂ O) | 1 |
| Templátová DNA | 1 |

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro PCR s komponenty sady TaKaRa Taq™

| Komponenty reakční směsi | 1 vzorek [μl] |
|---|----------------------|
| Přímý primer (F CS1, 10x ředěný dH ₂ O) | 0,5 |
| Zpětný primer (R CS2, 10x ředěné dH ₂ O) | 0,5 |
| 10×PCR Buffer - TaKaRa | 2,5 |
| dNTP Mixture - TaKaRa | 2 |
| Polymeráza - TaKaRa Taq™ | 0,125 |
| Templátová DNA | 1 |
| DMSO | 1,25 |
| dH ₂ O | 15,125 |
| MgCl ₂ | 2 |

Největší úspěšnost získání produktu byla při použití komponentů sady AccuPrime™ Taq DNA Polymerase System, tudíž všechny templátové DNA byly amplifikovány pomocí této sady.

Reakční směs pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) byla namíchána dle protokolu přiloženého k sadě AccuPrime™ Taq DNA Polymerase System ve sterilním prostředí (komora vysvícená UV zářením). Přesné složení směsi pro jeden vzorek o objemu 25 μl je uvedeno v Tabulce 7. Pro PCR byla použita polymeráza AccuPrime™ Taq DNA Polymerase, pufr 10X AccuPrime™ PCR Buffer II a 50 mM MgCl₂ ze stejné sady. Pro získání kopií genu 16S rRNA byly vybrány primery CS1_515pF a CS2_806aR (Caporaso et al. 2011), jejichž sekvence jsou uvedeny v Tabulce 4. Do mikrozkušavek o objemu 0,2 ml bylo vždy napipetováno množství 24 μl reakční směsi, do které byl přidán 1 μl předem naředěné (dH₂O, dle velikosti koncentrace DNA v daném vzorku) templátové DNA. K ověření sterilního zacházení s komponenty reakční směsi, byly vždy vypracovány dva vzorky sloužící jako pozitivní a negativní kontrola. Pro pozitivní kontrolu byla použita templátová DNA kmene *Streptomyces scabiei* DSM 41658, negativní kontrola spočívala v přidání destilované vody do reakční směsi namísto templátové DNA.

Zkušavky se směsí byly umístěny do termocykléru (C1000™ Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), kde proběhly reakce za podmínek uvedených v Tabulce 8. Poté byla zkontrolována správnost postupu umístěním PCR produktů na agarózový gel a uskutečněním elektroforézy.

Tabulka 7: Složení reakční směsi pro PCR s komponenty sady AccuPrime™ Taq DNA Polymerase System

| Komponenty reakční směsi | 1 vzorek [μl] |
|---------------------------------|----------------------|
| 10X AccuPrime Buffer II | 2,5 |
| Přímý primer (F CS1, 10mM) | 0,5 |
| Zpětný primer (R CS2, 10mM) | 0,5 |
| Templátová DNA | 1 |
| AccuPrime™ Taq DNA Polymerase | 0,5 |
| dH ₂ O | 18,5 |
| MgCl ₂ | 1,5 |

Tabulka 8: Protokol PCR reakce s AccuPrime™ Taq DNA Polymerase

| Krok | Teplota [°C] | Doba trvání | Počet opakování |
|----------------------|---------------------|--------------------|------------------------|
| Počáteční denaturace | 95 | 5 min | 1x |
| Denaturace | 95 | 30 s | |
| Nasedání primerů | 55 | 45 s | 28x |
| Syntéza | 68 | 30 s | |
| Závěrečná syntéza | 68 | 7 min | 1x |

4.2.6 Sekvence Illumina a zpracování výsledných dat

Hotové produkty PCR byly napipetovány do 96-ti jamkové destičky, řádně uzavřeny aluminiovým víčkem a odeslány na University of Illinois (Chicago, USA) k sekvenaci pomocí sekvenátoru MiSeq Illumina (Illumina, San Diego USA). Sekvenovány byly úseky genu pro 16S rRNA obsahující variabilní oblast V4 a amplifikované pomocí univerzálních primerů s převisovými adaptéry uvedenými v Tabulce 4. Následovalo sloučení párového sekvenčního čtení, které bylo filtrováno a zarovnáno pomocí databáze Silva. Chimerické sekvence byly detekovány integrovaným nástrojem VSearch dle standardního operačního postupu MiSeq (MiSeq SOP) v softwaru Mothur v. 1.44.1. Taxonomické zařazení sekvencí bylo provedeno prostřednictvím softwaru Mothur za použití databáze SILVA jako referenční databáze. Sekvence plastidů, mitochondrií a neklasifikované v doméně Bacteria byly odstraněny. Sekvenční knihovna byla seskupena do tzv. operačně taxonomických jednotek (OTUs) za pomoci UPARSE implementovaného v softwaru USEARCH v10.0.240. Pomocí nástrojů implementovaných do softwaru Mothur byla následně vytvořena tabulka OTUs, která byla dále zpracována v tabulkovém editoru Microsoft Office Excel. Operačně taxonomické jednotky byly definovány na hladině podobnosti 97 %. Postupováno bylo dle Madrova et al. (2018) a ve spolupráci s Ing. Janem Kopeckým, Ph.D.

4.2.7 Statistické analýzy

Pro statistickou analýzu výsledků fyzikálně-chemických a geochemických charakteristik půd bylo využito programu STATISTICA 12 (StatSoft). Na základě prvotního provedení testů normality dat, byly následně výsledky podrobeny neparametrickým statistickým testům. Rozdíly mezi jednotlivými půdními horizonty v rámci obsahu T_{celk} a dalších významných prvků stanovených z půdních agregátů byly stanoveny prostřednictvím neparametrické alternativy analýzy rozptylu, a to Kruskal-Wallisovým testem na hladině $p < 0,05$. Vyhodnocení statisticky významných rozdílů na hladině $p < 0,05$ mezi dvěma studovanými půdními profily bylo provedeno neparametrickým testem středních hodnot dvou nezávislých výběrů (Mann-Whitneyův U test).

Metodou rarefakce, která stanovuje druhovou rozmanitost v odebraných vzorcích, byla stanovena biodiverzita prokaryotického společenstva ve studovaných půdních profilech. Tabulka OTUs, která byla vytvořena v programu Mothur v. 1.44.1 (viz kapitola 4.2.6), byla upravena a výsledná data zpracována do grafu v tabulkovém procesoru Libre Office Calc. Rarefakční křivky byly vypočítány z tabulky OTUs normalizací na minimální počet sekvencí ve vzorku, aby byly vzorky přímo porovnatelné. Počet zjištěných OTUs tedy odpovídal počtu sekvencí, na který bylo normalizováno.

Statistické analýzy pro zhodnocení složení prokaryotických společenstev a jeho vztahu k vlastnostem půdy byly provedeny v prostředí R v. 3.6.3. Matice vzdálenosti umožňující popis rozdílů ve složení mikrobiálních společenstev mezi jednotlivými vzorky byla vypočtena v programu Mothur 1.44.1 s Bray-Curtis distancí. Pro vizualizaci podobnosti/variability prokaryotického společenstva mezi půdními agregáty byl následně tento výstup použit k vytvoření ordinačních NMDS (Non-metric multidimensional scaling) diagramů v prostředí R. V tom samém prostředí byl s použitím balíčku Vegan v. 2.5-6 a MASS v. 7.3-51.6 testován vliv přítomnosti T1 v půdních profilech a dalších fyzikálně-chemických charakteristik půd na složení prokaryotických společenstev v půdních agregátech. Řešitelem statistických analýz hodnotících mikrobiální společenstva byl Ing. Jan Kopecký, Ph.D.

5 Výsledky

5.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti půdy

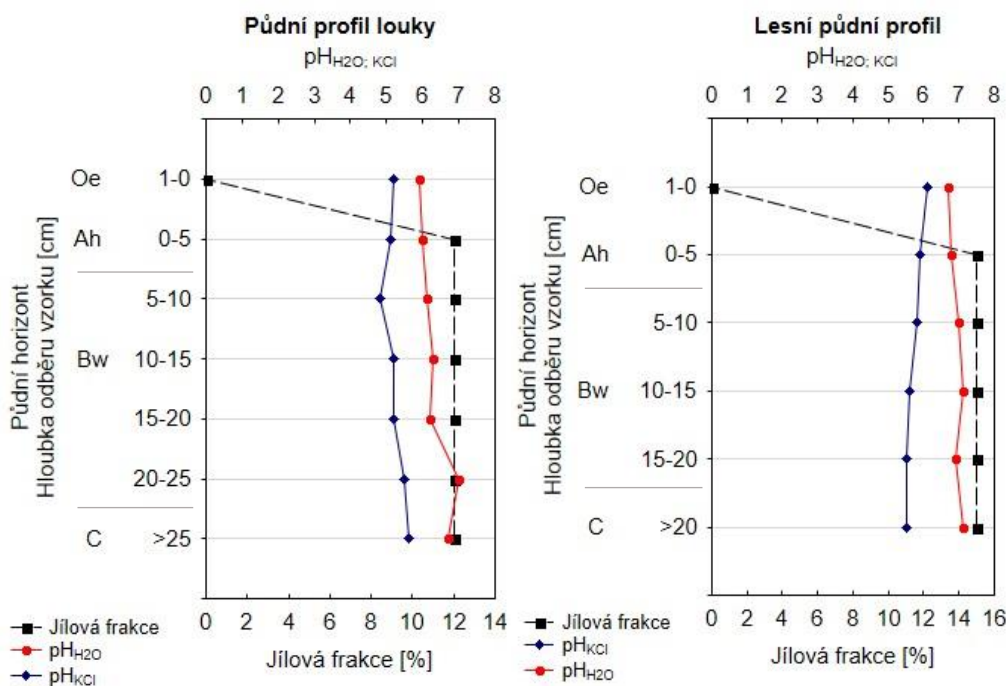
5.1.1 Základní fyzikálně-chemické a geochemické charakteristiky půdy

Oba studované půdní profily byly klasifikovány podle mezinárodní metodiky WRB (FAO 2014) jako „Eutric Cambisol“ (kambizem eutrofní) - les (Eutric Hyperskeletal Cambisol), louka (Eutric Skeletal Cambisol).

Základní půdní charakteristiky naměřené ve vzorcích studované luční a lesní půdy z lokality s přirozeně se vyskytujícím Tl jsou uvedeny v Příloze 13.

Všechny půdní vzorky vykazovaly pH_{H_2O} v rozmezí 5,9-7,1. U lučního půdního profilu byla zjištěna nejnižší hodnota $pH_{H_2O} = 5,9$, a to v nejsvrchnější vrstvě organického horizontu (Oe). Hodnoty půdní aktivní reakce (pH_{H_2O}) se nepatrně zvyšovaly s klesající hloubkou v půdním profilu louky. U vzorků odebraných v hloubce 0-5 cm, tedy v organominerálním horizontu (Ah), bylo naměřeno $pH_{H_2O} 6,0$, nejvyšší hodnoty bylo dosaženo v kambickém horizontu (Bw) v hloubce 20-25 cm, kde bylo pH rovno 7,0. V lesní půdě se pH výrazně neměnilo. Nejnižší hodnota $pH_{H_2O} = 6,7$ byla naměřena také v horizontu Oe, nejvyšší hodnoty bylo dosaženo v horizontu Bw (10-15 cm), a to $pH_{H_2O} = 7,1$ (Obrázek 3)

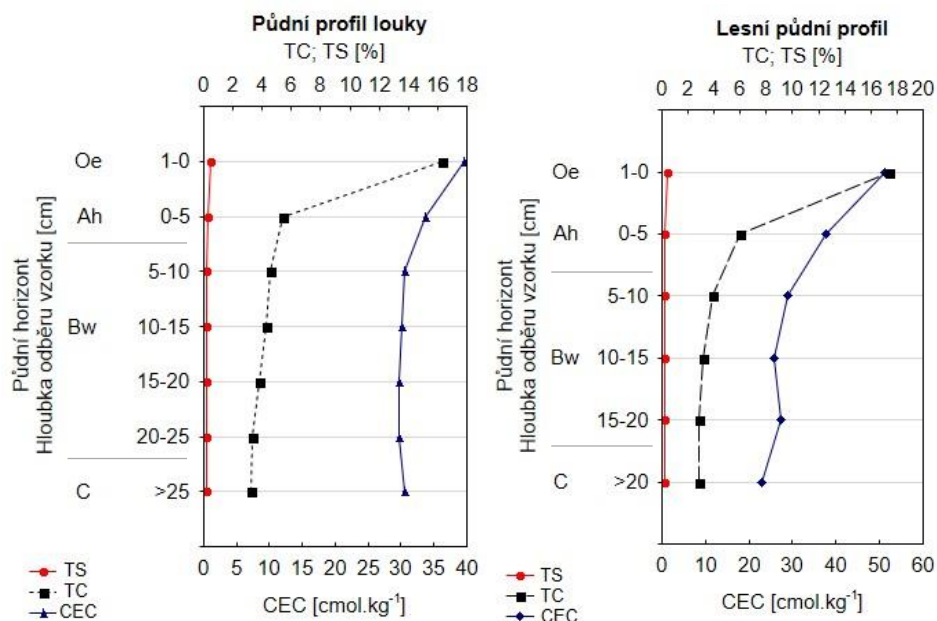
Další testovanou charakteristikou byla výměnná reakce půdy (pH_{KCl}). Naměřené hodnoty pH_{KCl} u vzorků z lučního profilu se pohybovaly v rozmezí 4,8-5,6 (Obrázek 3). Nejnižší pH = 4,8 bylo zaznamenáno v horizontu Bw (v hloubce 5-10 cm). Hlouběji v lučním půdním profilu došlo k malému nárůstu hodnot pH, a to v horizontu C na hodnotu 5,6. U vzorků lesní půdy bylo zjištěno velmi nepatrné klesání hodnot pH_{KCl} , které byly napříč horizonty v rozmezí (5,5-6,1). V obou půdních profilech byl zjištěn 12-15% podíl jílové frakce. V horizontech Oe nebyl obsah jílu detekován, nicméně v níže položených půdních horizontech (Ah, Bw, C) byla koncentrace jílové frakce konstantní (Obrázek 3).



Obrázek 3: Podíl jílové frakce, aktivní (pH_{H₂O}) a výměnná (pH_{KCl}) půdní reakce v lučním (vlevo) a lesním (vpravo) půdním profilu

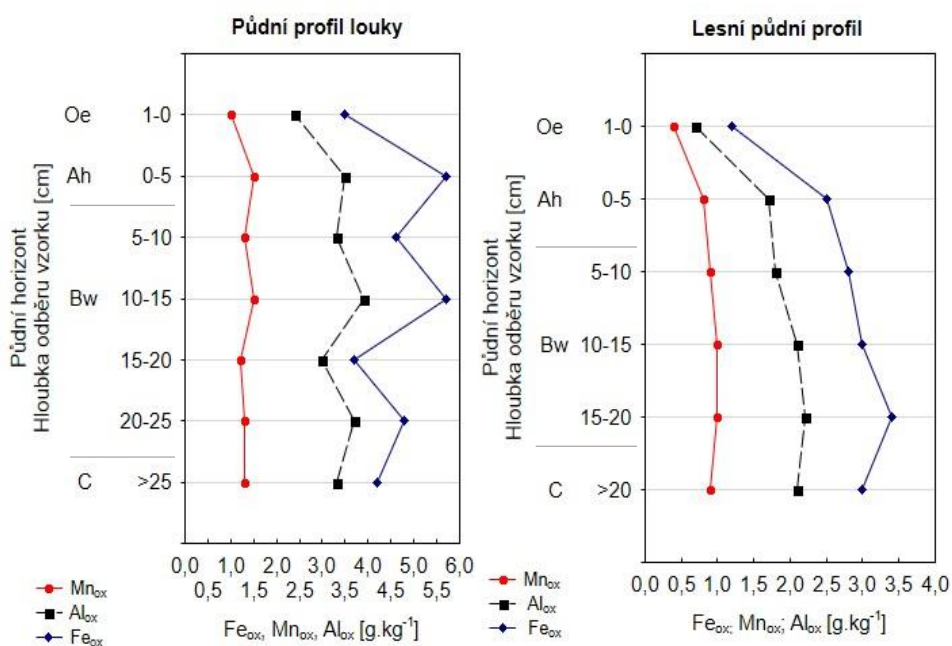
Obsah celkového uhlíku (TC) klesal s hloubkou v obou půdních profilech. Nejvyšších hodnot v lučním profilu (16,3 %) dosahoval v horizontu Oe, přičemž TC prudce klesl mezi horizontem Oe a Ah. V níže položených půdních horizontech (Bw, C) se hodnoty celkového obsahu uhlíku již snižovaly jen nepatrně (Obrázek 4). V horizontu Ah lučního profilu bylo naměřeno 5,4 % TC, kdežto v nejnižší položeném horizontu C to bylo 3,3 %.

Stejně jako u lučního profilu, byl v lesním profilu obsah celkového uhlíku nejvyšší (17 %). Horizont Ah obsahoval již 6 % TC, v horizontu C byl naměřen 3% podíl TC. Oba půdní profile byly charakterizovány zvýšenou hodnotou kationtové výměnné kapacity (CEC) v horizontech Oe, přičemž se zvětšující se hloubkou v profilu naměřené hodnoty klesaly. V obou půdách byly hodnoty kationtové výměnné kapacity a celkového obsahu uhlíku pozitivně korelovány (Obrázek 4). Celkový obsah síry (TS) byl napříč půdními horizonty obou sledovaných půd velmi nízký a relativně konstantní (Obrázek 4).



Obrázek 4: Celkový obsah uhlíku (TC), síry (TS) a kationtová výměnná kapacita (CEC) naměřená ve vzorcích luční (vlevo) a lesní půdy (vpravo)

Koncentrace oxalátem extrahovatelných frakcí Fe, Mn a Al se v lesním půdním profilu s rostoucí hloubkou zvyšovala (Obrázek 5). K největšímu nárůstu došlo v případě oxalátové frakce Fe, kdy se její obsah zvýšil mezi horizontem Oe a Bw (hloubka odběru 15-20 cm) o více než polovinu. V luční profilu měly hodnoty oxalátových frakcí Fe, Mn a Al naopak proměnlivou tendenci napříč půdním profilem. Koncentrace všech tří frakcí dosahovala dvou maxim, a to v horizontu Ah a Bw (hloubka 10-15 cm).



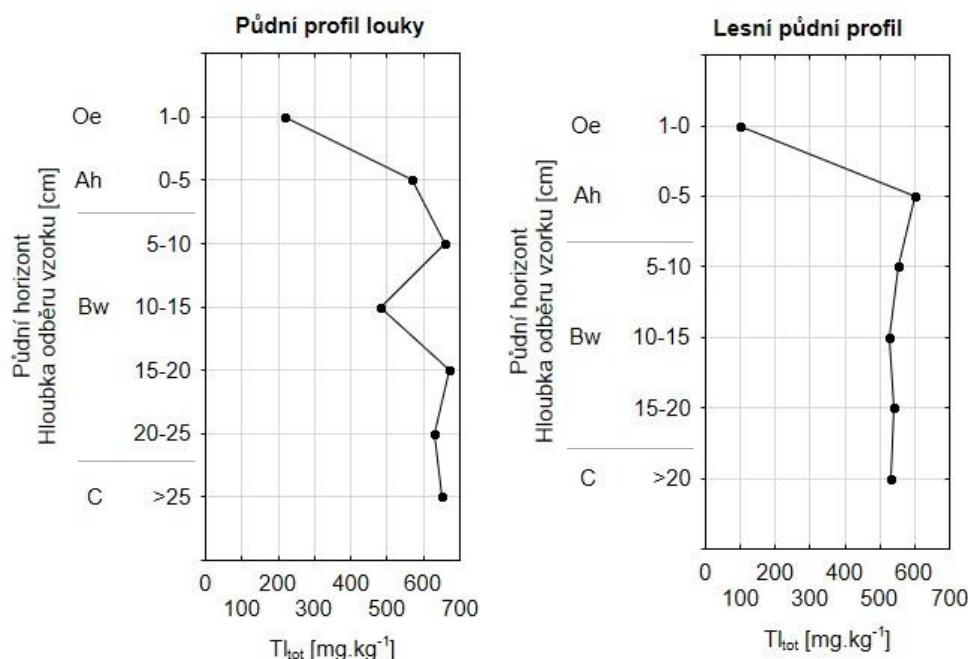
Obrázek 5: Koncentrace oxalátem extrahovatelných frakcí Fe (Fe_{ox}), Mn (Mn_{ox}), Al (Al_{ox}) v půdním profilu louky (vlevo) a lesním půdním profilu (vpravo)

Metodou XRD bylo stanoveno mineralogické složení v půdních profilech, přičemž v obou půdách byl zaznamenán dominantní výskyt křemene (SiO_2), K-živců ($\text{KAlSi}_3\text{O}_{10}$), muskovitu ($\text{K}_2\text{Al}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{F},\text{OH})_2$), illitu ($(\text{K},\text{H}_3\text{O})\text{Al}_2(\text{Si},\text{Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$), chloritu a kombinované směsi jílových fází illit-smektit.

5.1.2 Obsah celkového a extrahovatelného Tl

Vzorky z lučního půdního profilu vykazovaly nárůst obsahu celkového Tl (Tl_{tot}) již v horních půdních horizontech (Obrázek 6). V horizontu Oe činil obsah $220 \text{ mg Tl kg}^{-1}$, horizont Ah obsahoval již $570 \text{ mg Tl kg}^{-1}$. Obsah Tl_{tot} převážně s hloubkou v půdním profilu louky vzrůstal, výjimku tvoří horizont Bw (v hloubce 10-15 cm), u kterého se obsah snížil o 90 mg Tl kg^{-1} . Největšího maxima bylo v lučním profilu dosaženo v horizontu Bw v hloubce 15-20 cm (670 mg kg^{-1}).

V lesním půdním profilu došlo oproti lučnímu profilu k markantnějšímu nárůstu celkového obsahu Tl (Tl_{tot}) mezi horizonty Oe a Ah (Obrázek 6). Zatímco v horizontu Oe byl obsah Tl 93 mg kg^{-1} , v horizontu Ah vzrostl obsah Tl o 500 mg kg^{-1} . Směrem dolů k horizontu Bw (hloubka 5-10 cm) však došlo k mírnému poklesu, přičemž v hloubce $>10 \text{ cm}$ v lesním profilu byl již obsah Tl_{tot} relativně konstantní (rozmezí $526\text{-}539 \text{ mg Tl kg}^{-1}$).



Obrázek 6: Celkový obsah Tl (Tl_{tot}) v lučním (vlevo) a lesním (vpravo) půdním profilu

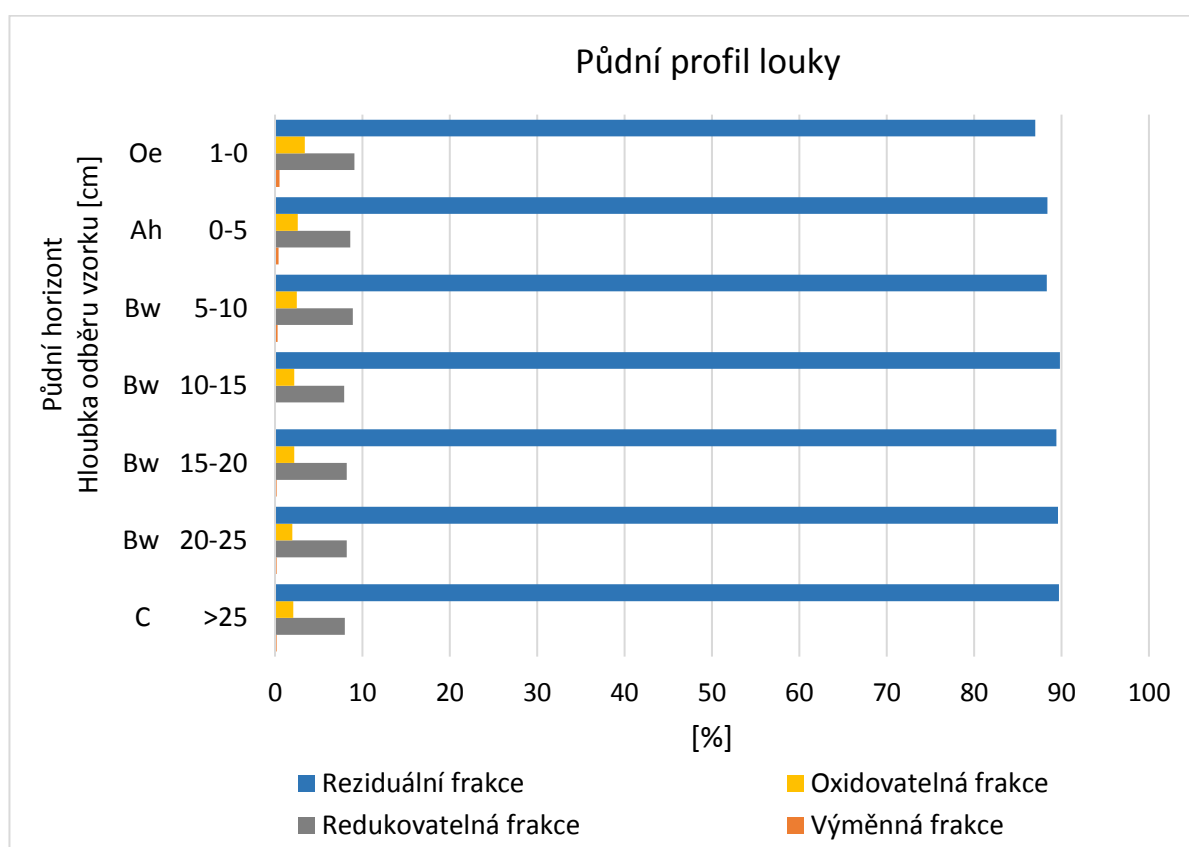
Stanovení výměnné frakce Tl pomocí $1 \text{ M NH}_4\text{NO}_3$ prokázalo největší podíl výměnného Tl (Tl_{ex}) ve svrchním horizontu Oe vzhledem k celkové koncentraci Tl v daném horizontu. Stejně tomu bylo u oxalátem extrahovatelného Tl (Tl_{ox}). V horizontu Oe lučního půdního profilu byl zjištěn obsah $13,5 \%$ výměnného Tl a 20% Tl_{ox} z celkového obsahu Tl v půdním horizontu. Směrem do hloubky se však koncentrace těchto dvou frakcí snížila. Horizont Ah

lučního půdního profilu již obsahoval 6% Tl_{ex} a 9 % Tl_{ox} z celkového obsahu Tl. Horizont Oe lesního půdního profilu obsahoval 6 % Tl_{ex} a 10 % Tl_{ox} z celkového Tl (Tl_{tot}). Stejně jako u luční půdy byl v lesní půdě zaznamenán pokles procentuálního zastoupení obou těchto frakcí Tl. V horizontu Ah činil obsah výměnného Tl 2 % z celkového obsahu Tl v horizontu, u oxalátem extrahovatelného Tl to bylo 4 %. Detailní výsledky tohoto stanovení jsou uvedeny v Příloze 5.

5.1.3 Chemická frakcionace Tl

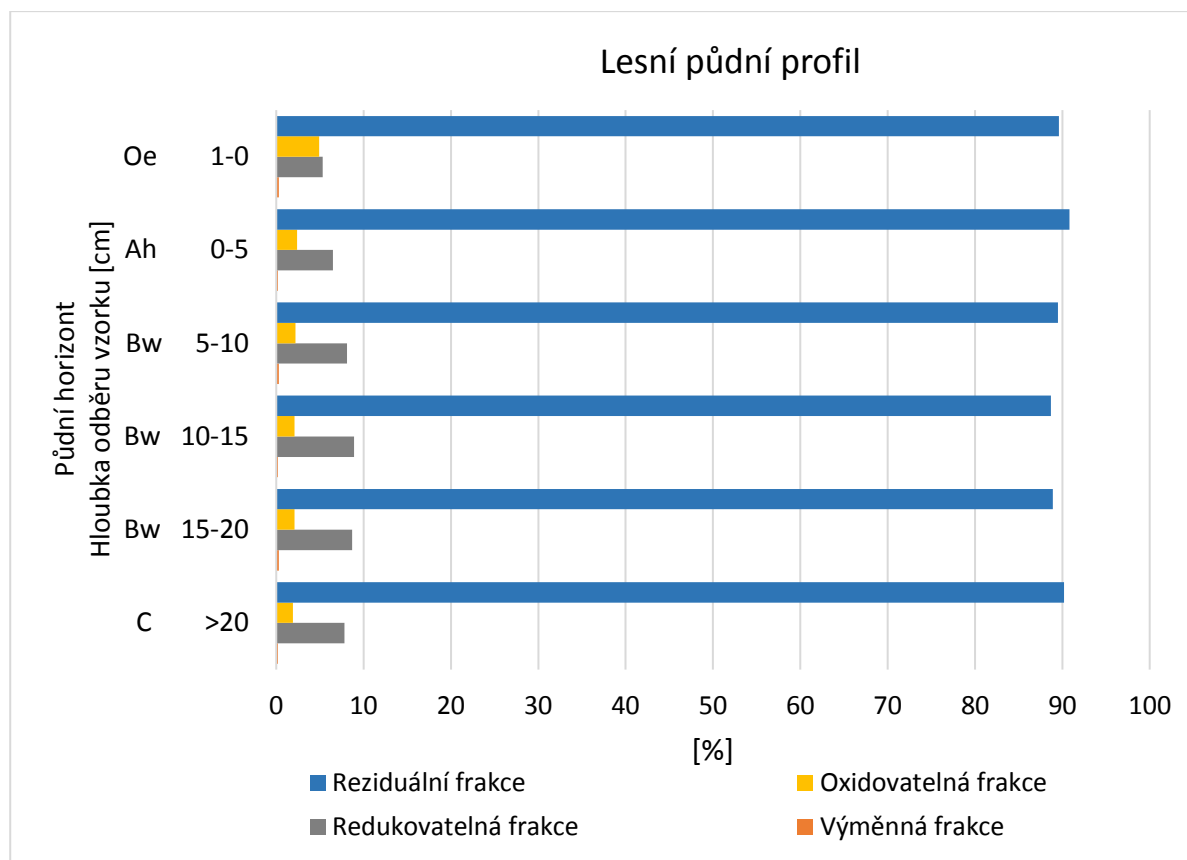
Všechny horizonty lesního i lučního profilu obsahovaly největší koncentraci Tl v reziduální frakci, a to v rozmezí 79-91 % (Obrázek 7 a 8). Podíl Tl vázaného na nerezuální frakce byl u obou půdních profilů několikanásobně nižší než podíl Tl ve stabilní reziduální frakci. Zastoupení Tl ve snadno mobilizovatelných frakcích lze charakterizovat sumou těchto frakcí, která ani v jednom horizontu lesní půdy nepřesáhla 11 % a v půdních horizontech louky dosáhla maxima 13 %. přesné hodnoty jsou uvedeny v Příloze 6.

V lučním půdním profilu byla nejvíce zastoupena koncentrace Tl v nerezuálních frakcích v horním organickém půdním horizontu (Oe), kde redukovatelná frakce Tl tvořila 9 %, v oxidovatelné formě bylo obsaženo 3 % Tl a výměnná Tl frakce činila 0,5 % z celkového obsahu Tl. Z Obrázku 7 lze usoudit nepatrný pokles zastoupení Tl v mobilních frakcích půdních horizontů v souvislosti se vzrůstající hloubkou půdního profilu louky.



Obrázek 7: Podíl zastoupení jednotlivých frakcí Tl v půdním profilu louky (dle metody BCR)

V lesním půdním profilu byla zaznamenána největší koncentrace Tl vázaného na nereziduální frakce v půdním horizontu Bw (v hloubce 10-15 cm), a to zejména díky 9% podílu Tl v redukovatelné frakci. Nejvíce Tl ve formě výměnné frakce bylo v horizontu Oe, přičemž tento obsah se do hloubky v půdním profilu snižoval. Zatímco u oxidovatelné Tl frakce lze pozorovat na Obrázku 8 klesající trend výsledných hodnot, u redukovatelné Tl frakce byl zaznamenán mírný nárůst směrem do hloubky půdního profilu lesu.



Obrázek 8: Podíl zastoupení jednotlivých frakcí Tl v lesním půdním profilu (dle metody BCR)

5.1.4 Zastoupení prvků a organické hmoty v půdních agregátech

Stejně jako u mikrobiologické části proběhlo měření vybraných prvků a podílu organické hmoty v pěti půdních agregátech z každého horizontu půdních profilů, přičemž u vzorku 10b byla zjištěna chyba v měření, a tak byl z dalšího vyhodnocování vyřazen. Celkový obsah v půdě byl stanoven u řady prvků, ale pouze Tl a prvky Al, As, Ca, Fe, Mg, Mn, Rb, které jsou významné z hlediska asociace/speciace Tl, jsou dále hodnoceny.

Provedením statistické analýzy byl zjištěn v lučním profilu statisticky významný rozdíl mezi půdními horizonty v podílu organické hmoty a v celkovém obsahu prvků Tl (Tl_{celk}), Fe, As, Ca, Mg, Al či Rb (Příloha 7). Z hlediska celkového obsahu Tl v půdních agregátech daného horizontu se signifikantně lišily horizonty Oe a Bw, dále horizonty Oe a C či horizonty Ah a C

(Tabulka 9). Podíl organické hmoty se statisticky významně lišil mezi půdními horizonty Oe a Bw, horizonty Oe a C či vrstvami Ah a Bw (Tabulka 10).

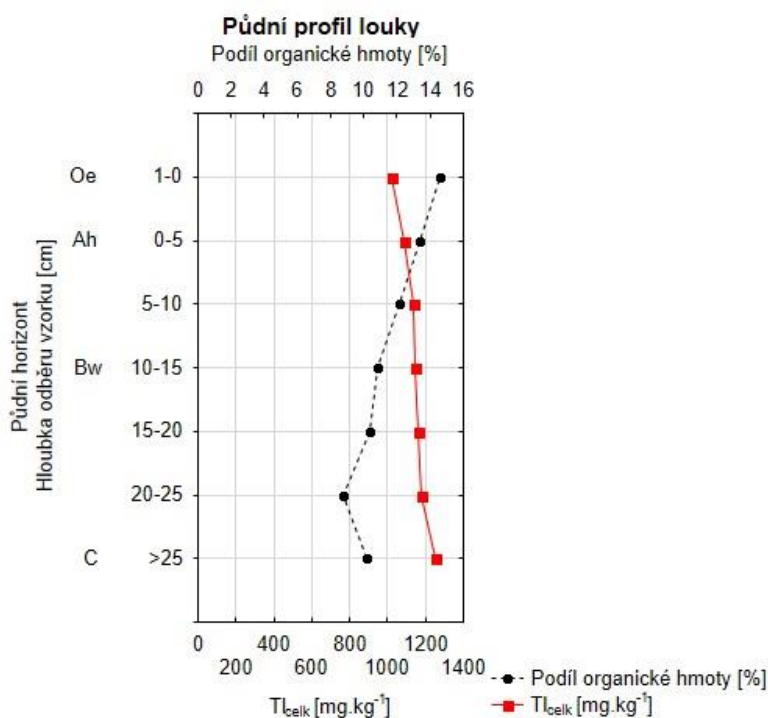
Tabulka 9: Post hoc test Kruskal-Wallisova testu (Vícenásobné porovnání p hodnot - celkový obsah Tl v lučním profilu) - červeně zvýrazněn statisticky významný rozdíl

| | | | | |
|--|--|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Závislá: Tl _{celk} [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustranné) Tl _{celk} [mg.kg ⁻¹] (Louka - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná: Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 35) =25,01143 p = 0,0000 | | | |
| Horizont | Oe R:4,2000 | Ah R:7,6000 | Bw R:20,500 | C R:32,200 |
| Oe | | 1,000000 | 0,008793 | 0,000093 |
| Ah | 1,000000 | | 0,070850 | 0,000883 |
| Bw | 0,008793 | 0,070850 | | 0,134368 |
| C | 0,000093 | 0,000883 | 0,134368 | |

Tabulka 10: Post hoc test Kruskal-Wallisova testu (Vícenásobné porovnání p hodnot - podíl organické hmoty v lučním profilu) - červeně zvýrazněn statisticky významný rozdíl

| | | | | |
|---------------------------------------|--|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Závislá: Podíl organické hmoty [%] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustranné) Podíl organické hmoty [%] (Louka - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná: Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 35) = 20,17000; p = 0,0002 | | | |
| Horizont | Oe R:32,400 | Ah R:27,800 | Bw R:13,550 | C R:11,600 |
| Oe | | 1,000000 | 0,001404 | 0,007978 |
| Ah | 1,000000 | | 0,032483 | 0,074576 |
| Bw | 0,001404 | 0,032483 | | 1,000000 |
| C | 0,007978 | 0,074576 | 1,000000 | |

Celkový obsah Tl (Tl_{celk}) byl naměřen ve všech vzorcích půdních agregátů z lučního profilu v rozmezí 954-1310 mg kg⁻¹. Z Obrázku 9 vyplývá, že průměrný obsah Tl v půdních agregátech se s rostoucí hloubkou v půdním profilu zvyšoval. Zatímco v horizontu Oe lučního profilu byl obsah 1020 mg Tl kg⁻¹, horizont C vykazoval obsah Tl o 230 mg kg⁻¹ vyšší. U podílu organické hmoty v půdních agregátech byl zaznamenán opačný trend. V nejsvrchnějším horizontu Oe byl naměřen 14% podíl organické hmoty, který se však s hloubkou nepatrně snížil (10% podíl organické hmoty). Obsahy prvků Al, As, Mg, Mn, Fe a Rb se podobně jako Tl s hloubkou v půdním profilu zvýšily (Příloha 14).



Obrázek 9: Celkový obsah Tl (Tl_{celk}) a podíl organické hmoty v půdních agregátech napříč lučním půdním profilem

Kruskal-Wallisův test prokázal statisticky významné rozdíly mezi horizonty lesního profilu vzhledem k podílu organické hmoty a obsahům prvků Tl, As, Al, Ca, Mg či Rb (Příloha 8). Naopak se nepotvrdila rozdílnost v obsahu např. prvků Fe a Mn mezi jednotlivými půdními horizonty. Statistická analýza vyvrátila stanovenou nulovou hypotézu, že se horizonty lesní půdy v obsahu Tl shodují (Tabulka 11). Statistickým vyhodnocením byl zjištěn významný rozdíl mezi horizonty Oe a C či horizonty Ah a C. Půdní horizonty lesního profilu vykazovaly statisticky významný rozdíl i v podílu organické hmoty v nich obsažených. Významně se dle Tabulky 12 lišily horizonty Oe a Bw, dále byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi horizonty Oe a C a také mezi půdními horizonty Ah a C.

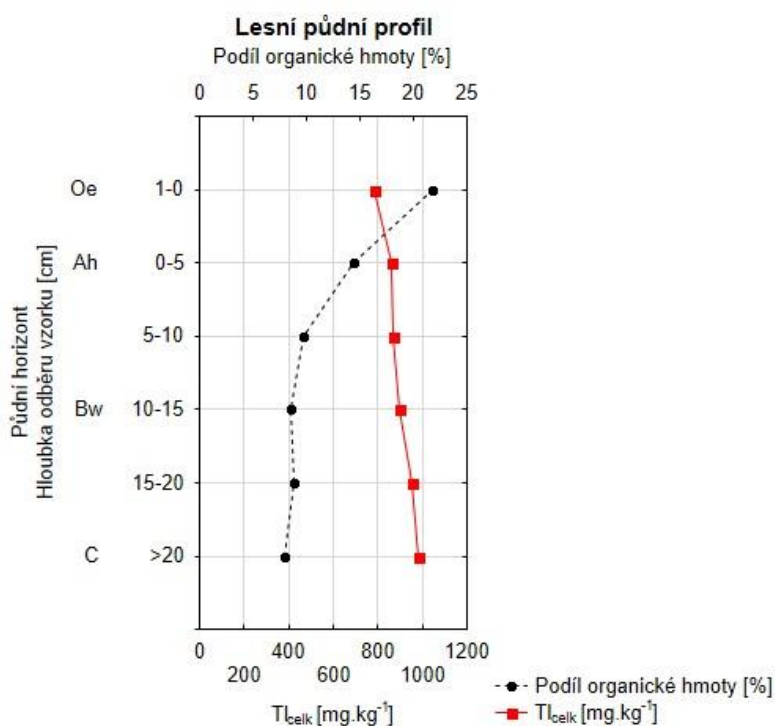
Tabulka 11: Post hoc test Kruskal-Wallisova testu (Vícenásobné porovnání p hodnot - celkový obsah Tl v lesním profilu) - červeně zvýrazněn statisticky významný rozdíl

| | | | | |
|---|--|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Závislá: Tl_{celk} [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustranné) Tl_{celk} [mg.kg ⁻¹] (Les - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná: Horizont Kruskal-Wallisův test: $H(3, N=29) = 14,83103$ $p = 0,0020$ | | | |
| Horizont | Oe R:6,2000 | Ah R:9,2500 | Bw R:16,000 | C R:25,400 |
| Oe | | 1,000000 | 0,154960 | 0,002180 |
| Ah | 1,000000 | | 0,953457 | 0,028151 |
| Bw | 0,154960 | 0,953457 | | 0,195180 |
| C | 0,002180 | 0,028151 | 0,195180 | |

Tabulka 12: Post hoc test Kruskal-Wallisova testu (Vícenásobné porovnání p hodnot - podíl organické hmoty v lesním profilu) - červeně zvýrazněn statisticky významný rozdíl

| | | | | |
|---------------------------------------|---|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Závislá: Podíl organické hmoty [%] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.) Nezávislá (grupovací) proměnná: Horizont Kruskal-Wallisův test: $H(3, N=29) = 21,64506$ $p = 0,0001$ | | | |
| Horizont | Oe R:26,200 | Ah R:23,500 | Bw R:12,533 | C R:4,4000 |
| Oe | | 1,000000 | 0,011294 | 0,000310 |
| Ah | 1,000000 | | 0,132552 | 0,004956 |
| Bw | 0,011294 | 0,132552 | | 0,386090 |
| C | 0,000310 | 0,004956 | 0,386090 | |

Z Obrázku 10 znázorňujícím průměrné hodnoty celkového obsahu Tl (Tl_{celk}) v jednotlivých lesních půdních horizontech je patrný stejný vzrůstající trend jako u lučního profilu. V horním horizontu Oe byl obsah $780 \text{ mg Tl kg}^{-1}$, kdežto v horizontu C činil obsah Tl 983 mg kg^{-1} . Opačný jev byl zaznamenán u podílu organické hmoty v půdních agregátech, kdy s rostoucí hloubkou v půdním profilu klesalo množství naměřené organické hmoty (Obrázek 10). V horizontu Oe byla získána největší hodnota, a to 21% podíl, horizont Ah obsahoval již 14 % organické hmoty a v horizontu C byl zjištěn 8% podíl organické hmoty v půdních agregátech. Průměrné obsahy Al, Mg, Mn či Rb se stejně jako obsah Tl s hloubkou v profilu zvýšily (Příloha 14).



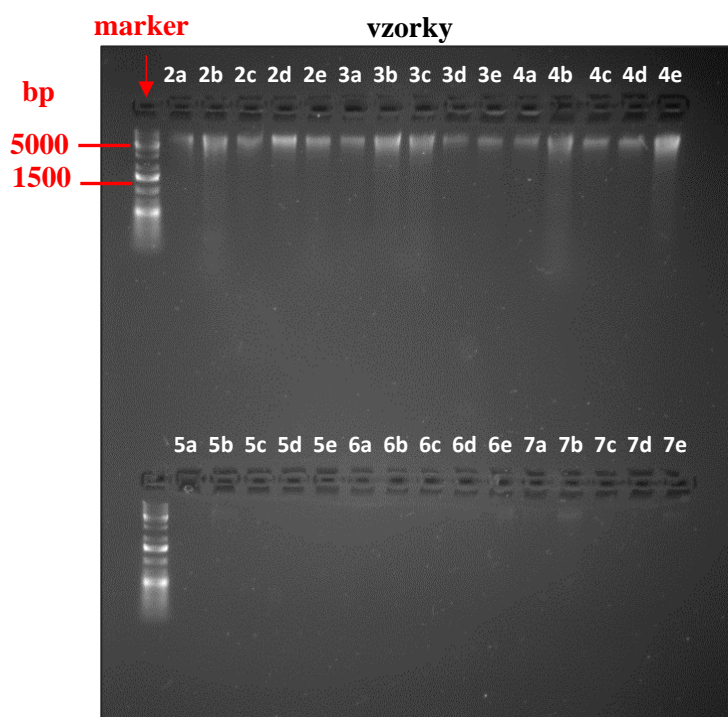
Obrázek 10: Celkový obsah Tl (Tl_{celk}) a podíl organické hmoty v půdních agregátech napříč lesním půdním profilem

5.1.5 Porovnání naměřených hodnot obou studovaných půdních profilů

Statistickou analýzou byl proveden neparametrický test pro dva výběry, a to pro zjištění, zda získané hodnoty naměřené pomocí fyzikálně-chemických analýz nabývají rozdílnosti vzhledem k hospodářskému využití půdy. Výsledky provedeného Mann-Whitneyho U testu jsou uvedené v Příloze 9 spolu s dílčí popisnou statistikou. Test porovnává střední hodnoty ve dvou nezávislých souborech. Mezi některými fyzikálně-chemickými proměnnými naměřenými v lučním a lesním profilu byl zjištěn statisticky významný rozdíl. Rozdílnost byla vypočtena například u půdního pH či obsahu oxalátem extrahovatelného Fe a Mn. Naopak shodné hodnoty jak v lučním, tak lesním profilu vykazovaly podíl organické hmoty v půdních agregátech, obsah Rb, celkový obsah uhlíku či jednotlivé frakce Tl.

5.2 Izolovaná environmentální DNA a produkty PCR reakce

Extrakce DNA z první sady půdních agregátů (vzorky 2-8) odebraných z lučního půdního profilu byla pouze částečně úspěšná (Obrázek 11). Vzorky číslo 2-4 z horizontů Oe, Ah a Bw (hloubka 5-10 cm), obsahovaly uspokojivou koncentraci DNA. Druhá část vzorků (č. 5-8) ze spodních půdních horizontů Bw (hloubka odběrů 10-25 cm) a C neobsahovala žádné nebo jen velmi malé množství DNA.



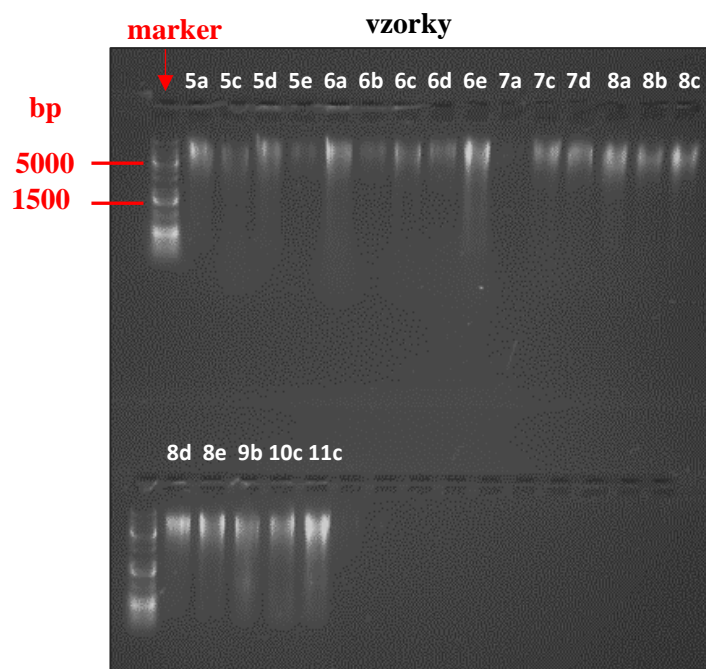
Obrázek 11: Elektroforetická separace nepurifikované DNA v agarózovém gelu

Měření na spektrofotometru potvrdilo, že koncentrace DNA byla velmi nízká, navíc se značnými nečistotami v podobě proteinů či rozpouštědel použitých během extrakce DNA (Tabulka 13).

Tabulka 13: Výsledné hodnoty koncentrace DNA naměřené spektrofotometrem u vybraných vzorků

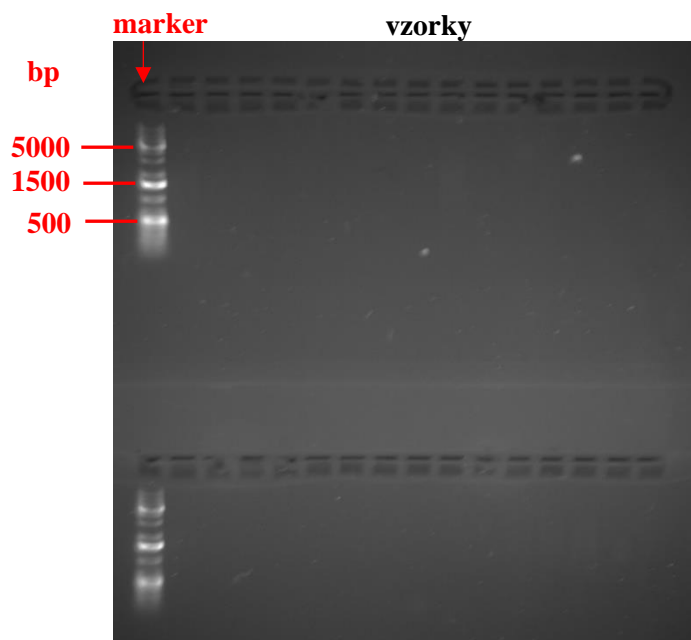
| Číslo vzorku | Opakování | Půdní horizont | Hloubka odběru vzorku [cm] | Koncentrace DNA [ng/μl] | A260/A280 | A260/A230 |
|--------------|-----------|----------------|----------------------------|-------------------------|-----------|-----------|
| 5 | a | Bw | 10-15 | 2,500 | 1,250 | 0,294 |
| 5 | c | Bw | 10-15 | 3,000 | 2,000 | 0,545 |
| 5 | d | Bw | 10-15 | 2,500 | 1,250 | 0,417 |
| 5 | e | Bw | 10-15 | 2,000 | 1,333 | 0,400 |
| 6 | a | Bw | 15-20 | 2,500 | 1,250 | 0,417 |
| 6 | b | Bw | 15-20 | 1,500 | 1,500 | 0,375 |
| 6 | c | Bw | 15-20 | 3,000 | 2,000 | 0,353 |
| 6 | d | Bw | 15-20 | 2,500 | 1,250 | 0,357 |
| 6 | e | Bw | 15-20 | 6,500 | 1,857 | 0,765 |
| 7 | a | Bw | 20-25 | 4,500 | 1,800 | 0,500 |
| 7 | c | Bw | 20-25 | 2,500 | 0,333 | 2,500 |
| 7 | d | Bw | 20-25 | 1,500 | 0,429 | 1,500 |

Po změně v postupu extrakce přidáním dH₂O byl v druhé sadě vzorků (č. 9-14) z lesního profilu zjištěn významný obsah DNA u 27 vzorků ze 30 celkových. Získat environmentální DNA se podařilo i při opakování nepovedených vzorků, což je patrné z Obrázku 12. Kontrolní agarózový gel zobrazuje téměř 100% úspěšnost. Vzorek 7a, který se jevil jako neúspěšný, byl ověřen spektrofotometricky, přičemž byla zjištěna vysoká koncentrace DNA (445 ng/ μl).



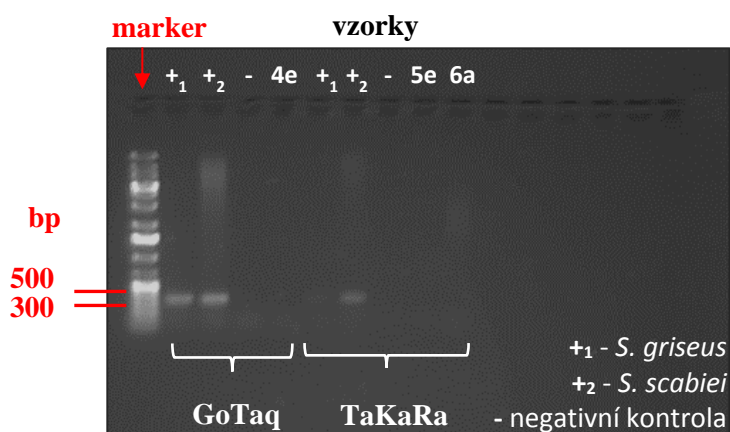
Obrázek 12: Kontrolní elektroforetický gel s DNA opakovaných vzorků

První provedení PCR ze vzorků nepurifikované DNA bylo neúspěšné. Na gel bylo naneseno celkem 30 vzorků (č. 9-14) s komponenty GoTaq[®] G2 Flexi DNA Polymerase, přičemž jen v několika místech gelů byl zaznamenán nepatrný stín vizualizované DNA (Obrázek 13).



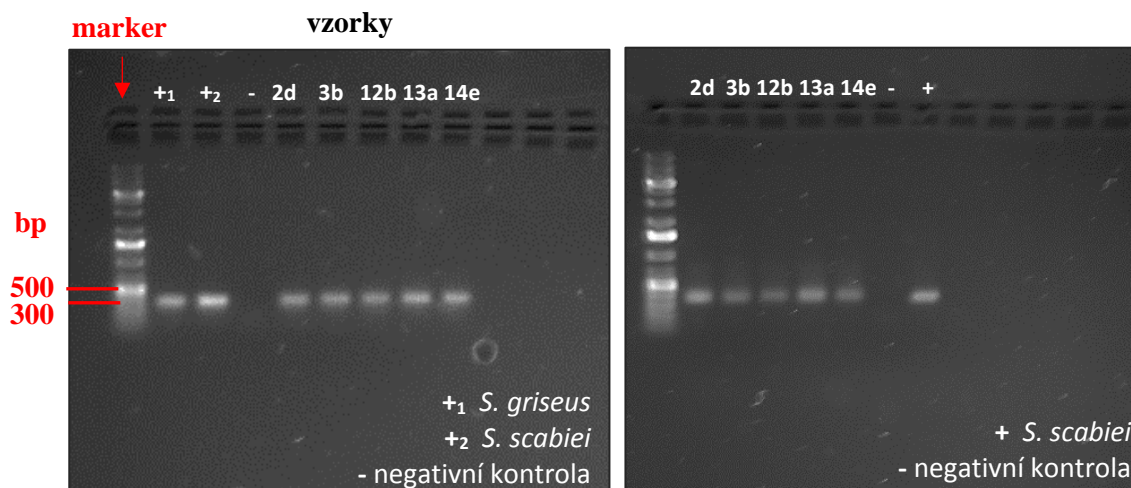
Obrázek 13: Kontrolní elektroforetický gel PCR produktů

Zopakovaná PCR byla provedena s reakční směsí obsahující komponenty TaKaRa Taq™ a GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase. Současně došlo k záměně komponentů pro reakční směs s chemikáliemi GoTaq, u kterých se očekávala nežádoucí kontaminace. Jako pozitivní kontroly (+1, +2) sloužily čisté kultury *Streptomyces griseus* a *Streptomyces scabiei*. Po úpravě komponent a podmínek reakce se amplifikovaly pouze pozitivní kontroly (Obrázek 14). V ostatních vzorcích působily inhibitory, které nedovolily vytvoření PCR produktů. Následná purifikace byla 100% úspěšná a další modifikace extrakce environmentální DNA nebyla třeba.



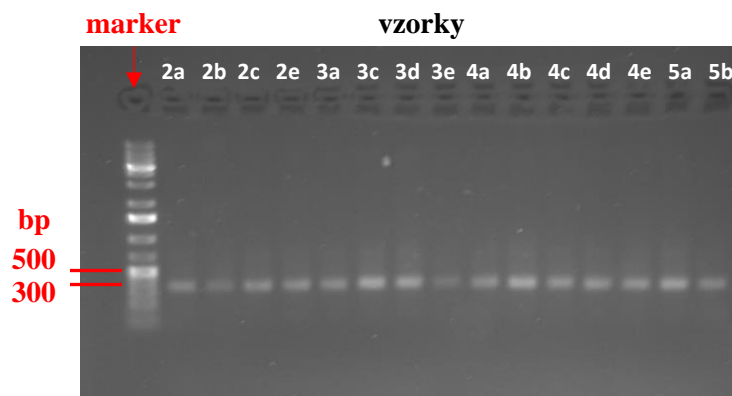
Obrázek 14: Elektroforetická separace PCR produktů s komponenty GoTaq a TaKaRa v agarózovém gelu

Po purifikaci DNA byla provedena PCR reakce s několika zkušebními vzorky (Obrázek 15). Produkty se podařilo získat pouze ve dvou provedeních, a to za použití komponentů GoTaq a AccuPrime. V obou případech byly vytvořeny amplikony, jak z DNA pro pozitivní kontroly, tak vlastních vzorků. Porovnání výsledků reakcí s komponenty GoTaq a AccuPrime je k nahlédnutí na Obrázku 15. Výsledek reakce s komponenty TaKaRa ukázal, že se amplifikovala pouze templátová DNA pozitivní kontroly.



Obrázek 15: Elektroforetická separace výsledku PCR reakce s komponenty GoTaq (vlevo) a AccuPrime (vpravo) v agarózovém gelu

Na základě testování komponent a podmínek průběhu PCR bylo shledáno využití sady AccuPrime™ Taq DNA Polymerase System jako nejvhodnější. Amplifikace úseku DNA pro gen 16S rRNA byla tudíž provedena u všech 65 vzorků s reakční směsí uvedenou v Tabulce 8 a za podmínek uvedených v Tabulce 9. Úspěšnost polymerázové řetězové reakce byla v prvním pokusu 83 %, 11 templátových DNA bylo nutné reakci opakovat. Metodou PCR bylo celkem vytvořeno 65 amplikonů o délce ~300 bp (viz Obrázek 16 s vybraným gelem), které byly odeslány k sekvenaci.



Obrázek 16: Elektroforetická separace amplikonů vzniklých z reakční směsí s AccuPrime komponenty v agarózovém gelu

5.3 Složení prokaryotického půdního společenstva

Po úpravách bylo pro analýzu společenstva získáno 2 482 218 sekvencí bakteriální a archaeální 16S rRNA, které byly přiřazeny do celkem 30 574 OTU (operačně taxonomických jednotek).

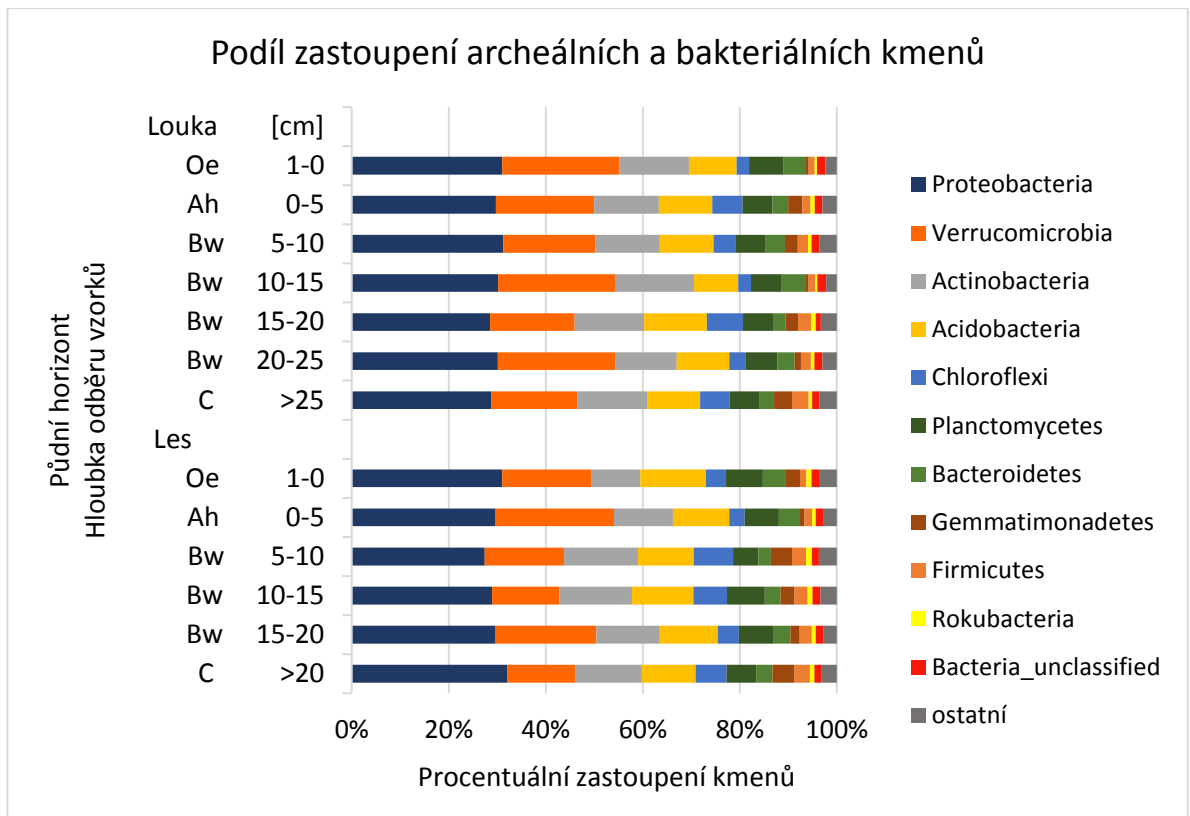
V obou půdních profilech dominovaly stejné bakteriální kmeny (Obrázek 17). Nejzastoupenější kmeny byly *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes* a *Firmicutes*. Archaeální kmeny byly vzhledem ke svému nízkému zastoupení ve společenstvu sloučeny (stejně jako málo početně zastoupené bakteriální kmeny) do skupiny kmenů „ostatních“.

V lučním profilu převažovalo rovnoměrné rozložení kmenů *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria* a *Planctomycetes*. U kmene *Verrucomicrobia* bylo zjištěno kolísavé rozložení, kdy maximální zastoupení bylo pozorováno ve třech různých hloubkách profilu. To je znázorněno na Obrázku 17, kde z celkového počtu OTU bylo 24 % (*Verrucomicrobia*) obsaženo v horizontu Oe a horizontu Bw v hloubkách 10-15 cm a 20-25 cm. U kmene *Chloroflexi* bylo pozorováno střídavé zvyšování a snižování podílu zastoupení do hloubky profilu.

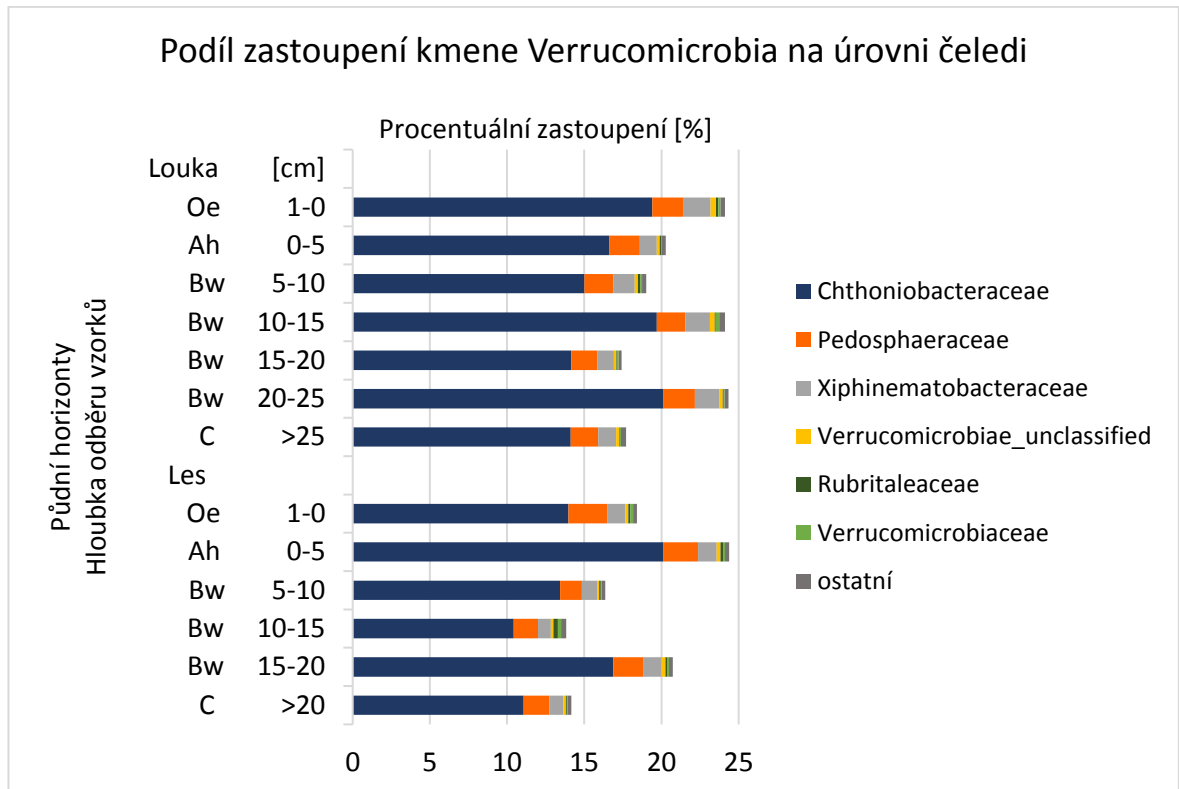
V lesním profilu byl zaznamenán výraznější výkyv ve složení prokaryotického společenstva pouze u kmenů *Verrucomicrobia*, *Gemmatimonadetes* a *Firmicutes*. Mezi horizontem Oe a Ah vzrostl podíl zastoupení kmene *Verrucomicrobia* z 18 % na nejvyšší hodnotu v profilu 24 % z celkového počtu OTU, v dalších 10 cm horizontu Bw došlo ke snížení až na 13 %, přičemž druhého nejvyššího podílu zastoupení 21 % bylo dosaženo v v hloubce 15-20 cm horizontu Bw. U kmene *Firmicutes* byl mezi půdními horizonty zjištěn nárůst zastoupení vzhledem ke zvyšující se hloubce v půdním profilu.

Dále byl proveden podrobnější rozbor taxonomických jednotek jednotlivých dominantních kmenů. V obou půdních profilech byl v rámci kmene *Proteobacteria* zjištěn největší výskyt zástupců čeledi *Xanthobacteraceae* a *Nitrosomonadaceae*. V lučním profilu byl sledován mírný nárůst jejich podílu v horizontech Oe a Bw (hloubka 10-15 cm, 20-25 cm), v lesním profilu dosáhla čeledí *Xanthobacteraceae* dvou maxim, a to v horizontech Ah a Bw (hloubka 15-20 cm).

V rámci kmene *Verrucomicrobia* byly nejzastoupenějšími čeleděmi *Chthoniobacteraceae* a *Pedosphaeraceae*. V lučním profilu byl nejvyšší výskyt *Chthoniobacteraceae* zaznamenán v horizontu Oe a Bw (hloubky 10-15 cm, 20-25 cm), v lesním profilu to byly horizonty Ah a Bw (15-20 cm) (Obrázek 18). Toto rozložení korespondovalo se zde nejzastoupenějším bakteriálním rodem - *Candidatus Udaeobacter*, který byl také nejhojnějším ze všech klasifikovaných rodů v obou půdních profilech.

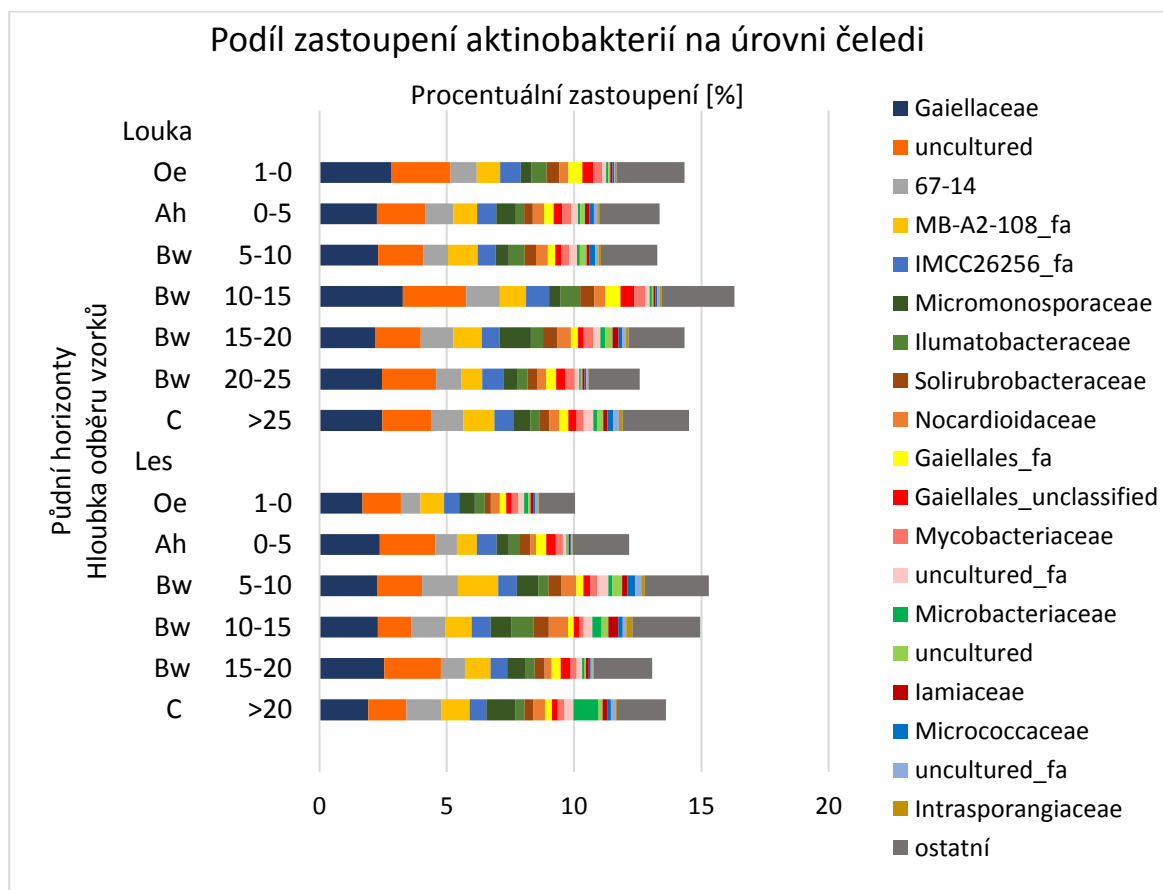


Obrázek 17: Podíl zastoupení archeálních a bakteriálních kmenů ve společenstvu obou půdních profilů



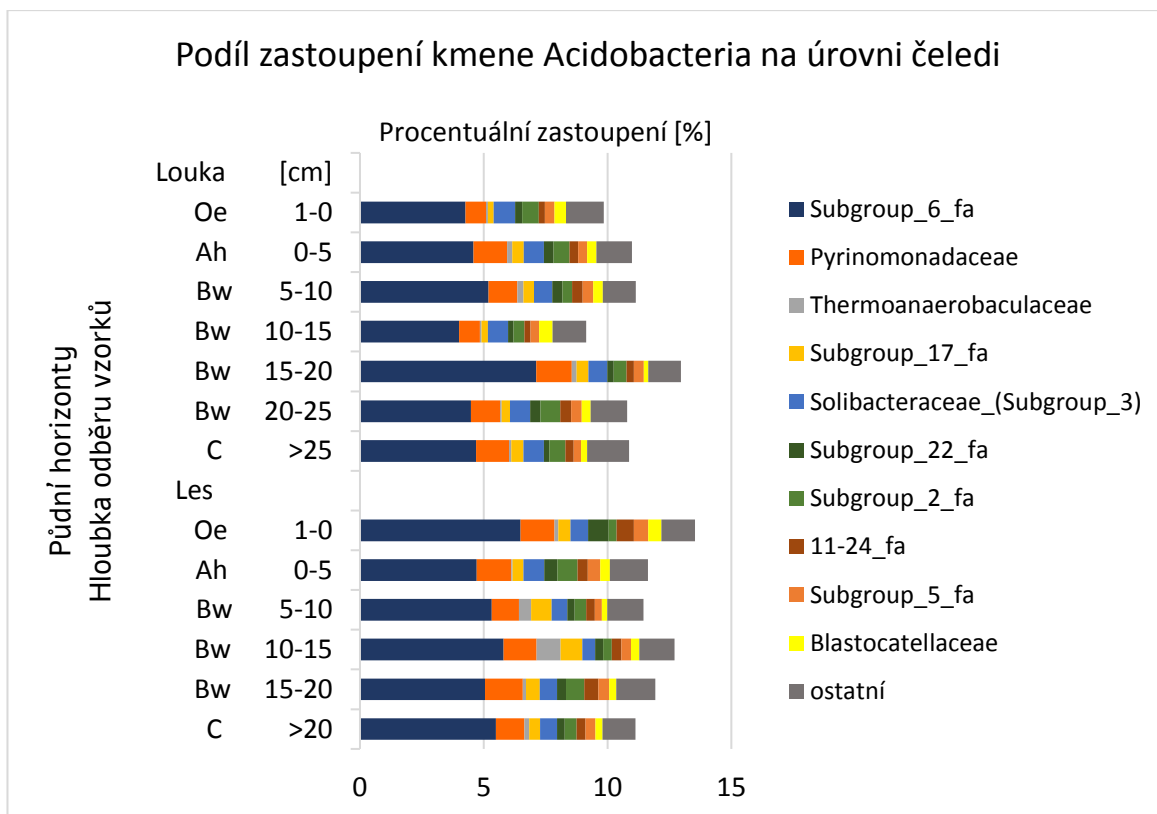
Obrázek 18: Podíl zastoupení taxonů kmene *Verrucomicrobia* na úrovni čeledi v obou půdních profilech

V rámci kmene *Actinobacteria* byla nejvíce zastoupena čeleď *Gaiellaceae* (Obrázek 19). Nejvýraznější výkyv v zastoupení byl u této čeledi zaznamenán v lučním profilu, kde v horizontu Bw v hloubce 10-15 cm došlo k nárůstu podílu ze 2 % na 3 %. V lesním profilu bylo největší procento zastoupení čeledi *Gaiellaceae* sledováno v horizontu Bw (15-20 cm), přičemž se zde zastoupení této čeledi s hloubkou nepatrně zvýšilo. I přesto, že se nejedná o dominantní čeleď kmene *Actinobacteria*, byl v lesním půdním profilu pozorován v nejhlubším horizontu C nárůst podílu zastoupení čeledi *Microbacteriaceae* (Obrázek 19).

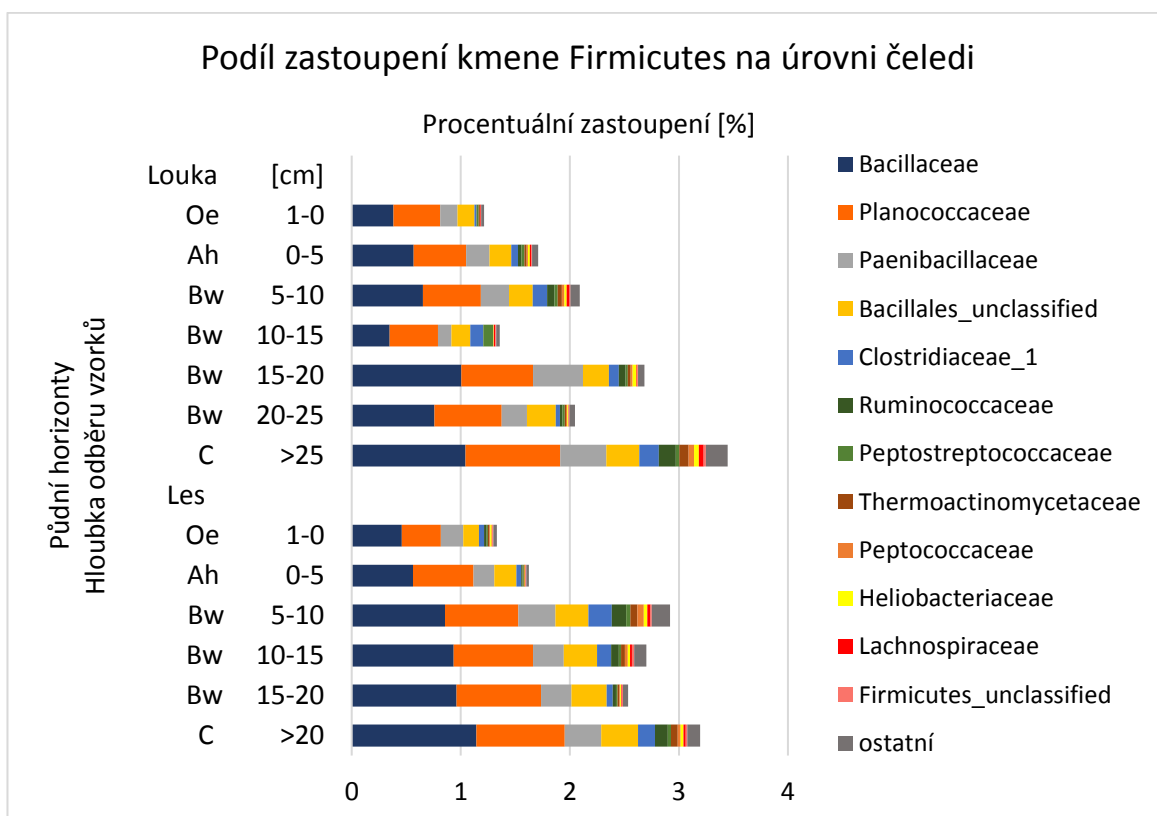


Obrázek 19: Podíl zastoupení taxonů kmene *Actinobacteria* na úrovni čeledi v obou půdních profilech

U kmene *Acidobacteria* bylo nejvíce zástupců zařazeno do čeledí *Subgroup 6_fa* a *Pyrinomonadaceae* (Obrázek 20). Jak již bylo zmíněno výše, nebyl téměř u žádného z bakteriálních kmenů pozorován vztah s rostoucí hloubkou. Pouze u kmene *Firmicutes* lze určit vliv hloubky na zastoupení mikroorganismů v jednotlivých vrstvách lesní půdy. Jak znázorňuje Obrázek 21, počet zástupců čeledí *Bacillaceae*, *Planococcaceae* a nepatrně také *Paenibacillaceae* (kmene *Firmicutes*) se zvyšuje s hloubkou v půdním profilu lesu.



Obrázek 20: Podíl zastoupení taxonů kmene *Acidobacteria* na úrovni čeledi v obou půdních profilech



Obrázek 21: Podíl zastoupení taxonů kmene *Firmicutes* na úrovni čeledi v obou půdních profilech

Rozborem taxonů byly také určeny dominantní rody, které se shodně vyskytovaly v obou půdních profilech (Příloha 12). Nejvíce zastoupeny zde byly bakteriální rody *Candidatus Udaeobacter* (kmen *Verrucomicrobia*), *Subgroup 6_ge* (kmen *Acidobacteria*), *Xanthobacteraceae_ge* (kmen *Proteobacteria*), *Gaiella* (kmen *Actinobacteria*) a *KD4-96_ge* (kmen *Chloroflexi*).

5.4 Diverzita prokaryotického společenstva

Rarefakční křivky ukázaly, že mezi lučním a lesním profilem nebyl významný rozdíl v celkové archaeální a bakteriální diverzitě (Obrázek 22). V obou půdních profilech byl průměrný počet OTU v jednotlivých půdních horizontech v rozmezí 1920-2563.

Diverzita se ale nepatrně lišila mezi jednotlivými horizonty daných půdních profilů. V lučním profilu vykazoval největší diverzitu horizont Bw v hloubce 10-15 cm s průměrným počtem 2563 OTU zjištěných ve vzorcích a nejmenší diverzita byla v horizontu Bw (hloubka 20-25 cm) s počtem 1841 OTU. Naproti tomu byla v lesním profilu největší diverzita sledována v horizontu Oe s počtem 2521 OTU, nejmenší diverzitu vykazoval horizont Ah s počtem 1960 OTU. Z rarefakčních křivek však nevyplýval žádný trend vzhledem k hloubce v půdním profilu a obsahu Tl.

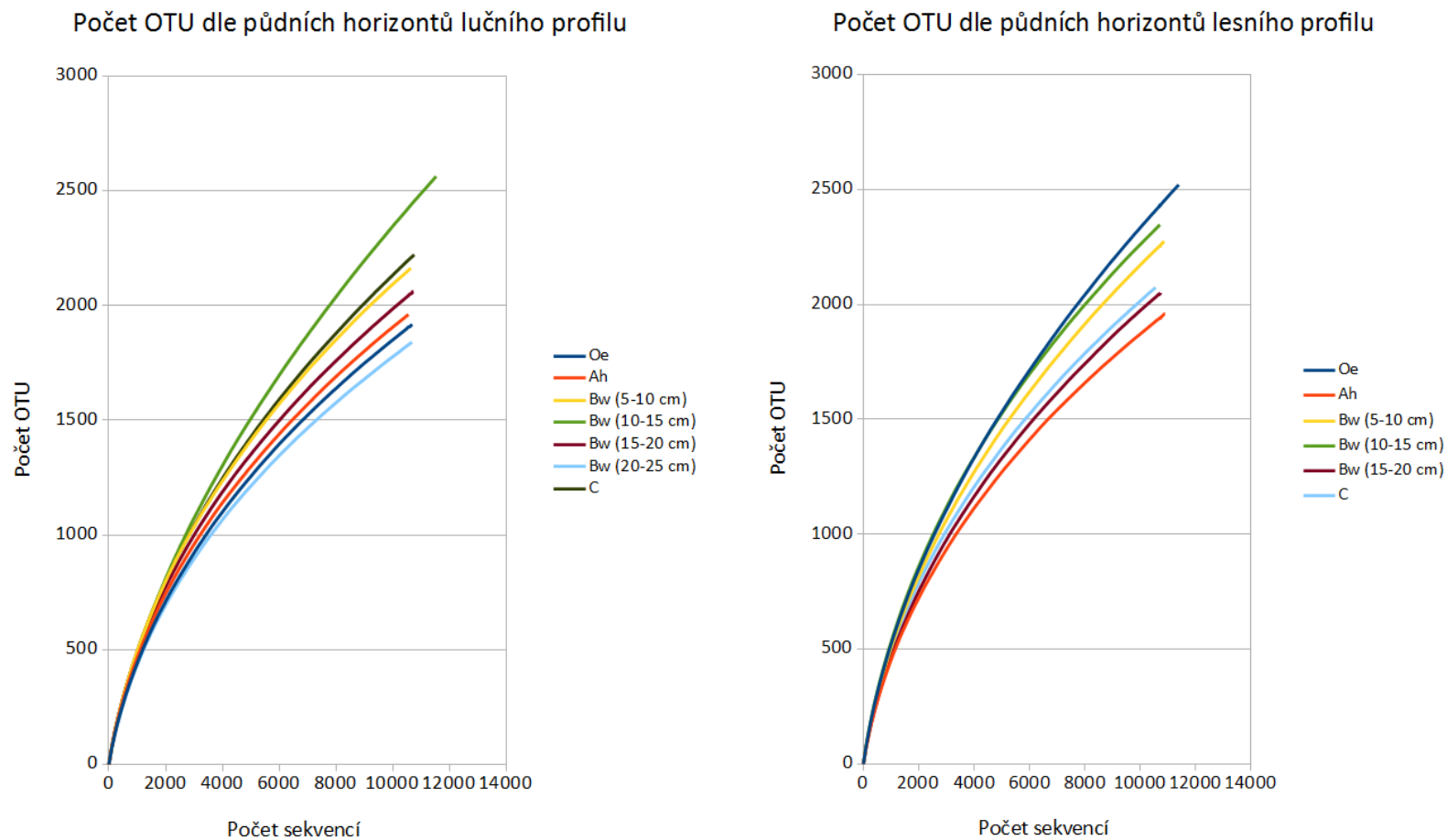
Metodou nemetrického mnohorozměrného škálování (NMDS) byla graficky zobrazena podobnost, respektive variabilita mezi jednotlivými půdními agregáty z hlediska diverzity mikrobiálního společenstva (složení OTU ve vzorku). Zároveň s tím byl stanoven i vztah mezi fyzikálně-chemickými charakteristikami studovaných půd a prokaryotickou diverzitou půdních agregátů. Výstupem této metody byla statistická data (Příloha 10, 11) a ordinační diagramy (Obrázek 23, 24).

Ordinační diagramy zobrazily značnou variabilitu prokaryotického společenstva v půdních agregátech, a to jak napříč celým profilem, tak i v rámci daného horizontu, ze kterého byly odebrány.

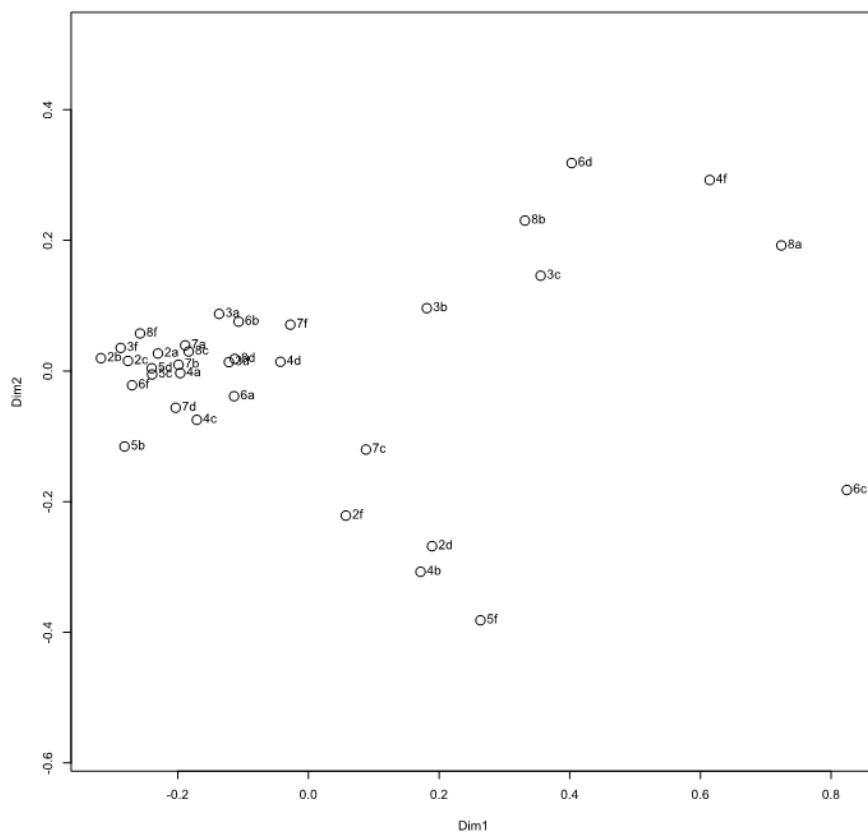
V lučním profilu vytvořilo několik vzorků větší shluk nasvědčující podobnost složení společenstva, ale jednalo se převážně o vzorky z různých horizontů. Nejmenší rozmanitost OTU v agregátech byla zjištěna v několika vzorcích z horizontů Oe a Bw (10-15 cm; 20-25 cm). V rámci agregátů z daného horizontu byly však vždy maximálně 3 s podobným složením prokaryot, zbylé dva agregáty měly odlehlou pozici značící výraznou variabilitu. Nejméně podobné si byly svým složením mikroorganismů v lučním profilu vzorky z horizontu Bw (15-20 cm). Variabilita vzorků z horizontu Bw (20-25 cm) byla nejmenší.

V lesním profilu se v půdních agregátech projevila vyšší diverzita prokaryotického společenstva než u lučního profilu. Největší variabilita OTU byla mezi agregáty z horizontu Oe a nejmenší variabilitu vykazovaly agregáty z horizontu Ah.

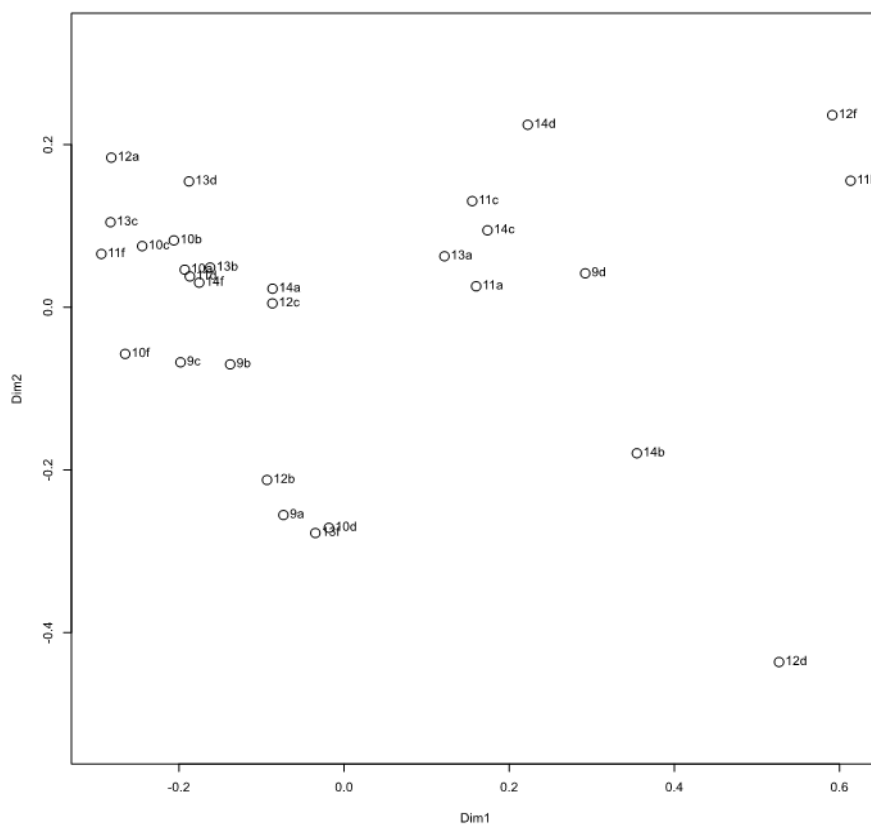
Statistická analýza ukázala nízké hodnoty regresního koeficientu (r^2), ze kterých vyplynulo, že nebyl pozorován jakýkoliv trend mezi fyzikálně-chemickými proměnnými a mikrobiálním složením vzorků z jednotlivých horizontů obou půdních profilů. Nejvyšší hodnota regresního koeficientu pro luční profil byla 0,14 (obsah výměnného Tl_{ex}) a pro lesní profil to byla hodnota 0,16 (pH_{H2O}).



Obrázek 22: Rarefakční křivky. Stanovená archaeální a bakteriální diverzita dle počtu OTU v půdních horizontech v závislosti na prosekvenovanosti vzorku (luční profil - vlevo; lesní profil - vpravo)



Obrázek 23: NMDS graf - ordinační diagram pro luční profil



Obrázek 24: NMDS graf - ordinační diagram pro lesní profil

6 Diskuze

6.1 Obsah a mobilita Tl v prostředí studovaných lokalit

Thallium, jakožto stopový prvek, se v nekontaminovaném půdním prostředí vyskytuje ve velmi nízkých koncentracích, a to v rozmezí 0,1-1 mg Tl kg⁻¹ (Kazantzis 2000; Peter & Viraraghavan 2005). Naše výsledky však prokázaly abnormální obsahy Tl v půdě na lokalitě Erzmatt ve Švýcarsku. Extrémní obsahy (~90-600 mg Tl kg⁻¹/ v agregátech ~800-1200 mg Tl kg⁻¹) se rovnají referenčním hodnotám pro půdy vyvinuté na ložiscích Tl-As sulfidů, které například uvádějí ve své studii Bačeva et al. (2014) nebo Xiao et al. (2004). Identifikované Tl na studované lokalitě je litogenního původu, a to mimo jiné na základě výsledků vysokého obsahu As a Fe, který se převážně do hloubky půdních profilů společně s Tl zvyšoval. Litogenní (sulfidický) původ Tl byl dále jasně dokumentován pomocí mineralogického studia autory Voegelin et al. (2015) a Herrmann et al. (2018).

V obou studovaných půdních profilech byl zjištěn vysoký obsah Tl, jak u celkových (homogenizovaných) půd, tak i půdních agregátů. V agregátech byl nicméně obsah o X00 mg kg⁻¹ vyšší, což si lze vysvětlit značnou heterogenitou půdních agregátů. Jak uvádějí Šimek et al. (2019), složení půdních agregátů je pro svou vysokou izolovanost velmi unikátní, kde asociace různých minerálních složek, organické hmoty a mikroorganismů tvoří organizovanou mikrostrukturu lišící se svým vnitřním prostředím od okolní půdy. Totsche et al. (2018) považují za nejdůležitější minerální fáze, které se podílejí na mikroagregaci půdy, jílové minerály a Fe oxidy, u nichž byla již řadou studií (např. Martin et al. 2018) popsána adsorpce či absorpce Tl. To může vést k vysoké koncentrovanosti Tl v našich půdních agregátech.

I přestože v jednotlivých agregátech bylo nalezeno poměrně variabilní množství Tl, bylo prokázáno, že se průměrný obsah Tl v horizontech s hloubkou zvyšoval podobně jako ve vzorcích homogenizované půdy. V organických horizontech byl obsah Tl nejnižší, přičemž v horizontu Oe byl v lesním půdním profilu obsah Tl podstatně nižší než v případě louky. Vaněk et al. (2009) došli ke stejnému závěru, tj. rostoucí obsah Tl do hloubky profilu a nejnižší hodnoty obsahu Tl v nejsvrchnějších horizontech. Tato studie taktéž porovnává půdy s rozdílným využitím - les × zemědělská půda (trvalý travní porost). Obě lokality měly velmi kyselé pH, kterým si autoři vysvětlovali zvýšenou mobilizaci Tl převažující do hloubky půdních profilů. Lesní půda vykazovala nižší obsah Tl a pH narozdíl od zemědělské půdy, což bylo dle Vaněk et al. (2009) pravděpodobně způsobeno druhovým zastoupením v porostu (*Picea abies* L., *Fagus sylvatica* L.) a jeho acidifikačními a akumulacími účinky. Naše výsledky jsou se jmenovanou studií shodné v nižším obsahu Tl v lesní půdě než v půdě zemědělské, ale liší se v půdní reakci lesních půd. Dle kritérií pro hodnocení půdní reakce lesních půd odpovídaly námi naměřené hodnoty neutrálnímu pH_{H2O} (Rejšek & Vácha 2018). Příčinou těchto hodnot je pravděpodobně vápencové a dolomitové podloží, které na půdu působí svými pufracími schopnostmi, jak také uvádí Herrmann et al. (2018). Navzdory tomu je v horizontu Oe lesního profilu velmi nízký obsah Tl v porovnání s hlouběji položenými horizonty. To si lze vysvětlit dominantním zastoupením buků (*Fagus sylvatica*) v rostlinném pokryvu. Al-Najar et al. (2003) uvádí jako možnost mobilizace Tl vliv rostlin, přičemž důležitými faktory pro vstup stopových (potenciálně rizikových) prvků včetně Tl do rostliny

jsou: kořeny vyvolané změny pH v rhizosféře, zvýšená redukční kapacita kořenů, množství a složení kořenových exudátů. Studie Tyler (2004), Tyler a Olsson (2006) prokázaly schopnost buků zachycovat Tl kořeny prostřednictvím podobných mechanismů jako alkalické kationty. Další možností nižšího obsahu Tl je například mikrobiální aktivita působící mobilizaci Tl z méně stabilizovaných frakcí, což uvádí Rasool et al. (2020), které by mohlo vzhledem ke své výrazné rozpustnosti specifických fází Tl(I) migrovat (ve formě Tl⁺) do spodních horizontů půdním roztokem.

Organický horizont (Oe) lučního profilu obsahoval více celkového Tl narozdíl od lesního profilu, a to i navzdory nižšímu pH (5,9), které je dle vyhlášky č. 275/1998 Sb. (Ministerstvo zemědělství) slabě kyselé. Ve studii Voegelin et al. (2015) bylo na lokalitě Erzmatt také zjištěno mírně kyselé pH v horní části půdního profilu P3. Ten stejně jako v naší práci obsahoval vyšší koncentraci Tl, než zbylé lokality P1 a P2 vykazující neutrální pH. Snížený obsah Tl v horizontu Oe v porovnání s horizonty Ah a C v lučním profilu je způsoben pravděpodobně mobilizací Tl v důsledku pH. To je v souladu se Sterckeman et al. (2000), podle kterých je snížené pH půdy odpovědné za mobilizaci stopových prvků („těžkých kovů“) a následnou migraci půdním profilem směrem dolů. Příčinou ale mohou být stejně jako u lesního profilu mikrobiální aktivita či rostlinný pokryv. Například se zde hojně vyskytuje zástupce rodu *Knautia*, u jehož druhového zástupce (*Knautia caroli-rechingeri*) popsali Bačeva Andonovska et al. (2018) významný vstup Tl do kořenů rostlin na lokalitě Allchar (Makedonie).

Skutečně v organických horizontech Oe bylo potvrzeno vyšší riziko biologické dostupnosti Tl narozdíl od hlouběji položených horizontů. Podílové zastoupení Tl ve výměnné (Tl_{ex}) a oxalátem (Tl_{oxal}) extrahovatelné formě v těchto horizontech poukazuje na snazší mobilizaci Tl z nestabilních forem. Zvýšený podíl výměnné frakce přičítáme retenci Tl na organickou hmotu v poměrně labilní formě, a to primárně v důsledku působení elektrostatických sil (Narwal et al. 1999; Ahnstrom & Parker 2001). S tím souhlasí studie Jacobson et al. (2005), který uvádí, že sorpce Tl na organickou hmotu (SOM) se může zdát jako nízká, jelikož komplexace Tl s organickými ligandy je celkově slabá. Ke stejnému závěru dospěli i Vaněk et al. (2013a), kteří prokázali, že Tl je vysoce mobilní a labilní v půdních horizontech bohatých na organické látky.

Vyšší, ne však statisticky významný podíl labilního Tl byl u lučního profilu také prokázán sekvenční extrakcí BCR. Je to pravděpodobně dáno slabě kyselým pH luční půdy, který dosáhne neutrálních hodnot až v horizontu C (půdotvorný substrát). To je v souladu s Karlsson (2006), který uvádí slabou sorpci Tl při snížených hodnotách pH a slabých redoxních podmínkách. Významná imobilizace Tl může probíhat při alkalickém pH.

Navzdory zjištěným labilním formám Tl v půdách, byla v obou půdních profilech prokázána vysoká geochemická stabilita Tl napříč všemi půdními horizonty. Mobilita Tl byla obecně velice nízká, jelikož v půdách zájmové lokality převažuje reziduální forma Tl (~90 % celkového obsahu Tl). Jak uvádějí autoři Yang et al. (2005), Liu et al. (2010), Gomez-Gonzalez et al. (2015), jsou takto vysoké koncentrace Tl ve formě reziduální frakce obvyklé pro Tl litogenního původu. Podobně Al-Najar et al. (2005) prokázali ve vzorcích půdy až 92 % Tl asociovaného s reziduální frakcí. Karbowska et al. (2014) zaznamenali podstatně nižší koncentraci reziduální Tl frakce (v horní vrstvě půdy 66 %, ve spodní vrstvě 36 %) v půdě vzniklé na dolomitovém podloží nesoucí Zn-Pb rudu, což bylo ale způsobeno výhradně přítomností Tl v oxidovatelné formě, která se váže právě na sulfidy (Jakubowska et al. 2007).

Hojně bylo také Tl zastoupeno v podobě redukovatelné frakce zahrnující vazbu Tl na Mn, Fe hydr(oxidy). Vaněk et al. (2009) zjistili v obou studovaných půdách (les × trvalý travní porost) až 95 % Tl z celkového obsahu vázaného v reziduální frakci, což bylo interpretováno dominantní vazbou Tl v silikátech v podobě K-živců (KAlSi_3O_8), illitu ($((\text{KH}_3\text{O})\text{Al}_2(\text{Si},\text{Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2)$) či muskovitu ($\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{F},\text{OH})_2$). S tím korespondují i naše výsledky rentgenové práškové difrakční analýzy (XRD), podle nichž je zde prokázán dominantní výskyt K-živců, muskovitu a illitu, u kterých byla prokázána interakce/vazba s Tl (Tremel et al. 1997b; Vaněk et al. 2011; Grösslová et al. 2015; Voegelin et al. 2015). Značnou imobilizaci Tl nasvědčuje i vysoká hodnota CEC (Rejšek & Vácha 2018), která prokazuje schopnost půd účinně poutat kationty. Její velikost je převážně závislá na přítomnosti organické hmoty a jílové frakce v půdě.

Podíl Tl ve formě výměnné frakce byl v obou profilech nízký (0,1-0,5 % z celkového obsahu Tl). V lučním profilu byl ale zjištěn nepatrný rozdíl v porovnání s lesním profilem, a to ve vyšším podílovém zastoupení výměnného Tl v organickém horizontu, které se s hloubkou snižovalo. To může být potenciálně způsobeno vlivem organických látek jako jsou fulvokyseliny, huminové kyseliny či například kyselina šťavelová, které dokážou zvýšit zvětrávání minerálů především v závislosti na klesajícím pH (Huang & Keller 1972; Drever & Stillings 1997; Wang et al. 2005; Lazo et al. 2017). Významně působí na křemičitany (zejména slídy, živce či jílové minerály), z nichž uvolněné Tl se pravděpodobně naváže slabou vazbou na organickou hmotu (Drever & Stillings 1997; Jacobson et al. 2005). Výměnná Tl frakce představuje největší riziko ze tří labilních forem určených BCR extrakcí, jelikož vlivem organických kyselin s nízkou molekulovou hmotností může dojít k uvolnění toxického Tl do prostředí (Ettler et al. 2009).

Redukovatelná frakce zahrnuje Tl vázané na Fe a Mn-oxidy (Liu et al. 2016). Výsledky oxalátem extrahovatelného Fe a Mn, které mají stejný rostoucí trend do hloubky lesního profilu jako podílové zastoupení Tl (5-9 % z celkového obsahu Tl) v redukovatelné frakci, poukazují na vazbu Tl s Fe a Mn (hydr)oxidy ($R^2=0,9$). Rostoucí trend do hloubky by mohl spočívat ve vzniku těchto oxidů jako sekundárních minerálů při Tl-As-Fe sulfidické mineralizaci (Voegelin et al. 2015). V lučním profilu nebyla významná korelace mezi těmito proměnnými zjištěna. Hodnoty redukovatelné Tl frakce (8-9 %), stejně jako Fe_{ox} a Mn_{ox} , byly v celém půdním profilu louky relativně konstatní.

Oxidovatelná frakce Tl je pravděpodobně dle klesajícího trendu podílového zastoupení této frakce v jednotlivých horizontech vázaná na organickou hmotu (Liu et al. 2018). Lze tak usuzovat na základě obsahu celkového TC, který se s hloubkou snižoval. Celkový obsah TC lze považovat za proměnnou udávající vysoký obsah organické hmoty v půdě, a to vzhledem k hodnotám celkového anorganického uhlíku, které nabývaly <0,1 hm.% (tedy menší, než je stanovena hodnota meze detekce). Odhad obsahu organické hmoty v půdních agregátech také prokázal značný podíl, který se do hloubky snižoval. Hodnoty byly ale vyšší i v minerálních horizontech, a tak zde mohlo dojít k lehkému zkreslení v průběhu stanovení. Salehi et al. (2011) uvádí, že i při teplotách žhání 300 °C je možný únik vlhkosti vázané v jílových minerálech. Předpokládá se, že kovové znečišťující látky spojené s oxidovatelnými fázemi zůstanou v půdě delší dobu, ale mohou být mobilizovány procesy rozkladu (Kennedy et al. 1997). Nízké hodnoty zastoupení Tl v oxidovatelné frakci (louka ~2-3 %, les ~2-5 %) však nasvědčují již zmíněné slabé komplexaci Tl s organickými ligandy.

Přesto je možné pozorovat mírný rozdíl mezi půdními profily v organických horizontech, kde bylo podílové zastoupení oxidovatelné Tl frakce v lesním profilu vyšší (5 %). V souvislosti s tím, vykazoval horizont Oe také vyšší hodnotu CEC v porovnání s lučním profilem, což nasvědčuje většímu podílu organické hmoty, který je sem dodáván výrazným opadem stromů. Oxidovatelná Tl frakce by také mohla představovat Tl navázané na sulfidy, které jsou dominantními nositeli Tl v půdách (Kazantzis 2000; Lis et al. 2003). Herrmann et al. (2018) v zájmové lokalitě prokázali pyrit, jehož alterace je pravděpodobně původním zdrojem Tl ve studované lokalitě Erzmatt. Naše analýzy pomocí XRD ale sulfidické minerály neprokázaly.

I přestože se Tl ve studovaných půdách jeví jako značně stabilní a představující nízké riziko pro životní prostředí, koncentrace Tl v labilních formách nelze označit za zanedbatelné. Podle Muhlbachova et al. (2015) je toxicita kovů charakterizována jejich biologickou dostupností, která je dána především snadno vyluhovatelnou a iontově výměnnou frakcí dostupnou pro absorpci půdními organismy. Obsah Tl vázaného ve formě výměnné frakce stanovené NH_4NO_3 byl v lučním profilu v rozmezí $30\text{--}36 \text{ mg kg}^{-1}$, v lesním profilu to bylo $5\text{--}25 \text{ mg kg}^{-1}$, zatímco požadovaná hodnota v půdách byla prokázána nižší $<1 \text{ mg Tl kg}^{-1}$. Výměnná Tl frakce (dle BCR extrakce) byla v půdě zastoupena obsahem Tl v rozmezí $0,5\text{--}2,2 \text{ mg kg}^{-1}$ pro luční profil, lesní profil obsahoval $0,2\text{--}1,6 \text{ mg Tl kg}^{-1}$. Snadnější degradaci mohou také podlehnout málo krystalické a amorfni Fe/Mn oxidy, které jsou častým nositelem Tl v půdě. V redukovatelné formě bylo obsaženo v lučním profilu $20\text{--}58 \text{ mg kg}^{-1}$, v lesním profilu bylo redukovatelného Tl $5\text{--}50 \text{ mg kg}^{-1}$. Studie (Tremel et al. 1997b; Al-Najar et al. 2005; Pavlíčková et al. 2006) navíc prokázaly, že půdy obsahující litogenní Tl, které mají nízký sklon k uvolňování Tl, mohou mít významné dopady v zemědělsky využívaných půdách. Autoři zaznamenali mobilizaci Tl v rhizosféře rostlin, které působily na relativně stabilní, nerozpustné silikáty, sulfidy či oxidy obohacené Tl.

Dle našich výsledků lze říci, že využití půdy ovlivňuje chemismus Tl v zájmové lokalitě jen částečně. Rozdíly mezi lučním a lesním profilem jsou vždy sledovány v organických horizontech Oe, kde je největším faktorem z hlediska hospodářského využití pravděpodobně rostlinný pokryv. Ten dodává do půdy značné množství organické hmoty, přičemž v lesní půdě dle TC, CEC a oxidovatelné Tl frakce je v horním horizontu Oe a Ah organické hmoty nepatrně více, což způsobuje i vyšší zastoupení Tl v oxidovatelné frakci. To je v souladu s Andersen et al. (2004), podle kterého různé druhy stromů ovlivňují vlastnosti půdy, jako je pH a obsah organických látek zejména v horních vrstvách půdy, avšak nemají vliv na hlubší půdní horizonty. I přestože řada stromů má značný vliv snižovat pH půdy, v našem případě je pH lesní půdy ovlivněno spíše geologickým podložím. Snižovaný obsah Tl je v organickém horizontu lesní půdy způsoben s největší pravděpodobností litofilním charakterem Tl, a tak jej bukové porosty jsou schopny přijímat do svých kořenů podobně jako alkalické kovy. Chemismus Tl je v lesní půdě ovlivněn převážně mineralogickým složením, které zde zvyšuje pH a má vliv na značnou imobilizaci Tl do struktur stabilních primárních minerálů jako jsou K-živce, muskovit a sekundární illit-smektit

Vzhledem k tomu, že podle Drábek et al. (2007) byly zdokumentovány vyšší hodnoty pH pod travním porostem ve srovnání s přilehlými lesními půdami, nelze říci, že chemismus Tl v lučním profilu může být z části ovlivněn lokální vegetací, a tudíž využitím půdy. Složení půdy způsobuje slabě kyselé pH, které působí snadnější uvolňování Tl do prostředí, což vysvětluje

nepatrně vyšší obsah TI v lučném profilu, který se díky snadnější pohyblivosti do hloubky zvyšuje.

6.2 Diverzita a složení prokaryotického společenstva v půdě kontaminované TI

Významný rozdíl mezi diverzitou prokaryotického společenstva lučního a lesního půdního profilu nebyl prokázán. Výrazná odlišnost v diverzitě nebyla zjištěna ani mezi jednotlivými horizonty daného půdního profilu. Náš výsledek podporuje závěr studií Gelsomino a Azzellino (2011) či Girvan et al. (2003), kteří uvádí vliv využití půdy na strukturu mikrobiálního společenstva až jako sekundární činitel, přičemž jsou ale dle autorů významnější fyzikálně-chemické faktory půdního prostředí. Jako jeden z nejvýznamnějších parametrů ovlivňující mikrobiální společenstvo je uváděno pH půdy (Fierer & Jackson 2006), které se v obou námi studovaných lokalitách zvyšovalo s hloubkou, ale ani v tomto směru nebyl rarefakčními křivkami prokázán trend ve změně diverzity. Dále může být diverzita společenstva ovlivněna například působením stresu prostřednictvím znečišťujících látek. Například Liu et al. (2020) či Sheik et al. (2012) prokázali ve své studii pokles rozmanitosti mikroorganismů s gradientem rizikových prvků (As, Cr či Cd). V našem případě však nelze pozorovat přímý vliv TI na diverzitu mikroorganismů v jednotlivých horizontech, jelikož zde není trend s vývojem obsahu TI v půdním profilu.

Analýza provedená za účelem zjištění vlivu celkového obsahu TI a jednotlivých geochemických TI frakcí na složení prokaryotického společenstva neprokázala jakýkoliv trend, který by nasvědčoval vztahu mezi variabilitou mikrobiální komunity v jednotlivých agregátech a obsahem TI v daných půdních horizontech. Nebyla prokázána závislost struktury společenstva ani na dalších fyzikálně-chemických charakteristikách jako jsou například půdní pH, obsah organické hmoty v půdě, obsah oxalátem extrahovatelného Fe či Mn. Výsledek je v rozporu se studii Rasool a Xiao (2018), Liu et al. (2019a), Rasool et al. (2020) a Wang et al. (2020), kteří prokázali vliv obsahu celkového TI, TI frakcí a geochemických parametrů na formování mikrobiálního společenstva. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben stanovením ze směsných vzorků půd, zatímco náš experiment zahrnoval stanovení společenstva z jednotlivých půdních agregátů. Ve všech půdních horizontech byla mezi jednotlivými půdními agregáty prokázána značná variabilita prokaryotického složení, která pravděpodobně překryla statisticky významné rozdíly mezi půdními horizonty, ale i mezi půdami různého hospodářského využití. Toto je v souladu s Carson et al. (2010), Blaud et al. (2014) a Šimek et al. (2019). Autoři označují půdní agregáty jako unikátní mikroprostředí, která jsou specifická fyzikálně-chemickými podmínkami odlišnými od vnějšího prostředí. Takovéto jedinečné podmínky mikroprostředí přispívají k heterogenitě ve složení a struktuře mikrobiálních komunit v malých prostorových měřítcích. Studie Davinic et al. (2012) prokázali různé bakteriální komunity v půdních agregátech v závislosti na jejich velikosti. To potvrzují Upton et al. (2019), kteří také prokázali strukturu mikrobiálního společenstva závislou na velikosti půdních agregátů.

Složení prokaryotického společenstva v půdě představuje citlivé měřítko zdraví půdy (Hartmann et al. 2014). Ačkoli byla prokázána značná variabilita složení OTU v jednotlivých agregátech, bylo zjištěno jisté překrytí ve sdílených taxonech mezi horizonty daného půdního profilu i mezi oběma lokalitami. Taxonomické zařazení určilo shodně v obou půdních profilech 10 dominantních bakteriálních kmenů. Byly to kmeny *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes*, *Firmicutes* a *Rokubacteria* (vyjmenované v přesném pořadí od nejvíce po méně zastoupené). Téměř všechny tyto kmeny se dle studie Delgado-Baquerizo et al. (2018) řadí mezi celosvětově nejzastoupenější, pouze kmen *Rokubacteria* je ve jmenované studii zaměněn za kmen *Armatimonadetes*. Naše výsledky se však liší v pořadí nejčastějšího zastoupení. Janssen (2006) taktéž ve své studii nekontaminovaných vzorků půdy potvrzuje námi prokázané kmeny jako dominantní v půdním prostředí. Významné bakteriální kmeny se v naší studii neliší od společenstev zjištěných v nekontaminovaných vzorcích půdy (Janssen 2006; Delgado-Baquerizo et al. 2018), některé kmeny ale mají rozdílný relativní podíl zastoupení. V nekontaminovaných vzorcích zaujímají kmeny *Proteobacteria* ~37 %, *Actinobacteria* ~25-30 %, *Acidobacteria* 13 % a zbylé kmeny *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Gemmatimonadetes* a *Firmicutes* jsou zastoupeny ze 2-7 %. V našem experimentu je podílové zastoupení kmenů *Proteobacteria* a *Actinobacteria* nepatrně nižší, a to v důsledku markantně vyššího podílu zastoupení kmene *Verrucomicrobia* (14-24 % z celkového podílu kmenů).

Podobné složení mikrobiálního společenstva jako v naší studii bylo prokázáno i Rasool et al. (2020), kteří se zabývali mikrobiálním společenstvem v sedimentech kontaminovaných Tl. Celkem ~95 % ze stanovených 16S rRNA sekvencí bylo taktéž zařazeno do 10 dominantních bakteriálních kmenů, což je v souladu s našimi výsledky. Dominantními kmeny byly *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes*, *Chlorobi*, *Gemmatimonadetes*, *Verrucomicrobia*. V porovnání s našimi výsledky se zde složení lišilo pouze kmenem *Chlorobi*, který je v naší studii nahrazen kmenem *Rokubacteria*. Co se týče pořadí dle zastoupení ve společenstvu, je mezi studii rozdíl zejména v kmenu *Verrucomicrobia*. Zatímco ve studii Rasool et al. (2020) je kmen *Verrucomicrobia* nejméně zastoupený z 10 zmiňovaných dominantních kmenů, v naší studii se jedná o druhý nejhojněji zastoupený kmen. Nízký podíl kmene *Verrucomicrobia* je podle Bergmann et al. (2011) v řadě studií přičítáno použitým primerům, jelikož některé běžně používané primery dle těchto autorů mohou během amplifikace vyloučit variantu genu pro 16S rRNA typickou pro *Verrucomicrobia*. Bergmann et al. (2011) prokázali ve své studii, že průměrně 23 % bakteriálních sekvencí náleželo zástupcům kmene *Verrucomicrobia* a byly zjištěny v celkem 180 vzorcích půdy ze 181 testovaných. Toto je v souladu s našimi výsledky, které prokázaly v obou půdních profilech 14-24% podíl zastoupení kmene *Verrucomicrobia*. Dále autoři (Bergmann et al. 2011) uvádějí, že se hojněji *Verrucomicrobia* vyskytovaly v půdách s travnatým porostem v porovnání s půdami jiného využití. To se v našem experimentu nepotvrdilo.

Ze studie Rasool a Xiao (2018) však vyplývá, že v prostředí kontaminovaném Tl byla prokázána negativní korelace zástupců *Verrucomicrobia* s vyšším obsahem Tl. Podobným výsledkům dospěli Berg et al. (2012) a Azarbad et al. (2015), kteří zjistili negativní korelaci kmene *Verrucomicrobia* se zvyšujícím se obsahem kovového znečištění (Pb, Zn, Cd, Cu).

Tomuto tvrzení by mohlo odpovídat v naší studii mírné zvýšení procentuálního zastoupení v horizontech s nižším obsahem „labilních“ frakcí Tl. Obecně zde byl ale podíl zástupců *Verrucomicrobia* velmi vysoký, který spíše potvrzuje souvislost s neprokázaným vlivem Tl na variabilitu společenstva či adaptaci těchto půdních mikroorganismů na dlouhodobé účinky kovového zatížení půd (Chander & Joergensen 2008).

I přestože výsledky neukázaly statisticky významný vztah mezi obsahem Tl a složením mikrobiálního společenstva, byla v obou půdních profilech prokázána dominantní přítomnost taxonů, u kterých byla v minulosti zaznamenána tolerance vůči rizikovým prvkům (kovům).

Dominance kmene *Proteobacteria* je v souladu s Nies et al. (2000) a Wang et al. (2020) kteří prokázali, že většina bakterií žijících v extrémně kovy znečištěné půdě náleží právě do tohoto kmene. Některé studie prokázaly zástupce kmenů *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Proteobacteria*, *Gemmatimonadetes* jako dominující v půdách kontaminovaných rizikovými prvky, a to v důsledku vlastní či získané tolerance anebo rezistence vůči toxickým kovům (Gu et al. 2017; Chen et al. 2018; Beattie et al. 2018; Liu et al. 2019a; Rasool et al. 2020).

Čeď *Xanthobacteraceae* náležející do třídy *Rhizobiales* představovala více než 20 % z kmene *Proteobacteria*. Takto vysoké zastoupení by mohlo znamenat souvislost mezi *Rhizobiales* a biogeochemickými procesy s Tl, kterou uvádí Wang et al. (2020).

Zajímavým výsledkem je hojně zastoupení kmene *Actinobacteria* (10-16 %) v obou půdních profilech, u kterého dřívější studie Yin et al. (2015) prokázala citlivost na stopové prvky jako jsou Pb, Zn a Cr. Porovnáme-li však horizonty obsahující méně Tl s horizonty s výrazným nárůstem obsahu Tl, nebyl zde zjištěn výrazný pokles v zastoupení této skupiny mikroorganismů podél gradientu obsahu Tl. Naopak v lesním profilu se podíl zastoupení čeledi *Gaiellaceae* patřící do kmene *Actinobacteria* mírně zvyšoval do hloubky stejně jako obsah labilních frakcí Tl. Toto je v souladu s řadou studií (např. Li et al. 2015; Madrova et al. 2018), které prokázaly odolnost tohoto kmene vůči kontaminaci stopovými (rizikovými) prvky a zároveň zvýšení zastoupení v půdách se zvýšeným obsahem kontaminace. Epelde et al. (2015) taktéž potvrzují možnou toleranci kovového zatížení půdy některými zástupci kmene *Actinobacteria*. Konkrétně byl v této studii prokázán zvyšující se trend zastoupení třídy *Thermoleophilia* (zahrnující čeď *Gaiellaceae*) se zvyšujícím se znečištěním stopovými prvky (Cd, Pb, Zn). Výsledky taxonomického rozboru ukázaly, že zástupce tohoto kmene, rod *Gaiella*, byl čtvrtým nejvíce se vyskytujícím rodem ve společenstvu ze všech zde klasifikovaných bakteriálních a archaeálních rodů. Toto pravděpodobně souvisí s výsledkem studie Rasool et al. (2020), kteří prokázali v sedimentech obohacených Tl přítomnost rodu *Gaiella* schopného tolerance vysoce toxických kovových prvků.

Výsledky dále ukázaly markantní zastoupení čeledi *Subgroup 6_fa* představující více než 40 % kmene *Acidobacteria*, a to v obou půdních profilech. Zajímavým výsledkem je, že tato čeď dosáhla svého maxima v lučním profilu v horizontu Bw v hloubce 15-20 cm, který vykazoval nejvyšší obsah Tl v labilních frakcích (71 mg kg⁻¹) a celkově podíl zastoupení *Subgroup 6_fa* v horizontech kopíroval obsah Tl v lučních horizontech. V lesním profilu však tento trend pozorován nebyl, což lze pravděpodobně přičíst nepatrně vyšší variabilitě mikrobiálních společenstev jednotlivých půdních agregátů či neutrálnímu pH, při kterém je mobilita kovů jako je Pb, Cd či Zn obecně nižší (Sterckeman et al. 2000). Rod *Subgroup 6* náležející do stejnojmenné čeledi byl prokázán jako druhý nejhojněji zastoupený v celém

prokaryotickém společenstvu obou půdních profilů. Zástupci *Subgroup 6* jsou nejhojněji zastoupeným nižším taxonem kmene *Acidobacteria* v půdách obecně, zejména v půdách s travnatým porostem (Janssen 2006; Naether et al. 2012). Dominance v našem experimentu může ale souviset i s rezistencí této skupiny vůči kovovému znečištění a obecně se schopností kmene *Acidobacteria* odolávat extrémním podmínkám prostředí. Ve studii Barns et al. (2007) byla tato skupina bakterií nalezena v lokalitě kontaminované uranem, což nasvědčovalo vysoké odolnosti vůči kontaminaci kovů. Tento výsledek se shoduje také se studií Yin et al. (2015), kteří v lokalitě znečištěné řadou kovů (např. Hg, Pb, Cd, Cr) prokázali významný výskyt *Acidobacteria GP6* (představující ~30 % kmene *Acidobacteria*) odpovídající toleranci zvýšeným koncentracím toxických prvků.

Rod *KD4-96* (kmen *Chloroflexi*) byl v obou půdních profilech prokázán jako jeden z pěti dominantních rodů vyskytujících se ve studovaných lokalitách. Dle grafu taxonomie na úrovni rodů se jeho procentuální zastoupení mírně zvyšovalo v horizontech, kde byl zjištěn vyšší obsah Tl. To by mohlo napovídat adaptaci tohoto rodu na přítomnost toxického stopového prvku, kterou zaznamenali Liu et al. (2020), a jejichž studie prokázala významnou pozitivní korelaci rodu *KD4-96* s DTPA extrahovatelným Cd. Toto je v souladu i s Azarbad et al. (2015), kteří zaznamenali ve své studii zvýšený podíl kmene *Chloroflexi* zvyšující se společně s rostoucím podílem znečištění půdy kovy jako je Zn, Pb, Cd, Cu. Podle autorů jsou zástupci kmene *Chloroflexi* schopni adaptace na extrémně znečištěné půdní prostředí.

Liu et al. (2019a) prokázali ve své studii citlivost kmene *Firmicutes* na zvyšující se obsah Tl v prostředí. To je v rozporu s našimi výsledky. V obou studovaných půdních profilech byl zjištěn růst podílu zastoupení kmene *Firmicutes* do hloubky, a to zejména v lesním půdním profilu. V lučném profilu byl nárůst kolísavý stejně jako obsah Tl v jednotlivých horizontech. Podíl zastoupení kmene *Firmicutes* měl podobný trend jako suma obsahu labilních Tl forem v jednotlivých horizontech, což by mohlo potvrdit výsledky několika studií (Ellis et al. 2003; Yin et al. 2015), které ukázaly toleranci zástupců této skupiny bakterií vůči přítomnosti rizikových prvků (např. Cu, Hg, Pb, Zn) v půdě.

Jak z výsledků vyplývá, nebylo prokázáno výrazně odlišné složení prokaryotického společenstva mezi lučným a lesním půdním profilem. V obou lokalitách byly zjištěny shodné dominantní bakteriální kmeny, a stejně tak byla prokázána značně podobná dominance taxonů na nižší hierarchické úrovni. Nepatrné rozdíly byly zjištěny mezi jednotlivými horizonty daných půdních profilů, ale dle permutační analýzy zde nebyla prokázána statisticky významná korelace složení mikrobiálního společenstva s fyzikálně-chemickými vlastnostmi půdy a rozdíly neodpovídaly ani gradientu hloubky půdního profilu. Navzdory tomu prokázal rozbor taxonomického uspořádání prokaryotického společenstva v naší studii některé druhy mikroorganismů, které jsou spojovány s tolerancí zatížení půdy rizikovými prvky (kovy ev. metaloidy). Ačkoli byla prokázána v zájmové lokalitě nízká mobilita Tl dána značným podílem Tl v reziduální frakci, zdá se, že i přesto může být zjištěn vztah mezi celkovým obsahem Tl, reziduální Tl frakcí a mikroorganismy (Liu et al. 2019a). V našem experimentu se toto nepotvrdilo, a to patrně kvůli značné variabilitě složení prokaryot mezi jednotlivými půdními agregáty daných horizontů v obou půdních profilech.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat prokaryotická společenstva žijící v půdách s různým hospodářským využitím zatížených Tl. Studován byl také vliv rozdílného využití půdy na chemismus Tl, a s tím spojené potenciální riziko pro životní prostředí.

Předpoklad vlivu využití půdy na chemismus Tl a složení půdní bioty se nepotvrdil. Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v celkovém obsahu Tl mezi oběma půdními profily. BCR sekvenční extrakce taktéž neprokázala statisticky významný rozdíl mezi lučným a lesním profilem v rámci jednotlivých chemických frakcí Tl. V rámci (celkových) půdních profilů byl dán chemismus Tl zejména shodným geologickým podložím a mineralogickým složením studovaných půd. Výsledky prokázaly vysokou geochemickou stabilitu Tl, která byla dána ~90% vazbou Tl na reziduální frakci. Pouze malé procento Tl bylo ve formě „labilních“ frakcí, z čehož vyplynulo nízké riziko dopadu na životní prostředí. Druhá část hypotézy, která předpokládala vliv využití půdy na složení půdní bioty (mikrobiální) se taktéž nepotvrdila. V obou půdních profilech byly prokázány shodné dominantní bakteriální kmeny i taxony na nižší hierarchické úrovni. To podpořila i analýza diverzity mikrobiálních společenstev, která nebyla statisticky významně rozdílná mezi studovanými půdními profily.

Hypotéza předpokládající odlišnou půdní biotu v půdě zatížené Tl a v půdě nekontaminované se nepotvrdila. V obou půdních profilech bylo více než 95 % prokaryotických sekvencí 16S rRNA zařazeno do dominantních bakteriálních kmenů, které jsou studii prokázány jako všudypřítomné a celosvětově nejvíce zastoupené prokaryotické kmeny. Stejně tak byly mezi dominantními prokaryotickými rody prokázány bakterie, které byly zjištěny studii v nekontaminovaných půdách jako dominantní. Významný rozdíl ve složení prokaryot se neprokázal, avšak částečně byla pozorována odlišnost v poměrech procentuálního zastoupení kmene *Verrucomicrobia*.

Kombinace výsledků geochemických vlastností půdy a mikrobiologických charakteristik obou půdních profilů nepotvrdily závislost variability mikrobiálního společenstva mezi půdními agregáty na koncentraci Tl v půdě. Prokaryotické společenstvo nebylo ovlivněno ani fyzikálně-chemickými parametry půdy. Statistická analýza ukázala významnou variabilitu společenstva mezi jednotlivými půdními agregáty daných půdních horizontů, ale i v rámci celého profilu. Tato variabilita pravděpodobně zastínila možný vliv Tl a jiných vlastností půdy na druhovou rozmanitost a složení prokaryot.

Navzdory podobnosti složení prokaryotického společenstva s nekontaminovanými půdami, byla zjištěna dominance námi zjištěných bakteriálních kmenů i ve studiích mikrobiálního společenstva v půdě znečištěné Tl. I přes závěry vyvracující vliv Tl na prokaryota byla taxonomickým rozborem a porovnáním s dříve provedenými studii zjištěna přítomnost bakteriálních taxonů, které byly spojeny se schopností adaptace na znečištěné půdní prostředí rizikovými prvky (vč. Tl). To by bylo ale potřeba potvrdit dalšími mikrobiologickými metodami zahrnující například stanovení genů rezistence vůči Tl. Analýzy vlastností prokaryotického společenstva, které přesněji souvisejí s toxicitou Tl by patrně překryly velkou variabilitu taxonomického složení, takže by se hledané rozdíly prokázaly.

8 Seznam literatury

- Aguilar-Carrillo J, Herrera-García L, Reyes-Domínguez IA, Gutiérrez EJ. 2020. Thallium(I) sequestration by jarosite and birnessite: Structural incorporation vs surface adsorption. *Environmental Pollution* **257**.
- Ahnstrom ZAS, Parker DR. 2001. Cadmium reactivity in metal-contaminated soils using a coupled stable isotope dilution-sequential extraction procedure. *Environmental Science and Technology* **35**(1):121-126.
- Alderton DHM, Serafimovski T, Mullen B, Fairall K, James S. 2005. The Chemistry of Waters Associated with Metal Mining in Macedonia. *Mine Water and the Environment* **24**(3):139-149.
- Al-Najar H, Kaschl A, Schulz R, Römheld V. 2005. Effect of thallium fractions in the soil and pollution origins on Tl uptake by hyperaccumulator plants: a key factor for the assessment of phytoextraction. *International Journal of Phytoremediation* **7**(1):55-67.
- Al-Najar H, Schulz R, Römheld V. 2003. Plant availability of thallium in the rhizosphere of hyperaccumulator plants: a key factor for assessment of phytoextraction. *Plant and Soil* **249**(1): 97-105.
- Anagboso MU, Turner A, Braungardt C. 2013. Fractionation of thallium in the Tamar estuary, south west England. *Journal of Geochemical Exploration* **125**:1-7.
- Andersen MK, Raulund-Rasmussen K, Strobel BW, Hansen HCB. 2004. The Effects of Tree Species and Site on the Solubility of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in Soils. *Water, Air, & Soil Pollution* **154**(1-4):357-370.
- Anderson CWN, Brooks RR, Chiarucci A, Lacoste CJ, Leblanc M, Robinson BH, Simcock R, Stewart RB. 1999. Phytomining for nickel, thallium and gold. *Journal of Geochemical Exploration* **67**(1-3):407-415.
- Antić-Mladenović S, Frohne T, Kresović M, Stärk HJ, Savić D, Ličina V, Rinklebe J. 2017. Redox-controlled release dynamics of thallium in periodically flooded arable soil. *Chemosphere* **178**:268-276.
- Azarbad H, Niklińska M, Laskowski R, van Straalen NM, van Gestel CAM, Zhou J, He Z, Wen C, Roling WFM. 2015. Microbial community composition and functions are resilient to metal pollution along two forest soil gradients. *FEMS Microbiology Ecology* **91**:1-11.
- Baćmaga M, Wyzkowska J, Kucharski J. 2020. Response of soil microorganisms and enzymes to the foliar application of Helicur 250 EW fungicide on *Hordeum vulgare* L. *Chemosphere* **242**.
- Bačeva Andonovska K, Safilov T, Matevski V. 2018. BIOACCUMULATION OF SOME TOXIC ELEMENTS BY ENDEMIC PLANT SPECIES *Onobrychis degenii* Dörfler, *Knautia caroli-rechingeri* Micev. AND *Centaurea kavadarensis* Micev. FROM ALLCHAR LOCALITY, REPUBLIC OF MACEDONIA. *Geologica Macedonica* **32**(1):33-44.

- Bačeva K, Stafilov T, Šajn R, Tănăselia C, Makreski P. 2014. Distribution of chemical elements in soils and stream sediments in the area of abandoned Sb–As–Tl Allchar mine, Republic of Macedonia. *Environmental Research* **133**:77-89.
- Bach EM, Baer SG, Meyer CK, Six J. 2010. Soil texture affects soil microbial and structural recovery during grassland restoration. *Soil Biology and Biochemistry* **42**(12):2182-2191.
- Bao Z, Sato Y, Fujimura R, Ohta H. 2014. *Alsobacter metallidurans* gen. nov., sp. nov., a thallium-tolerant soil bacterium in the order *Rhizobiales*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**:775-780.
- Barns SM, Cain EC, Sommerville L, Kuske CR. 2007. *Acidobacteria* Phylum Sequences in Uranium-Contaminated Subsurface Sediments Greatly Expand the Known Diversity within the Phylum. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(9):3113-3116.
- Beattie RE, Henke W, Campa MF, Hazen TC, McAliley LR, Campbell JH. 2018. Variation in microbial community structure correlates with heavy-metal contamination in soils decades after mining ceased. *Soil Biology and Biochemistry* **126**:57-63.
- Berg J, Brandt KK, Al-Soud WA, Holm PE, Hansen LH, Sørensen SJ Nybroe O. 2012. Selection for Cu-Tolerant Bacterial Communities with Altered Composition, but Unaltered Richness, via Long-Term Cu Exposure. *Applied and Environmental Microbiology* **78**(20):7438-7446.
- Bergmann GT, Bates S, Eilers KG, Lauber CL, Caporaso JG, Walters WA, Knight R, Fierer N. 2011. The under-recognized dominance of *Verrucomicrobia* in soil bacterial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **43**(7):1450-1455.
- Bidoglio G, Gibson, PN, O'Gorman M, Roberts KJ. 1993. X-ray absorption spectroscopy investigation of surface redox transformations of thallium and chromium on colloidal mineral oxides. *Geochim. Cosmochim. Acta* **57**(10):2389–2394.
- Blaud A, Chevallier T, Virto I, Pablo AL, Chenu C, Brauman A. 2014. Bacterial community structure in soil microaggregates and on particulate organic matter fractions located outside or inside soil macroaggregates. *Pedobiologia* **57**(3):191-194.
- Blume E, Bischoff M, Reichert JM, Moorman T, Konopka A, Turco RF. 2002. Surface and subsurface microbial biomass, community structure and metabolic activity as a function of soil depth and season. *Applied Soil Ecology*, **20**(3):171-181.
- Boriová K, Čerňanský S, Matúš P, Bujdoš M, Šimonovičová A. 2014. Bioaccumulation and biovolatilization of various elements using filamentous fungus *Scopulariopsis brevicaulis*. *Letters in Applied Microbiology* **59**(2):217-223.
- Boughriet A, Proix N, Billon G, Recourt P, Ouddane B. 2007. Environmental Impacts of Heavy Metal Discharges from a Smelter in Deûle-canal Sediments (Northern France): Concentration Levels and Chemical Fractionation. *Water, Air, & Soil Pollution* **180**(1-4):83-95.
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW. 2000. Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **45**(3):198-207.

- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 516-4522.
- Carson JK, Gonzalez-Quiñones V, Murphy DV, Hinz C, Shaw JA, Gleeson DB. 2010. Low Pore Connectivity Increases Bacterial Diversity in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(12):3936-3942.
- Clarke LB, Sloss LL. 1992. Trace elements—emissions from coal combustion and gasification. IEA Coal Research, London.
- Davinic M, Fultz LM, Acosta-Martinez V, Calderón FJ, Cox SB, Dowd SE, Allen VG, Zak JC, Moore-Kucera J. 2012. Pyrosequencing and mid-infrared spectroscopy reveal distinct aggregate stratification of soil bacterial communities and organic matter composition. *Soil Biology and Biochemistry* **46**:63-72.
- Delgado-Baquerizo M, Oliverio AM, Brewer TE, Benavent-González A, Eldridge DJ, Bardgett RD, Maestre FT, Singh BK, Fierer N. 2018. A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science* **359**(6373):320-325.
- Drábek O, Borůvka L, Pavlů L, Nikodem A, Pírková I, Vacek O. 2007. Grass cover on forest clear-cut areas ameliorates some soil chemical properties. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **101**(9):1224-1233.
- Drenovsky RE, Vo D, Graham KJ, Scow KM. 2004. Soil Water Content and Organic Carbon Availability Are Major Determinants of Soil Microbial Community Composition. *Microbial Ecology* **48**(3):424-430.
- Drever JI, Stillings LL. 1997. The role of organic acids in mineral weathering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **120**(1-3):167-181.
- Eilers KG, Debenports S, Anderson S, Fierer N. 2012. Digging deeper to find unique microbial communities: The strong effect of depth on the structure of bacterial and archaeal communities in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **50**:58-65.
- Ellis RJ, Morgan P, Weightman AJ, Fry JC. 2003. Cultivation-Dependent and -Independent Approaches for Determining Bacterial Diversity in Heavy-Metal-Contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(6):3223-3230.
- Epelde L, Lanzén A, Blanco F, Urich T, Garbisu C. 2015. Adaptation of soil microbial community structure and function to chronic metal contamination at an abandoned Pb-Zn mine. *FEMS Microbiology Ecology* **91**(1):1-11.
- Ettler V, Vrtišková R, Mihaljevič M, Šebek O, Grygar T, Drahotka P. 2009. Cadmium, lead and zinc leaching from smelter fly ash in simple organic acids—Simulators of rhizospheric soil solutions. *Journal of Hazardous Materials* **170**(2-3):1264-1268.
- Facchinelli A, Sacchi E, Mallen L. 2001. Multivariate statistical and GIS-based approach to identify heavy metal sources in soils. *Environmental Pollution* **114**(3):313-324.

- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2014. World reference base for soil resources 2014: International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. FAO, Rome.
- Fierer N, Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(3):626-631.
- Fierer N, Schimel JP, Holden PA. 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry* **35**(1):167-176.
- Frey SD, Knorr M, Parrent JL, Simpson RT. 2004. Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *Forest Ecology and Management* **196**(1):159-171.
- Fritze H, Pietikäinen J, Pennanen T. 2000. Distribution of microbial biomass and phospholipid fatty acids in Podzol profiles under coniferous forest. *European Journal of Soil Science* **51**(4): 565-573.
- Gadd GM. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* **156**(3):609-643.
- Galván-Arzate S, Santamaría A. 1998. Thallium toxicity. *Toxicology Letters* **99** (1):1-13.
- Garrido F, Garcia-Guinea J, Lopez-Arce P, Voegelin A, Göttlicher J, Mangold S, Almendros G. 2020. Thallium and co-genetic trace elements in hydrothermal Fe-Mn deposits of Central Spain. *Science of The Total Environment* (e 137162) DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.137162.
- Gee GW, Bauder JW. 1986. Particle-size analysis. Pages 383-411 in Klute A, editor. *Methods of Soil Analysis. Part I: Physical and Mineralogical Methods*. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison - WI, USA.
- Gelsomino A, Azzellino A. 2011. Multivariate analysis of soils: microbial biomass, metabolic activity, and bacterial-community structure and their relationships with soil depth and type. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **174**(3):381-394.
- Giller KE, Witter E, McGrath SP. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* **30**(10-11):1389-1414.
- Girvan MS, Bullimore J, Pretty JN, Osborn AM, Ball AS. 2003. Soil Type Is the Primary Determinant of the Composition of the Total and Active Bacterial Communities in Arable Soils. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(3):1800-1809.
- Gloennec P, Lucas JP, Mercat AC, Roudot AC, Le Bot B. 2016. Environmental and dietary exposure of young children to inorganic trace elements. *Environment International* **97**:28-36.
- Gomez-Gonzalez MA, Garcia-Guinea J, Laborda F, Garrido F. 2015. Thallium occurrence and partitioning in soils and sediments affected by mining activities in Madrid province (Spain). *Science of The Total Environment* **536**:268-278.
- Greenwood NN, Earnshaw A. 1993. *Chemie prvku. Informatorium*. Praha.

Gremion F, Chatzinotas A, Harms H. 2003. Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicates that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environmental Microbiology* **5**:896-907.

Grösslová Z, et al. 2015. Bioaccumulation of thallium in a neutral soil as affected by solid-phase association. *Journal of Geochemical Exploration* **159**:208-212.

Gu Y, Van Nostrand JD, Wu L, He Z, Qin Y, Zhao FJ, Zhou J, Smidt H. 2017. Bacterial community and arsenic functional genes diversity in arsenic contaminated soils from different geographic locations. *PLOS ONE* **12**(5).

Guo H, Nasir M, Lv J, Dai Y, Gao J. 2017. Understanding the variation of microbial community in heavy metals contaminated soil using high throughput sequencing. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **144**:300-306.

Hartmann M, Niklaus PA, Zimmermann S, Schmutz S, Kremer J, Abarenkov K, Lüscher P, Widmer F, Frey B. 2014. Resistance and resilience of the forest soil microbiome to logging-associated compaction. *The ISME Journal* **8**(1):226-244.

Herrmann J, Voegelin A, Palatinus L, Mangold S, Majzlan J. 2018. Secondary Fe–As–Tl mineralization in soils near Buus in the Swiss Jura Mountains. *European Journal of Mineralogy* **30**(5):887-898.

Huang WH, Keller WD. 1972. Organic Acids as Agents of Chemical Weathering of Silicate Minerals. *Nature Physical Science* **239**(96):149-151.

Chander K, Joergensen RG. 2008. Decomposition of Zn-rich *Arabidopsis halleri* Litter in Low and High Metal Soil in the Presence and Absence of EDTA. *Water Air and Soil Pollution* **188**:195-204.

Chen Y, Jiang Y, Huang H, Mou L, Ru J, Zhao J, Xiao S. 2018. Long-term and high-concentration heavy-metal contamination strongly influences the microbiome and functional genes in Yellow River sediments. *Science of The Total Environment* **637-638**:1400-1412.

Chodak M, Gołębiowski M, Morawska-Płoskonka, Kuduk K, Niklińska M. 2013. Diversity of microorganisms from forest soils differently polluted with heavy metals. *Applied Soil Ecology* **64**:7-14.

ISO 11260:1994. 1994. Soil Quality - Determination of Effective Cation Exchange Capacity and Base Saturation Level Using Barium Chloride Solution. International Organization of Standardization.

Jacobson AR, McBride MB, Baveye P, Steenhuis TS. 2005. Environmental factors determining the trace-level sorption of silver and thallium to soils. *Science of The Total Environment* **345**(1-3):191-205.

Jakubowska M, Pasiieczna A, Zembrzuski W, Świt Z, Lukaszewski Z. 2007. Thallium in fractions of soil formed on floodplain terraces. *Chemosphere* **66**(4):611-618.

Janssen PH. 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(3):1719-1728.

- Jastrow J. D, Miller RM. 1998a. Soil aggregate stabilization and carbon sequestration: Feedbacks through organomineral associations. Pages 207–223 in Lal R, Kimble JM, Follett RF, Stewart BA, editors. Soil Processes and the Carbon Cycle. CRC Press, Boca Raton,
- Jastrow JD, Miller RM, Lussenhop J. 1998b. Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregate stabilization in restored prairie. *Soil Biology and Biochemistry* **30**(7):905-916.
- Jia Y, Xiao T, Sun J, Yang F, Baveye PC. 2018. Microcolumn-based speciation analysis of thallium in soil and green cabbage. *Science of The Total Environment* **630**:146-153.
- Jiang HH, Cai LM, Wen HH, Luo J. 2020. Characterizing pollution and source identification of heavy metals in soils using geochemical baseline and PMF approach. *Scientific Reports* **10**(1).
- Jiang J, Wu L, Li N, Luo Y, Liu L, Zhao Q, Zhang L, Christie P. 2010. Effects of multiple heavy metal contamination and repeated phytoextraction by *Sedum plumbizincicola* on soil microbial properties. *European Journal of Soil Biology* **46**(1):18-26.
- Karbowska B, Zembrzuski W, Jakubowska M, Wojtkowiak T, Pasieczna A, Lukaszewski Z. 2014. Translocation and mobility of thallium from zinc–lead ores. *Journal of Geochemical Exploration*, **143**:127-135.
- Karbowska B. 2016. Presence of thallium in the environment: sources of contaminations, distribution and monitoring methods. *Environmental Monitoring and Assessment* **188**:640.
- Karlsson U. 2006. Environmental levels of thallium - Influence of redox properties and anthropogenic sources. DocuSys, V Frölunda, 2/2006.
- Kazantzis G. 2000. Thallium in the Environment and Health Effects. *Environmental Geochemistry and Health* **22**(4):275-280.
- Kennedy AC. 1999. Bacterial diversity in agroecosystems. Pages 65-76 in Paoletti MG, editor. *Invertebrate Biodiversity as Bioindicators of Sustainable Landscapes: Practical Use of Invertebrates to Assess Sustainable Land Use*. Elsevier Science.
- Kennedy VH, Sanchez AL, Oughton DH, Rowland APOD. 1997. Use of Single and Sequential Chemical Extractants to Assess Radionuclide and Heavy Metal Availability From Soils for Root Uptaken. *Analyst* **122**(8):89R-100R.
- Kersten M, Xiao T, Kreissig K, Brett A, Coles BJ, Rehkämper M. 2014. Tracing Anthropogenic Thallium in Soil Using Stable Isotope Compositions. *Environmental Science & Technology* **48**(16):9030-9036.
- Krause L, Biesgen D, Treder A, Schweizer SA, Klumpp E, Knief C, Siebers N. 2019. Initial microaggregate formation: Association of microorganisms to montmorillonite-goethite aggregates under wetting and drying cycles. *Geoderma* **351**:250-260.
- Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. 2009. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(15):5111-5120.

- Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA, Fierer N. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry* **40**(9):2407-2415.
- Lazo DE, Dyer LG, Alorro RD. 2017. Silicate, phosphate and carbonate mineral dissolution behaviour in the presence of organic acids: A review. *Minerals Engineering* **100**:115-123.
- Li J, Hu HW, Ma YB, Wang JT, Liu YR, He JZ. 2015. Long-term nickel exposure altered the bacterial community composition but not diversity in two contrasting agricultural soils. *Environmental Science and Pollution Research* **22**(14):10496-10505.
- Linhart I. 2014. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Praha.
- Lis J, Pasieczna A, Karbowska B, Zembrzuski W, Lukaszewski Z. 2003. Thallium in Soils and Stream Sediments of a Zn–Pb Mining and Smelting Area. *Environmental Science & Technology* **37**(20):4569-4572.
- Liu H, Wang C, Xie Y, Luo Y, Sheng M, Xu F, Xu H. 2020. Ecological responses of soil microbial abundance and diversity to cadmium and soil properties in farmland around an enterprise-intensive region. *Journal of Hazardous Materials* **392** (e122478) DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122478.
- Liu J, et al. 2016. Thallium transformation and partitioning during Pb–Zn smelting and environmental implications. *Environmental Pollution* **212**:77-89.
- Liu J, et al. 2018. Geochemical dispersal of thallium and accompanying metals in sediment profiles from a smelter-impacted area in South China. *Applied Geochemistry* **88**:239-246.
- Liu J, et al. 2019a. Response of microbial communities and interactions to thallium in contaminated sediments near a pyrite mining area. *Environmental Pollution* **248**:916-928.
- Liu J, et al. 2019b. Thallium pollution in China and removal technologies for waters: A review. *Environment International* **126**:771-790.
- Liu J, Luo X, Wang J, Xiao T, Chen D, Sheng G, Yin M, Lippold H, Wang C, Chen Y. 2017. Thallium contamination in arable soils and vegetables around a steel plant-A newly-found significant source of Tl pollution in South China. *Environmental Pollution* **224**:445-453.
- Liu J, Wang J, Chen Y, Qi J, Lippold H, Wang C. 2010. Thallium Distribution in Sediments from the Pearl River Basin, China. *CLEAN - Soil, Air, Water* **38**(10):909-915.
- López-Antón MA, Spears DA, Díaz-Somoano M, Martínez Tarazona MR. 2013. Thallium in coal: Analysis and environmental implications. *Fuel* **105**:13-18.
- Lukaszewski Z, Jakubowska M, Zembrzuski W. 2018. The mobility of thallium from bottom soil of the Silesian-Cracowian zinc-lead ore deposit region (Poland). *Journal of Geochemical Exploration* **184**:11-16.
- Madrova P, Vetrovsky T, Omelka M, Grunt M, Smutna Y, Rapoport D, Vach M, Baldrian P, Kopecky J, Sagova-Mareckova M. 2018. A Short-Term Response of Soil Microbial

Communities to Cadmium and Organic Substrate Amendment in Long-Term Contaminated Soil by Toxic Elements. *Frontiers in Microbiology* **9**:2807.

Margesin R, Płaza GA, Kasenbacher S. 2011. Characterization of bacterial communities at heavy-metal-contaminated sites. *Chemosphere*, **82**(11):1583-1588.

Martín F, García I, Dorronsoro C, Simón M, Aguilar J, Ortíz I, Fernández E, Fernández J. 2010. Thallium Behavior in Soils Polluted by Pyrite Tailings (Aznalcóllar, Spain). *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* **13**(1):25-36.

Martin LA, Loič A, Wissocq A, Benedetti MF, Latrille Ch. 2018. Thallium (Tl) sorption onto illite and smectite: Implications for Tl mobility in the environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **230**:1-16.

Ministerstvo zemědělství. 1998. Vyhláška Ministerstva zemědělství ze dne 12. listopadu 1998 o agrochemickém zkoušení zemědělských půd a zjišťování půdních vlastností lesních pozemků vlastností lesních pozemků. Pges 8332-8360 in *Sbírka zákonů České republiky*, 1998, částka 97. Česká republika.

Mitchell RJ, Hester AJ, Campbell CD, Chapman SJ, Cameron CM, Hewison RL, Potts JM. 2010. Is vegetation composition or soil chemistry the best predictor of the soil microbial community?. *Plant and Soil*, **333**(1-2):417-430.

Muhlbachova G, Sagova-Mareckova M, Omelka M, Szakova J, Tlustos P. 2015. The influence of soil organic carbon on interactions between microbial parameters and metal concentrations at a long-term contaminated site. *Science of The Total Environment* **502**:218-223.

Naether A, et al. 2012. Environmental Factors Affect Acidobacterial Communities below the Subgroup Level in Grassland and Forest Soils. *Applied and Environmental Microbiology* **78**:7398-7406.

Nannipieri P, Ascher-Jenull J, Ceccherini MT, Pietramellara G, Renella G, Schloter M. 2020. Beyond microbial diversity for predicting soil functions: A mini review. *Pedosphere* **30**(1):5-17.

Narwal RP, Singh BR, Salbu B. 1999. Association of cadmium, zinc, copper, and nickel with components in naturally heavy metal-rich soils studied by parallel and sequential extractions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **30**(7,8):1209-1230.

Nies DH. 2000. Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH₃₄. *Extremophiles* **4**(2):77-82.

Nriagu, JO. 1998. *Thallium in the Environment*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA.

Olaniran A, Balgobind A, Pillay B. 2013. Bioavailability of Heavy Metals in Soil: Impact on Microbial Biodegradation of Organic Compounds and Possible Improvement Strategies. *International Journal of Molecular Sciences* **14**(5):10197-10228.

Pansu M, Gautheyrou J. 2006. *Handbook of Soil Analysis: Mineralogical, Organic and Inorganic Methods*. Springer - Verlag Berlin Heidelberg. Berlin.

- Park JH, Lamb D, Paneerselvam P, Choppala G, Bolan N, Chung J-W. 2011. Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* **185**(2-3):549-574.
- Patrmanová T. 2019. Geny sekundárního metabolismu v půdních bakteriálních společenstvech [MSc. Thesis]. Univerzita Karlova, Praha.
- Paulo A, Bojakowska I, Pasieczna A. 2007. Thallium in Brown and Hard Coals of Poland. Supplement 767. 17th Annual Goldschmidt Conference. Cologne, Germany.
- Pavličková J, Zbírál J, Smatanová M, Habarta P, Houserová P, Kubáň V. 2006. Uptake of thallium from naturally-contaminated soils into vegetables. *Food Additives and Contaminants* **23**(5):484-491.
- Peacock CL, Moon EM. 2012. Oxidative scavenging of thallium by birnessite: Explanation for thallium enrichment and stable isotope fractionation in marine ferromanganese precipitates. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **84**:297-313.
- Perotti M, Petrini R, D'orazio M, Ghezzi L, Giannecchini R, Vezzoni S. 2018. Thallium and Other Potentially Toxic Elements in the Baccatoio Stream Catchment (Northern Tuscany, Italy) Receiving Drainages from Abandoned Mines. *Mine Water and the Environment* **37**(3):431-441.
- Peter JAL, Viraraghavan T. 2005. Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Environment International* **31**(4):493-501.
- Rader ST, Mazdab FK, Barton MD. 2018. Mineralogical thallium geochemistry and isotope variations from igneous, metamorphic, and metasomatic systems. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **243**:42-65.
- Ralph L, Twiss MR. 2002. Comparative Toxicity of Thallium(I), Thallium(III), and Cadmium(II) to the Unicellular Alga Isolated from Lake Erie. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **68**(2):0261-0268.
- Rasool A, Nasim W, Xiao T, Ali W, Shafeeque M, Sultana SR, Fahad S, Munis MFH, Chaudhary HV. 2020. Microbial diversity response in thallium polluted riverbank soils of the Lanmuchang. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **187**:109854.
- Rasool A, Xiao T. 2018. Response of microbial communities to elevated thallium contamination in river sediments. *Geomicrobiology Journal* **35**(10):854-868.
- Rauret G, et al. 2000. Application of a modified BCR sequential extraction (three-step) procedure for the determination of extractable trace metal contents in a sewage sludge amended soil reference material (CRM 483), complemented by a three-year stability study of acetic acid and EDTA extractable metal content. *Journal of Environmental Monitoring* **2**(3):228-233.
- Rejšek K, Vácha R. 2018. *Nauka o půdě*. Agriprint, Olomouc.
- Rousk J, Rousk K. 2018. Responses of microbial tolerance to heavy metals along a century-old metal ore pollution gradient in a subarctic birch forest. *Environmental Pollution* **240**:297-305.

- Sagova-Mareckova M, Cermak L, Novotna J, Plhackova K, Forstova J, Kopecky J. 2008. Innovative Methods for Soil DNA Purification Tested in Soils with Widely Differing Characteristics. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(9):2902-2907.
- Sagova-Mareckova M, et al. 2016. The structure of bacterial communities along two vertical profiles of a deep colluvial soil. *Soil Biology and Biochemistry* **101**:65-73.
- Salehi MH, HASHEMI BENI O, BEIGI HARCHEGANI H, Esfandiarpour I, Motaghian HR. 2011. Refining Soil Organic Matter Determination by Loss-on-Ignition. *Pedosphere* **21**(4):473-482.
- Samec P, Formánek P. 2007. *Mikrobiologie lesních půd. Lesnická práce, Kostelec nad Černými lesy.*
- Sheik CS, Mitchell TW, Rizvi FZ, Rehman Y, Faisal M, Hasnain S, McInerney MJ, Krumholz LR. 2012. Exposure of Soil Microbial Communities to Chromium and Arsenic Alters Their Diversity and Structure. *PLoS ONE* **7** (e40059) DOI: 10.1371/journal.pone.0040059.
- Schedlbauer OF, Heumann KG. 2000. Biomethylation of Thallium by Bacteria and First Determination of Biogenic Dimethylthallium in the Ocean. *Applied Organometallic Chemistry* **14**:330-340.
- Schippers A, Breuker A, Blazejak A, Bosecker K, Kock D, Wright TL. 2010. The biogeochemistry and microbiology of sulfidic mine waste and bioleaching dumps and heaps, and novel Fe(II)-oxidizing bacteria. *Hydrometallurgy* **104**(3-4):342-350.
- Six J, Paustian K. 2014. Aggregate-associated soil organic matter as an ecosystem property and a measurement tool. *Soil Biology and Biochemistry* **68**:A4-A9.
- Spears, DA, Tewalt SJ. 2009. The geochemistry of environmentally important trace elements in UK coals, with special reference to the Parkgate coal in the Yorkshire–Nottinghamshire Coalfield, UK. *International Journal of Coal Geology* **80**(3-4):157-166.
- Stefanowicz AM, Kapusta P, Zubek S, Stanek M, Woch MW. 2020. Soil organic matter prevails over heavy metal pollution and vegetation as a factor shaping soil microbial communities at historical Zn–Pb mining sites. *Chemosphere* **240**.
- Stefanowicz AM, Niklińska M, Kapusta P, Szarek-Łukaszewska G. 2010. Pine forest and grassland differently influence the response of soil microbial communities to metal contamination. *Science of The Total Environment* **408**(24):6134-6141.
- Sterckeman T, Douay F, Proix N, Fourrier H. 2000. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution* **107**(3):377-389.
- Sun J, Zou X, Ning Z, Sun M, Peng J, Xiao T. 2012. Culturable microbial groups and thallium-tolerant fungi in soils with high thallium contamination. *Science of The Total Environment* **441**: 258-264.
- Šimek M, et al. 2019. *Živá půda. Academia, Praha.*
- Tisdall JM, Oades JM. 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *Journal of Soil Science* **33**(2):141-163.

- Torsvik V, Øvreås L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* **5**(3):240-245.
- Totsche KU, et al. 2018. Microaggregates in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **181**(1):104-136.
- Tremel A, Masson P, Sterckeman T, Baize D, Mench M. 1997b. Thallium in French agrosystems—I. Thallium contents in arable soils. *Environmental Pollution* **95**(3):293-302.
- Tsezos M. 2009. Metal - Microbes Interactions: beyond Environmental Protection. *Advanced Materials Research* **71-73**:527-532.
- Tyler G, Olsson T. 2006. The importance of atmospheric deposition, charge and atomic mass to the dynamics of minor and rare elements in developing, ageing, and wilted leaves of beech (*Fagus sylvatica* L.). *Chemosphere* **65**(2):250-260.
- Tyler G. 2004. Ionic charge, radius, and potential control root/soil concentration ratios of fifty cationic elements in the organic horizon of a beech (*Fagus sylvatica*) forest podzol. *Science of The Total Environment* **329**(1-3):231-239.
- U.S. EPA. 2009. Toxicological review of thallium and compounds. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. Available from: www.https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/1012tr.pdf
- Upton RN, Bach EM, Hofmockel KM. 2019. Spatio-temporal microbial community dynamics within soil aggregates. *Soil Biology and Biochemistry* **132**:58-68.
- Vaněk A, et al. 2016. Isotopic Tracing of Thallium Contamination in Soils Affected by Emissions from Coal-Fired Power Plants. *Environmental Science & Technology* **50**(18):9864-9871.
- Vaněk A, et al. 2018. Thallium isotopes in metallurgical wastes/contaminated soils: A novel tool to trace metal source and behavior. *Journal of Hazardous Materials* **343**:78-85.
- Vaněk A, Grygar T, Chrástný V, Tejnecký V, Dražota P, Komárek M. 2010a. Assessment of the BCR sequential extraction procedure for thallium fractionation using synthetic mineral mixtures. *Journal of Hazardous Materials* **176**(1-3):913-918.
- Vaněk A, Chrástný V, Komárek M, Galušková I, Dražota P, Grygar T, Tejnecký V, Drábek O. 2010b. Thallium dynamics in contrasting light sandy soils—Soil vulnerability assessment to anthropogenic contamination. *Journal of Hazardous Materials* **173**(1-3):717-723.
- Vaněk A, Chrástný V, Komárek M, Penížek V, Teper L, Cabala J, Drábek O. 2013a. Geochemical position of thallium in soils from a smelter-impacted area. *Journal of Geochemical Exploration* **124**:176-182.
- Vaněk A, Chrástný V, Mihaljevič M, Dražota P, Grygar T, Komárek M. 2009. Lithogenic thallium behavior in soils with different land use. *Journal of Geochemical Exploration* **102**(1): 7-12.

- Vaněk A, Chrastný V, Teper L, Cabala J, Penížek V, Komárek M. 2011. Distribution of thallium and accompanying metals in tree rings of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) from a smelter-affected area. *Journal of Geochemical Exploration* **108**(1):73-80.
- Vaněk A, Komárek M, Chrastný V, Galušková I, Mihaljevič M, Šebek O, Drahota P, Tejnecký V, Vokurková P. 2012. Effect of low-molecular-weight organic acids on the leaching of thallium and accompanying cations from soil – A model rhizosphere solution approach. *Journal of Geochemical Exploration* **112**: 212-217.
- Vaněk A, Mihaljevič M, Galušková I, Chrastný V, Komárek M, Penížek V, Zádorová T, Drábek O. 2013b. Phase-dependent phytoavailability of thallium – A synthetic soil experiment. *Journal of Hazardous Materials* **250-251**: 265-271
- Voegelin A, Pfenninger N, Petrikis J, Majzlan J, Plötze M, Senn A-C, Mangold S, Steininger R, Göttlicher J. 2015. Thallium Speciation and Extractability in a Thallium- and Arsenic-Rich Soil Developed from Mineralized Carbonate Rock. *Environmental Science & Technology* **49**(9):5390-5398.
- Wang J, et al. 2020. Microbial insights into the biogeochemical features of thallium occurrence: A case study from polluted river sediments. *Science of The Total Environment* **739**.
- Wang X, Li Q, Hu H, Zhang T, Zhou Y. 2005. Dissolution of kaolinite induced by citric, oxalic, and malic acids. *Journal of Colloid and Interface Science* **290**(2):481-488.
- Wei X, Zhou Y, Tsang DCW, Song L, Zhang Ch, Yin M, Liu J, Xiao T, Zhang G, Wang J. 2019. Hyperaccumulation and transport mechanism of thallium and arsenic in brake ferns (*Pteris vittata* L.): A case study from mining area. *Journal of Hazardous Materials*. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304389419317108>
- Williams MA, Rice CW. 2007. Seven years of enhanced water availability influences the physiological, structural, and functional attributes of a soil microbial community. *Applied Soil Ecology* **35**(3): 535-545.
- Wu M, et al. 2019. Prenatal exposure to thallium is associated with decreased mitochondrial DNA copy number in newborns: Evidence from a birth cohort study. *Environment International* **129**:470-477.
- Xia W, et al. 2016. A Case–Control Study of Prenatal Thallium Exposure and Low Birth Weight in China. *Environmental Health Perspectives* **124**(1):164-169.
- Xiao T, Guha J, Boyle D, Liu C-Q, Zheng B, Wilson GC, Rouleau A, Chen J. 2004. Naturally occurring thallium: a hidden geoenvironmental health hazard?. *Environment International* **30**(4):501-507.
- Xiong Y. 2007. Hydrothermal thallium mineralization up to 300 °C: A thermodynamic approach. *Ore Geology Reviews* **32**(1-2):291-313.
- Yang C, Chen Y, Peng P, Chang X, Xie C. 2005. Distribution of natural and anthropogenic thallium in the soils in an industrial pyrite slag disposing area. *Science of Total Environment* **341**:159–172.

Yang C, Chen Y, Peng P, Li C, Chang X, Wu Y. 2009. Trace element transformations and partitioning during the roasting of pyrite ores in the sulfuric acid industry. *Journal of Hazardous Materials* **167**(1-3):835-845.

Yin H, et al. 2015. An integrated insight into the response of sedimentary microbial communities to heavy metal contamination. *Scientific Reports* **5**(1).

You Y, Wang J, Huang X, Tang Z, Liu S, Sun OJ. 2014. Relating microbial community structure to functioning in forest soil organic carbon transformation and turnover. *Ecology and Evolution* **4**(5):633-647.

9 Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obrázek 1: Vyznačení zájmové lokality a místa odběru vzorků z půdních profilů louky (M) a lesu (F) na mapě, zdroj: Aleš Vaněk..... | 17 |
| Obrázek 2: Studované půdní profily - louka (vlevo), les (vpravo) včetně konkrétního zakreslení půdních horizontů (Oe - organický, Ah - organominerální, Bw - kambický, C - půdotvorný substrát), zdroj: Aleš Vaněk..... | 17 |
| Obrázek 3: Podíl jílové frakce, aktivní ($\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$) a výměnná (pH_{KCl}) půdní reakce v lučním (vlevo) a lesním (vpravo) půdním profilu..... | 28 |
| Obrázek 4: Celkový obsah uhlíku (TC), síry (TS) a kationtová výměnná kapacita (CEC) naměřená ve vzorcích luční (vlevo) a lesní půdy (vpravo)..... | 29 |
| Obrázek 5: Koncentrace oxalátem extrahovatelných frakcí Fe (Fe_{ox}), Mn (Mn_{ox}), Al (Al_{ox}) v půdním profilu louky (vlevo) a lesním půdním profilu (vpravo) | 29 |
| Obrázek 6: Celkový obsah Tl (Tl_{tot}) v lučním (vlevo) a lesním (vpravo) půdním profilu | 30 |
| Obrázek 7: Podíl zastoupení jednotlivých frakcí Tl v půdním profilu louky (dle metody BCR) | 31 |
| Obrázek 8: Podíl zastoupení jednotlivých frakcí Tl v lesním půdním profilu (dle metody BCR) | 32 |
| Obrázek 9: Celkový obsah Tl (Tl_{celk}) a podíl organické hmoty v půdních agregátech napříč lučním půdním profilem | 34 |
| Obrázek 10: Celkový obsah Tl (Tl_{celk}) a podíl organické hmoty v půdních agregátech napříč lesním půdním profilem..... | 35 |
| Obrázek 11: Elektroforetická separace nepurifikované DNA v agarózovém gelu..... | 36 |
| Obrázek 12: Kontrolní elektroforetický gel s DNA opakovaných vzorků | 37 |
| Obrázek 13:Kontrolní elektroforetický gel PCR produktů..... | 38 |
| Obrázek 14: Elektroforetická separace PCR produktů s komponenty GoTaq a TaKaRa v agarózovém gelu | 38 |
| Obrázek 15: Elektroforetická separace výsledku PCR reakce s komponenty GoTaq (vlevo) a AccuPrime (vpravo) v agarózovém gelu | 39 |
| Obrázek 16: Elektroforetická separace amplikonů vzniklých z reakční směsi s AccuPrime komponenty v agarózovém gelu | 39 |
| Obrázek 17: Podíl zastoupení archaeálních a bakteriálních kmenů ve společenstvu obou půdních profilů..... | 41 |
| Obrázek 18: Podíl zastoupení taxonů kmene Verrucomicrobia na úrovni čeledi v obou půdních profilech | 41 |
| Obrázek 19: Podíl zastoupení taxonů kmene Actinobacteria na úrovni čeledi v obou půdních profilech | 42 |

| | |
|---|----|
| Obrázek 20: Podíl zastoupení taxonů kmene Acidobacteria na úrovni čeledi v obou půdních profilech..... | 43 |
| Obrázek 21: Podíl zastoupení taxonů kmene Firmicutes na úrovni čeledi v obou půdních profilech..... | 43 |
| Obrázek 22: Rarefakční křivky. Stanovená archaeální a bakteriální diverzita dle počtu OTU v půdních horizontech v závislosti na prosekvenovanosti vzorku (luční profil - vlevo; lesní profil - vpravo)..... | 45 |
| Obrázek 23: NMDS graf - ordinační diagram pro luční profil..... | 46 |
| Obrázek 24: NMDS graf - ordinační diagram pro lesní profil | 46 |

10 Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| Tabulka 1: Přesná lokalizace odběrových míst půdních vzorků | 17 |
| Tabulka 2: Seznam použitých chemikálií pro mikrobiologickou část..... | 18 |
| Tabulka 3: Seznam použitých médií a pufrů | 19 |
| Tabulka 4: Název a sekvence použitých primerů | 19 |
| Tabulka 5: Složení reakční směsi pro PCR s komponenty sady GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase..... | 23 |
| Tabulka 6: Složení reakční směsi pro PCR s komponenty sady TaKaRa Taq™ | 24 |
| Tabulka 7: Složení reakční směsi pro PCR s komponenty sady AccuPrime™ Taq DNA Polymerase System..... | 25 |
| Tabulka 8: Protokol PCR reakce s AccuPrime™ Taq DNA Polymerase | 25 |
| Tabulka 9: Post hoc test Kruskal-Wallisova testu (Vícenásobné porovnání p hodnot - celkový obsah Tl v lučním profilu) - červeně zvýrazněn statisticky významný rozdíl..... | 33 |
| Tabulka 10: Post hoc test Kruskal-Wallisova testu (Vícenásobné porovnání p hodnot - podíl organické hmoty v lučním profilu) - červeně zvýrazněn statisticky významný rozdíl..... | 33 |
| Tabulka 11: Post hoc test Kruskal-Wallisova testu (Vícenásobné porovnání p hodnot - celkový obsah Tl v lesním profilu) - červeně zvýrazněn statisticky významný rozdíl | 34 |
| Tabulka 12: Post hoc test Kruskal-Wallisova testu (Vícenásobné porovnání p hodnot - podíl organické hmoty v lesním profilu) - červeně zvýrazněn statisticky významný rozdíl | 35 |
| Tabulka 13: Výsledné hodnoty koncentrace DNA naměřené spektrofotometrem u vybraných vzorků | 37 |

11 Seznam příloh

| | |
|---|------|
| Příloha 1: Hmotnost půdních agregátů pro analýzu rozkladu vzorků a stanovení organické hmoty ztrátou žíháním, podíl organické hmoty a celkový obsah Tl v půdních agregátech lučního půdního profilu | I |
| Příloha 2: Hmotnost půdních agregátů pro analýzu rozkladu vzorků a stanovení organické hmoty ztrátou žíháním, podíl organické hmoty a celkový obsah Tl v půdních agregátech lesního půdního profilu | II |
| Příloha 3: Hmotnost půdních agregátů z lučního profilu určených pro extrakci DNA | III |
| Příloha 4: Hmotnost půdních agregátů z lesního profilu určených pro extrakci DNA..... | IV |
| Příloha 5: Výsledky měření celkové koncentrace Tl, mobilizovatelné/výměnné Tl frakce (1 M NH_4NO_3) a oxalátem extrahovatelné Tl frakce v půdních horizontech..... | V |
| Příloha 6: Podílové zastoupení operačně definovaných Tl frakcí stanovených metodou modifikované BCR sekvenční extrakce dle Rauret et al. (2000)..... | VI |
| Příloha 7: Výstupy z programu Statistica 12 - post hoc test Kruskal-Wallisova testu/ANOVA - vícenásobné oboustranné porovnání p hodnot pro zjištění shody \times rozdílu mezi jednotlivými půdními horizonty (z hlediska závisle proměnné) půdního profilu louky..... | VI |
| Příloha 8: Výstupy z programu Statistica 12 - post hoc testy Kruskal-Wallisova testu/ANOVA - vícenásobné oboustranné porovnání p hodnot pro zjištění shody \times rozdílu mezi jednotlivými půdními horizonty (z hlediska závisle proměnné) lesního půdního profilu | IX |
| Příloha 9: Mann-Whitneyův U test pro porovnání fyzikálně-chemických hodnot obou půdních profilů..... | XII |
| Příloha 10: Výsledky statistické analýzy NMDS pro luční půdní profil | XIII |
| Příloha 11: Výsledky statistické analýzy NMDS pro lesní půdní profil..... | XIV |
| Příloha 12: Zastoupení dominantních bakteriálních rodů v obou půdních profilech | XV |
| Příloha 13: Fyzikálně-chemické charakteristiky obou studovaných půdních profilů..... | XVI |
| Příloha 14: Obsahy vybraných prvků stanovených v půdních agregátech | XVII |

12 Seznam použitých zkratek a symbolů

| | |
|--------------------|--|
| 16S rRNA | gen kódující část malé ribozomální podjednotky prokaryot |
| Ah | organominerální půdní horizont |
| Al _{ox} | oxalátem extrahovatelný Al |
| As | arsen |
| Bw | kambický půdní horizont |
| C (horizont) | půdotvorný substrát (rozložená matečná hornina) |
| Cd | kadmium |
| CEC | kationtová výměnná kapacita |
| Cr | chrom |
| Cu | měď |
| d _{H2O} | destilovaná voda |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| Eh | redoxní potenciál |
| ev. | eventuálně |
| Fe _{ox} | oxalátem extrahovatelné Fe |
| Hg | rtuť |
| Mn _{ox} | oxalátem extrahovatelný Mn |
| Oe | organický půdní horizont |
| OTU | operačně taxonomická jednotka |
| Pb | olovo |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| pH _{H2O} | aktivní půdní reakce |
| pH _{KCl} | výměnná půdní reakce |
| TC | celkový obsah uhlíku |
| TIC | celkový obsah anorganického uhlíku |
| Tl | thallium |
| Tl _{celk} | celkový obsah Tl stanovený z půdního agregátu |
| Tl _{ex} | mobilizovatelná/výměnná Tl frakce stanovená 1 M NH ₄ NO ₃ |
| Tl _{ox} | oxalátem extrahovatelné Tl |
| Tl _{tot} | celkový obsah Tl v daném půdním horizont stanovený ze vzorků homogenizované půdy |
| TS | celkový obsah síry |
| Zn | zinek |

13 Samostatné přílohy

Příloha 1: Hmotnost půdních agregátů pro analýzu rozkladu vzorků a stanovení organické hmoty ztrátou žiháním, podíl organické hmoty a celkový obsah TI v půdních agregátech lučního půdního profilu

| Půdní horizont | Hloubka odběru vzorku [cm] | Číslo vzorku | Opakování vzorku | Hmotnost agregátu před ztrátou žiháním [g] | Podíl organické hmoty [%] | Hmotnost agregátu pro rozklad vzorků [g] | TI _{celk} [mg.kg ⁻¹] |
|----------------|----------------------------|--------------|------------------|--|---------------------------|--|---|
| Oe | 1-0 | 2 | a | 0,1965 | 16,0305 | 0,1921 | 1065,8575 |
| | 1-0 | 2 | b | 0,1513 | 14,2102 | 0,1814 | 953,8785 |
| | 1-0 | 2 | c | 0,118 | 14,6610 | 0,302 | 977,1267 |
| | 1-0 | 2 | d | 0,1167 | 13,3676 | 0,1323 | 1109,4744 |
| | 1-0 | 2 | e | 0,2755 | 14,8820 | 0,2633 | 989,9628 |
| Ah | 0-5 | 3 | a | 0,168 | 13,2738 | 0,1439 | 1100,1386 |
| | 0-5 | 3 | b | 0,1163 | 14,3594 | 0,1118 | 1117,2921 |
| | 0-5 | 3 | c | 0,121 | 13,2231 | 0,134 | 1059,6437 |
| | 0-5 | 3 | d | 0,1472 | 13,5190 | 0,1076 | 1089,7225 |
| | 0-5 | 3 | e | 0,187 | 12,5668 | 0,156 | 1080,7153 |
| Bw | 5-10 | 4 | a | 0,1353 | 10,7908 | 0,1487 | 1127,5955 |
| | 5-10 | 4 | b | 0,1002 | 11,8762 | 0,1228 | 1113,1379 |
| | 5-10 | 4 | c | 0,1718 | 12,2235 | 0,1946 | 1138,0872 |
| | 5-10 | 4 | d | 0,141 | 12,6950 | 0,124 | 1137,0467 |
| | 5-10 | 4 | e | 0,1452 | 13,2920 | 0,1282 | 1177,3559 |
| Bw | 10-15 | 5 | a | 0,1464 | 10,6557 | 0,1105 | 1152,9644 |
| | 10-15 | 5 | b | 0,1458 | 11,1797 | 0,1232 | 1092,4217 |
| | 10-15 | 5 | c | 0,1298 | 11,2481 | 0,1253 | 1139,5785 |
| | 10-15 | 5 | d | 0,1133 | 9,9735 | 0,1506 | 1167,7199 |
| | 10-15 | 5 | e | 0,1224 | 11,0294 | 0,1244 | 1163,9490 |
| Bw | 15-20 | 6 | a | 0,1578 | 10,1394 | 0,1314 | 1136,3842 |
| | 15-20 | 6 | b | 0,1147 | 8,8928 | 0,1833 | 1274,2745 |
| | 15-20 | 6 | c | 0,1622 | 10,6042 | 0,1286 | 1146,2374 |
| | 15-20 | 6 | d | 0,1242 | 11,7552 | 0,1374 | 1145,6130 |
| | 15-20 | 6 | e | 0,1456 | 10,5769 | 0,1631 | 1120,4549 |
| Bw | 20-25 | 7 | a | 0,1759 | 8,9824 | 0,1341 | 1179,2920 |
| | 20-25 | 7 | b | 0,1034 | 8,1238 | 0,152 | 1173,3868 |
| | 20-25 | 7 | c | 0,1211 | 9,0834 | 0,1559 | 1224,2373 |
| | 20-25 | 7 | d | 0,1251 | 8,5532 | 0,1326 | 1138,5070 |
| | 20-25 | 7 | e | 0,1456 | 9,1346 | 0,2252 | 1177,6220 |
| C | >25 | 8 | a | 0,1201 | 9,4921 | 0,1376 | 1226,1183 |
| | >25 | 8 | b | 0,1197 | 10,8605 | 0,1433 | 1211,4316 |
| | >25 | 8 | c | 0,1052 | 9,0304 | 0,1775 | 1228,4160 |
| | >25 | 8 | d | 0,1565 | 10,6070 | 0,1341 | 1281,5652 |
| | >25 | 8 | e | 0,1007 | 10,7249 | 0,1339 | 1309,3181 |

Příloha 2: Hmotnost půdních agregátů pro analýzu rozkladu vzorků a stanovení organické hmoty ztrátou žiháním, podíl organické hmoty a celkový obsah Tl v půdních agregátech lesního půdního profilu

| Půdní horizont | Hloubka odběru vzorku [cm] | Číslo vzorku | Opakování vzorku | Hmotnost agregátu před ztrátou žiháním [g] | Podíl organické hmoty [%] | Hmotnost agregátu pro rozklad vzorků [g] | Tl_{celk} [mg.kg⁻¹] |
|-----------------------|-----------------------------------|---------------------|-------------------------|---|----------------------------------|---|---|
| Oe | 1-0 | 9 | a | 0,1087 | 32,6587 | 0,1112 | 827,6028 |
| | 1-0 | 9 | b | 0,0988 | 30,3644 | 0,2319 | 796,2063 |
| | 1-0 | 9 | c | 0,2056 | 15,4183 | 0,196 | 827,7414 |
| | 1-0 | 9 | d | 0,1264 | 13,7658 | 0,5638 | 490,1846 |
| | 1-0 | 9 | e | 0,1924 | 16,3202 | 0,1547 | 959,8299 |
| Ah | 0-5 | 10 | a | 0,1328 | 13,0271 | 0,1403 | 852,9511 |
| | 0-5 | 10 | c | 0,1166 | 15,9527 | 0,1165 | 875,7219 |
| | 0-5 | 10 | d | 0,1588 | 15,6089 | 0,1235 | 867,7664 |
| | 0-5 | 10 | e | 0,1343 | 13,4761 | 0,1438 | 842,5218 |
| Bw | 5-10 | 11 | a | 0,0986 | 15,4877 | 0,1498 | 838,0469 |
| | 5-10 | 11 | b | 0,1141 | 9,9391 | 0,1313 | 868,9549 |
| | 5-10 | 11 | c | 0,1377 | 9,6407 | 0,1177 | 866,9117 |
| | 5-10 | 11 | d | 0,117 | 9,8765 | 0,1372 | 864,3439 |
| | 5-10 | 11 | e | 0,1066 | 9,5726 | 0,1021 | 901,6358 |
| Bw | 10-15 | 12 | a | 0,1174 | 9,7561 | 0,1279 | 903,9817 |
| | 10-15 | 12 | b | 0,1103 | 9,2845 | 0,1383 | 884,3237 |
| | 10-15 | 12 | c | 0,1136 | 7,4343 | 0,2011 | 887,5127 |
| | 10-15 | 12 | d | 0,1154 | 9,4190 | 0,144 | 927,0571 |
| | 10-15 | 12 | e | 0,1263 | 7,7123 | 0,1337 | 892,2063 |
| Bw | 15-20 | 13 | a | 0,1274 | 9,1053 | 0,2059 | 866,6046 |
| | 15-20 | 13 | b | 0,1323 | 9,2622 | 0,1074 | 1002,957 |
| | 15-20 | 13 | c | 0,1479 | 8,6168 | 0,1123 | 968,1696 |
| | 15-20 | 13 | d | 0,1568 | 8,5869 | 0,1075 | 970,5452 |
| | 15-20 | 13 | e | 0,1214 | 9,0561 | 0,1038 | 961,7129 |
| C | >20 | 14 | a | 0,1257 | 8,8138 | 0,1213 | 970,9238 |
| | >20 | 14 | b | 0,1025 | 8,0350 | 0,1226 | 1033,503 |
| | >20 | 14 | c | 0,1554 | 8,5854 | 0,121 | 989,0591 |
| | >20 | 14 | d | 0,1466 | 8,1725 | 0,1676 | 975,3263 |
| | >20 | 14 | e | 0,1874 | 7,0259 | 0,1174 | 944,7398 |

Tl_{celk} - celkový obsah Tl v půdním agregátu

Příloha 3: Hmotnost půdních agregátů z lučního profilu určených pro extrakci DNA

| Půdní horizont | Hloubka odběru vzorku [cm] | Číslo vzorku | Opakování vzorku | Hmotnost půdního agregátu [g] |
|-----------------------|-----------------------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| Oe | 1-0 | 2 | a | 0,18 |
| | 1-0 | 2 | b | 0,2 |
| | 1-0 | 2 | c | 0,25 |
| | 1-0 | 2 | d | 0,14 |
| | 1-0 | 2 | e | 0,21 |
| Ah | 0-5 | 3 | a | 0,21 |
| | 0-5 | 3 | b | 0,21 |
| | 0-5 | 3 | c | 0,26 |
| | 0-5 | 3 | d | 0,27 |
| | 0-5 | 3 | e | 0,22 |
| Bw | 5-10 | 4 | a | 0,26 |
| | 5-10 | 4 | b | 0,23 |
| | 5-10 | 4 | c | 0,22 |
| | 5-10 | 4 | d | 0,29 |
| | 5-10 | 4 | e | 0,28 |
| Bw | 10-15 | 5 | a | 0,16 |
| | 10-15 | 5 | b | 0,43 |
| | 10-15 | 5 | c | 0,15 |
| | 10-15 | 5 | d | 0,25 |
| | 10-15 | 5 | e | 0,26 |
| Bw | 15-20 | 6 | a | 0,18 |
| | 15-20 | 6 | b | 0,16 |
| | 15-20 | 6 | c | 0,13 |
| | 15-20 | 6 | d | 0,14 |
| | 15-20 | 6 | e | 0,41 |
| Bw | 20-25 | 7 | a | 0,28 |
| | 20-25 | 7 | b | 0,21 |
| | 20-25 | 7 | c | 0,16 |
| | 20-25 | 7 | d | 0,13 |
| | 20-25 | 7 | e | 0,34 |
| C | >25 | 8 | a | 0,17 |
| | >25 | 8 | b | 0,11 |
| | >25 | 8 | c | 0,19 |
| | >25 | 8 | d | 0,18 |
| | >25 | 8 | e | 0,22 |

Příloha 4: Hmotnost půdních agregátů z lesního profilu určených pro extrakci DNA

| Půdní horizont | Hloubka odběru vzorku [cm] | Číslo vzorku | Opakování vzorku | Hmotnost půdního agregátu [g] |
|-----------------------|-----------------------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| Oe | 1-0 | 9 | a | 0,26 |
| | 1-0 | 9 | b | 0,14 |
| | 1-0 | 9 | c | 0,16 |
| | 1-0 | 9 | d | 0,22 |
| | 1-0 | 9 | e | 0,13 |
| Ah | 0-5 | 10 | a | 0,34 |
| | 0-5 | 10 | b | 0,22 |
| | 0-5 | 10 | c | 0,40 |
| | 0-5 | 10 | d | 0,38 |
| | 0-5 | 10 | e | 0,43 |
| Bw | 5-10 | 11 | a | 0,26 |
| | 5-10 | 11 | b | 0,26 |
| | 5-10 | 11 | c | 0,25 |
| | 5-10 | 11 | d | 0,16 |
| | 5-10 | 11 | e | 0,17 |
| Bw | 10-15 | 12 | a | 0,13 |
| | 10-15 | 12 | b | 0,29 |
| | 10-15 | 12 | c | 0,25 |
| | 10-15 | 12 | d | 0,21 |
| | 10-15 | 12 | e | 0,32 |
| Bw | 15-20 | 13 | a | 0,15 |
| | 15-20 | 13 | b | 0,13 |
| | 15-20 | 13 | c | 0,14 |
| | 15-20 | 13 | d | 0,12 |
| | 15-20 | 13 | e | 0,16 |
| C | >20 | 14 | a | 0,35 |
| | >20 | 14 | b | 0,27 |
| | >20 | 14 | c | 0,28 |
| | >20 | 14 | d | 0,11 |
| | >20 | 14 | e | 0,38 |

Příloha 5: Výsledky měření celkové koncentrace Tl, mobilizovatelné/výměnné Tl frakce (1 M NH₄NO₃) a oxalátem extrahovatelné Tl frakce v půdních horizontech

| Číslo vzorků | Půdní horizont | Tl _{tot} [mg.kg ⁻¹] ^a | Tl _{ex} [mg.kg ⁻¹] ^a | Tl _{ex} [%] ^a | Tl _{ox} [mg.kg ⁻¹] | Tl _{ox} [%] ^a |
|---------------------------------|----------------|---|--|-----------------------------------|---|-----------------------------------|
| <i>Půdní profil – louka (M)</i> | | | | | | |
| 2 | Oe | 220 ± 10 | 29,6 | 13,5 | 44,0 | 20,0 |
| 3 | Ah | 570 ± 14 | 31,5 | 5,5 | 48,6 | 8,5 |
| 4 | | 657 ± 22 | 36,1 | 5,5 | 45,8 | 7,0 |
| 5 | | 481 ± 21 | 35,2 | 7,3 | 48,3 | 10,0 |
| 6 | Bw | 670 ± 12 | 33,5 | 5,0 | 39,3 | 5,9 |
| 7 | | 630 ± 13 | 33,4 | 5,3 | 48,9 | 7,8 |
| 8 | C | 651 ± 23 | 33,8 | 5,2 | 51,1 | 7,8 |
| <i>Půdní profil – les (F)</i> | | | | | | |
| 9 | Oe | 92,9 ± 1,3 | 5,41 | 5,8 | 9,15 | 9,8 |
| 10 | Ah | 602 ± 25 | 11,4 | 1,9 | 23,0 | 3,8 |
| 11 | | 551 ± 18 | 17,2 | 3,1 | 31,8 | 5,8 |
| 12 | Bw | 526 ± 20 | 21,3 | 4,0 | 30,7 | 5,8 |
| 13 | | 539 ± 17 | 23,5 | 4,4 | 45,5 | 8,4 |
| 14 | C | 533 ± 22 | 24,8 | 4,7 | 31,7 | 5,9 |

Tl_{tot} - celková koncentrace Tl (nejistota pro celkový obsah Tl je uvedena jako 2 SD (n=3))

Tl_{ex} - mobilizovatelná/výměnná frakce Tl stanovená 1 M NH₄NO₃, Tl_{ox} - oxalátem extrahovatelné Tl

^a průměry (n=3) s RSD <10 %

Příloha 6: Podílové zastoupení operačně definovaných TI frakcí stanovených metodou modifikované BCR sekvenční extrakce dle Rauret et al. (2000)

| Označení vzorku | Půdní horizont | Výměnná frakce (%) | Redukovatelná frakce (%) | Oxidovatelná frakce (%) | Reziduální frakce (%) |
|-----------------------------|----------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|
| <i>Půdní profil - louka</i> | | | | | |
| 2 | Oe | 0,5 | 9,1 | 3,4 | 87,0 |
| 3 | Ah | 0,4 | 8,6 | 2,6 | 88,4 |
| 4 | | 0,3 | 8,9 | 2,5 | 88,3 |
| 5 | Bw | 0,1 | 7,9 | 2,2 | 89,8 |
| 6 | | 0,2 | 8,2 | 2,2 | 89,4 |
| 7 | | 0,2 | 8,2 | 2,0 | 89,6 |
| 8 | C | 0,2 | 8,0 | 2,1 | 89,7 |
| <i>Půdní profil - les</i> | | | | | |
| 9 | Oe | 0,3 | 5,3 | 4,9 | 89,6 |
| 10 | Ah | 0,2 | 6,5 | 2,4 | 90,8 |
| 11 | Bw | 0,3 | 8,1 | 2,2 | 89,5 |
| 12 | | 0,2 | 8,9 | 2,1 | 88,7 |
| 13 | | 0,3 | 8,7 | 2,1 | 88,9 |
| 14 | C | 0,2 | 7,8 | 1,9 | 90,2 |

Data jsou průměry (n=3) s relativní směrodatnou odchylkou (RSD) <10 %

Příloha 7: Výstupy z programu Statistica 12 - post hoc test Kruskal-Wallisova testu/ANOVA - vícenásobné oboustranné porovnání p hodnot pro zjištění shody × rozdílu mezi jednotlivými půdními horizonty (z hlediska závisle proměnné) půdního profilu louky

Statisticky významný rozdíl mezi horizonty byl prokázán (červeně zvýrazněné)

| | | | | |
|---------------------------------------|---|----------------|-----------------|-----------------|
| Závislá: Al [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Al [mg.kg ⁻¹] (Louka - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 35) =15,66095 p = 0,0013 | | | |
| | Oe R:4,2000 | Ah R:12,800 | Bw R:20,400 | C R:27,400 |
| Oe | | 1,000000 | 0,009404 | 0,002063 |
| Ah | 1,000000 | | 0,827860 | 0,145620 |
| Bw | 0,009404 | 0,827860 | | 1,000000 |
| C | 0,002063 | 0,145620 | 1,000000 | |

| | | | | |
|---------------------------------------|--|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: As [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); As [mg.kg ⁻¹] (Louka - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 35) =18,54095 p = 0,0003 | | | |
| | Oe R:3,8000 | Ah R:14,400 | Bw R:19,200 | C R:31,000 |
| Oe | | 0,611520 | 0,015894 | 0,000162 |
| Ah | 0,611520 | | 1,000000 | 0,062544 |
| Bw | 0,015894 | 1,000000 | | 0,127631 |
| C | 0,000162 | 0,062544 | 0,127631 | |

| | | | | |
|---------------------------------------|---|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: Ca [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Ca [mg.kg ⁻¹] (Louka - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 35) =10,01381 p = 0,0185 | | | |
| | Oe R:24,200 | Ah R:28,600 | Bw R:14,250 | C R:16,200 |
| Oe | | 1,000000 | 0,312793 | 1,000000 |
| Ah | 1,000000 | | 0,030583 | 0,334211 |
| Bw | 0,312793 | 0,030583 | | 1,000000 |
| C | 1,000000 | 0,334211 | 1,000000 | |

| | | | | |
|---------------------------------------|--|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: Fe [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Fe [mg.kg ⁻¹] (Louka - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 35) =16,91810 p =0,0007 | | | |
| | Oe R:4,2000 | Ah R:14,800 | Bw R:19,200 | C R:30,200 |
| Oe | | 0,611520 | 0,020489 | 0,000361 |
| Ah | 0,611520 | | 1,000000 | 0,104932 |
| Bw | 0,020489 | 1,000000 | | 0,190769 |
| C | 0,000361 | 0,104932 | 0,190769 | |

| | | | | |
|---------------------------------------|---|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: Mg [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Mg [mg.kg ⁻¹] (Louka - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 35) =21,40810 p = 0,0001 | | | |
| | Oe R:3,6000 | Ah R:11,400 | Bw R:19,850 | C R:31,600 |
| Oe | | 1,000000 | 0,009094 | 0,000093 |
| Ah | 1,000000 | | 0,594553 | 0,010965 |
| Bw | 0,009094 | 0,594553 | | 0,130962 |

| | | | | |
|---------------------------------------|---|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: Mg [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Mg [mg.kg ⁻¹] (Louka - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 35) =21,40810 p = 0,0001 | | | |
| | Oe R:3,6000 | Ah R:11,400 | Bw R:19,850 | C R:31,600 |
| C | 0,000093 | 0,010965 | 0,130962 | |

| | | | | |
|--|--|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: Podíl organické hmoty [%] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Podíl organické hmoty [%] (Louka - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 35) =20,17000 p = 0,0002 | | | |
| | Oe R:32,400 | Ah R:27,800 | Bw R:13,550 | C R:11,600 |
| Oe | | 1,000000 | 0,001404 | 0,007978 |
| Ah | 1,000000 | | 0,032483 | 0,074576 |
| Bw | 0,001404 | 0,032483 | | 1,000000 |
| C | 0,007978 | 0,074576 | 1,000000 | |

| | | | | |
|---------------------------------------|--|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: Rb [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Rb [mg.kg ⁻¹] (Louka - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 35) =11,99476 p = 0,0074 | | | |
| | Oe R:4,6000 | Ah R:15,800 | Bw R:20,150 | C R:25,000 |
| Oe | | 0,503717 | 0,014430 | 0,009871 |
| Ah | 0,503717 | | 1,000000 | 0,934361 |
| Bw | 0,014430 | 1,000000 | | 1,000000 |
| C | 0,009871 | 0,934361 | 1,000000 | |

| | | | | |
|--|---|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: Tl _{celk} [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Tl _{celk} [mg.kg ⁻¹] (Louka - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 35) =25,01143 p = 0,0000 | | | |
| | Oe R:4,2000 | Ah R:7,6000 | Bw R:20,500 | C R:32,200 |
| Oe | | 1,000000 | 0,008793 | 0,000093 |
| Ah | 1,000000 | | 0,070850 | 0,000883 |
| Bw | 0,008793 | 0,070850 | | 0,134368 |
| C | 0,000093 | 0,000883 | 0,134368 | |

Statisticky významný rozdíl mezi horizonty nebyl prokázán

| | | | | |
|---------------------------------------|---|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: Mn [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Mn [mg.kg ⁻¹] (Louka - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 35) =6,608095 p = 0,0855 | | | |
| | Oe R:14,400 | Ah R:27,600 | Bw R:17,950 | C R:12,200 |
| Oe | | 0,250018 | 1,000000 | 1,000000 |
| Ah | 0,250018 | | 0,357806 | 0,104932 |
| Bw | 1,000000 | 0,357806 | | 1,000000 |
| C | 1,000000 | 0,104932 | 1,000000 | |

Příloha 8: Výstupy z programu Statistica 12 - post hoc testy Kruskal-Wallisova testu/ANOVA - vícenásobné oboustranné porovnání p hodnot pro zjištění shody × rozdílu mezi jednotlivými půdními horizonty (z hlediska závisle proměnné) lesního půdního profilu

Statisticky významný rozdíl mezi horizonty byl prokázán (červeně zvýrazněné)

| | | | | |
|---------------------------------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| Závislá: Al [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Al [mg.kg ⁻¹] (Les - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná: Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 29) =17,91517 p = 0,0005 | | | |
| | Oe R:4,2000 | Ah R:8,2500 | Bw R:17,200 | C R:24,600 |
| Oe | | 1,000000 | 0,018664 | 0,000911 |
| Ah | 1,000000 | | 0,370659 | 0,025220 |
| Bw | 0,018664 | 0,370659 | | 0,554277 |
| C | 0,000911 | 0,025220 | 0,554277 | |

| | | | | |
|---------------------------------------|---|-----------------|-----------------|---------------|
| Závislá: As [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); As [mg.kg ⁻¹] (Les - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná: Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 29) =7,832644 p = 0,0496 | | | |
| | Oe R:16,000 | Ah R:4,0000 | Bw R:16,733 | C R:17,600 |
| Oe | | 0,213897 | 1,000000 | 1,000000 |
| Ah | 0,213897 | | 0,047235 | 0,103588 |
| Bw | 1,000000 | 0,047235 | | 1,000000 |
| C | 1,000000 | 0,103588 | 1,000000 | |

| | | | | |
|---------------------------------------|---|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: Ca [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Ca [mg.kg ⁻¹] (Les - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná: Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 29) =20,82851 p = 0,0001 | | | |
| | Oe R:27,000 | Ah R:22,500 | Bw R:12,133 | C R:5,6000 |
| Oe | | 1,000000 | 0,004332 | 0,000424 |
| Ah | 1,000000 | | 0,182989 | 0,018532 |
| Bw | 0,004332 | 0,182989 | | 0,823878 |
| C | 0,000424 | 0,018532 | 0,823878 | |

| | | | | |
|---------------------------------------|--|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: Mg [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Mg [mg.kg ⁻¹] (Les - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 29) =10,48644 p = 0,0149 | | | |
| | Oe R:10,200 | Ah R:10,000 | Bw R:14,467 | C R:25,400 |
| Oe | | 1,000000 | 1,000000 | 0,028584 |
| Ah | 1,000000 | | 1,000000 | 0,042087 |
| Bw | 1,000000 | 1,000000 | | 0,077391 |
| C | 0,028584 | 0,042087 | 0,077391 | |

| | | | | |
|---|--|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: Podíl organické hmoty [%] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Podíl organické hmoty [%] Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 29) =21,64506 p =0,0001 | | | |
| | Oe R:26,200 | Ah R:23,500 | Bw R:12,533 | C R:4,4000 |
| Oe | | 1,000000 | 0,011294 | 0,000310 |
| Ah | 1,000000 | | 0,132552 | 0,004956 |
| Bw | 0,011294 | 0,132552 | | 0,386090 |
| C | 0,000310 | 0,004956 | 0,386090 | |

| | | | | |
|---------------------------------------|--|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: Rb [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Rb [mg.kg ⁻¹] (Les - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 29) =11,64575 p = 0,0087 | | | |
| | Oe R:7,2000 | Ah R:10,250 | Bw R:15,733 | C R:24,400 |
| Oe | | 1,000000 | 0,313745 | 0,008420 |
| Ah | 1,000000 | | 1,000000 | 0,079425 |
| Bw | 0,313745 | 1,000000 | | 0,292306 |
| C | 0,008420 | 0,079425 | 0,292306 | |

| | | | | |
|---|---|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: Tl _{celk} [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Tl _{celk} [mg.kg ⁻¹] (Les - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 29) =14,83103 p = 0,0020 | | | |
| | Oe R:6,2000 | Ah R:9,2500 | Bw R:16,000 | C R:25,400 |
| Oe | | 1,000000 | 0,154960 | 0,002180 |
| Ah | 1,000000 | | 0,953457 | 0,028151 |
| Bw | 0,154960 | 0,953457 | | 0,195180 |
| C | 0,002180 | 0,028151 | 0,195180 | |

Statisticky významný rozdíl mezi horizonty nebyl prokázán:

| | | | | |
|---------------------------------------|--|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: Fe [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Fe [mg.kg ⁻¹] (Les - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 29) =5,475862 p = 0,1401 | | | |
| | Oe R:13,600 | Ah R:7,5000 | Bw R:15,600 | C R:20,600 |
| Oe | | 1,000000 | 1,000000 | 1,000000 |
| Ah | 1,000000 | | 0,545596 | 0,130920 |
| Bw | 1,000000 | 0,545596 | | 1,000000 |
| C | 1,000000 | 0,130920 | 1,000000 | |

| | | | | |
|---------------------------------------|--|----------------|----------------|---------------|
| Závislá: Mn [mg.kg ⁻¹] | Vícenásobné porovnání p hodnot (oboustr.); Mn [mg.kg ⁻¹] (Les - agregáty) Nezávislá (grupovací) proměnná : Horizont Kruskal-Wallisův test: H (3, N= 29) =3,557471 p = 0,3134 | | | |
| | Oe R:10,200 | Ah R:11,250 | Bw R:16,533 | C R:18,200 |
| Oe | | 1,000000 | 0,898549 | 0,824369 |
| Ah | 1,000000 | | 1,000000 | 1,000000 |
| Bw | 0,898549 | 1,000000 | | 1,000000 |
| C | 0,824369 | 1,000000 | 1,000000 | |

Příloha 9: Mann-Whitneyův U test pro porovnání fyzikálně-chemických hodnot obou půdních profilů

| Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost) | | | |
|--|-----------|-------------------|-----------------|
| Dle proměnné: Využití půdy (Louka × Les) | | | |
| Označené testy (červeně) jsou významné na hladině $p < 0,05$ | | | |
| Proměnná | p-hodnota | N platn. Louka | N platn. Les |
| <i>Stanoveno z agregátů</i> | | | |
| Podíl organické hmoty [%] | 0,068656 | 35 | 29 |
| Al [mg.kg ⁻¹] | 0,016369 | 35 | 29 |
| As [mg.kg ⁻¹] | 0,000000 | 35 | 29 |
| Ca [mg.kg ⁻¹] | 0,021100 | 35 | 29 |
| Fe [mg.kg ⁻¹] | 0,000000 | 35 | 29 |
| Mg [mg.kg ⁻¹] | 0,002634 | 35 | 29 |
| Mn [mg.kg ⁻¹] | 0,000000 | 35 | 29 |
| Rb [mg.kg ⁻¹] | 0,081901 | 35 | 29 |
| Tl [mg.kg ⁻¹] | 0,000000 | 35 | 29 |
| <i>Stanoveno z homogenizované půdy</i> | | | |
| pH _{H2O} | 0,018417 | 7 | 6 |
| pH _{KCl} | 0,015159 | 7 | 6 |
| Clay [%] | 0,045501 | 7 | 6 |
| CEC [cmol(+).kg ⁻¹] | 0,283978 | 21 | 18 |
| TC [%] | 0,533800 | 7 | 6 |
| TS [%] | 0,234266 | 7 | 6 |
| Al _{ox} [g.kg ⁻¹] | 0,003405 | 21 | 18 |
| Fe _{ox} [g.kg ⁻¹] | 0,005341 | 21 | 18 |
| Mn _{ox} [g.kg ⁻¹] | 0,003405 | 21 | 18 |
| Tl _{tot} [mg.kg ⁻¹] | 0,297954 | 21 | 18 |
| Tl _{ex} [mg.kg ⁻¹] | 0,003405 | 21 | 18 |
| Tl _{ox} [mg.kg ⁻¹] | 0,026810 | 21 | 18 |
| Výměnná Tl frakce [%] | 1,000000 | 21 | 18 |
| Redukovatelná Tl frakce [%] | 0,253099 | 21 | 18 |
| Oxidovatelná Tl frakce [%] | 0,321127 | 21 | 18 |
| Reziduální Tl frakce [%] | 0,056590 | 21 | 18 |

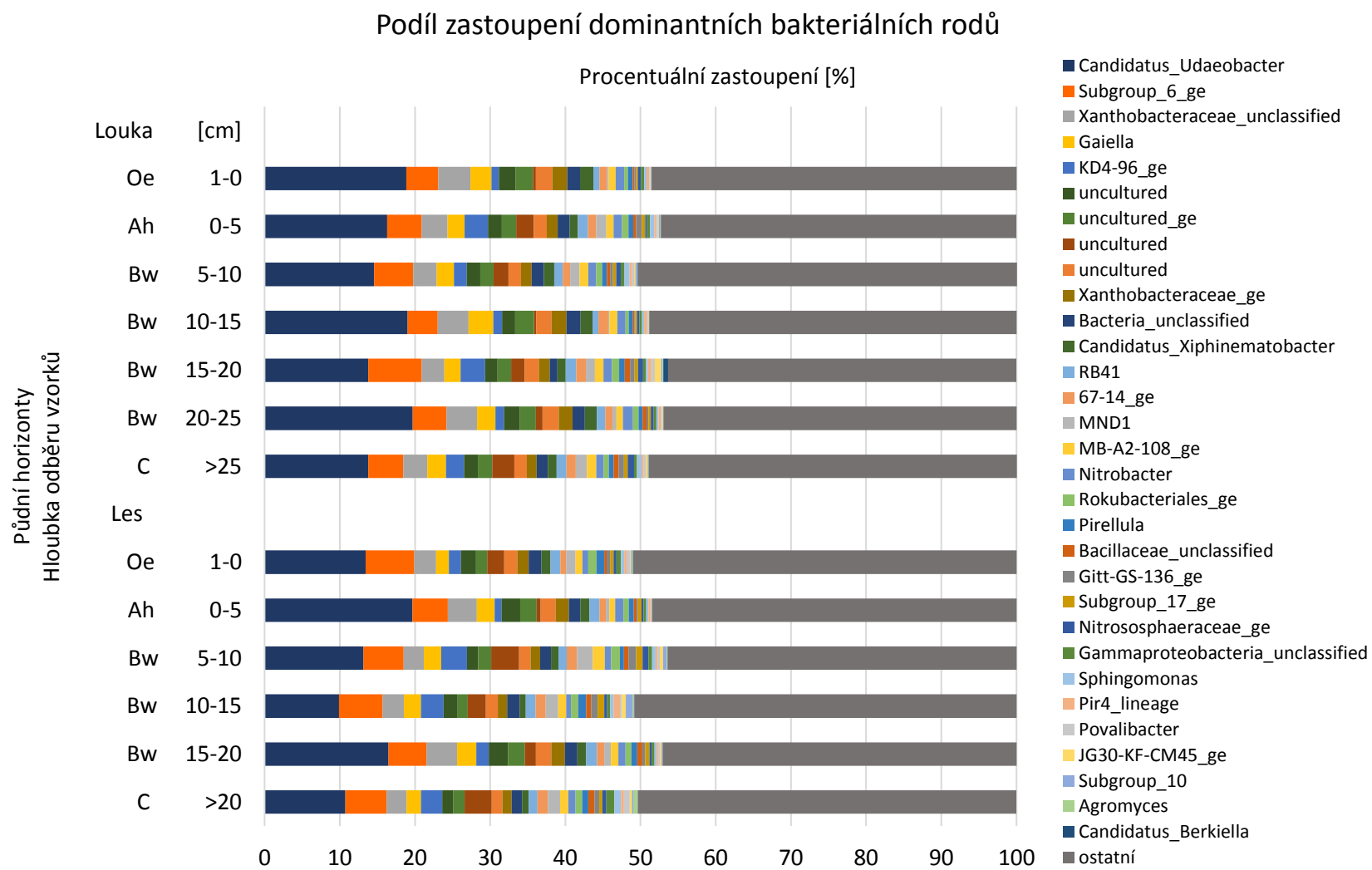
Příloha 10: Výsledky statistické analýzy NMDS pro luční půdní profil

| Fyzikálně-chemický ukazatel | Dimenze 1 | Dimenze 2 | Korelační koeficient (r²) | Pr(>r) |
|------------------------------------|------------------|------------------|---|------------------|
| Podíl organické hmoty | 0,75105 | -0,66024 | 0,00170 | 0,97460 |
| pH _{H2O} | -0,13346 | 0,99105 | 0,01610 | 0,78170 |
| pH _{KCl} | -0,21059 | 0,97758 | 0,02520 | 0,67780 |
| Jílová frakce | 0,28438 | 0,95871 | 0,07240 | 0,29180 |
| CEC | -0,48126 | -0,87658 | 0,03650 | 0,57620 |
| TC | -0,28023 | -0,95993 | 0,07180 | 0,30700 |
| TS | -0,33823 | -0,94106 | 0,07620 | 0,27350 |
| Fe _{ox} | -0,91905 | 0,39414 | 0,01030 | 0,85450 |
| Mn _{ox} | -0,00489 | 0,99999 | 0,01610 | 0,78080 |
| Al _{ox} | -0,19384 | 0,98103 | 0,00610 | 0,91460 |
| Tl _{TOT} | 0,30730 | 0,95161 | 0,11900 | 0,11920 |
| Tl _{ex} | 0,99768 | -0,06805 | 0,01650 | 0,77670 |
| Tl _{ex} (%) | -0,27166 | -0,96239 | 0,14100 | 0,07990 |
| Tl _{ox} | -0,46915 | 0,88312 | 0,02770 | 0,65300 |
| Tl _{ox} (%) | -0,38086 | -0,92463 | 0,12060 | 0,12460 |
| Výměnná frakce | -0,11396 | 0,99349 | 0,00600 | 0,91020 |
| Redukovatelná frakce | -0,15606 | -0,98775 | 0,01270 | 0,82330 |
| Oxidovatelná frakce | -0,23682 | -0,97155 | 0,03740 | 0,56120 |
| Reziduální frakce | 0,24914 | 0,96847 | 0,02420 | 0,69080 |

Příloha 11: Výsledky statistické analýzy NMDS pro lesní půdní profil

| Fyzikálně-chemický ukazatel | Dimenze 1 | Dimenze 2 | Korelační koeficient (r²) | Pr(>r) |
|------------------------------------|------------------|------------------|---|------------------|
| Podíl organické hmoty | -0,59652 | -0,80260 | 0,12590 | 0,16570 |
| pH _{H2O} | 0,75025 | 0,66116 | 0,15810 | 0,10440 |
| pH _{KCl} | -0,49611 | -0,86826 | 0,04810 | 0,53110 |
| Jílová frakce | 0,14701 | 0,98914 | 0,05060 | 0,52520 |
| CEC | -0,55077 | -0,83466 | 0,10630 | 0,23020 |
| TC | -0,38590 | -0,92254 | 0,07430 | 0,36570 |
| TS | -0,38170 | -0,92429 | 0,07550 | 0,35900 |
| Fe _{ox} | 0,21801 | 0,97595 | 0,05450 | 0,48770 |
| Mn _{ox} | 0,28721 | 0,95787 | 0,05360 | 0,49390 |
| Al _{ox} | 0,25488 | 0,96697 | 0,05030 | 0,51780 |
| Tl _{TOT} | 0,08110 | 0,99671 | 0,04710 | 0,54960 |
| Tl _{ex} | 0,44210 | 0,89696 | 0,07940 | 0,34100 |
| Tl _{ex} (%) | 0,91714 | -0,39856 | 0,04510 | 0,55270 |
| Tl _{ox} | 0,18246 | 0,98321 | 0,06030 | 0,44840 |
| Tl _{ox} (%) | 0,47025 | -0,88253 | 0,00780 | 0,90240 |
| Výměnná frakce | -0,45059 | 0,89273 | 0,00740 | 0,90960 |
| Redukovatelná frakce | 0,52460 | 0,85135 | 0,07710 | 0,35270 |
| Oxidovatelná frakce | -0,30094 | -0,95364 | 0,06680 | 0,40650 |
| Reziduální frakce | -0,99641 | 0,08465 | 0,03630 | 0,61940 |

Příloha 12: Zastoupení dominantních bakteriálních rodů v obou půdních profilech



Příloha 13: Fyzikálně-chemické charakteristiky obou studovaných půdních profilů

| Číslo vzorků | Půdní horizont | Hloubka [cm] | Jílová frakce [%] | pH _{KCl} | pH _{H₂O} | TC [%] | TIC [%] | TS [%] | CEC [cmol(+).kg ⁻¹] ^a | Fe _{ox} | Mn _{ox} [g.kg ⁻¹] ^a | Al _{ox} |
|---------------------------------|----------------|--------------|-------------------|-------------------|------------------------------|--------|---------|--------|--|------------------|---|------------------|
| <i>Půdní profil - louka (M)</i> | | | | | | | | | | | | |
| 2 | Oe | 1-0 | n.d. | 5,2 | 5,9 | 16,3 | <0,1 | 0,43 | 39,6 | 3,5 | 1,0 | 2,4 |
| 3 | Ah | 0-5 | 12 | 5,1 | 6,0 | 5,41 | <0,1 | 0,24 | 33,7 | 5,7 | 1,5 | 3,5 |
| 4 | | 5-10 | 12 | 4,8 | 6,1 | 4,54 | <0,1 | 0,22 | 30,5 | 4,6 | 1,3 | 3,3 |
| 5 | Bw | 10-15 | 12 | 5,2 | 6,3 | 4,24 | <0,1 | 0,22 | 30,2 | 5,7 | 1,5 | 3,9 |
| 6 | | 15-20 | 12 | 5,2 | 6,2 | 3,78 | <0,1 | 0,21 | 29,7 | 3,7 | 1,2 | 3,0 |
| 7 | | 20-25 | 12 | 5,5 | 7,0 | 3,33 | <0,1 | 0,22 | 29,7 | 4,8 | 1,3 | 3,7 |
| 8 | C | 25- | 12 | 5,6 | 6,7 | 3,27 | <0,1 | 0,21 | 30,6 | 4,2 | 1,3 | 3,3 |
| <i>Půdní profil - les (F)</i> | | | | | | | | | | | | |
| 9 | Oe | 1-0 | n.d. | 6,1 | 6,7 | 17,4 | <0,1 | 0,43 | 51,2 | 1,2 | 0,4 | 0,7 |
| 10 | Ah | 0-5 | 15 | 5,9 | 6,8 | 6,00 | <0,1 | 0,24 | 37,7 | 2,5 | 0,8 | 1,7 |
| 11 | | 5-10 | 15 | 5,8 | 7,0 | 3,88 | <0,1 | 0,18 | 29,0 | 2,8 | 0,9 | 1,8 |
| 12 | Bw | 10-15 | 15 | 5,6 | 7,1 | 3,19 | <0,1 | 0,17 | 25,9 | 3,0 | 1,0 | 2,1 |
| 13 | | 15-20 | 15 | 5,5 | 6,9 | 2,83 | <0,1 | 0,17 | 27,2 | 3,4 | 1,0 | 2,2 |
| 14 | C | 20- | 15 | 5,5 | 7,1 | 2,88 | <0,1 | 0,19 | 22,9 | 3,0 | 0,9 | 2,1 |

Oe -organický půdní horizont, Ah - organominerální půdní horizont, Bw – kambický (hloubka odběru každých 1-5 cm podle odlišnosti barvy, struktury a obsahu jílu), C - vlastní půdotvorný substrát

TC - celkový obsah uhlíku, TIC - celkový obsah anorganického uhlíku, TS – celkový obsah síry, CEC - kationtová výměnná kapacita, Fe_{ox}, Mn_{ox}, Al_{ox} - oxalátem extrahovatelné koncentrace železa, manganu a hliníku,

n.d. – nedetekováno

^a průměry (n=3) s RSD <10 %

Příloha 14: Obsahy vybraných prvků stanovených v půdních agregátech

| Číslo vzorků | Půdní horizont | Hloubka [cm] | Al [mg.kg ⁻¹] | As [mg.kg ⁻¹] | Ca [mg.kg ⁻¹] | Fe [mg.kg ⁻¹] | Mg [mg.kg ⁻¹] | Mn [mg.kg ⁻¹] | Tl _{celk} [mg.kg ⁻¹] | Rb [mg.kg ⁻¹] |
|---------------------------------|----------------|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---|---------------------------|
| <i>Půdní profil - louka (M)</i> | | | | | | | | | | |
| 2 | Oe | 1-0 | 43773,7 | 2066,6 | 2239,3 | 48531,8 | 4509,5 | 1245,2 | 1019,3 | 73,5 |
| 3 | Ah | 0-5 | 50009,2 | 2306,4 | 2110,2 | 54213,8 | 5189,5 | 1418,5 | 1089,5 | 98,5 |
| 4 | | 5-10 | 52116,7 | 2373,8 | 1906,9 | 55186,1 | 5284,0 | 1422,0 | 1138,6 | 100,9 |
| 5 | Bw | 10-15 | 51461,6 | 2347,2 | 1904,1 | 55520,3 | 5337,9 | 1344,5 | 1143,3 | 99,3 |
| 6 | | 15-20 | 51806,1 | 2546,7 | 1975,3 | 57264,9 | 5434,4 | 1340,9 | 1164,6 | 100,2 |
| 7 | | 20-25 | 50527,8 | 2390,3 | 1828,9 | 55002,1 | 5450,7 | 1269,2 | 1178,6 | 98,1 |
| 8 | C | 25- | 53059,6 | 2611,4 | 2070,2 | 58399,9 | 5921,0 | 1311,3 | 1251,4 | 100,7 |
| <i>Půdní profil - les (F)</i> | | | | | | | | | | |
| 9 | Oe | 1-0 | 36604,6 | 5433,2 | 2856,2 | 105984,3 | 4279,2 | 835,0 | 780,3 | 70,0 |
| 10 | Ah | 0-5 | 45740,6 | 1387,2 | 2291,3 | 40339,4 | 4834,1 | 996,3 | 859,7 | 92,8 |
| 11 | | 5-10 | 47433,6 | 1601,2 | 1823,2 | 45818,1 | 4972,0 | 1020,8 | 868,0 | 94,5 |
| 12 | Bw | 10-15 | 48191,3 | 1552,1 | 1570,6 | 43102,4 | 4839,1 | 1007,6 | 899,0 | 93,8 |
| 13 | | 15-20 | 51337,5 | 1561,2 | 1570,7 | 44635,8 | 5244,2 | 1059,0 | 954,0 | 100,0 |
| 14 | C | 20- | 52481,1 | 1560,9 | 1538,7 | 46767,2 | 5460,8 | 1032,6 | 982,7 | 102,0 |

Oe -organický půdní horizont, Ah - organominerální půdní horizont, Bw – kambický (hloubka odběru každých 1-5 cm podle odlišnosti barvy, struktury a obsahu jílu), C - vlastní půdotvorný substrát

Data jsou průměry (n=5) ± SD