



UNIWERSYTET ROLNICZY
im. H. Kołłątaja w Krakowie
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny



Justyna Sokołowska
nr albumu 1037

Wpływ naturalnej sukcesji leśnej w Karpatach na właściwości gleb

Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze Gleboznawstwa i Agrofizyki
pod kierunkiem naukowym
dr hab. inż. Tomasza Zaleskiego, prof. URK
i dr hab. inż. Agnieszki Józefowskiej, prof. URK

Kraków 2022

Składam serdeczne podziękowania

Promotorowi dr hab. inż. Tomaszowi Zaleskiemu, prof. URK
*za możliwość realizacji pracy doktorskiej w Katedrze Gleboznawstwa i Agrofizyki
Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, wszelką pomoc i nadzór merytoryczny*

Promotor pomocniczej dr hab. inż. Agnieszce Józefowskiej, prof. URK
*za nieustanne wsparcie i nieograniczoną pomoc merytoryczną, praktyczną i koleżeńską
na każdym etapie realizacji doktoratu, opiekę, przekazaną wiedzę oraz wprowadzenie
w świat pracy naukowo-badawczej*

Doktorantom i Pracownikom Katedry Gleboznawstwa i Agrofizyki
*za możliwość dyskusji, niepowtarzalną atmosferę pracy, koleżeńską pomoc i codzienną
życzliwość*

Rodzicom, Rodzeństwu, Bliskim i Przyjaciołom
za ogromną cierpliwość, zrozumienie, ciągłą motywację do działania, obecność i wiarę.

Streszczenie

Pólnaturalne łąki są nieodłącznym elementem unikalnego krajobrazu Karpat, który został ukształtowany w wyniku wielowiekowej działalności człowieka. W rezultacie zmian społecznych i ekonomicznych następujących po II wojnie światowej, krajobraz Karpat zaczął ulegać ponownym przekształceniom. Aktualnie wiele obszarów pólnaturalnych łąk zostaje objętych naturalną sukcesją leśną. Takie zmiany, stały się przedmiotem wieloaspektowych dyskusji, szczególnie związanych z dalszym zarządzaniem cennymi przyrodniczo terenami pólnaturalnych łąk, zwiększaniem powierzchni leśnej, sekwestracją węgla oraz zmianami klimatycznymi. Mając na uwadze potrzebę pogłębienia wiedzy na temat zmian zachodzących w środowisku przyrodniczym terenów o podlegającym przemianom sposobie użytkowania podjęto badania, których głównym celem była ocena wpływu naturalnej sukcesji leśnej na zmiany oraz tempo przemian morfologicznych, fizyko-chemicznych i mikrobiologicznych właściwości gleb, w wybranych, karpaccich parkach narodowych. Lokalizacja badań na terenach objętych ochroną prawną daje możliwość zbadania zmian powodowanych naturalnym procesem sukcesji leśnej przy ograniczonym wpływie antropopresji.

Miejscem badań były obszary Pienińskiego Parku Narodowego, Bieszczadzkiego Parku Narodowego i Magurskiego Parku Narodowego. W każdym z nich wytypowane zostały transekty, obejmujące trzy obszary: pólnaturalną łąkę, obszar sukcesji leśnej porośniętej 25 – 75 letnią roślinnością drzewiastą oraz obszar ponad 150 letniego lasu (starodrzew). Gleby do analiz laboratoryjnych pobrano z poziomów genetycznych profili glebowych oraz z dwudziestocentymetrowych rdzeni wierzchniej warstwy gleby. Próbkę gleb z poziomów genetycznych posłużyły do charakterystyki morfologicznej gleb oraz analizy podstawowych właściwości tj. skład granulometryczny, pH zawartość całkowitego węgla organicznego, zawartość azotu ogólnego, kwasowość wymienna, zawartość wymiennych kationów zasadowych. Przemiany materii organicznej, zawartość węgla organicznego, aktywność biologiczna w glebach łąk, sukcesji i starodrzewów były badane w wierzchnich (0-10 cm i 10-20 cm) warstwach gleb.

Stwierdzono, że proces naturalnej sukcesji leśnej w niewielkim stopniu wpływał na właściwości morfologiczne i fizyko-chemiczne gleb. Stopniowe naturalne zmiany pólnaturalnych łąk na stadium sukcesji powodowały ciemnienie barwy gleby, zwiększenie wartości wskaźnika rozwoju poziomu próchnicznego gleby, zmniejszenie zawartości węgla biomasy mikroorganizmów, zmniejszenie wydajności wykorzystania substratów organicznych przez biomasę mikroorganizmów. Stwierdzono, że zaawansowanie procesów humifikacji oraz czynniki kształtujące zawartość węgla organicznego różniły się w zależności od warstwy gleby i sposobu użytkowania.

Summary

Semi-natural mountain meadows are an integral part of the unique Carpathian landscape, which was formed as a result of long-term human activity in the Carpathian region. As a result of socioeconomic changes after World War II, the landscape of the Carpathians began to transform again. Currently, many areas of semi-natural meadows are covered by natural forest succession. Such changes have become the issue of scientific discussions related to the further management of valuable areas of semi-natural meadows, increasing the forest area, carbon sequestration, and climate change. The main purpose of the study was to examine the influence of natural forest succession on the changes and the transformation rates of morphological physio-chemical and microbiological soil properties in the selected Carpathian national parks. The location of the research area in the legal protection areas makes it possible to study the changes caused by the natural forest succession with the limited impact of anthropopressure.

The research area was located in the Pieniny National Park, Bieszczady National Park, and Magura National Park. In total, ten transects, each consisting of three different land-use areas: 1) semi-natural mountain meadow, 2) successional forest covered by different aged (25- to 75-year-old) trees, and 3) old-growth forest (aged more than 150 years), were selected. Soil samples were collected from genetic horizons of soil profiles and the 0-10 and 10-20 cm soil layers. Soil samples from genetic horizons were used for the morphological characterization of soils and analysis of soil texture, pH, total organic carbon content, total nitrogen content, and sorption properties were made. While organic matter transformations and biological activity in the soils of semi-natural meadows, successional forests, and old-growth forests were investigated in the 0-10 and 10-20 cm layers.

The natural forest succession process only slightly influences the morphological and physio-chemical soil properties. The land use change from meadow to forest ecosystems caused darkening of the top soil layer, an increasing A-horizon development index, a decrease in the microbial biomass organic carbon, and a reduction efficiency of the use of organic substrates by the biomass of microorganisms.

Spis treści

1	Wstęp, cel pracy	1
2	Struktura pracy	3
3	Przegląd literatury	4
3.1	Historia użytkowania gruntów obszaru badań	4
3.2	Dotychczasowe badania na temat naturalnej sukcesji leśnej w Karpatach	6
3.3	Wpływ zmiany użytkowania gruntów na właściwości gleb	8
3.3.1	Węgiel organiczny	8
3.3.2	Substancje humusowe	9
3.3.3	Właściwości mikrobiologiczne	10
4	Materiały i metody	12
4.1	Obszar badań	12
4.2	Badania terenowe	15
4.3	Badania laboratoryjne	16
4.4	Opracowanie wyników	18
5	Wyniki badań	20
5.1	Właściwości morfologiczne	20
5.1.1	Barwa gleby	21
5.2	Właściwości fizyko-chemiczne	22
5.2.1	Skład granulometryczny	22
5.2.2	Odczyn gleb	23
5.2.3	Zawartość węgla organicznego i azotu ogólnego	23
5.2.4	Właściwości sorpcyjne	24
5.3	Klasyfikacja gleb	26
5.4	Substancje humusowe	27
5.4.1	Zawartość węgla substancji humusowych	27
5.4.2	Współczynniki absorbancji kwasów huminowych i kwasów fulwowych	27
5.5	Aktywność mikrobiologiczna	28
5.5.1	Węgiel biomasy mikroorganizmów	28
5.5.2	Aktywność enzymatyczna	28
5.5.3	Respiracja mikroorganizmów	28
5.5.4	Wskaźniki biochemiczne	29
5.6	Rozwój poziomu próchniczego gleb	30
5.7	Parametry wpływające na zawartość węgla organicznego	31
6	Wnioski	32
7	Literatura wykorzystana w autoreferacie	34
8	Publikacje stanowiące rozprawę doktorską wraz z oświadczeniami autorów	46

1 Wstęp, cel pracy

Wielowiekowa działalność człowieka, na pierwotnie naturalnych obszarach, doprowadziła do ukształtowania się oryginalnego i obfitującego w bioróżnorodność krajobrazu Karpat, którego ważnym elementem stały się półnaturalne łąki. W wyniku, następujących po II wojnie światowej, przemian społeczno-gospodarczych, z różnych przyczyn, porzucano użytkowanie cennych przyrodniczo, półnaturalnych łąk, co zapoczątkowało procesy naturalnej sukcesji leśnej. Zarastające łąki stały się wyzwaniem dla osób zarządzających, szczególnie obszarami objętymi ochroną prawną takimi jak parki narodowe.

Mając na uwadze międzynarodowe regulacje prawne (m. in.: Dz.U. 1996 nr 53 poz. 238, COM 2008 0645, Rozporządzenie...2018/841, COM 2020 0380), wspierające i rekomendujące zwiększanie powierzchni leśnych, w kontekście ochrony przed zmianami klimatu i zwiększenia sekwestracji dwutlenku węgla, a także wysokie walory przyrodnicze i krajobrazowe półnaturalnych łąk, problem postępującej sukcesji leśnej stał się przedmiotem licznych dyskusji.

Na obszarze polskich Karpat, temat zarastania półnaturalnych łąk poruszany był głównie z punktu widzenia botanicznego, jednak niewiele prac rozwija zagadnienia związane z glebą, która jest największym lądowym rezerwuarem węgla na Ziemi. Jednocześnie, większość prac obejmuje swoim zasięgiem niewielkie obszary, podczas gdy brak jest opracowań, które gromadzą dane z różnych części Karpat. Dlatego w niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto próbę opisu środowiska glebowego objętego procesem naturalnej sukcesji leśnej. Bazując na dość obszernym i różnorodnym obszarze badań, możliwe było, poznanie czynników wpływających na przemiany węgla organicznego w glebie.

W pracy postawiono następującą hipotezę badawczą:

- Zmiana użytkowania półnaturalnych łąk związana z procesem naturalnej sukcesji leśnej ma wpływ na morfologiczne, fizyko-chemiczne i mikrobiologiczne właściwości gleb oraz tempo mineralizacji i humifikacji materii organicznej.

Głównym celem badań była ocena wpływu naturalnej sukcesji leśnej na przemiany morfologicznych, fizyko-chemicznych i mikrobiologicznych właściwości gleb, w wybranych karpaccich parkach narodowych.

Do realizacji celu głównego, wyznaczono następujące cele szczegółowe:

- Określenie wpływu naturalnej sukcesji leśnej na właściwości morfologiczne i fizyko-chemiczne gleb, ze szczególnym uwzględnieniem zmian zawartości węgla organicznego.
- Analiza oraz porównanie składu frakcyjnego substancji humusowych w glebach półnaturalnych łąk, stadium sukcesji leśnej i starodrzewów.
- Porównanie stopnia rozwoju wierzchnich warstw gleb i zaawansowania procesu humifikacji gleb różnie użytkowanych.
- Ocena wpływu naturalnej sukcesji leśnej na właściwości mikrobiologiczne gleb oraz zmiany wskaźników biochemicznych.

- Określenie mikrobiologicznych właściwości gleb oraz wskaźników biochemicznych, kształtujących zawartość węgla organicznego w zróżnicowanych sposobach użytkowania gleb – półnaturalna łąka, stadium sukcesji, starodrzew.

2 Struktura pracy

Wyniki badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej pt. „Wpływ naturalnej sukcesji leśnej w Karpatach na właściwości gleb” zostały przedstawione w trzech publikacjach naukowych:

- 1) Sokołowska J., Józefowska A., Woźnica K., Zaleski T. 2020. *Succession from meadow to mature forest: Impacts on soil biological, chemical and physical properties—Evidence from the Pieniny Mountains, Poland*. *Catena* Vol. 189, 104503. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104503>. **IF = 5,198**
- 2) Sokołowska J., Józefowska A., Zaleski T. 2022. *Humus horizon development during natural forest succession process in the Polish Carpathians*. *Journal of Mountain Science* 19, 647–661. <https://doi.org/10.1007/s11629-021-6836-x>. **IF = 2,071**
- 3) Sokołowska J., Józefowska A., Zaleski T. 2022. *Impact of natural forest succession on changes in soil organic carbon in the Polish Carpathian Mountains*. *Forests* 3(5), 744. <https://doi.org/10.3390/f13050744>. **IF=2,364**

Badania rozpoczęto na obszarze Pienińskiego Parku Narodowego. Obejmowały one prace terenowe i wykonanie analiz fizykochemicznych (tj. skład granulometryczny, pH, zawartość węgla organicznego, właściwości sorpcyjne, gęstość objętościowa, porowatość) oraz mikrobiologicznych (tj. zawartość węgla biomasy mikroorganizmów, aktywność enzymatyczna) gleb. Wyniki tych badań posłużyły do wstępnej oceny procesów zachodzących w glebach o różnych sposobach użytkowania, ze szczególnym uwzględnieniem przemian w warstwie 0-20 cm.

W kolejnych latach, badania sukcesywnie były realizowane na obszarze Bieszczadzkiego Parku Narodowego oraz Magurskiego Parku Narodowego. Poszerzono, a także uszczegółowiono zakres badań do specjalistycznych analiz składu frakcyjnego substancji humusowych i właściwości mikrobiologicznych gleb.

Wytyczony kierunek badań pozwolił na scharakteryzowanie rozwoju i przemian powierzchniowej warstwy gleb, oraz zidentyfikowanie czynników wpływających na zawartość węgla organicznego.

3 Przegląd literatury

3.1 Historia użytkowania gruntów obszaru badań

Pierwotnie, naturalną pokrywą roślinną Karpat były zbiorowiska leśne, które w wyniku rozwoju osadnictwa były karczowane i zajmowane przez człowieka. Systematyczna akcja kolonizacyjna na obszarze polskiej części Karpat została zapoczątkowana w średniowieczu (Przyboś, 1995). Jako pierwsi, w XIII i XIV wieku, w Karpatach pojawili się przedstawiciele ludności wołoskiej (Kubijowicz, 1927). Byli oni pionierami rozwoju pasterstwa na tych obszarach (Kozak, 2005). Gospodarka pasterska z powodzeniem rozwijała się na obszarze Karpat przez kilka wieków, a jej sposoby prowadzenia różniły się w zależności od czynników takich jak: lokalizacja w obrębie Karpat, uwarunkowania fizjograficzne, skład etniczny ludności i tradycje gospodarowania, oraz kształtowały się na przestrzeni czasu (Zarzycki i Korzeniak, 2013). Pasterstwo początkowo opierało się głównie na wypasie, natomiast wzrost udziału łąk kośnych nastąpił dopiero w XVIII wieku (Hejzman i in., 2012).

W wyniku szerokiej działalności antropogenicznej związanej z gospodarowaniem na terenach pierwotnie porośniętych lasem wykształciły się półnaturalne łąki, które stały się charakterystycznym elementem krajobrazu Karpat. Największy rozkwit pasterstwa sezonowego w Karpatach datuje się na połowę XIX wieku (Kostuch, 1996). Następnie znaczenie pasterstwa zaczęło słabnąć, co początkowo było związane ze zniesieniem pańszczyzny i regulacją przepisów zezwalających na wypas. Kolejne duże zmiany w gospodarowaniu na obszarze Karpat przyniosły konsekwencje społeczno-gospodarcze po II wojnie światowej. W tym czasie, miała miejsce tzw. akcja wysiedleńcza „Wisła”, w której ludność bojkowska i łemkowska opuściła tereny Bieszczad, Beskidu Niskiego i części Beskidu Sądeckiego. Pomimo tego, że te tereny zostały zamieszkałe przez obywateli Polski, zagęszczenie ludności w tych rejonach znacznie się zmniejszyło, co skutkowało również zmniejszeniem zapotrzebowania na grunty wykorzystywane rolniczo (Zarzycki i Korzeniak, 2013).

Zmiany społeczne i demograficzne, a także czynniki przyrodnicze, trudna dostępność terenu, uwarunkowania ekonomiczne, zwiększające się koszty produkcji oraz mniejsze zapotrzebowanie na produkty gospodarki pasterskiej były powodem porzucenia tradycyjnej gospodarki rolno-hodowlanej na półnaturalnych łąkach wykształconych w Karpatach (Tokarczyk, 2015). Wyłączenie czynnika stabilizującego ekosystemy łąkowe w postaci wypasu lub wykaszania zapoczątkowało procesy sukcesji wtórej, na obszarach półnaturalnych łąk, zmierzającej do odtworzenia klimaksowych zbiorowisk leśnych. Ograniczenie działalności rolno-pasterskiej, w wyniku czynników społeczno-ekonomicznych było główną przyczyną rozprzestrzenienia się naturalnej sukcesji leśnej w Pieninach. Natomiast gwałtowne nasilenie sukcesji lasu na obszarach półnaturalnych łąk w Bieszczadach i Beskidzie Niskim, wiąże się bezpośrednio z wysiedleniem z tych terenów części autochtonicznej ludności (Tokarczyk, 2013; Wolski, 2009). Dodatkowym

czynnikiem potęgującym skalę wtórnej sukcesji leśnej w Karpatach było objęcie terenów ochroną ścisłą, poprzez stopniowe włączanie ich w granice parków narodowych.

3.2 Dotychczasowe badania na temat naturalnej sukcesji leśnej w Karpatach

Tematyka postępowania naturalnej sukcesji na terenie Karpat była dość szeroko poruszana w literaturze naukowej, jednak większość z opracowań skupiała się na zagadnieniach botanicznych, głównie dotyczących roślinności zielnej. Zarzycki i Korzeniak (2013) podjęli się kompleksowej oceny stanu, zróżnicowania i przemian roślinności łąkowej Polskich Karpat powiązanych ze zmianami w gospodarce rolnej, a także przedyskutowali możliwości kontynuacji użytkowania łąk w kontekście aktywnej polityki rolnośrodowiskowej. Znacznie mniej opracowań dotyczyło wkraczania na nieużytkowne tereny roślinności drzewiastej i leśnej. Biorąc pod uwagę poszczególne części Karpat, najwięcej opracowań dotyczy polan Tatrzańskiego Parku Narodowego. Skupiają się one głównie na dynamice wkraczania świerka na polany tatrzańskie (Ciurzycki, 2005, 2004; Dziewolski, 1985).

W latach 90 XX wieku Bartoszek i in., (1990) oraz Bodziarczyk i in., (1992) określili stopień zaawansowania wtórnej sukcesji na łąkach pienińskich oraz omówili rolę poszczególnych gatunków roślinności leśnej. W ostatnich latach obiektem badań nad wtórną sukcesją lasu była polana Kogutowa w Małych Pieninach, na podstawie, której określono sposób wkraczania gatunków drzewiastych oraz wskazano najbardziej ekspansywne gatunki drzew wkraczające na opuszczone tereny półnaturalnych łąk (Frączek i Dziepak, 2015). Wśród licznych badań dotyczących przemian zbiorowisk łąkowych w Pienińskim Parku Narodowym na przestrzeni lat należy podkreślić badania Bodziarczyka i in., (1992, 1999) i Kaźmierczakowej i in., (2004). Pojawiały się również nieliczne wyniki badań florystyczno-gleboznawczych Pienińskiego Parku Narodowego (Zaleski i in., 2014), a także skupiające się na wstępnej ocenie wpływu wtórej sukcesji leśnej na właściwości morfologiczne, chemiczne i fizyczne gleb (Zaleski i in., 2018).

W Beskidzie Niskim prowadzono badania obejmujące tematykę wkraczania roślinności leśnej na tereny niezalesione. Nowak, (2011) w badaniach na temat obniżenia granicy rolno-leśnej w pasmach magurskich zauważyła zwiększenie się powierzchni leśnej o 5,5 % od 1978 do 2004 roku. Z kolei Szwagrzyk, (2004) badał gatunki drzew i krzewów oraz sposoby ich rozprzestrzeniania się wzdłuż granicy Magurskiego Parku Narodowego. W Gorcach tematyką zmian użytkowania gruntów zajmowali się Michalik, (1990), który wyróżnił kolejne fazy sukcesji, a także Wężyk i Pyrkosz, (1999) i Wężyk, (2006), którzy na podstawie zdjęć lotniczych określili zmiany powierzchni polan oraz Tokarczyk, (2013, 2012), która określiła skład gatunkowy oraz strukturę wiekową odnowień.

W Bieszczadach Kucharzyk i Augustyn, (2008) analizowali zmiany w przebiegu górnej granicy lasu na przełomie XIX i XX wieku oraz określili czynniki powodujące te zmiany. Ponadto, wyznaczyli czynniki wpływające na tempo sukcesji lasu, a także wykonali analizę wieloczynnikową trwałości polan w Bieszczadzkim Parku Narodowym (Kucharzyk i Augustyn, 2010). Natomiast Wolski, (2018) szeroko przedstawił wpływ oddziaływań antropogenicznych na współczesny krajobraz Bieszczad Wysokich. Wśród badań gleboznawczych na terenie

Bieszczadzkiego Parku Narodowego można wskazać pracę Zaleskiego i in., (2007) na temat przekształceń pokrywy glebowej łąk porolnych w Wołosatem.

Pomimo licznych badań dotyczących zmiany użytkowania gruntów oraz rozprzestrzeniania się roślinności leśnej przeprowadzonych na obszarze Karpat brak jest kompleksowych opracowań ukierunkowanych na zmiany zachodzące w glebach, które są istotną częścią środowiska. Dlatego, istnieje potrzeba interdyscyplinarnego i wieloaspektowego podejścia do zagadnienia naturalnej sukcesji leśnej, w różnych rejonach Karpat, które dostarczyłoby informacji na temat zmian mających miejsce w środowisku podczas zachodzących procesów.

3.3 Wpływ zmiany użytkowania gruntów na właściwości gleb

3.3.1 Węgiel organiczny

Według szacunków FAO, (2009) w 30 centymetrowej wierzchniej warstwie gleby, globalnie zgromadzone jest niemal 700 Pg węgla, co czyni ją największym lądowym rezerwuarem tego pierwiastka. Według Lal, (2014) nawet niewielki wzrost zawartości węgla w glebie (0,01 % rocznie), poprzez jego sekwestrację, może zrekompensować wzrosty zawartości dwutlenku węgla w atmosferze. Dlatego nawet marginalne zmiany odgrywają istotną rolę w dynamice, obiegu i sekwestracji węgla, zarówno w skali lokalnej jak i globalnej. Kluczowa rola gleby w obiegu węgla w kontekście zmian użytkowania gruntów oraz zmian klimatycznych była poruszana przez różnych badaczy (Amundson i in., 2015; Bell i in., 2020; Deng i in., 2016; Garcia-Pausas i in., 2017; Guimarães i in., 2013; Guo i Gifford, 2002; Jobbágy i Jackson, 2000; Martin i in., 2010; Poeplau i in., 2011; Ramesh i in., 2019; Smith, 2008; Ueda i in., 2017). Dotychczasowe badania potwierdziły, że na zasoby węgla organicznego w glebie istotny wpływ mają czynniki środowiskowe (Doetterl i in. 2016). Luo i in., (2017) wykazali duże znaczenie klimatu, właściwości gleb, dopływu węgla oraz akumulacji zasobów węgla w regulowaniu dynamiki glebowego węgla organicznego i podkreślili, że znajomość tych parametrów jest niezbędna do modelowania procesów przemian węgla organicznego w glebie. Natomiast Gregorich i in., (2017) zbadali podatność rozkładu ściółki na wzrost temperatury w kontekście wpływu klimatu na magazynowanie węgla w glebie oraz zauważyli brak istotnego wpływu właściwości gleb na ten proces.

Często rozważanym zagadnieniem był wpływ zmiany użytkowania gruntów na zawartość oraz akumulację węgla organicznego w glebie. Davis i Condron, (2002) na podstawie krajowej bazy gleb Nowej Zelandii dokonali przeglądu wpływu zalesienia użytków zielonych na stopień akumulacji i zawartość węgla organicznego. Guo i Gifford, (2002) dokonali przeglądu publikacji poruszających temat wpływu zmiany użytkowania gruntów na zawartość węgla organicznego i przedstawili zależności pomiędzy różnymi wariantami użytkowania. Przywrócenie rodzimej roślinności, takiej jak użytki zielone czy lasy, na opuszczone pola uprawne w dłuższej perspektywie zwiększa zawartość węgla organicznego w glebie (Smith, 2008). Również Martín i in., (2016) potwierdzili wzrost sekwestracji węgla w glebach użytkowanych rolniczo, przekształconych na użytki zielone bądź lasy. Podobne badania prowadzili Nadal-Romero i in., (2016), którzy porównali wpływ zalesienia oraz naturalnej sukcesji na opuszczonych gruntach ornych. W aktualnych doniesieniach naukowych pojawiają się również prace skupiające się na wyjaśnieniu zmian zawartości węgla organicznego i azotu ogólnego w glebach obszarów górskich, szczególnie w kontekście zmiany sposobu użytkowania terenu (Garcia-Pausas i in., 2017). Uznaje się, że pojawienie się roślinności drzewiastej poprzez zalesienie lub naturalną sukcesję na gruntach użytkowanych rolniczo zwiększa zawartość węgla organicznego w glebach, poprzez jego akumulację (Silver i in., 2000), natomiast wpływ zmian pomiędzy użytkami

zielonymi, łąkami, a gruntami leśnymi, na zawartość glebowego węgla organicznego nie została jednoznacznie zidentyfikowana (Martín i in., 2016; Wiesmeier i in., 2012).

3.3.2 Substancje humusowe

Glebowa materia organiczna podlegająca ciągłym procesom mineralizacji i humifikacji, jest elementem, który w najwyższym stopniu kształtuje właściwości gleb, a także wpływa na rozwój ekosystemów glebowych. Rozważając rolę glebowej materii organicznej, należy podkreślić istotny wpływ polimolekularnych i poldispersyjnych związków polielektrolitów i sferokolidów, zwanych substancjami humusowymi (Gonet, 1993; Hayes i Swift, 2001; Kononowa, 1968). Ze względu na ich rozpuszczalność substancje humusowe można podzielić na kwasy huminowe, które są nierozpuszczalne w niskich wartościach pH ($\text{pH} < 2$), kwasy fulwowe, rozpuszczalne w szerokim zakresie pH oraz huminy, nierozpuszczalne w warunkach kwaśnych ani zasadowych.

Od wielu lat badania nad związkami humusowymi polegały na rozwijaniu wiedzy na temat struktury molekularnej i supramolekularnej substancji humusowych (Piccolo, 2002; Sutton and Sposito, 2005; Wershaw, 1999). W 2018 roku Gerke (2018) zaproponował nowy pogląd na substancje humusowe występujące w glebach, które jego zdaniem są produktami syntezy substancji fenolowych. Mohinuzzaman i in., (2020) porównywali metody ekstrakcji substancji humusowych z gleb różnie użytkowanych. W ostatnich latach badania skupiały się na poznawaniu właściwości fluorescencyjnych kwasów huminowych i kwasów fulwowych, które okazały się przydatne dla lepszego zrozumienia przemian biochemicznych w zróżnicowanych środowiskach glebowych (Mohinuzzaman i in., 2020; Mostofa i in., 2019). Pomimo, że występowanie substancji humusowych, jako trwałych wielkocząsteczkowych substancji zostało zakwestionowane (Lehmann i Kleber, 2015), naukowcy nadal wykorzystują badanie składu frakcyjnego substancji humusowych jako czułego wskaźnika zmian zachodzących w glebie (Oktaba i Kondras, 2015).

W badaniach środowiskowych substancje humusowe zostały uznane za frakcje, które dostarczają informacji o poziomie węgla organicznego w glebie (Jiménez-González i in., 2020). Substancje humusowe były obiektem badań w glebach na całym świecie, tj. w Europie na użytkach rolnych i łąkach (Ukalska-Jaruga i in., 2019), oraz na zalesionych gruntach rolnych (Kukułś i in., 2019), w Azji na terenach lasu pierwotnego, uprawy mahoniu, lasów deszczowych, plantacji kawy i użytków zielonych (Navarrete i in., 2010), a także w Ameryce Południowej porównywano lasy sosnowe z glebami rolniczymi (Zalba i in., 2016). Zhiyanski i in., (2017), którzy analizowali wpływ intensywności gospodarowania i różnych sposobów użytkowania gruntów na cechy ilościowe i jakościowe próchnicy glebowej, podkreślili znaczenie badań nad substancjami humusowymi w glebach obszarów górskich. Sun i in., (2012) stwierdzili, że zmiany użytkowania gruntów mogą zmienić skład chemiczny substancji humusowych pomimo ich odporności na degradację biologiczną. Niektórzy badacze (Panettieri i in., 2014; Tadini i in., 2015) zwrócili uwagę na zróżnicowanie składu substancji humusowych w różnych typach gleb.

3.3.3 Właściwości mikrobiologiczne

Największą część składników biologicznych gleby stanowią mikroorganizmy glebowe, które stanowią zwykle więcej niż 10 % całej materii organicznej w glebie (Nielsen i Winding 2002). Mikroorganizmy glebowe są głównym czynnikiem wpływającym na rozkład i przemiany materii organicznej w glebie. Mają szczególny udział w mineralizacji materii organicznej, a także w obiegu węgla i składników odżywczych (Araújo i in., 2009; Compant i in., 2005; Kołwazn i in., 2005). Aktywność mikroorganizmów glebowych była szeroko wykorzystywana do określenia jakości, żyzności i produktywności gleby (Brzezińska, 2006; Koper i in., 2008; Saxena, 2016) oraz jako wskaźnik zmian zachodzących w środowisku glebowym (Piotrowska i Charzyński, 2012). Sicardi i in., (2004) wskazali właściwości mikrobiologiczne gleby takie jak: zawartość węgla biomasy mikroorganizmów, respirację mikrobiologiczną gleby i aktywność enzymatyczną za przydatne wskaźniki do oceny zmian jakości biologicznej gleby, w wyniku przekształceń terenów użytkowanych jako pastwiska na użytkowanie leśne.

Biomasa mikroorganizmów glebowych jest definiowana, jako materia organiczna, na którą składają się organizmy mniejsze niż $5-10 \mu\text{m}^3$. Według Polskiej Normy (PN-ISO 14240-2 2001) biomasa mikroorganizmów to masa nieuszkodzonych komórek mikroorganizmów znajdująca się w danej glebie. Węgiel mikroorganizmów jest jednym z parametrów wykorzystywanych do opisywania żyzności i jakości gleby (Landgraf i Klose, 2002; Saxena, 2016), a także wskaźnikiem zmian w niej zachodzących (Kara i Bolat, 2008). Według Voroney i in., (2007) węgiel biomasy mikroorganizmów stanowi od 1 % do 5 % węgla materii organicznej gleby. Zawartość mikroorganizmów w glebie związana jest z: zawartością węgla organicznego (Olszowska, 2014; Zwoliński, 2008), warunkami wodnymi gleby (Natywa i in., 2014; Saxena, 2016), uziarnieniem gleby (Jiang-shan i in., 2005; Miechówka i in., 2010), a także z występowaniem korzeni i wiekiem drzewostanu (Rosenvald in., 2011).

Określenie zawartości węgla biomasy mikroorganizmów jest szeroko używane w badaniach związanych ze zmianą użytkowania gruntów, również w glebach obszarów górskich (Fang i in., 2014; Guo i in., 2014; Pabst i in., 2014). Wołoszczyk i in., (2020) uważają, że zawartości węgla organicznego oraz zawartości węgla biomasy mikroorganizmów w glebach, mogą być podstawą do jakościowej oceny oraz monitorowania obiegu węgla w wierzchniej warstwie gleb gruntów ornych, lasów i łąk. Liu i in., (2020) potwierdzili istotny wpływ sposobu użytkowania oraz właściwości gleb gruntów rolniczych, rekultywowanych i leśnych na zawartość biomasy i strukturę mikroorganizmów. Również inne badania gleb obszarów górskich udowodniły silne powiązania zmian użytkowania gruntów z zawartością węgla biomasy mikroorganizmów (Manpoong i in., 2020).

Aktywność enzymatyczna jest wykorzystywana, jako czuły i miarodajny wskaźnik biochemicznych przemian w glebie (Nannipieri i in., 2003; Sicardi i in., 2004), a także, jako wskaźnik jakości gleby (Mganga i in., 2016). Wiele badań dotyczyło reakcji aktywności enzymów glebowych na różne praktyki gospodarowania (Acosta-Martínez i in., 2008; Nannipieri

i in., 2003; Ndiaye i in., 2000). Z kolei Józefowska i Miechówka, (2015) badając różne użytkowane gleby w terenach górskich, podkreśliły pozytywny wpływ użytkowania łąkowego na aktywność mikrobiologiczną gleb. W literaturze można znaleźć doniesienia, w których określano wpływ zmian użytkowania na skład gatunkowy i aktywność drobnoustrojów glebowych, a także aktywność enzymatyczną (Ren i in., 2016; Mijangos i in., 2014; Moghimian i in., 2017).

Pomiar respiracji heterotroficznej gleby, która odnosi się do produkcji dwutlenku węgla z oddychania drobnoustrojów znajdujących się w glebie (Yazdanpanah i in., 2016), jest prostą metodą stosowaną do opisu ogólnych warunków glebowych, a także aktywności mikroorganizmów w glebie (Józefowska i in., 2017). Proces oddychania gleby ma istotny wpływ na obieg węgla poprzez uwalnianie dwutlenku węgla do atmosfery (Xu i Shang, 2016). Badania nad respiracją heterotroficzną i autotroficzną gleby były wykorzystywane do prognozowania procesów związanych z obiegiem węgla oraz podziemnej sekwestracji węgla w lasach sukcesyjnych (Huang i in., 2016). Respiracja mikroorganizmów może być również wykorzystywana do monitorowania zmian zachodzących w różnie użytkowanych glebach takich jak: łąki przekształcone w pola kukurydzy (Mukumbuta i in., 2019), pola pszenicy, winnice i uprawy wiśni (Khanghahi i in., 2019), lasy naturalne, grunty orne, sady cytrusowe i pola ryżowe (Bakhshandeh i in., 2019) oraz do badania zmian jakości gleby związanych z obiegiem węgla organicznego (Bakhshandeh i in., 2019; Mganga i in., 2016; Moscatelli i in., 2005). Parametry aktywności mikrobiologicznej gleb zostały podkreślone przez naukowców (Bastida i in., 2006; Toh i in., 2020), jako istotne w ocenie zmian zachodzących w glebach różnie użytkowanych. Ponadto, parametry aktywności mikrobiologicznej stosowane są do obliczania wskaźników, takich jak: iloraz metabolizmu, iloraz drobnoustrojów i iloraz mineralizacji, szeroko wykorzystywanych do monitorowania (Bakhshandeh i in., 2019; Mganga i in., 2016; Moscatelli i in., 2005).

4 Materiały i metody

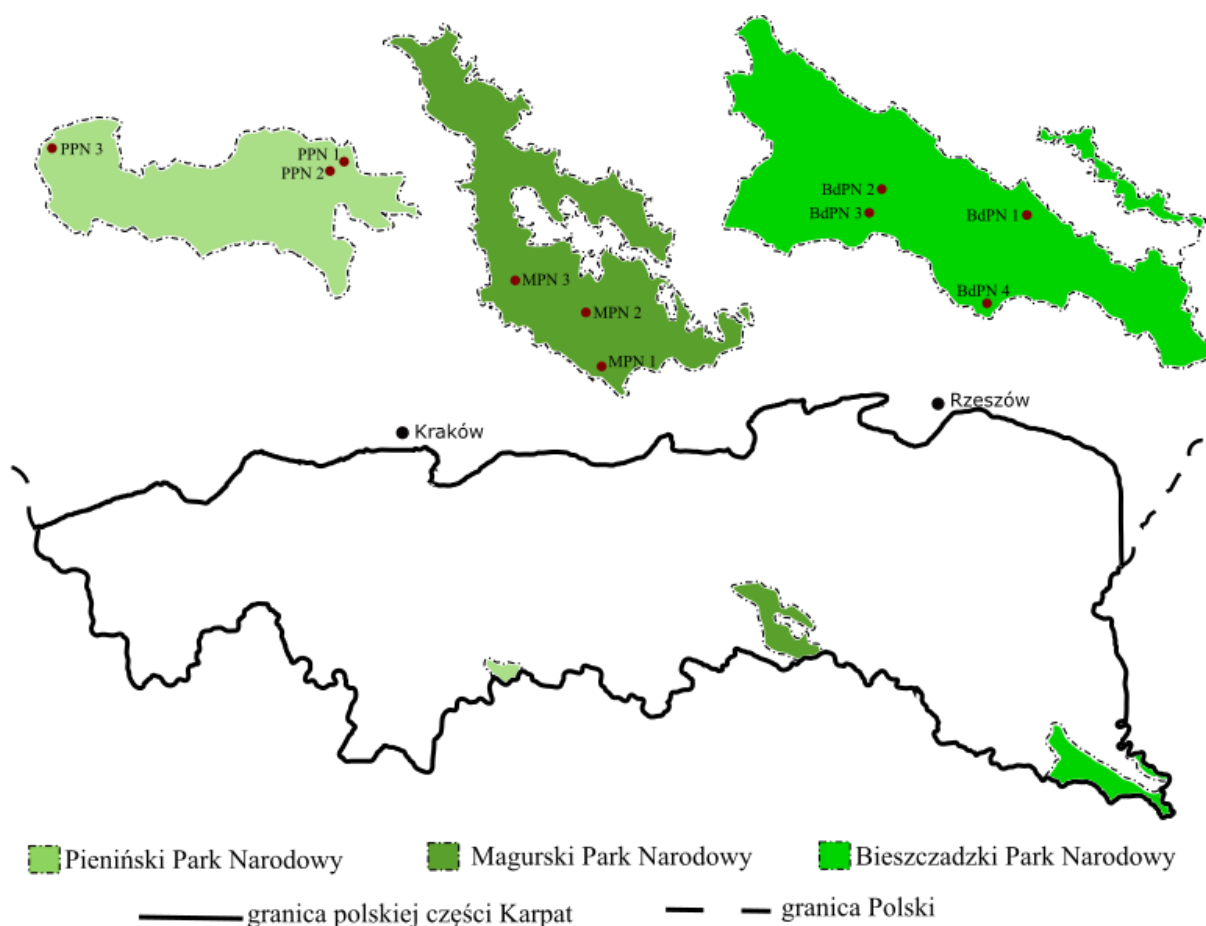
4.1 Obszar badań

Badania obejmowały obszar trzech karpackich parków narodowych – Pienińskiego Parku Narodowego, Magurskiego Parku Narodowego oraz Bieszczadzkiego Parku Narodowego. Wymienione parki narodowe zlokalizowane są w różnych częściach polskich Karpat (Ryc. 1), co pozwoliło zrealizować badania w urozmaiconych warunkach fizjograficznych.

Pieniński Park Narodowy leży na terenie pienińskiego pasa skałkowego, rozciągającego się od Austrii aż po Rumunię, rozdzielającego Zewnętrzne Karpaty Zachodnie od Wewnętrznych Karpat Zachodnich. Gleby Pienińskiego Parku Narodowego charakteryzują się dużą różnorodnością, co wynika przede wszystkim z niejednolitego podłoża geologicznego, rzeźby terenu i warunków hydrologicznych (Niemyska-Lukaszuk i in., 2002). W strukturze pokrywy glebowej przeważają gleby brunatne (58 %) i rędziny (38 %) (Zaleski et al., 2016). W Pieninach występują dwa piętra klimatyczne – umiarkowanie ciepłe i umiarkowanie chłodne (Perzanowska, 2004). Średnia roczna temperatura waha się od 4 °C do 6 °C, natomiast średnia roczna suma opadów wynosi 690-850 mm (Perzanowska, 2004).

Magurski Park Narodowy leży w środkowej części Beskidu Niskiego, który zaliczany jest do Zewnętrznych Karpat Zachodnich. Podłoże geologiczne reprezentuje jednostka magurska, którą stanowią utwory fliszowe (Skiba i Drewnik, 2000). W strukturze pokrywy glebowej przeważają gleby brunatne, które stanowią około 85-90% pokrywy glebowej Magurskiego Parku Narodowego (Skiba i Drewnik, 2000). W obrębie Beskidu Niskiego wyróżniono dwa piętra klimatyczne – umiarkowanie ciepłe i umiarkowanie chłodne. Magurski Park Narodowy charakteryzuje się średnią roczną temperaturą około 5 °C, natomiast średnia roczna suma opadów mieści się w przedziale od 800 do 900 mm (Stępień-Sałek, 2004).

Bieszczadzki Park Narodowy zlokalizowany jest w obrębie Bieszczadów Zachodnich, leży w mezoregionie Zewnętrzne Karpaty Wschodnie (Kondracki, 1998). Bieszczady należą do gór średnich i znajdują się w obrębie płaszczowinowo-fliszowych utworów fałdowych należących do płaszczowiny dukielskiej i płaszczowiny śląskiej (Skiba, 1999). Gleby Bieszczadzkiego Parku Narodowego zostały wytworzone na pokrywach zwietrzelinowych skał fliszowych. Około 85-90% powierzchni parku stanowią gleby brunatne, a wśród nich nieznacznie przeważają gleby brunatne kwaśne (Skiba, 1999). W Bieszczadach wyróżnia się trzy piętra klimatyczne, jednak Bieszczadzki Park Narodowy i jego otulina leżą na terenie zaklasyfikowanym do piętra klimatycznego umiarkowanie chłodnego, ze średnią roczną temperaturą od 4 °C do 6 °C (Nowosad, 1995). Średnie roczne opady wahają się w granicach 1000 do 1300 mm (Obrębska-Starkłowa i in., 1995).



Ryc. 1. Lokalizacja miejsc badań w poszczególnych parkach narodowych na tle polskiej części Karpat.

Na podstawie informacji historycznych o użytkowaniu gruntów, map historycznych oraz aktualnych map satelitarnych, a także dostępnych informacji i dotychczasowych doniesień naukowych na temat gleb, w każdym z trzech parków narodowych wytypowano 3-4 transektów (Ryc. 1). Każdy transekt obejmował trzy powierzchnie: 1) półnaturalną łąkę, 2) obszar sukcesji leśnej porośniętej 25 – 75 letnią roślinnością drzewiastą, 3) obszar ponad 150 letniego lasu (starodrzew) (Ryc. 2).

Jako półnaturalne łąki zostały przyjęte obszary aktualnie porośnięte rodzimymi gatunkami wieloletnich roślin zielnych (Zarzycki i Korzeniak, 2013), które powstały na terenach wykarczowanych przez pierwotne ludy zamieszkujące Karpaty i były użytkowane rolniczo lub jako pastwiska, przez wiele wieków. Stadia sukcesji to tereny porzuconych półnaturalnych łąk, na które wkroczyły rośliny sukcesyjne. Na obszarach sukcesji występują gatunki drzewiaste takie jak: klon jawor (*Acer pseudoplatanus* L.), brzoza brodawkowata (*Betula pendula* Roth), topola osikowa (*Populus tremuloides* Michx.), świerk pospolity (*Picea abies* L.), olsza szara (*Alnus incana* L.), sosna zwyczajna (*Pinus sylvestris* L.), jodła pospolita (*Abies alba* Mill), jesion wyniosły (*Fraxinus excelsior* L.), z dominacją buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.). Jako starodrzewy zostały wybrane tereny porośnięte ponad 150-letnimi lasami, które pod względem siedlisk leśnych zaklasyfikowano, jako buczyny karpackie (*Dentario glandulosae–Fagetum*).



Ryc. 2. Wybrane powierzchnie badawcze o różnym sposobie użytkowania: a) półnaturalna łąka, b) stadium sukcesji leśnej, c) starodrzew (transekt MPN 2).

4.2 Badania terenowe

Badania terenowe polegały na wykonaniu odkrywek glebowych na każdej z powierzchni (półnaturalna łąka, sukcesja, starodrzew) (Ryc. 3). Łącznie wykonano 30 odkrywek glebowych. Każdy profil glebowy szczegółowo opisano, a gleby zaklasyfikowano według Systematyki Gleb Polski (2019) oraz klasyfikacji międzynarodowej World Reference Base for Soil Resources (IUSS Working Group, 2015). Z poziomów genetycznych pobrano reprezentatywne próby gleb do analiz laboratoryjnych. Dodatkowo, z wierzchniej warstwy gleby 0-20 cm, pobrano rdzenie glebowe o średnicy 5 cm (Ryc. 3). Na każdej z powierzchni pobrano po pięć rdzeni glebowych, z warstwy 0-10 cm oraz z warstwy 10-20 cm.

Mając na uwadze, że najbardziej czułą i podatną na zmiany wynikające np. z różnego sposobu użytkowania, jest wierzchnia warstwa gleb, w pracy skupiono się głównie na rozpatrywaniu przemian zachodzących w warstwie 0-20 cm.



Ryc. 3. Profile glebowe i rdzenie glebowe z powierzchni: a) półnaturalnej łąki, b) stadium sukcesji leśnej, c) starodrzewu (transekt BdPN 4)

4.3 Badania laboratoryjne

W powietrznie suchych i przesianych przez sito o średnicy oczek 2 mm próbach glebowych pobranych z poziomów genetycznych profili wykonano następujące analizy:

- skład granulometryczny, metodą areometryczno-sitową Casagrande'a w modyfikacji Prószyńskiego (PN-ISO 11277:2005);
- pH, metodą potencjometryczną, w roztworze 1 M KCl (w stosunku gleby do roztworu 1:2,5) (Kabała i Karczewska, 2017);
- zawartość węgla organicznego, metodą Tiurina (PN-ISO 14235:2003);
- zawartość azotu ogólnego, metodą Kjeldahla (Lityński i in., 1976), z wykorzystaniem aparatu FOSS Kjeltex TM 8100;
- kwasowość wymienną, poprzez wyparcie z kompleksu sorpcyjnego jonów H^+ i Al^{3+} za pomocą 1 M KCl (Kabała i Karczewska, 2017);
- zawartość wymiennych kationów zasadowych, poprzez ekstrakcję gleby w 1 M CH_3COONH_4 i wyparcie z kompleksu sorpcyjnego kationów Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ (Kabała i Karczewska, 2017).

Każda z próbek glebowych pobranych z rdzeni, z warstw 0-10 cm i 10-20 cm, została podzielona na dwie części. Jedna część została powietrznie wysuszona oraz przesiana przez sito o średnicy oczek 2 mm. Druga część gleby została przesiana na mokro przez sito o średnicy oczek 2 mm i była przechowywana w temperaturze $-21\text{ }^{\circ}C$ do czasu analiz laboratoryjnych. Na tydzień przed analizami próbki gleby były wstępnie inkubowane w temperaturze $25\text{ }^{\circ}C$ i doprowadzone do 40-60 % wilgotności. W tak przygotowanych próbach glebowych wykonano analizy laboratoryjne właściwości mikrobiologicznych:

- respiracja mikrobiologiczna gleby, metodą inkubacji w zamkniętych słojach (Hopkins, 2008);
- zawartość węgla biomasy mikroorganizmów, metodą fumigacji-ekstrakcji (PN-EN ISO 14240-2:2011), zawartość węgla biomasy mikroorganizmów w wyekstrahowanych roztworach glebowych, oznaczono z wykorzystaniem aparatu Euro Thermo TOC-TN 1200;
- aktywność dehydrogenaz, według metody Casida i in., (1964);
- aktywność inwertaz, według metody Frankenberger i Johanson, (1983), aktywność enzymów oznaczono przy wykorzystaniu spektrofotometru Shimadzu UV-1800.

W świeżych próbach glebowych oznaczono również zawartość rozpuszczalnego węgla organicznego, poprzez ekstrakcję gleby w 0,05 M $CaCl_2$ i przefiltrowanie przesączu przez sączki o średnicy porów $0,45\text{ }\mu m$ (Jones i Willett, 2006); zawartość rozpuszczalnego węgla organicznego w przesączach oznaczono z wykorzystaniem aparatu Euro Thermo TOC-TN 1200.

W powietrznie suchych glebach z rdzeni glebowych wykonano takie analizy jak:

- pH, metodą potencjometryczną, w roztworze 1 M KCl (w stosunku gleby do roztworu 1:2,5) (Kabała i Karczewska, 2017);
- zawartość węgla organicznego, metodą Tiurina (PN-ISO 14235:2003);
- zawartość azotu ogólnego, metodą Kjeldahla (Lityński i in., 1976), z wykorzystaniem aparatu FOSS Kjeltex TM 8100;
- ekstrakcję substancji humusowych, wykorzystując metodę rekomendowaną przez Międzynarodowe Towarzystwo Substancji Humusowych (Tan, 2005); zawartość węgla poszczególnych frakcji substancji humusowych oznaczono z wykorzystaniem aparatu Euro Thermo TOC-TN 1200, natomiast widma zostały oznaczone na spektrofotometrze Shimadzu UV-1800.

Dodatkowo w suchych i świeżych glebach pochodzących z warstw gleby 0-10 cm oraz 10-20 cm oznaczono barwę gleby według skali barw Munsell'a (Oyama i Takehara, 1970).

4.4 Opracowanie wyników

Na podstawie widm absorpcji kwasów huminowych i kwasów fulwowych obliczono następujące współczynniki absorpcji, charakteryzujące substancje humusowe:

- $Q_{4/6}$ wyrażający iloraz absorpcji przy długościach fal 400 nm i 600 nm (Schnitzer i Khan, 1972);
- $Q_{2/4}$ wyrażający wartości absorpcji przy długościach fal 280 nm i 400 nm (Gonet i Dębska, 1998);
- $\Delta \log K$, obliczono według równania $\Delta \log K = \log K_{400\text{nm}} - \log K_{600\text{nm}}$, gdzie K jest wartością absorpcji przy długościach fali odpowiednio 400 nm i 600 nm;
- $Q_{2/3}$ wyrażający iloraz wartości absorpcji przy długościach fal 250 nm i 365 nm (Suhett i in., 2004).

Na podstawie barw gleby określonej w stanie suchym i mokrym obliczono wartości wskaźnika rozwoju poziomu próchnicznego gleby, według równania:

$$ADI = \frac{\text{horizon thickness}}{V \times C} + 1, (1)$$

gdzie: V oznacza jasność, a C oznacza nasycenie barwy według skali Munsella (Mazurek i in., 2016).

Z wyników uzyskanych, z pięciu kolejnych tygodni respiracji, wykorzystując kinetyczny model równania oddychania mikrobiologicznego pierwszego rzędu ($C_m = C_0(1 - e^{-kt})$) wyznaczono skumulowaną wartość węgla zmineralizowanego (C_m) w okresie inkubacji ($t = 35$ dni), potencjalnie mineralizowany węgiel (C_0) oraz stałą szybkości mineralizacji (k) (Moscatelli i in., 2007).

Bazując na uzyskanych wynikach właściwości mikrobiologicznych oraz całkowitej zawartości węgla organicznego obliczono następujące wskaźniki biochemiczne gleb:

- iloraz metabolizmu (qCO_2), obliczono, jako stosunek średniej wartości respiracji mikroorganizmów w czasie inkubacji do zawartości węgla biomasy mikroorganizmów (Mondini i in., 2019);
- iloraz mikrobiologiczny ($qMIC$), obliczono, jako stosunek zawartości węgla biomasy mikroorganizmów do całkowitej zawartości węgla organicznego (Bakhshandeh i in., 2019);
- iloraz mineralizacji (qM), obliczono, jako stosunek skumulowanej wartości węgla zmineralizowanego do zawartości całkowitego węgla organicznego (Bakhshandeh i in., 2019).

Przy wykorzystaniu programu Statistica 13.0 wykonano obliczenia statystyczne (wartości średnie, błędy standardowe), a także porównano wyniki pomiędzy sposobami użytkowania oraz warstwami gleby z wykorzystaniem testów ANOVA. Ponadto, do opisanego wpływu wybranych

właściwości gleb oraz wskaźników na zawartość węgla organicznego w glebach różnie użytkowanych, wykonano równania regresji zmiennej zależnej.

Dla wybranych współczynników i właściwości gleb przeprowadzono analizę głównych składników (PCA) oraz analizę redundancji (RDA) dla całej warstwy 0-20 cm, z wykorzystaniem programu Canoco 5.12 (Braak i Smilauer 2012).

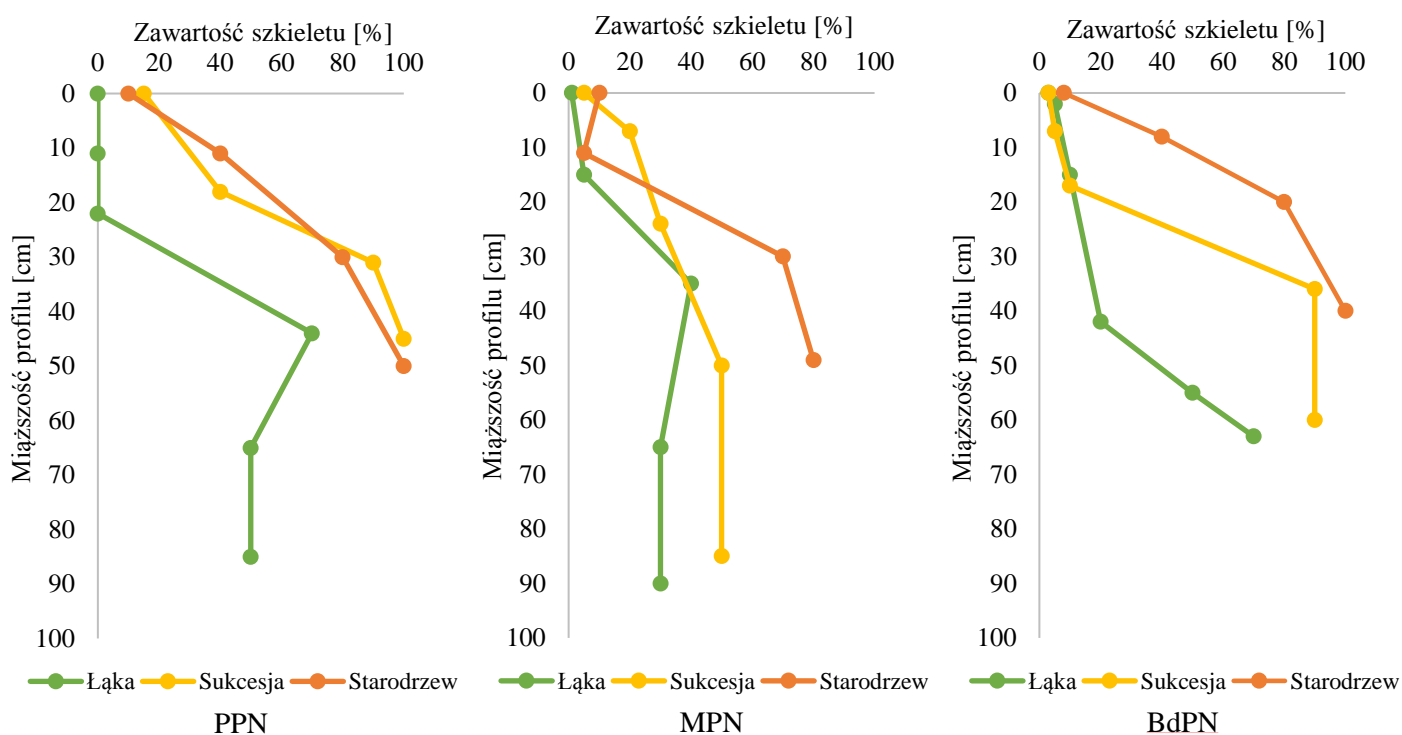
5 Wyniki badań

5.1 Właściwości morfologiczne

Gleby o różnym sposobie użytkowania (półnaturalna łąka, stadium sukcesji leśnej, starodrzew) cechowały się podobną budową morfologiczną. W większości opisanych profili glebowych wyróżniono podpowierzchniowy poziom diagnostyczny kambik. W pozostałych glebach występował, słabiej wykształcony, poziom wzbogacenia i podpowierzchniowego przeobrażenia struktury – B.

Głębokość wykonanych profili glebowych wahała się od 34 cm do 115 cm. Średnia miąższość profili glebowych we wszystkich parkach narodowych wynosiła 77 cm dla półnaturalnych łąk, 69 cm dla stadiów sukcesji leśnej oraz 60 cm dla starodrzewów.

Zawartość szkieletu w profilu glebowym różniła się w zależności od sposobu użytkowania (Ryc. 4). Średnio, największą zawartością części szkieletowych w profilu glebowym, w Pienińskim Parku Narodowym i Bieszczadzkiem Parku Narodowym, charakteryzowały się gleby użytkowane, jako sukcesja (odpowiednio 45 % i 32 %), jednak w Magurskim Parku Narodowym największy udział części szkieletowych stwierdzono w glebach starodrzewów (40 %). Średnio, najmniej części szkieletowych było w glebach półnaturalnych łąk, odpowiednio 34 %, 24 % i 24 % – Pieniński Park Narodowy, Magurski Park Narodowy i Bieszczadzki Park Narodowy.



Ryc. 4. Zawartość szkieletu w wybranych profilach glebowych Pienińskiego Parku Narodowego (transekt PPN 2), Magurskiego Parku Narodowego (transekt MPN 2) i Bieszczadzkiego Parku Narodowego (transekt BdPN 2).

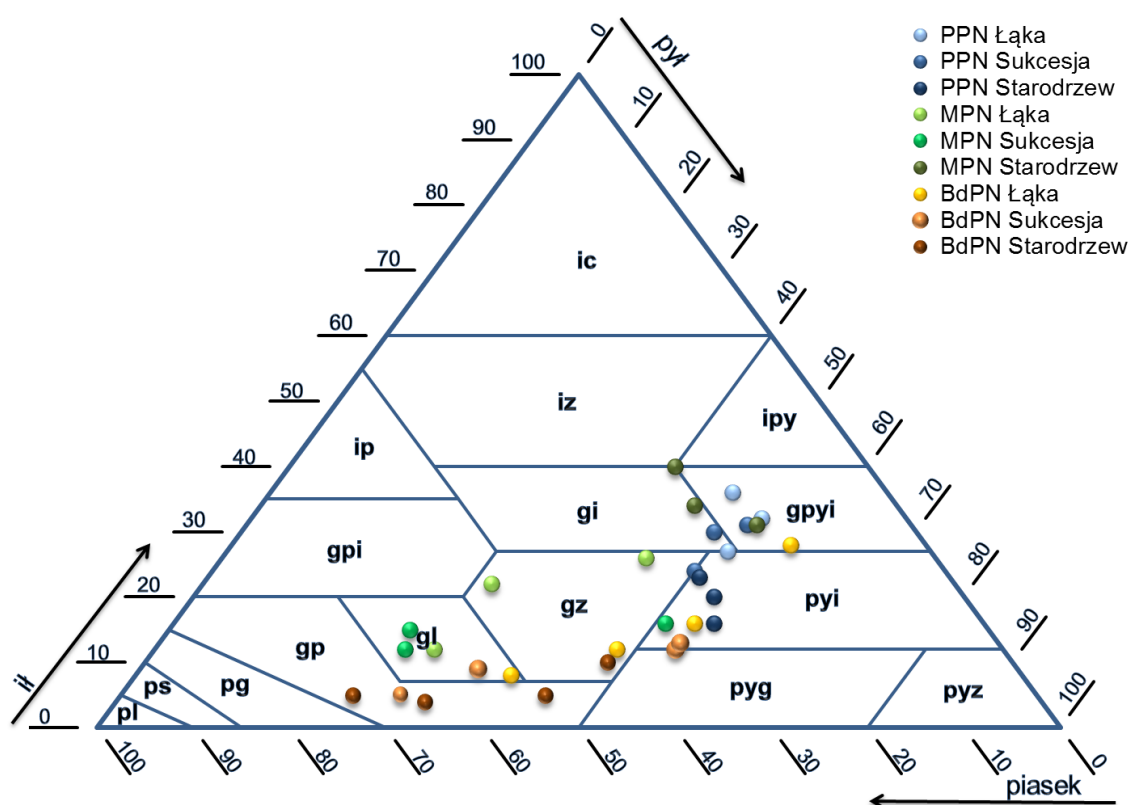
5.1.1 Barwa gleby

Barwa gleby oznaczona w rdzeniach glebowych 0-20 cm różniła się między sposobami użytkowania, zwłaszcza w warstwie 0-10 cm. Najciemniejsze zabarwienie miały gleby użytkowane, jako starodrzewy, a najjaśniejsze gleby półnaturalnych łąk. Wyniki te znalazły również odzwierciedlenie w obliczonych wartościach wskaźnika rozwoju poziomu próchnicznego gleby (ADI) (Publikacja nr 2, Tabela 7). Barwa gleby związana była z zawartością węgla organicznego i zawartością węgla poszczególnych frakcji substancji humusowych.

5.2 Właściwości fizyko-chemiczne

5.2.1 Skład granulometryczny

Wśród gleb Pienińskiego Parku Narodowego przeważały utwory o uziarnieniu pyłów ilastych, glin ilastych i glin pylasto-ilastych. Gleby Magurskiego Parku Narodowego zostały zaklasyfikowane głównie do grup granulometrycznych glin lekkich, glin zwykłych lub glin ilastych. Natomiast gleby Bieszczadzkiego Parku Narodowego miały uziarnienie glin piaszczystych, glin lekkich, glin zwykłych pyłów gliniastych i pyłów ilastych (Ryc. 5). Analizowane gleby pod względem kategorii agrotechnicznej zaklasyfikowano do gleb średnich i ciężkich.

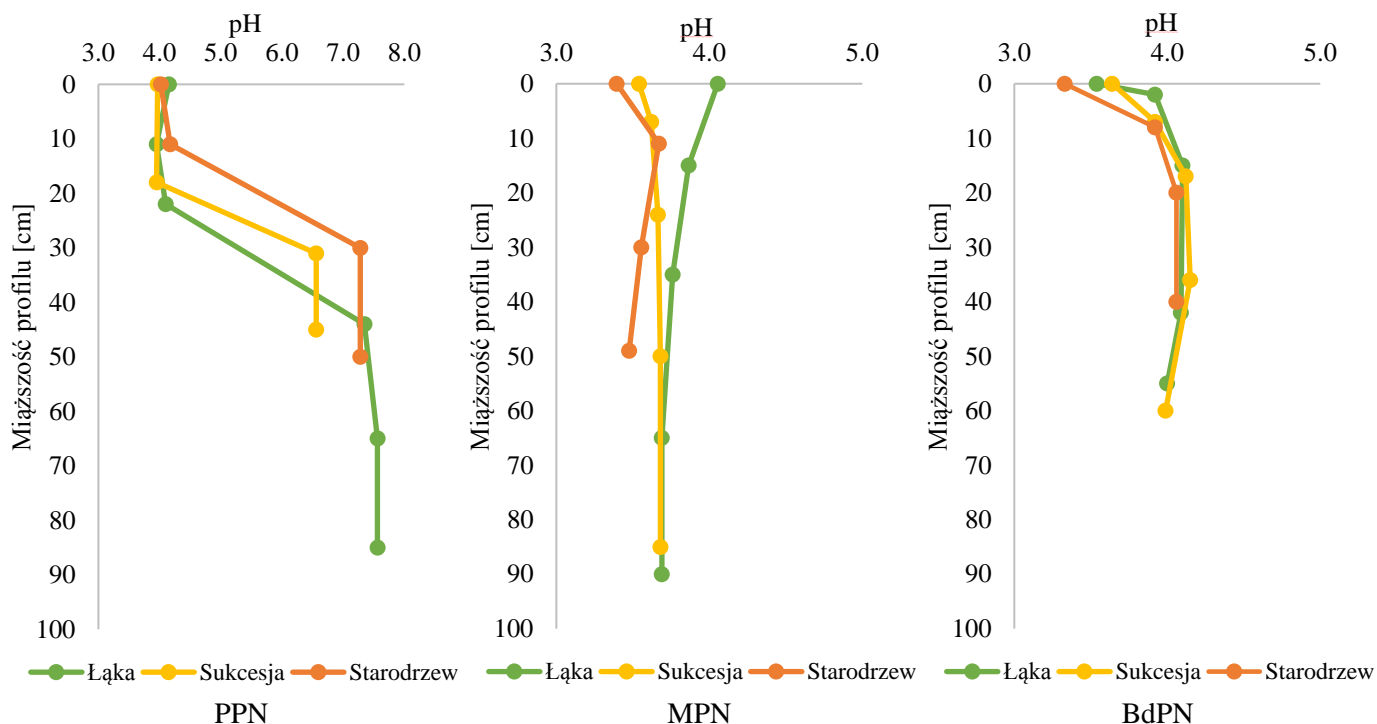


Ryc. 5. Średnie uziarnienie gleb w profilach glebowych Pienińskiego Parku Narodowego (PPN), Magurskiego Parku Narodowego (MPN) i Bieszczadzkiego Parku Narodowego (BdPN).

Porównując uziarnienie wierzchnich warstw 0-20 cm gleb półnaturalnych łąk, sukcesji oraz starodrzewów nie wykazano istotnych różnic pomiędzy glebami o różnych sposobach użytkowania. Natomiast różnice w składzie granulometrycznym wierzchnich warstw gleb występowały między glebami parków narodowych. Gleby Pienińskiego Parku Narodowego charakteryzowały się najmniejszą zawartością frakcji piaskowej i największą zawartością frakcji pylastej. Gleby Pienińskiego Parku Narodowego i Magurskiego Parku Narodowego charakteryzowały się istotnie wyższą zawartością frakcji ilastej w porównaniu z glebami Bieszczadzkiego Parku Narodowego (Publikacja nr 1, Tabela 4; Publikacja nr 2, Tabela 4).

5.2.2 Odczyn gleb

Odczyn gleb Pienińskiego Parku Narodowego był mocno zróżnicowany, znajdował się w przedziale od silnie kwaśnego, głównie w wierzchnich poziomach, do zasadowego szczególnie w dolnych częściach profili glebowych. Gleby Magurskiego Parku Narodowego i Bieszczadzkiego Parku Narodowego charakteryzowały się silnie kwaśnym odczynem w całych profilach glebowych. Porównując pH gleb półnaturalnych łąk, stadium sukcesji i starodrzewów w obrębie tego samego parku narodowego nie stwierdzono istotnych różnic (Ryc. 6).



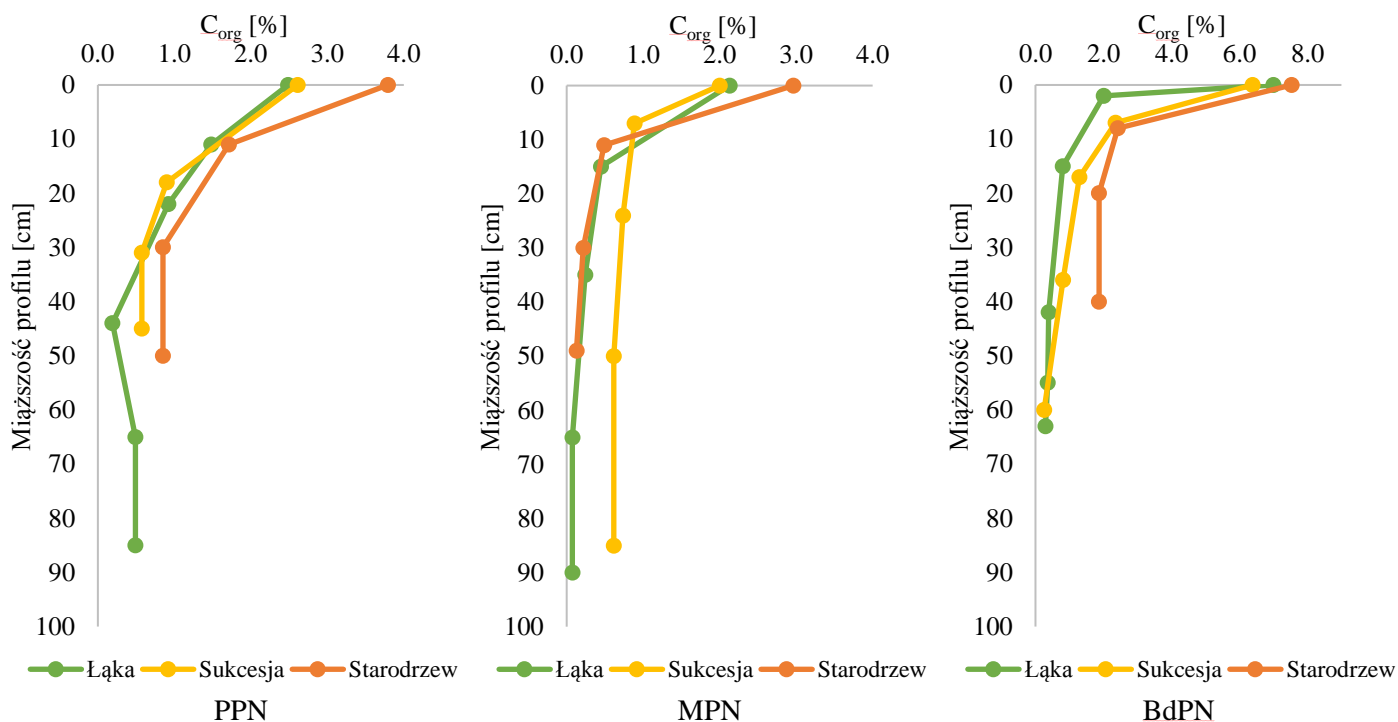
Ryc. 6. Odczyn gleb w wybranych profilach glebowych Pienińskiego Parku Narodowego (transekt PPN 2), Magurskiego Parku Narodowego (transekt MPN 2) i Bieszczadzkiego Parku Narodowego (transekt BdPN 2).

5.2.3 Zawartość węgla organicznego i azotu ogólnego

Gleby starodrzewów charakteryzowały się wyższą zawartością węgla organicznego w porównaniu do gleb półnaturalnych łąk i sukcesji. Zawartość węgla organicznego zmniejszała się w głąb profili glebowych. Średnio najniższą zawartością węgla organicznego charakteryzowały się gleby Magurskiego Parku Narodowego, natomiast najwyższe średnie zawartości węgla organicznego były w glebach Bieszczadzkiego Parku Narodowego (Ryc. 7).

W warstwie 0-10 cm stwierdzono nieznaczny wzrost średniej zawartości węgla organicznego w zależności od sposobu użytkowania, półnaturalne łąki charakteryzowały się najniższą, a starodrzewy najwyższą średnią zawartością węgla organicznego. Natomiast w warstwie 10-20 cm najniższą średnią zawartość węgla organicznego stwierdzono w glebach sukcesji, a najwyższą w glebach starodrzewów. We wszystkich sposobach użytkowania warstwa 0-10 cm

charakteryzowała się wyższą średnią zawartością węgla organicznego w porównaniu z warstwą 10-20 cm (Publikacja nr 2, Tabela 4; Publikacja nr 3, Figura 2).



Ryc. 7. Zawartość węgla organicznego w wybranych profilach Pienińskiego Parku Narodowego (transekt PPN 2), Magurskiego Parku Narodowego (transekt MPN 2) i Bieszczadzkiego Parku Narodowego (transekt BdPN 2).

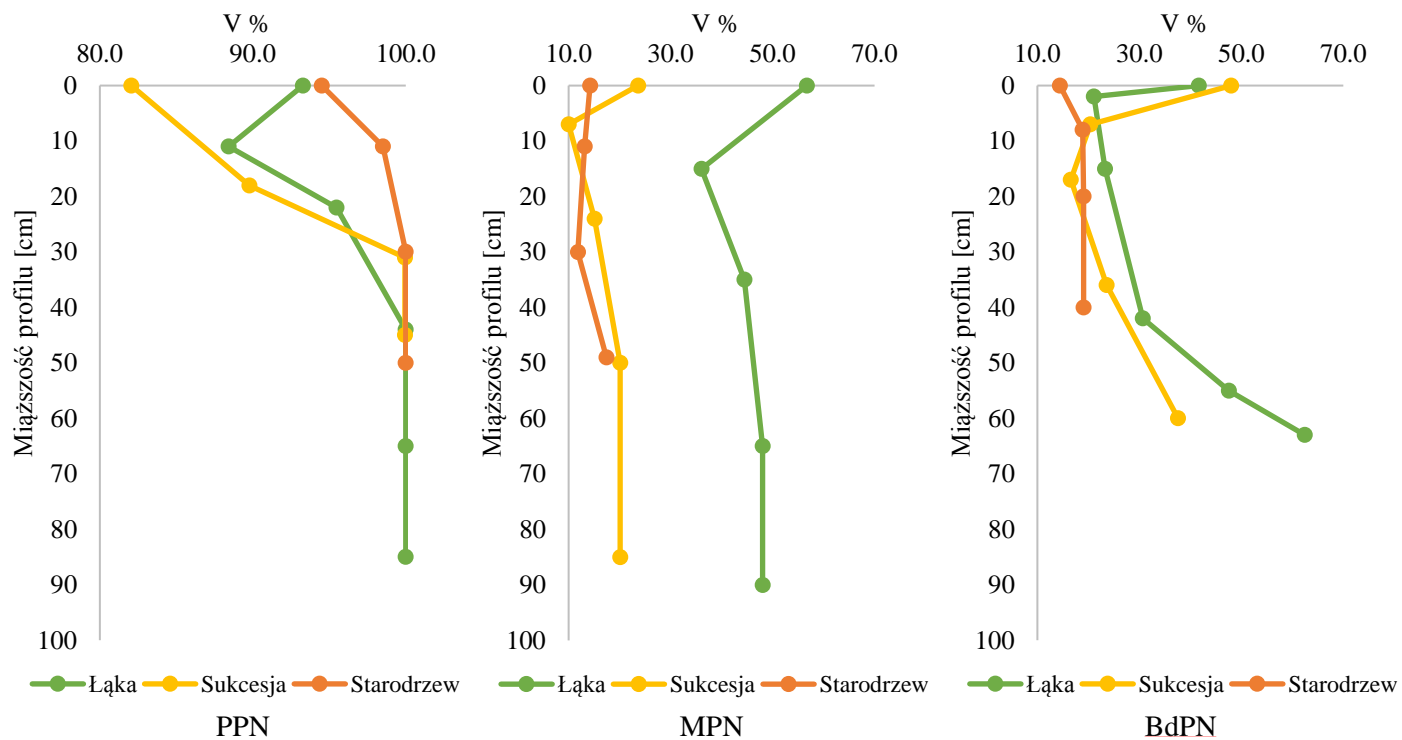
W warstwie 0-10 cm średnia zawartość rozpuszczalnego węgla organicznego była najwyższa w glebach starodrzewów, a najniższa w glebach sukcesji. Natomiast w warstwie 10-20 cm średnia zawartość rozpuszczalnego węgla organicznego nieznacznie wzrastała ze zmianą sposobu użytkowania półnaturalna łąka < sukcesja < starodrzew (Publikacja nr 3, Figura 2).

Zawartość azotu ogólnego była zróżnicowana pomiędzy glebami parków narodowych, ale nie pomiędzy różnymi sposobami użytkowania. Średnie zawartości azotu ogólnego w glebach Pienińskiego Parku Narodowego były wyższe, w porównaniu z glebami pozostałych parków narodowych. Podobnie wartości stosunku C:N różniły się między glebami parków narodowych, ale nie między glebami różnie użytkowanymi w obrębie tego samego parku. Gleby Bieszczadzkiego Parku Narodowego charakteryzowały się istotnie najwyższymi wartościami stosunku C:N (Publikacja nr 2, Tabela 4).

5.2.4 Właściwości sorpcyjne

Suma kationów zasadowych w glebach Pienińskiego Parku Narodowego była znacznie wyższa niż w glebach Magurskiego Parku Narodowego i Bieszczadzkiego Parku Narodowego. Wysycenie kompleksu sorpcyjnego kationami zasadowymi było najniższe w glebach Bieszczadzkiego Parku Narodowego, a najwyższe w glebach Pienińskiego Parku Narodowego. W glebach Pienińskiego Parku Narodowego wysycenie kompleksu sorpcyjnego kationami

zasadowymi było podobne we wszystkich sposobach użytkowania. Natomiast w glebach łąk Magurskiego Parku Narodowego i Bieszczadzkiego Parku Narodowego średnie wysycenie kompleksu sorpcyjnego kationami zasadowymi było wyższe niż w glebach użytkowanych, jako starodrzewy (Ryc. 8).



Ryc. 8. Wysycenie kompleksu sorpcyjnego kationami zasadowymi w wybranych profilach Pienińskiego Parku Narodowego (transekt PPN 2), Magurskiego Parku Narodowego (transekt MPN 2) i Bieszczadzkiego Parku Narodowego (transekt BdPN 2).

5.3 Klasyfikacja gleb

Według Systematyki Gleb Polski (2019) większość gleb zostało zaklasyfikowanych do rzędu gleb brunatnych, wyróżniono typy gleb brunatnych tj. brunatne właściwe, brunatne kwaśne i brunatne wylugowane. Natomiast według międzynarodowej systematyki World Reference Base for Soil Resources (IUSS Working Group, 2015) większość gleb zostało określonych jako Cambisols, a pozostałe dwie gleby zostały zaklasyfikowane jako Leptosols z poziomem cambic (Tab. 1).

Tab. 1. Klasyfikacja gleb według Systematyki Gleb Polski (2019) oraz World Reference Base for Soil Resources (IUSS Working Group, 2015).

transekt	użytkowanie	Systematyka Gleb Polski (2019)	World Reference Base for Soil Resources (IUSS Working Group, 2015)
PPN 1	Łąka	Gleba brunatna wylugowana	Eutric Endoskeletal Cambisols
	Sukcesja	Gleba brunatna wylugowana	Eutric Endoskeletal Cambisols
	Starodrzew	Gleba brunatna wylugowana	Eutric Skeletic Cambisols
PPN 2	Łąka	Gleba brunatna właściwa	Eutric Endoskeletal Cambisols
	Sukcesja	Rędzina brunatna	Eutric Cambic Leptosols
	Starodrzew	Rędzina brunatna	Eutric Endoskeletal Cambisols
PPN 3	Łąka	Gleba brunatna wylugowana	Eutric Cambisols
	Sukcesja	Gleba brunatna wylugowana	Endeutric Cambisols
	Starodrzew	Gleba brunatna wylugowana	Endeutric Cambisols
MPN 1	Łąka	Gleba brunatna właściwa	Eutric Endoskeletal Cambisols
	Sukcesja	Gleba brunatna właściwa	Eutric Skeletic Cambisols
	Starodrzew	Gleba brunatna właściwa	Dystric Skeletic Cambisols
MPN 2	Łąka	Gleba brunatna właściwa	Dystric Skeletic Cambisols
	Sukcesja	Gleba brunatna kwaśna	Dystric Endoskeletal Cambisols
	Starodrzew	Gleba brunatna kwaśna	Dystric Cambisols
MPN 3	Łąka	Gleba brunatna właściwa	Eutric Skeletic Cambisols
	Sukcesja	Gleba brunatna właściwa	Dystric Endoskeletal Cambisols
	Starodrzew	Gleba brunatna właściwa	Eutric Skeletic Cambisols
BdPN 1	Łąka	Gleba brunatna właściwa	Dystric Endoskeletal Endostagnic Cambisols
	Sukcesja	Gleba brunatna właściwa	Dystric Endoskeletal Cambisols
	Starodrzew	Gleba brunatna właściwa	Dystric Leptic Skeletic Cambisols
BdPN 2	Łąka	Gleba brunatna właściwa	Dystric Endoskeletal Amphistagic Cambisols
	Sukcesja	Gleba brunatna właściwa	Dystric Endoskeletal Cambisols
	Starodrzew	Ranker zbrunatiały	Dystric Cambic Skeletic Leptosols
BdPN 3	Łąka	Gleba brunatna kwaśna	Dystric Skeletic Epistagnic Cambisols
	Sukcesja	Gleba brunatna kwaśna	Dystric Skeletic Cambisols
	Starodrzew	Gleba brunatna właściwa	Dystric Endoskeletal Leptic Cambisols
BdPN 4	Łąka	Gleba brunatna właściwa	Eutric Cambisols
	Sukcesja	Gleba brunatna właściwa	Dystric Endoskeletal Cambisols
	Starodrzew	Gleba brunatna kwaśna	Dystric Skeletic Cambisols

PPN – Pieniński Park Narodowy; MPN – Magurski Park Narodowy; BdPN – Bieszczadzki Park Narodowy

5.4 Substancje humusowe

5.4.1 Zawartość węgla substancji humusowych

Substancje humusowe są produktem procesu humifikacji i stanowią około 80 % masy próchnicy. Dominującą frakcją substancji humusowych w warstwie 0-10 cm, w glebach wszystkich sposobów użytkowania tj. półnaturalna łąka, stadium sukcesji i starodrzew były huminy. Natomiast w warstwie 10-20 cm, we wszystkich glebach dominowała frakcja kwasów fulwowych. Suma węgla kwasów huminowych i kwasów fulwowych, w warstwie 0-10 cm była najwyższa w glebach starodrzewów, a najniższa w glebach półnaturalnych łąk. Warstwa 10-20 cm charakteryzowała się wyższą zawartością sumy węgla kwasów huminowych i fulwowych w glebach sukcesji w porównaniu z glebami łąk półnaturalnych i starodrzewów. W glebach wszystkich sposobów użytkowania zawartość węgla kwasów huminowych była wyższa w warstwie 0-10 cm niż w warstwie 10-20 cm, ale statystycznie istotne różnice stwierdzono tylko w glebach sukcesji. Stosunek węgla kwasów huminowych do węgla kwasów fulwowych, w warstwie 0-10 cm wzrastał w kierunku półnaturalna łąka < stadium sukcesji < starodrzew. Natomiast w warstwie 10-20 cm najniższy stosunek węgla kwasów huminowych do węgla kwasów fulwowych był w glebach sukcesji (Publikacja nr 2, Tabela 5).

5.4.2 Współczynniki absorbancji kwasów huminowych i kwasów fulwowych

Współczynniki absorbancji są istotnymi wskaźnikami stopnia zaawansowania procesów humifikacji. Wartości współczynnika $Q_{4/6}$, który jest wskaźnikiem stopnia humifikacji oraz dojrzałości substancji humusowych, były wyższe w warstwie 0-10 cm niż 10-20 cm, zarówno dla kwasów huminowych jak i dla kwasów fulwowych. W warstwie 0-10 cm najwyższy stopień humifikacji i kondensacji kwasów huminowych (najniższa wartość $Q_{4/6}$) zaobserwowano w glebach półnaturalnych łąk, a najniższym stopniem dojrzałości (najwyższa wartość $Q_{4/6}$) charakteryzowały się gleby sukcesji. Natomiast w warstwie 10-20 cm wartości współczynnika $Q_{4/6}$ dla kwasów huminowych, były niższe w glebach sukcesji i starodrzewów niż w glebach półnaturalnych łąk. Wartości współczynnika $Q_{4/6}$ wyznaczonego dla kwasów fulwowych były najniższe w glebach użytkowanych jako półnaturalne łąki, w obydwu warstwach. Współczynnik $Q_{2/4}$, który jest wskaźnikiem zaawansowania procesu humifikacji substancji humusowych, obliczony dla kwasów huminowych był najwyższy w glebach półnaturalnych łąk, zarówno w warstwie 0-10 cm jak i warstwie 10-20 cm. Podobnie gleby półnaturalnych łąk, charakteryzowały się mniejszym zaawansowaniem procesu humifikacji kwasów fulwowych, w porównaniu do stadium sukcesji i starodrzewów, w obydwu badanych warstwach. Wartości współczynnika $Q_{2/3}$, który odzwierciedla stopień degradacji struktur substancji humusowych, obliczone dla kwasów fulwowych były najwyższe w glebach półnaturalnych łąk, w warstwie 0-10 cm. Natomiast w warstwie 10-20 cm niższy stopień zdegradowania struktur kwasów fulwowych (niższe wartości $Q_{2/3}$) stwierdzono w glebach sukcesji i starodrzewów, w porównaniu z glebami półnaturalnych łąk (Publikacja nr 2, Tabela 6).

5.5 Aktywność mikrobiologiczna

5.5.1 Węgiel biomasy mikroorganizmów

Węgiel biomasy mikroorganizmów to masa nieuszkodzonych komórek mikroorganizmów w glebie. W warstwie 0-10 cm, średnia zawartość węgla biomasy mikroorganizmów układała się w następującej, malejącej kolejności: półnaturalna łąka>stadium sukcesji>starodrzew. Natomiast w warstwie 10-20 cm gleby półnaturalnych łąk charakteryzowały się istotnie wyższą zawartością węgla biomasy mikroorganizmów w porównaniu z glebami sukcesji leśnej. Zawartość węgla biomasy mikroorganizmów różniła się między warstwami, w warstwie 0-10 cm średnie zawartości węgla biomasy mikroorganizmów były wyższe w porównaniu z warstwą 10-20 cm, dla wszystkich sposobów użytkowania (Publikacja nr 3, Figura 2).

5.5.2 Aktywność enzymatyczna

Dehydrogenazy to enzymy występujące w żywych organizmach, przyspieszające utlenianie materii organicznej. Średnia aktywność dehydrogenaz w warstwie 0-10 cm była najniższa w glebach półnaturalnych łąk, a najwyższa w glebach starodrzewów. Odwrotnie, w warstwie 10-20 cm najwyższą średnią aktywnością dehydrogenaz charakteryzowały się gleby półnaturalnej łąki, a najniższą gleby sukcesji (Publikacja nr 3, Figura 4).

Inwertazy to zewnątrzkomórkowe enzymy hydrolityczne biorące udział w mineralizacji materii organicznej, a także w obiegu azotu i węgla w glebie. Gleby starodrzewów charakteryzowały się średnio najwyższą aktywnością inwertaz, a najniższa aktywność tych enzymów została stwierdzona w glebach sukcesji leśnej (Publikacja nr 3, Figura 4).

5.5.3 Respiracja mikroorganizmów

Respiracja mikroorganizmów jest wskaźnikiem dwutlenku węgla produkowanego przez mikroorganizmy glebowe podczas procesu oddychania. W warstwie 0-10 cm najwyższymi średnimi wartościami oddychania mikrobiologicznego, za wyjątkiem pierwszego tygodnia, charakteryzowały się gleby sukcesji. W warstwie 10-20 cm w ciągu pierwszych trzech tygodni najwyższe wartości respiracji mikroorganizmów odnotowano w stadium sukcesji, natomiast w dwóch kolejnych tygodniach najwyższymi średnimi wartościami oddychania mikroorganizmów charakteryzowały się gleby łąk półnaturalnych. Respiracja drobnoustrojów glebowych malała wraz z czasem inkubacji (Publikacja nr 3, Figura 3).

W warstwie 0-10 cm średnie najwyższe zawartości skumulowanego węgla zmineralizowanego w czasie inkubacji (C_m) oraz węgla potencjalnie mineralizowanego (C_0) były w glebach sukcesji, a najniższe w glebach starodrzewów. Natomiast w warstwie 10-20 cm najwyższe średnie zawartości węgla zmineralizowanego w czasie inkubacji oraz węgla potencjalnie mineralizowanego były odpowiednio w glebach sukcesji i półnaturalnych łąk, a najniższe w glebach starodrzewów. Z kolei stałe szybkości mineralizacji (k), w warstwie 0-10 cm, w glebach półnaturalnych łąk i sukcesji były istotnie niższe w porównaniu z glebami starodrzewów (Publikacja nr 3, Tabela 2).

5.5.4 Wskaźniki biochemiczne

Średnia wartość ilorazu metabolizmu (qCO_2), w warstwie 0-10 cm, była najniższa w glebach starodrzewów, a najwyższa w glebach sukcesji. Natomiast w warstwie 10-20 cm gleby sukcesji charakteryzowały się niemal dwukrotnie wyższą wartością qCO_2 w porównaniu z glebami półnaturalnych łąk i starodrzewów. Średnie wartości ilorazu mikrobiologicznego ($qMIC$) malały wraz ze zmianą sposobu użytkowania, półnaturalna łąka>sukcesja>starodrzew, w obu warstwach. Ale tylko w warstwie 10-20 cm średnia wartość $qMIC$ w glebach łąk była istotnie wyższa w porównaniu z glebami sukcesji i starodrzewów. Iloraz mineralizacji (qM), w warstwie 0-10 cm, również malał wraz ze zmianą sposobu użytkowania, półnaturalna łąka>sukcesja>starodrzew, jednak w warstwie 10-20 cm najwyższą średnią wartością qM charakteryzowały się gleby sukcesji, a najniższą gleby starodrzewów (Publikacja nr 3, Tabela 3).

5.6 Rozwój poziomu próchniczego gleb

Wartości wskaźnika rozwoju poziomu próchniczego gleby (ADI) różniły się pomiędzy poszczególnymi sposobami użytkowania. W warstwie 0-10 cm średnie wartości ADI wzrastały od półnaturalnej łąki do starodrzewu, zarówno dla gleb w stanie wilgotnym i suchym. Natomiast w warstwie 10-20 cm, najniższymi wskaźnikami ADI charakteryzowały się gleby sukcesji, a najwyższymi gleby starodrzewów (Publikacja nr 2, Tabela 7).

Na podstawie analizy PCA, wykonanej dla wierzchniej, 0-20 cm warstwy gleby, stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy wskaźnikiem rozwoju poziomu próchniczego gleby oraz zawartością węgla organicznego, węgla kwasów huminowych i węgla kwasów fulwowych. Badania potwierdziły, że zawartość węgla organicznego w istotny sposób kształtuje rozwój poziomu próchniczego gleb. Uzyskane wyniki badań wykazały, że wskaźnik ADI jest dobrym i łatwym do określenia parametrem, szacującym zawartość węgla organicznego w glebie. Stwierdzono również dodatnią korelację pomiędzy wskaźnikami ADI, a wskaźnikiem $Q_{4/6}$ wyznaczonym dla kwasów fulwowych, a także ujemną korelację między wskaźnikami ADI, a wskaźnikami $Q_{2/4}$ i $Q_{2/3}$ wyznaczanymi dla kwasów fulwowych (Publikacja nr 2, Figura 1). Ujemne korelacje pomiędzy powyższymi parametrami sugerują, że kwasy fulwowe o mniejszych rozmiarach powodują wzrost wartości ADI, co może być związane z wykształceniem się ciemniejszej barwy gleby i przyczyniać się do rozwoju poziomu próchniczego.

5.7 Parametry wpływające na zawartość węgla organicznego

We wszystkich badanych glebach, równanie regresji zmiennej zależnej dla zawartości węgla organicznego (C_{org}), wykazało wysoką korelację pomiędzy zawartością węgla organicznego i zawartością węgla biomasy mikroorganizmów (MBC), wskaźnikami – iloraz mikrobiologiczny (qMIC) i iloraz metabolizmu (qCO₂) oraz zawartością węgla rozpuszczalnego (DOC) zgodnie z równaniem: $C_{org} = 28.6 + 0.22MBC - 4.83qMIC - 0.02DOC - 0.21qCO_2$. (2)

Otrzymany model wyjaśnił 83% wariacji zmiennej zależnej.

Biorąc pod uwagę odrębne równania regresji dla poszczególnych sposobów użytkowania w dwóch warstwach gleby (Tab. 2) stwierdzono, że różne parametry mikrobiologiczne i wskaźniki biochemiczne kształtowały zawartość węgla organicznego w glebach. W warstwie 0-10 cm zawartość węgla organicznego w glebach półnaturalnych łąk kształtowana była przez: iloraz mineralizacji (qM), skumulowaną zawartość węgla zmineralizowanego (C_m) i aktywność dehydrogenaz (DHA); w glebach sukcesji: aktywność dehydrogenaz (DHA), iloraz mikrobiologiczny (qMIC), zawartość węgla rozpuszczalnego (DOC), zawartość węgla biomasy mikroorganizmów (MBC) i aktywność inwertaz (INV); w glebach starodrzewów: iloraz mineralizacji (qM), iloraz mikrobiologiczny (qMIC), zawartość węgla rozpuszczalnego (DOC), aktywność inwertaz (INV), iloraz metaboliczny (qCO₂) oraz zawartość skumulowanego węgla zmineralizowanego (C_m) i aktywność dehydrogenaz (DHA). Natomiast w warstwie 10-20 cm na zawartość węgla organicznego w glebach półnaturalnych łąk i sukcesji wpływ miały: iloraz mineralizacji (qM), iloraz mikrobiologiczny (qMIC), zawartość węgla rozpuszczalnego (DOC) oraz zawartość węgla biomasy mikroorganizmów (MBC), aktywność inwertaz (INV) i iloraz metaboliczny (qCO₂); a w glebach starodrzewów: iloraz mikroorganizmów (qMIC), zawartość węgla rozpuszczalnego (DOC), iloraz metaboliczny (qCO₂) oraz iloraz mineralizacji (qM) i zawartość węgla biomasy mikroorganizmów (MBC) (Tab. 2). Porównując składowe modeli regresji, w warstwie 0-10 cm, dla półnaturalnych łąk, stadiów sukcesji i starodrzewów stwierdzono różnice w składowych dla poszczególnych sposobów użytkowania. Natomiast w warstwie 10-20 cm na zawartość węgla organicznego w glebach półnaturalnych łąk i sukcesji wpływ miały dokładnie te same parametry. Modele regresji wyjaśniały od 77 % do 99 % zmienności zawartości węgla organicznego (Publikacja nr 3, Tabela 4).

Tab. 2 Równania regresji zmiennej zależnej węgla organicznego (C_{org}) dla poszczególnych sposobów użytkowania i warstw gleby.

Sposób użytkowania	Warstwa [cm]	
	0-10	10-20
Łąka	$C_{org} = -5,10 - 0,39qM + 2,90C_m + 0,41DHA$	$C_{org} = 2,59 - 0,09qM - 0,52qMIC + 0,14MBC - 0,10DOC + 0,38INV + 2,41qCO_2$
Sukcesja	$C_{org} = 39,22 - 0,39DHA - 9,14qMIC + 0,35MBC - 0,11DOC + 0,09INV$	$C_{org} = 12,01 - 0,01qM - 3,24qMIC + 0,30MBC - 0,03DOC + 0,10INV + 0,16qCO_2$
Starodrzew	$C_{org} = 67,24 - 0,30qM + 2,04C_m + 0,57DHA - 5,60qMIC - 0,06DOC - 0,04INV - 7,18qCO_2$	$C_{org} = 45,98 + 0,23qM - 9,54qMIC + 0,19MBC - 0,05DOC - 2,75qCO_2$

6 Wnioski

- 1) Proces naturalnej sukcesji leśnej w niewielkim stopniu wpłynął na właściwości morfologiczne gleb.
- 2) Zmiana sposobu użytkowania półnaturalnych łąk na ekosystemy leśne spowodowała zwiększenie wysycenia barw w wierzchnich (0-10 cm i 10-20 cm) warstwach gleby.
- 3) Skład frakcyjny substancji humusowych w glebach półnaturalnych łąk, w stadium sukcesji leśnej i starodrzewów nie różnił się istotnie między tymi sposobami użytkowania.
- 4) Zawartość węgla kwasów huminowych w warstwie 0-10 cm stadium sukcesji była istotnie wyższa w porównaniu z warstwą 10-20 cm.
- 5) Stopień zaawansowania procesu humifikacji zależał od warstwy gleby i sposobu użytkowania. W warstwie 0-10 cm zmiana użytkowania, z półnaturalnej łąki na użytkowanie leśne, wpłynęła na zmniejszenie tempa procesu humifikacji oraz obniżenie stopnia dojrzałości kwasów fulwowych. W warstwie 10-20 cm nastąpił wzrost tempa humifikacji, jak również spadek zawartości kwasów humusowych i kwasów fulwowych w początkowym stadium rozkładu.
- 6) Wartości wskaźników ADI korelowały z zawartością węgla organicznego oraz zawartością węgla frakcji substancji humusowych. Według wskaźników ADI, gleby starodrzewów charakteryzowały się najbardziej rozwiniętym poziomem próchnicznym, a gleby półnaturalnych łąk miały najmniej rozwinięty poziom próchniczny.
- 7) Naturalna sukcesja leśna spowodowała zmniejszenie zawartości węgla biomasy mikroorganizmów, głównie w warstwie 10-20 cm.
- 8) Gleby objęte naturalną sukcesją leśną charakteryzowały się mniej wydajnym wykorzystaniem substratów organicznych przez biomasę mikroorganizmów w porównaniu do gleb półnaturalnych łąk i gleb starodrzewów.
- 9) Składowe równań regresji objaśniające zawartości węgla organicznego w glebach półnaturalnych łąk, stadium sukcesji i starodrzewów różniły się w zależności od sposobu użytkowania i warstwy gleby.
- 10) W warstwie 0-10 cm na zawartość węgla organicznego w glebach półnaturalnych łąk wpłynęły: iloraz mineralizacji (ujemna korelacja), skumulowana zawartość węgla zmineralizowanego i aktywność dehydrogenaz (dodatnia korelacja). W glebach sukcesji zawartość węgla organicznego kształtowały: aktywność dehydrogenaz, iloraz mikrobiologiczny, zawartość węgla rozpuszczalnego (ujemna korelacja), zawartość węgla biomasy mikroorganizmów i aktywność inwertaz (dodatnia korelacja). W glebach starodrzewów na zawartość węgla organicznego wpływ miały: iloraz mineralizacji, iloraz mikrobiologiczny, zawartość węgla rozpuszczalnego, aktywność inwertaz, iloraz

metaboliczny (ujemna korelacja) oraz zawartość skumulowanego węgla zmineralizowanego i aktywność dehydrogenaz (dodatnia korelacja).

- 11) W warstwie 10-20 cm zawartość węgla organicznego w glebach półnaturalnych łąk i sukcesji kształtowana była przez: iloraz mineralizacji, iloraz mikrobiologiczny, zawartość węgla rozpuszczalnego (ujemna korelacja) oraz zawartość węgla biomasy mikroorganizmów, aktywność inwertaz i iloraz metaboliczny (dodatnia korelacja). W glebach starodrzewów wpływ na zawartość węgla organicznego miały: iloraz mikroorganizmów, zawartość węgla rozpuszczalnego, iloraz metaboliczny (ujemna korelacja) oraz iloraz mineralizacji i zawartość węgla biomasy mikroorganizmów (dodatnia korelacja).

7 Literatura wykorzystana w autoreferacie

- Acosta-Martínez, V., Acosta-Mercado, D., Sotomayor-Ramírez, D., Cruz-Rodríguez, L., 2008. Microbial communities and enzymatic activities under different management in semiarid soils. *Appl. Soil Ecol.* 38, 249–260. <https://doi.org/10.1016/J.APSSOIL.2007.10.012>
- Amundson, R., Berhe, A.A., Hopmans, J.W., Olson, C., Sztein, A.E., Sparks, D.L., 2015. Soil and human security in the 21st century. *Science* (80). 348, 647–655. <https://doi.org/10.1126/science.1261071>
- Araújo, A.S.F., Leite, L.F.C., Santos, V.B., Carneiro, R.F. V, 2009. Soil microbial activity in conventional and organic agricultural systems. *Sustainability* 1, 268–276. <https://doi.org/10.3390/su1020268>
- Bakhshandeh, E., Hossieni, M., Zeraatpisheh, M., Francaviglia, R., 2019. Land use change effects on soil quality and biological fertility: A case study in northern Iran. *Eur. J. Soil Biol.* 95, 103119. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2019.103119>
- Bartoszek, L., Haberska, A., Szwagrzyk, J., 1990. Zarastanie przez drzewa i krzewy polan Łazek Niżni i Ligarki w Pienińskim Parku Narodowym. *Chrońmy Przyr. Ojczystą* 46, 17–31.
- Bastida, F., Moreno, J.L., Hernández, T., García, C., 2006. Microbiological activity in a soil 15 years after its devegetation. *Soil Biol. Biochem.* 38, 2503–2507. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.02.022>
- Bell, S., Barriocanal, C., Terrer, C., Rosell-Melé, A., 2020. Management opportunities for soil carbon sequestration following agricultural land abandonment. *Environ. Sci. Policy* 108, 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2020.03.018>
- Bodziarczyk, J., Kucharzyk, S., Różański, W., 1992. Wtórna sukcesja roślinności leśnej na opuszczonych polanach kośnych w Pienińskim Parku Narodowym. *Pieniny – Przyr. i Człowiek* 2, 25–41.
- Bodziarczyk, J., Michalcewicz, J., Szwagrzyk, J., 1999. Secondary forest succession in abandoned meadows of the Pieniny National Park. *Ekol. Pol.* 47, 209–223.
- Brzezińska, M., 2006. Impact of treated wastewater on biological activity and accompanying processes in organic soils. *Acta Agrophysica*, Lublin.
- Casida, L.E., Klein, D.A., Santoro, T., 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 98, 371–376.
- Ciurzycki, W., 2005. Dynamika zarastania przez las górnoreglowych polan popasterskich w Tatrach Polskich. *Sylwan* 2, 35–41.
- Ciurzycki, W., 2004. Wpływ wybranych czynników środowiskowych na dynamikę wkraczania

- świerka pospolitego na górnoreglowe polany popasterskie w Tatrach Polskich. *Sylwan* 20–28.
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clement, C., Barka, E.A., 2005. Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 71, 1685–1693. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1685>
- Davis, M.R., Condrón, L.M., 2002. Impact of grassland afforestation on soil carbon in New Zealand: a review of paired-site studies. *Aust. J. Soil Res.* 40, 675–690. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/SR01074>
- Deng, L., Zhu, G., Tang, Z., Shangguan, Z., 2016. Global patterns of the effects of land-use changes on soil carbon stocks. *Glob. Ecol. Conserv.* 5, 127–138. <https://doi.org/10.1016/J.GECCO.2015.12.004>
- Doetterl, S., Berhe, A.A., Nadeu, E., Wang, Z., Sommer, M., Fiener, P., 2016. Erosion, deposition and soil carbon: A review of process-level controls, experimental tools and models to address C cycling in dynamic landscapes. *Earth-Science Rev.* 154, 102–122. <https://doi.org/10.1016/J.EARSCIREV.2015.12.005>
- Dziewolski, J., 1985. Zagadnienia wtórnej sukcesji lasu na polanach Tatrzańskiego Parku Narodowego. *Chrońmy Przyr. Ojcz* 41, 5–10.
- Fang, X., Wang, Q., Zhao, W., Wei, Y., Niu, L., Dai, L., 2014. Land use effects on soil organic carbon, microbial biomass and microbial activity in Changbai Mountains of Northeast China. *Chinese Geogr. Sci.* 24, 297–306. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11769-014-0670-9>
- FAO/IIASA/ISRIC/ISS-CAS/JRC, 2009. Harmonized World Soil Database (version 1.2), FAO, Rome, Italy and IIASA, Laxenburg, Austria.
- Frączek, M., Dziepak, M., 2015. Wtórna sukcesja lasu na polanie Kogutowej w Małych Pieninach. *Stud. i Mater. CEPL w Rogowie R.* 17, 211–219.
- Frankenberger, W.T., Johanson, J.B., 1983. Factors affecting invertase activity in soils. *Plant Soil* 74, 313–323. <https://doi.org/10.1007/BF02181349>
- Garcia-Pausas, J., Romanyà, J., Montané, F., Rios, Marc Taull, A.I., Rovira, P., Casals, P., 2017. Are soil carbon stocks in mountain grasslands compromised by land-use changes?, [w] Catalan, J., Ninot, J.M., Mercè, A.M. (Red.), *High Mountain Conservation in a Changing World*. Springer Open, Geneva, pp. 207–249.
- Gerke, J., 2018. Concepts and misconceptions of humic substances as the stable part of soil

- organic matter: A review. *Agronomy* 8. <https://doi.org/10.3390/agronomy8050076>
- Gonet, S.S., 1993. Struktura substancji humusowych. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 411, 189–194.
- Gonet, S.S., Dębska, B., 1998. Properties of humic acids developed during humification process of post-harvest plant residues. *Environ. Int.* 24, 603–608. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(98\)00034-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0160-4120(98)00034-8)
- Gregorich, E.G., Janzen, H., Ellert, B.H., Helgason, B.L., Qian, B., Zebarth, B.J., Angers, D.A., Beyaert, R.P., Drury, C.F., Duguid, S.D., May, W.E., McConkey, B.G., Dyck, M.F., 2017. Litter decay controlled by temperature, not soil properties, affecting future soil carbon. *Glob. Chang. Biol.* 23, 1725–1734. <https://doi.org/10.1111/gcb.13502>
- Guimarães, D.V., Gonzaga, M.I.S., da Silva, T.O., da Silva, T.L., da Silva Dias, N., Matias, M.I.S., 2013. Soil organic matter pools and carbon fractions in soil under different land uses. *Soil Tillage Res.* 126, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.still.2012.07.010>
- Guo, L., Gifford, R., 2002. Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. *Glob. Chang. Biol.* 8, 345–360. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1354-1013.2002.00486.x>
- Guo, Y., Quin, F., Yao, Y., Qi, W., 2014. Effects of land use changes on soil organic carbon and soil microbial biomass carbon in low hills of North Yanshan Mountains. *Range Manag. Agrofor.* 35, 15–21.
- Hayes, M.H.B., Swift, R.S., 2001. Progress towards understanding aspects of composition and structure of humic substances, [w]: Swift, R. S, Spark, K.M. (Red.), *Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments, and Waters*. IHSS, pp. 3–16.
- Hejzman, M., Hejzmanová, P., Pavlů, V., Beneš, J., 2012. Origin, history, management and plant species composition of grasslands in Central Europe - a review., [w]: Goliński, P., Warda, M., Stypiński, P. (Red.), *Grassland - a European Resource? Proceedings of the 24th General Meeting of the European Grassland Federation, Lublin, Poland, 3-7 June 2012*. Polskie Towarzystwo Łąkarskie, pp. 554–567.
- Hopkins, D.W., 2008. Carbon mineralization, [w]: Carter, M.R., Gregorich, E.G. (Red.), *Soil Sampling and Methods of Analysis*. CRC Press.
- Huang, W., Han, T., Liu, J., Wang, G., Zhou, G., 2016. Changes in soil respiration components and their specific respiration along three successional forests in the subtropics. *Funct. Ecol.* 30, 1466–1474. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12624>
- Jiang-shan, Z., Jian-fen, G., Guang-shui, C., Wei, Q., 2005. Soil microbial biomass and its controls. *J. For. Res.* 16, 327–330. <https://doi.org/10.1007/BF02858201>

- Jiménez-González, M.A., Almendros, G., Waggoner, D.C., Álvarez, A.M., Hatcher, P.G., 2020. Assessment of the molecular composition of humic acid as an indicator of soil carbon levels by ultra-high-resolution mass spectrometric analysis. *Org. Geochem.* 143, 104012. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2020.104012>
- Jobbágy, E.G., Jackson, R.B., 2000. The vertical distribution of soil organic carbon and its relation to climate and vegetation. *Ecol. Appl.* 10, 423–436. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2000\)010\[0423:TVDOSO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)010[0423:TVDOSO]2.0.CO;2)
- Jones, D.L., Willett, V.B., 2006. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biol. Biochem.* 38, 991–999. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2005.08.012>
- Józefowska, A., Miechówka, A., 2015. Enzymatic activity and enchytraeids abundance in agricultural mountain soils. *Soil Sci. Annu.* 66, 133–138. <https://doi.org/10.1515/ssa-2015-0029>
- Józefowska, A., Pietrzykowski, M., Woś, B., Cajthaml, T., Frouz, J., 2017. Relationships between respiration, chemical and microbial properties of afforested mine soils with different soil texture and tree species: Does the time of incubation matter. *Eur. J. Soil Biol.* 80, 102–109. <https://doi.org/10.1016/J.EJSOBI.2017.05.004>
- Kabała, C., Karczewska, A., 2017. *Metodyka analiz laboratoryjnych gleb i roślin*, wydanie 8. INoGOOE, UP, Wrocław.
- Kara, Ö., Bolat, I., 2008. The effect of different land uses on soil microbial biomass carbon and nitrogen in Bartın Province. *Turk J Agric* 32, 281–288.
- Kaźmierczakowa, R., Zarzycki, J., Wróbel, I., Vončina, G., 2004. Łąki, pastwiska i zbiorowiska siedlisk wilgotnych Pienińskiego Parku Narodowego. *Stud. Naturae* 49, 195–251.
- Khanghahi, M.Y., Murgese, P., Strafella, S., Crecchio, C., 2019. Soil biological fertility and bacterial community response to land use intensity: A case study in the Mediterranean Area. *Diversity* 11. <https://doi.org/10.3390/d11110211>
- Kołwazn, B., Adamik, W., Grabas, K., Pawełczyk, A., 2005. *Podstawy mikrobiologii w środowiska*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław.
- Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego, Rady, Europejskiego Komitetu Ekonomiczno-Społecznego i Komitetu Regionów. COM0380 2020. Unijna strategia na rzecz bioróżnorodności 2030. Przywracanie przyrody do naszego życia.
- Komunikat Komisji do Parlamentu Europejskiego, Rady, Europejskiego Komitetu Ekonomiczno-Społecznego oraz Komitetu Regionów COM 645 2008, w sprawie podjęcia wyzwań

związanych z wylesianiem i degradacją lasów w celu przeciwdziałania zmianom klimatycznym i utracie różnorodności biologicznej.

- Kondracki, J., 1998. *Geografia regionalna Polski*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Kononowa, M., 1968. *Substancje organiczne gleby, ich budowa, właściwości i metody badań*. PWRiL, Warszawa.
- Koper, J., Piotrowska, A., Siwik-Ziomek, A., 2008. Dehydrogenase and inventase activities in a rusty soil in the neighbour of the Włocławek nitrogen plant „anvil”. *Proc. EcoPOLE 2*, 197–212.
- Kostuch, R., 1996. Zmiany szaty roślinnej terenów górskich spowodowane działalnością człowieka. *Mat.Sem. IMUZ Falenty 38*, 156–163.
- Kozak, J., 2005. *Zmiany powierzchni lasów w Karpatach Polskich na tle innych gór świata*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego.
- Kubijowicz, W., 1927. *Życie pasterskie w Beskidach Magórkich*. Prace Komisji Etnograficznej Polskiej Akademi Umiejętności Nr. 2, Kraków.
- Kucharzyk, S., Augustyn, M., 2010. Stability of mountain glades in the Bieszczady National Park. *Rocz. Bieszczadzkie 18*, 45–58.
- Kucharzyk, S., Augustyn, M., 2008. Dynamika górnej granicy lasu w Bieszczadach Zachodnich – zmiany w ciągu półtora wieku. *Rocz. Bieszczadzkie 54*, 133–156.
- Kukułs, I., Kļaviņš, M., Nikodemus, O., Kasparinskis, R., Brūmelis, G., 2019. Changes in soil organic matter and soil humic substances following the afforestation of former agricultural lands in the boreal-nemoral ecotone (Latvia). *Geoderma Reg.* 16. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2019.e00213>
- Lal, R., 2014. Societal value of soil carbon. *J. Soil Water Conserv.* 69, 186A-192A. <https://doi.org/10.2489/jswc.69.6.186A>
- Landgraf, D., Klose, S., 2002. Mobile and readily available C and N fractions and their relationship to microbial biomass and selected enzyme activities in a sandy soil under different management systems. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165, 9–16. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200202\)165:1<9::AID-JPLN9>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200202)165:1<9::AID-JPLN9>3.0.CO;2-O)
- Lehmann, J., Kleber, M., 2015. The contentious nature of soil organic matter. *Nature* 528, 60–68. <https://doi.org/10.1038/nature16069>
- Lityński, T., Jurkowska, H., Górlach, E., 1976. *Chemical-agricultural Analysis*. PWN.
- Liu, Mengyun, Liu, Mengmeng, Li, P., Yang, J., Wang, J., Chang, Q., 2020. Variations in soil

- organic carbon decompositions of different land use patterns on the tableland of Loess Plateau. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 4337–4352. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07099-2>
- Luo, Z., Feng, W., Luo, Y., Baldock, J., Wang, E., 2017. Soil organic carbon dynamics jointly controlled by climate, carbon inputs, soil properties and soil carbon fractions. *Glob. Chang. Biol.* 23, 4430–4439. <https://doi.org/10.1111/gcb.13767>
- Manpoong, C., De Mandal, S., Bangaruswamy, D.K., Perumal, R.C., Benny, J., Beena, P.S., Ghosh, A., Kumar, N.S., Tripathi, S.K., 2020. Linking rhizosphere soil biochemical and microbial community characteristics across different land use systems in mountainous region in Northeast India. *Meta Gene* 23, 100625. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2019.100625>
- Martin, D., Lal, T., Sachdev, C.B., Sharma, J.P., 2010. Soil organic carbon storage changes with climate change, landform and land use conditions in Garhwal hills of the Indian Himalayan mountains. *Agric. Ecosyst. Environ.* 138, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2010.04.001>
- Martín, J.A., Álvaro-Fuentes, J., Gonzalo, J., Gil, C., Ramos-Miras, J.J., Grau Corbí, J.M., Boluda, R., 2016. Assessment of the soil organic carbon stock in Spain. *Geoderma* 264, 117–125. <https://doi.org/10.1016/J.GEODERMA.2015.10.010>
- Mazurek, R., Kowalska, J., Gasiorek, M., Setlak, M., 2016. Micromorphological and physico-chemical analyses of cultural layers in the urban soil of a medieval city - A case study from Krakow, Poland. *Catena* 141, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.02.026>
- Mganga, K.Z., Razavi, B.S., Kuzyakov, Y., 2016. Land use affects soil biochemical properties in Mt. Kilimanjaro region. *CATENA* 141, 22–29. <https://doi.org/10.1016/J.CATENA.2016.02.013>
- Michalik, S., 1990. Sukcesja roślinności na polanie regłowej w Gorczańskim Parku Narodowym w okresie 20 lat w wyniku zaprzestania wypasu. *Prądnik* 2, 137–148.
- Miechówka, A., Gąsiorek, M., Józefowska, A., Zadrozny, P., 2010. Effect of soil management method on the content of microbial biomass carbon in soils of Śląskie and Ciężkowickie foothills. *Rocz. Glebozn.* LXI, 164–170.
- Mijangos, I., Epelde, L., Garbisu, C., González-Oreja, J.A., 2014. Modification of soil enzyme activities as a consequence of replacing meadows by pine plantations under temperate climate. *Pedobiologia (Jena)*. 57, 61–66. <https://doi.org/10.1016/J.PEDOBI.2013.12.006>
- Moghimian, N., Hosseini, S.M., Kooch, Y., Darki, B.Z., 2017. Impacts of changes in land use/cover on soil microbial and enzyme activities. *CATENA* 157, 407–414. <https://doi.org/10.1016/J.CATENA.2017.06.003>

- Mohinuzzaman, M., Yuan, J., Yang, X., Senesi, N., Li, S.L., Ellam, R.M., Mostofa, K.M.G., Liu, C.Q., 2020. Insights into solubility of soil humic substances and their fluorescence characterisation in three characteristic soils. *Sci. Total Environ.* 720, 137395. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137395>
- Mondini, C., Bigot, G., Sinicco, T., Mosetti, D., 2019. Biochemical indicators of soil fertility in vineyards with different conservative management systems. *BIO Web Conf.* 13, 04009. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191304009>
- Moscatelli, M.C., Di Tizio, A., Marinari, S., Grego, S., 2007. Microbial indicators related to soil carbon in Mediterranean land use systems. *Soil Tillage Res.* 97, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.still.2007.08.007>
- Moscatelli, M.C., Lagomarsino, A., Marinari, S., De Angelis, P., Grego, S., 2005. Soil microbial indices as bioindicators of environmental changes in a poplar plantation. *Ecol. Indic.* 5, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2005.03.002>
- Mostofa, K.M.G., Jie, Y., Sakugawa, H., Liu, C.Q., 2019. Equal treatment of different EEM data on PARAFAC modeling produces artifact fluorescent components that have misleading Biogeochemical Consequences. *Environ. Sci. Technol.* 53, 561–563. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06647>
- Mukumbuta, I., Shimizu, M., Hatano, R., 2019. Short-term land-use change from grassland to cornfield increases soil organic carbon and reduces total soil respiration. *Soil Tillage Res.* 186, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.still.2018.09.010>
- Nadal-Romero, E., Cammeraat, E., Pérez-Cardiel, E., Lasanta, T., 2016. Effects of secondary succession and afforestation practices on soil properties after cropland abandonment in humid Mediterranean mountain areas. *Agric. Ecosyst. Environ.* 228, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.05.003>
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Biol.* 54, 655–670. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x>
- Natywa, M., Selwet, M., Maciejewski, T., 2014. Wpływ wybranych czynników agrotechnicznych na liczebność i aktywność drobnoustrojów glebowych 31, 56–63.
- Navarrete, I.A., Tsutsuki, K., Navarrete, R.A., 2010. Humus composition and the structural characteristics of humic substances in soils under different land uses in Leyte, Philippines. *Soil Sci. Plant Nutr.* 56, 289–296. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2010.00455.x>
- Ndiaye, E., Sandeno, J., McGrath, D., Dick, R.P., 2000. Integrative biological indicators for detecting change in soil quality. *Am. J. Altern. Agric.* 15, 26–36.

- Niemyska-Lukaszuk, J., Miechówka, A., Zaleski, T., 2002. The soils of Pieniny National Park and their threats. *Pieniny – Przyr. i Człowiek* 90, 79–90.
- Nowak, A., 2011. Zmiany granicy rolno-leśnej w Pasmach Magurskich Beskidu Niskiego od lat 1978-1980 do lat 2003-2004. *Pr. Geogr.* 111–126.
- Nowosad, M., 1995. Outlines of climate of the Bieszczady National Park and its buffer zone in line of previous studies. *Rocz. Bieszczadzkie* 4, 163–183.
- Obrębska-Starkłowa, B., Hess, M., Olecki, Z., Trepifiska, J., Kowanetz, L., 1995. Klimat, [w]: *Karpaty Polskie, Przyroda, Człowiek i Jego Działalność*. UJ, Kraków, pp. 31–47.
- Oktaba, L., Kondras, M., 2015. Organic matter transformation in meadow soils during the first years after afforestation. *Sylwan* 159, 126–134. <https://doi.org/10.26202/sylwan.2014074>
- Olszowska, G., 2014. Biochemical soil activity in *Taxus baccata* L. stands in forest reserves and managed forests. *For. Res. Pap.* 75, 407–415. <https://doi.org/10.2478/frp-2014-0037>
- Oyama, M., Takehara, H., 1970. Revised Standard Soil Color Charts. Research Council for Agriculture, Forestry and Fisheries. Japan.
- Pabst, H., Kühnel, A., Kuzyakov, Y., 2014. Effect of land-use and elevation on microbial biomass and water extractable carbon in soils of Mt. Kilimanjaro ecosystems. *Appl. Soil Ecol.* 77, 80–81. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.03.002>
- Panettieri, M., Kincker, H., Murillo, J., Madejon, E., Hatcher, P., 2014. Soil organic matter degradation in an agricultural chronosequence under different tillage regimes evaluated by organic matter pools, enzymatic activities and CPMAS ¹³C NMR. *Soil Biol. Biochem.* 78, 170–181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.07.021>
- Perzanowska, J., 2004. Climate of the Pieniny Mountains. *Stud. Naturae* 49, 21–32.
- Piccolo, A., 2002. The supramolecular structure of humic substances: A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. *Adv. Agron.* 75, 57–134. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(02\)75003-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(02)75003-7)
- Piotrowska, A., Charzyński, P., 2012. Zmienność czasowo-przestrzenna zawartości i aktywności glebowej biomasy mikrobiologicznej. *Proc. ECOpole* 6, 655–661. [https://doi.org/10.2429/proc.2012.6\(2\)088](https://doi.org/10.2429/proc.2012.6(2)088)
- Poeplau, C., Don, A., Vesterdal, L., Leifeld, J., Van Wesemael, B., Schumacher, J., Gensior, A., 2011. Temporal dynamics of soil organic carbon after land-use change in the temperate zone - carbon response functions as a model approach. *Glob. Chang. Biol.* 17, 2415–2427. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02408.x>

- Polska Norma PN-ISO 11277:2005. Jakość gleby – Oznaczanie składu granulometrycznego w mineralnym materiale glebowym – Metoda sitowa i sedymentacyjna. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
- Polska Norma PN-ISO 14235:2003 Jakość gleby – Oznaczanie zawartości węgla organicznego przez utlenianie dwuchromianem(VI) w środowisku kwasu siarkowego(VI). Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
- Polska Norma PN-ISO 14240-2:2001. Jakość gleby – Oznaczanie ilości biomasy mikroorganizmów w glebie – Metoda fumigacji-ekstrakcji. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
- Polskie Towarzystwo Gleboznawcze Komisja Genezy Klasyfikacji i Kartografii Gleb, 2019. Systematyka gleb Polski. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Polskie Towarzystwo Gleboznawcze, Wrocław-Warszawa.
- Przyboś, K., 1995. Dzieje Karpat Polski, [w]: Warszyńska, J. (Red.), Karpaty Polskie. Uniwersytet Jagielloński, Kraków, pp. 147–168.
- Ramesh, T., Bolan, N.S., Kirkham, M.B., Wijesekara, H., Kanchikerimath, M., Srinivasa Rao, C., Sandeep, S., Rinklebe, J., Ok, Y.S., Choudhury, B.U., Wang, H., Tang, C., Wang, X., Song, Z., Freeman, O.W., 2019. Soil organic carbon dynamics: Impact of land use changes and management practices: A review. *Adv. Agron.* 156, 1–107. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2019.02.001>
- Ramowa konwencja Narodów Zjednoczonych w sprawie zmian klimatu. 1992. Nowy Jork. (Dz.U. 1996 nr 53 poz. 238)
- Ren, C., Zhao, F., Kang, D., Yang, G., Han, X., Tong, X., Feng, Y., Ren, G., 2016. Linkages of C:N:P stoichiometry and bacterial community in soil following afforestation of former farmland. *For. Ecol. Manage.* 376, 59–66. <https://doi.org/10.1016/J.FORECO.2016.06.004>
- Rosenvald, K., Kuznetsova, T., Ostonen, I., Truu, M., Truu, J., Uri, V., Lohmus, K., 2011. Rhizosphere effect and fine-root morphological adaptations in a chronosequence of silver birch stands on reclaimed oil shale post-mining areas. *Ecol. Eng.* 37, 1027–1034. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.05.011>
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady UE 2018/841 z dnia 30 maja 2018 r. w sprawie włączenia emisji i pochłaniania gazów cieplarnianych w wyniku działalności związanej z użytkowaniem gruntów, zmianą użytkowania gruntów i leśnictwem do ram polityki klimatycznoenergetycznej do roku 2030.
- Saxena, N., 2016. Methods for elucidating microbial biomass. *Int. J. Appl. Sci.* 03, 375–387. <https://doi.org/10.21013/jas>

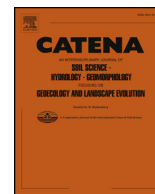
- Schnitzer, M., Khan, S., 1972. Humic substances in the environment. Marcel Dekker, New York.
- Sicardi, M., García-Préchac, F., Frioni, L., 2004. Soil microbial indicators sensitive to land use conversion from pastures to commercial *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) plantations in Uruguay. *Appl. Soil Ecol.* 27, 125–133. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2004.05.004>
- Silver, W.L., Ostertag, R., Lugo, A.E., 2000. The potential for carbon sequestration through reforestation of abandoned tropical agricultural and pasture lands. *Restor. Ecol.* 8, 394–407. <https://doi.org/10.1046/j.1526-100x.2000.80054.x>
- Skiba, S., 1999. Charakterystyka pokrywy glebowej Bieszczadzkiego Parku Narodowego. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 467, 21–32.
- Skiba, S., Drewnik, M., 2000. Soil cover of the Magura National Park (the Carpathians , Beskid Niski Mts). *Rocz. Bieszczadzkie* 9, 183–195.
- Smith, P., 2008. Land use change and soil organic carbon dynamics. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 81, 169–178. <https://doi.org/10.1007/s10705-007-9138-y>
- Stępień-Sałek, M., 2004. Magurski Park Narodowy. *Przyr. Pol.* 02, 16–18.
- Suhett, A., MacCord, F., Amado, A., Farjalla, V., de Esteves, A., 2004. Photodegradation of dissolved organic carbon in humic coastal lagoons, [w]: Neto, L., Milori, D.M.B., da Silva, W.T. (Red.), *Humic Substances and Soil and Water Environment*. IHSS, pp. 61–69.
- Sun, C., Liu, J., Wang, Y., Zheng, N., Xingqiang, W., Liu, Q., 2012. Effect of long-term cultivation on soil organic carbon fractions and metal distribution in humic and fulvic acid in black soil, Northeast China. *Soil Res.* 50, 562. <https://doi.org/10.1071/SR12100>
- Sutton, R., Sposito, G., 2005. Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environ. Sci. Technol.* 39, 9009–9015. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/es050778q>
- Szwagrzyk, J., 2004. Sukcesja leśna na gruntach porolnych; stan obecny, prognozy i wrażliwości. *Sylwan* 4, 53–59.
- Tadini, A., Constantino, I., Nuzzo, A., Spaccini, R., Piccolo, A., Moreira, A., Bisinoti, M., 2015. Characterization of typical aquatic humic substances in areas of sugarcane cultivation in Brazil using tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis. *Sci. Total Environ.* 518–519, 201–208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.103>
- Tan, K.T., 2005. Soil sampling, preparation and analysis. Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Toh, F.A., Ndam, L.M., Angwafo, T.E., Christopher, N., 2020. Effect of land use management patterns on mineralization kinetics of soil organic carbon in Mount Bambouto Caldera Area of Cameroon. *Open J. Soil Sci.* 10, 391–409. <https://doi.org/10.4236/ojss.2020.109021>

- Tokarczyk, N., 2015. Zarastanie polan reglowych w polskich Karpatach w świetle istniejących badań. *Chrońmy Przyr. Ojcz.* 71, 243–256.
- Tokarczyk, N., 2013. Renaturalizacja górnoreglowych polan gorczańskich. *Sylwan* 157, 113–121.
- Tokarczyk, N., 2012. Changes in the area of glades in the upper forest vertical zone in the Gorce Mts from 1954 to 2003. *Pr. Geogr.* 128, 7–16. <https://doi.org/10.4467/20833113PG.12.001.0350>
- Ueda, M.U., Kachina, P., Marod, D., Nakashizuka, T., Kurokawa, H., 2017. Soil properties and gross nitrogen dynamics in old growth and secondary forest in four types of tropical forest in Thailand. *For. Ecol. Manage.* 398, 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.05.010>
- Ukalska-Jaruga, A., Klimkiewicz-Pawlas, A., Smreczak, B., 2019. Characterization of organic matter fractions in the top layer of soils under different land uses in Central-Eastern Europe. *Soil Use Manag.* 35, 595–606. <https://doi.org/10.1111/sum.12514>
- Voroney, P., Brookes, P.C., Beyaert, R.P., 2007. Soil microbial biomass C, N P and S, [w]: Carter, M.R., Gregorich, E. (Red.), *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Lewis Publ. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 637–642.
- Wanic, T., Bodziarczyk, J., Gasiorek, M., Hawryło, P., Józefowska, A., Kajdas, B., Mazurek, R., Szostak, M., Usień, M., Węzyk, P., Zadrozny, P., Zięba-Kulawik, K., Zaleski, T., 2017. Trophic conditions of forest soils of the Pieniny National Park, southern Poland. *Soil Sci. Annu.* 68, 205–211. <https://doi.org/10.1515/ssa-2017-0026>
- Wershaw, R.L., 1999. Molecular aggregation of humic substances. *Soil Sci.* 164, 803–813.
- Węzyk, P., 2006. Przemiany środowiska przyrodniczego Gorców na przykładzie użytkowania polan w latach 1954–1997. *Stud. Naturae* 54, 201–2011.
- Węzyk, P., Pyrkosz, R., 1999. Użytkowanie polan w Gorcach na przestrzeni lat 1954–1997 na podstawie fotogrametrycznego opracowania zdjęć lotniczych. *Arch. Fotogram. Kartogr. i Teledetekcji* 223–232.
- Wiesmeier, M., Spörlein, P., Geuß, U., Hangen, E., Haug, S., Reischl, A., Schilling, B., von Lützw, M., Kögel-Knabner, I., 2012. Soil organic carbon stocks in southeast Germany (Bavaria) as affected by land use, soil type and sampling depth. *Glob. Chang. Biol.* 18, 2233–2245. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02699.x>
- Woloszczyk, P., Fiencke, C., Elsner, D.C., Cordsen, E., Pfeiffer, E.M., 2020. Spatial and temporal patterns in soil organic carbon, microbial biomass and activity under different land-use types in a long-term soil-monitoring network. *Pedobiologia (Jena)*. 80.

<https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2020.150642>

- Wolski, J., 2018. Przekształcenia granic lasu w Bieszczadach Wysokich (od połowy XIX w. do współczesności).
- Wolski, J., 2009. Trwałość krajobrazu wiejskiego na przykładzie przekształceń zbiorowisk roślinnych bieszczadzkiej „krainy dolin” w ciągu ostatnich 150 lat. *Chrońmy Przyr. Ojczystą* 65, 441–448.
- Xu, M., Shang, H., 2016. Contribution of soil respiration to the global carbon equation. *J. Plant Physiol.* 203, 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.08.007>
- Yazdanpanah, N., Mahmoodabadi, M., Cerdà, A., 2016. The impact of organic amendments on soil hydrology, structure and microbial respiration in semiarid lands. *Geoderma* 266, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.11.032>
- Zalba, P., Amiotti, N., Galantini, J.A., Pistola, S., 2016. Soil humic and fulvic acids from different land-use systems evaluated by E4/E6 ratios. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 47, 1675–1679. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00103624.2016.1206558>
- Zaleski, T., Bodziarczyk, J., Wężyk, P., Gąsior, M., Hawryło, P., Józefowska, A., Kajdas, B., Mazurek, R., Szostak, M., Wanic, T., Zadrozny, P., Zięba-kulawik, K., 2018. Wpływ naturalnej sukcesji leśnej na właściwości gleb w strefie ekotonowej (między lasem i łąką) w Pienińskim Parku Narodowym – wstępne wyniki badań 20, 3–20.
- Zaleski, T., Korzeniak, J., Kalemba, A., Rolnicza, A., 2007. Antropogeniczne przekształcenia pokrywy glebowej łąk porolnych w Wołosatem (Bieszczadzki Park Narodowy). *Rocz. Bieszczadzkie* 15, 253–266.
- Zaleski, T., Mazurek, R., Gąsior, M., Wanic, T., Zadrozny, P., Józefowska, A., Kajdas, B., 2016. Gleby leśnych powierzchni monitoringowych w Pienińskim Parku Narodowym 15, 3–15.
- Zaleski, T., Zarzycki, J., Kacprzak, A., 2014. Wpływ sposobu koszenia na warunki glebowe i skład florystyczny ciepłolubnej łąki pienińskiej. *Pieniny – Przyr. i Człowiek* 13, 33–44.
- Zarzycki, J., Korzeniak, J., 2013. Meadows in the Polish Carpathians – present state, changes and preservation prospects. *Rocz. Bieszczadzkie* 21, 18–34.
- Zhiyanski, M., Glushkova, M., Kirova, L., Filcheva, E., 2017. Quantitative and qualitative features of soil humus in mountain treeline ecosystems. *Silva Balc.* 18, 5–23.
- Zwoliński, J., 2008. Vertical distribution of microbial biomass in forest soil. *Leśne Pr. Badaw.* 69, 225–231.

8 Publikacje stanowiące rozprawę doktorską wraz z oświadczeniami autorów



Succession from meadow to mature forest: Impacts on soil biological, chemical and physical properties—Evidence from the Pieniny Mountains, Poland

Justyna Sokołowska*, Agnieszka Józefowska, Karolina Woźnica, Tomasz Zaleski

Department of Soil Science and Agrophysics University of Agriculture in Krakow, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Land-use change
Succession
Organic carbon stock
Mountain soils
Western Beskids

ABSTRACT

Long-term human agricultural activity in the Carpathian region created meaningful landscape transformations; for example, valuable and high-biodiversity, semi-natural areas were formed. Subsequently, socioeconomic changes after World War II started a trend of decreasing agricultural activity and pasturing, as well as the abandonment of higher-altitude and more-difficult-to-access meadows. As a result, in many cases, landscape transformation, such as secondary forest succession, began to occur. This study examined the influence of natural forest succession by comparing a semi-natural meadow to a 25-year-old forest succession area and an old-growth forested area, taking into account selected soil physical, chemical and biological properties. The study sought to answer the following questions: where are the greater carbon stocks found — in meadows, forest successions or old-growth forests?; does soil microbial activity change during succession?; and does succession cause changes in soil physical properties? The research area was located in Pieniny National Park in southern Poland. No significant differences in the amount of carbon stock or the microbial activity (i.e. microbial biomass carbon content and dehydrogenase activity) were found among the meadow, succession and old-growth forest soil samples. However, the old-growth forest soils showed a much higher invertase activity than the succession and meadow soils. Nevertheless, when we took into consideration variables associated with the microbial properties, and placed these into an ordination space, more visible differences among the meadow, succession and forest samples became apparent. Thus, any discussion of land use in mountainous areas should take multiple aspects into account.

1. Introduction

Natural forest succession is an overgrowing process that helps to increase the extent of forested areas. Globally, an increase in forested areas is viewed favourably, with current international policy agendas supporting increasing forest areas in the context of carbon sequestration. However, at the same time, this could contribute to a decrease in biodiversity and the disappearance of unique landscapes, especially on a local scale (Szwagrzyk, 2004; Wolski, 2009). Semi-natural meadows are an integral part of mountain landscapes (Tokarczyk, 2017), such as those found in Pieniny National Park (PNP). PNP includes a large number of unforested areas that occupy 22% of the park (Każmierczakowa et al., 2004). Socioeconomic changes after World War II caused a trend of decreasing agriculture and pasturing (MacDonald et al., 2000), as well as the abandonment of higher-altitude and more-difficult-to-access meadows (Bodziarczyk et al., 1996). As a

result, in many cases, secondary forest succession began to occur (Bodziarczyk et al., 1999; Cammeraat, 2005), which can alter soil characteristics, such as microbiological properties or organic carbon stocks. The effects of increasing succession vegetation have recently been receiving greater scientific attention, but the information is scattershot. It is thus important to examine the impact of forest succession with respect to ecosystems and soil carbon storage.

Soil organic carbon (SOC) is the largest terrestrial organic carbon pool (Doetterl et al., 2016), with soils globally containing 699 Pg C in the 0–30 cm layer (FAO, 2009). Recent research (Doetterl et al., 2016) has suggested that a variety of environmental factors more readily impact SOC stability than intrinsic molecular structure. The crucial role of soil in the global carbon cycle and turnover is being increasingly acknowledged, especially in the context of land use and climate change (Amundson et al., 2015). The impact of different agricultural land uses and practices on soil organic matter (SOM) changes have been

* Corresponding author.

E-mail address: justyna.sokolowska@student.urk.edu.pl (J. Sokołowska).

<https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104503>

Received 14 August 2019; Received in revised form 23 January 2020; Accepted 29 January 2020

0341-8162/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

thoroughly reviewed by Guo and Gifford (2002) and Murty et al. (2002). However, there has been a lack of research covering all major land-use types (Poelau and Don, 2013), and also the effects of natural forest succession on SOC are still largely unknown. The afforestation of arable lands could restrict degradation processes and increase organic carbon sequestration in soils (Silver et al., 2000). Nadal-Romero et al. (2016) suggested that the rate of accumulation of SOC in soils under secondary succession after cropland abandonment is really slow. Grassland and forest soils vary in terms of their root architecture and density, which influence the mechanism of carbon sequestration (Six et al., 2000). Nevertheless, several studies have shown that the afforestation of grassland can also lead to a reduction in the SOC stock (Davis and Condon, 2002). Jobbágy and Jackson (2000) and Martín et al. (2016) found significant differences in SOC content among the soil profiles of various vegetation types, including grasslands, shrublands and forests, and croplands, grasslands and forests, respectively. However, so far, there has been no clear identification of the SOC accumulation patterns between forests and grasslands (Martín et al., 2016; Wiesmeier et al., 2012).

Soil biological properties could be sensitive indicators of soil transformations (Yakovchenko et al., 1996). An important feature of soil biological properties is microbial activity. According to Sicardi et al. (2004), microbial properties, such as microbial biomass, soil respiration and enzyme activity, are useful tools for assessing changes in biological soil quality resulting from the conversion of pasture to planted forest, as well as for determining changes in soil properties during natural forest succession (Zaleski et al., 2018). Moreover, many studies have suggested that enzyme activities are sensitive and reliable indicators of the biogeochemical changes in soil (Nannipieri et al., 2003; Sicardi et al., 2004) and of soil quality (Mganga et al., 2016). The measurement of general enzymatic activities, such as those of endocellular (e.g. dehydrogenases) and specific exocellular enzymes, involved in nutrient transformations provides useful indications of microbial activity (Nsabimana et al., 2004). The response of soil enzyme activities to management practices is well known (Acosta-Martínez et al., 2008; Nannipieri et al., 2003), and comparisons of microbial activity in arable land and grasslands in mountain areas abound (Józefowska and Miechówka, 2015). Conversely, there have only been a few studies on the influence of land-use changes—for example, the afforestation of farmlands (Ren et al., 2016) and the replacement of meadows with pine plantations (Mijangos et al., 2014)—on soil microbial activity, or on comparisons of enzyme activity among different covered lands, such as virgin and degraded natural forests and tree plantations (Moghimian et al., 2017).

The most common indicators of soil quality are the soil microbial properties, such as enzyme activity and microbial biomass carbon (MBC) content, and the soil chemical properties, such as organic carbon content and organic carbon stock, with soil physical properties, such as soil bulk density (BD), porosity, aggregate stability, aeration infiltration, and water retention capacity, being the most widely used physical indicators (Pagliai and Vignozzi, 2002; Schoenholtz et al., 2000). According to Schoenholtz et al. (2000), forest soil attributes help to promote plant root growth and biological activity, and facilitate the soil in accepting, holding and releasing carbon. Land-use changes can contribute to alterations in soil bulk density. Van Hall et al. (2017) demonstrated that decreased soil bulk density existed among areas of secondary vegetation succession. Moreover, soil physical properties,

such as soil porosity, bulk density, and soil moisture, influence microbiological activity. Several studies (e.g. Giusquiani et al., 1995; Pagliai and De Nobili, 1993) have also explored the interrelationship between pore size and enzyme activity.

The present study investigated the changes in soil properties exhibited in areas that had experienced a natural forest succession process in the Pieniny Mountains (Carpathians, Poland). The goals of this paper were to: (1) observe the changes in soil microbial activity (microbial biomass carbon and enzyme activity) during the succession process; (2) examine the changes in soil physical properties, such as total porosity (TP) and soil bulk density (BD), during the natural forest succession process; and (3) calculate the organic carbon stocks of the meadow, succession and old-growth forest land-use variants.

2. Materials and methods

The research area for this study was located in Pieniny National Park (PNP) in the Carpathian Mountains in southern Poland. PNP is one of the smallest Polish national parks, but it comprises significantly varied habitats and a richness of floral and faunal species (Witkowski, 2003). The Pieniny Mountains possess features typical of low mountains (Jaworski and Jakubowska, 2011). The total annual precipitation ranges from 690 mm to 850 mm and the mean annual temperature ranges from -6.7 °C in January to 17 °C in July (Perzanowska, 2004). PNP contains a wide variety of soil types, likely related to differentiation in the bedrock, land relief, hydrological conditions, and morphogenic and pedogenic processes (Niemyska-Lukaszuk et al., 2002). The most common soil type in the PNP forest monitoring areas is eutric cambisol (Wanic et al., 2017; Zaleski et al., 2018, 2016). Three transects, each consisting of areas of semi-natural meadow, succession covered by 25- or 30-year-old forest, and old-growth forest (trees aged 150–200 years old), were selected. All of the tree stands belonged to, or (in the case of the succession stage) probably will belong to, a *Dentario glandulosae-Fagetum* (Carpathian beech forest) vegetation complex. Carpathian beech forest is the most common forest habitat in PNP (Wanic et al., 2017).

Soil samples were taken in the autumn of 2017. According to the World Reference Base (WRB, 2015), almost all the examined soils were classifiable under the term 'cambisol', with the exception of one that was a cambic leptosol (Table 1). In each area, five soil subsamples from depths of 0–10 cm and 10–20 cm were collected. These samples were investigated to determine their soil microbial, physical and chemical properties. Measurements of MBC content, according to Voroney et al. (2007), enzyme activity, such as dehydrogenase activity (DHA), according to Casida et al. (1964), invertase activity (AI), according to Frankenberger and Johanson (1983), and dissolved organic carbon (DOC) content, according to Jones and Willett (2006) were made on fresh soil samples that had been passed through a 2-mm-mesh sieve. Using dry soil passed through a 2-mm-mesh sieve, the soil texture was examined using the Casagrande-Prószyński aerometer method (PN-R-04032, 1998), while the pH was determined using a potentiometric method in 1 M of potassium chloride solution and the total organic carbon (TOC) content was estimated using the Tiurin method (Lityński et al., 1976). The sorption properties, such as base saturation (BS), was calculated, according to the following equation:

$$BS = (S/(S+Ex. A.)) \times 100(\%)$$

Table 1

Soil units at the area of the transects according to WRB classification (WRB, 2015).

Transect	Meadow	Succession	Forest
1	Endoskeletal Eutric Cambisols	Endoskeletal Eutric Cambisols	Skeletal Eutric Cambisols
2	Endoskeletal Eutric Cambisols	Eutric Cambic Leptosols	Endoskeletal Eutric Cambisols
3	Eutric Cambisols	Endoeutric Cambisols	Endoeutric Cambisols

where S is the sum of the exchangeable basic cations (Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺) extracted using 1 M of CH₃COONH₄ and measured by ICP-OES (Optima 7300 DV), while Ex.A. is the exchangeable acidity, measured by extraction using 1 M of potassium chloride (Kabała and Karczewska, 2017).

In addition, four repetitions of undisturbed soil samples were collected in Kopecky cylinders (100 cm³ volume) from each area of the three examined transects and both mineral soil layers (0–10 cm and 10–20 cm). The soil samples were taken from the two mineral soil layers after removing the litter. These samples were used to determine the soil bulk density (BD); soil total porosity (TP); and the volume of macro-, mezo-, and micropores based on the curves given by the soil water retention capacity derived using a porous plate in a pressure chamber (Eijkelkamp's apparatus), according to Richard's method (Blake and Hartge, 1986).

Finally, the SOC stock was calculated, according to the following equation:

$$SOC = TOC \times BD \times d$$

where the SOC represents the soil organic carbon stock in Mg·ha⁻¹, the TOC is the soil organic carbon content in %, the BD is the bulk density in (g·cm⁻³) and d is the sampling depth (cm). In the investigated soil layers, the coarse fragment portion was below 5% in all the studied micropedons, and so was not taken into consideration in the above equation.

3. Statistical analyses

The statistical analyses were performed using Statistica 12.0 software. Means and standard deviations were calculated for the different land-use variants (meadow, succession, forest) for both the 0–10 cm and 10–20 cm layers. Tukey's post-hoc test was used to test for significant differences in the soil properties among the different land-use variants. Additionally, a Pearson correlation analysis was performed for selected soil properties in the entire 0–20 cm soil layer. All correlation coefficients significant at p < 0.05 are shown herein. Also, the locations of the examined sites (meadow, succession, forest) in the ordination space were considered using redundancy analysis (RDA), taking the variables associated with microbial properties into consideration. The ordination was calculated using the Canoco 5 programme (Braak and Smlauer, 2012).

4. Results

As shown in Table 2, the investigated soils were relatively homogeneous. The pH values of the respective top layers of the soils trended towards strongly acidic. Except for TOC, there were no significant differences in the examined chemical soil properties among the different land-use variants or between the two depths. In the 0–10 cm layer, the forest and succession soils had the highest TOC content (3.3%) compared to the meadow soils (2.8%). Conversely, in the 10–20 cm layer, the average TOC values were 1.5%, 1.4% and 1.6% in the meadow, succession and forest soils, respectively. The mean TOC values in the forest and succession soils in the 0–10 cm layer were significantly lower

than in the 10–20 cm layer. The TOC content of the soils was positively correlated with microbial activity (MBC and AI), TP and SOC, and negatively correlated with BD (Table 5). Moreover, the differences between the SOC values in the entire 0–20 cm meadow, succession and forest layers were similarly not significant. It was noted that the succession and forest SOC values were similar and slightly higher than the meadow SOC values. Additionally, in both the succession and forest soils, the SOC was greater in the 0–10 cm layer than in the 10–20 cm layer (Table 3).

The enzymatic activity and MBC content varied among the soils, although there were no significant differences in DHA or MBC in the land-use variants and layers (Table 3). The mean DHA of the 0–10 cm succession soil was not quite as high as those from the meadow or forest soils. However, in the 10–20 cm layer, the mean DHA slightly increased during the natural forest succession process, with meadow soils having lower DHA and forest soils having the highest. The soil DHA values were positively correlated with DOC (Table 5). The MBC content also did not significantly vary among the investigated land-use variants. However, in both layers, the meadow soil samples showed slightly higher mean MBC values than those of the succession and forest soil samples. In the top layer (0–10 cm), a slight decrease in mean AI values was observed, from meadow to forest. The mean AI values of the lower-layer soil (10–20 cm) also varied among the three land-use variants, but the differences were not significant. The AI was positively correlated with TOC, DOC and TP, and negatively correlated with BD.

The soils had similar soil texture ranging from silty clay to silty loam (Table 4). Significant differences were observed only in the case of clay content. The meadow soil of the 10–20 cm layer had the highest clay content by far, while the succession soil of the 0–10 cm layer had the lowest clay content. The TP of the soils was higher in the 0–10 cm layer than in the 10–20 cm layer, but no significant differences were observed (Table 4). The 0–10 cm meadow soil was characterised by slightly higher TP than the succession and forest soils. In the 10–20 cm meadow and succession soils, the TP was not quite as high as in the forest soil. The volumes of micropores and mezopores in the soils were similar. However, the volume of macropores was higher in the forest soil than in the meadow and succession soils, especially in the 10–20 cm layer, where significant differences were observed. The TP of the soils positively correlated with pH KCl, TOC, AI and the sorption properties (i.e. cation exchange capacity (CEC) and S), whilst being negatively correlated with BD (Table 5).

Fig. 1 shows the relation between microbial activity (DHA, AI, MBC) and the measured soil parameters (BD, DOC, TOC, SOC, mesopores, micropores), as selected using the Monte Carlo test (p < 0.05). These results revealed the positioning of the different land-use variants in the ordination space (Fig. 1). The RDA analysis indicated that these characteristics in the 0–10 cm layer overlapped among the land-use variants, but at 10–20 cm, differences between the meadow, succession and forest samples became more obvious. Fig. 1 also suggests a correlation among the soil properties. DHA positively correlated with available food, as expressed by DOC and mesopores, and negatively correlated with micropores. AI strongly positively correlated with mesopores, DOC and TOC, although AI negatively correlated with BD. However, MBC strongly positively correlated with TOC and SOC,

Table 2

Mean and standard deviation values and post-hoc Tukey test results for soil properties (TOC: total organic carbon, DOC: dissolved organic carbon, Ex.A.: exchangeable acidity, S: sum of basic cations, CEC: cation exchange capacity, BS: base saturation).

Depth [cm]	Land use	pH KCl	TOC [%]	DOC [mg·kg ⁻¹]	Ex.A. [mmol·kg ⁻¹]	S [mmol·kg ⁻¹]	CEC [mmol·kg ⁻¹]	BS %
0–10	Meadow	4.2 ± 0.4 ^a	2.8 ± 0.5 ^{ab}	204.4 ± 121.5 ^a	108.1 ± 31.9 ^a	156.6 ± 45.3 ^a	264.7 ± 50.8 ^a	58.8 ± 10.2 ^a
	Succession	4.2 ± 0.8 ^a	3.3 ± 0.4 ^b	143.3 ± 30.5 ^a	110.6 ± 73.4 ^a	134.7 ± 59.0 ^a	245.3 ± 35.8 ^a	56.0 ± 24.5 ^a
	Forest	4.4 ± 0.9 ^a	3.3 ± 0.8 ^b	201.3 ± 71.5 ^a	105.6 ± 55.3 ^a	228.0 ± 120.5 ^a	333.6 ± 75.8 ^a	65.8 ± 20.1 ^a
10–20	Meadow	4.0 ± 0.2 ^a	1.5 ± 0.3 ^a	111.4 ± 29.0 ^a	84.4 ± 36.6 ^a	133.8 ± 21.1 ^a	218.1 ± 57.7 ^a	62.5 ± 6.9 ^a
	Succession	4.1 ± 0.5 ^a	1.4 ± 0.2 ^a	125.9 ± 42.1 ^a	110.0 ± 57.5 ^a	122.0 ± 39.9 ^a	232.0 ± 20.7 ^a	53.7 ± 21.2 ^a
	Forest	4.5 ± 1.0 ^a	1.6 ± 0.8 ^a	152.6 ± 48.0 ^a	89.4 ± 71.6 ^a	226.3 ± 124.0 ^a	315.7 ± 78.9 ^a	69.7 ± 24.5 ^a

Table 3

Mean and standard deviation values and post-host Tuckey test results for microbial biomass carbon (MBC) content, dehydrogenase activity (DHA), invertase activity (AI), and soil organic carbon stock (SOC).

Depth [cm]	Land use	MBC [mg·kg ⁻¹]	DHA [$\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\text{soil}\cdot\text{h}^{-1}$]	AI [mg C ₆ H ₁₂ O ₆ kg ⁻¹ h ⁻¹]	SOC [Mg·ha ⁻¹]
0–10	Meadow	174.6 ± 107.6 ^a	25.7 ± 13.9 ^a	54.3 ± 39.3 ^a	27.7 ± 7.8 ^{abc}
	Succession	130.3 ± 36.4 ^a	13.9 ± 12.4 ^a	66.8 ± 52.9 ^{ab}	36.0 ± 5.0 ^c
	Forest	135.7 ± 21.2 ^a	26.7 ± 12.2 ^a	161.3 ± 40.8 ^b	33.6 ± 5.3 ^{bc}
10–20	Meadow	115.8 ± 75.0 ^a	16.6 ± 11.3 ^a	14.1 ± 18.9 ^a	18.7 ± 3.6 ^{ab}
	Succession	45.6 ± 24.3 ^a	21.4 ± 31.6 ^a	9.4 ± 16.2 ^a	17.1 ± 1.7 ^a
	Forest	59.9 ± 31.5 ^a	25.9 ± 20.2 ^a	68.3 ± 23.8 ^{ab}	17.1 ± 7.1 ^a

positively correlated with micropores and negatively correlated with BD.

5. Discussion

The natural forest succession process in PNP is contributing to decreased biodiversity and the disappearance of unique landscapes. On the other hand, natural forest succession is an important issue in the context of carbon sequestration. As explained below, the natural forest succession process slightly influences soil parameters (e.g. carbon accumulation, microbial activity and physical properties).

5.1. Total organic carbon content

In the case of converting agricultural land to forest, the input of organic matter is significant (Kondras et al., 2012). There is no agreement in the literature in relation to the effects of forest succession or afforestation on total organic carbon content. Vesterdal et al. (2002) suggested that after afforestation, in the relatively short term, carbon is accumulated mainly in the biomass, whilst in the longer term, the soil becomes responsible for storing carbon. However, according to Flinn and Marks (2007), post-agricultural forest may not fully recover to achieve the same soil parameters as primary forest, especially in terms of soil organic matter, and undergrowth diversity may not return to its original status. Bhardwaj et al. (2019) indicated a gradual improvement in soil properties as succession progresses, especially an increase in the levels of organic carbon and nitrogen, in the mid-Himalayan region of India. However, the findings of the present study do not support those of Bhardwaj et al. (2019), with the (more than 100-year-old) forest and (25-year-old forest) succession samples from PNP having similar mean TOC values in the 0–10 cm layer. In general, an increasing TOC content results from a slow increase in the input of organic matter (Cammeraat, 2005). The meadow soils herein had slightly lower TOC values than the succession and forest soils. Such a difference could be caused by tree cover, which might lead to increased above- and belowground vegetation input and, as a consequence, organic carbon accumulation (Nair et al., 2009). Additionally, it is well known that trees promote changes in soil total porosity and contribute to organic carbon accumulation, as confirmed by a positive correlation ($r = 0.643$, $p < 0.05$) between TOC and TP in the examined soils.

Table 4

Means and standard deviation values and post-host Tuckey test results for soil bulk density (BD); total porosity (TP); micro-, mezo-, and macropore volumes; and soil texture.

Depth [cm]	Land use	BD [g·cm ⁻³]	TP [% v/v]	Micropores [% v/v]	Mezopores [% v/v]	Macropores [% v/v]	Sand [%]	Silt [%]	Clay [%]
0–10	Meadow	1.0 ± 0.2 ^a	58.8 ± 9.7 ^a	25.9 ± 8.1 ^a	28.0 ± 13.2 ^a	4.9 ± 5.0 ^a	22 ± 9 ^a	56 ± 14 ^a	22 ± 6 ^{ab}
	Succession	1.1 ± 0.1 ^a	54.0 ± 1.6 ^a	24.9 ± 5.1 ^a	23.4 ± 5.5 ^a	5.6 ± 2.7 ^a	29 ± 3 ^a	58 ± 1 ^a	13 ± 3 ^a
	Forest	1.0 ± 0.1 ^a	57.7 ± 2.7 ^a	25.3 ± 6.5 ^a	19.9 ± 6.4 ^a	12.4 ± 1.7 ^{ab}	19 ± 6 ^a	59 ± 15 ^a	22 ± 9 ^{ab}
10–20	Meadow	1.3 ± 0.1 ^a	47.8 ± 2.0 ^a	31.3 ± 3.9 ^a	10.3 ± 8.3 ^a	6.2 ± 2.8 ^a	15 ± 2 ^a	52 ± 7 ^a	33 ± 6 ^b
	Succession	1.2 ± 0.1 ^a	49.3 ± 2.4 ^a	24.3 ± 5.4 ^a	15.2 ± 4.8 ^a	9.9 ± 4.2 ^{ab}	24 ± 5 ^a	58 ± 3 ^a	18 ± 6 ^{ab}
	Forest	1.1 ± 0.1 ^a	53.8 ± 4.2 ^a	24.3 ± 7.4 ^a	13.8 ± 7.5 ^a	15.7 ± 1.6 ^b	28 ± 7 ^a	54 ± 7 ^a	19 ± 8 ^{ab}

5.2. Soil organic carbon stock

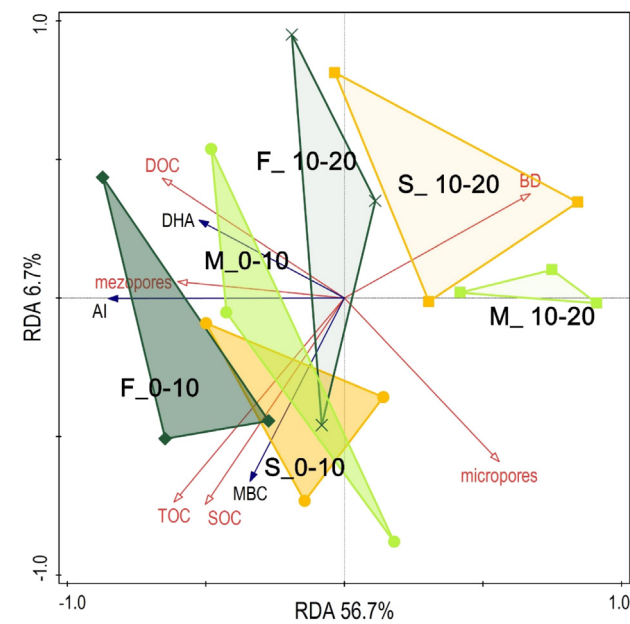
According to Nadal-Romero et al. (2016), SOC accumulation in soils under secondary forest succession after cropland abandonment in mountain areas is a relatively slow process due to the slow increase in organic matter input. In the 0–10 cm layer of the succession and forest soils, however, there were slightly higher SOC values than in the meadow soil. Poeplau and Don (2013) found an insignificant decline in mean SOC in the mineral soil following the conversion of grasslands back to forests. Despite this, global patterns of soil carbon stock changes due to land-use conversions have shown a significant increase in SOC with the conversion of grasslands to forests (Deng et al., 2016). Likewise, in this study, slight differences in SOC values in the 0–10 cm layer, especially between meadow and succession soils, were observed. Moreover, many studies (e.g. DeGryze et al., 2004; Post and Kwon, 2000) have confirmed a significant effect of land-use change on the global carbon cycle through changing soil carbon accumulation and turnover. Forest soils and forest biomes may retain about 0.4 Pg C and 1–3 Pg C per year, respectively; thus, carbon storage in forests should be of significant interest (Lal, 2005).

Carbon accumulation in soil correlates with depth, it being well known that topsoil contains greater concentrations of soil carbon than the subsoil (Poeplau and Don, 2013), which is supported by our results. The respective higher and similar SOC values in the 0–10 cm layer in the succession and forest soil samples could be associated with litter decomposition and ecosystem stabilisation. The accumulation of carbon in soil occurs faster in the early stages of the succession process because of the rapid increase in litter production and input in young forests (Xuluc-Tolosa et al., 2003). Moreover, forests and meadows are stable ecosystems, shaped over hundreds of years; in contrast, succession is a dynamically changing ecosystem (Zaleski et al., 2018). Thus, ecosystem carbon storage has certain limits and, as a result, the soil carbon ecosystem stabilises due to limitations on tree growth and carbon saturation in the soil (Six et al., 2002). In agreement with Fontaine et al. (2007), the greater SOC accumulation in the 0–10 cm soil layer is likely influenced by fresh carbon input (positive correlation with TOC), as well as ongoing microbial activity (positive correlation with MBC). Additionally, a higher root input rate, created by increasing plant diversity, would impact the metabolic activity of soil microbes, promoting an increase in soil carbon storage (Lange et al., 2014). Poeplau and Don (2013) suggested that the SOC of forest soils is more labile than that of grassland soils. Nevertheless, the meadow soils from PNP

Table 5
Pearson correlation analyse results for selected examined soil properties (0–20 cm). All correlation coefficients significant at $p < 0.05$ are shown.

	BD	TOC	pH KCl	Ex.A	CEC	TP	MBC	DOC	DHA	AI	BS	S	clay	SOC
BD	–	–0.661	–0.482	n.s	–0.554	–0.987	n.s	n.s	n.s	–0.562	n.s	–0.523	n.s	n.s
TOC	–0.661	–	n.s	n.s	n.s	0.643	0.617	n.s	n.s	0.521	n.s	n.s	n.s	0.946
pH KCl	–0.482	n.s	–	–0.762	0.514	0.473	n.s	n.s	n.s	n.s	0.872	0.880	n.s	n.s
Ex.A	n.s	n.s	–0.762	–	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	–0.938	–0.587	n.s	n.s
CEC	–0.554	n.s	0.514	n.s	–	0.531	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	0.794	n.s	n.s
TP	–0.987	0.643	0.473	n.s	0.531	–	n.s	n.s	n.s	0.563	n.s	0.504	n.s	n.s
MBC	n.s	0.617	n.s	n.s	n.s	n.s	–	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	0.580
DOC	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	–	0.490	0.516	n.s	n.s	n.s	n.s
DHA	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	0.490	–	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s
AI	–0.562	0.521	n.s	n.s	n.s	0.563	n.s	0.516	n.s	–	n.s	n.s	n.s	n.s
BS	n.s	n.s	0.872	–0.938	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	–	0.803	n.s	n.s
S	–0.523	n.s	0.880	–0.587	0.794	0.504	n.s	n.s	n.s	n.s	0.803	–	n.s	n.s
clay	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	–	n.s
SOC	n.s	0.946	n.s	n.s	n.s	n.s	0.580	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s	–

n.s. not significant.



Simple Term Effects:

Name	Explains %	pseudo-F	P	0-10 cm	Succession	Forest
BD	26.4	5.7	0.02	■	■	■
DOC	25.9	5.6	0.02	■	■	■
TOC	25.1	5.4	0.02	■	■	■
mezopores	20.6	4.1	0.04	■	■	■
micro pores	20.2	4.1	0.04	■	■	■
SOC	18.0	3.5	0.05	■	■	■

Fig. 1. RDA showing the main trends in the dataset and indicating the approximate direction of soil variable effects on soil microbiological properties ($p < 0.05$, Monte Carlo permutation, simple term effect) in both the 0- to 10-cm and 10- to 20-cm examined soil layers.

exhibited an equitable distribution of SOC in both the examined soil layers (0–10 cm and 10–20 cm) when compared with the succession and forest soils.

5.3. Microbiological activity

The slightly higher MBC content in the PNP meadow soils as opposed to the succession and forest soils could be associated with the presence of grassy and dense land-cover at the meadow sites, which would accord with Lange et al. (2014), who showed that soil microbial communities are strongly linked to plant diversity. Soil microbial

activity is enhanced by denser vegetation, which reduces evaporation from the topsoil (Lange et al., 2014). In other research, Jangid et al. (2011) suggested that management history, such as long-term cultivation, is a more important determinant of the current microbial community than plant vegetation and soil properties. Also, Laganière et al. (2010) noted the importance of previous land use, selected tree species and soil texture on carbon storage in afforested, former agricultural land. Likewise Jiang-Shan et al. (2005) found a positive correlation between MBC and the soil clay fraction, although Miechówka et al. (2010) showed a negative correlation with silty loam or silty clay soils. In this study, no significant correlations between soil texture and MBC were observed. Instead, the SOC stock of the examined soils strongly correlated with MBC ($r = 0.580$, $p > 0.05$) content, which can be explained by soil microorganisms—the active components of the soil organic pool that are responsible for organic matter decomposition (Gregorich et al., 2000). The findings of this study are in agreement with those of several other works (e.g. Ekelund et al., 2001; Taylor et al., 2002) that have reported a decrease in MBC content with increasing soil depth, linked to decreased SOM content. Several studies (e.g. Gómez-Sagasti et al., 2012; Nsabimana et al., 2004) have highlighted that enzyme activity is associated with soil microbial communities, which play an essential role in many soil processes. Praveen-Kumar and Tarafdar (2003) suggested that DHA is an indicator of microorganism—especially bacterial and acinomycte—activity in the soil. However, this study suggests no statistically significant correlation between MBC and the activity of the examined enzymes (i.e. DHA and AI). Additionally, the DHA of the examined soils did not significantly vary amongst the investigated land-use variants, while in the 10–20 cm layer, an increase in DHA during the natural forest succession process was noticeable. Several studies have shown slightly or significantly higher DHA values in native forest soil than in secondary forest and reforestation soils (Bini et al., 2013), or 20-year-old regenerated forest in lower-slope mountain areas (Gamboa and Galicia, 2011), respectively. In fact, a slight increase in TOC in the 10–20 cm layer of the examined soils might support an increase in DHA during the natural forest succession process in PNP. The RDA analysis confirmed a significant correlation between TOC and DHA, which is in agreement with previous research (Skowron et al., 2010). Moreover, the DHA and AI of the investigated soils positively correlated ($r = 0.490$, $r = 0.516$, $p > 0.05$) with the available food, measured as DOC. DOC is a really important labile fraction of organic soil carbon because it plays a crucial role as an energy substrate for soil microorganisms (Marschner and Bredow, 2002). DOC in the soil comes from plant remains, root secretions, organic matter and microbial biomass (Kalbitz et al., 2000). Kobus et al. (1987) additionally suggested that the main source of invertebrate is, in fact, plant residues in the soil.

The AI of the investigated forest soils was significantly higher than

in the succession and meadow soils; this may be linked to the nature of the surface cover. Moreover, surface cover and the presence of roots increase the soil porosity and, in this study, we observed a positive correlation TP and AI. According to Speir and Ross (2002), plant materials would noticeably contribute to a rapid increase in AI. Moreover, soil invertase plays a very significant role in the hydrolysis of sucrose to glucose and fructose, which are important sources of energy for soil organisms (Gu et al., 2009); however, this study did not find any relationships between AI and MBC. Finally, several studies have suggested a positive correlation between AI and organic matter content (Ciarkowska and Sołek-Podwika, 2012; Józefowska and Miechówka, 2015), which is in line with our results.

5.4. Physical soil properties

The SOC stock, soil organic carbon (TOC and DOC) and microbial activity in the investigated soils were associated with certain physical soil properties, such as soil TP and BD. The different land-use soils showed similar soil porosity, while the volume of macropores was higher in the forest soil than in the succession and meadow soils. The volume of macropores in the forest soils may have been affected by tree roots. Yu et al. (2018) noted a positive, significant and linear correlation between root density and soil porosity. The soil porosity of the examined soils likely had a significant influence on the soil microbial activity. Pore shape and size distributions relate to chemical, biogeochemical and biological properties, such as enzyme activity (Pagliai and Vignozzi, 2002). In this study, enzyme activity and MBC content positively correlated with the volume of mesopores, which consist of both soil water and soil air. Moreover, the volume of the micropores (micropores being the places only the microbiota can access water) positively correlated with MBC. The content and availability of soil water influence the abundance and diversity of microorganisms in the soil; Nattywa et al. (2014) noted that, with increased soil moisture, the microbial biomass also increases. However, at the extremes of soil moisture, the microorganismal biomass could also decrease (Saxena, 2016).

The occurrence of microorganisms in soil is also linked with soil bulk density. According to Nattywa et al. (2014), a decreased soil bulk density facilitates greater microorganism penetration of the soil environment. However, we found no significant differences in the BD values among the studied soils, whilst Zhang et al. (2016) noted decreased soil bulk density in the secondary forest succession of abandoned farmland, associated with an increase in the abundance of soil bacterial communities, which was also not confirmed by our study.

5.5. Limitations of the experimental approach and dataset

Since the end of the 20th century, the land-use changes in PNP have been the subject of several studies, most of them focused on floristic changes. For example, Bodziarczyk et al. (1992) examined the floristic composition and structure of vegetation in areas occupied by natural forest succession. There has been a lack of research directed towards changes in the soil, which is a very important part of the environment. In this context, there needs to be a focus on studying the chemical, physical and microbiological properties of soils to provide information on the changes that occur in the soil during the natural forest succession process. To date, the literature on land-use change has focused heavily on the investigation of selected soil properties, such as organic carbon storage (DeGryze et al., 2004), microbial parameters (Mganga et al., 2016), enzyme activity (Mijangos et al., 2014) and carbon and nitrogen pools (Ross et al., 2002), unlike this study. Recently, research on land-use change has begun to incorporate different land-use variants, such as agricultural lands, forestlands and grasslands (Józefowska et al., 2016; Martín et al., 2016), or different succession phases (Bhardwaj et al., 2019). This study involved only part of the Polish Carpathians (the PNP), which could be viewed as a limitation of the dataset, although the

examined stages (meadow, succession, old-growth forest) are common land-use variants across the Carpathians. Similarly to our study, Mganga et al. (2016) investigated the common land-use systems in East Africa based on soil samples from the Mount Kilimanjaro region.

5.6. Wider landscape-scale implications

Natural forest succession is a process that is spreading through PNP and also across the Carpathian region, primarily as a result of agricultural and pastoral land abandonment. As a result, changes in the unique mountain landscape are occurring, associated with the disappearance of valuable and high-biodiversity, semi-natural mountain meadows (Tokarczyk, 2017). To date, succession has been the subject of many studies in different parts of the Carpathians (e.g. Bodziarczyk et al., 1992; Ciurzycki, 2005; Józefowska et al., 2018; Tokarczyk, 2016); however, most of these have primarily focused on plant diversity and species replacement. To address the lack of scientific knowledge on changes in the soil environment that occur during natural forest succession, this study of soil physical, chemical and biological properties was carried out. This kind of research, which took into consideration soil as a whole, will contribute to a better understanding of the natural succession process and be useful in the decision-making associated with protected mountain-area management.

Natural forest succession has been the focus of global research, especially in North and South America and Europe. Most of these studies have, however, examined tropical forest succession (e.g. Boukili and Chazdon, 2017; Xuluc-Tolosa et al., 2003), whilst papers on the succession process in Europe are less common (e.g. Nadal-Romero et al., 2016). Similarly to our study, these papers have addressed the impact of forest succession on soil properties, aimed at answering the question of whether succession can lead to a recovery of soil properties. Nadal-Romero et al. (2016) suggested that land cover has a significant effect on physical and chemical soil properties in the Mediterranean region. Moreover, they highlighted that there is no agreement in the literature in relation to the effect of succession on soil properties, especially in humid mountain areas. Thus, broad studies in different parts of world are needed to contribute to the knowledge base, and the combined results of these should be taken into account when designing the management of future abandonment areas. Thus, our study is both locally and globally important.

6. Conclusions

The natural forest succession process only slightly influences soil properties. The SOC stock in the 0–20 cm layer of mountain soils covered by old-growth forest ($50.7 \pm 10.0 \text{ Mg ha}^{-1}$) and 25-year-old succession forest ($53.1 \pm 4.8 \text{ Mg ha}^{-1}$) is slightly higher than that in soils covered by meadow ($46.4 \pm 3.6 \text{ Mg ha}^{-1}$). Moreover, the meadow soils exhibited a smaller difference in organic carbon stock between the 0–10 cm and 10–20 cm soil layers than measured in the succession and old-growth forest soils.

The type of soil cover does not affect soil microbial activity nevertheless, soil porosity favouring the growth of microorganisms. Litter accumulation and root input into old forest soil led to higher invertase activity when compared to the succession and meadow soils. Natural forest succession increases the soil porosity in the 10–20 cm layer, especially affecting the volume of macropores. Soil changes caused by natural forest succession are better captured when multiple soil properties (physical, chemical, biological) are taken into consideration.

Land-use change and the decrease in valuable and high-biodiversity, semi-natural meadow areas in the Polish Carpathians constitute a broad issue. Semi-natural meadows, which are an integral part of mountain landscapes, require extensive attention and care to maintain their biodiversity. On the other hand, the conversion of meadows into forests has an essential role in carbon sequestration over the long term. Future studies should be interdisciplinary and cover a broader research area to

include other areas of the Carpathians, in order to provide information about the benefits to, and/or losses from, the environment during landscape transformations. On the local scale, such studies may be usefully employed in the decision-making associated with managing protected areas (such as national parks).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This research was co-financed from the Forest Fund No. EZ.0290.1.17.2018 and the Ministry of Science and Higher Education of

the Republic of Poland, No. BM-4175/17 and BM-2125/18.



References

- Acosta-Martínez, V., Acosta-Mercado, D., Sotomayor-Ramírez, D., Cruz-Rodríguez, L., 2008. Microbial communities and enzymatic activities under different management in semiarid soils. *Appl. Soil Ecol.* 38, 249–260. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2007.10.012>.
- Amundson, R., Berhe, A.A., Hopmans, J.W., Olson, C., Sztein, A.E., Sparks, D.L., 2015. Soil and human security in the 21st century. *Science* 348, 647–655. <https://doi.org/10.1126/science.1261071>.
- Bhardwaj, D.R., Pal, S., Panwar, P., 2019. Changes in soil properties along a forest succession gradient in mid Himalayan region. *India. Isr. J. Plant Sci.* 66, 152–161.
- Bini, D., dos Santos, C.A., Carmo, K.B.do., Kishino, N., Andrade, G., Zangaro, W., Nogueira, M.A., 2013. Effects of land use on soil organic carbon and microbial processes associated with soil health in southern Brazil. *Eur. J. Soil Biol.* 55, 117–123. <https://doi.org/10.1016/J.EJSOBI.2012.12.010>.
- Blake, G.R., Hartge, K.H., 1986. Particle density. In: Klute, A. (Ed.), *Methods of Soil Analysis*. American Society of Agronomy, Madison, pp. 377–382.
- Bodziarczyk, J., Kucharzyk, S., Różański, W., 1992. Wtórna sukcesja roślinności leśnej na opuszczonych polanach kośnych w Pienińskim Parku Narodowym. *Pieniny – Przr. i Człowiek* 2, 25–41.
- Bodziarczyk, J., Michalciewicz, J., Szwagrzyk, J., 1999. Secondary forest succession in abandoned meadows of the Pieniny National Park. *Ekol. Pol.* 47, 209–223.
- Bodziarczyk, J., Szwagrzyk, J., Michalciewicz, J., 1996. Procesy spontanicznej renaturalizacji w Pienińskim Parku Narodowym. *Przegląd Przr.* 7, 83–94.
- Boukili, V., Chazdon, R., 2017. Environmental filtering, local site factors and landscape context drive changes in functional trait composition during tropical forest succession. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 24, 37–47. <https://doi.org/10.1016/J.PPEES.2016.11.003>.
- Braak, C.J.F., Smlauer, P., 2012. *CANOCO (version 5): Software for multivariate data exploration, testing and summarization*. Microcomput, Power, Ithaca, NY, USA.
- Cammeraat, E.L., 2005. Vegetation succession and its consequences for slope stability in SE Spain. *Plant Soil* 278, 135–147. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-5893-1>.
- Casida, L.E., Klein, D.A., Santoro, T., 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 98, 371–376.
- Ciarkowska, K., Sołek-Podwika, K., 2012. Influence of intensive vegetable cultivation in ground and under foil tunnels on the enzymatic activity of the soil. *Polish J. Environ. Stud.* 21, 1571–1575.
- Ciurzycki, W., 2005. Dynamika zarostania przez las górnoeregłowych polan popasterskich w Tatrach Polskich. *Sylwan* 2, 35–41.
- Davis, M.R., Condon, L.M., 2002. Impact of grassland afforestation on soil carbon in New Zealand: a review of paired-site studies. *Aust. J. Soil Res.* 40, 675–690. <https://doi.org/10.1071/SR01074>.
- DeGryze, S., Six, J., Paustian, K., Morris, S.J., Paul, E.A., Merckx, R., 2004. Soil organic carbon pool changes following land-use conversions. *Glob. Chang. Biol.* 10, 1120–1132. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2003.00786.x>.
- Deng, L., Zhu, G., Tang, Z., Shanguan, Z., 2016. Global patterns of the effects of land-use changes on soil carbon stocks. *Glob. Ecol. Conserv.* 5, 127–138. <https://doi.org/10.1016/J.GECCO.2015.12.004>.
- Doetterl, S., Berhe, A.A., Nadeu, E., Wang, Z., Sommer, M., Fiener, P., 2016. Erosion, deposition and soil carbon: a review of process-level controls, experimental tools and models to address C cycling in dynamic landscapes. *Earth-Sci. Rev.* 154, 102–122. <https://doi.org/10.1016/J.EARSCIREV.2015.12.005>.
- Ekelund, F., Rønn, R., Christensen, S., 2001. Distribution with depth of protozoa, bacteria and fungi in soil profiles from three Danish forest sites. *Soil Biol. Biochem.* 33, 475–481. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00188-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00188-7).
- FAO/IIASA/ISRIC/ISS-CAS/JRC, 2009. *Harmonized World Soil Database (version 1.2)*, FAO, Rome, Italy and IIASA, Laxenburg, Austria.
- Flinn, K.M., Marks, P.L., 2007. Agricultural legacies in forest environments: tree communities, soil properties, and light availability. *Ecol. Appl.* 17, 452–453. <https://doi.org/10.1890/05-1963>.
- Fontaine, S., Barot, S., Barré, P., Bdioui, N., Mary, B., Rumpel, C., 2007. Stability of organic carbon in deep soil layers controlled by fresh carbon supply. *Nature* 450, 277–280. <https://doi.org/10.1038/nature06275>.
- Frankenberger, W.T., Johanson, J.B., 1983. Factors affecting invertase activity in soils. *Plant Soil* 74, 313–323. <https://doi.org/10.1007/BF02181349>.
- Gamboa, A.M., Galicia, L., 2011. Differential influence of land use/cover change on topsoil carbon and microbial activity in low-latitude temperate forests. *Agric. Ecosyst. Environ.* 142, 280–290. <https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2011.05.025>.
- Giusquiani, P.L., Pagliani, M., Gigliotti, G., Businelli, D., Benett, A., 1995. Urban waste compost: effects on physical, chemical, and biochemical soil properties. *J. Environ. Qual.* 24, 175–182. <https://doi.org/10.2134/jeq1195.00472425002400010024x>.
- Gómez-Sagasti, M.T., Alkorta, I., Becerril, J.M., Epelde, L., Anza, M., Garbisu, C., 2012. Microbial monitoring of the recovery of soil quality during heavy metal phytoremediation. *Water. Air. Soil Pollut.* 223, 3249–3262. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1106-8>.
- Gregorich, E.G., Liang, B.C., Drury, C.F., Mackenzie, A.F., McGill, W.B., 2000. Elucidation of the source and turnover of water soluble and microbial biomass carbon in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 32, 581–587. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00146-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00146-7).
- Gu, Y., Wang, P., Kong, C.H., 2009. Urease, invertase, dehydrogenase and polyphenoloxidase activities in paddy soil influenced by allelopathic rice variety. *Eur. J. Soil Biol.* 45, 436–441. <https://doi.org/10.1016/J.EJSOBI.2009.06.003>.
- Guo, L., Gifford, R., 2002. Soil carbon stocks and land use change: a meta analysis. *Glob. Chang. Biol.* 8, 345–360. <https://doi.org/10.1046/j.1354-1013.2002.00486.x>.
- IUSS Working Group WRB, 2015. *World reference base for soil resources 2014*. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. Update 2015. *World Soil Resources Reports No. 106*. FAO, Rome.
- Jangid, K., Williams, M.A., Franzluebbers, A.J., Schmidt, T.M., Coleman, D.C., Whitman, W.B., 2011. Land-use history has a stronger impact on soil microbial community composition than aboveground vegetation and soil properties. *Soil Biol. Biochem.* 43, 2184–2193. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2011.06.022>.
- Jaworski, A., Jakubowska, D., 2011. The dynamics of changes in the structure and species composition of primary forest stands in selected areas of Pieniny National Park. *For. Res. Pap.* 72, 339–356. <https://doi.org/10.2478/v10111-011-0034-5>.
- Jiang-Shan, Z., Jian-Fen, G., Guang-Shui, C., Wei, Q., 2005. Soil microbial biomass and its controls. *J. For. Res.* 16, 327–330. <https://doi.org/10.1007/BF02858201>.
- Jobbágy, E.G., Jackson, R.B., 2000. The vertical distribution of soil organic carbon and its relation to climate and vegetation. *Ecol. Appl.* 10, 423–436. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2000\)10\[0423:TVDOSO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2000)10[0423:TVDOSO]2.0.CO;2).
- Jones, D.L., Willett, V.B., 2006. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biol. Biochem.* 38, 991–999. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2005.08.012>.
- Józefowska, A., Miechówka, A., 2015. Enzymatic activity and enchytraeids abundance in agricultural mountain soils. *Soil Sci. Annu.* 66, 133–138. <https://doi.org/10.1515/ssa-2015-0029>.
- Józefowska, A., Miechówka, A., Frouz, J., 2016. Comparison of earthworm populations in arable and grassland fields in the Outer Western Carpathians, South Poland. *Biologia* 71, 316–322. <https://doi.org/10.1515/biolog-2016-0035>.
- Józefowska, A., Zaleski, T., Zarzycki, J., Frączek, K., 2018. Do mowing regimes affect plant and soil biological activity in the mountain meadows of Southern Poland? *J. Mt. Sci.* 15, 2409–2421.
- Kabała, C., Karczewska, A., 2017. *Metodyka analiz laboratoryjnych gleb i roślin*, wydanie 8. InoGOOE, UP, Wrocław.
- Kalbitz, K., Solinger, S., Park, J.H., Michalzik, B., Matzner, E., 2000. Controls on the dynamics of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Sci.* 164, 277–304.
- Kaźmierczakowa, R., Zarzycki, J., Wróbel, I., Vončina, G., 2004. Łąki, pastwiska i zbiorowiska siedlisk wilgotnych Pienińskiego Parku Narodowego. *Stud. Natura* 49, 195–251.
- Kobus, J., Kurek, E., Czechowska, E., Słomka, A., Kulpa, D., 1987. Wpływ nawożenia organicznego na aktywność biologiczną zdegradowanej gleby lessowej. *Rocz. Glebozn.* 38, 133–141.
- Kondras, M., Czepińska-Kamińska, D., Sienicka, P., Otręba, A., Torzewski, K., Oktaba, L., 2012. The stock of organic carbon in forest soils in phytocenosis of the continental mixed coniferous forest in Kampinos National Park. *Soil Sci. Annu.* 63, 26–33. <https://doi.org/10.2478/v10239-012-0038-8>.
- Laganière, J., Angers, D.A., Paré, D., 2010. Carbon accumulation in agricultural soils after afforestation: A meta-analysis. *Glob. Chang. Biol.* 16, 439–453. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01930.x>.
- Lal, R., 2005. Forest soils and carbon sequestration. *For. Ecol. Manage.* 220, 242–258. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.08.015>.
- Lange, M., Habekost, M., Eisenhauer, N., Roscher, C., Bessler, H., Engels, C., Oelmann, Y., Scheu, S., Wilcke, W., Schulze, E.D., Gleixner, G., 2014. Biotic and abiotic properties mediating plant diversity effects on soil microbial communities in an experimental grassland. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096182>.
- Lityński, T., Jurkowska, H., Goriach, E., 1976. *Chemical-agricultural Analysis*. PWN.
- MacDonald, D., Crabtree, J.R., Wiesinger, G., Dax, T., Stamou, N., Fleury, P., Gutierrez Lazpita, J., Gibon, A., 2000. Agricultural abandonment in mountain areas of Europe: environmental consequences and policy response. *J. Environ. Manage.* 59, 47–69. <https://doi.org/10.1006/jema.1999.0335>.
- Marschner, B., Bredow, A., 2002. Temperature effects on release and ecologically relevant properties of dissolved organic carbon in sterilised and biologically active soil samples. *Soil Biol. Biochem.* 34, 459–466. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00203-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00203-6).
- Martín, J.A., Álvaro-Fuentes, J., Gonzalo, J., Gil, C., Ramos-Miras, J.J., Grau Corbí, J.M.,

- Boluda, R., 2016. Assessment of the soil organic carbon stock in Spain. *Geoderma* 264, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.10.010>.
- Mganga, K.Z., Razavi, B.S., Kuzyakov, Y., 2016. Land use affects soil biochemical properties in Mt. Kilimanjaro region. *CATENA* 141, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.02.013>.
- Miechówka, A., Gąsiorek, M., Józefowska, A., Zadrozny, P., 2010. Effect of soil management method on the content of microbial biomass carbon in soils of Śląskie and Ciężkowickie foothills. *Rocz. Glebozn. LXI* 164–170.
- Mijangos, I., Epelde, L., Garbisu, C., González-Oreja, J.A., 2014. Modification of soil enzyme activities as a consequence of replacing meadows by pine plantations under temperate climate. *Pedobiologia (Jena)* 57, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2013.12.006>.
- Moghimi, N., Hosseini, S.M., Kooch, Y., Darki, B.Z., 2017. Impacts of changes in land use/cover on soil microbial and enzyme activities. *CATENA* 157, 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.06.003>.
- Murty, D., Kirschbaum, M.U.F., Mcmurtrie, R.E., Mcgilvary, H., 2002. Does conversion of forest to agricultural land change soil carbon and nitrogen? A review of the literature. *Glob. Chang. Biol.* 8, 105–123. <https://doi.org/10.1046/j.1354-1013.2001.00459.x>.
- Nadal-Romero, E., Cammeraat, E., Pérez-Cardiel, E., Lasanta, T., 2016. Effects of secondary succession and afforestation practices on soil properties after cropland abandonment in humid Mediterranean mountain areas. *Agric. Ecosyst. Environ.* 228, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.05.003>.
- Nair, P.K.R., Nair, V.D., Kumar, B.M., Haile, S.G., 2009. Soil carbon sequestration in tropical agroforestry systems: a feasibility appraisal. *Environ. Sci. Policy* 12, 1099–1111. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2009.01.010>.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Biol.* 54, 655–670. <https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x>.
- Natywa, M., Selwet, M., Maciejewski, T., 2014. Wpływ wybranych czynników agrotechnicznych na liczebność i aktywność drobnoustrojów glebowych 31, 56–63.
- Niemyska-Lukaszuk, J., Miechówka, A., Zaleski, T., 2002. The soils of Pieniny National Park and their threats. *Pieniny – Przry. i Człowiek* 90, 79–90.
- Nsibimana, D., Haynes, R.J., Wallis, F.M., 2004. Size, activity and catabolic diversity of the soil microbial biomass as affected by land use. *Appl. Soil Ecol.* 26 (2), 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2003.12.005>.
- Pagliai, M., De Nobili, M., 1993. Relationships between soil porosity, root development and soil enzyme activity in cultivated soils. *Soil Struct. Biota Interrelat.* 243–256. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-81490-6.50024-8>.
- Pagliai, M., Vignozzi, N., 2002. The soil pore system as an indicator of soil quality. In: Pagliai, M., Jones, R. (Eds.), *Sustainable Land Management - Environmental Protection - a Soil Physical Approach*. Catena Verlag, Reiskirchen, Germany, pp. 71–82.
- Perzanowska, J., 2004. Climate of the Pieniny Mountains. *Stud. Naturae* 49, 21–32.
- Poelau, C., Don, A., 2013. Sensitivity of soil organic carbon stocks and fractions to different land-use changes across Europe. *Geoderma* 192, 189–201. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.08.003>.
- Post, W.M., Kwon, K.C., 2000. Soil carbon sequestration and land-use change: processes and potential. *Glob. Chang. Biol.* 6, 317–327. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2000.00308.x>.
- Praveen-Kumar, Tarafdar, J.C., 2003. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as a electron acceptor of culturable soil bacteria, fungi and actinomycetes. *Biol. Fertil. Soils* 38 (3), 186–189. <https://doi.org/10.1007/s00374-003-0600-y>.
- Ren, C., Zhao, F., Kang, D., Yang, G., Han, X., Tong, X., Feng, Y., Ren, G., 2016. Linkages of C:N: P stoichiometry and bacterial community in soil following afforestation of former farmland. *For. Ecol. Manage.* 376, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.06.004>.
- Ross, D.J., Tate, K.R., Scott, N.A., Wilde, R.H., Rodda, N.J., Townsend, J.A., 2002. Afforestation of pastures with *Pinus radiata* influences soil carbon and nitrogen pools and mineralisation and microbial properties. *Soil Res.* 40, 1303–1318. <https://doi.org/10.1071/SR02020>.
- Saxena, N., 2016. Methods for elucidating microbial biomass. *Int. J. Appl. Sci.* 03, 375–387. <https://doi.org/10.21013/jas>.
- Schoenholtz, S., Miegroet, H.V., Burger, J., 2000. A review of chemical and physical properties as indicators of forest soil quality: challenges and opportunities. *For. Ecol. Manage.* 138, 335–356. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00423-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00423-0).
- Sicardi, M., García-Préchar, F., Frioni, L., 2004. Soil microbial indicators sensitive to land use conversion from pastures to commercial *Eucalyptus grandis* (Hill ex Maiden) plantations in Uruguay. *Appl. Soil Ecol.* 27, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.05.004>.
- Silver, W.L., Ostertag, R., Lugo, A.E., 2000. The potential for carbon sequestration through reforestation of abandoned tropical agricultural and pasture lands. *Restor. Ecol.* 8, 394–407. <https://doi.org/10.1046/j.1526-100x.2000.80054.x>.
- Six, J., Conant, R.T., Paul, E.A., Paustian, K., 2002. Stabilization mechanisms of SOM implications for C saturation of soils. *Plant Soil* 241, 155–176. <https://doi.org/10.1023/A:1016125726789>.
- Six, J., Elliott, E., Paustian, K., 2000. Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under no-tillage agriculture. *Soil Biol. Biochem.* 32, 2099–2103. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00179-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00179-6).
- Skowron, A., Miechówka, A., Zadrozny, P., 2010. Impact of the way of land use on dehydrogenase activity in the soils of the silesian foothills. *Ecol. Chem. Eng.* 17 (10), 1309–1313.
- Speir, T.W., Ross, D.J., 2002. Hydrolytic enzyme activities to assess soil degradation and recovery. In: Burns, R., Dick, R.P. (Eds.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*. CRC Press, pp. 407–432.
- Szwagrzyk, J., 2004. Sukcesja leśna na gruntach porolnych; stan obecny, prognozy i wątpliwości. *Sylwan* 4, 53–59.
- Taylor, J., Wilson, B., Mills, M., Burns, R., 2002. Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. *Soil Biol. Biochem.* 34, 387–401. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00199-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00199-7).
- Tokarczyk, N., 2017. Forest encroachment on temperate mountain meadows – scale, drivers, and current research directions. *Geogr. Pol.* 90, 463–480. <https://doi.org/10.7163/gpol.0112>.
- Tokarczyk, N., 2016. Overgrowing of montane glades in the Polish Carpathians in the light of the existing research. *Chrońmy Przry. Ojcz.* 71 (4), 243–256.
- van Hall, R.L., Cammeraat, L.H., Keesstra, S.D., Zorn, M., 2017. Impact of secondary vegetation succession on soil quality in a humid Mediterranean landscape. *Catena* 149, 836–843. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.05.021>.
- Vesterdal, L., Ritter, E., Gundersen, P., 2002. Change in soil organic carbon following afforestation of former arable land. *For. Ecol. Manage.* 169, 137–147. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(02\)00304-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(02)00304-3).
- Voroney, P., Brookes, P.C., Beyaert, R.P., 2007. Soil microbial biomass C, N P and S. In: Carter, M.R., Gregorich, E. (Eds.), *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Lewis Publ, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 637–642.
- Wanic, T., Bodziarczyk, J., Gąsiorek, M., Hawryło, P., Józefowska, A., Kajdas, B., Mazurek, R., Szostak, M., Usień, M., Wężyk, P., Zadrozny, P., Zięba-Kulawik, K., Zaleski, T., 2017. Trophic conditions of forest soils of the Pieniny National Park, southern Poland. *Soil Sci. Annu.* 68, 205–211. <https://doi.org/10.1515/ssa-2017-0026>.
- Wiesmeier, M., Spörlein, P., Geuß, U., Hangen, E., Haug, S., Reischl, A., Schilling, B., von Lützwow, M., Kögel-Knabner, I., 2012. Soil organic carbon stocks in southeast Germany (Bavaria) as affected by land use, soil type and sampling depth. *Glob. Chang. Biol.* 18, 2233–2245. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02699.x>.
- Witkowski, Z.J., 2003. Animals of the Pieniny National Park, their endangerment and conservation. *Pieniny- Przry. i Człowiek* 8, 71–82.
- Wolski, J., 2009. Trwałość krajobrazu wiejskiego na przykładzie przekształceń zbiorowisk roślinnych bieszczadzkiej, krainy dolin ” w ciągu ostatnich 150 lat. *Chrońmy Przry. Ojczystą* 65, 441–448.
- Xuluc-Tolosa, F.J., Vester, H.F.M., Ramirez-Marcial, N., Castellanos-Albores, J., Lawrence, D., 2003. Leaf litter decomposition of tree species in three successional phases of tropical dry secondary forest in Campeche, Mexico. *For. Ecol. Manage.* 174, 401–412. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(02\)00059-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(02)00059-2).
- Yakovchenko, V., Sikora, L.J., Kaufman, D.D., 1996. A biologically based indicator of soil quality. *Biol. Fertil. Soils* 21, 245–251. <https://doi.org/10.1007/BF00334899>.
- Yu, B., Xie, C., Cai, S., Chen, Y., Lv, Y., Mo, Z., Liu, T., Yang, Z., 2018. Effects of tree root density on soil total porosity and non-capillary porosity using a ground-penetrating Tree Radar Unit in Shanghai, China. *Sustainability* 10, 4640. <https://doi.org/10.3390/su10124640>.
- Zaleski, T., Bodziarczyk, J., Wężyk, P., Gąsiorek, M., Hawryło, P., Józefowska, A., Kajdas, B., Mazurek, R., Szostak, M., Wanic, T., Zadrozny, P., Zięba-Kulawik, K., 2018. Wpływ naturalnej sukcesji leśnej na właściwości gleb w strefie ekotonowej (między lasem i łąką) w Pienińskim Parku Narodowym – wstępne wyniki badań 20, 3–20.
- Zaleski, T., Mazurek, R., Gąsiorek, M., Wanic, T., Zadrozny, P., Józefowska, A., Kajdas, B., 2016. Soils of the forest monitoring areas in the Pieniny National Park. *Pieniny – Przry. i Człowiek* 14, 3–15.
- Zhang, C., Liu, G., Xue, S., Wang, G., 2016. Soil bacterial community dynamics reflect changes in plant community and soil properties during the secondary succession of abandoned farmland in the Loess Plateau. *Soil Biol. Biochem.* 97, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.02.013>.

mgr inż. Justyna Sokółowska
Katedra Gleboznawstwa i Agrofizyki
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

Kraków, 23.06.2022 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Sokółowska J., Józefowska A., Woźnica K., Zaleski T. 2020. *Succession from meadow to mature forest: Impacts on soil biological, chemical and physical properties—Evidence from the Pieniny Mountains, Poland*. Catena Vol. 189, 104503. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104503> mój udział polegał na:

- opracowaniu założeń prowadzonych badań
- wykonywaniu prac terenowych
- doborze metodyki prac laboratoryjnych
- przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych
- opracowaniu i interpretacji wyników
- opracowaniu tabel i rycin
- przygotowaniu manuskryptu
- pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego
- poprawie pracy po recenzjach.

Mój udział w publikacji wyniósł 60 %.

Justyna Sokółowska

.....
podpis

dr hab. inż. Agnieszka Józefowska, prof. URK
Katedra Gleboznawstwa i Agrofizyki
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

Kraków, 23.06.2022 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Sokołowska J., Józefowska A., Woźnica K., Zaleski T. 2020. *Succession from meadow to mature forest: Impacts on soil biological, chemical and physical properties—Evidence from the Pieniny Mountains, Poland*. *Catena* Vol. 189, 104503. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104503> mój udział polegał na:

- opracowaniu założeń prowadzonych badań
- wykonywaniu prac terenowych
- doborze metodyki prac laboratoryjnych
- wykonaniu analiz statystycznych
- nadzorowaniu poprawnej interpretacji wyników
- poprawie pracy po recenzjach.

Mój udział w publikacji wyniósł 20 %.


podpis

mgr inż. Karolina Woźnica
Katedra Gleboznawstwa i Agrofizyki
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

Kraków, 23.06.2022 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Sokołowska J., Józefowska A., Woźnica K., Zaleski T. 2020. *Succession from meadow to mature forest: Impacts on soil biological, chemical and physical properties—Evidence from the Pieniny Mountains, Poland*. *Catena* Vol. 189, 104503. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104503> mój udział polegał na:

- wykonywaniu prac terenowych
- przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych.

Mój udział w publikacji wyniósł 5 %.

.....
Karolina Woźnica.....
podpis

dr hab. inż. Tomasz Zaleski, prof. URK
Katedra Gleboznawstwa i Agrofizyki
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków


Kraków, 23.06.2022 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Sokołowska J., Józefowska A., Woźnica K., Zaleski T. 2020. *Succession from meadow to mature forest: Impacts on soil biological, chemical and physical properties—Evidence from the Pieniny Mountains, Poland*. *Catena* Vol. 189, 104503. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104503> mój udział polegał na:



- nadzorowaniu opracowania założeń prowadzonych badań
- wyborze powierzchni badawczych
- wykonywaniu prac terenowych
- nadzorowaniu poprawnej interpretacji wyników.


Mój udział w publikacji wyniósł 15 %.



.....
podpis

Original Article

Humus horizon development during natural forest succession process in the Polish Carpathians

Justyna SOKOŁOWSKA*  <https://orcid.org/0000-0002-6816-9342>;  e-mail: justyna.sokolowska@student.urk.edu.pl

Agnieszka JÓZEFOWSKA  <https://orcid.org/0000-0003-4922-2037>; e-mail: agnieszka.jozefowska@urk.edu.pl

Tomasz ZALESKI  <https://orcid.org/0000-0002-9785-3784>; e-mail: tomasz.zaleski@urk.edu.pl

*Corresponding author

Department of Soil Science and Agrophysics, University of Agriculture in Krakow, al. Mickiewicza 21 31-120 Kraków, Poland

Citation: Sokółowska J, Józefowska A, Zaleski T (2022) Humus horizon development during natural forest succession process in the Polish Carpathians. Journal of Mountain Science 19(3). <https://doi.org/10.1007/s11629-021-6836-x>

© The Author(s) 2022.

Abstract: As a result of socio-economic changes and land abandonment, the main ecological driver of the Carpathian landscape is the progression of the natural forest succession process. Thus, aspects of this process have become worthy of attention, especially in the context of carbon sequestration and the management of protected areas. Soil processes, especially within the topsoil, are some of the most susceptible to change, due to the accumulation of organic matter during such land-use transformations. The purposes of this study were to investigate the differences in topsoil development using the A Horizon Development Index (ADI) and to study the composition of humic substances and advanced organic matter humification in different land-use areas in selected Carpathian national parks, i.e. Bieszczady, Magura and Pieniny National Parks in southern Poland. Additionally, a goal of this study was to compare the ADI and the spectroscopic coefficients of humic substances as indicators of the degree of humus horizon shaping as well as advanced organic matter humification. In total, ten transects were selected, each consisting of three different land-use areas: semi-natural meadow, successional forest and

old-growth forest. Soil colour was determined in fresh and air-dried samples using the Munsell colour chart. In air-dried soil samples pH, soil texture, total organic carbon and total nitrogen were measured. Humic substances were extracted and further characterized by UV-VIS spectroscopy. The ADI confirmed the influence of natural forest succession on soil colour darkening and the development of the uppermost soil layer. Spectroscopic analyses of humic substances showed two different patterns depending on soil depth. In the 0–10 cm layer, natural forest succession reduced the rate of the humification process and decreased the degree of maturity of fulvic acids; in the 10–20 cm layer, it led to an increase in the rate of the humification process and a decrease in the content of humic and fulvic acids at the beginning of the transformation. The comparison of two different indicators of soil development – the ADI and the spectroscopic coefficients of humic substances ($Q_{4/6}$, $Q_{2/4}$, $Q_{2/3}$, $\Delta \log K$) – indicated that these indexes are based on different features of soil and cannot be used interchangeably.

Keywords: Land use changes; Natural forest succession; Polish Carpathians; Landscape transformation; Protected areas management; Humic substances

Received: 09-Apr-2021

1st Revision: 10-Aug-2021

2nd Revision: 20-Oct-2021

Accepted: 05-Dec-2021

1 Introduction

Originally, the Carpathians were covered with primary forests. Settlement in these virgin areas of the mountains led to the formation of semi-natural meadows in an initial transformation of the landscape. In the Polish part of the Carpathians, this was related to agriculture, especially the pasture practices of Italian immigrants in the area in the 13th and 14th centuries (Kubijowicz 1927). Later, sheep herding developed in this area; initially, this activity only involved grazing. The development of hay meadows took place in the 18th century; however, a significant rise of pasture activity in the Carpathians was noted from the 19th century to the first half of the 20th century (Hejman et al. 2012). After World War II and the related socio-economical changes, the abandonment of agricultural land initiated plant succession processes and a reduction in the area of the semi-natural meadows (Zarzycki and Korzeniak 2013), and encroachment of secondary forests to their original territory began to change the unique Carpathian landscape again.

Nowadays, the natural forest succession process is an important ecological driver in the Carpathian landscape as well as a major factor that causes the disappearance of highly ecologically valuable semi-natural meadows. Previous studies in the Pieniny National Park have shown that forest succession influences chemical, physical and microbiological soil properties to a slight extent (Sokołowska et al. 2020). However, a deeper look at morphological features may be a simpler way to assess changes in the soil environment without time-consuming laboratory analyses. Soil colour is one of the most commonly assessed features of soil morphology (Buol et al. 2003) and may be an indicator of various other soil properties, although so far, soil colour has been used mostly as an indicator of soil organic carbon (SOC) content in the literature (Konen et al. 2003; Wills et al. 2007).

In soil science, the Munsell colour chart (Oyama and Takehara 1970) is commonly used to determine soil colour. Significant relationships were observed between SOC concentration of intensively farmed soils and the Munsell value and the Munsell chroma measured for moist and air-dried soils (Konen et al. 2003). As noted above, the relationship between soil colour and soil organic matter (SOM) or SOC content is well known; however, in some studies other factors

that influence soil colour have been assessed. Novák et al. (2018) have shown some positive correlations between the colour index and soil texture, as well as a negative relation between the colour index and calcium content and also pH. Aitkenhead et al. (2013), using a dataset derived from the National Soil Inventory of Scotland database, determined the relationships between soil colour and a range of physical and chemical soil characteristics. Recently, a new approach of using an inexpensive colour sensor was used to develop SOC and total nitrogen predictions for Russian Chernozems (Mikhailova et al. 2017).

Soil colour measurement has also been used in the investigation of urban soils. Mazurek et al. (2016) determined the stabilization of organic matter (OM) by calculating the A Horizon Development Index (ADI), based on the Munsell value and Munsell chroma of the soil colour. Also, Wills et al. (2007) predicted SOC content using soil colour measurement and presented a simple linear regression of SOC with soil depth, Munsell value and Munsell chroma. Thus, so far soil colour has been widely used to assess various soil properties, but mostly in agricultural or urban ecosystems. Further studies are needed to explore the differences in properties and associations of soil colour for other land uses (Wills et al. 2007). The present study focused on soils undergoing natural environmental processes, i.e. natural forest succession in protected areas such as nature preserves, to contribute to a wider knowledge about using soil colour as a valid descriptive feature in soil science.

It is well known that SOM is a crucial factor in soils, determining soil properties as well as playing a very important role in the development of the soil ecosystem. Organic matter is one of the basic soil pigments, colouring soils black (Vodyanitskii and Savichev 2017). Viscarra Rossel et al. (2006) have shown that the darkening of soils rich in organic carbon is caused by saturated OM, the variation and quantity of black humic acid, as well as soil moisture. Regarding the OM, a very important role is played by polymolecular and polydispersion compounds of polyelectrolytes and spherocolides, called humic substances (Gonet 1993; Hayes and Swift 2001; Kononowa 1968).

Some papers have highlighted the role of humic substances in soil colour. According to Lindbo et al. (1998), the composition of humic substances is one of the factors influencing the degree of soil darkening. Vodyanitskii and Kirillova (2016) highlighted that the

pigmenting ability of humic acids is greater than that of fulvic acids. Thus, changes in soil colour during natural forest succession could be provoked by humic substance composition as well as changes in humic substance structure.

One broadly used method to assess changes in humic substances caused by environmental factors is absorption spectrophotometry in the UV-visible (UV-VIS) range. This method allows qualitative analyses of humic substances (Gołębiewska 2004); moreover, appropriate analysis of UV-VIS spectra may provide very interesting information on the chemical structure of humic substances (Kumada 1987; Stevenson 1994). The $Q_{4/6}$, $Q_{2/4}$, $Q_{2/3}$ and $\Delta \log K$ are the most common coefficients calculated from the results of absorption spectrophotometry in the UV-VIS range. The $Q_{4/6}$ is considered as an indicator of humus quality and humification degree (Pospíšilová et al. 2014). According to Orlov (1983), higher $Q_{4/6}$ values show a lower molecular weight and lower degree of condensation of aromatic structures. The $Q_{2/4}$ coefficient reflects the proportion between lignins and other materials at the beginning of humification as well as the content of materials at the beginning of transformation stage (Erraji et al. 2017). The $Q_{2/3}$ indicates the degradation of humic substance structures; higher $Q_{2/3}$ values reflect a higher degree of degradation (Gołębiewska 2004). Finally, the $\Delta \log K$ indicates the level of humic substance maturity (Wnuk et al. 2020).

Humic substances, based on their solubility, are divided into humic acids (HA), which are non-soluble at low pH (<2); fulvic acids (FA), which are soluble at acidic and alkaline conditions; and humins, which are non-soluble in both acidic and alkaline conditions. To better understand the nature of humic substances, Mohinuzzaman et al. (2020) examined different methods for humic substance extraction from soils from varying land uses and provided useful information about labile and insoluble humic substance fractions. Moreover, Mohinuzzaman et al. (2020) and Mostofa et al. (2019) studied the fluorescence features of humic acids and fulvic acids, which are very useful for a better understanding of biochemical transformations and consequences in diverse soil environments.

Humic substances have been considered as a suitable soil fraction to provide information about SOC levels in environmental studies (Jiménez-González et al. 2020). As stated by Sun et al. (2012),

changes in land use can alter the chemical composition of humic substances despite their resistant nature to biological degradation. Kukułs et al. (2019) examined the influence of land afforestation on humic substances and saw a gradual decrease in the ratio of carbon of humic acids and fulvic acids ($C_{HA}:C_{FA}$) after land-use changes. Several studies (Panettieri et al. 2014; Tadini et al. 2015) have especially highlighted the role of humic acids as including molecular components of plant and microbial origin and showing their different compositions in various soils. So far, humic substances have been the object of study around the world, e.g. in Europe in arable lands and grasslands (Ukalska-Jaruga et al. 2019) and afforested agricultural lands in the boreal-nemoral ecotone (Kukułs et al. 2019); in Asia (Navarrete et al. 2010); as well as in South America (Zalba et al. 2016). Zhiyanski et al. (2017) examined the effects of management intensity and different land uses on quantitative and qualitative features of soil humic and highlighted the importance of such research in mountain ecosystems.

However, changes in humic substance composition during the natural forest succession process are still unknown. Therefore, this study investigated how the content and composition of humic substances may be altered during natural forest succession, extending the knowledge about soil changes during land-use change, especially topsoil, which is the most susceptible to changes due to the short-term accumulation of various kinds of OM. In meadows, for instance, topsoil incorporates easily decomposed grass and herbaceous plants; in successional forests, fresh litterfall from young trees; and in old-growth forest – a climax stage – a constant supply of fresh litter, and these should be mirrored as changes in soils resulting from different land uses.

The purpose of this study was to test the following hypotheses:

- 1) Natural forest succession influences topsoil development, as expressed by ADI values.
- 2) The composition of humic substances varies in soils from different land uses (semi-natural meadow, successional forest, old-growth forest) and soil layers (0–10 and 10–20 cm).
- 3) Advanced OM humification differs between land uses and the examined soil layers (0–10 and 10–20 cm).
- 4) The ADI and UV-VIS spectroscopic coefficients are suitable and comparable indicators to

determine the degree of humus horizon shaping as well as advanced OM humification.

2 Materials and Methods

The research was conducted in the Polish Carpathians, southern Poland. The soil samples were taken from three Carpathian national parks – Bieszczady National Park (BdNP), Magura National Park (MNP) and Pieniny National Park (PNP) (Table 1). The precise characteristics of these sites with particular attention to soil cover were presented in previous studies: BdNP (Skiba 1999), MNP (Skiba and Drewnik 2000) and PNP (Niemyska-Lukaszuk et al. 2002). In total, ten transects, each consisting of three different land-use areas: 1) semi-natural meadow, 2) successional forest covered by different aged (25- to 75-year-old) trees and 3) old-growth forest (aged more than 150 years), were selected. Table 1 shows the precise GPS location as well as elevation and slope of the investigated succession areas, while the nearest meadows and forests adjacent to the selected succession area were also assessed. The transects were selected based on historical data as well as historical maps, available present-day satellite maps (<https://geoportal360.pl/>) and database (<https://www.bdl.lasy.gov.pl>) covering the study area. The semi-natural meadows were created

in the 13th and 14th centuries as a result of tree cutting and maintained by pasture and agriculture. They are formed mostly by native species which have spread across the landscape (Zarzycki and Korzeniak 2013). The natural forest succession areas were created as a result of encroachment of successional plants on abandoned semi-natural meadows. They contain tree species such as *Acer pseudoplatanus* L. (sycamore maple), *Betula pendula* Roth (silver birch), *Populus tremuloides* Michx. (aspen poplar), *Picea abies* L. (Norway spruce), *Alnus incana* L. (grey alder), *Pinus sylvestris* L. (Scots pine), *Abies alba* Mill. (silver fir) and *Fraxinus excelsior* L. (common ash) dominated by of *Fagus sylvatica* L. (common beech). The old-growth forest stands belonged to one of the most common forest habitats in the Carpathians - *Dentario glandulosae-Fagetum* (Carpathian beech forest). Example photographs of the semi-natural meadow, natural successional forest and old-growth forest plots are provided as Appendix 1.

After removing fresh leaf fall from the surface, soil samples were collected using a metal 5 cm diameter core (Appendix 2) from the 0–20 cm layer of soil. Then the soil core was divided into two layers, 0–10 cm and 10–20 cm. The soil cores were collected from all ten transects (Table 1) in five repetitions from each of semi-natural meadow, successional forest and old-growth forest area. Soil colour was determined in fresh and air-dried samples using the Munsell colour chart

Table 1 Location of the three study areas, along with topographical (elevation, slope) and climatic conditions (temperature, rainfall, climate classification)

Location		GPS coordinates of the transects	Elevation (m asl)	Slope (°)	Mean annual		Climate
					Temperature (°C)	Rainfall (mm)	
Eastern Outern Carpathians	Bieszczady National Park (BdNP)	1. 49°06'20" N 22°43'48" E	1,124	20	4.0-6.0 (Nowosad 1995)	1,000-1,300 (Obrębska-Starkłowa et al. 1995)	Moderately cool (Nowosad 1995)
		2. 49°07'45" N 22°35'37" E	930	12			
		3. 49°06'52" N 22°34'14" E	1,162	15			
		4. 49°03'17" N 22°41'18" E	803	5			
Western Outern Carpathians	Magura National Park (MNP)	1. 49°27'46" N 21°29'05" E	550	6	5.0 (Stępień-Sałek 2004)	800-900 (Stępień-Sałek 2004)	Moderately warm and moderately cool (Obrębska-Starkłowa et al. 1995)
		2. 49°26'25" N 21°29'56" E	673	10			
		3. 49°28'48" N 21°25'14" E	542	3			
Western Intern Carpathians	Pieniny National Park (PNP)	1. 49°25'35" N 20°25'31" E	669	11	3.9-6.3 (Perzanowska 2004)	690-850 (Perzanowska 2004)	Moderately warm and moderately cool (Perzanowska 2004)
		2. 49°25'29" N 20°25'11" E	671	15			
		3. 49°25'49" N 20°19'38" E	575	4			

(Oyama and Takehara 1970). Based on the wet and dry soil colour – i.e. the value and chroma in the individual soil layers (0–10 cm and 10–20 cm) – the ADI was calculated according to the following equation:

$$ADI = \frac{\text{horizon thickness}}{V \times C} + 1, \quad (1)$$

where *V* is Munsell value and *C* is Munsell chroma (Mazurek et al. 2016).

In our study, each of the examined layers was 10 cm thick, so the ADI values in this case indicated only the differences in soil colour and did not depend on soil layer thickness. The extraction of humic substances (humic and fulvic acids) was performed in air-dried soil samples, sieved with a mesh size of 2 mm, using the procedure recommended by the International Humic Substance Society (Tan 2005). The extraction of humic substances was performed on three replicates from each collected soil sample. The carbon from the mixture of humic substances (the sum of humic and fulvic acids C_{HA+FA}) was extracted in an alkaline solution (0.1 M NaOH) for 4 hours. The carbon of humic acids (C_{HA}) was precipitated and separated after acidification of humic substances solution by 6 M H_2SO_4 to pH = 1.5, and next diluted in 0.1 M $NaHCO_3$. The carbon of fulvic acids (C_{FA}) were obtained as a supernatant after separation from the humic acids. The content of organic carbon in obtained solutions of humic substances was measured using a Euro Thermo TOC-TN 1200 (Landsmeer, Netherlands). The non-extractable organic carbon (C_{NE}), defined as the humins, was calculated by the difference between total organic carbon (C_{org}) and C_{HA+FA} .

The obtained C_{HA} and C_{FA} solutions were further characterized by UV-VIS spectroscopy, using a

Shimadzu UV-1800 (Kyoto, Japan) spectrophotometer UV-VIS. Based on the measured absorption spectra the following coefficients were calculated: 1) $Q_{4/6}$ representing the quotient of absorbance values at wavelengths 400 nm and 600 nm (Schnitzer and Khan 1972); 2) $Q_{2/4}$ expressing of absorbance values at wavelengths 280 nm and 400 nm (Gonet and Dębska 1998); 3) $\Delta \log K$ calculated following the equation:

$$\Delta \log K = \log K_{400nm} - \log K_{600nm}, \quad (2)$$

where *K* is absorbance value at 400 nm and 600 nm (Kumada 1987); and 4) $Q_{2/3}$, expressed as a ratio of absorbance values at wavelengths 250 nm and 365 nm (Suhett et al. 2004).

Additionally, in the air-dried soil samples, soil properties of two replicates for each soil sample were measured such as: pH in 1 M KCl (in the 1:2.5 ratio) by the potentiometer method, using combined electrode Hydromet type ERH-12-6 (Gliwice, Poland); soil texture (sand, silt, clay) according to the Casagrande–Prószyński aerometer method; total organic carbon (C_{org}) content using the Tiurin method (Kabała and Karczewska 2017); and total nitrogen (N_{tot}), using a FOSS Kjeltec™ 8100 (Höganäs, Sweden) (Lityński et al. 1976). Investigated soils were classified according to the World Reference Base (IUSS Working Group WRB 2015). Almost all soils, except for two, were classifiable as cambisols with a varied trophicity (dystric and eutric cambisols) (Table 2). The other two soils were classified as leptosols with a not-fully-shaped cambic horizon.

Statistical analyses were performed using Statistica 13.0 software. Means and standard errors of the various measured properties were calculated for

Table 2 Soil units at the area of the transects according to World Reference Base for Soil Resources (WRB) classification (IUSS Working Group WRB 2015).

Study site	Number of transect	Land use		
		Meadow	Succession	Forest
BdNP	1	Dystric Endoskeletal Endostagnic Cambisols	Dystric Endoskeletal Cambisols	Dystric Leptic Skeletic Cambisols
	2	Dystric Endoskeletal Amphistagic Cambisols	Dystric Endoskeletal Cambisols	Dystric Cambic Skeletic Leptosols
	3	Dystric Skeletic Epistagnic Cambisols	Dystric Skeletic Cambisols	Dystric Endoskeletal Leptic Cambisols
	4	Eutric Cambisols	Dystric Endoskeletal Cambisols	Dystric Skeletic Cambisols
MNP	1	Eutric Endoskeletal Cambisols	Eutric Skeletic Cambisols	Dystric Skeletic Cambisols
	2	Dystric Skeletic Cambisols	Dystric Endoskeletal Cambisols	Dystric Cambisols
	3	Eutric Skeletic Cambisols	Dystric Endoskeletal Cambisols	Eutric Skeletic Cambisols
PNP	1	Eutric Endoskeletal Cambisols	Eutric Endoskeletal Cambisols	Eutric Skeletic Cambisols
	2	Eutric Endoskeletal Cambisols	Eutric Cambic Leptosols	Eutric Endoskeletal Cambisols
	3	Eutric Cambisols	Endoeutric Cambisols	Endoeutric Cambisols

Notes: BdNP – Bieszczady National Park; MNP – Magura National Park; PNP – Pieniny National Park.

the individual land use (semi-natural meadow, successional forest and old-growth forest) for both the 0–10 cm and 10–20 cm soil layers. An ANOVA Kruskal–Wallis test, at a significance level of $p < 0.05$, was used to examine the effect of land use and location on basic soil properties. The contents of carbon humus fractions and calculated coefficients were used to test for significant differences among the different land use variables and soil layers, using an ANOVA Kruskal–Wallis rank test at a significance level $p < 0.05$.

Additionally, Principal Component Analysis (PCA) and Redundancy Analysis (RDA), using the Cannoco 5.12 program (Braak & Smilauer 2012), were performed for selected coefficients and soil properties over the entire 0–20 cm layer. In the PCA diagram, only variables that were significant at $p < 0.02$ according to a Monte Carlo permutation test with 499 random permutations (Table 3) were included.

Table 3 Redundancy analysis (RDA) showing the main trends in the data set and indicating the approximate direction of soil variable effects.

Name	Variation explained (%)	pseudo-F	<i>p</i>
C _{HA}	49.0	26.9	0.002
C _{HA+FA}	47.2	25.1	0.002
C _{FA}	39.4	18.2	0.002
Q _{2/3} _FA	38.1	17.3	0.002
C _{org}	38.0	17.2	0.006
clay	34.6	14.8	0.002
Q _{4/6} _FA	26.2	10.0	0.002
Q _{2/4} _FA	21.8	7.8	0.012
C:N	20.6	7.3	0.012

Notes: Analysis RDA selected only variables that were significant at $p < 0.05$ according to a Monte Carlo permutation test with 499 random permutations.

C_{HA} – carbon of humic acids; C_{HA+FA} – carbon of humic acids and fulvic acids; C_{FA} – carbon of fulvic acids; Q_{2/3}_FA – quotient of the absorbance measured at 250 nm and 365 nm wavelengths measured for fulvic acids; C_{org} – total organic carbon; Q_{4/6}_FA – quotient of the absorbance measured at 400 nm and 600 nm wavelengths measured for fulvic acids; Q_{2/4}_FA – quotient of the absorbance measured at 280 nm and 400 nm wavelengths measured for fulvic acids; C:N – organic carbon and total nitrogen ratio.

3 Results

The soils of meadow, successional forest and old-growth forest in selected national parks had slightly different properties (Table 4). The highest C_{org} content characterized the soils of BdNP. The content of C_{org} in

BdNP compared to MNP and PNP in the 0–10 cm layer were higher, about 36 g kg⁻¹ and 29 g kg⁻¹ in the meadow, 32 g kg⁻¹ and 23 g kg⁻¹ in the successional forest and 28 g kg⁻¹ and 24 g kg⁻¹ in the old-growth forest, respectively. While in the 10–20 cm the differences between the content of C_{org} in BdNP and MNP and PNP were less than 20 g kg⁻¹ for all land uses. Overall, the 0–10 cm layer had higher C_{org} compared to the 10–20 cm layer in all national park soils; however, significant differences only in the successional forest soils were noted (Table 4). The highest content of N_{tot} was found in PNP, while significant differences between land uses were not found (Table 4). As also seen in Table 4, the C:N ratio values were significantly highest in BdNP, whereas the mean pH_{KCl} ranged from 3.3 in the 0–10 cm layer of forest in BdNP to 4.5 in the 10–20 cm layer of forest in PNP and increased from BdNP and MNP to PNP. All of these soil properties depended on localization effects, while the C_{org} content depended on localized and land-use effects (Table 4). Overall, soils were classified as loamy (Table 4). Significant differences depended on location were found in the soil texture fractions. The soils of PNP had the lowest content of sand fraction and the highest content of silt fraction while the soils of MNP and PNP characterized higher content of clay fraction compared to the soils of BdNP (Table 4).

The organic carbon fraction composition varied slightly depending on land cover and soil layers (Table 5). In the 0–10 cm layer, the C_{NE} fraction was the dominant fraction, compared to C_{HA} by 28%, 7% and 8% and C_{FA} by 12%, 3% and 6% of all carbon fractions in the semi-natural meadow, successional forest and old-growth forest soils, respectively. While in the 10–20 cm layer of semi-natural meadow, successional forest and old-growth forest soils the dominant fraction was C_{FA}, which constituted 11%, 20% and 10% of the sum of C_{HA+FA} and C_{NE}, respectively (Table 5). Regarding the land uses in the 0–10 cm layer, old-growth forest soils had the highest and semi-natural meadow soils the lowest content of C_{HA+FA}, whereas in the 10–20 cm layer, there was a higher content of C_{HA+FA} in old-growth forest soils compared to semi-natural meadow and successional forest soils. The content of C_{HA} in the 0–10 cm layer was higher than in the 10–20 cm layer, whereas the statistically significant difference was found only for successional forest soil (Table 5). In the 0–10 cm layer, semi-natural meadow was characterized the lowest

Table 4 The characterization of soils in the investigated national parks. Mean and standard error values, ANOVA Kruskal–Wallis test results for selected soil properties (C_{org}, N_{tot}, C:N, pH, soil texture).

Study site	Land use	Layer (cm)	C _{org} (g kg ⁻¹)	N _{tot} (g kg ⁻¹)	C:N	pH _{KCl}	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)
BdNP	Meadow	0-10	57.1±10.0 ^{Babc}	1.7±0.5 ^{Aa}	52.1±23.6 ^{Ba}	3.7±0.1 ^{Aa}	39±9 ^{Ba}	52±6 ^{Aa}	9±3 ^{Aa}
		10-20	27.5±5.0 ^{Bab}	1.1±0.1 ^{Aa}	26.0±5.0 ^{Ba}	3.9±0.1 ^{Aa}	37±10 ^{Ba}	43±9 ^{Aa}	14±5 ^{Aa}
	Succession	0-10	55.8±9.6 ^{Bbc}	1.7±0.4 ^{Aa}	36.7±7.7 ^{Ba}	3.5±0.2 ^{Aa}	52±7 ^{Ba}	43±7 ^{Aa}	6±1 ^{Aa}
		10-20	26.1±2.5 ^{Ba}	1.0±0.3 ^{Aa}	33.4±9.7 ^{Ba}	3.8±0.1 ^{Aa}	47±7 ^{Ba}	48±8 ^{Aa}	8±2 ^{Aa}
	Forest	0-10	57.2±6.5 ^{Bc}	1.9±0.4 ^{Aa}	33.3±6.4 ^{Ba}	3.3±0.1 ^{Aa}	58±6 ^{Ba}	37±6 ^{Aa}	6±1 ^{Aa}
		10-20	30.7±3.4 ^{Babc}	1.0±0.2 ^{Aa}	35.1±10.4 ^{Ba}	3.7±0.1 ^{Aa}	55±8 ^{Ba}	38±6 ^{Aa}	6±2 ^{Aa}
MNP	Meadow	0-10	21.0±4.0 ^{Aabc}	1.5±0.3 ^{Aa}	13.8±0.6 ^{Aa}	3.9±0.1 ^{Aa}	48±9 ^{Ba}	40±6 ^{Aa}	12±3 ^{Ba}
		10-20	12.0±1.8 ^{Aab}	1.4±0.2 ^{Aa}	9.6±2.5 ^{Aa}	3.9±0.1 ^{Aa}	47±9 ^{Ba}	37±6 ^{Aa}	15±4 ^{Ba}
	Succession	0-10	23.8±2.7 ^{Abc}	1.7±0.1 ^{Aa}	13.8±0.5 ^{Aa}	3.5±0.2 ^{Aa}	52±8 ^{Ba}	38±6 ^{Aa}	10±2 ^{Ba}
		10-20	9.9±0.7 ^{Aa}	1.0±0.1 ^{Aa}	9.8±0.5 ^{Aa}	3.6±0.1 ^{Aa}	51±9 ^{Ba}	37±8 ^{Aa}	12±1 ^{Ba}
	Forest	0-10	29.1±3.3 ^{Ac}	1.8±0.0 ^{Aa}	15.9±1.4 ^{Aa}	3.4±0.0 ^{Aa}	32±3 ^{Ba}	53±1 ^{Aa}	15±2 ^{Ba}
		10-20	17.4±3.6 ^{Aabc}	1.3±0.1 ^{Aa}	13.5±2.9 ^{Aa}	3.5±0.1 ^{Aa}	21±4 ^{Ba}	53±5 ^{Aa}	26±4 ^{Ba}
PNP	Meadow	0-10	28.1±3.2 ^{Aabc}	3.9±0.4 ^{Ba}	7.2±0.5 ^{Aa}	4.2±0.3 ^{Ba}	22±5 ^{Aa}	56±8 ^{Ba}	22±4 ^{Ba}
		10-20	14.8±2.0 ^{Aab}	2.2±0.4 ^{Ba}	6.7±0.2 ^{Aa}	4.0±0.1 ^{Ba}	15±1 ^{Aa}	52±4 ^{Ba}	33±3 ^{Ba}
	Succession	0-10	32.7±2.2 ^{Abc}	2.2±0.6 ^{Ba}	18.4±6.7 ^{Aa}	4.2±0.4 ^{Ba}	29±1 ^{Aa}	58±0 ^{Ba}	13±2 ^{Ba}
		10-20	13.8±1.1 ^{Aa}	2.1±0.3 ^{Ba}	6.8±1.1 ^{Aa}	4.1±0.3 ^{Ba}	24±3 ^{Aa}	58±1 ^{Ba}	18±4 ^{Ba}
	Forest	0-10	33.1±4.9 ^{Ac}	3.7±0.3 ^{Ba}	8.9±0.8 ^{Aa}	4.4±0.5 ^{Ba}	19±4 ^{Aa}	59±8 ^{Ba}	22±5 ^{Ba}
		10-20	15.9±4.7 ^{Aabc}	2.4±0.4 ^{Ba}	6.6±1.1 ^{Aa}	4.5±0.6 ^{Ba}	28±4 ^{Aa}	54±4 ^{Ba}	19±4 ^{Ba}
Effect:									
Location (<i>F</i> ; <i>p</i>)			23.76; 0.00	22.27; 0.00	41.67; 0.00	15.28; 0.00	23.84; 0.00	12.91; 0.00	27.63; 0.00
Land use (<i>F</i> ; <i>p</i>)			23.71; 0.00	9.34; 0.96	4.43; 0.49	9.37; 0.09	3.34; 0.65	0.71; 0.98	6.12; 0.29

Notes: BdNP – Bieszczady National Park; MNP – Magura National Park; PNP – Pieniny National Park; C_{org} – total organic carbon, N_{tot} – total nitrogen, C:N – organic carbon and total nitrogen ratio. Different capital letters indicate significant differences between national parks and lower case letters indicate significant differences between land use and soil depth variants. Kruskal-Wallis rank test, *p* < 0.05).

Table 5 Mean and standard error values and the ANOVA Kruskal–Wallis rank test results for organic matter fractions (C_{HA+FA}, C_{HA}, C_{FA}, C_{NE} and C_{HA}:C_{FA}) in different soil layers of semi-natural meadow, natural successional forest and old-growth forest.

Layer (cm)	Land use	C _{HA+FA} (g kg ⁻¹)	C _{HA} (g kg ⁻¹)	C _{FA} (g kg ⁻¹)	C _{NE} (g kg ⁻¹)	C _{HA} :C _{FA}
0-10	Meadow	21.3±3.4 ^a	6.5±1.8 ^{ab}	12.0±1.7 ^a	16.3±5.7 ^a	0.8±0.1 ^a
	Succession	24.9±3.8 ^a	11.8±1.9 ^b	13.1±2.0 ^a	14.4±2.5 ^a	0.9±0.1 ^a
	Forest	25.7±3.5 ^a	12.4±2.1 ^b	13.3±1.5 ^a	15.8±3.7 ^a	0.9±0.1 ^a
10-20	Meadow	12.9±2.3 ^a	4.6±1.0 ^a	8.2±1.5 ^a	6.2±1.0 ^a	0.6±0.1 ^a
	Succession	12.5±2.2 ^a	3.9±0.8 ^a	8.6±1.6 ^a	5.1±1.0 ^a	0.5±0.1 ^a
	Forest	14.9±2.1 ^a	5.2±0.8 ^{ab}	9.6±1.4 ^a	7.4±2.0 ^a	0.6±0.1 ^a

Notes: C_{HA+FA} – carbon of humic acids and fulvic acids; C_{HA} – carbon of humic acids; C_{FA} – carbon of fulvic acids, C_{NE} – non-extractable carbon. Different lower case letters indicate significant differences between land use and soil depth variants (ANOVA, Kruskal-Wallis rank test, *p* < 0.05).

C_{HA}:C_{FA} ratio, while in the 10-20 cm layer the lowest C_{HA}:C_{FA} in the successional forest soil was found (Table 5).

The Q_{4/6} coefficient values calculated for humic acids and fulvic acids were higher in the 0-10 cm than those in the 10-20 cm layer for each examined land use variable (Table 6). In the 0-10 cm layer, the lowest Q_{4/6} value for humic acids was observed in the semi-natural meadow and the highest in the succession forest, while in the 10-20 cm layer the lowest Q_{4/6} value for humic acids in the successional forest and the

highest in the old-growth forest were noted. However, the Q_{4/6} coefficient values for fulvic acids were the lowest in the semi-natural meadow in both examined layers (Table 6). The Q_{2/4} coefficient calculated for humic acids had the highest values in the semi-natural meadow soils for both 0-10 cm and 10-20 cm layers. Alike, the calculated coefficient Q_{2/4} for fulvic acids was higher in the semi-natural meadow soils compared to successional forest and old-growth forest soils in both examined layers. In the 0-10 cm layer, the semi-natural meadow soils characterized the highest Q_{2/3}

Table 6 Mean and standard error values and the Kruskal–Wallis rank test results for absorbance coefficients ($Q_{4/6}$, $Q_{2/4}$, $Q_{2/3}$ and $\Delta \log K$) in humic and fulvic acids in soil layers of semi-natural meadow, natural successional forest and old-growth forest.

Layer (cm)	Land use	Humic acids			
		$Q_{4/6}$	$Q_{2/4}$	$Q_{2/3}$	$\Delta \log K$
0-10	Meadow	3.8±0.3 ^{bc}	3.8±0.1 ^c	2.8±0.1 ^{ab}	0.6±0.0 ^{ab}
	Succession	4.3±0.2 ^c	3.7±0.0 ^c	2.9±0.0 ^b	0.6±0.0 ^b
	Forest	4.1±0.1 ^c	3.6±0.1 ^{bc}	2.9±0.0 ^b	0.6±0.0 ^b
10-20	Meadow	2.4±0.4 ^{ab}	3.4±0.1 ^{abc}	2.5±0.2 ^{ab}	0.5±0.1 ^{ab}
	Succession	2.0±0.3 ^a	2.7±0.2 ^a	2.2±0.2 ^a	0.4±0.0 ^a
	Forest	2.6±0.2 ^{ab}	3.0±0.1 ^{ab}	2.6±0.1 ^a	0.4±0.0 ^a
Layer (cm)	Land use	Fulvic acids			
		$Q_{4/6}$	$Q_{2/4}$	$Q_{2/3}$	$\Delta \log K$
0-10	Meadow	3.5±0.6 ^{ab}	21.1±2.7 ^{ab}	7.4±0.2 ^{abc}	0.6±0.1 ^a
	Succession	5.1±0.5 ^b	14.1±0.9 ^a	6.6±0.1 ^a	0.7±0.0 ^a
	Forest	4.7±0.2 ^b	14.4±0.9 ^{ab}	6.7±0.3 ^{ab}	0.7±0.0 ^a
10-20	Meadow	2.2±0.4 ^a	23.2±3.3 ^b	9.2±0.5 ^c	1.0±0.3 ^a
	Succession	3.1±0.9 ^{ab}	21.5±1.9 ^{ab}	8.8±0.4 ^c	0.9±0.2 ^a
	Forest	3.6±0.7 ^{ab}	16.7±0.8 ^{ab}	8.0±0.4 ^{bc}	0.6±0.1 ^a

Notes: $Q_{4/6}$ – quotient of the absorbance measured at 400 nm and 600 nm wavelengths; $Q_{2/4}$ – quotient of the absorbance measured at 280 nm and 400 nm wavelengths; $Q_{2/3}$ – quotient of the absorbance measured at 250 nm and 365 nm wavelengths; $\Delta \log K = \log K_{400} - \log K_{600}$, where K is a absorbance values measured at 400 nm and 600 nm wavelengths. Different lower case letters indicate significant differences between land use and soil depth variants (ANOVA, Kruskal-Wallis rank test, $p < 0.05$).

Table 7 Minimum and maximum of colour value and chroma, Munsell chart colours, mean and standard error values of A Horizon Development Index (ADI).

Layer (cm)	Land use	Dry						Wet					
		Value		Chroma		Munsell chart	ADI	Value		Chroma		Munsell chart	ADI
		min	max	min	max			min	max	min	max		
0-10	Meadow	4	7	2	4		0.5±0.2 ^{abc}	2	5	3	6		0.7±0.3 ^{ab}
	Succession	3	6	2	3		0.8±0.4 ^{bc}	2	4	1	4		1.3±0.8 ^b
	Forest	2	6	1	4		1.1±0.7 ^c	1.7	4	1	4		1.9±1.0 ^b
10-20	Meadow	5	7	2	4		0.5±0.1 ^{ab}	4	5	2	8		0.6±0.3 ^a
	Succession	5	7	3	4		0.4±0.1 ^a	3	5	3	6		0.5±0.2 ^a
	Forest	4	7	3	6		0.5±0.1 ^{abc}	2	5	2	8		0.9±0.4 ^{ab}

Notes: All of the examined soil samples were characterized by a 10YR Munsell hue. Different lower case letters indicate significant differences between land use and soil depth variants (ANOVA, Kruskal–Wallis rank test, $p < 0.05$).

coefficient values calculated for fulvic acids compared to successional forest and old-growth forest soils, while in the 10–20 cm layer the lowest $Q_{2/3}$ in the old-growth forest soils was noted. However, the $Q_{2/3}$ values calculated for humic acids were similar between all examined land use variants in both soil layers (Table 6). The $Q_{2/3}$ values calculated for fulvic acids in the 10–20 cm layer decrease from semi-natural meadow via successional forest to old-growth forest. However, no statistically significant differences between semi-natural meadow, successional forest and old-growth forest soils in the individual layers for humic and fulvic acids were found for the $\Delta \log K$ values (Table 6).

The colour of examined soils was different between semi-natural meadow, successional forest and old-growth forest, especially in the 0–10 cm soil layer. All of the examined soil samples were

characterized by a 10YR Munsell hue; however, the soil colour darkened from semi-natural meadow via successional forest to old-growth forest (Table 7). The calculated ADI mean values of examined different land use soils varied, ranging from 0.4 to 1.1 and from 0.5 to 1.9 in dry and wet soil samples, respectively (Table 7). The ADI_{dry} and ADI_{wet} mean values increased significantly from semi-natural meadow to old-growth forest in the 0–10 cm layer. Whereas, in the 10–20 cm layer, the lowest mean ADI_{wet} and ADI_{dry} values were found in the successional forest and the highest were observed in the old-growth forest soils.

The score plot in two principal components represents 80.9% of the total variability. The first PCA axis explains 70.8% and was strongly correlated with a few original variables, positively with clay content

and negatively with ADI and content of humic substances (C_{HA} , C_{FA} and C_{HA+FA}). The second PCA axis explains only 10.1% and is weakly connected with C:N ratio, $Q_{2/3}$ and $Q_{4/6}$ coefficients determined for fulvic acids (Fig. 1). A positive correlation between C_{org} , C_{FA} , C_{HA} , and ADI_{dry} as well as ADI_{wet} was noted (Fig. 1). The ADI_{dry} and ADI_{wet} values were positively correlated with $Q_{4/6}$ determined for fulvic acids. However, a negative correlation between ADI_{dry} and ADI_{wet} and $Q_{2/4}$ as well as $Q_{2/3}$ for fulvic acids was noted (Fig. 1).

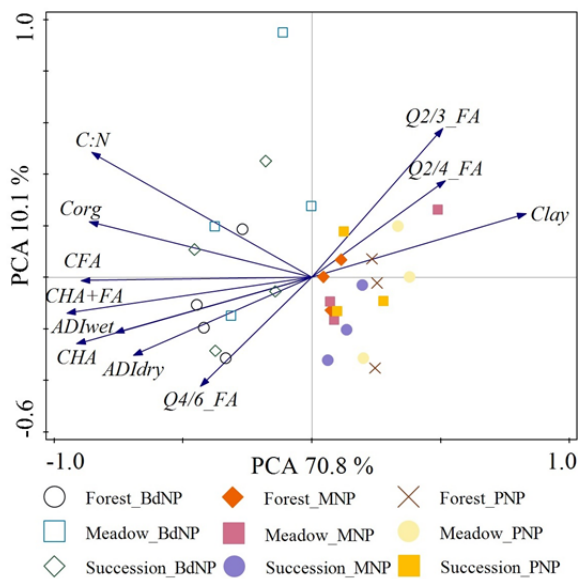


Fig. 1 Principal Component Analysis (PCA) for selected coefficients (ADI_{wet} , ADI_{dry} , $Q_{4/6}$, $Q_{2/4}$, $Q_{2/3}$) and soil properties (C:N, C_{org} , C_{FA} , C_{HA} , C_{HA+FA} , clay) over the entire 0–20 cm layer.

Notes: BdNP – Bieszczady National Park; MNP – Magura National Park; PNP – Pieniny National Park; ADI_{wet} – A Horizon Development Index measured in wet soil samples; ADI_{dry} – A Horizon Development Index measured in dry soil samples; $Q_{4/6_FA}$ – quotient of the absorbance measured at 400 nm and 600 nm wavelengths measured for fulvic acids; $Q_{2/4_FA}$ – quotient of the absorbance measured at 280 nm and 400 nm wavelengths measured for fulvic acids; $Q_{2/3_FA}$ – quotient of the absorbance measured at 250 nm and 365 nm wavelengths measured for fulvic acids; C_{org} – organic carbon; C:N – organic carbon and total nitrogen ratio; C_{HA+FA} – carbon of humic acids and fulvic acids; C_{HA} – carbon of humic acids; C_{FA} – carbon of fulvic

4 Discussion

The study covered three Polish national parks of the Carpathian Mountains, whose soils varied in their properties. The differences in their soil properties may

reflect the location of the individual national parks. The significantly highest content of C_{org} in soils of BdNP could be related to the higher altitude compared to MNP and PNP. One of the main environmental factor influencing soil nutrient distribution on a small scale is topography; Martin et al. (2010), for instance, highlighted a meaningful role of topography in soil carbon accumulation. Additionally, a certain amount of moisture is essential for the decomposition of organic residues and as a result increase carbon content in soil (Martin et al. 2010). However, geographic location, climate, precipitation, and micro-topography can lead to different outcomes (Jiang et al. 2019). For example in Himalayan soil, C:N ratio was found to decrease with increasing elevation (Müller et al. 2017); conversely in the Polish Carpathians, C:N increased with increasing altitude above sea level. Also, similar results have been found in subtropical regions in China (He et al. 2016).

However, soil texture was the factor that influenced N_{tot} content in studied soils the most. In soils of the PNP, the highest content of N_{tot} as well as the highest silt and clay fraction were observed. Gami et al. (2009) stated that silt+clay content significantly explained the variation of total nitrogen content in forest and cultivated soils. Moreover, higher pH values in the soils of PNP compared to BdNP and MNP may reflect different parent materials. According to Niemyska-Lukaszuk et al. (2002), the parent materials for eutric cambisols in PNP are especially rocks of sandstone-shale series with an admixture of carbonate binder, which influences higher pH values, whilst the BdNP and MNP soils were formed on the Carpathian Flysch, where the dominant rocks are sandstones, mudstones and shales (Skiba 1999; Skiba and Drewnik 2000). Despite the differences in the basic properties of soil located in different parts of the Carpathians, the broad research area contributed to the generalization of the changes in OM decomposition and humification caused by natural forest succession in this region.

4.1 Soil colour and the A Horizon Development Index (ADI)

As expected, the old-growth forest soils were characterized by the darkest soil colour, and the meadow the lightest, which is related to the content of C_{org} as well as the content of humic substances. So far,

soil colour has been used mainly as an indicator of organic carbon content in soils (Konen et al. 2003; Wills et al. 2007). Mazurek et al. (2016), based on soil colour features, calculated the ADI to determine the degree of stabilization of the OM in the studied profile. The results from our study confirm the relationship between increasing ADI value and content of C_{org} , by the positive correlation between the ADI_{wet} and ADI_{dry} and C_{org} as well as carbon content of humic substance fractions, which are a meaningful part of organic carbon in the soil. The correlation results confirmed that calculating ADI value may be a simple and time-saving way to indicate changes in C_{org} and humic substance content in soils during natural forest succession. The colour of humic substances may be yellowish-brown to black depending on the degree of decay and concentration. It is well known that humic substances contribute to the black colour of soils by accumulation in the surface horizon of the soil (Weber 2020). Nevertheless, sometimes the darkness of soil is not related to the content of organic carbon and may be caused by the presence in the soil of additional compounds such as melanin pigments found in many fungi and some bacteria (Guggenberger 2005) which are black and brown coloured and are assumed to represent precursors of humic substances in soil (Saiz-Jimenez 1996). But, so far there is little information about such interferences in soil colour; however, the relationships between soil colour and content of organic carbon were more often subject of studies.

4.2 Composition of humic substances

Humic substances are the most widespread naturally occurring organic substances, which have attracted the interest of many scientists (Weber et al. 2018). The relationship between different components of humic substances is still of great interest in terms of studying the effect of land use and soil management on soil quality (Reddy et al. 2012; Zhiyanski et al. 2017). Humins are the most dominant fraction of humic substances in soils, independent of land use (Guimarães et al. 2013). This was also observed in this study in the 0–10 cm layer, where C_{NE} was the dominant fraction in all examined land use variants. However, in the 10–20 cm layer, the fractional composition took a slightly different shape, with the dominance of C_{FA} . Such a composition in the individual layers may be related to the insolubility of humins and the high solubility of fulvic acids under both alkaline and acid conditions (Sutton and Sposito

2005). Simultaneously, the higher content of C_{FA} compared to C_{HA} in both examined layers and all land use variants indicate high mobility of the OM. Also, Guimarães et al. (2013) have shown a higher content of fulvic acids than humic acids in different agriculture areas, and they stated that the predominance of fulvic acids in organic carbon composition indicated a slow rate of SOM decomposition or frequent inputs of fresh residues. Such a distribution of humic and fulvic acids was observed in forest soils (Guggenberger and Zech 1994; Schnitzer 1999). Moreover, Giurov and Artinova (2001) found the humus in Cambisols as a fulvic-humic type, which confirmed that the dominance of C_{FA} and C_{NE} fractions is common in that soil type. Despite the fact that humic acids bind strongly to soils and are resistant to microbial metabolism, they are depleted from soils by wind and water erosion as well as by water leaching (Susic 2016).

The significantly higher C_{HA} content in the 0–10 cm layer compared to the 10–20 cm layer may be caused by the continuous input of fresh organic matter on the soil surfaces as well as greater microbial activity in the top layer of soil, which are the main factors affecting humification (Li et al. 2015). Conversely, despite the higher input of OM, C_{org} and C_{HA} content in the 0–10 cm layers compared to the 10–20 cm layers, the calculated coefficients such as $Q_{4/6}$, $Q_{2/4}$ and $\Delta \log K$ for humic acids and fulvic acids have shown a lower advancement of the humification process in the top layer. Such inaccuracies might be caused by climatic conditions, which are factors influencing SOM humification and carbon accumulation (Wang et al. 2016b). Wang et al. (2016a) found a decrease in soil aromaticity with increasing elevation. Moreover, Drewnik (2000) stated that the rate of OM decomposition in the Carpathians decreased with increasing altitude, which could be related to lower temperatures. The lower temperature can result in an increase in the recalcitrant SOM due to restriction of microbial decomposition (Wang et al. 2016a).

4.3 Advanced organic matter humification

It is well known that humification and mineralization are parallel processes in the soil environment. According to Kandeler et al. (2005), the decomposition of organic material is dynamic, and a stepwise process results in a small portion converting to complex and more stable material; however, readily available litter and plant exudates are transformed and

nutrients are mineralized mainly via respiratory processes of the microbiota. Many authors (Cerli et al. 2008; Quideau et al. 2000) have highlighted the important role of the humic substances' age in terms of the degree of transformations in their functional groups, which in our study was confirmed by an increased advancement of the humification process with soil depth.

The calculated absorbance coefficients contributed to characterizing the differences in the soils from different land uses. Based on the $Q_{4/6}$ ratio, which is often used to characterize humic substances and is considered as an indicator of the degree of maturity (Vázquez et al. 2016) as well as reflecting the degree of condensation and aromatic structures (Aranda et al. 2011), we observed a significant decrease in maturity and condensation degree of fulvic acids in the 0–10 cm soil layer from meadow to successional forest soils (i.e. an increase in $Q_{4/6}$). It is commonly assumed that a high degree of condensation and aromaticity of humic substances are indicators of a highly advanced humification process. The high humification in meadow soils was also noted by Ukalska-Jaruga et al. (2019), who confirmed that in grassland soils humified OM is very well protected against mineralization.

Inversely, in accordance with the $Q_{2/3}$ coefficient reflecting the degree of structural degradation of humic substances' components (Suhett et al. 2004), a significantly lower degradation of fulvic acids structures (a decrease in $Q_{2/3}$) in successional forest compared to the semi-natural meadow was noted. The differentiation between examined land uses may be affected by microbial activity, which influences the timing of active plant residue transformation in soils (Li et al. 2015). More stable fulvic acids structures in successional forest soils may be the result of the land-use history, however. Kalbitz et al. (2000) noted the impact of long-term agricultural use and high input on increasing aromatic structures and further humification of fulvic acids. Moreover, Dean et al. (2020) noticed the influence of historical human activity on relocated carbon from primary forests. Such processes may account for the presence of old fulvic acids from decomposed coarse lateral roots of old trees in meadow soils that initially were covered by forests. Wilson et al. (1997) observed a legacy of SOC heterogeneity in one or two successional generations of forests; however, the pattern was not clear for examined different surfaces. According to

Oyarzún et al. (2011), the SOC legacy is less in secondary forests and could reduce soil variability.

The $Q_{2/4}$ coefficient characterizes the advance of OM humification (Ammari et al. 2012) as well as reflects the contents of organic materials at the beginning of transformation (Guangyin & Youcai 2017), and here indicated the decrease in the content of humic substances in the initial stage of decomposition from semi-natural meadow to successional forest. These results may indicate that in the 0–10 cm layer of semi-natural meadow highly and lightly decomposed OM occur at the same time while in old-growth forest and successional forest, lightly decomposed material is predominant. These differences may be influenced by the varied susceptibility to the decomposition of meadow vegetation compared to litterfall from deciduous trees. Forest litter decomposition often is divided into three stages, the early stage and the late stage with the dominance of non-lignified and lignified tissue decomposition, respectively, and the final stage (Berg 2018). Similarly, in the 10–20 cm layer, the lower decomposed organic material and higher content of fulvic and humic acids at the beginning of the transformation in semi-natural meadows (as expressed by higher values of $Q_{2/4}$) were noted. It could be caused by higher input of plant residues compared to old-growth forest and successional forest, particularly from dense root systems. Gill and Jackson (2000) have found significant differences in root turnover among varied vegetation types; tree roots had the slowest turnover rate and grasslands the fastest. Schmidt et al. (2011) indicated that root-derived carbon is retained in soils much more efficiently than aboveground inputs of plant litter. Additionally, decreasing the $Q_{2/4}$ values from semi-natural meadow to successional forest and old-growth forest indicates a higher degree of humification advancement in tree ecosystems. It is very well known that long-term SOM accumulation takes place in the humus layer of forest soils. The meaningful role of an established forest ecosystem in carbon sequestration is highlighted in the literature; for example, Ni et al. (2016) have shown the importance of continuity of alpine forests in the accumulation of SOM and carbon sequestration.

4.4 A Horizon Development Index and UV-VIS spectroscopic coefficients

The positive correlation between the $Q_{4/6}$ calculated for fulvic acids, which determines the

advancement of the humification process and ADI values suggests that these indexes are inconsistent. The interpretation of the spectroscopic results was based on a long-term study on the absorbance features of humic substances (Chen et al. 1977; Gonet and Dębska 1998; Kononowa 1968; Kumada 1987; Schnitzer and Khan 1972). Despite the finding that the humification process increased aromatically of humic substances, some authors (Baldock et al. 1992; Kögel-Knabner 1997; Quideau et al. 2000) have shown that an increase in the degree of humic substance humification is accompanied by an increase in the degree of their aliphaticity.

Moreover, the direction of humic substance transformation is related to the oxygen conditions in the soil. According to Thomsen et al. (2008), aerobic conditions favour an increase in aromaticity, while anaerobic conditions favour an increase in aliphaticity of humic substances along the humification process. Thus, the increase of humic substance aromaticity is not always equivalent to the progress of the humification process. However, in this study the presence of fulvic acids at the beginning of the transformation process in the examined semi-natural meadow soils provided lower ADI values. Thus, the more advanced the fulvic acid humification and the higher the size of fulvic acids structures, the higher the ADI values, which is expressed in the negative correlation between ADI values and $Q_{2/4}$ as well as $Q_{2/3}$. In the opposite sense, the occurrence of lower-size humic acids structures increases ADI values and results in darker soils.

Recent research (Christl et al. 2008) has shown that the smaller humic acids may have a more compact structure, caused by their larger content of aromatic carbon and a higher degree of condensation. Christl et al. (2008) also stated that small, uniform molecules are not the primary building blocks of humic acids with high apparent molecular weights. In fact, they found clear chemical differences between the molecular size classes of soil humic acids. Unfortunately, the chemical structure of humic substances is difficult to uniquely define because of a large number of chemical units in the compounds as well as changes in the percentage contribution of chemical units in humic substances molecules depending on habitat and bioecological conditions (Mielnik 2016). Despite the obvious role of the presence of OM in soil on colour, the present study has shown that the degree of degradation of humic

substances structures (expressed by $Q_{2/3}$) is a meaningful factor influencing soil colour and soil development degree.

Comparing both methods used here, UV-VIS spectroscopy is useful in determining the absorbance of aromatic systems, which is related to the degree of humic substances' humification as well as the quality of soil (Da Silva et al. 2018), whereas the ADI showed the diversity of the degree of organic matter stabilization. The ADI correlated with organic carbon content and is especially dependent on soil colour and the amount of material scattered as well as its exposure time (Mazurek et al. 2016). Thus, each of the presented methods investigating the advancement of organic material decomposition and development of uppermost soil layers is focused on different features of the soil. The calculation of ADI focuses only on physical soil properties, while calculating the absorbance coefficients is based on spectroscopic analysis penetrating the chemical structure of organic matter.

5 Conclusions

The natural forest succession in the Polish Carpathians influenced soil colour darkening and shaped the development of the uppermost (0–20 cm) soil layer, as expressed by the calculated ADI. Moreover, spectroscopic analyses of humic substances showed that land-use changes impacted the advancement of the humification process. Nevertheless, these changes were also related to the soil depth. In the 0–10 cm soil layer, the natural forest succession reduced the rate of the humification process as well as decreasing the degree of maturity of fulvic acids. Conversely, in the 10–20 cm soil layer, changing the land use from semi-natural meadow via successional forest to an old-growth forest led to an increase in the rate of the humification process as well as a decrease in the content of both humic and fulvic acids at the beginning of the transformation.

The comparison of the ADI results and the calculated spectroscopic coefficients indicates that these indices are based on different features of soils and cannot be used interchangeably as indicators of the development of soil. Moreover, the degree of advance of the humification process is related mainly to features of the individual humic substances.

Therefore, there is a need to extend studies of humic substances. It is especially worth focusing on the

structure of individual humic substances and the presence of different functional groups, which was missing in the present study. Moreover, future research could divide the successional stages according to the age of the trees to capture and better understand the ratio and direction of OM decomposition in soils during natural forest succession.

Acknowledgments

This study was supported by Statutory financial support of Ministry of Science and Higher Education RP Department of Soil Science and Agrophysics [O10013-DO11 in 2021] University of Agriculture in Krakow. We wish to thank Cambridge Proofreading team for reading the manuscript and for language corrections.

Electronic supplementary material: Supplementary material (Appendixes 1-2) is available in the online version of this article at <https://doi.org/10.1007/s11629-021-6836-x>

References

- Aitkenhead MJ, Coull M, Towers W, et al (2013) Prediction of soil characteristics and colour using data from the National Soils Inventory of Scotland. *Geoderma* 200-201:99-107. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.02.013>
- Ammari TG, Al-Omari Q, Abbassi BE (2012) Composting sewage sludge amended with different sawdust proportions and textures and organic waste of food industry - Assessment of quality. *Environ Technol (United Kingdom)* 33:1641-1649. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.641589>
- Aranda V, Ayora-Cañada MJ, Domínguez-Vidal A, et al (2011) Effect of soil type and management (organic vs. conventional) on soil organic matter quality in olive groves in a semi-arid environment in Sierra Mágina Natural Park (S Spain). *Geoderma* 164:54-63. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.05.010>
- Baldock JA, Oades JM, Waters AG, et al (1992) Aspects of the chemical structure of soil organic materials as revealed by solid-state ¹³C NMR spectroscopy. *Biogeochemistry* 16:1-42. <https://doi.org/10.1007/BF02402261>
- Berg B (2018) Decomposing litter; limit values; humus accumulation, locally and regionally. *Appl Soil Ecol* 123:494-508. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.026>
- Braak CJF ter, Smilauer P (2012) Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0
- Buol S, Southard R, Graham R, et al. (2003) *Soil Genesis and Classification*, fifth. Press Ames, Iowa State, USA.
- Cerli C, Celi L, Kaiser K, et al. (2008) Changes in humic substances along an age sequence of Norway spruce stands planted on former agricultural land. *Org Geochem* 39:1269-1280. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2008.06.001>
- Chen Y, Senesi N, Schnitzer M (1977) Information Provided on Humic Substances by E4/E6 Ratios. *Soil Sci Soc Am J* 41:352-358. <https://doi.org/10.2136/sssaj1977.03615995004100020037x>
- Christl I, Kincker H, Kögel - Knabner I, et al. (2008) Chemical heterogeneity of humic substances: characterization of size fractions obtained by hollow - fibre ultrafiltration. *Eur J Soil Sci* 51:617-625. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2000.00352.x>
- Da Silva RR, Lucena GN, MacHado ÂF, et al. (2018) Spectroscopic and elementary characterization of humic substances in organic substrates. *Comun Sci* 9:264-274. <https://doi.org/10.14295/CS.v9i2.2734>
- Dean C, Kirkpatrick JB, Doyle RB, et al. (2020) The overlooked soil carbon under large, old trees. *Geoderma* 376. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2020.114541>
- Drewnik M (2000) Ectohumus horizons and the rate of organic matter decomposition in the Carpathian soils. *Pr Geogr* 105:391-401
- Erraji H, Afilal ME, Azim K, et al. (2017) Valorization of household anaerobic processed digestate: A case study of Morocco. *J Mater Environ Sci* 8:4024-4031.
- Gami SK, Lauren JG, Duxbury JM (2009) Influence of soil texture and cultivation on carbon and nitrogen levels in soils of the eastern Indo-Gangetic Plains. *Geoderma* 153:304-311. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2009.08.003>
- Gill RA, Jackson RB (2000) Global patterns of root turnover for terrestrial ecosystems. *New Phytol* 147:13-31. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00681.x>
- Giurov G, Artinova N (2001) *Soil Science. Makros*, Sofia. pp 132-139.
- Gołębiewska D (2004) Absorption spectrometry in the UV-VIS range: parameters and methods of analyzing the absorption spectra of humic compounds. In: Gołębiewska D (ed.), *Research Methods for Humic Substances in Aquatic and Terrestrial Ecosystems*. AR, Szczecin, pp 15-26. (in Polish)
- Gonet SS (1993) The structure of humic substances. *Zesz Probl Post Nauk Roln* 411:189-194 (in Polish)
- Gonet SS, Dębska B (1998) Properties of humic acids developed

Open Access

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

- during humification process of post-harvest plant residues. *Environ Int* 24:603-608.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(98\)00034-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0160-4120(98)00034-8)
- Guangyin Z, Youcai Z (2017) Harvest of Bioenergy From Sewage Sludge by Anaerobic Digestion. In: *Pollution Control and Resource Recovery*. Elsevier, pp 181-273
- Guggenberger G (2005) Humification and mineralization in soils. In: Varma A, Buscot F (eds.) *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. SpringerNature, Berlin, Heidelberg. pp 85-106.
- Guggenberger G, Zech W (1994) Dissolved organic carbon in forest floor leachates: simple degradation products or humic substances? *Sci Total Environ* 152:37-47.
[https://doi.org/10.1016/0048-9697\(94\)90549-5](https://doi.org/10.1016/0048-9697(94)90549-5)
- Guimarães DV, Gonzaga MIS, da Silva TO, et al. (2013) Soil organic matter pools and carbon fractions in soil under different land uses. *Soil Tillage Res* 126:177-182.
<https://doi.org/10.1016/j.still.2012.07.010>
- Hayes MHB, Swift RS (2001) Progress towards understanding aspects of composition and structure of humic substances. In: Swift RS, Spark KM (eds.), *Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments, and Waters*. IHSS, pp 3-16.
- He X, Hou E, Liu Y, et al. (2016) Altitudinal patterns and controls of plant and soil nutrient concentrations and stoichiometry in subtropical China. *Sci Rep* 6:1-9.
<https://doi.org/10.1038/srep24261>
- Hejman M, Hejmanová P, Pavlů V, et al. (2012) Origin, history, management and plant species composition of grasslands in Central Europe - a review. In: Goliński P, Warda M, Stypiński P (eds.), *Grassland - a European resource? Proceedings of the 24th General Meeting of the European Grassland Federation*, Lublin, Poland, 3-7 June 2012. Polskie Towarzystwo Łąkarskie (Polish Grassland Society). pp 554-567.
- IUSS Working Group WRB (2015) World reference base for soil resources 2014. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. Update 2015. World Soil Resources Reports No. 106. FAO, Rome, Italy.
- Jiang L, He Z, Liu J, et al (2019) Elevation gradient altered soil C, N, and P Stoichiometry of pinus taiwanensis forest on Daiyun Mountain. *Forests* 10:1-15.
<https://doi.org/10.3390/F10121089>
- Jiménez-González MA, Almendros G, Waggoner DC, et al. (2020) Assessment of the molecular composition of humic acid as an indicator of soil carbon levels by ultra-high-resolution mass spectrometric analysis. *Org Geochem* 143:104012.
<https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2020.104012>
- Kabała C, Karczewska A (2017) Methodology of laboratory analyzes of soils and plants, 8th edition. INOGOEE, UP, Wrocław, Poland. pp 23-24. (in Polish)
- Kalbitz K, Solinger S, Park JH, et al. (2000) Controls on the dynamism of dissolved organic matter in soils: a review. *Soil Sci* 164:277-304.
- Kandeler E, Stemmer M, Gerzabek MH (2005) Role of Microorganisms in Carbon Cycling in Soils. In: Buscot F, Varma A (eds) *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 139-158.
- Kögel-Knabner I (1997) ¹³C and ¹⁵N NMR spectroscopy as a tool in soil organic matter studies. *Geoderma* 80:243-270.
[https://doi.org/10.1016/S0016-7061\(97\)00055-4](https://doi.org/10.1016/S0016-7061(97)00055-4)
- Konen ME, Burras CL, Sandor JA (2003) Organic Carbon, Texture, and Quantitative Color Measurement Relationships for Cultivated Soils in North Central Iowa. *Soil Sci Soc Am J* 67:1823-1830. <https://doi.org/10.2136/sssaj2003.1823>
- Kononowa M (1968) Organic substances of soil their structure properties and research methods. PWRiL, Warszawa, Poland. (in Polish)
- Kubijowicz W (1927) Shepherd life in the Beskids Magóra. *Prace Komisji Etnograficznej Polskiej Akademii Umiejętności* Nr. 2, Kraków, Poland. (in Polish)
- Kukułš I, Kļaviņš M, Nikodemus O, et al. (2019) Changes in soil organic matter and soil humic substances following the afforestation of former agricultural lands in the boreal-nemoral ecotone (Latvia). *Geoderma Reg* 16: e00213.
<https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2019.e00213>
- Kumada K (1987) *Chemistry of Soil Organic Matter*. Elsevier, Japan, Tokyo.
- Li FB, Lu G De, Zhou XY, et al. (2015) Elevation and land use types have significant impacts on spatial variability of soil organic matter content in hani terraced field of Yuanyang County, China. *Rice Sci* 22:27-34.
<https://doi.org/10.1016/j.rsci.2015.05.005>
- Lindbo D, Rabenhorst M, Rhoton E (1998) Quantifying hydric soil indicators with soil color. In: Rabenhorst (ed) *Quantifying soil hydromorphology*. SSSA Spec. Publ. 54. SSSA, Madison, WI, USA, pp 95-106.
- Lityński T, Jurkowska H, Gorlach E (1976) *Chemical-agricultural Analysis*. PWN. (In Polish)
- Martin D, Lal T, Sachdev CB, et al. (2010) Soil organic carbon storage changes with climate change, landform and land use conditions in Garhwal hills of the Indian Himalayan mountains. *Agric Ecosyst Environ* 138:64-73.
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2010.04.001>
- Mazurek R, Kowalska J, Gasiorek M, et al. (2016) Micromorphological and physico-chemical analyses of cultural layers in the urban soil of a medieval city - A case study from Krakow, Poland. *Catena* 141:73-84.
<https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.02.026>
- Mielnik L (2016) Characteristics of the humic acids (HA) from lake sediments as effect of UV-VIS spectral parameters application. *Acta Sci Pol Technica Agrar* 15:43-51.
- Mikhailova EA, Stiglitz RY, Post CJ, et al. (2017) Predicting soil organic carbon and total nitrogen in the russian chernozem from depth and wireless color sensor measurements. *Eurasian Soil Sci* 50:1414-1419.
<https://doi.org/10.1134/S106422931713004X>
- Mohinuzzaman M, Yuan J, Yang X, et al (2020) Insights into solubility of soil humic substances and their fluorescence characterisation in three characteristic soils. *Sci Total Environ* 720:137395.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137395>
- Mostofa KMG, Jie Y, Sakugawa H, Liu CQ (2019) Equal treatment of different EEM data on PARAFAC modeling produces artifact fluorescent components that have misleading biogeochemical consequences. *Environ Sci Technol* 53:561-563.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06647>
- Müller M, Oelmann Y, Schickhoff U, et al (2017) Himalayan treeline soil and foliar C:N:P stoichiometry indicate nutrient shortage with elevation. *Geoderma* 291:21-32.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.12.015>
- Navarrete IA, Tsutsuki K, Navarrete RA (2010) Humus composition and the structural characteristics of humic substances in soils under different land uses in Leyte, Philippines. *Soil Sci Plant Nutr* 56:289-296.
<https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2010.00455.x>
- Ni X, Yang W, Tan B, et al. (2016) Forest gaps slow the sequestration of soil organic matter: A humification experiment with six foliar litters in an alpine forest. *Sci Rep* 6:1-13.
<https://doi.org/10.1038/srep19744>
- Niemyska-Łukaszuk J, Miechówka A, Zaleski T (2002) The soils of Pieniny National Park and their threats. *Pieniny - Przyr i Człowiek* 90:79-90. (in Polish)
- Novák J, Lukas V, Křen J (2018) Estimation of soil properties based on soil colour index. *Agric Conspec Sci* 83:71-76.
- Nowosad M (1995) Outlines of climate of the Bieszczady National Park and its buffer zone in line of previous studies. *Rocz Bieszczadzkie* 4:163-183.
- Obrebska-Starkłowa B, Hess M, Olecki Z, et al. (1995) Climate. In: *Polish Carpathians, nature, man and his activities*. UJ, Kraków, pp 31-47. (in Polish)
- Orlov D (1983) *Soils Chemistry*. Moscow State University, Moscow.
- Oyama M, Takehara H (1970) Revised Standard Soil Color Charts. Research Council for Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan.

- Oyarzún CE, Godoy R, Staelens J, et al. (2011) Seasonal and annual throughfall and stemflow in Andean temperate rainforests. *Hydrol Process* 25:623-633.
<https://doi.org/10.1002/hyp.7850>
- Panettieri M, Kincker H, Murillo J, et al. (2014) Soil organic matter degradation in an agricultural chronosequence under different tillage regimes evaluated by organic matter pools, enzymatic activities and CPMAS ¹³C NMR. *Soil Biol Biochem* 78:170-181.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.07.021>
- Perzanowska J (2004) Climate of the Pieniny Mointains. *Stud Naturae* 49:21-32
- Pospišilová Ľ, Fasurová N, Jurica L (2014) Fractionation of humus and optical properties of humic acids originating from different soil types. *Acta Univ Agric Silv Mendelianae Brun* 54:45-52. <https://doi.org/10.1118/actaun200654040045>
- Quideau SA, Anderson MA, Graham RC, et al (2000) Soil organic matter processes: Characterization by ¹³C NMR and ¹⁴C measurements. *For Ecol Manage* 138:19-27.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00409-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00409-6)
- Reddy SB, Nagaraja MS, Raj TSP, et al (2012) Soil humic and fulvic acid fractions under different land use systems. *MADRAS Agric J* 99:507-510.
- Saiz-Jimenez C (1996) The chemical structure of humic substances. In: *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, pp 1-44.
- Schmidt MWI, Torn MS, Abiven S, et al. (2011) Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* 478:49-56.
<https://doi.org/10.1038/nature10386>
- Schnitzer M (1999) A lifetime perspective on the chemistry of soil organic matter. *Adv Agron* 68:1-58.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60842-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60842-1)
- Schnitzer M, Khan S (1972) *Humic Substances in the Environment*. Marcel Dekker, New York, USA.
- Skiba S (1999) Characteristics of the soils in Bieszczady National Park. *Zesz Probl Post Nauk Roln* 467:21-32. (in Polish)
- Skiba S, Drewnik M (2000) Soil cover of the Magura National Park (the Carpathians , Beskid Niski Mts). *Rocz Bieszczadzkie* 9:183-195. (in Polish)
- Sokolowska J, Józefowska A, Woźnica K, et al. (2020) Succession from meadow to mature forest: Impacts on soil biological, chemical and physical properties—Evidence from the Pieniny Mountains, Poland. *Catena* 189: 104503 .
<https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104503>
- Stępień-Sałek M (2004) Magura National Park. *Przrz Pol* 02:16-18. (in Polish)
- Stevenson FJ (1994) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Suhett A., MacCord F, Amado A., et al. (2004) Photodegradation of dissolved organic carbon in humic coastal lagoons. In: Neto L, Milori DMB, da Silva WT (eds.), *Humic Substances And Soil And Water Environment*. IHSS, Embrapa. pp 61-69.
- Sun C, Liu J, Wang Y, et al. (2012) Effect of long-term cultivation on soil organic carbon fractions and metal distribution in humic and fulvic acid in black soil, Northeast China. *Soil Res* 50:562.
<https://doi.org/10.1071/SR12100>
- Susic M (2016) Replenishing humic acids in agricultural soils. *Agronomy* 6(4):45.
<https://doi.org/10.3390/agronomy6040045>
- Sutton R, Sposito G (2005) Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environ Sci Technol* 39:9009-9015.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/es050778q>
- Tadini A, Constantino I, Nuzzo A, et al. (2015) Characterization of typical aquatic humic substances in areas of sugarcane cultivation in Brazil using tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis. *Sci Total Environ* 518-519:201-208.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.103>
- Tan KT (2005) *Soil sampling, preparation and analysis*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.
- Thomsen IK, Kruse T, Bruun S, et al. (2008) Characteristics of soil carbon buried for 3300 Years in a bronze age burial mound. *Soil Biol Biochem* 72:1292-1298.
<https://doi.org/https://doi.org/10.2136/sssaj2007.0348>
- Ukalska-Jaruga A, Klimkowicz-Pawlas A, Smreczak B (2019) Characterization of organic matter fractions in the top layer of soils under different land uses in Central-Eastern Europe. *Soil Use Manag* 35:595-606.
<https://doi.org/10.1111/sum.12514>
- Vázquez C, Iriarte AG, Merlo C, et al. (2016) Land use impact on chemical and spectroscopical characteristics of soil organic matter in an arid ecosystem. *Environ Earth Sci* 75:.
<https://doi.org/10.1007/s12665-016-5655-9>
- Viscarra Rossel R, Minasny B, Roudier P, et al. (2006) Colour space models for soil science. *Geoderma* 133:320-337.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.07.017>
- Vodyanitskii YN, Kirillova NP (2016) Application of the CIE-L*a*b* system to characterize soil color. *Eurasian Soil Sci* 49:1259-1268. <https://doi.org/10.1134/S1064229316110107>
- Vodyanitskii YN, Savichev AT (2017) The influence of organic matter on soil color using the regression equations of optical parameters in the system CIE- L*a*b*. *Ann Agrar Sci* 15:380-385. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.05.023>
- Wang H, Chou C, Chiou C, et al. (2016a) Humic acid composition and characteristics of soil organic matter in relation to the elevation gradient of Moso bamboo plantations. *PLoS ONE* 11(9): e0162193.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162193>
- Wang H, Tian G, Chiu C (2016b) Invasion of moso bamboo into a Japanese cedar plantation affects the chemical composition and humification of soil organic matter. *Nat Publ Gr* 1-6.
<https://doi.org/10.1038/srep32211>
- Weber J (2020) Humic substances and their role in the environment. *Agriculture* 03-08.
[https://doi.org/10.1016/0167-8809\(90\)90135-z](https://doi.org/10.1016/0167-8809(90)90135-z)
- Weber J, Chen Y, Jamroz E, et al. (2018) Preface: humic substances in the environment. *J Soils Sediments* 18:2665-2667.
<https://doi.org/10.1007/s11368-018-2052-x>
- Wills SA, Burras CL, Sandor JA (2007) Prediction of soil organic carbon content using field and laboratory measurements of soil color. *Soil Sci Soc Am J* 71:380-388.
<https://doi.org/10.2136/sssaj2005.0384>
- Wilson BR, Moffat AJ, Nortcliff S (1997) The nature of three ancient woodland soils in southern England. *J Biogeogr* 24:633-646.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.1997.tb00074.x>
- Wnuk E, Waśko A, Walkiewicz A, et al. (2020) The effects of humic substances on DNA isolation from soils. *PeerJ* 8: e9378.
<https://doi.org/10.7717/peerj.9378>
- Zalba P, Amiotti N, Galantini JA, et al. (2016) Soil humic and fulvic acids from different land-use systems evaluated by E4/E6 ratios. *Commun Soil Sci Plant Anal* 47:1675-1679.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00103624.2016.1206558>
- Zarzycki J, Korzeniak J (2013) Meadows in the Polish Carpathians - present state , changes and preservation prospects. *Rocz Bieszczadzkie* 21:18-34 (in Polish)
- Zhiyanski M, Glushkova M, Kirova L, et al. (2017) Quantitative and qualitative features of soil humus in mountain treeline ecosystems. *Silva Balc* 18:5-23.

mgr inż. Justyna Sokółowska
Katedra Gleboznawstwa i Agrofizyki
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

Kraków, 23.06.2022 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Sokółowska J., Józefowska A., Zaleski T. 2022. *Humus horizon development during natural forest succession process in the Polish Carpathians*. Journal of Mountain Science 19, 647–661. <https://doi.org/10.1007/s11629-021-6836-x> mój udział polegał na:

- sformułowaniu koncepcji pracy
- opracowaniu założeń prowadzonych badań
- wyborze powierzchni badawczych
- wykonaniu prac terenowych
- doborze metodyki prac laboratoryjnych
- przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych
- wykonaniu analiz statystycznych
- opracowaniu i interpretacji wyników
- opracowaniu tabel i rycin
- przygotowaniu manuskryptu
- pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego
- poprawie pracy po recenzjach.

Mój udział w publikacji wyniósł 70 %.

Justyna Sokółowska

.....
podpis

dr hab. inż. Agnieszka Józefowska, prof. URK
Katedra Gleboznawstwa i Agrofizyki
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

Kraków, 23.06.2022 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Sokołowska J., Józefowska A., Zaleski T. 2022. *Humus horizon development during natural forest succession process in the Polish Carpathians*. Journal of Mountain Science 19, 647–661. <https://doi.org/10.1007/s11629-021-6836-x> mój udział polegał na:

- weryfikacji sformułowania koncepcji pracy
- wykonaniu analiz statystycznych
- nadzorowaniu poprawnej interpretacji wyników
- poprawie pracy po recenzjach.

Mój udział w publikacji wyniósł 20 %.


Podpis

dr hab. inż. Tomasz Zaleski, prof. URK
Katedra Gleboznawstwa i Agrofizyki
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

Kraków, 23.06.2022 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Sokołowska J., Józefowska A., Zaleski T. 2022. *Humus horizon development during natural forest succession process in the Polish Carpathians*. Journal of Mountain Science 19, 647–661. <https://doi.org/10.1007/s11629-021-6836-x> mój udział polegał na:

- nadzorowaniu wyboru powierzchni badawczych
- nadzorowaniu prac terenowych
- nadzorowaniu poprawnej interpretacji wyników.

Mój udział w publikacji wyniósł 10 %.



.....
podpis

Article

Impact of Natural Forest Succession on Changes in Soil Organic Carbon in the Polish Carpathian Mountains

Justyna Sokołowska, Agnieszka Józefowska *  and Tomasz Zaleski

Department of Soil Science and Agrophysics, University of Agriculture in Krakow, al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków, Poland; justyna.sokolowska@student.urk.edu.pl (J.S.); tomasz.zaleski@urk.edu.pl (T.Z.)

* Correspondence: agnieszka.jozefowska@urk.edu.pl

Abstract: The main driver of the Carpathian landscape is the process of natural forest succession on the semi-natural meadows unique to the region. Moreover, these semi-natural mountain meadows contribute to ecosystem services, although increasing forest areas are recommended by current international policy agendas. The purpose of this study was to examine the impact of natural forest succession in the Polish part of Carpathian on changes in soil organic carbon and assess the influence of different soil properties on organic carbon content across three land uses. Soil samples were taken from 10 transects consisting of semi-natural mountain meadow, natural successional forest and old-growth forest, selected in three Polish Carpathian national parks. Measurements of organic carbon, dissolved organic carbon, microbial properties, such as microbial respiration, and enzyme activities were made; additionally, biochemical indicators were calculated. To describe the influence of measured soil parameters and calculated indicators of soil organic carbon changes, the organic carbon dependent variable regression equations across all studied soils and for the individual land use and examined layers were evaluated. The overall regression equation indicated that changes in organic carbon general to all investigated soils depended on microbial biomass carbon content, microbial quotient, dissolved organic carbon content and metabolic quotient. The regression models obtained for the individual land use variants and soil layers explained 77% to 99% of the variation in organic carbon. Results showed that natural forest succession caused a decrease in microbial biomass carbon content, and successional forest soils characterized less efficient use of organic substrates by microbial biomass.

Keywords: ecosystem services; landscape transformation; protected areas management; microbial activity; microbial respiration



Citation: Sokołowska, J.; Józefowska, A.; Zaleski, T. Impact of Natural Forest Succession on Changes in Soil Organic Carbon in the Polish Carpathian Mountains. *Forests* **2022**, *13*, 744. <https://doi.org/10.3390/f13050744>

Academic Editor: Choonsig Kim

Received: 6 April 2022

Accepted: 8 May 2022

Published: 11 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

European mountain areas are characterized by the high diversity of habitats resulting from natural conditioning as well as human activity. The Carpathian Mountains are the largest, longest and most fragmented mountain chain in Europe. Moreover, this mountain chain is characterized by a high variety of relief, with intra-mountainous regions, depressions, sub-mountain hills and lowlands. These, along with altitudes exceeding 2500 m, contribute to the magnificent landscape of the Carpathians [1].

Semi-natural mountain meadows are an integral part of the Carpathian landscape [2]. In recent times, however, less-productive and inconveniently located grasslands are being increasingly abandoned [3] due to socio-economic changes in the Carpathians. Following abandonment, overgrowing of these unique meadows by the surrounding forest has begun to progress. The negative and positive effects of these land-use changes and continuous natural forest succession in the Polish part of Carpathians are a debatable issue, especially in the context of carbon sequestration and climate changes. In any case, semi-natural mountain meadows have a great contribution to ecosystem services. These areas provide food, e.g., hay for sheep; regulating services, e.g., water regulation, preventing soil erosion

and carbon sequestration; supporting services, such as primary production and water cycling; and cultural services, e.g., tourism and contributing to the overall landscape. Moreover, it is well known that land-cover changes influence carbon cycling in the soil. Thus, the Polish part of the Carpathian Mountains is an appropriate study area to assess changes in the soil carbon cycle during natural forest succession.

The importance of such studies was highlighted by Garcia-Pausas et al. [3], who stated that woody plants can significantly influence carbon balance, but the size of this effect is still unknown. Moreover, soils contain more than twice the carbon found in the atmosphere [4]; thus, even a little change in soils may greatly influence the carbon balance. Many authors [5–7] have reported the impact of land-use changes on organic carbon content in soil. Nevertheless, land-use changes simultaneously may cause carbon sequestration or carbon dioxide emission. Restoring grasslands, forest or other native vegetation on former croplands increases soil organic carbon content [4]. However, there is still a lack of knowledge covering the impact of natural processes, such as forest succession on soil organic carbon.

Some of the main factors that influence soil organic carbon changes are biotic properties, consisting mainly of the quantity and quality of carbon inputs into soil. These factors work together with climatic variables and abiotic soil factors to regulate carbon dynamics in soils [8]. Natural forest succession processes in the Carpathian make it possible to distinguish different kinds of carbon inputs, such as easily decomposed grass in meadows, fresh fall from young, successional trees and the constant supply of fresh litter during the climax stage of a forest. As such, studies on soil organic carbon changes in a changing mountain environment may be particularly useful.

Soil is a dynamic environment in which accumulation and decomposition of organic matter continuously occur. Two crucial processes leading to transformation of soil organic matter are mineralization and humification. According to Kandeler et al. [9], microorganisms play an important role in organic matter decomposition, especially mineralization, mainly via respiratory processes. Measurement of soil heterotrophic respiration, referring to the production of CO₂ from microbial respiration [10], is simply a method to describe overall soil conditions, as well as the activity of the microbial community in soil [11]. This process has an essential contribution to carbon cycling and the global carbon budget by releasing carbon dioxide from the soil to the atmosphere [12].

Studies on soil heterotrophic and autotrophic respiration were used to predict soil carbon processes and below-ground carbon sequestration in successional forests [13]. Microbial soil respiration was also broadly used in the studies to monitor changes between different land-use areas, such as grasslands converted to cornfields [14], wheat fields, vineyards and cherry farms [15], or natural forest, arable lands, citrus gardens and paddy fields [16], but studies on natural soil-respiration changes in land-use transformation are very rare. Soil heterotrophic respiration is usually used in combination with other indicators, such as microbial biomass carbon as an indicator of soil quality. Some authors [17,18] have highlighted the importance of quantifying soil microbial activity parameters as indicators enhancing the evaluation of changes in land use.

Additionally, other parameters, such as metabolic quotient, microbial quotient and mineralization quotient, have been evaluated to monitor the changes in soil quality connected with soil organic carbon cycle [16,19,20]. The metabolic quotient was used as an index of microbial efficiency in utilizing the available resources [18], as well as an indicator of the degree of substrate limitation for soil microbes [21]. The microbial quotient reflects the microbial biomass contribution to soil organic carbon and also indicates the fraction of recalcitrant organic matter in the soil [20]. Moreover, the microbial quotient was characterized as an indicator of further changes in organic matter during land-use alterations [22]. The mineralization quotient expresses the fraction of total organic carbon mineralized during the incubation time [20] and was used as an indicator of condition stability of chemical, biochemical and microbiological properties [16], as well as being characterized as an indicator of the efficiency of micro-flora in metabolizing soil organic

carbon [23]. Nevertheless, Mganga et al. [19] defined the mineralization quotient as the most sensitive indicator of land-use change from natural ecosystem to agroecosystem.

These parameters are widely used in research as responsive indicators of soil quality, which may help to explain ecological processes of the environment [24]. Thus, in this study, metabolic quotient, microbial quotient, mineralization quotient and chosen microbial soil properties were used as the indicators to help assess and explain soil organic carbon changes during the natural forest succession in the Polish part of Carpathians. The purposes of this study were to (i) examine the impact of natural forest succession on the soil organic carbon content, (ii) assess the differences of measured soil properties and biochemical indicators in semi-natural mountain meadows, natural succession forest and old-growth forest and (iii) investigate the soil properties and biochemical parameters affecting soil organic carbon content across changing land uses.

2. Materials and Methods

2.1. Research Area

The study area was located in the Carpathian Mountains, covering the southern part of Poland. Soil samples were collected from the three Polish Carpathian national parks—Pieniny National Park (PNP), Bieszczady National Park (BdNP) and Magura National Park (MNP)—which are located in different parts of the Polish Carpathians (Figure 1).

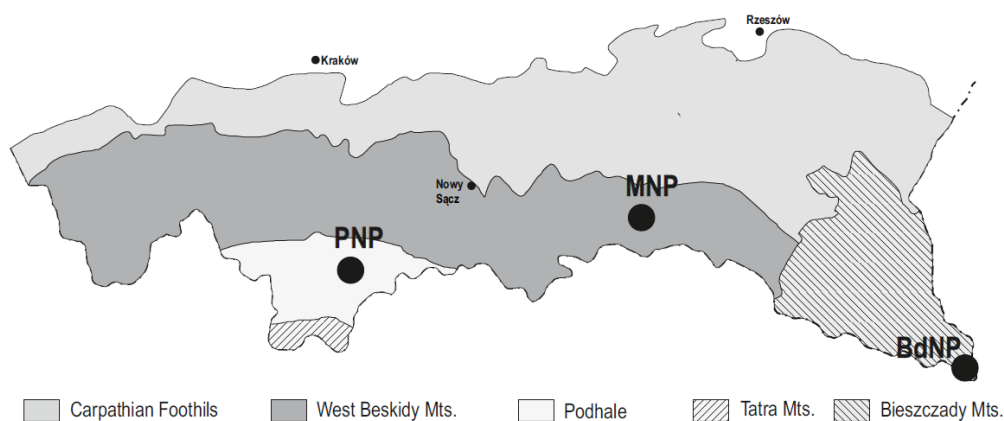


Figure 1. The location of the examined national parks in the Polish part of the Carpathian Mountains. BdNP—Bieszczady National Park, MNP—Magura National Park, PNP—Pieniny National Park.

The Carpathian Mountains are characterized by diversity of geological cover; in the PNP, one of the dominant parent materials are rocks of sandstone–shale series with an admixture of carbonate binder [25], whilst the BdNP and MNP soils were formed on the Carpathian Flysch with the dominance of sandstones, mudstones and shales [26]. Almost all of the investigated soils of PNP, BdNP and MNP were classifiable as cambisols with a varied trophicity (dystric and eutric cambisols) (Table 1) and were classified as loamy [27]. The basic soil properties of examined soil depended mainly on location. The highest content of total nitrogen and higher pH values were found in PNP compared to BdNP and MNP. However, BdNP characterized the highest C:N ratio [27].

Table 1. Location of the study areas and soil units at the area of the transects according to World Reference Base for Soil Resources (WRB) classification (IUSS Working Group WRB, 2015).

Location	Number of Transect	Land Use	GPS Co-Ordinates	Soil Unit (WRB)	
Eastern Outer Carpathians	1	Meadow	49°06'22.0" N 22°43'50.5" E	Dystric Endoskeletal Endostagnic Cambisols	
		Succession	49°06'20.1" N 22°43'48.2" E	Dystric Endoskeletal Cambisols	
		Forest	49°06'27.8" N 22°43'55.0" E	Dystric Leptic Skeletic Cambisols	
	2	Meadow	49°07'51.3" N 22°35'49.1" E	Dystric Endoskeletal Amphistagic Cambisols	
		Succession	49°07'45.0" N 22°35'37.1" E	Dystric Endoskeletal Cambisols	
		Forest	49°08'00.9" N 22°36'05.0" E	Dystric Cambic Skeletic Leptosols	
	3	Meadow	49°06'51.1" N 22°34'12.8" E	Dystric Skeletic Epistagnic Cambisols	
		Succession	49°06'52.3" N 22°34'14.5" E	Dystric Skeletic Cambisols	
		Forest	49°06'54.2" N 22°34'34.2" E	Dystric Endoskeletal Leptic Cambisols	
	4	Meadow	49°03'20.4" N 22°41'41.4" E	Eutric Cambisols	
		Succession	49°03'17.1" N 22°41'18.1" E	Dystric Endoskeletal Cambisols	
		Forest	49°03'21.8" N 22°40'35.9" E	Dystric Skeletic Cambisols	
Western Outer Carpathians	1	Meadow	49°27'53.8" N 21°29'02.3" E	Eutric Endoskeletal Cambisols	
		Succession	49°27'46.4" N 21°29'04.8" E	Eutric Skeletic Cambisols	
		Forest	49°27'33.0" N 21°28'28.2" E	Dystric Skeletic Cambisols	
		Meadow	49°26'43.6" N 21°29'38.2" E	Dystric Skeletic Cambisols	
	2	Succession	49°26'25.3" N 21°29'55.8" E	Dystric Endoskeletal Cambisols	
		Forest	49°26'21.3" N 21°29'35.5" E	Dystric Cambisols	
		Meadow	49°28'54.2" N 21°25'23.3" E	Eutric Skeletic Cambisols	
	3	Succession	49°28'48.3" N 21°25'14.0" E	Dystric Endoskeletal Cambisols	
		Forest	49°28'48.4" N 21°24'46.2" E	Eutric Skeletic Cambisols	
	Western Inner Carpathians	1	Meadow	49°25'31.8" N 20°25'28.0" E	Eutric Endoskeletal Cambisols
			Succession	49°25'35.3" N 20°25'31.1" E	Eutric Endoskeletal Cambisols
			Forest	49°25'34.6" N 20°25'33.4" E	Eutric Skeletic Cambisols
2		Meadow	49°25'30.1" N 20°25'03.1" E	Eutric Endoskeletal Cambisols	
		Succession	49°25'28.5" N 20°25'11.4" E	Eutric Cambic Leptosols	
3		Forest	49°25'30.1" N 20°25'08.6" E	Eutric Endoskeletal Cambisols	
	Meadow	49°25'49.9" N 20°19'36.8" E	Eutric Cambisols		
	Succession	49°25'48.7" N 20°19'38.4" E	Endoeutric Cambisols		
		Forest	49°25'48.9" N 20°19'39.5" E	Endoeutric Cambisols	

2.2. Sampling Scheme

In each national park, three (PNP, MNP) or four (BdNP) transects consisting of semi-natural meadow, natural succession forest and old-growth forest were chosen (Table 1). These areas were chosen based on the historical data about land use of the study area and available satellite maps covering the study area.

The semi-natural meadows occur at sites whose natural vegetation is forest and were created as a result of forest clearing during the colonization of the Polish part of Carpathians in the 13th and 14th centuries. Over centuries, the semi-natural meadows were used for agriculture, especially pasture activity. They are formed mostly by native species of perennial plants, which have spread across the landscape because of human activity [28]. The natural succession forests are areas covered by 25–70-year-old forest and were created by overgrowing abandoned meadows. They are formed by different successional tree

species and are dominated by *Fagus sylvatica* L. (common beech). The old-growth forests are areas covered by more than 150-year-old forests. The study old-growth forest stands belong to a *Dentario glandulosae-Fagetum* (Carpathian beech forest) forest habitat.

In each of the selected areas (semi-natural meadow, succession forest, and old-growth forest) in each of 10 study transects, five soil samples from both 0–10 cm and 10–20 cm soil layers were taken. Soil samples were collected using a metal five-centimetre-diameter core.

2.3. Laboratory Analyses

In the laboratory, fresh soil samples were sieved with a 2 mm mesh, and a portion of each soil sample was kept at $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to laboratory analysis. One week prior to the analyses, soil samples were preincubated at a temperature of $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ and a soil moisture value equal to 40–60% water holding capacity was achieved. The rest of each soil sample was air-dried and also sieved with a 2 mm mesh.

Microbial respiration, microbial biomass carbon (MBC), dissolved organic carbon (DOC), dehydrogenase activity (DHA) and invertase activity (INV) were assessed in the fresh soil samples. Microbial respiration was estimated by the incubation method. First, 10 g of fresh soil was placed into a 100 mL vial containing a small beaker of 3 mL 0.5 M NaOH as a carbon dioxide trap. Next, the vial with the fresh soil/NaOH beaker was hermetically closed for a three-day sampling period. Incubation took place at a constant temperature of $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. After the three-day sampling period, the vial was opened and the carbon dioxide evolved from soil was quantified by titration with 0.05 M HCl after the addition of 2 mL of BaCl_2 . After this, the vial was opened and ventilated for four days. Blank samples, i.e., vials containing only beakers with NaOH, were used to assess carbon dioxide trapped during incubation from the air closed in the vials and during handling. The microbial respiration measurements were repeated once a week for five weeks.

MBC was evaluated using a fumigation–extraction method [29]. DOC content was measured following extraction using 5 mM CaCl_2 (soil: CaCl_2 ratio 1:10) and filtered by $0.45\text{ }\mu\text{m}$. MBC and DOC were measured using the dry combustion method with a Euro Thermo TOC-TN 1200 (Landsmeer, The Netherlands). DHA levels were assessed using the method presented by Casida et al. [30], while INV activity was determined as previously described Frankenberger and Johanson [31]. Enzyme activities were measured using a Shimadzu UV-1800 (Kyoto, Japan) spectrophotometer. In air-dried soil samples, the content of total organic carbon (C_{org}) according to the oxidation and reduction Tiurin method was measured [32].

2.4. Calculations and Statistical Analyses

Based on the first-order kinetic model of microbial respiration ($C_m = C_0(1 - e^{-kt})$), the calculated cumulative value of mineralized carbon during incubation time (35 days) (C_m), potentially mineralizable carbon (C_0) and rate constant (k) were estimated [33].

Based on the obtained results of microbial parameters and carbon content, the following biochemical indicators were calculated: (1) metabolic quotient ($q\text{CO}_2$), expressing the ratio of microbial respiration (C-CO_2) to soil microbial biomass carbon (MBC) ($q\text{CO}_2 = \text{C-CO}_2/\text{MBC}$) [34]; (2) the microbial quotient ($q\text{MIC}$), representing the quotient of soil microbial biomass carbon (MBC) and total organic carbon content (C_{org}) ($q\text{MIC} = \text{MBC}/\text{C}_{\text{org}}$); and (3) the mineralization quotient ($q\text{M}$), estimated as the ratio of cumulative respiration ($\text{CR}_{5\text{weeks}}$) and total organic carbon content (C_{org}) ($q\text{M} = \text{CR}_{5\text{weeks}}/\text{C}_{\text{org}}$) [16].

Statistical analyses were performed using Statistica 13.0 software. Means and standard errors were estimated for individual land-use variants (meadow, succession forest and old-growth forest) for both the 0–10 cm and 10–20 cm layers. To describe the influence of measured soil parameters and calculated indicators of soil organic carbon changes, the C_{org} dependent variable regression equations across all studied soils and for the individual land-use and examined layers were evaluated. Moreover, differences in examined soil properties and calculated indicators for the different land-use variants and soil layers were assessed using a one-way ANOVA post hoc Tuckey's test at a significance level of $p = 0.05$.

3. Results

3.1. Total Organic Carbon and Labile Carbon

The mean C_{org} content slightly increased from semi-natural meadow soils (MS) to succession forest soils (SS) to old-growth forest soils (FS) in the 0–10 cm layer, while, in the 10–20 cm layer, SS had the lowest C_{org} and FS the highest. Across all land uses the content of C_{org} in the 0–10 cm layer was significantly higher compared to the 10–20 cm layer. (Figure 2). In the 0–10 cm layer, the lowest DOC values were found in SS and the highest in FS, while, in the 10–20 cm layer, the mean DOC content increased from MS to SS (Figure 2). SS had the lowest MBC content in both examined layers, but only in the 10–20 cm layer was the MBC significantly higher in MS compared to SS (Figure 2).

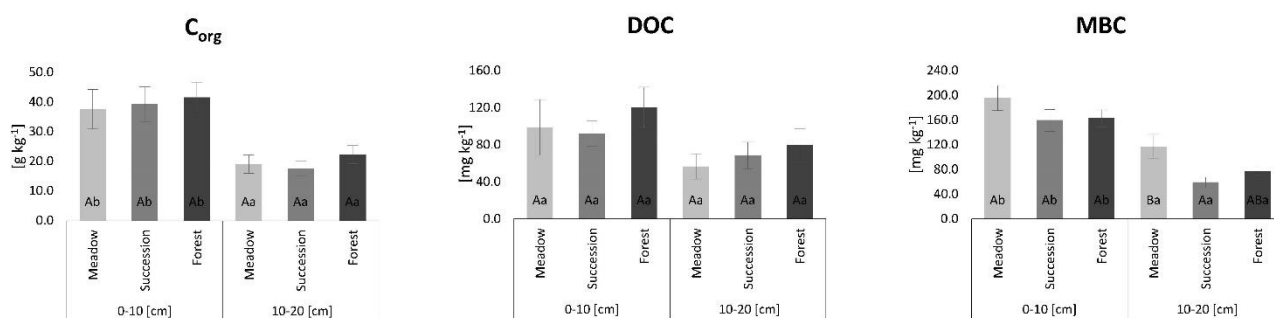


Figure 2. Content of total organic carbon (C_{org}), dissolved organic carbon (DOC) and microbial biomass carbon (MBC) in soils. The lowercase letters indicate differences between examined soil layers for individual land-use variants, while uppercase letters show differences between land-use variants separately for the 0–10 and 10–20 cm soil layers (Tukey post hoc test, $p < 0.05$). Standard error is reported as bars.

3.2. Microbial Activity

Enzyme activity patterns differed depending on the examined enzyme (Figure 3). DHA decreased from MS to SS to FS in the 0–10 cm layer but had the highest mean values for MS and the lowest for SS in the 10–20 cm layer. FS had the highest INV activity and SS the lowest activity in both the 0–10 and 10–20 cm layers (Figure 3).

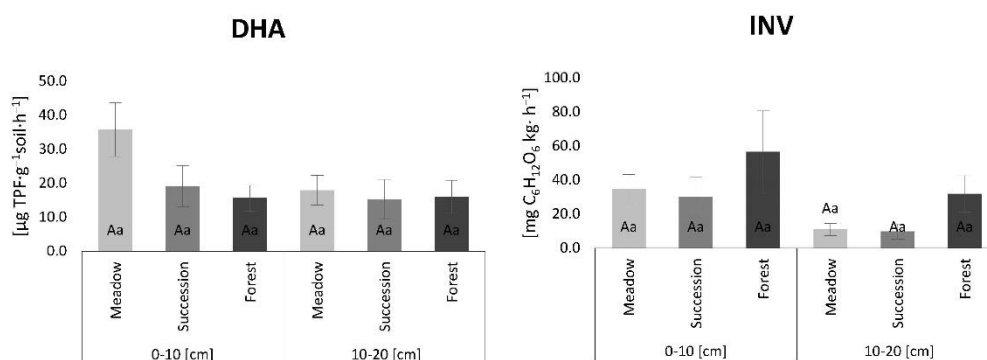


Figure 3. Dehydrogenase activity (DHA) and invertase activity (INV) results. The lowercase letters indicate differences between examined layers for individual land-use variants, while uppercase letters show differences between land-use variants separately for the 0–10 and 10–20 cm layers (Tukey post hoc test, $p < 0.05$). Standard error is reported as bars.

The mean microbial respiration ranged from $0.09\ mg\ CO_2\ g\ soil^{-1}\ 24\ h^{-1}$ (FS, 0–10 cm, 5th week) to $1.57\ mg\ CO_2\ g\ soil^{-1}\ 24\ h^{-1}$ (MS, 0–10 cm, 1st week). Overall, the microbial respiration values decreased with the incubation period. In the 0–10 cm layer, SS had the highest microbial respiration values in almost all incubation weeks, except the first week. In the 10–20 cm layer, over the first three weeks, the highest microbial respiration values

were found in SS; however, in the fourth and fifth weeks, the highest values were noted in MS (Figure 4).

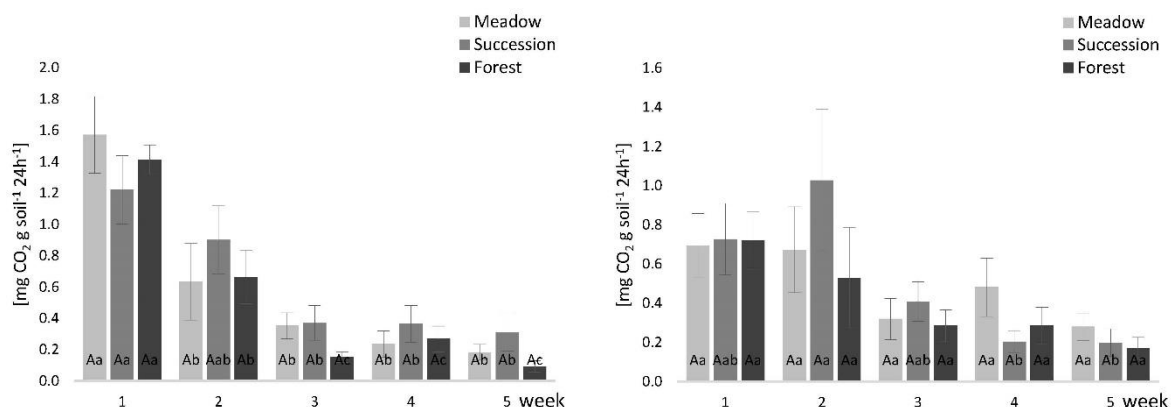


Figure 4. Soil respiration results for the (a) 0–10 cm and the (b) 10–20 cm soil layers. The lowercase letters indicate differences between individual weeks in the same land-use variants, while uppercase letters show differences between land-use variants for individual weeks (Tukey post hoc test, $p < 0.05$). Standard error is reported as bars.

The calculated values of mineralized carbon during the incubation time (C_m) and potentially mineralizable carbon pools (C_0) did not differ significantly between individual land-use variants as layers (Table 2). However, in the 0–10 cm layer, the mean C_m and C_0 values were the highest in SS and the lowest in FS. Meanwhile, in the 10–20 cm layer, the highest C_m and C_0 mean values were found in SS and MS, respectively. In contrast, the first-order rate constant of labile pool mineralization (k) was significantly lower in MS and SS compared to FS in the 0–10 cm layer (Table 2).

Table 2. Mean and standard error values of cumulative value of mineralized carbon during incubation 35 days (C_m), potentially mineralizable carbon (C_0) and rate constant (k) results. The lowercase letters indicate differences between examined soil layers for individual land-use variants, while uppercase letters show differences between land-use variants separately for the 0–10 and 10–20 cm soil layers (Tukey post hoc test, $p < 0.05$). Standard error is reported behind “±”.

Layer (cm)	Land Use	C_m (mgC-CO ₂ g ⁻¹)	C_0 (mgC-CO ₂ g ⁻¹)	k
0–10	Meadow	20.58 ± 1.72 ^{Aa}	25.73 ± 4.66 ^{Aa}	0.081 ± 0.007 ^{Ab}
	Succession	22.17 ± 2.69 ^{Aa}	32.75 ± 5.23 ^{Aa}	0.059 ± 0.011 ^{Aa}
	Forest	18.14 ± 1.53 ^{Aa}	18.93 ± 1.59 ^{Aa}	0.095 ± 0.002 ^{Bb}
10–20	Meadow	16.97 ± 2.55 ^{Aa}	33.76 ± 6.11 ^{Aa}	0.045 ± 0.012 ^{Aa}
	Succession	17.96 ± 2.62 ^{Aa}	26.68 ± 4.55 ^{Aa}	0.047 ± 0.009 ^{Aa}
	Forest	13.91 ± 2.40 ^{Aa}	24.30 ± 6.22 ^{Aa}	0.063 ± 0.013 ^{Aa}

3.3. Biochemical Indicators

The calculated values of the biochemical indicators slightly depended on land use and soil layer (Table 3). The qCO_2 mean value was almost two times higher in SS compared to MS and FS in the 10–20 cm layer. Mean $qMIC$ decreased from MS to SS to FS in both examined soil layers; significant differences were found between soils in the 10–20 cm layer. Mean qM slightly decreased from MS to FS in the 0–10 cm layer, whereas in the 10–20 cm layer the qM mean value in SS was about 47% higher compared to FS. Moreover, the mean values of qCO_2 and qM in the 0–10 cm layer of SS were significantly lower than the 10–20 cm layer (Table 3).

Table 3. Mean and standard error values of metabolic quotient (qCO_2), microbial quotient ($qMIC$) and mineralization quotient (qM) results. The lowercase letters indicate differences between examined soil layers for individual land-use variants, while uppercase letters show differences between land-use variants separately for the 0–10 and 10–20 cm soil layers (Tukey post hoc test, $p < 0.05$). Standard error is reported behind “ \pm ”.

Layer (cm)	Land Use	qCO_2 ($mgC-CO_2 \text{ mgMBC}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$)	$qMIC$ ($mgMBC \text{ gC}_{org}^{-1}$)	qM ($mgC-CO_2 \text{ mg C}_{org}^{-1}$)
0–10	Meadow	3.60 ± 0.68 ^{Aa}	6.12 ± 0.83 ^{Aa}	0.76 ± 0.19 ^{Aa}
	Succession	4.19 ± 0.61 ^{Aa}	4.47 ± 0.52 ^{Aa}	0.62 ± 0.08 ^{Aa}
	Forest	3.38 ± 0.37 ^{Aa}	4.21 ± 0.39 ^{Aa}	0.49 ± 0.06 ^{Aa}
10–20	Meadow	6.51 ± 1.77 ^{Aa}	7.14 ± 1.34 ^{Ba}	1.15 ± 0.33 ^{Aa}
	Succession	12.87 ± 3.93 ^{Ab}	3.82 ± 0.61 ^{Aa}	1.32 ± 0.30 ^{Ab}
	Forest	6.35 ± 1.83 ^{Aa}	3.83 ± 0.47 ^{Aa}	0.84 ± 0.23 ^{Aa}

3.4. Parameters Affecting Soil Organic Carbon Content

The overall regression equation indicated that the soil organic carbon content, across all studied soils, depended on MBC, $qMIC$, DOC and qCO_2 values, according to the equation:

$$C_{org} = 28.6 + 0.22MBC - 4.83qMIC - 0.02DOC - 0.21qCO_2 \quad (1)$$

The obtained model explained 83% of the variance in the dependent variable, and the standard error of estimation was 7.5. Nevertheless, when we took into consideration the regression equations for individual land-use variants, we can state that different microbial parameters and biogeochemical indexes shaped C_{org} content depending on land cover and soil layer. Comparing the regression models for meadow, succession forest and old-growth forest soil for both examined layers, it was noted that the models for different land-use variants clearly differed between MS, SS and FS for the 0–10 cm layer, while, in the 10–20 cm layer, C_{org} MS and FS depended on the same parameters (Table 4). The regression models explained 77% to 99% of the variation in C_{org} in the individual land-use variants and soil layers.

Table 4. Total organic carbon (C_{org}) dependent variable regression for individual examined land-use and soil layer variants.

Land Use Layer (cm)	Meadow		Succession		Forest	
	0–10	10–20	0–10	10–20	0–10	10–20
Free word	−5.10	2.59	39.22	12.01	67.24	45.98
qM	−0.39	−0.09	-	−0.01	−0.30	0.23
C_m	2.90	-	-	-	2.04	-
DHA	0.41	-	−0.39	-	0.57	-
$qMIC$	-	−0.52	−9.14	−3.24	−5.60	−9.54
MBC	-	0.14	0.35	0.30	-	0.19
DOC	-	−0.10	−0.11	−0.03	−0.06	−0.05
INV	-	0.38	0.09	0.10	−0.04	-
qCO_2	-	2.41	-	0.16	−7.18	−2.75
Corrected R^2	0.77	0.93	0.95	0.97	0.99	0.95
Estimation error	10.11	2.52	4.16	1.53	0.79	2.17

qM —mineralization quotient; C_m —cumulative value of mineralized carbon during incubation time (35 days); DHA—dehydrogenase activity; $qMIC$ —microbial quotient; MBC—microbial biomass carbon; DOC—dissolved organic carbon; INV—invertase activity; qCO_2 —metabolic quotient.

4. Discussion

4.1. Impact of Natural Forest Succession on Soil Organic Carbon

Land-use change is one of the main factors influencing the organic carbon cycle. Many studies, Bell et al., Liu et al., Luo et al., Mganga et al. [19,35–37], highlighted the importance

of land-use conversion on soil organic carbon dynamics. Moreover, such changes in land cover and land use can have a significant impact on global carbon pools and fluxes [38]. While, here, only a slight increase in C_{org} during natural forest succession was noted, this was also confirmed in a previous study [39]. However, according to estimations, even a marginal (0.01% annually) increase in C_{org} content in soil via carbon sequestration may easily offset annual rises in the atmospheric carbon dioxide [40]. Thus, even small changes may play an important role in carbon dynamics, carbon cycle and carbon sequestration at both the local and global scale.

Natural succession is the default management strategy for the abandonment of agricultural lands, which influence both aboveground and belowground carbon accumulation [41]. Moreover, natural forest succession increases forested areas, which are considered an important soil organic carbon pool. Forest soils contain almost half of the total organic carbon in terrestrial ecosystems [42] and play a crucial role in the context of carbon sequestration; therefore, increasing forest areas is recommended by current international policy agendas. On the other hand, overgrowth of highly valuable semi-natural meadows in Polish national parks in the Carpathian Mountains, caused by a continuous process of natural forest succession, can decrease biodiversity and cause the disappearance of unique mountain landscapes [43,44]. The differences in meadow and forest ecosystem stability compared to succession forests has been highlighted in previous studies [39,45]. However, the present study showed a greater similarity of C_{org} changes in MS and FS in the 0–10 cm layer, while, in the 10–20 cm layer, the factors shaping C_{org} in MS and SS were the same. Such results may confirm that the 0–10 cm soil layer is more susceptible to changes along land-use and land cover changes, such as natural forest succession.

4.2. The Soil Properties and Biochemical Parameters Affecting Soil Organic Carbon Content across Changing Land Uses

The influence of studied soil properties and calculated parameters on C_{org} across all land uses in the Polish Carpathians was more differential in the 0–10 cm layer compared to the 10–20 cm soil layer. Forests and grasslands are assumed to be stable ecosystems, playing a crucial role in carbon sequestration and the carbon cycle. Moreover, grasslands, through photosynthesis, capture about 20% of the CO_2 released to the atmosphere annually [46]. Thus, the regression results of our study showed that the content of C_{org} in FS and MS in the 0–10 cm layer is determined by some similar parameters. The positive impact of DHA in the regression model of C_{org} in MS and FS highlights an important role of microbial activity in shaping the organic carbon pool in such ecosystems. Maini et al. [47] related that DHA levels vary in soils of different land uses with the addition of organic residues on the soil surface. However, Błońska et al. [48] found a large amount of component of nutrient cycling in the initial stages of organic matter decomposition in forest systems, which resulted in higher DHA levels. Meanwhile, in the 0–10 cm layer of SS, the INV level had significant influence on the C_{org} content. Invertase is one of the most important enzymes in the soil carbon cycle and is related to the transformation and decomposition of soil organic carbon by hydrolyzing carbohydrates to sugars and oligomers that are suitable for uptake by plants and microbes [49].

The positive influence of INV and MBC on C_{org} , as well as the fact that the lowest mean values of these parameters were found in SS, may indicate that the presence and activity of microorganisms in such a constantly changing environment is the limiting factor for C_{org} changes in succession land use. According to Souza et al. [50], the ability of microbial biomass to convert organic carbon under stress is reduced, resulting in decreased qMIC levels. Natural forest succession caused the deterioration of conditions for microbial growth, which was confirmed by the decrease in qMIC from MS to FS, as well as the negative impact of qMIC in the regression of C_{org} in SS and FS. In contrast, Susyan et al. [51] noted an increase in qMIC levels within secondary forest succession. However, Insam and Domsch [52] reported declining qMIC in open-pit mine soils under forest succession, which indicated decreasing C_{org} availability due to progressive accumulation of recalcitrant

humic material. Additionally, C_{org} in the 0–10 cm layer for MS and FS was significantly influenced by mineralization parameters (qM and C_m), which may also confirm the higher stability of such ecosystems.

Bakhshandeh et al. [16] used qM as an indicator of chemical, biochemical and microbiological soil properties' stability. Meanwhile, here, natural forest succession influenced an increase in C_m and C_0 content in the 0–10 cm layer, which indicated faster mineralization of organic matter in SS compared to FS and MS. According to Moscatelli et al. [33], lower values of C_m and C_0 demonstrate lower respiration rates and the presence of a smaller fraction of organic carbon available for mineralization. Nevertheless, the rate constant of labile pool mineralization in SS was significantly lower compared to FS. Similarly, Jiang et al. [53] found the highest k values in forest land compared to other land-use types.

Conversely, in the 10–20 cm layer, the influence of natural forest succession on organic carbon changes was inconsiderable; especially in the MS and SS, the same parameters defined the C_{org} content in regression models. However, the qCO_2 , which is a frequently used indicator of ecosystem development and soil disturbance [54], was the most important parameter that influenced C_{org} changes in Carpathian soils, especially in the 10–20 cm layer. SS had the highest qCO_2 ; similar results were presented by Susyan et al. [51], who found the highest qCO_2 values in succession stages on the arable lands. Susyan et al. [51] also stated that the lack of a decline in qCO_2 values during forest succession confirmed simultaneous changes in microbial biomass and respiration activity. The MS and FS in the Carpathians had a higher microbial efficiency in utilizing the available resources, which was related to the lower qCO_2 [19].

Additionally, lower qCO_2 in MS and FS may reflect the higher stability of organic substrates by the presence of microbial biomass [55]. However, the highest qCO_2 in SS was related to the lowest MBC, especially in the 10–20 cm layer. Such results are in agreement with Umarov et al. [56], who showed an increase in microbial biomass carbon content during the first 17 years after secondary forest succession, which then gradually decreased and remained at a quite constant level after 24 years of succession. Nevertheless, Susyan et al. [51] stated that microbial biomass increase could be related to increasing input and accumulation of organic carbon during forest succession, and, in disagreement with our results, they noted an increase in microbial biomass carbon along succession. Likewise, Mganga et al. [19] found lower qM values in the natural ecosystem in the Mt. Kilimanjaro region compared to arable land, which was associated with lower ratios of easily mineralizable organic matter to stable organic matter in soils under natural vegetation. These findings are in accord with our results obtained for FS, expressed by the qM values and regression models.

5. Conclusions

Despite no significant differences in the content of C_{org} between semi-natural meadow, succession and old-growth forest, the natural forest succession in the Polish Carpathian Mountains influences the type and the rate of the C_{org} decomposition and transformation. The obtained results have shown that the natural forest succession caused a decrease in MBC content, especially in the 10–20 cm layer. Moreover, SS characterized less efficient use of organic substrates by microbial biomass compared to MS and FS, expressed by qCO_2 .

Overall, across all studied soils, the significant impact on C_{org} had MBC, $qMIC$, qCO_2 and DOC. The obtained model explained 83% of the variance in C_{org} . Meanwhile, the content of C_{org} in the individual land-use variants and depths was shaped by different biochemical factors depending on land use and soil layer. In the 0–10 cm soil layer, the differences between MS and SS, and FS and SS were more distinct, while the changes in C_{org} in MS and FS were determined by similar properties. Meanwhile, in the 10–20 cm layer in MS and SS, the C_{org} content was shaped by the same parameters.

The insight into C_{org} changes confirmed the findings that meadows and forests are stable ecosystems that were formed over hundreds of years, while successional processes are dynamic continuously changing ecosystems—ecotone zones. The stability of meadow

and forest ecosystems is an important issue in the context of carbon sequestration and climate change. Taking into account the problems of decision makers managing protected areas, such as national parks, it would be appropriate to protect the semi-natural mountain meadows to preserve their biodiversity and the ecosystem services they provide, which are important globally, but even more at the local scale.

Author Contributions: Conceptualization, J.S., A.J. and T.Z.; methodology, J.S. and A.J.; software, not applicable; validation, J.S. and A.J.; formal analysis, J.S. and A.J.; investigation, J.S.; resources, J.S.; data curation, J.S.; writing—original draft preparation, J.S.; writing—review and editing, A.J. and T.Z.; visualization, J.S.; supervision, A.J. and T.Z.; funding acquisition, T.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Statutory financial support of Ministry of Science and Higher Education RP Department of Soil Science and Agrophysics [010013-D011 in 2021] University of Agriculture in Krakow.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We wish to thank Cambridge Proofreading team for reading the manuscript and for language corrections.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Cheval, S.; Birsan, M.V.; Dumitrescu, A. Climate variability in the Carpathian Mountains Region over 1961–2010. *Glob. Planet. Change* **2014**, *118*, 85–96. [[CrossRef](#)]
- Tokarczyk, N. Forest encroachment on temperate mountain meadows—Scale, drivers, and current research directions. *Geogr. Pol.* **2017**, *90*, 463–480. [[CrossRef](#)]
- Garcia-Pausas, J.; Romanya, J.; Montané, F.; Rios, A.I.; Taull, M.; Rovira, P.; Casals, P. Are Soil Carbon Stocks in Mountain Grasslands Compromised by Land-Use Changes? In *High Mountain Conservation in a Changing World*; Catalan, J., Ninot, J.M., Mercè, A.M., Eds.; Springer Open: Geneva, Switzerland, 2017; pp. 207–249.
- Smith, P. Land use change and soil organic carbon dynamics. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* **2008**, *81*, 169–178. [[CrossRef](#)]
- Guo, L.; Gifford, R. Soil carbon stocks and land use change: A meta analysis. *Glob. Change Biol.* **2002**, *8*, 345–360. [[CrossRef](#)]
- Martín, J.A.; Álvaro-Fuentes, J.; Gonzalo, J.; Gil, C.; Ramos-Miras, J.J.; Grau Corbí, J.M.; Boluda, R. Assessment of the soil organic carbon stock in Spain. *Geoderma* **2016**, *264*, 117–125. [[CrossRef](#)]
- Nadal-Romero, E.; Cammeraat, E.; Pérez-Cardiel, E.; Lasanta, T. Effects of secondary succession and afforestation practices on soil properties after cropland abandonment in humid Mediterranean mountain areas. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2016**, *228*, 91–100. [[CrossRef](#)]
- Luo, Z.; Feng, W.; Luo, Y.; Baldock, J.; Wang, E. Soil organic carbon dynamics jointly controlled by climate, carbon inputs, soil properties and soil carbon fractions. *Glob. Change Biol.* **2017**, *23*, 4430–4439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kandeler, E.; Stemmer, M.; Gerzabek, M.H. Role of Microorganisms in Carbon Cycling in Soils. In *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*; Buscot, F., Varma, A., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany; New York, NY, USA, 2005; pp. 139–158.
- Yazdanpanah, N.; Mahmoodabadi, M.; Cerdà, A. The impact of organic amendments on soil hydrology, structure and microbial respiration in semiarid lands. *Geoderma* **2016**, *266*, 58–65. [[CrossRef](#)]
- Józefowska, A.; Pietrzykowski, M.; Woś, B.; Cajthaml, T.; Frouz, J. Relationships between respiration, chemical and microbial properties of afforested mine soils with different soil texture and tree species: Does the time of incubation matter. *Eur. J. Soil Biol.* **2017**, *80*, 102–109. [[CrossRef](#)]
- Xu, M.; Shang, H. Contribution of soil respiration to the global carbon equation. *J. Plant Physiol.* **2016**, *203*, 16–28. [[CrossRef](#)]
- Huang, W.; Han, T.; Liu, J.; Wang, G.; Zhou, G. Changes in soil respiration components and their specific respiration along three successional forests in the subtropics. *Funct. Ecol.* **2016**, *30*, 1466–1474. [[CrossRef](#)]
- Mukumbuta, I.; Shimizu, M.; Hatano, R. Short-term land-use change from grassland to cornfield increases soil organic carbon and reduces total soil respiration. *Soil Tillage Res.* **2019**, *186*, 1–10. [[CrossRef](#)]
- Khanghahi, M.Y.; Murgese, P.; Strafella, S.; Crecchio, C. Soil biological fertility and bacterial community response to land use intensity: A case study in the Mediterranean Area. *Diversity* **2019**, *11*, 211. [[CrossRef](#)]
- Bakhshandeh, E.; Hossieni, M.; Zeraatpisheh, M.; Francaviglia, R. Land use change effects on soil quality and biological fertility: A case study in northern Iran. *Eur. J. Soil Biol.* **2019**, *95*, 103119. [[CrossRef](#)]
- Bastida, F.; Moreno, J.L.; Hernández, T.; García, C. Microbiological activity in a soil 15 years after its devegetation. *Soil Biol. Biochem.* **2006**, *38*, 2503–2507. [[CrossRef](#)]

18. Toh, F.A.; Ndam, L.M.; Angwafo, T.E.; Christopher, N. Effect of Land Use Management Patterns on Mineralization Kinetics of Soil Organic Carbon in Mount Bambouto Caldera Area of Cameroon. *Open J. Soil Sci.* **2020**, *10*, 391–409. [CrossRef]
19. Mganga, K.Z.; Razavi, B.S.; Kuzyakov, Y. Land use affects soil biochemical properties in Mt. Kilimanjaro region. *CATENA* **2016**, *141*, 22–29. [CrossRef]
20. Moscatelli, M.C.; Lagomarsino, A.; Marinari, S.; De Angelis, P.; Grego, S. Soil microbial indices as bioindicators of environmental changes in a poplar plantation. *Ecol. Indic.* **2005**, *5*, 171–179. [CrossRef]
21. Dilly, O.; Munch, J.C. Ratios between estimates of microbial biomass content and microbial activity in soils. *Biol. Fertil. Soils* **1998**, *27*, 374–379. [CrossRef]
22. Nsabimana, D.; Haynes, R.; Wallis, F. Size, activity and catabolic diversity of the soil microbial biomass as affected by land use. *Appl. Soil Ecol.* **2004**, *26*, 81–92. [CrossRef]
23. Francaviglia, R.; Renzi, G.; Ledda, L.; Benedetti, A. Organic carbon pools and soil biological fertility are affected by land use intensity in Mediterranean ecosystems of Sardinia, Italy. *Sci. Total Environ.* **2017**, *599–600*, 789–796. [CrossRef] [PubMed]
24. Novak, E.; Carvalho, L.A.; Santiago, E.F.; Portilho, I.I.R. Chemical and microbiological attributes under different soil cover. *Cerne* **2017**, *23*, 19–30. [CrossRef]
25. Niemyska-Lukaszuk, J.; Miechówka, A.; Zaleski, T. The soils of Pieniny National Park and their threats. *Pieniny Przyroda Człowiek* **2002**, *90*, 79–90.
26. Skiba, S.; Drewnik, M.; Klimek, M. Pokrywa glebowa parków narodowych w polskich Karpatach. *Przyroda Człowiek Bóg* **2004**, *1*, 115–125.
27. Sokołowska, J.; Józefowska, A.; Zaleski, T. Humus horizon development during natural forest succession process in the Polish Carpathians. *J. Mt. Sci.* **2022**, *19*, 647–661. [CrossRef]
28. Zarzycki, J.; Korzeniak, J. Meadows in the Polish Carpathians—Present state, changes and preservation prospects. *Rocznik Bieszczadzkie* **2013**, *21*, 18–34.
29. Voroney, P.; Brookes, P.C.; Beyaert, R.P. Soil microbial biomass C, N P and S. In *Soil Sampling and Methods of Analysis*; Carter, M.R., Gregorich, E., Eds.; Lewis Publ. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2007; pp. 637–642.
30. Casida, L.E.; Klein, D.A.; Santoro, T. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* **1964**, *98*, 371–376. [CrossRef]
31. Frankenberger, W.T.; Johanson, J.B. Factors affecting invertase activity in soils. *Plant Soil* **1983**, *74*, 313–323. [CrossRef]
32. Kabała, C.; Karczewska, A. *Metodyka Analiz Laboratoryjnych Gleb i Roślin*, 8th ed.; INoGOOE, UP: Wrocław, Poland, 2017.
33. Moscatelli, M.C.; Di Tizio, A.; Marinari, S.; Grego, S. Microbial indicators related to soil carbon in Mediterranean land use systems. *Soil Tillage Res.* **2007**, *97*, 51–59. [CrossRef]
34. Mondini, C.; Bigot, G.; Sinicco, T.; Mosetti, D. Biochemical indicators of soil fertility in vineyards with different conservative management systems. *BIO Web Conf.* **2019**, *13*, 04009. [CrossRef]
35. Liu, M.; Liu, M.; Li, P.; Yang, J.; Wang, J.; Chang, Q. Variations in soil organic carbon decompositions of different land use patterns on the tableland of Loess Plateau. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2020**, *27*, 4337–4352. [CrossRef] [PubMed]
36. Bell, S.; Barriocanal, C.; Terrer, C.; Rosell-Melé, A. Management opportunities for soil carbon sequestration following agricultural land abandonment. *Environ. Sci. Policy* **2020**, *108*, 104–111. [CrossRef]
37. Luo, Z.; Viscarra Rossel, R.A.; Shi, Z. Distinct controls over the temporal dynamics of soil carbon fractions after land use change. *Glob. Change Biol.* **2020**, *26*, 4614–4625. [CrossRef] [PubMed]
38. Ramesh, T.; Bolan, N.S.; Kirkham, M.B.; Wijesekara, H.; Kanchikerimath, M.; Srinivasa Rao, C.; Sandeep, S.; Rinklebe, J.; Ok, Y.S.; Choudhury, B.U.; et al. Soil organic carbon dynamics: Impact of land use changes and management practices: A review. *Adv. Agron.* **2019**, *156*, 1–107.
39. Sokołowska, J.; Józefowska, A.; Woźnica, K.; Zaleski, T. Succession from meadow to mature forest: Impacts on soil biological, chemical and physical properties—Evidence from the Pieniny Mountains, Poland. *Catena* **2020**, *189*, 104503. [CrossRef]
40. Lal, R. Societal value of soil carbon. *J. Soil Water Conserv.* **2014**, *69*, 186A–192A. [CrossRef]
41. Silver, W.L.; Ostertag, R.; Lugo, A.E. The potential for carbon sequestration through reforestation of abandoned tropical agricultural and pasture lands. *Restor. Ecol.* **2000**, *8*, 394–407. [CrossRef]
42. Mayer, M.; Prescott, C.E.; Abaker, W.E.A.; Augusto, L.; Cécillon, L.; Ferreira, G.W.D.; James, J.; Jandl, R.; Katzensteiner, K.; Laclau, J.P.; et al. Influence of forest management activities on soil organic carbon stocks: A knowledge synthesis. *For. Ecol. Manag.* **2020**, *466*, 118127. [CrossRef]
43. Szwagrzyk, J. Sukcesja leśna na gruntach porolnych; stan obecny, prognozy i wrażliwości. *Sylvan* **2004**, *4*, 53–59.
44. Wolski, J. Trwałość krajobrazu wiejskiego na przykładzie przekształceń zbiorowisk roślinnych bieszczadzkiej “krainy dolin” w ciągu ostatnich 150 lat. *Chrońmy Przyrodę Ojczystą* **2009**, *65*, 441–448.
45. Zaleski, T.; Bodziarczyk, J.; Wężyk, P.; Gąsiorek, M.; Hawryło, P.; Józefowska, A.; Kajdas, B.; Mazurek, R.; Szostak, M.; Wanic, T.; et al. Wpływ Naturalnej Sukcesji leśnej na Właściwości Gleb w Strefie Ekotonowej (Między Lasem i łąką) w Pienińskim Parku Narodowym—Wstępne Wyniki Badań. 2018. Volume 20, pp. 3–20. Available online: https://www.pieninyprn.pl/mfiles/1408/28/0/z/Pien15_s003-20_Zaleski_internet.pdf (accessed on 5 April 2022).
46. Follett, F.; Kimble, J.M. *The Potential of U.S. Grazing Lands to Sequester Carbon and Mitigate the Greenhouse Effect*, 1st ed.; Publisher: CRC Press Boca Raton, Florida, 2001.
47. Maini, A.; Sharma, V.; Sharma, S. Assessment of soil carbon and biochemical indicators of soil quality under rainfed land use systems in North Eastern region of Punjab, India. *Carbon Manag.* **2020**, *11*, 169–182. [CrossRef]

48. Błońska, E.; Kacprzyk, M.; Spólnik, A. Effect of deadwood of different tree species in various stages of decomposition on biochemical soil properties and carbon storage. *Ecol. Res.* **2017**, *32*, 193–203. [[CrossRef](#)]
49. Wan, S.; Xia, J.; Liu, W.; Niu, S. Photosynthetic overcompensation under nocturnal warming enhances grassland carbon sequestration. *Ecology* **2009**, *90*, 2700–2710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Souza, R.C.; Hungria, M.; Cantão, M.E.; Vasconcelos, A.T.R.; Nogueira, M.A.; Vicente, V.A. Metagenomic analysis reveals microbial functional redundancies and specificities in a soil under different tillage and crop-management regimes. *Appl. Soil Ecol.* **2015**, *86*, 106–112. [[CrossRef](#)]
51. Susyan, E.A.; Wirth, S.; Ananyeva, N.D.; Stolnikova, E.V. Forest succession on abandoned arable soils in European Russia—Impacts on microbial biomass, fungal-bacterial ratio, and basal CO₂ respiration activity. *Eur. J. Soil Biol.* **2011**, *47*, 169–174. [[CrossRef](#)]
52. Insam, H.; Domsch, K.H. Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. *Microb. Ecol.* **1988**, *15*, 177–188. [[CrossRef](#)]
53. Jiang, L.; He, Z.; Liu, J.; Xing, C.; Gu, X.; Wei, C.; Zhu, J.; Wang, X. Elevation gradient altered soil C, N, and P Stoichiometry of pinus taiwanensis forest on Daiyun Mountain. *Forests* **2019**, *10*, 1089. [[CrossRef](#)]
54. Saviozzi, A.; Levi-Minzi, R.; Cardelli, R.; Riffaldi, R. A comparison of soil quality in adjacent cultivated, forest and native grassland soils. *Plant Soil* **2001**, *233*, 251–259. [[CrossRef](#)]
55. Pinzari, F.; Trinchera, A.; Benedetti, A.; Sequi, P. Use of biochemical indices in the mediterranean environment: Comparison among soils under different forest vegetation. *J. Microbiol. Methods* **1999**, *36*, 21–28. [[CrossRef](#)]
56. Umarov, M.M.; Kurakov, A.V.; Stepanov, A.L. *Microbial Transformation of Nitrogen in Soil*; GEOS: Moscow, Russia, 2007.

mgr inż. Justyna Sokołowska
Katedra Gleboznawstwa i Agrofizyki
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

Kraków, 23.06.2022 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Sokołowska J., Józefowska A., Zaleski T. 2022. *Impact of natural forest succession on changes in soil organic carbon in the Polish Carpathian Mountains*. Forests 3(5), 744. <https://doi.org/10.3390/f13050744> mój udział polegał na:

- sformułowaniu koncepcji pracy
- opracowaniu założeń prowadzonych badań
- wyborze powierzchni badawczych
- wykonaniu prac terenowych
- doborze metodyki prac laboratoryjnych
- przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych
- wykonaniu analiz statystycznych
- opracowaniu i interpretacji wyników
- opracowaniu tabel i rycin
- przygotowaniu manuskryptu
- pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego
- poprawie pracy po recenzjach.

Mój udział w publikacji wyniósł 70 %.

Justyna Sokołowska

.....
podpis

dr hab. inż. Agnieszka Józefowska, prof. URK
Katedra Gleboznawstwa i Agrofizyki
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

Kraków, 23.06.2022 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Sokołowska J., Józefowska A., Zaleski T. 2022. *Impact of natural forest succession on changes in soil organic carbon in the Polish Carpathian Mountains*. Forests 3(5), 744. <https://doi.org/10.3390/f13050744> mój udział polegał na:

- weryfikacji koncepcji pracy
- wykonaniu analiz statystycznych
- nadzorowaniu poprawnej interpretacji wyników
- pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego.

Mój udział w publikacji wyniósł 15 %.


Podpis

dr hab. inż. Tomasz Zaleski, prof. URK
Katedra Gleboznawstwa i Agrofizyki
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

Kraków, 23.06.2022 r.

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy Sokołowska J., Józefowska A., Zaleski T. 2022. *Impact of natural forest succession on changes in soil organic carbon in the Polish Carpathian Mountains*. Forests 3(5), 744. <https://doi.org/10.3390/f13050744> mój udział polegał na:

- nadzorowaniu wyboru powierzchni badawczych
- nadzorowaniu prac terenowych
- nadzorowaniu poprawnej interpretacji wyników.

Mój udział w publikacji wyniósł 15 %.



.....
podpis