

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



**Je aktivita ligninolytických enzymů při rozkladu opadu
závislá na obsahu fenolických látek?**

Magisterská diplomová práce 2010

**Vypracovala: Markéta Applová
Vedoucí práce: Ing. Jiří Bárta, PhD.**

Applová, M., 2010. Je aktivita ligninolytických enzymů při rozkladu opadu závislá na obsahu fenolických látek? [Does ligninolytic enzyme activity depend on phenolics content during the litter decomposition? Mgr. Thesis, in Czech] - 76 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The aim of the study was to determine the influence of phenolics content and inoculation with soil extract on microbial respiration, on the phenoloxidase (PhOx), peroxidase (PerOx) and newly Mn-peroxidase (MnP) activity in two dominating litter samples (*Calamagrostis villosa* and *Picea abies*) differing in phenolics content from Plešné and Čertovo lake watersheds. At PhOx and PerOx activity, the dependence on incubation temperature with L-DOPA was estimated.

PhOx and MnP activities significantly increased with higher content of hardly decomposable phenolics, but decreased with water extractable phenolics content. Inoculation with soil extract had no influence on microbial respiration, enzyme activity, nor on decomposition of phenolics. Microbial respiration was significantly higher at 10°C, but average enzyme activity was comparable at 0 and 10°C.

PhOx activities had temperature optimum higher than 22°C, while PerOx activities had temperature optimum at 0 – 15°C.

Prohlašuji, že svoji diplomovou magisterskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury a rad školitele.

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

V Českých Budějovicích, 28.4. 2010

.....

Poděkování:

V první řadě děkuji Bohu za život a veškerou podporu. Ze svých bližních bych nejdříve chtěla poděkovat svému školiteli Jirkovi Bártovi za vedení diplomové práce. Jarce Kubešové děkuji za příjemné pobyty v laborce a za důležitou psychickou podporu (ona ví). Paní profesorce Haně Šantrůčkové bych chtěla poděkovat za mnohé důležité rady. Tomáši Pickovi, paní Říhové, Danovi Vaňkovi a ostatním bych chtěla poděkovat za provedení některých analýz.

Katedře bych chtěla poděkovat za půjčení notebooku.

Zvláštní dík patří starším přátelům, kteří mě zásobovali svými zkušenostmi se psaním diplomek.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za jejich podporu.

Všem, kterým jsem zapoměla poděkovat, se omlouvám a činím tak dodatečně.

Chci poděkovat grantové agentuře za finanční podporu (GAČR č. 526/08/0751).

Obsah:

1. Úvod.....	2
2. Literární rešerše.....	4
2.1. Mikroorganismy rozkládající rostlinný opad.....	4
2.1.1. Endofyti a epifyti.....	5
2.1.2. WR houby.....	6
2.1.3. BR houby.....	7
2.1.4. SR houby.....	7
2.2. Fenolytické enzymy.....	8
2.2.1. Fenoloxidázy (PhOx).....	8
2.2.2. Peroxidázy (PerOx).....	9
2.2.3. Mangan peroxidázy (MnP).....	9
2.3. Vliv chemického složení rostlinného opadu na jeho rozklad.....	12
2.3.1. Fenolické látky.....	13
2.4. Vliv nutrientů na rozklad opadu a fenolických látek.....	15
2.4.1. Vliv dusíku (N) a fosforu (P) v opadu.....	15
2.4.2. Vliv dostupných živin na rozklad fenolických látek.....	16
2.5. Vliv teploty.....	17
2.6. Vliv pH.....	19
2.7. Hypotézy.....	19
3. Materiál a metody.....	20
3.1. Studijní plochy.....	20
3.1.1. Výzkumná plocha Plešné jezero (PL).....	20
3.1.2. Výzkumná plocha Čertovo jezero (CT).....	21
3.2. Inkubační pokus.....	21
3.2.1. Odběr opadů.....	21
3.2.2. Analýzy chemického složení opadů.....	21
3.2.3. Půdní extrakt a založení pokusů pro měření respirace.....	22
3.2.4. Založení pokusu k měření enzymatické aktivity.....	22
3.3. Závislost reaktivity PhOx a PerOx na inkubační teplotě s roztokem L – DOPA.....	22
3.4. Použité laboratorní analýzy.....	23
3.4.1. Bazální mikrobiální respirace.....	23
3.4.2. Celkový obsah uhlíku (C_{TOT}) a dusíku (N_{TOT}).....	24
3.4.3. Obsah extrahovatelného uhlíku (C_{EXT}) a dusíku (N_{EXT}).....	24
3.4.4. Stanovení reaktivního fosforu v oxalátovém extraktu (P_{OX}).....	24
3.4.5. Stanovení obsahu fenolických látek rozpustných v acetonu (AEPH).....	25
3.4.6. Fenolické látky rozpustné ve vodě (WEPH).....	26
3.4.7. Stanovení sušiny (s).....	27
3.4.8. Příprava homogenátů.....	27
3.4.9. Stanovení aktivit fenoloxidáz (PhOx) a peroxidáz (PerOx).....	27
3.4.8. Stanovení aktivit MnP, oxidáz a peroxidáz.....	29
3.5. Statistické zpracování dat.....	29
4. Výsledky.....	30
4.1. Chemické složení opadu před zahájením pokusu a po jeho ukončení.....	30
4.1.1. Počáteční a konečné chemické složení opadů.....	30
4.2. Kumulativní mikrobiální respirace.....	31

4.3. Aktivity fenolytických enzymů.....	36
4.3.1. Aktivita PhOx.....	36
4.3.2. Aktivita PerOx.....	39
4.3.3. Aktivita MnP.....	42
4.4. Závislost enzymatické aktivity na chemickém složení opadu.....	44
4.5. Změna obsahu fenolických látek v opadu během inkubace.....	45
4.5.1. Změna obsahu AEPH a WEPH.....	45
4.5.2. Závislost změn obsahu AEPH a WEPH na aktivitě PhOx a MnP.....	47
5. Diskuze.....	49
5.1. Mikrobiální respirace.....	49
5.4. Vliv inokulace půdním extraktem, endofytické mikroorganismy.....	51
5.5. Vliv teploty na mikrobiální respiraci a produkci fenolytických enzymů.....	52
5.6. Využití poznatků této práce.....	53
5.6.1. Příčiny kůrovcové kalamity a obnova poškozených lokalit.....	53
6. Závěry.....	55
7. Literatura.....	56
8. Přílohy.....	65

Vysvětlivky:

AEPH	aceton extractable phenolics – fenolické látky extrahovatelné v acetonu
BI	bez inokulace
C _{CW}	obsah uhlíku extrahovatelného ve studené vodě
C _{EXT}	celkový obsah extrahovatelného uhlíku
CT	povodí Čertova jezera
CTOT	celkový obsah uhlíku
DMAB	3,3-dimethylaminobenzoová kyselina
DON	dissolved organic nitrogen – rozpustný organický dusík
EDTA	ethylenediaminetetraacetát
IN	inokulovaný
LiP	lignin peroxidáza
MBTH	3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone
MnP	mangan peroxidázy
N _{CW}	obsah dusíku extrahovatelného ve studené vodě
N _{EXT}	celkový obsah extrahovatelného dusíku
N _{TOT}	celkový obsah dusíku
PerOx	peroxidázy
PhOx	fenoloxidázy
PL	povodí Plešného jezera
P _{OX}	obsah fosforu v oxalátovém výluhu
WEPh	water extractable phenolics – fenolické látky extrahovatelné ve vodě

1. Úvod

Vlivem kyselých depozic SO_4^{2-} a NO_3^- v druhé polovině 20. století (Kopáček and Veselý, 2005) došlo k vyplavování bazických kationtů (hlavně Ca^{2+} a Mg^{2+}) z půdy a k oslabování smrkových porostů na Šumavě (Pawłowski, 1997). Od roku 2004 vedlo toto oslabení k přemnožení kůrovce (*Ips typographus*) (Jones et al., 2004). Výsledkem je odumření dospělých stromů a jejich postupné padání umocněné větrnými kalamitami. V této době probíhá zásadní rozhodování o tom, jak s těmito lesy naložit.

V zásadě můžeme rozlišit dvě možnosti. Buď pokácet stojící stromy, všechno dřevo odvézt a vysázet nový les, nebo ponechat stojící stromy a ležící kmeny na místě a umožnit lesu, aby se obnovil sám. Tato obnova může být úspěšná pouze tehdy, pokud budou mít nově rostoucí stromy příhodné podmínky, mezi něž patří mimo jiné dostatek živin. Živiny se v ekosystému nacházejí především v půdě a v biomase a nekromase rostlin, tedy v kmenech stromů a rostlinném opadu, který přináší živiny do půdy. Zdroje živin jsou na Šumavě důležité i proto, že z již zmíněných důvodů jsou tu půdy degradované.

Abychom určili potenciál přirozené obnovy lesa, potřebujeme mít údaje o rozkladu dřeva a opadu na stanovištích, a jak je tento rozklad závislý na kvalitě organické hmoty. Dřevo se vyznačuje vysokým zastoupením fenolických látek, především ligninu, které jsou obtížně rozložitelné a mohou v rozkladu hrát klíčovou roli. Tyto fenolické látky jsou v určité, avšak menší, míře zastoupeny také v opadech rostlin, které nám sloužily jako modelové substráty pro rozklad celkové organické hmoty přítomné na daných plochách lesa.

Tato práce by měla přispět k poznání dynamiky procesu dekompozice fenolických látek a tím i celkové dekompozice rostlinné organické hmoty, a k nalezení vhodného metodického postupu při zkoumání rozkladu fenolických látek.

Cíle práce:

- Zopakovat a rozšířit měření z bakalářské práce (Applová, 2008) o určení vlivu inokulace půdním extraktem na aktivity fenolytických enzymů během inkubace vzorků vybraných typů opadů z povodí Plešného a Čertova jezera.

- Zaměřit se na aktivitu fenoloxidáz (PhOx), peroxidáz (PerOx) a nově na aktivitu Mn-peroxidázy (MnP), která může hrát klíčovou roli při rozkladu opadu s vysokým obsahem fenolických látek.
- Určit vliv chemického složení opadů na aktivitu fenolytických enzymů s důrazem na vliv fenolických látek (nízkomolekulárních i vysokomolekulárních forem).
- U vybraných enzymů určit závislost jejich aktivit na teplotě.

2. Literární rešerše

2.1. Mikroorganismy rozkládající rostlinný opad

Na rozkladu opadu se podílí mnoho skupin organismů. Rozklad hlavních složek opadu, celulózy, hemicelulóz a ligninu je však záležitostí výhradně bakterií a hub.

Bakterie se podílejí především na rozkladu cukrů, škrobu a bílkovin. Jsou schopné rychlejší reakce na přísun těchto látek do půdy (Henriksen and Breland, 1999; Witkamp, 1966), a proto se uplatňují především na počátku dekompozice (Henriksen and Breland, 1999). Na rozkladu rostlinného opadu se podílejí například bakterie rodu *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium* (Dilly et al., 2004). Pokud opad ve větším množství obsahuje fenolické látky, dominují houby a vláknité bakterie aktinomycety, které jednobuněčné bakterie přerůstají (Brady and Weil, 2002). Opad na povrchu půdy je rovněž dostupnější pro houby, které jsou schopné myceliem překonat části půdy s nepříznivými podmínkami a k opadu dorůst. Bakterie nejsou schopné se pohybovat mimo vodní film na povrchu půdních částic a využívají pouze substrát ve svém bezprostředním okolí, proto dávají přednost substrátům ve směsi s půdou (Brady and Weil, 2002).

Houby rozkládají všechny složky rostlinného opadu. Ve srovnání s bakteriemi jsou efektivnější, protože zabudují zhruba 50% hmoty opadu, zatímco bakterie pouze 20% (Brady and Weil, 2002). Optimální pH hub je kolem 5, což je důležité pro rozklad organické hmoty v kyselých půdách jehličnatých lesů. Bakterie, včetně aktinomycet, dávají přednost pH kolem 7 (Rousk et al., 2009; Li et al., 2008).

Na rozkladu dřevní hmoty, jejíž podstatnou součástí jsou fenolické látky (často polymerizované aromatické sloučeniny s navázanými OH skupinami), se podílejí tři hlavní skupiny hub (Fungi): houby bílé hniloby („white rot fungi“, WR houby), houby hnědé hniloby („brown rot fungi“, BR houby) a houby měkké hniloby („soft rot fungi“, SR houby). Tyto skupiny hub jsou pojmenované podle produktu rozkladu. WR houby jsou známé schopností rozkladu ligninu (polyaromatická obtížně rozložitelná složka rostlinné hmoty), ale nejsou jediné (Steffen et al., 2000). Zvláštní skupinou rozkladačů jsou endofytické mikroorganismy, významní zásadním zastoupením ve společenstvech mikroorganismů na počátku dekompozice, a schopností rozkládat lignin (Osono and Hirose, 2009).

2.1.1. Endofyti a epifyti

Endofytické houby nalezneme uvnitř hostitelova rostlinného pletiva, kde žijí po celý svůj životní cyklus nebo po jeho část (Wilson, 1995). Jsou velmi časté. Mnoho rostlin, zvláště dřeviny, mohou hostit i větší množství druhů najednou (Faeth and Hammon, 1997). Zahrnují široké spektrum hub, včetně patogenů a dormantních saprofytů (Osono, 2006). Druhové složení záleží na stáří lesa, v homogenním porostu na jeho genetické struktuře, na hybridizaci napadených rostlin a na podmínkách prostředí (Saikkonen, 2007).

Populace endofytů nelze zanedbat. Hustota endofytů v rámci jednoho listu může být totiž až 10^5 cfu (colony forming units – jedinců schopných vytvořit samostatnou kolonii) (Lodewyck et al., 2002) a listy jednoho rostlinného druhu mohou hostit více než 50 endofytických kultivovatelných houbových druhů (Pang et al., 2008).

Množství endofytů se mění v prostoru a v čase. Věk listů a jehlic je silně pozitivně korelovaný s houbovou kolonizací (Lehtijärvi and Barklund, 2000; Wilson and Carroll, 1994; Helander et al., 1993). Kvůli neschopnosti šířit se na větvičky a pak zpět na listy (Sieber et al., 1991), je délka života endofyta omezená na dobu existence napadeného listu. Endofyti jsou závislí na vzdušné vlhkosti, která je nejvyšší u báze listů a jehlic, a proto v rámci jednoho listu se nejvíce vyskytují právě tam (Helander et al., 1993; Bernstein and Carroll 1977).

Složení společenstev epifytů žijících na povrchu listů se od endofytického liší. Většina epifytů má jen omezenou schopnost rozkládat opad a lignin. Rozdílná schopnost rozkladu endofytů a epifytů je vysvětlována rozdílným chemickým složením uvnitř listů a na jejich povrchu. Vosky a kutin na povrchu jsou velmi špatně rozložitelné a odpuzují vodu, proto je kolonizace epifyty dána především jejich schopností produkovat spóry. Distribuce je dále ovlivněná zásobeností snadno rozložitelnými uhlovodíky (Osono and Takeda, 2000).

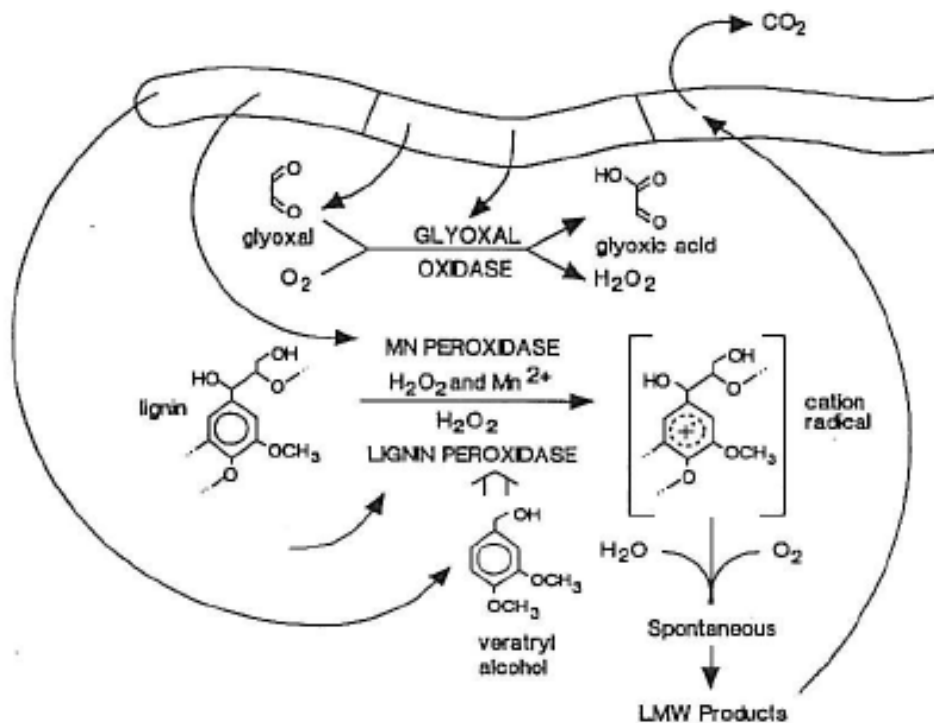
Endofyté a epifyté jsou schopní přežít po opadu listu a podílet se na jeho rozkladu (Promputtha et al., 2007; Osono, 2006), včetně ligninu (Osono and Hirose, 2009; Osono and Takeda, 2000). Přibližně dvě třetiny druhů endofytických hub, nacházejících se na listech nebo v nich, se v nich vyskytují i po jejich odumření (Promputtha et al., 2007). Osono (2006) udává, že endofytické houby mohou tvořit 2 až 100% z houbových saprofytů. Většina endofytů rychle vymizí, ale několik druhů může přežít až do pozdních stádií rozkladu. Pokud byly listy před opadnutím napadeny endofyty, jsou jako opad snadněji rozložitelné i jinými houbami (Osono and Hirose, 2009).

Schopnost přeměny na saprofyta je druhově závislá. Například *Trichoderma viride* je schopná vytrvat na borovém opadu více než 5 měsíců, ale *Marasmius androsaceus* rychle odumírá (Cox et al., 1997). Příkladem endofyta/saprofyta může být i *Lophodermium* sp. izolované z borovice vejmutovky (*Pinus strobus*) (Deckert et al., 2001).

2.1.2. WR houby

WR houby jsou z oddělení *Basidiomycetes* a *Ascomycetes*. Mezi WR houby můžeme dále řadit například rody *Ganoderma*, *Trametes* a *Phellinus* (Killham, 1994). Jsou rozšířenější než BR houby. Rozkládají především tvrdé dřevo listnatých stromů (Carlile et al., 2001). Většina z nich je schopná degradovat i celulózu. Produktem rozkladu ligninu je bílý prášek. Hlavními enzymy WR hub jsou mangan peroxidáza (MnP) a lignin peroxidáza (LiP). Některé WR houby nejsou schopné produkovat LiP ale pouze lakázy a MnP (Périer and Gold, 1991), přičemž enzymatický aparát zůstává stejně účinný (Srebotnik et al., 1994). Například *Pycnoporus cinnabarinus* ale neprodukuje ani LiP ani MnP, jen lakázy (Eggert et al., 1996b). Nicméně Lankinen a kol. (2001) tvrdí, že absence naměřené aktivity LiP může být způsobena nevhodnými kultivačními podmínkami, nebo inaktivací během extrakce a purifikace.

Princip rozkladu fenolických látek je nejvíce prozkoumaný u houby *Phanerochaete chrysosporium*. Samotnému oxidativnímu štěpení aromatických jader fenolických látek předchází hydroxylace a demethylace molekul (Berg and McClaugherty, 2008). Reakce probíhají pouze za přítomnosti peroxidu vodíku a enzymů (Obr. 1), LiP a MnP, uvolňujících velmi reaktivní volné radikály kysíku, které reagují s molekulou ligninu, štěpí kovalentní vazby a uvolňují mnoho různých fenolických sloučenin ve formě kationtových radikálů, které reagují s kyslíkem a vodou a vznikají nízkomolekulární látky, které jsou zpětně přijímány houbovou hyfou. Peroxid vodíku vzniká oxidací glyoxalu, vylučovaného houbou, nebo oxidací glukózy nebo alkoholů (Carlile et al., 2001; de Jong et al., 1994).



Obr 1. Ligninolýtický systém WR houby *Phanerochaete chrysosporium* (převzato od de Jong et al., 1994).

2.1.3. BR houby

BR houby patří především do čeledi *Coniophoraceae*, řád *Boletales*, oddělení *Basidiomycetes*. Produktem rozkladu je hnědý prášek. Rozkládají především měkké dřevo jehličnanů (Carlile et al., 2001). Podílejí se na rozkladu celulózy a hemicelulóz, ale některé druhy nejsou schopné rozkladu čisté celulózy, pouze v komplexu s ligninem. Mění strukturu ligninu, ale nedokážou ho kompletně mineralizovat (Carlile et al., 2001). Jsou závislé na přítomnosti kyslíku a produkují hydroxylové radikály, které napadají dřevo (Hatakka, 2001) a způsobují demethoxylaci za vzniku methanolu (Eriksson et al., 1990). Zbylý lignin je díky většímu počtu fenolických hydroxylových skupin reaktivnější, protože právě z těchto skupin během štěpení WR houbami vznikají kationtové radikály (de Jong et al., 1994).

2.1.4. SR houby

SR houby patří především do oddělení *Ascomycetes* a *Deuteromycetes* a jsou nejaktivnější ve vlhkém dřevě. Carlile a kol. (2001) uvádějí jako běžné rody jen *Chaetomium*, *Fusarium* a *Paecilomyces*, které se běžně vyskytují v půdě a nepatří mezi pravé kolonizátory dřeva. Crawford

(1981) naopak uvádí ve svém review mnoho studií dokládajících, že SR houby jsou schopné snížit obsah ligninu ve dřevě, což bylo potvrzeno i v laboratorních podmínkách (Nilsson et al., 1989). Rozkládají však pouze tvrdé dřevo oxidací syringylového ligninu. Měkké dřevo nejsou schopné rozkládat kvůli vysokému zastoupení guaiacylových jednotek (Nilsson et al., 1989).

2.2. Fenolytické enzymy

Fenolické látky jsou rozkládány extracelulárními fenolytickými enzymy, z nichž nejvýznamnější jsou fenoloxidázy (včetně lakáz, LAC; EC 1.10.3.2), peroxidázy (EC 1.11.1) a mangan - peroxidázy (EC 1.11.1.13) (Leonowicz et al., 1999).

Všechny tyto enzymy jsou kromě degradace fenolických látek schopné také jejich polymerizace, tedy zvyšování jejich odolnosti vůči rozkladu, a tvorby humusu, případně jejich intracelulární formy slouží k syntéze ligninu v rostlinách (Hofrichter et al., 2001; Dean et al., 1998; Bending and Read, 1997; Bourbonnais et al., 1995; Liu et al., 1994).

2.2.1. Fenoloxidázy (PhOx)

Fenoloxidázy jsou široká skupina fenolytických enzymů. Extracelulární formy slouží k rozkladu ligninu a humusu a k získání živin a energie. Houby i bakterie používají fenoloxidázy ke snížení toxicity fenolických látek, iontů kovů, a k antimikrobiální obraně (Sinsabaugh, 2010).

Lakázy (LAC; EC 1.10.3.2)

Lakázy se řadí mezi fenoloxidázy a jsou to glykoproteiny s 2 – 4 atomy mědi ve své molekule (Eggert et al., 1996b; Thurston, 1994). Jsou velmi častými enzymy hub (Mayer and Staples, 2002). Jejich produkce byla nalezena například u *Trametes gibbosa*, *Trametes hirsuta*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Coriolopsis polyzona*, *Stereum hirsutum*, *Dichomitus squalens* a *Ganoderma valesiacum* (Nerud et al., 1991). Obvykle vznikají v cytoplasmě houbové buňky (Mayer and Staples, 2002). Lakáz je mnoho typů. Společné mají aktivní centrum, ale liší se mezi sebou v molekulové hmotnosti (typicky 60 – 80 kDa) (Thurston, 1994), struktuře proteinové části a cukerné jednotky (Mayer and Staples, 2002), optimálním pH a dalších vlastnostech.

Lakázy jsou nespecifické enzymy, tzn. katalyzují více typů reakcí, například oxidaci kresolu nebo kyseliny askorbové (Mayer and Staples, 2002). Lakázy nejsou schopné rozkládat lignin přímo, protože mají příliš nízký redox potenciál (Eggert et al., 1996a) a protože jako

vysokomolekulární látky neprojdou sekundární buněčnou stěnou. Jsou napojeny na její vnější stranu a produkují mediátory, například *P. cinnabarinus* produkuje 1-hydroxybenzotriazol (Call, 1994). Mediátorem může být i 2,2,9-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS) (Bourbonnais, 1995). Lakázy také mohou sloužit houbě k odstraňování produktů rozkladu jinými enzymy, například mangan – peroxidázami nebo peroxidázami. Tyto produkty jsou pro houbové mycelium toxické a lakázy je zneškodňují polymerizací (Thurston, 1994).

Lakázy ale mají i jiné funkce. Tvoří pigmenty, které slouží k výztuži mycelia a tvorbě agregátů. Je to například u hub *Daldinia concentrica* a *Lentinus edodes* (Thurston, 1994). Lakázy se zapojují rovněž do polymerizace fenolických látek (Bourbonnais et al., 1995; Liu et al., 1994) v rostlinách (Mayer and Staples, 2002; Harvey and Walker, 1999; Mayer and Harel, 1979). Lakázy se v některých případech zapojují jen do první fáze lignifikace, zatímco v druhé fázi dominují peroxidázy (Stergiades et al., 1992).

2.2.2. Peroxidázy (PerOx)

Lignin peroxidázy (LiP; EC 1.11.1.14)

Lignin peroxidázy mají prostetické skupiny obsahující železo (Sinsabaugh, 2010). Peroxid vodíku, který je potřeba k jejich činnosti, vzniká enzymatickou oxidací aryl alkohol oxidáz hydroxylových skupin na carbonyly a redukcí kyslíku na H₂O₂. Ke vzniku peroxidu vodíku vedou také redukce kyslíku glyoxaloxidázami, galaktózooxidázami a glukózooxidázami.

Lignin peroxidázy mají dostatečně vysoký redox potenciál, aby mohly štěpit nefenolické aromatické sloučeniny (Eggert et al., 1996a). Jejich produkce je závislá na nízkých koncentracích dusíku u hub rodu *Phanerochaete*, ale nejedná se o obecný jev. Aktivita těchto enzymů je také indukována přítomností různých fenolických látek. Vysoká koncentrace manganatých kationtů posunuje produkci peroxidáz směrem k mangan peroxidázám (Sinsabaugh, 2010).

2.2.3. Mangan peroxidázy (MnP)

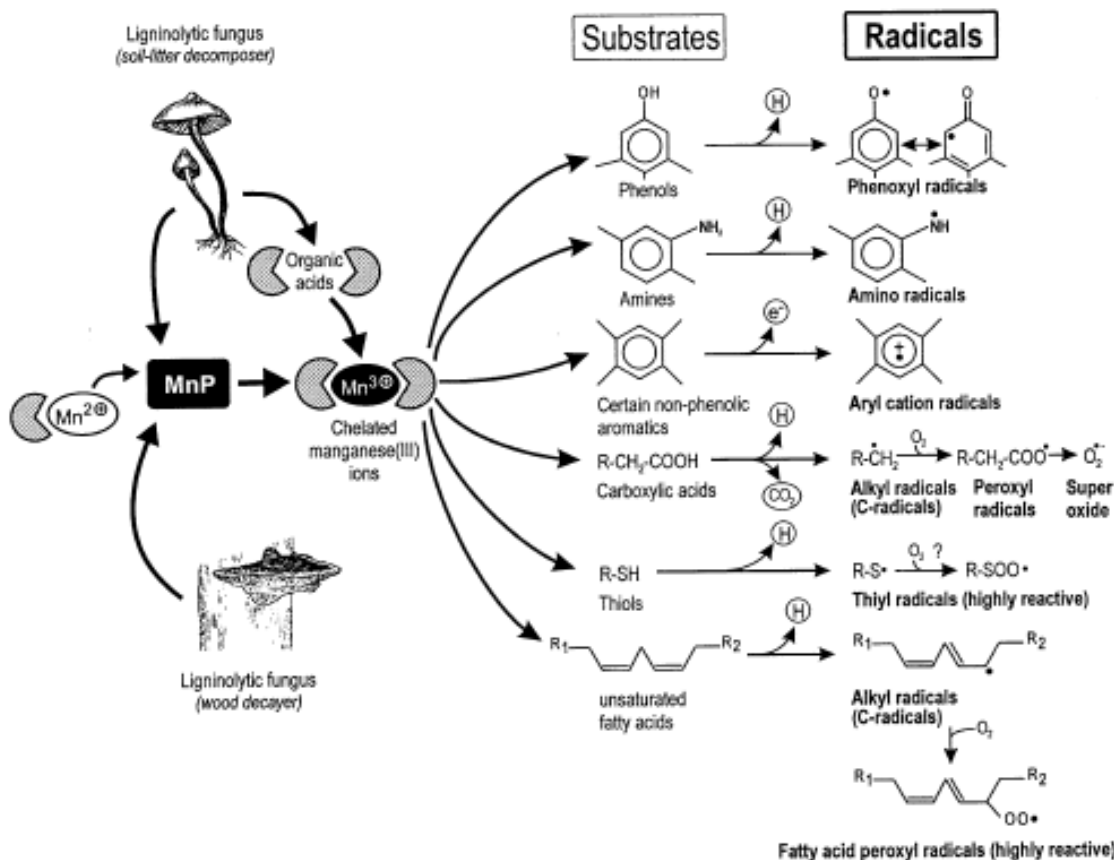
Mangan peroxidáza (MnP) byla poprvé popsána u *Phanerochaete chrysosporium* (Kuwahara et al., 1984). Leonowicz a kol. (1999) je řadí mezi fenoloxidázy a Sinsabaugh (2010) mezi lignin peroxidázy.

Mangan peroxidázy zahrnují mnoho různých enzymů. Typická velikost molekuly je 45 kDa (Hofrichter, 2002). Jedna houba může produkovat více typů MnP, které mohou být

fylogeneticky a strukturně odlišné (Hildén et al., 2005). MnP se podílejí na velkém množství různých reakcí (Obr. 2). Ke štěpení fenolických látek vyžadují přítomnost manganu (Périé and Gold, 1991), který se přirozeně vyskytuje v opadu, a peroxidu vodíku. Podle Hofrichter a kol. (1999) není peroxid vodíku k depolymerizaci ligninu vždy nutný. MnP v takovém případě vykazuje „oxidativní“ reakci, která je částečně citlivá na superoxid dismutázu. Výsledkem reakce jsou radikály a peroxidy z malonátu (Hofrichter et al., 1999).

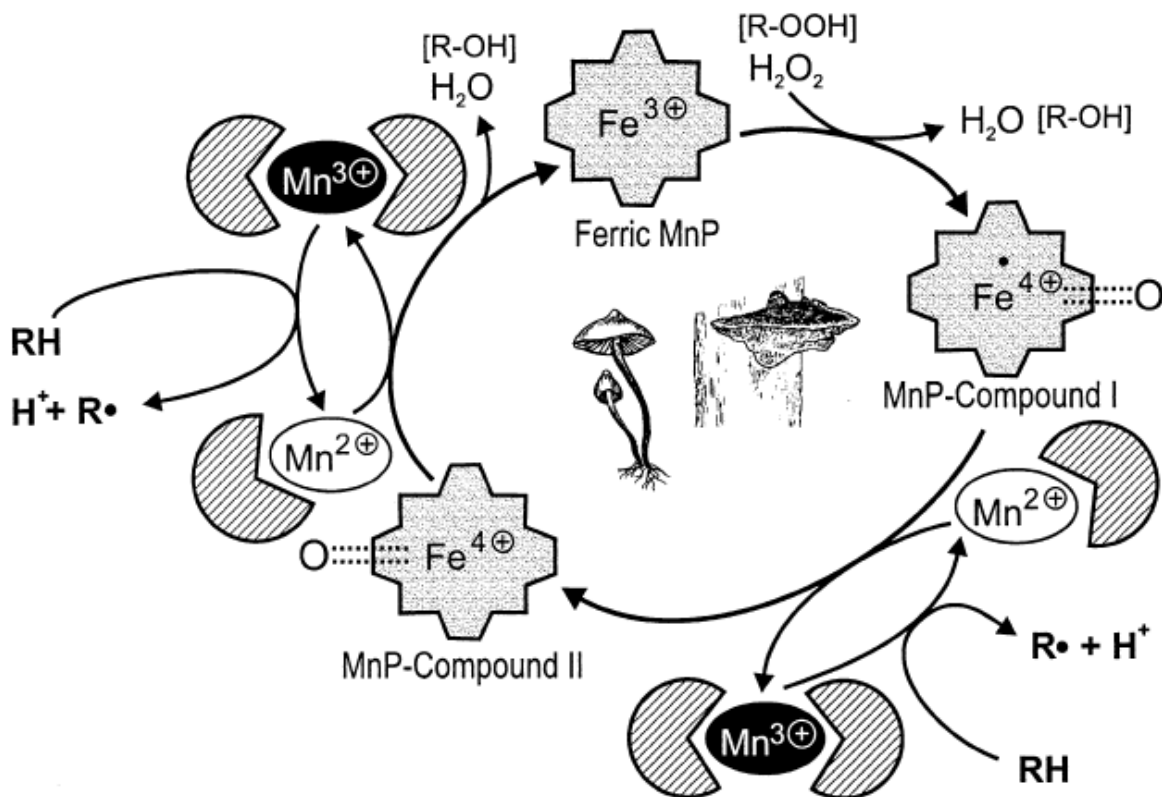
Aktivita MnP je pozitivně závislá na koncentraci Mn^{2+} kationtů (Boer et al., 2006). To je zvláště důležité při dekompozici smrkového jehličí (Berg and McClaugherty, 2008). Hofrichter a kol. (2001) však našli při vyšších koncentracích Mn^{3+} nižší aktuální aktivitu MnP během dekompozice ligninu. Mangan je zapojen i do regulace jiných enzymů, jako je lakáza (Archibald and Roy, 1992) a lignin peroxidáza (Perez and Jeffries, 1992).

MnP byla kvůli neschopnosti přímo oxidovat nefenolické sloučeniny dlouho považována za méně důležitou v rozkladu ligninu (Kuwahara et al., 1984). Později se zjistilo, že rozkládá aromatické sloučeniny (Bao et al., 1994) a depolymerizuje syntetický lignin (Wariishi et al., 1991). MnP z *Phlebia radiata* je schopná depolymerizace ligninu borového dřeva, ale jen za přítomnosti kooxidantů, jako jsou nenasycené mastné kyseliny (Hofrichter et al., 2001). MnP je však také schopná polymerizovat nízkolekulární rozpustné složky dřeva (Hofrichter et al., 2001).



Obr. 2. Tvorba radikálů enzymem MnP za přítomnosti různých substrátů (převzato od Hofrichter, 2002).

Cyklus katalýzy začíná navázáním peroxidu vodíku nebo organického peroxidu na železitou část enzymu a vznikem komplexu železa s peroxidem (Obr. 3). Rozštěpení vazby mezi kyslíky v molekule peroxidu vyžaduje přenos dvou elektronů z hemu, proto vzniká MnP sloučenina I (MnP-Coumpound I), což je Fe⁴⁺-oxo-porfyrinový radikálový komplex. Poté je heterolyticky rozštěpena vazba mezi kyslíky a vzniká jedna molekula vody. Následná redukce pokračuje na MnP sloučenině II (Fe⁴⁺-oxo-porfyrinový komplex). Monochelatizovaný Mn²⁺ ion se stává donorem jednoho elektronu pro tento porfyrinový meziprodukt a Mn²⁺ je oxidováno na Mn³⁺. Redukce Sloučeniny II probíhá podobně a vzniká další Mn³⁺ z Mn²⁺. To vede k produkci enzymu a uvolnění druhé molekuly vody (Obr. 3) (Hofrichter, 2002).



Obr. 3. Mangan – peroxidázový (MnP) katalytický cyklus (převzato od Hofrichter, 2002).

Produkce MnP byla nalezena například u *Phanerochaete chrysosporium* (Kuwahara et al., 1984), *Agaricus bisporus* (Lankinen et al., 2001), *Phlebia radiata* (Hofrichter et al., 2001), *Trametes gibbosa*, *Trametes hirsuta*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Coriolopsis polyzona*, *Stereum hirsutum*, *Dichomitus squalens* a *Ganoderma valesiacum* (Nerud et al., 1991). Některé houby, například *Agaricus bisporus* produkují z fenolytických enzymů jen MnP (Lankinen et al., 2001).

2.3. Vliv chemického složení rostlinného opadu na jeho rozklad

Nejvíce zastoupenými prvky v opadu jsou uhlík (45%), kyslík (45%), vodík (6%) a dusík (1,5%). Důležitým prvkem pro dekompozici fenolických látek je mangan. Slouží k syntéze enzymu mangan – peroxidázy (MnP), která je rozkládá (Berg and McClaughtery, 2008). Hlavními makromolekulárními složkami suchého rostlinného opadu jsou celulóza (45%), fenolické látky (22%), hemicelulózy (18%), proteiny (8%), cukry a škroby (5%) a tuky a vosky (2%) (Brady and Weil, 2002).

Celulóza je nejrozšířenější biopolymer na zemi (Wei et al., 2009). Je to polysacharid s poměrně pravidelnou strukturou. Základem její molekuly je přímý řetězec tvořený glukózovými jednotkami (Rayner and Boddy, 1988). Celulóza je rezistentní k hydrolýze (Carlile et al., 2001). Hemicelulózy jsou polymery různých cukrů, jako je arabinóza, xylóza, mannóza, galaktóza. Mají kratší molekuly, větvené nebo přímé řetězce. Hemicelulózy jsou zastoupeny více ve dřevě listnatých stromů (25 – 40%) než jehličnatých (25 – 30%) (Rayner and Boddy, 1988).

2.3.1. Fenolické látky

Fenolické látky obsahují ve své molekule jedno nebo více aromatických jader s navázanou OH skupinou. Rozdělují se na nízkomolekulární a vysokomolekulární. Nízkomolekulární jsou poměrně dobře rozložitelné a mohou sloužit jako zdroj snadno dostupné energie a uhlíku (Kanerva et al., 2006; Kraus et al., 2004; Fierer et al., 2001). Vysokomolekulární se vyznačují obtížnou rozložitelností. Ta je dána především jejich složitou nepravidelnou strukturou. Mezi vysokomolekulární fenolické látky se řadí například taniny a lignin. V živé rostlině slouží k obraně proti herbivorům, mikrobiálním patogenům včetně hub (Carlile et al., 2001) a tvorbě mechanické výztuže.

Fenolické látky nalezneme i v bylinách, ale více jich je v dřevnatých rostlinách. Jehličí obsahuje přibližně 40% fenolických látek a opad třtiny kolem 2% (Applová, 2008). Obsah fenolických látek se zvyšuje se stářím rostliny (Booker and Maier, 2001).

Taniny

Taniny jsou různorodou skupinou polyfenolických sloučenin v rostlinách. V opadech dřevin tvoří 15 – 25% suché hmoty (Booker and Maier, 2001; Yu and Dahlgren, 2000). Kvůli jejich diverzitě je obtížné je definovat. Od ostatních fenolických sloučenin se liší schopností sorbovat se na půdní částice (Halvorson and Gonzalez, 2008).

Interakce mezi půdními mikroorganismy a taniny jsou složité a závisí na vlastnostech taninů (Fierer et al., 2001), na jejich množství (Schweitzer et al., 2005) a na druhu mikroorganismu (Fierer et al., 2001; Souto et al., 2000). O některých taninech se soudí, že jsou pro mikroorganismy toxické (Fierer et al., 2001; Cowan, 1999).

Společně s dalšími fenolickými sloučeninami vytváří jejich lehké frakce (molekulová hmotnost do 1000 g/mol) (Fierer et al., 2001) značný zdroj uhlíkatých substrátů v půdě (Kanerva

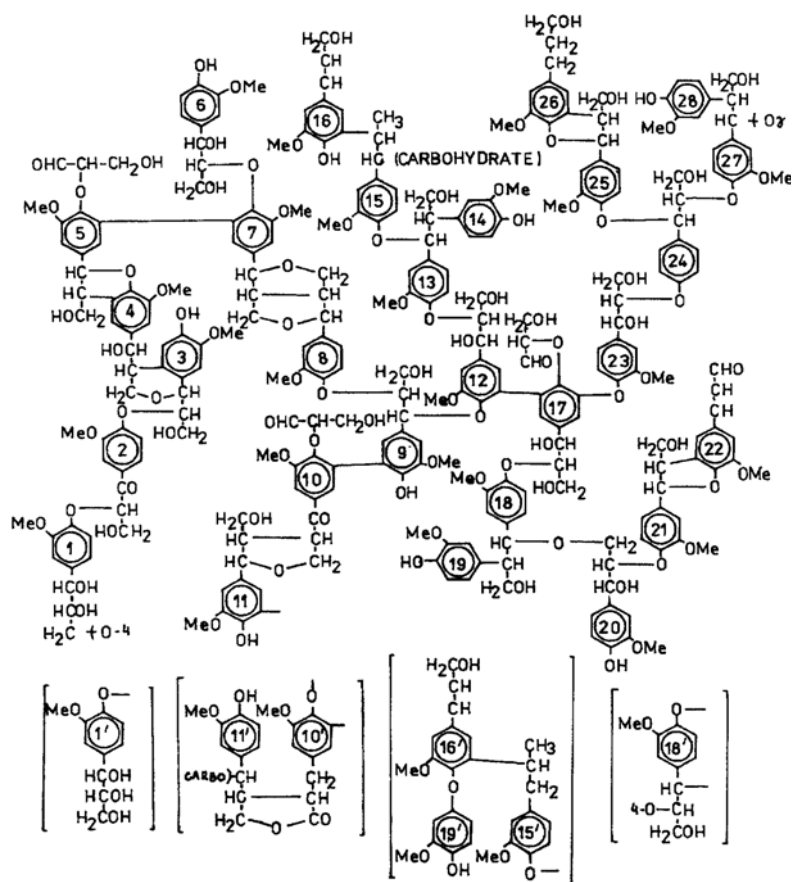
et al., 2006; Kraus et al., 2004; Fierer et al., 2001). Tím zvyšují mikrobiální aktivitu, což způsobuje krátkodobou imobilizaci dusíku (Kanerva et al., 2006; Kraus et al., 2004). Některé taniny včetně kyseliny taninové vážou kovalentními nebo iontovými vazbami labilní C a N do glomalinu (teplotně odolný glykoprotein), čímž snižují množství labilního dusíku a uhlíku v půdě (Halvorson and Gonzales, 2008). Vysokomolekulární taniny (molekulová hmotnost větší než 1000 g/mol) (Fierer et al., 2001) snižují půdní mikrobiální respiraci a mírně zvyšují mineralizaci dusíku (Kanerva et al., 2006). V experimentu Fierera a kol. (2001) došlo po jejich přidání vlivem vázání dusíku extracelulárními enzymy ke snížení čisté mineralizace dusíku.

Lignin

Lignin je druhým nejrozšířenějším biopolymerem na zemi (Wei et al., 2009). Je to polyfenolická vysokomolekulární látka (molekulová hmotnost je 10 000 až více než milion g/mol) (Killham, 1994) se složitou nepravidelnou strukturou (Obr. 4). Základními strukturními podjednotkami jsou kumaryl alkohol, koniferyl alkohol a sinapyl alkohol. Jsou propojeny množstvím různých vazeb. Běžnými jsou arylové, etherové a esterové vazby. Vzniká třírozměrný polymer neurčité velikosti. Vypreparovaný lignin vypadá jako tmavě hnědý prášek (Carlile et al., 2001).

Lignin se v rostlině nevyskytuje sám, ale vždy ve formě lignocelulózy (Carlile et al., 2001). Lignocelulóza se vyskytuje i v nedřevnatých rostlinách. Lignin zajišťuje větší pevnost sekundární buněčné stěny, především vodivých a podpůrných pletiv. Nalezneme ho ale i v primární buněčné stěně (Procházka et al., 1998), kde se ukládá do mikrokapilárních prostor (Votrubová, 1996). V rostlině funguje jako výztuž pro celulózu a hemicelulózu.

Degradace ligninu probíhá až po vyčerpání snadno rozložitelných částí opadu. V průběhu degradace opadu se tedy jeho zastoupení zvyšuje. Roste také jeho negativní vliv na mineralizaci opadu (Wang et al., 2004). Část ligninu navíc vzniká během rozkladu opadu z nízkomolekulárních fenolických sloučenin. Tímto způsobem se také tvoří půdní humus (Brady and Weil, 2002).



Obr. 4. Model struktury ligninu měkkého dřeva (převzato od Leonowicz et al., 1999)

Zvláštní mechanismus se vyvinul pro degradaci lignocelulózy. Houba s celulolytickým a ligninolytickým enzymatickým aparátem rozkládá celulózu. Její úbytek vede k nedostatku dusíku, což vyvolá větší produkci ligninolytických enzymů, které odstraní vrstvu fenolických látek. Jakmile je opět dostupná celulóza, produkce ligninolytických enzymů je potlačena (Berg and McClaugherty, 2008).

2.4. Vliv nutričních látek na rozklad opadu a fenolických látek

2.4.1. Vliv dusíku (N) a fosforu (P) v opadu

Dusík a fosfor jsou základními prvky potřebnými pro tvorbu mikrobiální biomasy. Jejich množství se vztahuje k množství uhlíku (C) a vyjadřuje se poměrem C:N a C:P. Obecně lze říci, že poměr C:N vyšší než 30 indikuje nedostatek dusíku a nižší hodnoty jeho nadbytek (Brady and Weil, 2002). Poměr C:N třtiny (*Calamagrostis villosa*) je přibližně 30 a smrkového jehličí (*Picea*

abies) přibližně 40 (Applová, 2008). Pokud jsou v opadu více zastoupeny fenolické látky, jejich rozklad nemusí odpovídat hodnotě C:N (Moore et al., 2006), protože tyto opady jsou rozkládány především houbami, které díky vyššímu poměru C:N (Griffin, 1972) vlastní biomasy vyžadují méně dusíku v potravě. Tyto houby zajistí rychlejší mineralizaci, než jaká by odpovídala poměru C:N. Proto C:N jehličí není dobrým prediktorem dekompozice (Berg and McClaugherty, 2008).

Poměr C:P má pro určení potenciální rozložitelnosti opadu podobný význam. Jeho kritická hodnota je vyšší – podle Moora a kol. (2006) přibližně 700:1 (w:w), ale Šantrůčková (2001) udává, že k imobilizaci fosforu dochází, pokud je poměr C:P větší než 300:1 (w:w), a k mineralizaci a následnému vyplavování, pokud je tento poměr menší než 200:1 (w:w).

Vliv dusíku a fosforu na dekompozici lze jen obtížně oddělit, protože oba prvky jsou hlavními nutrienty a jejich množství v opadu jsou v korelaci (Berg and McClaugherty, 2008).

2.4.2. Vliv dostupných živin na rozklad fenolických látek

Důležitější než celkový obsah dusíku a fosforu je obsah jejich dostupných forem (Wang et al., 2004). Vliv dostupného dusíku na samotný růst biomasy fenolytických hub je pozitivní (Leatham and Kirk, 1983). Vliv dostupného N na aktivitu hub rozkládajících fenolické látky a na aktivitu fenolytických enzymů není konzistentní. Záleží na několika faktorech:

(i) Druh houby. Fenolytická aktivita některých hub je dusíkem inhibována, jiných ne (Leatham and Kirk, 1983). Inhibice N (ve formě kyseliny glutamové) se projevuje například u fenolytické aktivity *Phanerochaete chrysosporium* (Leatham and Kirk, 1983). Oproti tomu rody *Pholiota*, *Polyporus* a *Agrocybe* z oddělení *Basidiomycetes*, vykazovaly po zvýšení N (ve formě přídatku NH_4NO_3) vyšší enzymatickou aktivitu (Allison et al., 2009). Také fenolytická aktivita *Lentinula edodes* a *Pleurotus ostreatus* byla méně citlivá na vysoké koncentrace dusíku ve formě kyseliny glutamové (Leatham and Kirk, 1983).

(ii) Druh enzymu. Eggert a kol. (1996b) u houby *Pycnoporus cinnabarinus* zjistili v prostředí bohatém na dusík ve formě NH_4^+ snížení lakázové aktivity, zatímco peroxidázová aktivita nebyla téměř ovlivněna. Peroxidázová aktivita vymizela ve vzorcích vrchní vrstvy opadového horizontu půdy po přídatku N ve formě NH_4^+ , kde lakázová aktivita nebyla téměř ovlivněna (Enrique et al., 2008).

(iii) Množství dodávaného dusíku. Silné obohacení dusíkem vede ke snížení mikrobiální respirace a mírné obohacení ji zvyšuje (Enrique et al., 2008). Toto je zvláště patrné v prostředí

s nízkými hladinami dostupného dusíku, u celulózy a dřeva, kde nízká koncentrace dostupných živin zvyšuje pravděpodobnost pozitivní reakce na přídavek N. Negativní vliv na rozklad fenolických látek, především ligninu, může být umocněn akumulací dusíku a fosforu v opadu v průběhu dekompozice. Tato akumulace je způsobená úbytkem uhlíku respirací, zatímco dusík a fosfor, pokud není vyplavován, v opadu zůstává (Berg and McClaugherty, 2008). Dlouhodobě vysoká koncentrace může vést k přizpůsobení mikroorganismů a ke snížení citlivosti na hladinu dusíku v prostředí. Proto mineralizace ligninu může probíhat i nezávisle na množství přidávaného dusíku (Allison et al., 2009).

Vliv dusíku na rozklad ligninu se mění s časem. Na počátku, při nízkém obsahu dusíku každé jeho navýšení znamená zvýšení mineralizace organické hmoty. Pokud je dusík přístupný ve větším množství, zpočátku se urychlí mineralizace uhlíku, ale ke konci rozkladu se kumulativní respirace ve srovnání s opady s nižším zastoupením dusíku sníží. Obsah ligninu v podmínkách vysokého zastoupení dusíku ve formě NO_3^- je v negativní korelaci s rychlostí dekompozice opadu (Wang et al., 2004).

Přídavek labilního uhlíku (sacharóza) do půdy vede ke snížení druhové pestrosti a ke změně složení společenstva saprofytů směrem k r – stratégům, kteří využívají jako substrát primárně snadno rozložitelné látky. K – stratégové, pomalu rostoucí houby rozkládající celulózu a lignin, jsou potlačeni, což vede ke zpomalení rozkladu opadu (Chigineva et al., 2009).

2.5. Vliv teploty

Teplota je důležitým faktorem ovlivňujícím všechny mikrobiální procesy (Brady and Weil, 2002). Mikrobiální procesy vedoucí k rozkladu ligninu však zatím byly zkoumány převážně za poměrně vysokých teplot v rozmezí 5 – 80°C (Ceylan et al., 2008; Niladevi and Prema, 2008; Baborová et al., 2006), což znamená, že chybí poznatky o vlivu teploty kolem 0°C a srovnání s vyššími teplotami. Teploty na výzkumných plochách povodí Plešného a Čertova jezera se pohybují právě mezi 0°C (opadová vrstva půdy v zimě pod sněhovou pokrývkou) a 10°C (opadová vrstva půdy v létě).

Z literatury je patrné, že mikrobiální aktivita za teplot kolem bodu mrazu je velmi významná (Jones et al., 1999; Fahnestock et al., 1998; Clein and Schimel, 1995). V boreálních oblastech tvoří emise CO_2 z půdy v zimním období 10 – 30% emisí za celý rok (Clein and Schimel, 1995). Mineralizace C a N v půdách tajgy a tundry probíhá i za teploty -5°C (Clein and

Schimel, 1995). Dá se tedy očekávat, že i extracelulární fenolytické enzymy jsou aktivní. Ovšem, s klesající teplotou se aktivita snižuje (Ceylan et al., 2008; Niladevi and Prema, 2008; Baborová et al., 2006). Grafy závislosti naměřené fenolytické enzymatické aktivity na teplotě naznačují, že teploty kolem 0°C můžou znamenat snížení potenciálních fenolytických enzymatických aktivit na méně než 10% z maxima za optimálních teplot (Baborová et al., 2006; Bending and Read, 1997). Jak ukazují předchozí experimenty, aktivita fenoloxidáz a peroxidáz je při teplotě 0°C významná (Applová, 2008).

Rozklad fenolických látek za tak nízkých teplot je umožněn především adaptovanými mikrobiálními společenstvy (Robinson, 2001; Bergero et al., 1999). Důležitá je přítomnost sněhové pokrývky, která chrání opadovou vrstvu půdy před velmi nízkými teplotami a promrznutím (Fahnestock et al., 1998). Existence vody v tekutém skupenství, která je nezbytná pro mikrobiální život, je dána obsahem solí, které snižují teplotu bodu tání až na -5°C (Šantrůčková, 2001).

Pokud se vrátíme k aktivitám fenolytických enzymů a vyšším teplotám, bylo zjištěno, že jejich teplotní optimum se pohybuje v rozmezí 30 – 50°C (Niladevi and Prema, 2008; Baborová et al., 2006). Například teplotní optimum MnP houby *Irpex lacteus* bylo 50 – 60°C a při nízkých teplotách (5 – 10°C) vykázala asi 10% maximální aktivity (Baborová et al., 2006). MnP houby *Lentinula edodes* měla teplotní optimum pro oxidaci substrátu (2,6 - dimethoxyphenol) 40°C (Boer et al., 2006). Dalším příkladem je lakáza *Streptomyces psammoticus*, jejíž nejvyšší aktivita se projevila při 32°C (Niladevi and Prema, 2008). PhOx houby *Hymenoscyphus ericae* má optimum aktivity při 30°C, přičemž teplota 12°C znamenala snížení aktivity přibližně na polovinu (Bending and Read, 1997).

Vliv teploty na rozklad opadu není po celou dobu tohoto procesu stejný. Ze začátku, kdy dominují rychle rostoucí organismy a probíhá degradace snadno rozložitelných složek opadu, je vliv teploty na rychlost rozkladu významný. Později, za dekompozice obtížně rozložitelných látek jako je celulóza a fenolické látky včetně ligninu, se její vliv snižuje (Berg and McLaugherty, 2008).

2.6. Vliv pH

Hodnota pH je důležitým faktorem v rozkladu opadu, rozhodujícím, zda se na něm budou podílet více houby nebo bakterie. Vyšší pH vyhovuje bakteriím a nižší houbám. Přestože se snižujícím se pH klesá mikrobiální rozklad, pokles je relativně malý, pH 4,5 může znamenat snížení mikrobiální aktivity jen o jednu třetinu oproti aktivitě za pH 8,3. Důvodem je pravděpodobně podobná efektivita bakterií a hub v dekompozici. Velmi nízké hodnoty pH (menší než 4,5) vedou ke snížení produktivity rostlin a k zpřístupnění toxických forem hliníku, což může vést k celkové inhibici mikrobiální aktivity (Rousk et al., 2009).

Aktivity fenolytických enzymů vykazují silnou závislost na pH prostředí. Jejich optimum se většinou pohybuje v kyselé oblasti (pH 4,0 – 7,5) (Niladevi and Prema, 2008; Boer et al., 2006). Směrem k vyšším a nižším hodnotám pH se aktivita velmi rychle snižuje, zhruba symetricky jak k vyšším tak k nižším hodnotám (Baborová et al., 2006; Bending and Read, 1997; Eggert et al., 1996b).

Každý enzym má své specifické optimum a jeho hodnota rovněž závisí na druhu houby, která daný enzym vylučuje (Baborová et al., 2006; Bending and Read, 1997; Eggert et al., 1996b). Například lakáza *Pycnoporus cinnabarinus* měla optimum pH 4,0 a při pH 3,0 a 5,0 vykazovala přibližně 60% maximální aktivity (Eggert et al., 1996b). Nejvyšší aktivita MnP *Irpex lacteus* byla naměřena při pH 5,5 – 6,5, ale více než 60% maxima dosahovala v širším rozmezí pH 4,0 – 7,0. Při pH 3,5 byla naměřena nulová aktivita (Baborová et al., 2006).

2.7. Hypotézy

- 1) Aktivita fenoloxidáz, peroxidáz a Mn-peroxidáz bude vyšší v opadech s vysokým zastoupením vysokomolekulárních fenolických látek.
- 2) Inokulace půdním extraktem bude mít pozitivní vliv na mikrobiální respiraci, aktivitu fenoloxidáz, peroxidáz a Mn-peroxidáz.
- 3) Aktivita fenoloxidáz, peroxidáz a Mn-peroxidáz bude vyšší v 10°C.
- 4) V opadech se během inkubace sníží obsah vysokomolekulárních fenolických látek.
- 5) Reaktivita fenoloxidáz a peroxidáz poroste se zvyšující se inkubační teplotou.

3. Materiál a metody

3.1. Studijní plochy

Studované lokality se nalézají na území Národního parku Šumava. Klimaticky patří Šumava do oblasti chladné – nachází se v přechodném střeoevropském klimatu mírného pásma. Teplota půdy v roce 2001 a 2002 se pohybovala kolem 0°C v zimě a mezi 10 a 12°C v létě. Nejnižší průměrné roční srážky činí 800 - 900 mm na severovýchodních závětrných svazích oblasti a maxima 1550 mm dosahují při návětrí podél státní hranice.

Z geologického hlediska šumavskou oblast tvoří přeměněné horniny a hlubinné vyvřeliny moldanubika a moldanubického plutonu. Uplatňují se zde především kyselé substráty, hlavně pararuly, migmatity, granitoidy a svory (Ložek, 2001). Z hlediska půd, Šumava náleží do regionu horských podzolů subregionem, ve kterém mezi doprovodnými složkami převažují hydromorfní půdy (Petruš and Neuhäuslová, 2001). Nejvýznamnějšími půdními jednotkami zde jsou podzol (*Podzol*), hnědá půda kyselá (*Cambisol*) a rezivá půda (*Spodo-dystric Cambisol*), (klasifikace dle ČGÚ, v závorce FAO).

Na Šumavě se nachází celkem osm jezer ledovcového původu, z nichž pět leží na území České republiky. Jsou to jezera Plešné, Čertovo, Černé, Prášilské a Laka. Předmětem mého výzkumu byl rozklad rostlinného opadu v povodí jezer Plešného a Čertova.

3.1.1. Výzkumná plocha Plešné jezero (PL)

Plešné jezero se nachází v nadmořské výšce 1090 m n.m., přímo pod vrcholem Plechý (1378 m n.m.). Povodí PL pokrývá plochu 66,7 ha včetně plochy 7,5 ha samotného jezera (Švambers, 1939, in Kopáček et al., 2002a). Skalní podloží tvoří granit (Veselý, 1994). Zhruba 90% povodí PL pokrývá asi 150 let starý smrko - bukový les s minoritní příměsí jasanu. Většinou se řadí půdy v povodí PL do kategorie kyselých podzolů. Profil je tvořen opadovou vrstvou O, svrchním organickým horizontem A (nebo také humusový H horizont), ochuzeným šedavým E horizontem, pod nímž nacházíme obohacený rezavohnědý horizont B (Kopáček et al., 2002a).

3.1.2. Výzkumná plocha Čertovo jezero (CT)

Čertovo jezero se nachází v nadmořské výšce 1030 m n.m., na úpatí Jezerní hory (1343 m n.m.). Povodí Čertova jezera pokrývá plochu 87,5 ha včetně plochy jezera 10,3 ha. (Švampera, 1939, in Kopáček et al., 2002a). Skalní podloží jezera tvoří svor (muskovitická rula), s intruzí křemence (Veselý, 1994). V současnosti je okolí Čertova jezera zalesněno 90 - 150ti letým sekundárním smrkovým porostem s řídkou příměsí jedle a buku. Povodí CT tvoří rezivá půda (58%), podzol (21%) a organicky bohatá nevyvinutá půda (17%) (Kopáček et al., 2002b).

3.2. Inkubační pokus

3.2.1. Odběr opadů

Odběr opadů proběhl v říjnu roku 2008. Pro pokus byl vybrán opad třtiny chloupkaté (*Calamagrostis villosa*) a jehličí smrku ztepilého (*Picea abies*). Důvodem výběru bylo dominantní zastoupení na studovaných plochách a významný rozdíl v obsahu fenolických látek. Opady byly odebrány v povodí Plešného jezera a v povodí Čertova jezera. Za účelem odběru jehličí byly ze smrků ostříhány větve, které byly zmrazeny. Jehlice byly ostříhány před založením pokusu. Opad třtiny byl získán otrháním uvadlých listů z rostlin.

3.2.2. Analýzy chemického složení opadů

Počáteční měření bylo provedeno z právě rozmražených opadů a konečné po asi 150 dnech inkubace, v opadech použitých v respiračním pokusu. U koncového měření byla zohledněna teplota, při které byl opad inkubován, a přítomnost či nepřítomnost inokulace půdním extraktem. Z každého tohoto typu opadu byl vytvořen směsný vzorek, který byl použit pro analýzy. Před založením pokusů a po jejich ukončení byl u každého vzorku opadu stanoven celkový obsah uhlíku (C_{TOT}) a dusíku (N_{TOT}), ve studené vodě extrahovatelného uhlíku a dusíku (C_{CW} , N_{CW}), celkového ve vodě extrahovatelného uhlíku a dusíku (C_{EXT} , N_{EXT}), extrahovatelného fosforu v oxalátu (P_{OX}), ve vodě extrahovatelných fenolických látek a fenolických látek rozpustných v acetonu.

3.2.3. Půdní extrakt a založení pokusů pro měření respirace

Půdní extrakt byl připraven třepáním 10 g půd opadových horizontů z jednotlivých povodí ve 100 ml destilované vody po dobu 2 hodin.

Před založením pokusu byl opad rozmražen (jehličí ostříháno), na 1 hodinu ponořen do destilované vody, která byla poté vylita, a opad byl po 20 g navážen do čistých lahví o objemu 1000 ml. V některých případech u CT jehličí bylo z důvodu jeho nedostatku použito jen 10 g. Do každé lahve byla umístěna kádinka s 20 ml 1 M NaOH pro měření mikrobiální respirace.

K opadům inokulovaným půdním extraktem (IN) byly napipetovány 2 ml půdního extraktu (k opadu z povodí Plešného jezera extrakt z půdy z povodí Plešného jezera a k opadům z povodí Čertova jezera extrakt z povodí Čertova jezera) a k neinokulovaným opadům 2 ml destilované vody (tzv. neinokulované vzorky, BI). K opadům o navážce 10 g bylo přidáno poloviční množství extraktu a vody. Sklenice byly vzduchotěsně uzavřeny a uloženy do inkubátorů (SANYO, USA) pro zajištění stálé teploty 0 a 10°C. Každé dva týdny byla po dobu 115 dní měřena bazální mikrobiální respirace.

3.2.4. Založení pokusu k měření enzymatické aktivity

Paralelně byl založen pokus k měření aktivit základních fenolytických enzymů (PhOx, PerOx a MnP). Do 100 ml NTS lahví bylo naváženo po 1 g opadu a přidáno po 0,1 ml odpovídajícího půdního výluhu (IN)/destilované vody (BI). Lahve byly uzavřeny parafilmem, který byl na několika místech perforován, aby byl zajištěn přístup vzduchu. Opady byly v průběhu pokusu několikrát dovlhčovány destilovanou vodou.

Připravené opady v lahvích byly umístěny do inkubátorů (SANYO, USA) pro zajištění stálé teploty 0 a 10°C. Prvních 5 odběrů probíhalo po 14 dnech a poslední odběr po 4 týdnech od předchozího. Při každém odběru byl opad zmražen a po opětovném rozmrazení byl zhomogenizován ve vodě podle níže popsaného postupu. V homogenátech byla určena aktivita PhOx, PerOx a MnP.

3.3. Závislost reaktivity PhOx a PerOx na inkubační teplotě s roztokem L – DOPA

Pro měření závislosti aktivit enzymů na teplotě byly použity rozmražené opady z října 2008 bez inokulace a inkubace. Homogenáty opadů byly připraveny výše popsaným způsobem.

Mikrodestičkovou metodou byla provedena analýza obsahu fenoloxidáz a peroxidáz (Hendel et al., 2005). Inkubace namíchaných roztoků v mikrodestičkách probíhala za různých teplot: 0, 5, 10, 15°C a za laboratorní teploty (cca 22°C) po dobu 18 hodin.

Z grafů v přílohách 16 – 23 je patrný rozdíl mezi PhOx a PerOx. Nejvyšší aktivity PhOx byly naměřeny při teplotě 22°C. Aktivity peroxidáz měly maximum za teplot nižších (v rozmezí 0 až 15°C). PhOx aktivita byla vyšší u opadů třtiny než u jehličí, zatímco mezi opady z různých povodí v aktivitách těchto enzymů nebyl rozdíl. V případě PerOx aktivit nebyl zřejmý rozdíl ani mezi jednotlivými opady ani mezi stejnými opady z různých povodí (Přílohy 16 – 23). Optimální inkubační teploty pro stanovení aktivit PhOx a PerOx jsou shrnuty v příloze 5.

Podle metody na měření aktivit PhOx a PerOx inkubační teplota vzorků se substrátem L-DOPA je 20°C (Hendel et al., 2005). Jak ukazují výsledky této práce, ve 20°C již docházelo k inhibici aktivity PerOx. Pro získání maximální výtěžnosti PerOx by bylo vhodnější použít inkubační teplotu nižší – kolem 5°C. U aktivit PhOx bylo teplotní optimum jasně vyšší než 20°C. Vzhledem k tomu, že v tomto případě nešlo o odpověď mikroorganismů na teplotu, nýbrž o odpověď samotných enzymů, nelze hovořit o mikrobiální adaptaci, spíše o biochemické vlastnosti, reaktivitě za různých teplot, či o teplotním optimu reakce. Naměřené teplotní optimum PerOx bylo ve srovnání s literaturou velmi nízké. Naopak aktivity PhOx mohly mít optimum odpovídající literárním zdrojům (Niladevi and Prema, 2008; Baborová et al., 2006).

3.4. Použité laboratorní analýzy

Laboratorní analýzy proběhly za konstantní vlhkosti a teploty v laboratořích Katedry biologie ekosystémů Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

3.4.1. Bazální mikrobiální respirace

Bazální mikrobiální respirace byla stanovována absorpční metodou s titrační koncovkou (Jäggi, 1976; Isermeyer, 1952). Metoda je založena na jímání CO₂ uvolňujícího se z opadu během inkubace do roztoku NaOH, který je umístěn v kádince v lahvi s opadem. Při reakci vzniká Na₂CO₃. Množství nezreagovaného hydroxidu sodného se pak titračně stanoví pomocí 0,5M HCl na acidobazický indikátor fenolftalein. Před titrací bylo do každé z kádinek s 1M

NaOH přidáno 5 ml 12,5% BaCl₂. Přesná koncentrace použité kyseliny byla stanovena titrací roztoku Na₂B₄O₇ na indikátor methylooranž.

Výpočet rychlosti respirace r :

$$r = (A - B) * c_{\text{HCl}} * 6005 / (m * s * t) \quad [\mu\text{gC-CO}_2\text{g}^{-1}\text{den}^{-1}]$$

A průměrná spotřeba HCl na titraci 3 blanků [ml]

B spotřeba HCl na titraci vzorku [ml]

c_{HCl} přesná koncentrace roztoku HCl [ml]

6005 přepočtový koeficient

m hmotnost navážky opadu [g]

s sušina opadu [g]

t doba inkubace [den]

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

C_{TOT} , N_{TOT} byly analyzovány v na vzduchu usušeném jemně namletém opadu.

Pro určení C_{TOT} a N_{TOT} byl použit elementární analyzátor (NC 2100 soil analyzer, ThermoQuest, Itálie).

3.4.3. Obsah extrahovatelného uhlíku (C_{EXT}) a dusíku (N_{EXT})

Pro určení ve vodě extrahovatelného uhlíku a dusíku byly z opadů provedeny studenododné a horkovodné výluhy. Studenododné výluhy slouží k určení obsahu C_{CW} a N_{CW} a horkovodné k N_{EXT} a C_{EXT} , které již zahrnují i obtížněji dostupné zdroje energie a živin. K 3 g opadu bylo přidáno 30 ml destilované vody a necháno 30 minut třepat. Pak se výluh slil, přefiltroval, nechal zmrazit a mokřý opad byl zalit 50 ml destilované vody. Po 16 hodinách inkubace za teploty 80°C byl slit a přefiltrován horkovodný výluh a nechal zmrazit. U každého vzorku byla provedena tři opakování.

C a N ve vodních extraktech byly změřeny na TOC/TN analyzátoru (SKALAR FORMACS HT), NH_4^+ a NO_3^- s použitím průtokového analyzátoru (Foss Tecator 5042, Sweden).

3.4.4. Stanovení reaktivního fosforu v oxalátovém extraktu (P_{OX})

Extrakce byla provedena podle Cappa a kol. (1987): k 1 g na vzduchu vysušeného nenamletého opadu se přidalo 20 ml extrakčního činidla (rozpustí se 16,1 g $(\text{COONH}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a

10,9 g (COOH)₂.2H₂O ve 1000 ml destilované vody). U opadů trávy *Calamagrostis* a borůvky bylo použito dvojnásobné množství extrakčního činidla a naředění bylo zohledněno při výpočtu koncentrace. Vzorky se třepou 120 minut ve tmě při konstantní teplotě 20°C. Extrakty a blank byly přefiltrovány přes skládaný filtrační papír. Analýza byla provedena podle Kopáčka et al. (2001): k 1 ml extraktu, standardu a blanku bylo přidáno 6 ml destilované vody, 2 ml 0,125M (NH₄)₄Mo₇O₂₄.4H₂O, 1 ml činidla B (0,53 g kyseliny askorbové se rozpustí ve 100 ml činidla A – Činidlo A se připraví rozpuštěním 3 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O a 0,0725 g KSbO.C₄H₄O₆ v destilované vodě, přidá se 35,25 ml koncentrované H₂SO₄ a doplní do 500 ml destilovanou vodou). Po 30 minutách se měří absorbance při 660 nm. U každého vzorku byla provedena tři opakování. Koncentrace vzorku se odečte z kalibrační křivky.

Výpočet množství reaktivního fosforu v opadu:

$$P_{OX} = ((Abs_{660} - A) / B) / s \quad [\mu g g^{-1}]$$

Abs₆₆₀ absorbance vzorku při vlnové délce 660 nm

A, B přepočítávací faktory kalibrační přímky

s sušina [g g⁻¹]

3.4.5. Stanovení obsahu fenolických látek rozpustných v acetonu (AEPH)

Pro stanovení dle Bärlechera a Graçy (2005) se použije na vzduchu usušený umletý opad. K asi 100 mg takto upraveného opadu se přidá po 5 ml 70% acetonu. Po 1 hodině extrakce při teplotě 4°C byly vzorky zcentrifugovány a bylo odebráno po 0,1 ml supernatantu a doplněno destilovanou vodou na 1 ml. Kalibrační křivka byla vytvořena z odstupňované vodou zředěné taninové kyseliny v 70% acetonu. Další postup je shodný pro vzorky i stanovení pro vytvoření kalibrační křivky. Přidá se po 5 ml 2% Na₂CO₃, po 5 minutách se přidá 0,5 ml činidla Folin-Ciocalteu. Po 120 minutách se měří absorbance při 760 nm. Celková koncentrace fenolických látek se stanoví na základě kalibrační křivky vytvořené z různě koncentrované taninové kyseliny. U každého vzorku byla provedena tři opakování. Sušina byla určena navážením a úplným vysušením (14 hodin, 80°C) na vzduchu usušeného namletého opadu.

Výpočet zastoupení AEPH v 1 g sušiny:

$$m = \{[(Abs_{760} - B) / A] / (2 * s) * 1000000\} / 1701,2 \quad [\mu mol g^{-1}]$$

Abs ₇₆₀	absorbance vzorku při vlnové délce 760 nm
A, B	přepočítávací faktory kalibrační přímky
2	přepočet na 1 mg
s	sušina [gg ⁻¹]
1000000	přepočet jednotky
1701,2	molulová hmotnost taninové kyseliny (gmol ⁻¹)

3.4.6. Fenolické látky rozpustné ve vodě (WEPH)

Obsah vodorozpustných fenolických látek v opadu byl určen spektrofotometrickou metodou (DeForest et al., 2005). Standardní roztok, ze kterého byla ředěním připravena kalibrační řada, obsahoval kyselinu p – kumarovou, p – hydroxybenzoovou, vanilinovou a syringovou o celkové koncentraci fenolických kyselin 200 μmol⁻¹.

V 10 ml destilované vody byly po dobu 18 hodin za konstantní teploty 20°C třepány 2 g vlhkého opadu (bez vysušení). Pak byly vzorky centrifugovány (900 g, 10 min.) a pod tlakem přefiltrovány. Filtráty byly podle potřeby naředěny destilovanou vodou. K 5 ml naředěných filtrátů, standardům a blanku, připravenému z přefiltrované destilované vody, bylo přidáno 0,75 ml 1,9M Na₂CO₃ a 0,25 ml roztoku Folin – Ciocalteu. Vzorky byly inkubovány ve tmě po dobu 1 hodiny a poté byla změřena absorbance při vlnové délce 750 nm. Na základě kalibrační křivky s ohledem na naředění vzorků byla určena koncentrace fenolických látek ve vzorcích.

Výpočet zastoupení WEPH v 1 g sušiny:

$$m = (Abs_{750} - B) / (A * 200 * s) \quad [\mu\text{molg}^{-1}]$$

Abs ₇₅₀	absorbance vzorku při vlnové délce 750 nm
A, B	přepočítávací faktory kalibrační přímky
200	koeficient k přepočtení na 1 g
s	sušina [gg ⁻¹]

Všechny výsledky se pomocí sušiny přepočtou na jednotku hmotnosti suché hmoty opadu.

3.4.7. Stanovení sušiny (s)

Suchá hmotnost (sušina) je bezrozměrné číslo, udávající podíl suchého rostlinného opadu na hmotnosti 1 g čerstvého vzorku. Obecně se určuje tak, že se nechá vysušit opad o předem známé hmotnosti do konstantní hmotnosti (14 hodin při 80°C), a zváží se. Sušina udává poměr hmotností po usušení a před usušením.

Sušina pro výpočet aktivit enzymů byla stanovována zároveň s přípravou homogenátu opadů. Homogenát, který byl připraven z naváženého množství opadu (přibližně 0,5 g), se filtroval přes předem zvážené filtrační papíry. Ty byly vysušeny i se zachyceným opadem na předem zvážené hliníkové váženice do konstantní hmotnosti (14 hodin při 80°C). Po vychladnutí byla váženka s filtry a vzorkem opět zvážena.

Výpočet suché hmotnosti opadu s:

$$s = (m_s - m_v) / m_l$$

m_v hmotnost váženky a filtračních papírů [g]

m_s hmotnost váženky a filtračních papírů po vysušení se suchým opadem [g]

m_l hmotnost naváženého vlhkého opadu [g]

3.4.8. Příprava homogenátů

Pro přípravu homogenátu opadu ve vodě bylo z NTS lahví odebíráno po 0,5 g opadu. Opad byl zhomogenizován s 50 ml destilované vody. Použití destilované vody jako extraktantu zajišťuje nejvyšší výtěžnost enzymů (Steffen et al., 2007). Každý homogenát byl přefiltrován přes zvážený filtrační papír. Použité filtrační papíry byly sušeny 14 hodin při teplotě 80°C a zvážením byla určena sušina opadu v době odběru. Přefiltrovaný homogenát byl zmražen v plastových uzavíratelných zkumavkách a uchováván do provedení analýz.

3.4.9. Stanovení aktivit fenoloxidáz (PhOx) a peroxidáz (PerOx)

Spektrofotometrická metoda stanovení aktivit fenoloxidáz (PhOx) a peroxidáz (PerOx) podle Hendela a kol. (2005) je založena na inkubaci vodního homogenátu opadu v acetátovém pufru, ke kterému se přidává aminokyselina L-DOPA. Ta slouží jako substrát pro PhOx a za přítomnosti peroxidu vodíku pro PhOx i PerOx. Aktivita PerOx se určí odečtením aktivity PhOx.

Aktivita PhOx a peroxidáz PerOx byla určována za použití 96-jamkových mikrodestiček (Gallo et al., 2004; Saiya-Cork et al., 2002). Pro změření PhOx aktivity bylo k 200 μ l homogenátu přidáno 50 μ l 25mM roztoku L-DOPA v acetátovém pufru o pH 5 (pH bylo navýšeno přidáním silného roztoku NaOH, nebo byl acetátový pufr vytvořen smísením 0,206 ml 99% (w/w) kyseliny octové s roztokem s 0,871 g octanu sodného a doplněním destilovanou vodou na objem 200 ml za výsledného pH 5). Pro určení PerOx aktivity byla vytvořena opakování s přidáním 10 μ l 0,3% H₂O₂. Z každého homogenátu byla připravena 4 opakování pro každý enzym a kontrolní blank, obsahující 200 μ l homogenátu a 50 μ l acetátového pufru (s přídatkem 10 μ l 0,3% H₂O₂ pro PerOx blank). Mikrodestičky byly přiklopeny víčkem a inkubovány ve tmě ve 20°C. Po 18 hodinách inkubace byla v mikrodestičkovém analyzátoru (Infinite 200, TECAN, Švýcarsko) změřena absorbance při 460 nm. Aktivita na 1 litr homogenátu a na 1 g sušiny se vypočítá podle následujících rovnic (Hendel et al., 2005):

a) Výpočet aktivity fenoloxidáz (PhOx):

$$A(\text{PhOx}) = (\text{Abs}_{460} / 7,9) * 1000 \quad [\mu\text{molh}^{-1}\text{l}^{-1}]$$

A(PhOx)	enzymová aktivita na 1 L homogenátu za 1 hodinu inkubace [$\mu\text{molh}^{-1}\text{l}^{-1}$]
Abs ₄₆₀	absorbance při vlnové délce 460 nm
7,9	koeficient vymírání, který je 1,66mM pro DOPA v podmínkách tohoto měření

b) Výpočet aktivity peroxidáz (PerOx):

$$A(\text{PerOx}) = \{ [\text{Abs}_{460} / 7,9] - A(\text{PhOx}) \} * 1000 \quad [\mu\text{molh}^{-1}\text{l}^{-1}]$$

A(PerOx)	enzymová aktivita na 1 litr homogenátu za 1 hodinu inkubace [$\mu\text{molh}^{-1}\text{l}^{-1}$]
Abs ₄₆₀	absorbance při vlnové délce 460 nm
7,9	koeficient vymírání, který je 1,66mM pro DOPA v podmínkách tohoto měření

c) Výpočet aktivity enzymů v 1 g suchého opadu:

$$A_m = (A * V) / m \quad [\mu\text{molh}^{-1}\text{g}^{-1}]$$

A	aktivita enzymu [$\mu\text{molh}^{-1}\text{l}^{-1}$]
m	hmotnost suchého opadu [g]
V	objem homogenátu [50 ml]

3.4.8. Stanovení aktivit MnP, oxidáz a peroxidáz

V homogenátech opadů získaných výše popsaným způsobem byla provedena mikrodestičkovou metodou analýza Mn-peroxidáz podle metodiky Ngo a Lenhoff (1980). Pro zjištění aktivity MnP je třeba určit aktivitu všech peroxidáz a poté od ní odečíst aktivitu peroxidáz bez MnP (AR – AP) (Příloha 1). K 50 μ l homogenátů opadů bylo přidáno 200 μ l roztoků pufrů (Příloha 3). Tyto roztoky byly namíchány podle schématu v příloze 1 a napipetovány podle tabulky v příloze 2. V destičkách byla každých 30 s po dobu 3 minut měřena absorbance při vlnové délce 590 nm. K měření absorbance byl použit mikrodestičkový analyzátor (Infinite 200, TECAN, Švýcarsko). Vhodné hodnoty (vytvářející přímkou) naměřených absorbancí v čase byly proloženy přímkou. Aktivita enzymů se odvozovala od sklonu této přímkou. Změna absorbancí byla vztažena na čas a přepočítána na aktivitu podle následujícího vzorce:

Výpočet enzymatické aktivity:

$$A = ((\text{Abs}(590)_2 - \text{Abs}(590)_1) / (x / 3600) * 0,25 / 32900 / 0,05 * 1000) / (s * 10) \quad [\text{nmolh}^{-1}\text{g}^{-1}]$$

Abs(590) ₁	absorbance při vlnové délce 590 nm v čase T ₁
Abs(590) ₂	absorbance při vlnové délce 590 nm v čase T ₂
x	délka časového úseku mezi časem T ₁ a T ₂ [s]
3600	přepočet na hodinu
0,25	celkový objem reakční směsi v [ml]
32900	molární absorbní koeficient
0,05	objem pipetovaného vzorku [ml]
s	sušina v [gg ⁻¹]
10	přepočet sušiny na objem vzorku

3.5. Statistické zpracování dat

Statistická zhodnocení byla provedena v programu STATISTIKA 8 (One-way ANOVA, Fisher test).

4. Výsledky

4.1. Chemické složení opadu před zahájením pokusu a po jeho ukončení

4.1.1. Počáteční a konečné chemické složení opadů

		C_{TOT} mgg ⁻¹	N_{TOT} mgg ⁻¹	C_{TOT}/N_{TOT}	C_{EXT} mgg ⁻¹	C_{EXT} % C_{TOT}	N_{EXT} mgg ⁻¹	N_{EXT} % N_{TOT}	DON mgg ⁻¹
PL	Třtina	438,36 ^a (4,44)	9,38 ^a (0,57)	46,88 ^a (3,09)	31,57 ^a (2,73)	6,84 ^a (0,59)	1,61 ^a (0,24)	17,75 ^a (0,21)	1,24 ^a (0,24)
	Jehličí	486,90 ^b (3,47)	12,32 ^b (0,25)	39,52 ^a (0,54)	98,72 ^b (4,55)	19,26 ^b (0,89)	0,27 ^b (0,08)	1,73 ^b (0,31)	0,15 ^b (0,04)
CT	Třtina	428,98 ^a (6,47)	11,72 ^a (2,43)	37,77 ^a (8,52)	34,51 ^a (3,38)	7,64 ^a (0,75)	1,50 ^a (0,07)	12,19 ^a (0,55)	1,08 ^a (0,07)
	Jehličí	491,48 ^b (1,49)	15,00 ^b (0,87)	32,83 ^a (1,86)	102,51 ^b (24,94)	22,54 ^b (1,42)	0,59 ^b (0,23)	4,55 ^b (0,25)	0,63 ^b (0,04)

Tab. 1a. Počáteční chemické složení opadu třtiny a jehličí (n = 3, ±S.D., různá písmena označují signifikantní rozdíly mezi vzorky). PL – povodí Plešného jezera, CT – povodí Čertova jezera, DON – obsah organického dusíku rozpustného ve vodě.

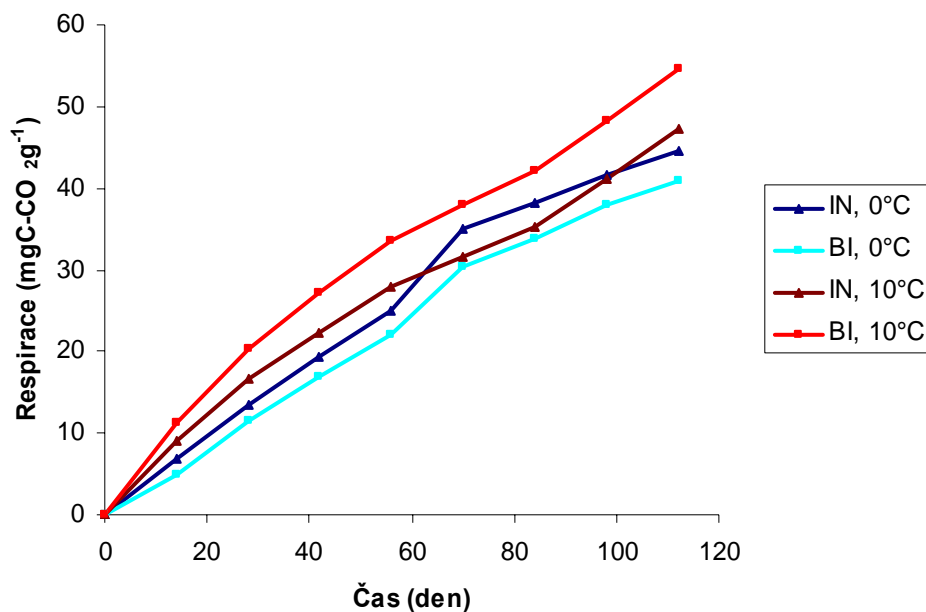
		C_{CW} mgg ⁻¹	C_{CW} % C_{EXT}	N_{CW} mgg ⁻¹	N_{CW} % N_{EXT}	P_{OX} μgg ⁻¹	AEPH μmolg ⁻¹	WEPH μmolg ⁻¹
PL	Třtina	4,37 ^a (0,32)	13,83 ^a (1,01)	0,24 ^a (0,07)	14,61 ^a (4,21)	224,06 ^a (18,23)	31,75 ^a (4,57)	12,41 ^a (1,16)
	Jehličí	4,36 ^a (0,47)	4,42 ^b (0,48)	0,01 ^b (0,00)	2,94 ^b (0,06)	55,12 ^b (2,87)	261,35 ^b (16,97)	8,69 ^b (3,07)
CT	Třtina	5,95 ^b (0,66)	17,23 ^a (1,90)	0,42 ^a (0,02)	27,86 ^a (1,37)	116,98 ^a (6,08)	32,06 ^a (7,26)	14,20 ^a (0,90)
	Jehličí	6,12 ^b (0,56)	5,97 ^b (0,55)	0,04 ^b (0,00)	6,91 ^b (0,43)	68,40 ^b (1,80)	349,97 ^b (35,43)	4,02 ^b (0,15)

Tab. 1b. Počáteční chemické složení opadu třtiny a jehličí (n = 3, ±S.D., různá písmena označují signifikantní rozdíly mezi vzorky). PL – povodí Plešného jezera, CT – povodí Čertova jezera, DON – obsah organického dusíku rozpustného ve vodě, AEPH – obsah fenolických látek rozpustných v acetonu, WEPH – obsah fenolických látek rozpustných ve vodě.

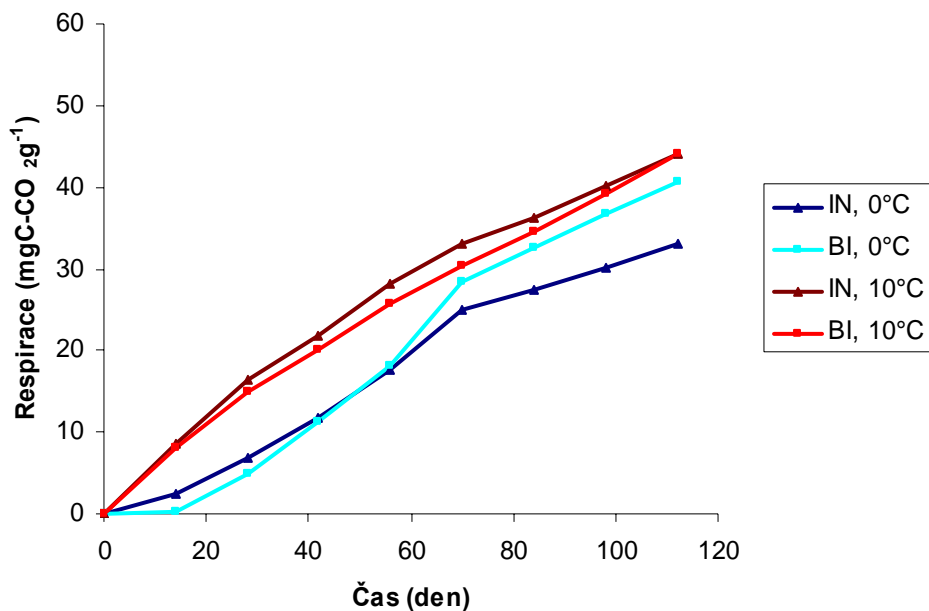
Ve všech uváděných charakteristikách (Tab. 1a, 1b), kromě poměru celkového uhlíku k celkovému dusíku, byly naměřeny signifikantní rozdíly mezi opady (Fisher test, $p < 0,05$). Obsah celkového uhlíku a dusíku byl vyšší v jehličí, zatímco jejich poměr byl vyšší v opadu třtiny. Celkový extrahovatelný uhlík byl více zastoupen v jehličí, ale obsah uhlíku extrahovatelného ve studené vodě vztaženého k celkovému extrahovatelnému uhlíku byl vyšší v opadu třtiny. Celkový obsah extrahovatelného dusíku byl naopak výrazně vyšší v opadu třtiny a také obsah dusíku ve studenovodném výluhu byl několikrát vyšší v případě opadu třtiny. Obsah rozpuštěného organického dusíku (DON) byl vyšší rovněž v opadu třtiny. Opad třtiny byl také výrazně bohatší na dostupný fosfor. V jehličí byly přibližně desetinásobně více zastoupeny fenolické látky rozpustné v acetonu, ale vodorozpustné fenolické látky byly zastoupeny více v opadech třtiny. Opad třtiny byl tedy celkově bohatší na snadno dostupné zdroje živin a energie.

Během inkubace se chemické složení opadů změnilo (Příloha 4a, 4b).

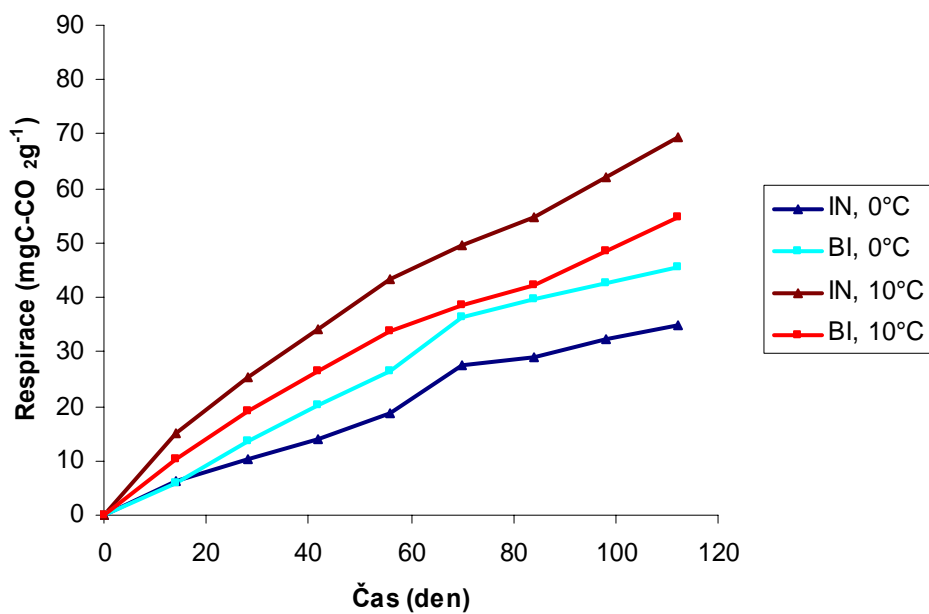
4.2. Kumulativní mikrobiální respirace



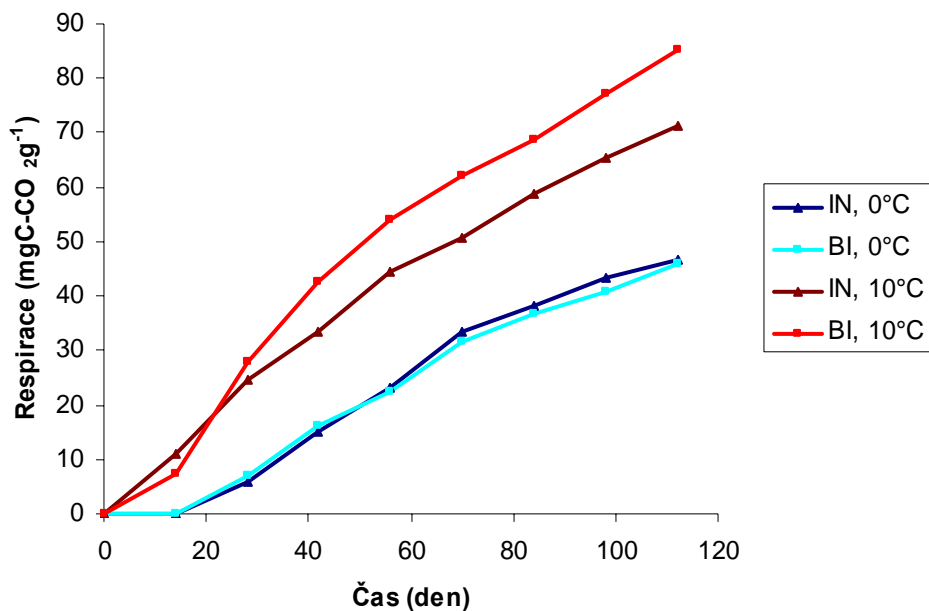
Graf 1. Kumulativní respirace v opadu třtiny z povodí PL. PL – povodí Plešného jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace.



Graf 2. Kumulativní respirace v jehličí z povodí PL. PL – povodí Plešného jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace.

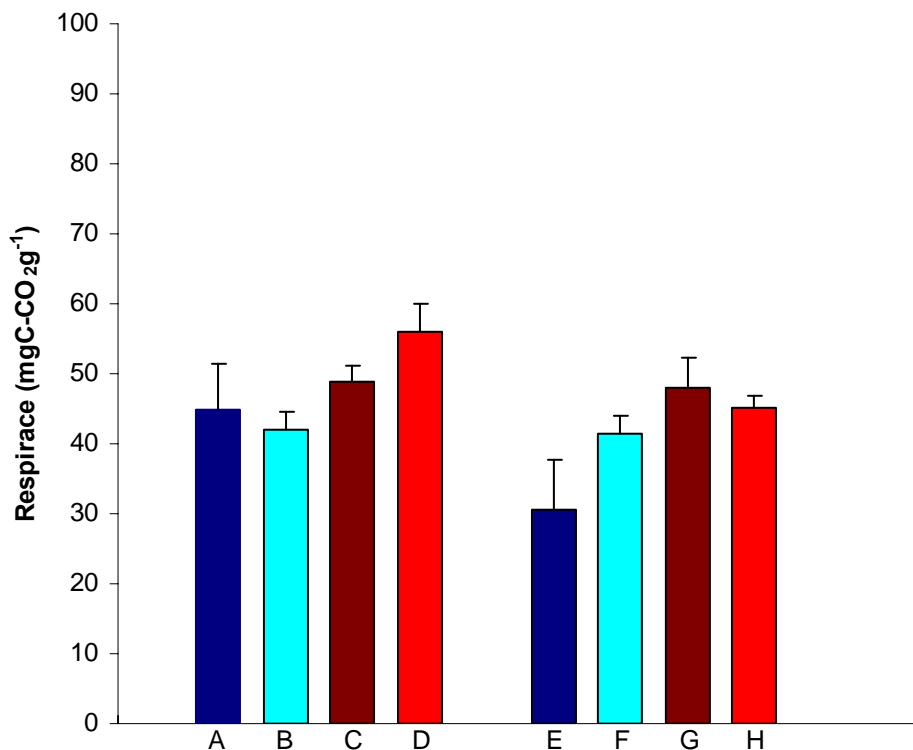


Graf 3. Kumulativní respirace v opadu třtiny z povodí CT. CT – povodí Čertova jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace.



Graf 4. Kumulativní respirace v jehličí z povodí CT. CT – povodí Čertova jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace.

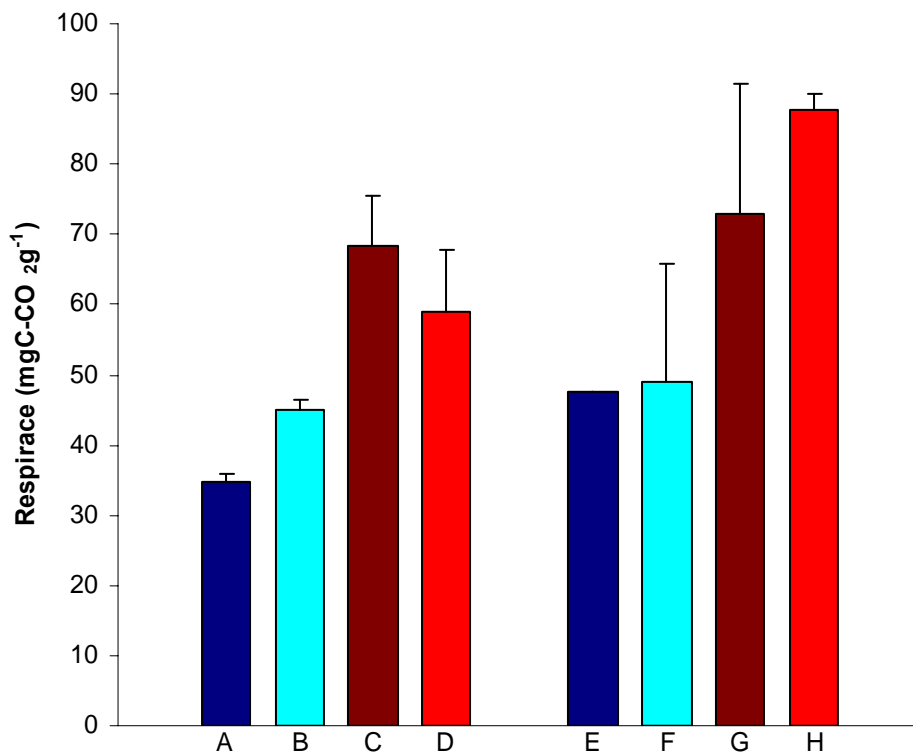
Největší vliv na kumulativní respirace měla teplota (Grafy 1 - 4). V 10°C byla kumulativní respirace v opadech z obou povodí signifikantně vyšší (Fisher test, $p < 0,001$) než v 0°C (Grafy 5 a 6).



Graf 5. Kumulativní mikrobiální respirace v opadech z povodí Plešného jezera (n = 3, chybové úsečky znázorňují S.D.). A – IN třtina 0°C, B – BI třtina 0°C, C – IN třtina 10°C, D – BI třtina 10°C, E – IN jehličí 0°C, F – BI jehličí 0°C, G – IN jehličí, 10°C, H – BI jehličí 10°C; IN – inokulovaný, BI – bez inokulace.

Typ opadu ani přítomnost inokulace neměla u obou povodí signifikantní vliv na kumulativní respiraci (Graf 5 a 6).

V opadu PL třtiny v 0°C byla vyšší kumulativní respirace v opadu IN (Graf 5). Inkubační teplota 10°C znamenala větší respiraci v BI opadech třtiny. U jehličí v 0°C byla vyšší míra respirace v opadech BI. V jehličí v 10°C byla respirace v BI a IN opadech na stejné úrovni.



Graf 6. Kumulativní mikrobiální respirace v opadech z povodí Čertova jezera (n = 3, chybové úsečky znázorňují S.D.). A – IN třtina 0°C, B – BI třtina 0°C, C – IN třtina 10°C, D – BI třtina 10°C, E – IN jehličí 0°C, F – BI jehličí 0°C, G – IN jehličí, 10°C, H – BI jehličí 10°C; IN – inokulovaný, BI – bez inokulace.

Kumulativní respirace v opadech z povodí CT byla nejnižší v IN opadech třtiny v 0°C (Graf 6). Z opadů třtiny v 10°C byla intenzivnější respirace v IN opadech. Nejvyšší respirace v opadech z CT byla v jehličí BI v 10°C. V 0°C byly respirace podobné, ať už se jednalo o jehličí IN nebo BI.

4.3. Aktivity fenolytických enzymů

Ve výsledkové části jsou uvedené pouze některé grafy zobrazující vývoj aktivit enzymů během inkubace opadů, ostatní jsou zařazeny do příloh.

4.3.1. Aktivita PhOx

	Teplota °C	Inokulace	Průměrná aktivita (S.D.) $\mu\text{molh}^{-1}\text{g}^{-1}$	Hodnota maximální aktivity (S.D.) $\mu\text{molh}^{-1}\text{g}^{-1}$	Čas dosažení maxima den
Třtina	0	IN	3,5 (1,5)	5,3 (2,0)	14
		BI	4,5 (1,1)	5,9 (0,0)	70
	10	IN	3,8 (0,7)	4,9 (0,8)	28
		BI	3,5 (0,7)	4,6 (1,0)	0
Jehličí	0	IN	6,0 (5,4)	13,4 (1,9)	97
		BI	6,2 (6,6)	19,2 (3,3)	97
	10	IN	15,8 (8,0)	21,9 (9,1)	27
		BI	22,4 (11,3)	32,8 (4,8)	13

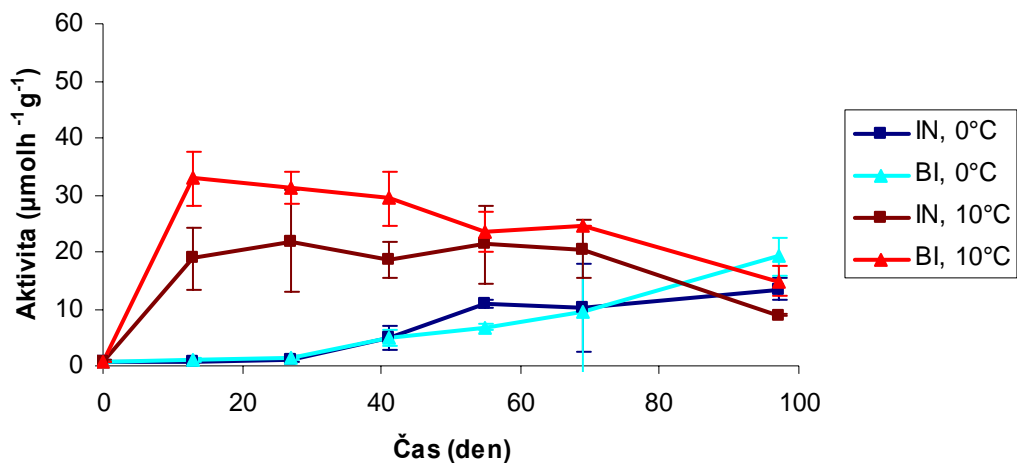
Tab. 2. Enzymatická aktivita fenoloxidáz (PhOx) v opadech z povodí PL (Průměrná aktivita: $n = 7$, hodnota maximální aktivity: $n = 3$). PL – povodí Plešného jezera, IN – inokulovaný vzorek, BI – vzorek bez inokulace, Čas dosažení maxima – čas, kdy aktivita PhOx dosáhla maximální hodnoty.

Za opady z obou povodí byly signifikantně (Fisher test, $p < 0,001$) vyšší průměrné aktivity PhOx v jehličí (Tab. 2 a 3). Nejvyšší průměrná aktivita PhOx v opadech z povodí PL byla v BI jehličí v 10°C (Tab. 2). V jehličí byly PhOx aktivity vyšší v 10°C , v opadu třtiny není vliv teploty patrný. Ve všech opadech, kromě opadu třtiny z PL v 10°C , byla aktivita PhOx vyšší v BI opadech. Maximální aktivity kopírují rozdíly mezi průměrnými aktivitami.

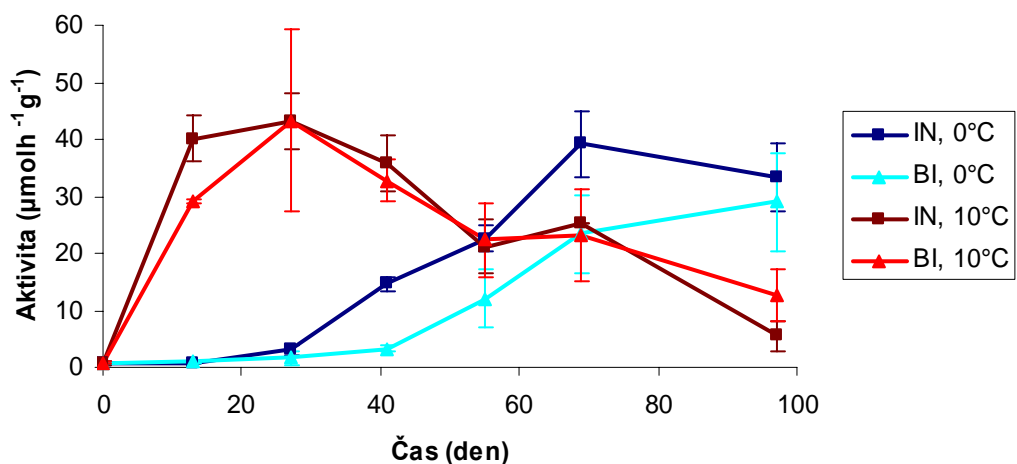
	Teplota °C	Inokulace	Průměrná aktivita (S.D.) $\mu\text{molh}^{-1}\text{g}^{-1}$	Hodnota maximální aktivity (S.D.) $\mu\text{molh}^{-1}\text{g}^{-1}$	Čas dosažení maxima den
Třtina	0	IN	3,6 (1,6)	6,5 (1,7)	69
		BI	4,3 (1,2)	5,7 (1,3)	97
	10	IN	5,1 (1,2)	7,3 (0,5)	55
		BI	5,6 (1,8)	8,3 (1,9)	69
Jehličí	0	IN	16,4 (15,9)	39,3 (5,8)	69
		BI	10,1 (11,7)	29,0 (8,7)	97
	10	IN	24,5 (16,6)	43,2 (5,0)	27
		BI	23,4 (13,8)	43,2 (16,0)	27

Tab. 3. Enzymatická aktivita fenoloxidáz (PhOx) v opadech z povodí CT (Průměrná aktivita: n = 7, hodnota maximální aktivity: n = 3). CT – povodí Čertova jezera, IN – inokulovaný vzorek, BI – vzorek bez inokulace, Čas dosažení maxima – čas, kdy aktivita PhOx dosáhla maximální hodnoty.

V opadech z povodí CT byly vyšší aktivity v opadech v 10°C. Nejvyšší aktivita PhOx v opadech z CT povodí byla v IN jehličí v 10°C (Tab. 3). V opadech třtiny byly aktivity vyšší v BI opadech, zatímco v jehličí v IN opadech. Vliv teploty a opadu se projevil podobně v hodnotách maximálních aktivit. Aktivity PhOx dosáhly maximálních hodnot dříve v IN opadech než v opadech BI. Aktivity PhOx dosáhly maximálních hodnot dříve ve vzorcích inkubovaných v 10°C než v 0°C.



Graf 7. Porovnání průběhů aktivit PhOx v PL jehličí. PL – povodí Plešného jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace. Vyneseny jsou průměry ($n = 3, \pm S.D.$).



Graf 8. Porovnání průběhů aktivit PhOx v CT jehličí. CT – povodí Čertova jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace. Vyneseny jsou průměry ($n = 3, \pm S.D.$).

Grafy 7 a 8 ukazují podobnost v aktivitách PhOx v jehličí z různých povodí. Aktivita PhOx v PL opadech byla nižší než v CT opadech. PhOx aktivita v CT jehličí byla zpočátku vyšší v 10°C, ale již kolem 30. dne inkubace začala klesat. Naopak aktivita v 0°C dosáhla maxima až kolem 70. dne inkubace. Na průbězích aktivit PhOx ve třtině se vliv inkubace ani teploty tak výrazně neprojevil (Příloha 6 a 7).

4.3.2. Aktivita PerOx

	Teplota °C	Inokulace	Průměrná aktivita (S.D.) $\mu\text{molh}^{-1}\text{g}^{-1}$	Hodnota maximální aktivity (S.D.) $\mu\text{molh}^{-1}\text{g}^{-1}$	Čas dosažení maxima den
Třtina	0	IN	0,9 (1,3)	3,5 (1,6)	14
		BI	1,2 (1,6)	3,8 (4,0)	42
	10	IN	0,5 (0,9)	2,3 (2,5)	14
		BI	0,6 (0,6)	1,5 (0,4)	14
Jehličí	0	IN	1,2 (1,4)	3,6 (1,7)	13
		BI	1,3 (1,5)	3,2 (1,3)	27
	10	IN	0,2 (0,6)	1,5 (1,0)	0
		BI	0,5 (1,1)	2,9 (0,7)	0

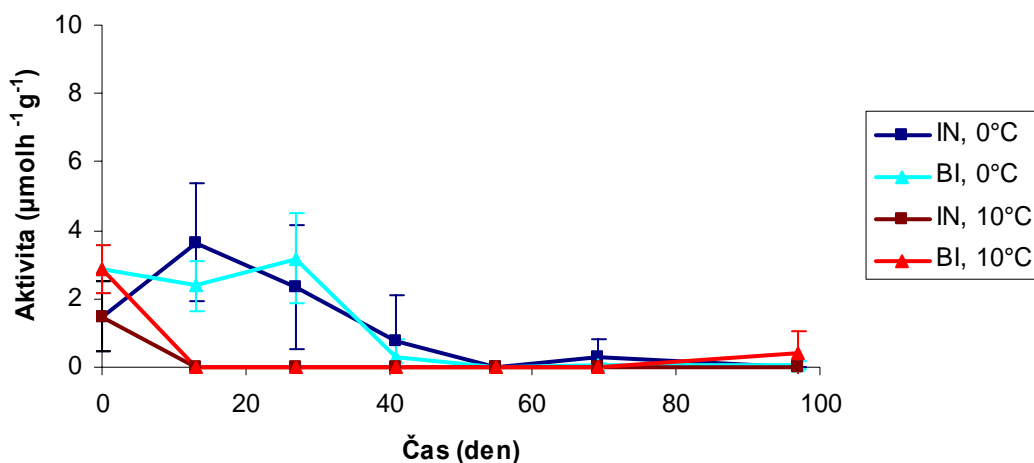
Tab. 4. Enzymatická aktivita peroxidáz (PerOx) v opadech z povodí PL (Průměrná aktivita: n = 7, hodnota maximální aktivity: n = 3). PL – povodí Plešného jezera, IN – inokulovaný vzorek, BI – vzorek bez inokulace, Čas dosažení maxima – čas, kdy aktivita PerOx dosáhla maximální hodnoty.

Nejvyšší průměrná aktivita PerOx byla nejvyšší v BI jehličí v 0°C (Tab. 4). Aktivity v opadech z PL povodí byly vyšší v 0°C než v 10°C. Aktivity v opadech z PL povodí byly vyšší v BI opadech než v IN opadech. Také hodnoty maximálních aktivit tomu v průměru odpovídají. V 0°C urychlila inokulace nástup maximálních aktivit. V 10°C takový vliv neměla.

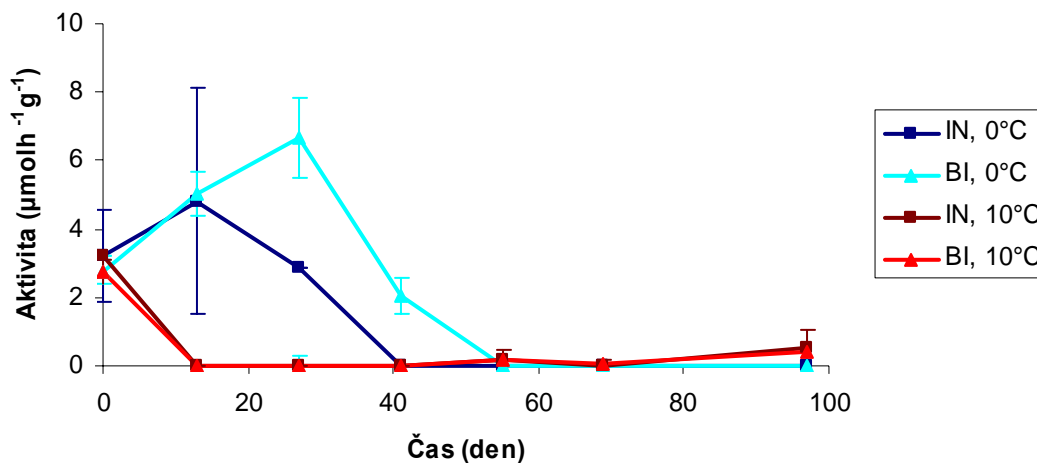
	Teplota °C	Inokulace	Průměrná aktivita (S.D.) $\mu\text{molh}^{-1}\text{g}^{-1}$	Hodnota maximální aktivity (S.D.) $\mu\text{molh}^{-1}\text{g}^{-1}$	Čas dosažení maxima den
Třtina	0	IN	0,8 (1,7)	4,6 (4,6)	0
		BI	0,4 (0,8)	2,0 (1,4)	55
	10	IN	2,9 (2,8)	8,0 (7,9)	27
		BI	2,1 (2,1)	5,6 (2,1)	69
Jehličí	0	IN	1,6 (2,0)	4,8 (1,3)	13
		BI	2,4 (2,7)	6,7 (1,2)	27
	10	IN	0,6 (1,2)	3,2 (1,0)	0
		BI	0,5 (1,0)	2,7 (0,4)	0

Tab. 5. Enzymatická aktivita peroxidáz (PerOx) v opadech z povodí CT (Průměrná aktivita: n = 7, hodnota maximální aktivity: n = 3). CT – povodí Čertova jezera, IN – inokulovaný vzorek, BI – vzorek bez inokulace, Čas dosažení maxima – čas, kdy aktivita PerOx dosáhla maximální hodnoty.

Nejvyšší průměrná aktivita PerOx v opadech z povodí CT byla nejvyšší v IN opadu třtiny z CT v 10°C (Tab. 5). Aktivita v opadu třtiny byla vyšší v 10°C, zatímco v jehličí v 0°C. V opadu třtiny a v jehličí v 10°C se projevil pozitivní vliv inokulace. Hodnoty maximálních aktivit tomu odpovídají. V průměru tohoto maxima dosahují dříve aktivity v jehličí a obecně inokulované opady.



Graf 9. Porovnání průběhů aktivit PerOx v PL jehličí. PL – povodí Plešného jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace. Vyneseny jsou průměry (n = 3, ±S.D.).



Graf 10. Porovnání průběhů aktivit PerOx v CT jehličí. CT – povodí Čertova jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace. Vyneseny jsou průměry ($n = 3, \pm S.D.$).

Vývoj aktivit PerOx byl velmi podobný u jehličí z povodí CT a u jehličí z povodí PL (Grafy 9 a 10). V první polovině inkubace byly vyšší aktivity v 0°C než v 10°C. V druhé polovině byly naměřeny ve všech případech nulové aktivity. Maxima aktivity v BI jehličí v 0°C bylo dosaženo o dva týdny později než v IN jehličí a maximální hodnoty byly srovnatelné. Teplota 10°C způsobila rychlé snížení aktivit, které se velmi mírně zvyšují až v druhé polovině inkubace, v případě CT jehličí až kolem 70. dne. Na průbězích aktivit PerOx v opadu třtiny se vliv inkubace ani teploty tak výrazně neprojevil (Příloha 8 a 9).

4.3.3. Aktivita MnP

	Teplota °C	Inokulace	Průměrná aktivita (S.D.) nmolh ⁻¹ g ⁻¹	Hodnota maximální aktivity (S.D.) nmolh ⁻¹ g ⁻¹	Čas dosažení maxima den
Třtina	0	IN	0,5 (0,5)	1,3 (1,6)	42
		BI	0,5 (0,5)	1,4 (1,8)	14
	10	IN	0,4 (0,2)	0,6 (0,8)	70
		BI	0,3 (0,2)	0,5 (0,9)	0
Jehličí	0	IN	0,7 (0,4)	1,4 (0,8)	41
		BI	0,7 (0,3)	1,1 (1,0)	41
	10	IN	0,7 (0,5)	1,4 (0,3)	13
		BI	0,5 (0,4)	1,0 (1,0)	69

Tab. 6. Enzymatická aktivita Mn-peroxidáz (MnP) v opadech z povodí PL (Průměrná aktivita: n = 7, hodnota maximální aktivity: n = 3). PL – povodí Plešného jezera, IN – inokulovaný vzorek, BI – vzorek bez inokulace, čas dosažení maxima – čas, kdy aktivita MnP dosáhla maximální hodnoty.

Průměrná enzymatická aktivita MnP byla vyšší v jehličí (souhrně pro opady z obou povodí) a signifikantně (Fisher test, $p < 0,05$) se lišila od aktivit v opadu třtiny (Tab. 6 a 7). Aktivity v opadu třtiny z PL byly vyšší v 0°C (Tab. 6). V 10°C měla inokulace pozitivní vliv na aktivitu.

	Teplota °C	Inokulace	Průměrná aktivita (S.D.) nmolh ⁻¹ g ⁻¹	Hodnota maximální aktivity (S.D.) nmolh ⁻¹ g ⁻¹	Čas dosažení maxima den
Třtina	0	IN	0,5 (0,6)	1,6 (0,7)	0
		BI	0,5 (0,3)	1,0 (0,9)	69
	10	IN	0,5 (0,5)	1,6 (0,7)	0
		BI	0,6 (0,7)	2,0 (2,9)	69
Jehličí	0	IN	0,9 (0,3)	1,2 (0,2)	41
		BI	1,0 (0,3)	1,4 (0,8)	41
	10	IN	0,4 (0,3)	0,8 (0,3)	41
		BI	0,6 (0,1)	0,8 (0,1)	27

Tab. 7. Enzymatická aktivita Mn-peroxidáz (MnP) v opadech z povodí CT (Průměrná aktivita: n = 7, hodnota maximální aktivity: n = 3). CT – povodí Čertova jezera, IN – inokulovaný vzorek, BI – vzorek bez inokulace, Čas dosažení maxima – čas, kdy aktivita MnP dosáhla maximální hodnoty.

Průměrná aktivita MnP v opadech z povodí CT byla nejvyšší v BI opadu jehličí v 0°C (Tab. 7). Inokulace měla negativní vliv na aktivitu v jehličí. Rovněž ve vyšších teplotách byla aktivita v jehličí nižší. Hodnoty maximálních aktivit tomu odpovídaly. V případě opadu třtiny není vliv těchto faktorů patrný. Aktivity MnP v opadu třtiny z CT byly nejvyšší v opadu před inkubací. Průběhy aktivit MnP neukazují vliv teploty ani inokulace (Příloha 10 - 13).

4.4. Závislost enzymatické aktivity na chemickém složení opadu

	PhOx	MnP
C_{TOT} (mgg ⁻¹)	0,74**	0,73**
N_{TOT} (mgg ⁻¹)	0,73**	0,78**
C/N	- 0,70**	- 0,74**
C_{EXT} (mgg ⁻¹)	- 0,34*	n.s.
C_{EXT} (% C _{TOT})	0,75**	0,76**
N_{EXT} (mgg ⁻¹)	0,49**	n.s.
N_{EXT} (% N _{TOT})	- 0,71**	- 0,67**
DON (mgg ⁻¹)	- 0,67**	- 0,61*
C_{CW} (mgg ⁻¹)	n.s.	0,55*
C_{CW} (% C _{EXT})	- 0,68**	- 0,63*
N_{CW} (mgg ⁻¹)	- 0,64*	- 0,61*
N_{CW} (% N _{EXT})	- 0,58*	n.s.
P_{OX} (μgg ⁻¹)	- 0,71**	- 0,68**
AEPH (μmolg ⁻¹)	0,76**	0,77**
WEPH (μmolg ⁻¹)	- 0,59*	- 0,69**

Tab. 8. Korelační koeficienty vybraných charakteristik počátečního chemického složení opadů s aktivitami fenoloxidáz (PhOx) a Mn-peroxidáz (MnP) (n = 12). DON – obsah organického dusíku rozpustného ve vodě, AEPH – obsah fenolických látek rozpustných v acetonu, WEPH – obsah fenolických látek rozpustných ve vodě. Signifikantnost korelací: * p < 0,05; ** p < 0,01; n.s. – nesignifikantní.

Aktivity PhOx a MnP korelovaly nejsilněji s obsahem C_{TOT}, N_{TOT}, C_{EXT} a s AEPH. Negativně korelovaly s poměrem C/N, N_{EXT}, DON, relativním obsahem C_{CW} a P_{OX} (Tab. 8).

4.5. Změna obsahu fenolických látek v opadu během inkubace

4.5.1. Změna obsahu AEPH a WEPH

	Teplota °C	Inokulace	Změna obsahu AEPH %	Změna obsahu WEPH %
Třtina	0	IN	- 28,75	- 11,79
		BI	- 32,54	14,53
	10	IN	- 23,62	2,84
		BI	- 31,42	28,38
Jehličí	0	IN	- 65,09	60,15
		BI	- 64,44	- 28,00
	10	IN	- 71,81	47,86
		BI	- 66,66	- 12,23

Tab. 9. Změna obsahu fenolických látek během inkubace opadů z PL. Změna je vztažena k počátečnímu obsahu a vyjádřena v procentech. Záporné číslo znamená úbytek v obsahu. PL – povodí Plešného jezera, IN – inokulovaný vzorek, BI – vzorek bez inokulace.

Během inkubace se měnilo zastoupení fenolických látek v opadu (Tab. 9 a 10). Změna je různá pro obsah AEPH a WEPH. Zastoupení AEPH se snížilo ve všech případech. Rozdíly jsou v rozsahu snížení. V jehličí došlo ke statisticky průkazně vyššímu snížení obsahu AEPH než v případě opadu třtiny (Fisher test, $p < 0,05$). Na změnu zastoupení WEPH v opadu měl statisticky průkazný vliv také typ opadu (Fisher test, $p < 0,05$) (Tab. 9 a 10). Změna zastoupení AEPH a WEPH signifikantně korelovaly ($N = 36$; $r = - 0,53$; $p < 0,01$).

V opadu PL třtiny došlo k většímu snížení obsahu AEPH v BI opadech (Tab. 9). V jehličí z PL došlo k většímu snížení AEPH v IN opadech. V opadech třtiny z PL byla změna AEPH větší v 0°C, v jehličí v 10°C.

V opadech z povodí PL neplatí konzistentní snížení obsahu WEPH (Tab. 9). V PL třtině došlo ke zvýšení obsahu WEPH ve všech opadech kromě IN v 0°C. V opadech třtiny BI bylo toto zvýšení větší. V 10°C se obsah WEPH zvyšoval více než v opadech v 0°C. V jehličí se obsah WEPH zvyšoval v IN opadech a snižoval v BI opadech. Větší změna obsahu WEPH nastala v jehličí v 0°C.

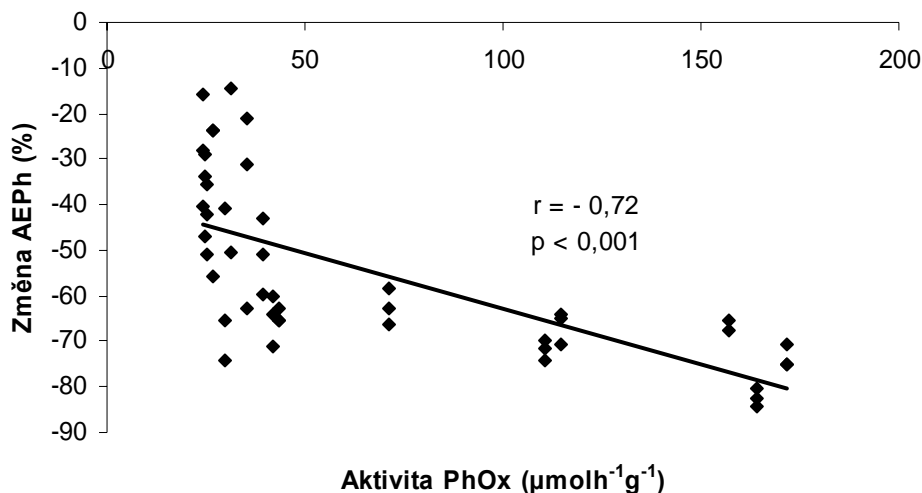
	Teplota °C	Inokulace	Změna obsahu AEPH %	Změna obsahu WEPH %
Třtina	0	IN	- 42,74	16,04
		BI	- 69,62	8,81
	10	IN	- 25,99	51,11
		BI	- 51,21	2,07
Jehličí	0	IN	- 66,61	89,33
		BI	- 62,41	97,72
	10	IN	- 73,65	81,95
		BI	- 82,37	194,54

Tab. 10. Změna obsahu fenolických látek během inkubace opadů z CT. Změna je vztažena k počátečnímu obsahu a vyjádřena v procentech. Záporné číslo znamená úbytek v obsahu. CT – povodí Čertova jezera, IN – inokulovaný vzorek, BI – vzorek bez inokulace.

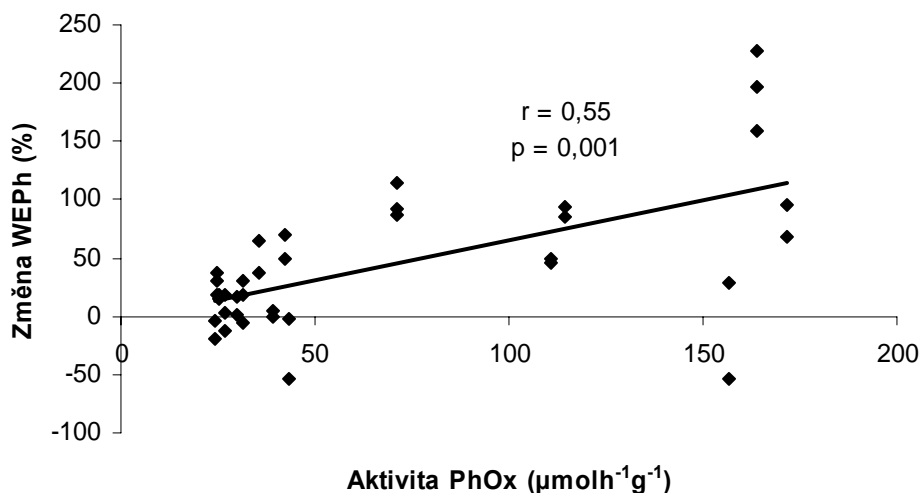
V opadu CT třtiny došlo k většímu snížení obsahu AEPH v BI opadech (Tab. 10). V CT jehličí bylo větší snížení obsahu AEPH v IN opadu v 0°C a v BI opadu to bylo v 10°C. V opadech třtiny byla změna větší v 0°C. V jehličí bylo snížení obsahu AEPH větší v 10°C.

Obsah WEPH se v opadech z povodí CT ve všech případech zvýšil (Tab. 10). V opadech třtiny se obsah WEPH zvýšil více v IN opadech. V jehličí se obsah WEPH zvýšil více v BI opadech.

4.5.2. Závislost změn obsahu AEPH a WEPH na aktivitě PhOx a MnP



Graf 11. Závislost změny obsahu AEPH na aktivitě fenoloxidáz (PhOx). r - korelační faktor, p označuje signifikanci.



Graf 12. Závislost změny obsahu WEPH na aktivitě fenoloxidáz (PhOx). r - korelační faktor, p označuje signifikanci.

Změna obsahu AEPH signifikantně negativně korelovala ($p < 0,001$) s aktivitou PhOx (Graf 11). Změna obsahu WEPH signifikantně ($p = 0,001$) pozitivně korelovala s aktivitou PhOx (Graf 12). Změna obsahu AEPH dále signifikantně negativně korelovala ($p = 0,014$) s aktivitou

MnP (Příloha 14). S aktivitou MnP signifikantně pozitivně korelovala ($p = 0,013$) změna obsahu WEPH (Příloha 15).

5. Diskuze

5.1. Mikrobiální respirace

Mikrobiální respirace rostla po celou dobu inkubace. Nebylo tedy dosaženo limitní hodnoty, podobně jako ve studii Domische a kol. (2006). Kumulativní mikrobiální respirace dosáhla za dobu inkubace srovnatelných hodnot s Hanssonem a kol. (2010). Ti však jehličí inkubovali v 15°C, což znamená, že kumulativní mikrobiální respirace byla nižší než v případě této práce.

Celková respirace za období inkubace závisela pouze na teplotě. Inokulace ani typ opadu neměl vliv. Typ opadu neměl signifikantní vliv na respiraci ani při jiných měřeních na daných lokalitách (Bárta et al., 2010), ale je to v rozporu se studií Rouska a Bååthe (2007). Také Wang a kol. (2004) našli závislost na typu opadu. Inokulace rovněž respiraci signifikantně neovlivnila, což indikuje přítomnost endofytických mikroorganismů (Bárta et al., 2010).

5.2. Vliv chemického složení na enzymatickou aktivitu

Na aktivitu PhOx a MnP měl signifikantní vliv typ opadu. Opady se lišily v chemickém složení. Dostupnost živin významně ovlivňuje produkci fenolytických enzymů (Allison et al., 2009; Enrique et al., 2008; Eggert et al., 1996b; Leatham and Kirk, 1983). Signifikantní pozitivní vliv měl obsah AEPH. Obsah fenolických látek je považován za zásadní pro aktivitu fenolických enzymů (Sinsabaugh, 2010). S obsahem AEPH úzce souvisí obsah C_{TOT} , který zahrnuje i fenolické látky. Také tento ukazatel byl pozitivně signifikantně korelován s aktivitou PhOx a MnP. Naproti tomu mezi WEPH patří i nízkomolekulární fenolické látky, které slouží jako zdroj živin a energie i pro nefenolytické mikroorganismy (Kanerva et al., 2006; Kraus et al., 2004; Fierer et al., 2001). Obsah WEPH byl proto negativně korelován s aktivitami PhOx a PerOx. Podobně obsah C_{CW} , který rovněž odpovídá obsahu snadno dostupného uhlíku, je negativně korelován s aktivitami PhOx a MnP. Vysoký obsah snadno dostupných živin a energie v opadu může způsobovat útlum fenolytických enzymů (Chigineva et al., 2009), což se projevilo i v této práci. Supresivní vliv dusíku na dekompozici obtížně rozložitelného opadu je známý (Enrique et al., 2008; Wang et al., 2004; Leatham and Kirk, 1983). Ukazuje se to i na negativní korelaci aktivit PhOx a MnP s N_{CW} a DON. Chybějící korelace relativní hodnoty N_{CW} vztažené k N_{EXT} může být způsobená heterogenitou vzorků. Také ostatní korelace s N_{CW} jsou slabé. Dalším

důležitým prvkem je fosfor. Oxalátový fosfor představuje dostupné zdroje fosforu pro mikroorganismy a odpovídá tomu také negativní korelace s aktivitami PhOx a PerOx. Zdroje snadno dostupných živin většinou snižují aktivitu enzymů, ale přítomnost jiného zdroje uhlíku než je lignin může podpořit degradaci fenolických látek včetně ligninu několika WR druhy hub, včetně *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *T. hirsutus*, *Polyporus spp.* a *Lentinula edodes* (Berg and McClaughtery, 2008). To by vysvětlovalo pozitivní korelaci MnP s absolutním obsahem C_{CW} . Obsah C_{EXT} a N_{TOT} jsou korelovány pozitivně, což je v případě C_{EXT} způsobeno zřejmě vysokým zastoupením vysokomolekulárních fenolických látek v C_{EXT} . N_{TOT} zahrnuje zřejmě ve velké míře obtížněji dostupné zdroje dusíku, a proto odpovídá spíše obsahu vysokomolekulárních látek v opadu.

Pro další práci bych doporučila měřit chemické složení opadů ve třech bodech: po odběru, po namočení opadu do destilované vody před založením inkubací a po jejich ukončení. Pro zjištění míry obohacení opadu živinami prostřednictvím půdního extraktu bych navrhovala určit také jeho složení, především rozpustných forem C, N, P a WEPH.

5.3. Vliv enzymů na změnu zastoupení fenolických látek

Aktivity PhOx a MnP signifikantně ovlivnily změnu zastoupení AEPH a WEPH v opadech. Vliv aktivit PhOx byl silnější, což může souviset s nízkými aktivitami MnP na počátku dekompozice opadu (Steffen et al., 2007). Aktivity PhOx a MnP měly signifikantní vliv na snížení naměřeného obsahu AEPH v opadu. Naproti tomu ve studii Steffen a kol. (2007) enzymatická aktivita nekorelovala s úbytkem ligninu. Obsah WEPH se s rostoucími aktivitami PhOx a MnP zvyšoval. To mohlo být způsobeno selektivním rozkladem PhOx a MnP vysokomolekulárních fenolických látek, čímž by se automaticky zvyšovalo zastoupení WEPH. Dalším vysvětlením je konkurence mikroorganismů živících se snadno dostupnými zdroji energie (r-stratégové) a vysokomolekulárními látkami (K-stratégové) (Chigineva et al., 2009). Pak pokud v opadu převládali K-stratégové produkující PhOx a rozkládající především AEPH, chyběli by r-stratégové rozkládající hlavně WEPH. Tomu by také odpovídala signifikantní korelace mezi změnami AEPH a WEPH. Signifikantní korelací mezi aktivitami MnP a změnou zastoupení fenolických látek se tato práce liší od Steffen a kol. (2007). Z výsledků (těsnější korelace a vyšší aktivity) se tedy zdá, že úbytek fenolických látek v opadu v počátečních stádiích dekompozice byl způsoben především aktivitami PhOx, podobně jako v literatuře (Steffen et al., 2007).

5.4. Vliv inokulace půdním extraktem, endofytické mikroorganismy

Na respiraci, enzymatickou aktivitu ani změnu zastoupení fenolických látek neměla inokulace žádný vliv. Důvodem může být silné napadení opadu úspěšnými saprofytickými endofyty (Bárta et al., 2010; Promputtha et al., 2007; Osono, 2006), nebo inhibice látkami obsaženými v půdním extraktu. To že půdní extrakt mohl obohatit vzorky opadu o mnoho živin můžeme vidět z obsahů látek rozpustných ve studené vodě (C_{CW} , N_{CW} , WEP_h). Opady byly extrahovány pouze 30 minut, zatímco extrakty opadového půdního horizontu po dobu 60 minut. Nicméně opady byly před založením pokusů na 60 minut namočeny do vody, a proto lze očekávat, že byly ochuzeny jak o mikroorganismy tak částečně o rozpustné látky. Dodané živiny v půdním extraktu mohly brzdit degradaci, nebo ji naopak zvyšovat (Allison et al., 2009; Enrique et al., 2008; Eggert et al., 1996b; Leatham and Kirk, 1983). Inokulace samotnými mikroorganismy by tedy mohla mít značně odlišný vliv. Vliv inokulace může být nízký také proto, že v iniciální fázi rozkladu dominují endofytičtí saprofyty a teprve později, kdy je opad částečně rozložen, je kolonizován dalšími půdními saprofyty (Promputtha et al., 2007), protože opad na počátku dekompozice pro ně může být nedostupný (Osono and Hirose, 2009).

Výhodou endofytů je jejich přítomnost na opadu v okamžiku odlomení listu. Takový endofytický mikroorganismus je adaptovaný na chemické složení rostliny. Mezi rostlinami a endofytickými mikroorganismy totiž existují prokázané interakce. Pokud je mikroorganismus přítomen na „odpovídajícím“ substrátu v podobě listu, probíhá rozklad mnohem rychleji. Velký vliv na dekompozici může mít také určitá kombinace endofytických druhů, na příklad zahrnující houbu z oddělení *Basidiomycetes* (Santana et al., 2005), která zajistí rozklad ligninu a zpřístupňování nového substrátu (Berg and McClaugherty, 2008). Ukazuje se tedy, že rovněž lignin a jiné vysokomolekulární fenolické látky jsou rozkládány endofytickými mikroorganismy (Osono, 2006). V případě, že je takový mikroorganismus přítomen, může docházet již od počátku k rozkladu fenolických látek a ligninu.

Mikrobiální respirace byla signifikantně odlišná v opadech z různých povodí. To mohlo být dáno různým napadením endofyty, které se projevilo v případě třtiny projevilo různým zabarvením opadu (opad z povodí CT byl čistě žlutý, z PL skvrnitý). Skvrnitě zabarvení mohlo být dáno kolonizací endofyty nebo parazity. Přesto vliv inokulace ani v opadu třtiny není konzistentní.

U opadu třtiny mohlo být větší snížení AEPH u BI opadů než u IN opadů způsobeno dotykem listů se zemí a samotnou inokulací. Ze země se dotykem nebo prachem mohly přenést mikroorganismy na opad. V takovém případě by i opady třtiny BI obsahovaly saprofytické mikroorganismy. Vysokým obsahem rozpustných živin v půdním extraktu mohla být inhibována činnost fenolytických enzymů v IN opadech třtiny (Enrique et al., 2008; Eggert et al., 1996b; Leatham and Kirk, 1983). Opad třtiny je také přirozeně poměrně bohatý na rozpustné látky.

U jehličí převládá větší úbytek AEPH v IN opadech. K tomu je třeba dodat, že jehličí použité k pokusům se nikdy nedotklo země a proto u něho nemohlo dojít k přirozenému přenosu mikroorganismů (proto předpokládám, že je k inkubačním pokusům vhodnější). Silné zastoupení endofytů a nízký obsah rozpustných látek způsobily již na počátku dekompozice výrazný úbytek obsahu AEPH.

Z malého vlivu inokulace na mikrobiální respiraci, fenolytickou aktivitu a změnu zastoupení AEPH a WEPH vyplývá, že při zkoumání počátečních fází dekompozice, vlivem přítomnosti endofytických mikroorganismů, lze odebrat opad bez dotyku s půdou a není nutné inokulovat půdním extraktem.

5.5. Vliv teploty na mikrobiální respiraci a produkci fenolytických enzymů

Mikrobiální respirace byla signifikantně vyšší v 10°C než v 0°C. Mikrobiální respirace však byla významná i v 0°C, podobně jako v literatuře (Uchida et al., 2005; Jones et al., 1999; Fahnestock et al., 1998; Clein and Schimel, 1995). Vliv teploty byl vyšší v jehličí. Výsledky tedy neodpovídají tvrzení, že mikrobiální respirace je více ovlivněná teplotou v opadech s nízkým zastoupením fenolických látek (Domisch et al., 2006; Meentemeyer, 1978).

Na rozdíl od mikrobiální respirace, produkce fenolytických enzymů a změna zastoupení AEPH a WEPH neukázaly závislost na teplotě, čímž se potvrdila předchozí měření (Bárta et al., 2010). Podobně tomu bylo v předchozím pokusu, kdy aktivita PhOx a PerOx také nebyla určována inkubační teplotou (Applová, 2008). Fenolytická aktivita je tedy stejně vysoká při 0°C jako při 10°C. Fakt, že nízké teploty vyhovují některým houbám, je známý (Robinson, 2001; Bergero et al., 1999). Dá se také předpokládat, že vzhledem k vysokým optimálním teplotám (Niladevi and Prema, 2008; Baborová et al., 2006), rozdíl 10°C, pokud v 0°C nedojde k zamrznutí, nebude mít příliš velký vliv.

5.6. Využití poznatků této práce

5.6.1. Příčiny kůrovcové kalamity a obnova poškozených lokalit

Kůrovcová kalamita trvá již od roku 2004. Hlavními příčinami rozvoje kůrovce je nízká odolnost stromů vůči jejich ataku (Jones et al., 2004). Odolnost je negativně ovlivněná suchem způsobeným melioracemi a osluněním stromů na obnažených krajích lesů bez keřového porostu a po holosečném kácení. Dále je to zvýšený přísun živin, acidifikace prostředí kyselými dešti a s tím související zvýšená toxicita hliníku a vyplavování vápníku (Ca) a hořčíku (Mg) (Jones et al., 2004).

Hlavní otázkou nyní je, co dělat s lesem poškozeným kůrovcem. Jedním z řešení je holosečné kácení a odvoz dřeva. Tento postup s sebou nese ekonomický zisk, ale také mnohá negativa. Dochází k obnažení dalších okraje lesů, území se ochuzuje o živiny potřebné pro růst nových stromů, poškozují se půda, mění se vodní režim. Šíří se trávy, které zabraňují uchycení semenáčků stromů, ale mohou mít příznivý vliv na zvyšování pH a zadržování živin v půdě, včetně vápníku a hořčíku (Fiala et al., 2005). Dalším řešením je přirozená obnova lesa, jejímž výsledkem by měl být heterogennější, odolnější, různověký lesní porost. Růst stromů je však závislý na dostatku živin a organické hmoty v půdě. V lese jsou živiny vázány především ve dřevě stromů a v opadu (Kovářová and Vacek, 2003). Do půdy se vracejí skrze tlení a rozklad této organické hmoty. Hlavními chybějícími nutrienty jsou bazické kationty, jejichž nedostatek byl způsoben uvolňováním kyselými depozicemi, s nimiž Ca a Mg reagovaly a byly vyplavovány. Celkově ve smrkovém porostu je přítomno 254 kg dostupného Ca a Mg dohromady v jednom hektaru lesa. V půdě je jich 240 kg/ha (Kopáček, nepublikováno), ale odstranění vegetace vede k jejich rychlému vyplavování. Velké množství je vázáno ve stromech (pouze ve větvích a jehličí smrků se nachází 92 kg/ha). Při holosečném vykácení přijdeme nejen o vápník a hořčík, ale i o jiné živiny a organickou hmotu. Krokem potřebným k čerpání nutrientů rostlinami je rozklad dřeva a ostatní organické hmoty.

Z těchto důvodů probíhá na Šumavě intenzivní výzkum rozkladu organické hmoty a cyklů prvků (např. Šantrůčková et al., 2009; Šantrůčková et al., 2006). Moje práce přispívá především ke zlepšování metodiky zjišťování rychlosti rozkladu opadu. S tím souvisí již zmíněné doporučení stanovovat chemické složení opadů po namočení do destilované vody a určovat

aktivity PerOx při nižších inkubačních teplotách. Při studiu prvních stádií dekompozice není nutné inokulovat opad půdním extraktem. Mnohem důležitějšími faktory jsou teplota a typ opadu, potažmo chemické složení opadů.

6. Závěry

- Obsah vysokomolekulárních fenolických látek pozitivně ovlivňuje aktivitu fenoloxidáz a Mn-peroxidáz. Obsah nízkomolekulárních fenolických látek je ovlivňuje negativně.
- Inokulace nemá v počátečním stádiu dekompozice (cca 100 dní při teplotě 0 – 10°C) vliv na mikrobiální aktivitu (mikrobiální respiraci) v opadu třtiny chloupkaté (*Calamagrostis villosa*) a smrku (*Picea abies*), na produkci fenoloxidáz, peroxidáz, Mn-peroxidáz ani na změnu zastoupení fenolických látek.
- V 10°C je vyšší mikrobiální aktivita (mikrobiální respirace) než v 0°C. Enzymatická aktivita je rovněž ovlivněná teplotou, ale zde není tento vliv konzistentní. Mikrobiální respirace i enzymatické štěpení fenolických látek probíhá i za teploty 0°C.
- Během inkubace se snížil obsah vysokomolekulárních fenolických látek v opadech.
- Naměřené aktivity samotných fenoloxidáz a peroxidáz bez přítomnosti mikroorganismů jsou závislé na teplotě, ve které inkubujeme vzorky opadů (bez inokulace a bez inkubace) se substrátem L-DOPA. Optimum fenoloxidáz bylo vyšší než 22°C, zatímco optimum peroxidáz leželo v rozmezí teplot 0 – 15°C.
- V povodí Plešného a Čertova jezera dochází k rozkladu jehličí (*Picea abies*) a opadu třtiny chloupkaté (*Calamagrostis villosa*) i za nízkých teplot (0°C). Již od počátku dekompozice dochází k rozkladu fenolických látek, což umožňuje rychlou dekompozici organické hmoty v opadovém půdním horizontu a uvolnění živin do půdy, kde slouží jako zdroj živin pro nový porost.

7. Literatura

- Allison, S.D., LeBauer, D.S., Ofrecio, M.R., Reyes, R., Ta, A.M., Tran, T.M., 2009. Low levels of nitrogen addition stimulate decomposition by boreal forest fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 41, 293 – 302.
- Applová, M., 2008. Aktivita fenoloxidáz a peroxidáz v opadech jehličnatého lesa v povodí Plešného a Čertova jezera. Bakalářská diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 38 p.
- Archibald, F., Roy, B., 1992. Production of manganic chelates by laccase from the lignin-degrading fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1496 – 1499.
- Baborová, P., Möder, M., Baldrian, P., Cajthamlová, K., Cajthaml, T., 2006. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Research in Microbiology* 157, 248 – 253.
- Bao, W.L., Fukushima, Y., Jensen, K.A., Moen, M.A., Hammel, K.E., 1994. Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Letters* 354, 297 – 300.
- Bärlocher, F., Graça, M.A.S., 2005. Total phenolics. In: Graça, M.A.S., Bärlocher, F., Gessner, M.O., 2005. *Methods to study litter decomposition: A Practical Guide*, Springer, Netherlands, 97 – 100.
- Bárta, J., Applová, M., Vaněk, D., Křišťůvková, M., Šantrůčková, H., 2010. Effect of available P and phenolics on mineral N release in acidified spruce forest: connection with lignin-degrading enzymes and bacterial and fungal communities. *Biogeochemistry* 97, 71 – 87.
- Bending, G.D., Read, D.J., 1997. Lignin and soluble phenolic degradation by ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 101, 1348 – 1354.
- Berg, B., McClaugherty, C., 2008. *Plant litter: decomposition, humus formation, carbon sequestration*. Springer-Verlag, Berlin. 286 p.
- Bergero, R., Girlanda, M., Varese, G.C., Intili, D, Luppi, A.M., 1999. Psychrooligotrophic fungi from Arctic soils of Franz Joseph Land. *Polar Biology* 21, 361 – 368.
- Bernstein, M.E., Carroll, G.C., 1977. Microbial populations on Douglas fir needles. *Microbial Ecology* 4, 41 – 52.
- Boer, C.G., Obici, L., de Souza, C.G.M., Peralta, R.M., 2006. Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*. *Process Biochemistry* 41, 1203 – 1207.

Booker, F.L., Maier, C.A., 2001. Atmospheric carbon dioxide, irrigation, and fertilization effects on phenolic and nitrogen concentrations in loblolly pine (*Pinus taeda*) needles. *Tree Physiology* 21, 609 – 616.

Bourbonnais, R., Paice, M.G., Reid, I.D., Lanthier, P., Yaguchi, M., 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) in Kraft lignin depolymerisation. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1876 – 1880.

Brady, N.C., Weil, R.R., 2002. *The nature and properties of soils*. Prentice Hall, New Jersey. 960 p.

Call, H.P., 1994. Process for modifying, breaking down or bleaching lignin, materials containing lignin or like substances. World patent application WO 94/29510.

Cappo, K.A., Blume, L.J., Raab, G.A., Bartz, J.K., Engels, J.L., 1987. Analytical methods manual for the direct/delayed response project soil survey. US PA, Las Vegas, USA. Sections 8 – 11.

Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W., 2001. *The fungi*. Academic Press, London, UK, 588 p.

Ceylan, H., Kubilay, S., Aktas, N., Sahiner, N., 2008. An approach for prediction of optimum reaction conditions for laccase-catalyzed bio-transformation of 1-naphthol by response surface methodology (RSM). *Bioresource Technology* 99, 2025 – 2031.

Chigineva, N.I., Aleksandrova, A.V., Tiunov, A.V., 2009. The addition of labile carbon alters litter fungal communities and decreases litter decomposition rates. *Applied Soil Ecology* 42, 264 – 270.

Clein, J.S., Schimel, J.P., 1995. Microbial activity of tundra and taiga soils at sub-zero temperatures. *Soil Biology & Biochemistry* 27, 1231 – 1234.

Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 564 – 582.

Cox, P., Fisher, P.J., Anderson, J.M., 1997. Experiments in fungal survival of two common pine litter colonisers. *Mycologist* 11, 55 – 59.

Crawford, R.L., 1981. *Lignin biodegradation and transformation*. Wiley, New York, 137 p.

Dean, J.F.D., LaFayette, P.R., Rugh, C., Tristram, A.H., Hoopes, J.T., Eriksson, K.E.L., Merkle, S.A., 1998. Laccases associated with lignifying vascular tissues. In: Lewis, N.G., Sarkanen, S. (Eds.), *Lignin and lignan biosynthesis*. ACS Symposium Series 697. American Chemical Society, Washington, DC. 96 p.

Deckert, R. J., Melville, L. H., Peterson, R. L., 2001. Structural features of a *Lophodermium* endophyte during the cryptic life-cycle phase in the foliage of *Pinus strobus*. *Mycological Research* 105, 991 – 997.

DeForest, J.L., Zak, D.R., Pregitzer, K.S., Burton, A.J., 2005. Atmospheric nitrate deposition and enhanced dissolved organic carbon leaching: test of a potential mechanism. *Soil Science Society of America Journal* 69, 1233 – 1237.

de Jong, E., Cazemier, A.E., Field, J.A., de Bont, J.A.M., 1994. Physiological role of chlorinated aryl alcohols biosynthesized de novo by white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 271 – 277.

Dilly, O., Bloem, J., Vos, A., Munch, J.C., 2004. Bacterial diversity in agricultural soils during litter decomposition. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 468 – 474.

Domisch, T., Finér, L., Laine, J., Laiho, R., 2006. Decomposition and nitrogen dynamics of litter in peat soils from two climatic regions under different temperature regimes. *European Journal of Soil Biology* 42, 74 – 81.

Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E.L., 1996a. A fungal metabolite mediates degradation of non-lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters* 391, 144 – 148.

Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.E.L., 1996b. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1151 – 1158.

Enrique, A.G., Bruno, C., Christopher, A., Virgile, C., Stéven, C., 2008. Effects of nitrogen availability on microbial activities, densities and functional diversities involved in the degradation of a Mediterranean evergreen oak litter (*Quercus ilex* L.). *Soil Biology & Biochemistry* 40, 1654 – 1661.

Eriksson, K.E., Blanchette, R.A., Ander, P., 1990. *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer-Verlag. Berlin, New York. 407 p.

Faeth, S.H., Hammon, K.E., 1997. Fungal endophytes in oak trees. I. Long-term patterns of abundance and associations with leafminers. *Ecology* 78, 810 – 819.

Fahnestock, J.T., Jones, M.H., Brooks, P.D., Walker, D.A., Welker, J.M., 1998. Winter and early spring CO₂ efflux from tundra communities of northern Alaska. *Journal of Geophysical Research* 103, 29023 – 29027.

Fiala, K., Tůma, I., Holub, P., Jandák, J., 2005. The role of *Calamagrostis* communities in preventing soil acidification and base cation losses in a deforested mountain area affected by acid deposition. *Plant and Soil* 268, 35 – 49.

Fierer, N., Schimel, J.P., Cates, R.G., Zou, J., 2001. Influence of balsam poplar tannin fractions on carbon and nitrogen dynamics in Alaskan taiga floodplain soils. *Soil Biology & Biochemistry* 33, 1827 – 1839.

Gallo, M., Amonette, R., Lauber, C., Sinsabaugh, R.L., Zak, D.R., 2004. Short-term changes in oxidative enzyme activity and microbial community structure in nitrogen-amended north temperate forest soils. *Microbial Ecology*, In press.

Griffin, D.M., 1972. *Ecology of soil fungi*. Syracuse University Press. Syracuse. 193 p.

Halvorson, J.J., Gonzales, J.M., 2008. Tannic acid reduces recovery of water-soluble carbon and nitrogen from soil and affects the composition of Bradford-reactive soil protein. *Soil Biology & Biochemistry* 40, 186 – 197.

Hansson, K., Kleja, D.B., Kalbitz, K., Larsson, H., 2010. Amounts of carbon mineralised and leached as DOC during decomposition of Norway spruce needles and fine roots. *Soil Biology & Biochemistry* 42, 178 – 185.

Harvey, B.M., Walker, J.R.K., 1999. Studies with plant laccases: I. Comparison of plant and fungal laccases. *Biochem. Molecular Biology and Biophysics* 3, 45 – 51.

Hatakka, A., 2001. Biodegradation of lignin. In: Hofrichter, M., Steinbüchel, A., (Eds.), *Biopolymers*. 1. Lignin, humic substances and coal. Weinheim. Germany. 129 – 180.

Helander, M.L., Neuvonen, S., Sieber, T., Petrini, O., 1993. Simulated acid rain affects birch leaf endophyte populations. *Microbial Ecology* 26, 227 – 234.

Hendel, B., Sinsabaugh, R.L., Marxsen, J., 2005. Lignin-degrading enzymes: phenoloxidase and peroxidase. In: Graça, M.A.S., Bärlocher, F., Gessner, M.O., 2005. *Methods to study litter decomposition: a practical guide*. Springer, Netherlands, 273 – 278.

Henriksen, T.M., Breland, T.A., 1999. Nitrogen availability effects on carbon mineralization, fungal and bacterial growth, and enzyme activities during decomposition of wheat straw in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1121 – 1134.

Hildén, K., Martinez, A.T., Hatakka, A., Lundell, T., 2005. The two manganese peroxidases Pr-MnP2 and Pr-MnP3 of *Phlebia radiata*, a lignin-degrading basidiomycete, are phylogenetically and structurally divergent. *Fungal genetics and biology* 42, 403 – 419.

Hofrichter, M., 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30, 454 – 466.

Hofrichter, M., Lundell, T., Hatakka, A., 2001. Conversion of milled pine wood by manganese peroxidase from *Phlebia radiata*. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4588 – 4593.

Hofrichter, M., Vares, K., Scheibner, K., Galkin, K., Silipä, J., Hatakka, A., 1999. Mineralization and solubilization of synthetic lignin by manganese peroxidases from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. *Journal of Biotechnology* 67, 217 – 228.

Isermeyer, H., 1952. Eine einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung und der Karbonate im Boden. *Z Pflanzenernähr Bodenk* 56, 26 – 38.

Jäggi, W., 1976. Die Bestimmung der CO₂-Bildung als Mass der bodenbiologischen Aktivität. *Schweiz Landwirtschaft Forschung* Band 15, Heft 314, 317 – 380.

Jones, M.E., Paine, T.D., Fenn, M.E., Poth, M.A., 2004. Influence of ozone and nitrogen deposition on bark beetle activity under drought conditions. *Forest Ecology and Management* 200, 67 – 76.

Jones, M.H., Fahnestock, J.T., Welker, J.M., 1999. Early and late winter CO₂ efflux from arctic tundra in the Kuparuk River watershed, Alaska, U.S.A. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 31, 187 – 190.

Kanerva, S., Kitunen, V., Kiikkilä, O., Lojonen, J., Smolander, A., 2006. Response of soil C and N transformations to tannin fractions originating from Scots pine and Norway spruce needles. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 1364 – 1374.

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

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

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

Kopáček, J., Veselý, J., 2005. Sulfur and nitrogen emissions in the Czech Republic and Slovakia from 1850 till 2000. *Atmospheric Environment* 39, 2179 – 2188.

Kovářová, M., Vacek, S., 2003. Mountain Norway spruce forests: Needle supply and its nutrient content. *Journal of Forest Science* 49, 327 – 332.

Kraus, T.E.C., Zasoski, R.J., Dahlgren, R.A., Horwath, W.T., Preston, C.M., 2004. Carbon and nitrogen dynamics in a forest soil amended with purified tannins from different plant species. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 309 – 321.

Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A., Gold, M.H., 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 169, 247 – 250.

- Lankinen, V.P., Bonnen, A.M., Anton, L.H., Wood, D.A., Kalkkinen, N., Hatakka, A., Thurston, C.F., 2001. Characteristics and N-terminal amino acid sequence of manganese peroxidase from solid substrate cultures of *Agaricus bisporus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55, 170 – 176.
- Leatham, G. F., Kirk, T. K., 1983. Regulation of ligninolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. *FEMS Microbiology Letters* 16, 65 – 67.
- Lehtijärvi, A., Barklund, P., 2000. Seasonal patterns of colonization of Norway spruce needles by *Lophodermium piceae*. *Forest Pathology* 30, 185 – 193.
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś -Wasilewska, M., Cho, N.-S., Hofrichter, M., Rogalski, J., 1999. Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology* 27, 175 – 185.
- Li, J., Zhao, G.Z., Chen, H.H., Qin, S., Xu, L.H., Jiang, C.L., Li, W.J., 2008. *Rhodococcus cercidiphylli* sp. nov., a new endophytic actinobacterium isolated from a *Cercidiphyllum japonicum* leaf. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 108 – 113.
- Liu, L., Dean, J.F.D., Friedman, W.E., Eriksson, K.-E., 1994. A laccase – like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissue. *The Plant Journal* 6, 213 – 224.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R.B., Taghavi, S., Mezgeay, M., van der Lelie, D., 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21, 583 – 606.
- Ložek, V., 2001. Geologie Národního parku Šumava. *Silva Gabreta, Supplementum* 1, 18 - 19.
- Mayer, A.M., Harel, E., 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18, 193 – 215.
- Mayer, A.M., Staples, R.C., 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Review. Phytochemistry* 60, 551 – 565.
- Meentemeyer, V., 1978. Macroclimate and lignin control of litter decomposition rates. *Ecological Society of America* 59, 465 – 472.
- Moore, T.R., Trofymow, J.A., Prescott, C.E., Fyles, J., Titus, B.D., 2006. Patterns of carbon, nitrogen and phosphorus dynamics in decomposing foliar litter in Canadian forests. *Ecosystems* 9, 46 – 62.
- Nerud, F., Zouchova, Z., Misurcova, Z., 1991. Ligninolytic properties of different white-rot fungi. *Biotechnology Letters* 13, 657 – 660.
- Ngo, T.T., Lenhoff, H.M., 1980. A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions, *Analytical Biochemistry* 105, 389 – 397.

- Niladevi, K.N., Prema, P., 2008. Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammoticus* and its application in dye decolourization. *Bioresource Technology* 99, 4583 – 4589.
- Nilsson, T., Daniel, G., Kirk, T.K., Obst, J.R., 1989. Chemistry and microscopy of wood decay by some higher ascomycetes. *Holzforschung* 43, 11 – 18.
- Osono T., 2006. Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 701 – 716.
- Osono, T., Hirose, D., 2009. Effects of prior decomposition of *Camellia japonica* leaf litter by an endophytic fungus on the subsequent decomposition by fungal colonizers. *Mycoscience* 50, 52 – 55.
- Osono, T., Takeda, H., 2000. Decomposing ability of interior and surface fungal colonizers of beech leaves with reference to lignin decomposition. *European Journal of Soil Biology* 35, 51 – 56.
- Pang, K.L., Vrijmoed, L.L.P., Goh, T.K., Plaingam, N., Jones, E.B.G., 2008. Fungal endophytes associated with *Kandelia candel* (*Rhizophoraceae*) in Mai Po Nature Reserve, Hong Kong. *Botanica Marina* 51, 171 – 178.
- Pawłowski, L., 1997. Acidification: its impact on the environment and mitigation strategies. *Ecological Engineering* 8, 271 – 288.
- Perez, J., Jeffries, T.W., 1992. Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2402 – 2409.
- Périé, F.H., Gold, M.H., 1991. Manganese regulation of manganese peroxidase expression and lignin degradation by the white rot fungus *Dichomitus squalens*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2240 – 2245.
- Petruš, J., Neuhäuslová, Z., 2001. Pedologie Národního parku Šumava. *Silva Gabreta, Supplementum* 1, 21 – 22.
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J., 1998. *Fyziologie rostlin*. Academia. Praha. 484 p.
- Promptutha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D., Jeewon, R., 2007. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology* 53, 579 – 590.
- Rayner, A. D. M., Boddy, L., 1988. *Fungal decomposition of wood: its biology and ecology*. John Wiley. Chichester.

Robinson, C.H., 2001. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist* 151, 341 – 353.

Rousk, J., Bååth, E., 2007. Fungal and bacterial growth in soil with plant materials of different C/N ratios. *FEMS Microbiology Ecology* 62, 258 – 267.

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

Saiya-Cork, K.R., Sinsabaugh, R.L., Zak, D.R., 2002. Effects of long term nitrogen deposition on extracellular enzyme activity in an *Acer saccharum* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1309 – 1315.

Saikkonen, K., 2007. Forest structure and fungal endophytes. *Fungal Biology Reviews* 21, 67 – 74.

Santana, M.E., Lodge, D.J., Lebow, P., 2005. Relationship of host recurrence in fungi to rates of tropical leaf decomposition. *Pedobiologia* 49, 549 – 564.

Schweitzer, J. A., Bailey, J. K., Hart, S. C., Wimp, G. M., Chapman, S. K., Whitham, T. G., 2005. The interaction of plant genotype and herbivory decelerate leaf litter decomposition and alter nutrient dynamics. *Oikos* 110, 133 – 145.

Sieber, T.N., Sieber-Canavesi, F., Dorworth, C.E., 1991. Endophytic fungi of red alder (*Alnus rubra*) leaves and twigs in British Columbia. *Canadian Journal of Botany* 69, 407 – 411.

Sinsabaugh, R.L., 2010. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology & Biochemistry* 42, 391 – 404.

Souto, X.C., Chiapusio, G., Pellissier, F., 2000. Relationships between phenolics and soil microorganisms in spruce forests: significance for natural regeneration. *Journal of Chemical Ecology* 26, 2025 – 2034.

Srebotnik, E., Jensen Jr., K.A., Hammel, K.E., 1994. Fungal degradation of recalcitrant nonphenolic lignin structures without lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 12794 – 12797.

Steffen, K.T., Cajthaml, T., Šnajdr, J., Baldrian, P., 2007. Differential degradation of oak (*Quercus petraea*) leaf litter by litter-decomposing basidiomycetes. *Research in Microbiology* 158, 447 – 455.

Steffen, K.T., Hofrichter, M., Hatakka, A., 2000. Mineralisation of ¹⁴C-labelled synthetic lignin and ligninolytic enzyme activities of litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 819 – 825.

- Sterjiades, R., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E., 1992. Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiology* 99, 1162 – 1168.
- Šantrůčková, H., 2001. *Ekologie půdy*. BF JU. České Budějovice. 29 p.
- Šantrůčková, H., Křišťůvková, M., Vaněk, D., 2006. Decomposition rate and nutrient release from plant litter of Norway spruce forest in the Bohemian Forest. *Biologia* 61, 499 – 508.
- Šantrůčková, H., Tahovská, K., Kopáček, J., 2009. Nitrogen transformations and pools in N-saturated mountain spruce forest soils. *Biology and Fertility of Soils* 45, 395 – 404.
- Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19 – 26.
- Uchida, M., Mob, W., Nakatsubo, T., Tsuchiya, Y., Horikoshi, T., Koizumi, H., 2005. Microbial activity and litter decomposition under snow cover in a cool-temperate broad-leaved deciduous forest. *Agricultural and Forest Meteorology* 134, 102 – 109.
- Veselý, J., 1994. Investigation of the nature of the Šumava lakes: a review. *Časopis Národního muzea* 163, 103 – 120.
- Votrubová, O., 1996. *Anatomie rostlin*. Karolinum. Praha. 89 p.
- Wang, W.J., Baldock, J.A., Dalal, R.C., Moody, P.W., 2004. Decomposition dynamics of plant materials in relation to nitrogen availability and biochemistry determined by NMR and wet-chemical analysis. *Soil Biology & Biochemistry* 36, 2045 – 2058.
- Wariishi, H., Valli, K., Gold, M.H., 1991. In vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 176, 269 – 275.
- Wei, H., Xu, Q., Taylor II, L.E., Baker, J.O., Tucker, M.P., Ding, S.Y., 2009. Natural paradigms of plant cell wall degradation. *Current Opinion in Biotechnology* 20, 330 – 338.
- Wilson D, 1995. Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73, 274 – 276.
- Wilson, D., Carroll, G.C., 1994. Infection studies of *Discula quercina*, and endophyte of *Quercus garryana*. *Mycologia* 86, 635 – 647.
- Witkamp, M., 1966. Decomposition of leaf litter in relation to environment, microflora, and microbial respiration. *Ecology* 47, 194 – 201.
- Yu, Z., Dahlgren, R.A., 2000. Evaluation of methods for measuring polyphenols in conifer foliage. *Journal of Chemical Ecology* 26, 2119 – 2140.

8. Přílohy

	AR	AP
Sukcinát – lakátový pufr	21 ml	21 ml
DMAB	2,8 ml	2,8 ml
MBTH	1,4 ml	1,4 ml
MnSO₄	1,4 ml	-
H₂O₂	1,4 ml	1,4 ml
EDTA	-	1,4 ml

Příloha 1. Směsi pro stanovení Mn-peroxidázy

VZ 1 + AR	VZ 1 + AP		VZ 3 + AR	VZ 3 + AP		VZ 5 + AR	VZ 5 + AP		VZ 7 + AR	VZ 7 + AP	
VZ 1 + AR	VZ 1 + AP		VZ 3 + AR	VZ 3 + AP		VZ 5 + AR	VZ 5 + AP		VZ 7 + AR	VZ 7 + AP	
VZ 1 + AR	VZ 1 + AP		VZ 3 + AR	VZ 3 + AP		VZ 5 + AR	VZ 5 + AP		VZ 7 + AR	VZ 7 + AP	
VZ 1 + AR	VZ 1 + AP		VZ 3 + AR	VZ 3 + AP		VZ 5 + AR	VZ 5 + AP		VZ 7 + AR	VZ 7 + AP	
VZ 2 + AR	VZ 2 + AP		VZ 4 + AR	VZ 4 + AP		VZ 6 + AR	VZ 6 + AP		VZ 8 + AR	VZ 8 + AP	
VZ 2 + AR	VZ 2 + AP		VZ 4 + AR	VZ 4 + AP		VZ 6 + AR	VZ 6 + AP		VZ 8 + AR	VZ 8 + AP	
VZ 2 + AR	VZ 2 + AP		VZ 4 + AR	VZ 4 + AP		VZ 6 + AR	VZ 6 + AP		VZ 8 + AR	VZ 8 + AP	
VZ 2 + AR	VZ 2 + AP		VZ 4 + AR	VZ 4 + AP		VZ 6 + AR	VZ 6 + AP		VZ 8 + AR	VZ 8 + AP	

Příloha 2. Schéma pipetování vzorků a roztoků AR a AP do mikrodestiček

Příloha 3. Složení pufrů:

Sukcinát-laktátový pufr (100 mM)

0,146 g	Kyselina jantarová
1,64 g	Kyselina mléčná, sodná sůl 60%
100 ml	destilovaná voda

Fosfátový pufr (100 mM)

0,950 g	KH_2PO_4
0,540 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
100 ml	destilovaná voda

Roztok DMAB (25 mM)

0,0826 g	DMAB
20 ml	Fosfátový pufr pH 6,5

Roztok MBTH (1 mM)

0,0043 g	MBTH
20 ml	destilovaná voda

Roztok MnSO_4 (2 mM)

0,0169 g	$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
50 ml	destilovaná voda

Roztok EDTA (2 mM)

0,074 g	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
50 ml	destilovaná voda

Roztok H_2O_2 (1 mM), byl připravován čerstvý před každým měřením

10 μl	30% H_2O_2
88 ml	destilovaná voda

		Teplota °C	In	C _{TOT} m _{gg} ⁻¹	N _{TOT} m _{gg} ⁻¹	C _{TOT} /N _{TOT}	C _{EXT} m _{gg} ⁻¹	C _{EXT} % C _{TOT}	N _{EXT} m _{gg} ⁻¹	N _{EXT} % N _{TOT}	DON m _{gg} ⁻¹
PL	Třtina	0	IN	449,94	10,51	42,81	32,85 (3,09)	7,30 (0,69)	1,49 (0,17)	14,18 (1,60)	1,23 (0,17)
		0	BI	447,34	12,69	35,24	29,11 (2,21)	6,51 (0,49)	1,54 (0,06)	12,10 (0,44)	1,30 (0,06)
		10	IN	450,24	10,33	43,58	34,71 (1,89)	7,71 (0,42)	1,47 (0,21)	14,27 (2,01)	1,05 (0,00)
		10	BI	448,13	13,88	32,28	34,84 (1,79)	7,77 (0,40)	1,71 (0,07)	12,31 (0,51)	1,41 (0,07)
	Jehličí	0	IN	501,25	15,60	32,14	42,33 (0,57)	8,44 (0,11)	1,51 (0,12)	9,70 (0,77)	1,18 (0,12)
		0	BI	497,91	15,19	32,78	37,32 (3,10)	7,50 (0,62)	0,74 (0,11)	4,87 (0,72)	0,49 (0,04)
		10	IN	506,05	19,68	25,72	41,69 (1,66)	8,24 (0,33)	3,75 (0,24)	19,04 (1,23)	2,37 (0,24)
		10	BI	504,50	17,30	29,17	33,37 (1,06)	6,61 (0,21)	2,20 (0,22)	12,72 (1,27)	1,30 (0,13)
CT	Třtina	0	IN	445,27	9,66	46,08	43,94 (4,59)	9,87 (1,03)	1,78 (0,31)	20,23 (0,63)	1,67 (0,06)
		0	BI	450,53	11,22	40,16	37,49 (1,62)	8,32 (0,36)	1,64 (0,30)	14,62 (2,71)	1,18 (0,15)
		10	IN	437,90	16,25	26,94	47,50 (2,78)	10,85 (0,64)	3,73 (0,29)	22,97 (1,80)	2,43 (0,29)
		10	BI	442,70	10,49	42,19	42,04 (3,70)	9,50 (0,84)	1,55 (0,11)	14,72 (1,02)	1,31 (0,11)
	Jehličí	0	IN	506,22	18,75	26,99	26,55 (2,52)	5,24 (0,50)	1,51 (0,34)	8,05 (1,82)	1,14 (0,34)
		0	BI	505,05	17,73	28,49	31,21 (0,86)	6,18 (0,17)	1,01 (0,05)	5,69 (0,30)	0,72 (0,05)
		10	IN	503,75	19,85	25,38	27,54 (0,99)	5,47 (0,20)	2,62 (0,02)	13,22 (0,11)	1,34 (0,02)
		10	BI	505,41	19,47	25,96	36,58 (1,90)	7,24 (0,38)	3,85 (0,19)	19,77 (1,00)	1,92 (0,19)

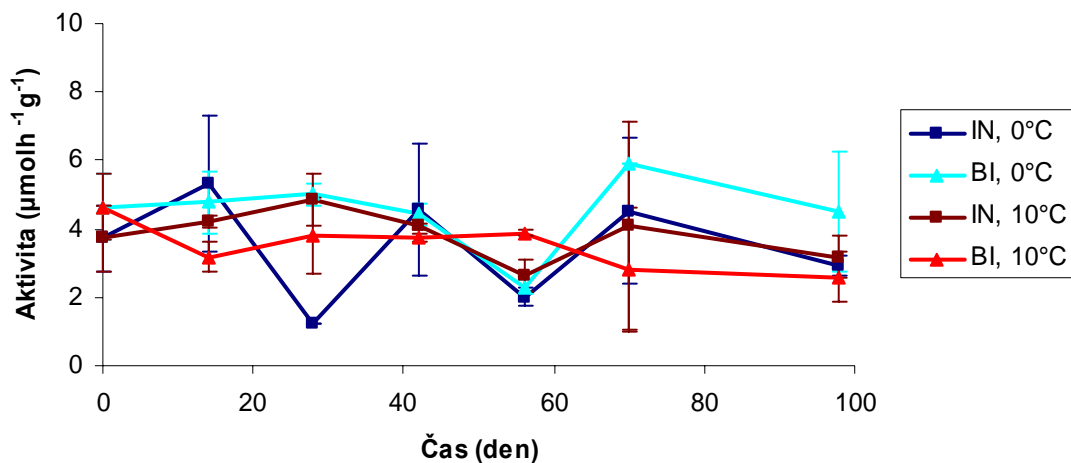
Příloha 4a: Konečné chemické složení opadů (n = 3, ± S.D.). PL – povodí Plešného jezera, CT – povodí Čertova jezera, In – inokulace, DON – obsah organického dusíku rozpustného ve vodě.

		Teplota °C	In	C _{cw} mgg ⁻¹	C _{cw} % C _{EXT}	N _{cw} mgg ⁻¹	N _{cw} % N _{EXT}	P _{ox} μgg ⁻¹	AEPH μmolg ⁻¹	WEPH μmolg ⁻¹
PL	Třtina	0	IN	9,13 (0,99)	27,79 (3,02)	0,45 (0,05)	29,86 (3,18)	173,11 (12,94)	22,84 (3,90)	10,95 (1,26)
		0	BI	8,05 (0,30)	27,24 (1,07)	0,56 (0,07)	36,36 (4,52)	164,99 (19,23)	21,42 (8,01)	14,22 (2,36)
		10	IN	10,89 (1,74)	34,22 (1,11)	0,52 (0,07)	35,60 (4,83)	204,00 (13,85)	20,83 (5,93)	12,76 (1,89)
		10	BI	12,48 (0,85)	35,82 (2,44)	0,57 (0,04)	33,12 (2,30)	105,54 (8,53)	20,12 (2,95)	15,93 (1,13)
	Jehličí	0	IN	7,03 (0,47)	16,60 (1,10)	0,25 (0,01)	16,40 (0,65)	212,84 (5,33)	91,24 (14,40)	13,33 (1,34)
		0	BI	10,25 (1,39)	25,88 (3,57)	0,12 (0,01)	16,84 (0,93)	132,33 (17,15)	92,94 (3,79)	8,04 (0,55)
		10	IN	8,17 (0,20)	19,61 (0,49)	0,88 (0,03)	23,52 (0,89)	170,70 (13,70)	73,67 (5,90)	12,71 (0,29)
		10	BI	6,87 (0,18)	20,58 (0,54)	0,60 (0,02)	27,39 (0,97)	97,53 (4,18)	87,14 (4,16)	7,47 (3,57)
CT	Třtina	0	IN	14,98 (1,91)	32,08 (3,72)	0,44 (0,04)	24,87 (2,18)	59,53 (15,46)	18,35 (2,49)	16,79 (0,60)
		0	BI	12,42 (0,51)	33,01 (1,88)	0,37 (0,02)	22,43 (1,20)	88,58 (11,93)	12,81 (5,50)	15,62 (1,09)
		10	IN	22,34 (1,64)	47,03 (3,46)	1,84 (0,07)	49,25 (2,01)	157,99 (6,73)	19,77 (7,03)	20,56 (2,42)
		10	BI	17,41 (2,07)	43,95 (3,13)	0,54 (0,09)	38,30 (2,55)	113,65 (12,61)	15,64 (2,66)	14,54 (0,32)
	Jehličí	0	IN	4,95 (0,42)	18,22 (1,95)	0,56 (0,01)	16,03 (0,96)	122,51 (11,99)	116,85 (11,91)	7,62 (0,26)
		0	BI	5,00 (0,04)	16,01 (0,14)	0,20 (0,01)	20,11 (1,46)	n.d.	131,57 (13,99)	7,95 (0,60)
		10	IN	5,16 (0,33)	18,75 (1,21)	0,64 (0,02)	24,33 (0,75)	92,97 (6,31)	92,22 (9,27)	7,32 (0,81)
		10	BI	8,04 (0,54)	21,99 (1,60)	1,14 (0,12)	29,71 (3,10)	117,63 (7,36)	61,72 (6,29)	11,85 (1,41)

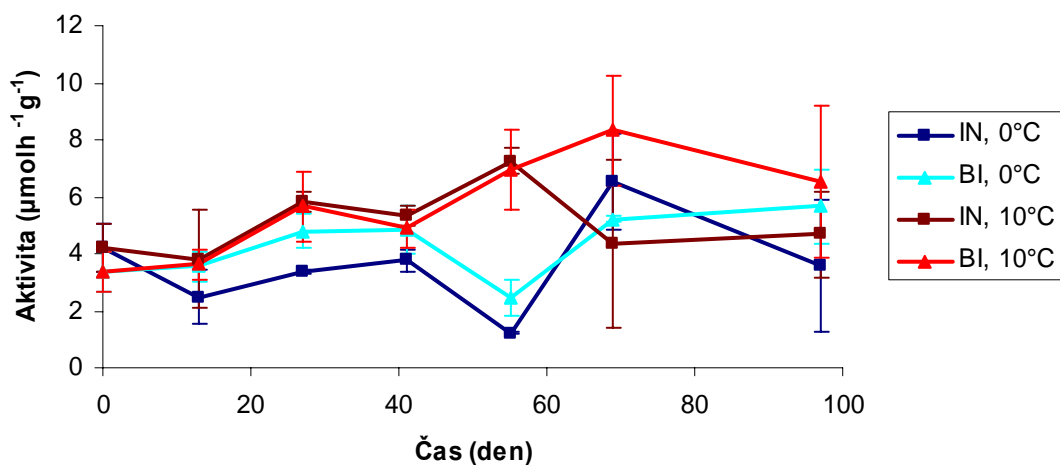
Příloha 4b: Konečné chemické složení opadů (n = 3, ± S.D.). PL – povodí Plešného jezera, CT – povodí Čertova jezera, In – inokulace, AEPH – obsah fenolických látek rozpustných v acetonu, WEPH – obsah fenolických látek rozpustných ve vodě.

		Maximální aktivita ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Teplota ($^{\circ}\text{C}$)
PhOx	třtina PC	3,57	22
	třtina CC	2,84	15
	jehličí PC	0,96	22
	jehličí CC	1,11	22
PerOx	třtina PC	7,81	5
	třtina CC	3,64	0
	jehličí PC	3,83	10
	jehličí CC	4,01	15

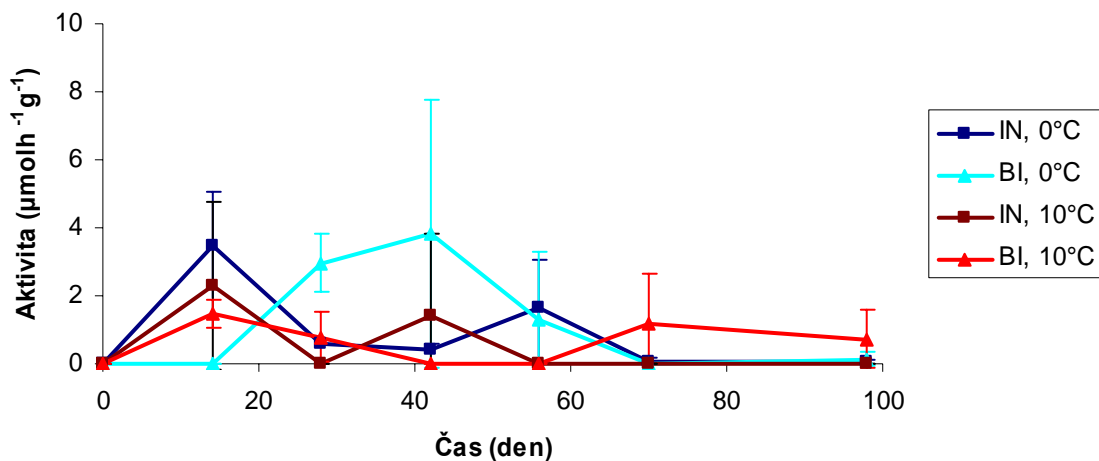
Příloha 5. Shrnutí hodnot maximálních aktivit fenoloxidáz (PhOx) a peroxidáz (PerOx) v závislosti na teplotě. PL – povodí Plešného jezera, CT – povodí Čertova jezera.



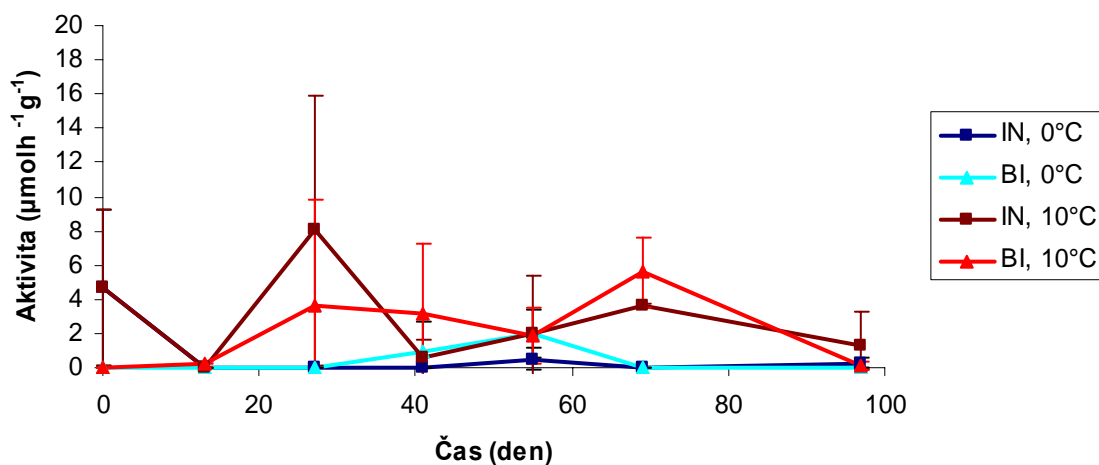
Příloha 6. Porovnání průběhů aktivit PhOx v opadech PL třtiny. PL – povodí Plešného jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace. Vyneseny jsou průměry (n = 3, ±S.D.).



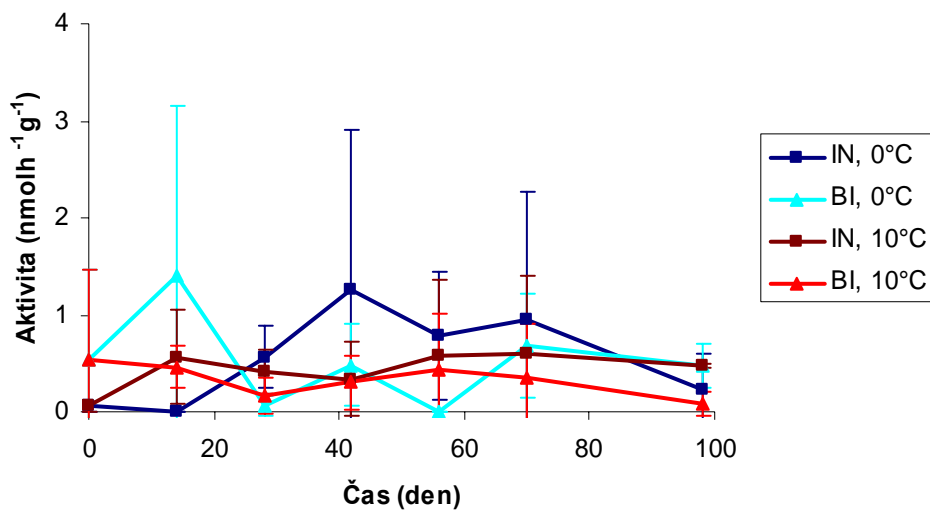
Příloha 7. Porovnání průběhů aktivit PhOx v opadech CT třtiny. CT – povodí Čertova jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace. Vyneseny jsou průměry (n = 3, ±S.D.).



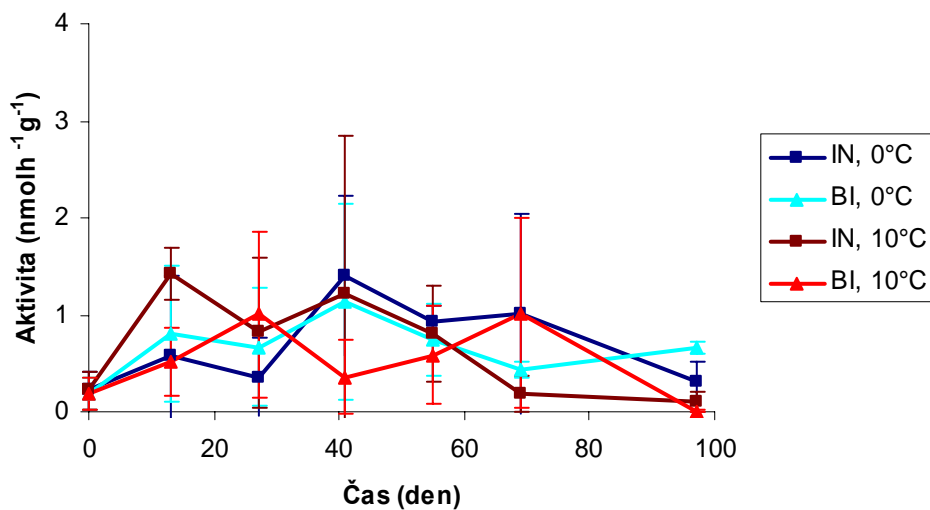
Příloha 8. Porovnání průběhů aktivit PerOx v opadu PL třtiny. PL – povodí Plešného jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace. Vyneseny jsou průměry ($n = 3, \pm S.D.$).



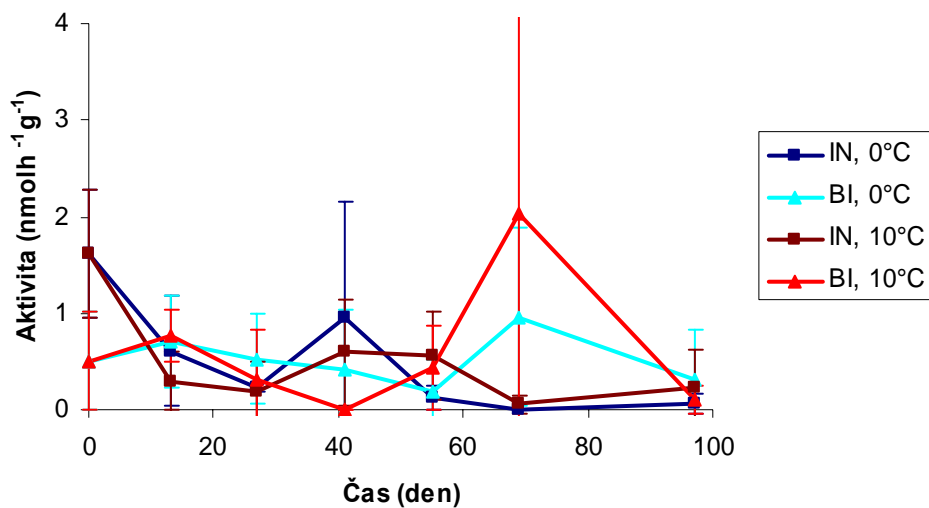
Příloha 9. Graf aktivity PerOx v opadech CT třtiny. CT – povodí Čertova jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace. Vyneseny jsou průměry ($n = 3, \pm S.D.$).



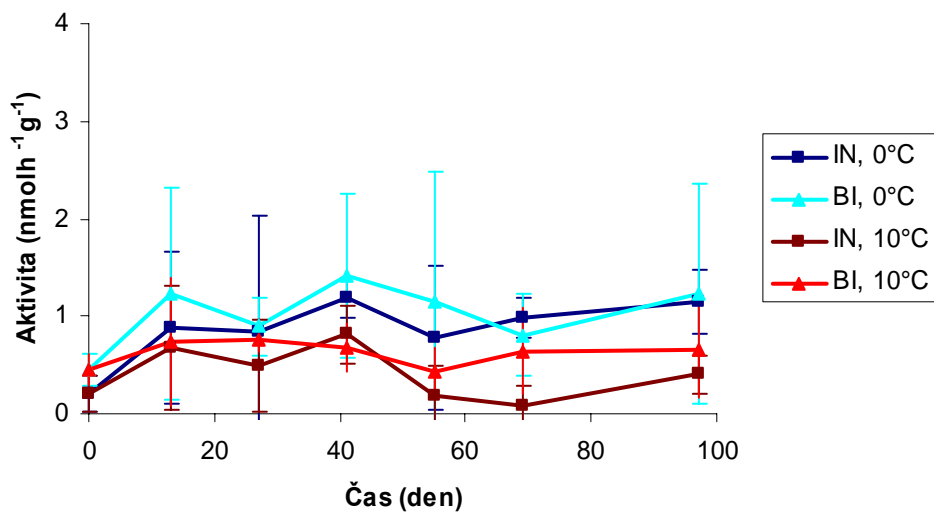
Příloha 10. Porovnání průběhů aktivit MnP v opadu PL třtiny. PL – povodí Plešného jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace. Vyneseny jsou průměry ($n = 3, \pm S.D.$).



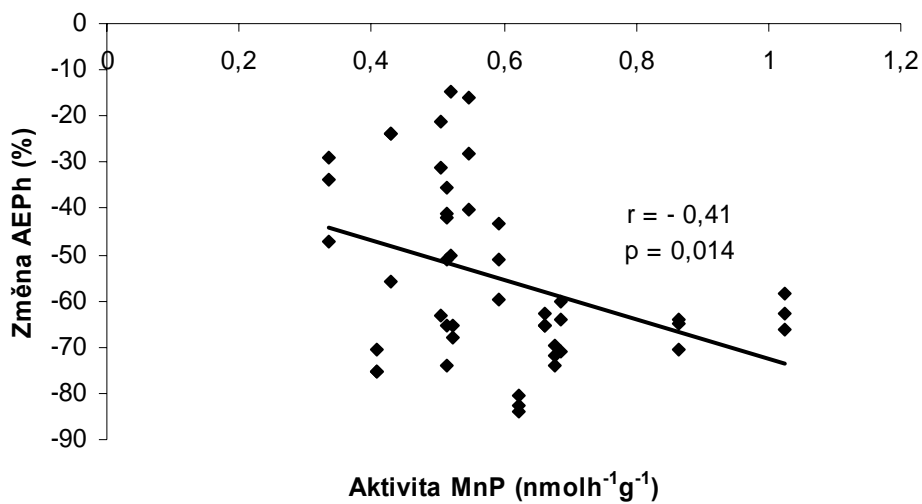
Příloha 11. Porovnání průběhů aktivit MnP v PL jehličí. PL – povodí Plešného jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace. Vyneseny jsou průměry ($n = 3, \pm S.D.$).



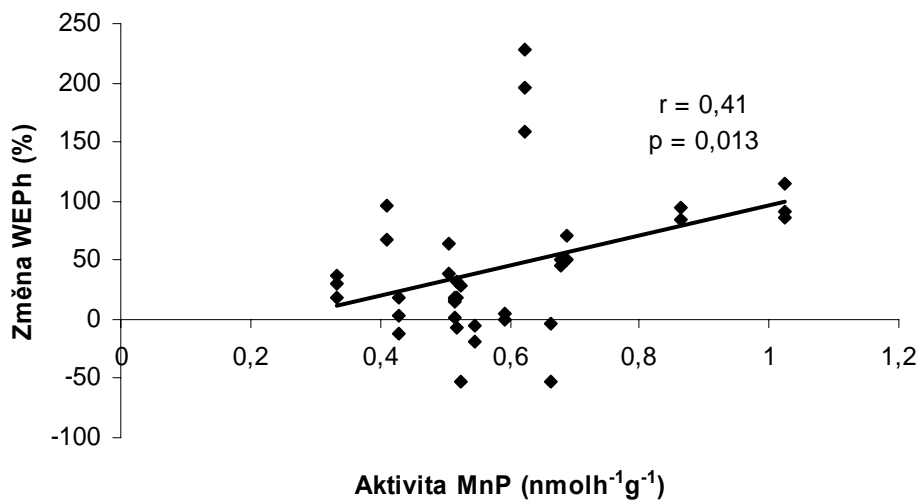
Příloha 12. Porovnání průběhů aktivit MnP v opadu CT třtiny. CT – povodí Čertova jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace. Vyneseny jsou průměry ($n = 3, \pm S.D.$).



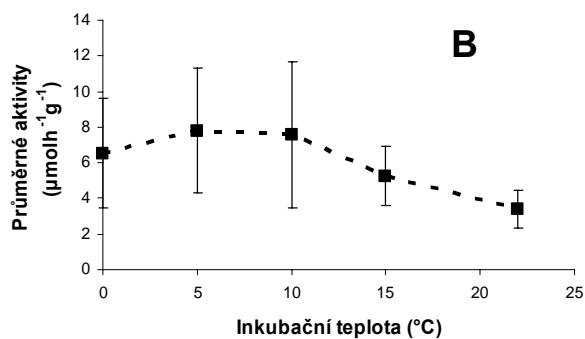
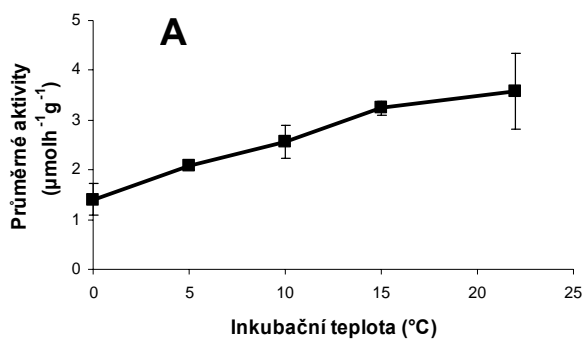
Příloha 13. Porovnání průběhů aktivit MnP v CT jehličí. CT – povodí Čertova jezera, IN – inokulovaný, BI – opad bez inokulace. Vyneseny jsou průměry ($n = 3, \pm S.D.$).



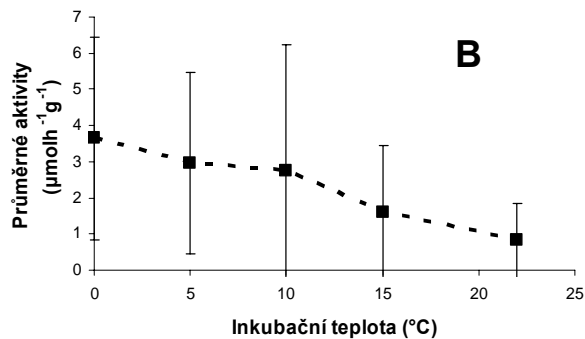
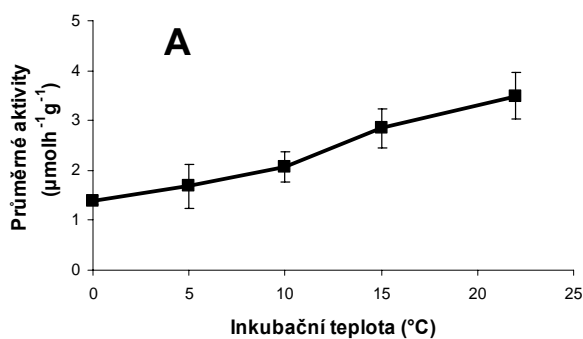
Příloha 14. Závislosti změny AEP h na aktivitě Mn-peroxidáz (MnP). r- korelační faktor, p označuje signifikanci.



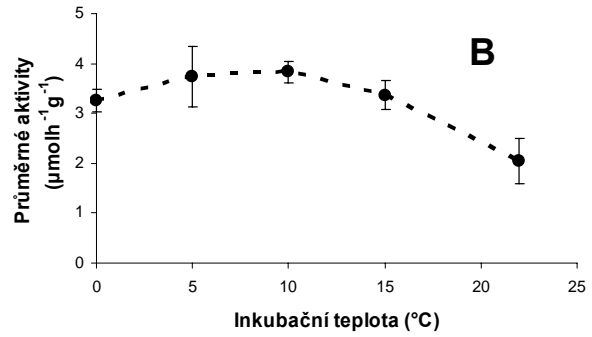
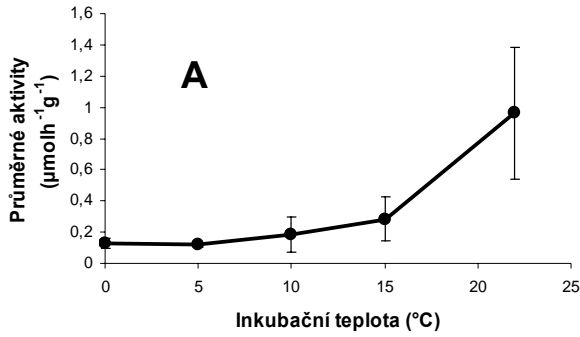
Příloha 15. Závislosti změny WEP h na aktivitě Mn-peroxidáz (MnP). r- korelační faktor, p označuje signifikanci.



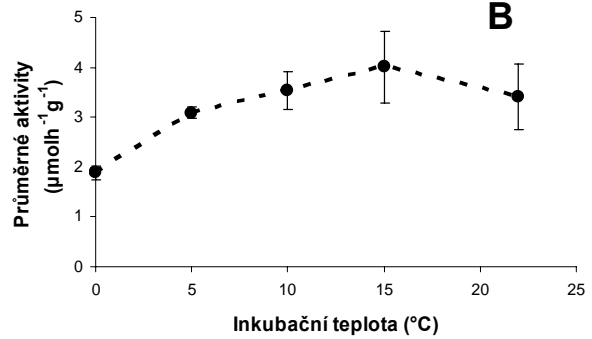
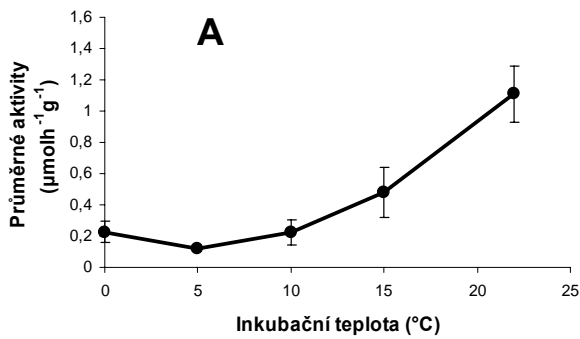
Přílohy 16 a 17. Srovnání závislosti fenoloxidázových (PhOx) (A) a peroxidázových (PerOx) (B) aktivit v opadu PL třtiny na různých inkubačních teplotách (průměr, n = 3, ± S.D.).



Přílohy 18 a 19. Srovnání závislosti fenoloxidázových (PhOx) (A) a peroxidázových (PerOx) (B) aktivit v opadu CT třtiny na různých inkubačních teplotách (průměr, n = 3, ± S.D.).



Přílohy 20 a 21. Srovnání závislosti fenoloxidázových (PhOx) (A) a peroxidázových (PerOx) (B) aktivit v PL jehličí na různých inkubačních teplotách (průměr, n = 3, ± S.D.).



Přílohy 22 a 23. Srovnání závislosti fenoloxidázových (PhOx) (A) a peroxidázových (PerOx) (B) aktivit v CT jehličí na různých inkubačních teplotách (průměr, n = 3, ± S.D.).