

PROTEASOVÁ AKTIVITA LESNÍCH PŮD A JEJÍ REAKCE NA PŘÍTOMNOST FENOLICKÝCH LÁTEK V PŮDĚ

LADISLAV HOLÍK, VALERIE VRANOVÁ,
JANA ROSÍKOVÁ a KLEMENT REJŠEK

Ústav geologie a pedologie, Lesnická a dřevařská fakulta,
Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 3, 613 00 Brno
ladislav.holik@mendelu.cz

Došlo 16.9.16, přijato 13.10.16.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby
urychleného publikování.

Klíčová slova: půdní proteasa, fenoly, lesní půda

Úvod

Rhizosféra se často popisuje jako oblast půdy obklopující kořeny rostlin, která je přímo ovlivněna kořeny rostlin a s nimi související biotou. Tato oblast je bohatě zaplněna mikroorganismy, které se živí sloučeninami uvolňovanými z kořenů rostlin a mohou zvyšovat příjem živin rostlinných kořenů a také umožňovat výživu z jinak nedostupných zdrojů živin v půdě^{1,2}. Jednou skupinou těchto látek jsou fenolové kyseliny, které jsou produkovány jmenými kořeny, jež se zapojují do ektomykorhiz a jejich úkolem je chránit kořeny před útoky parazitických hub^{3–9}. Fenolové kyseliny ovlivňují fyziologické procesy, jako je růst buněk, propustnost membrán, syntéza chlorofylu a bílkovin včetně enzymové aktivity a dýchání^{9,10}.

Cílem této studie je zjistit, do jaké míry je proteolytická aktivita půd stimulována a nebo inhibována fenolickými látkami.

Experimentální část

Odběr půdních vzorků

Vzorky byly odebírány na lokalitách Bílý Kříž (Experimentální ekologické pracoviště Bílý Kříž) a na území Školního lesního podniku Masarykův les Křtiny nedaleko od Brna. Bílý Kříž se nachází v Moravskoslezských Beskydech v severovýchodní části České republiky (N 49°30'17'', E 18°32'28'') s nadmořskou výškou 825–860 m. n. m., průměrnou roční teplotou 4,9 °C a ročním úhrnem srážek okolo 1100 mm. Půdní vzorky byly odebírány na lučném stanovišti z organominerálního horizontu (Ah horizont, půdní typ pseudoglej kambický) a z organického (humusového) horizontu (Oe horizont, půdní typ podzol) experimentálního lesního porostu smrku. Na území ŠLP ML Křtiny byla vybrána dvě stanoviště, a to Útěchov (N 49°18'1'', E 16°37'31'') se středně starým porostem dubu a půdním typem kambizem modální. Odebíral se zde organominerální a minerální horizont (Ah a Bw horizont). Druhým vybraným stanovištěm je Máchův památník (N 49°19'2.4'', E 16°40'19'') se starým smíšeným porostem buku a dubu a s půdním typem rendzina melanická. Zde byl odebrán organický, organominerální a minerální horizont (horizonty Oe, Ahk a Bwk). Porosty Školního lesního podniku se rozprostírají v nadmořské výšce 210–575 m. n. m., průměrná roční teplota je 7,5 °C a roční úhrn srážek 610 mm. Vzorky byly odebírány jako směsné vzorky ze tří dílčích odběrů z jednotlivých půdních horizontů a po převozu z terénu byly přesety přes síto s velikostí oka 2 mm a uskladněny

Tabulka I

Vybrané fyzikální a chemické vlastnosti zkoumaných půd

Stanoviště	C _{tot} [%]	N _{tot} [%]	C/N	pH H ₂ O	pH 0,01M CaCl ₂	Jíl [%]	Prach [%]	Písek [%]
Louka, Ad horizont	4,8	0,29	16,4	4,1	3,3	18,6	26,0	55,4
Smrk, Oe horizont	23,1	1,01	22,8	4,1	3,4	–	–	–
List. porost, BK-DB, Oe horizont	26,2	2,00	13,1	7,7	7,2	–	–	–
List. porost, BK-DB, Ahk hor.	11,1	0,97	11,4	7,5	7,1	12,5	65,0	22,5
List. porost, BK-DB, Bwk hor.	2,2	0,21	10,5	7,1	6,6	23,2	60,3	16,5
List. porost, DB, Ah horizont	4,3	0,29	14,8	5,1	3,8	6,8	50,0	43,2
List. porost, DB, Bw horizont	1,1	0,07	15,7	4,7	3,7	26,5	36,0	37,4

Oe horizont – organický horizont; Ad, Ah, Ahk – organominerální horizont; Bw, Bwk – minerální horizont; DB – dubový listnatý porost; BK – DB bukodubový listnatý porost. C_{tot} – celkový uhlík; N_{tot} – celkový dusík; C/N – poměr celkového uhlíku a dusíku; pH – půdní reakce

v chladnu a temnu. Vzorky byly odebírány na podzim roku 2012. Tab. I udává vybrané fyzikální a chemické vlastnosti testovaných půd.

Stanovení proteolytické aktivity půd

Stanovení proteasové aktivity půd proběhlo dle upravené metodiky¹¹. Do Erlenmeyerovy baňky byl navážen 1 g vlhké jemnozeme a inkubován s 2 ml 0,05 M Tris-HCl pufru (pH 8,55) a 2 ml 1% roztoku kaseinu (sodná sůl) při teplotě 50 °C po dobu 2 hodin. Kontrolní vzorky byly připraveny stejným způsobem, jen s tím rozdílem, že roztok kaseinu byl přidán až na konci inkubace. Reakce (inkubace) byla zastavena přidáním 1 ml 7,5% kyseliny trichloroctové (TCA). Poté byly vzorky centrifugovány při 4000 ot/min, 1 ml supernatantu byl odebrán, smíchán se 7 ml 3,7% roztoku Na₂CO₃ a poté byl přidán 1 ml 0,06% roztoku CuSO₄. Vzorky byly inkubovány 30 min při pokojové teplotě a pak se přidal 1 ml činidla Folin-Ciocalteu (smíchán s demineralizovanou vodou v poměru 1:3) a tato

směs byla inkubována 5 min při teplotě 37 °C a pak ponechána na 15 min při pokojové teplotě. Proteolytická aktivita byla měřena na základě produkce aminokyseliny L-tyrosinu spektrofotometricky při vlnové délce 578 nm (Specol 1300) a je vyjádřena v $\mu\text{g g}^{-1}$ suché půdy za 1 hodinu. Kalibrační křivka byla připravena z roztoku L-tyrosinu v demineralizované vodě a roztoku 0,05 M Tris-HCl / 7,5% TCA (v poměru 3:1).

Kyselina ferulová a 4-hydroxybenzoová byly přidány rozpuštěné v demineralizované vodě před inkubací o koncentracích 0, 5, 50 a 100 μg na gram suché půdy, přičemž pipetovaný objem byl 100 μl .

Statistická analýza

Statistické zhodnocení výsledků proteasové aktivity jednotlivých vzorků bylo provedeno pomocí modulu jednofaktorová ANOVA a vícenásobné porovnání pomocí LSD Fischerův test. Byl použit statistický program Statistica 12.0.

Tabulka II

Proteolytická aktivita půd^a po přidavku fenolických kyselin v množství 0, 5, 50 a 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ suché půdy

Stanoviště ^c	0	5	50	100	SE \pm ^b
<i>Louka, Ad horizont</i>					
Kyselina 4-hydroxybenzoová	122,16	132,92*	117,09	55,60*	3,56
Kyselina ferulová	122,16	132,71	137,38*	146,11*	4,59
<i>Smrk, Oe horizont</i>					
Kyselina 4-hydroxybenzoová	129,96	122,06	122,32	123,64	4,57
Kyselina ferulová	129,96	128,12	112,56*	103,34*	6,03
<i>Listnatý porost, BK-DB, Oe horizont</i>					
Kyselina 4-hydroxybenzoová	476,75	419,18*	417,73*	428,13*	10,80
Kyselina ferulová	476,75	482,07	474,81	437,80*	8,33
<i>Listnatý porost, BK-DB, Ahk horizont</i>					
Kyselina 4-hydroxybenzoová	238,07	318,03*	301,01*	293,49*	4,80
Kyselina ferulová	238,07	299,42*	299,23*	264,39*	8,11
<i>Listnatý porost, BK-DB, Bwk horizont</i>					
Kyselina 4-hydroxybenzoová	77,57	56,25*	56,25*	50,34*	2,06
Kyselina ferulová	77,57	56,43*	65,92*	62,70*	3,62
<i>Listnatý porost, DB, Ah horizont</i>					
Kyselina 4-hydroxybenzoová	221,01	229,41	209,58	139,01*	6,62
Kyselina ferulová	221,01	255,27*	241,27*	241,47*	7,14
<i>Listnatý porost, DB, Bw horizont</i>					
Kyselina 4-hydroxybenzoová	23,69	15,39*	11,77*	14,63*	2,03
Kyselina ferulová	23,69	20,22	17,05	19,01	2,65

^a Výsledky představují množství produkovaného L-tyrosinu v $\mu\text{g h}^{-1} \text{g}^{-1}$ suché půdy, * jsou statisticky významné ($P < 0,05$, $n = 3$). Standardní chyba, ^b SE \pm pro Fisherův LSD test. ^c Oe horizont – organický horizont; Ad, Ah, Ahk – organominerální horizont; Bw, Bwk – minerální horizont; DB – dubový listnatý porost; BK – DB bukodubový listnatý porost

Výsledky a diskuse

Vliv fenolů na proteolytickou aktivitu zkoumaných půd byl převážně inhibiční. Organické horizonty reagovaly inhibičně na přítomnost fenolických látek (tab. II), jen kyselina 4-hydroxybenzoová nevykázala statistickou významnost ($P < 0,05$) ve smrkovém porostu. Organominerální horizonty reagovaly naopak spíše stimulačně, přičemž kyselina ferulová působila stimulačně ve všech měřeních, zatímco kyselina 4-hydroxybenzoová působila stimulačně jen u starého listnatého porostu (tab. II). Minerální horizonty reagovaly podobně jako organické horizonty, a to inhibičně (tab. II). Vyjímkou byla kyselina ferulová v mladém listnatém porostu, která nevykázala statistickou významnost ($P < 0,05$). Fenolové kyseliny mohou být zapojeny do tvorby humusu, alelopatie a mít vliv na dostupnost živin¹². U rostlin plní funkci obrany před býložravci a patogeny¹³ a mohou mít silný negativní vliv na kvalitu půdní organické hmoty a koloběh dusíku^{14,15}. Literatura¹⁶ také například uvádí, že fenolové kyseliny mohou inhibovat rozklad organické hmoty vazbou na reaktivní místa extracelulárních enzymů. Výsledky ukazují, že fenolické kyseliny mají inhibiční účinek na půdní proteasy. V ojedinělých případech sice byla zjištěna i zvýšená aktivita proteas, mohlo se však jednat o specifickou odpověď odlišného spektra mikroorganismů žijících v daném horizontu.

Závěr

Cílem práce bylo zjistit reakci půdních proteas na přítomnost fenolických látek v odstupňovaných koncentracích. Výsledky ukazují, že v organických a minerálních horizontech je vliv inhibiční, zatímco v organominerálních horizontech je spíše stimulační. Negativní vliv fenolů na enzymovou aktivitu (proteasy) může mít vliv na ztráty dusíku v půdách a jeho vyplavování do částí půdního horizontu, kde již není přístupný a využitelný pro rostliny.

Příspěvek vznikl za podpory grantu TAČR č. projektu TA04020888.

LITERATURA

1. Lugtenberg B., Kamilova F.: *Ann. Rev. Microbiol.* 63, 541 (2009).
2. Moe L. A.: *Am. J. Bot.* 100, 1692 (2013).

3. Jorgensen E.: *Ait. Can. J. Bot.* 39, 1765 (1961).
4. Shain L.: *Phytopat.* 57, 1034 (1967).
5. Alcubilla M.: *Landwirtsch. Forsch.* 25, 96 (1970).
6. Prior C.: *Ann. Bot.* 40, 261 (1976).
7. Shain L.: *Phytopat.* 69, 1143 (1979).
8. Alcubilla M., Heibl R., Rehfuess K. E.: *Mitt. Ver. Forstl. Standortskunde Forstpflanzenzücht.* 33, 81 (1987).
9. Stumpf B., Yan F., Honermeier B.: *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 178, 118 (2015).
10. Leather G. R., Einhellig F. A.: *J. Chem. Ecol.* 14, 1821 (1988).
11. Nannipieri P., Pedrazzini F., Arcara P. G., Piovaneli C.: *Soil Sci.* 127, 26 (1979).
12. Lehmann R. G., Cheby H. H., Harsh J. B.: *Soil Sci. Soc. Am. J.* 51, 352 (1987).
13. Adamczyk B., Kitunen V., Smolander A.: *Soil Biol. Biochem.* 41, 2085 (2009).
14. Fierer N., Schmiel J. P., Cates R. G., Zou J.: *Soil Biol. Biochem.* 33, 1827 (2001).
15. Kraus T. E., Dahlgren R. A., Zasoski R. J.: *Plant Soil* 256, 41 (2003).
16. Toberman H., Evans C. D., Freeman C., Fenner N., White M., Emmett B. A., Artz R. R.: *Soil Biol. Biochem.* 40, 1519 (2008).

L. Holík, V. Vranová, and K. Rejšek (*Department of Geology and Soil Science, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno*): **Protease Activity of Forest Soils and their Responses to Phenolic Compounds in Soil**

Soil proteolytic complex plays an important role in nutrient cycling in the ecosystem. Interaction of this enzyme complex with phenolic acids was studied on selected soils. The aim was to determine how the soil protease reacts to the presence of phenolic compounds, i.e., substances released during the decomposition of organic matter and transferred to the soil environment. Phenolic compounds in organic horizon caused inhibition of soil protease, 4-hydroxybenzoic acid showed no statistical significance ($P < 0,05$) in the spruce stand. Organomineral horizons responded as stimulants: ferulic acid acted as a stimulant in all measurements, while 4-hydroxybenzoic acid stimulated only with old deciduous stands. Mineral horizons reacted like organic horizons, namely as inhibitors, with the exception of ferulic acid which, in a young deciduous forest, did not show statistical significance.