

VLIV ENANTIOMERŮ KYSELINY VINNÉ NA PROTEOLYTICKOU AKTIVITU PŮD

LADISLAV HOLÍK, VALERIE VRANOVÁ,
SOŇA KOČVAROVÁ 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 8.1.16, přijato 18.3.16.

Klíčová slova: enantiomery kyseliny vinné, půdní proteasa,
mineralizace dusíku, lesní ekosystém

Úvod

Půdní enzymy jsou zapojeny do většiny biochemických reakcí v půdě a citlivě reagují na změny, které v půdě probíhají^{1,2}. Proteasy mají důležitou roli v mineralizaci půdního dusíku. Jejich vysoká aktivita byla pozorována v půdách s vysokým obsahem humusu, velkou vlhkostí, vysokým pH a jsou vysoce aktivní i za relativně vysokých teplot³. Proteolýza je důležitý proces v koloběhu dusíku a je považována za krok, který omezuje rychlost mineralizace dusíku v půdách⁴. Z hlediska inhibice/stimulace spojené se sloučeninami s nízkou molekulovou hmotností je proteolýza a její regulace nedostatečně prozkoumána. Předpokládá se, že tyto sloučeniny mají stimulační nebo inhibiční efekt na půdní proteolýzu. Příkladem sloučenin s nízkou molekulovou hmotností jsou flavonoidy, isokumariny, prekurzory kyseliny indolyloctové nebo syntézy ethylenu a kyselina salicylová^{5–7}. U flavonoidů nebyl prokázán vliv na aktivitu půdních proteas⁸. Nízkomolekulární organické sloučeniny se přirozeně vyskytují ve formě L- a D-enantiomerů, které jsou syntetizovány v rostlinách a mikroorganismech. Do půdního prostředí se dostávají kořenovou exsudací rostlin a sekrecí mikrobiálních společenství a tak se stávají součástí půdní organické hmoty. Z hlediska zastoupení jednotlivých enantiomerů převažují vyšší koncentrace L- enantiomerů oproti D-enantiomerům⁹. Kyselina vinná (L- a D-enantiomery) se také řadí mezi nízkomolekulární organické sloučeniny a je jednou z dominantních půdních organických sloučenin vyskytujících se v půdním prostředí^{10,11}.

Cílem studie bylo zjistit, zda kyselina vinná, resp. její enantiomery, mají stimulační či inhibiční vliv na proteolytickou aktivitu půd. Vliv stimulace/inhibice byl studován při několika odstupňovaných koncentracích enantiomerů kyseliny vinné. Měření byla prováděna na trvalých výzkumných plochách, v lesních porostech dubu, ve smíše-

ném porostu buku a dubu a v horském lučním a lesním stanovišti s porostem smrku.

Experimentální část

Odběr půdních vzorků

Vzorky byly odebírány ze dvou lokalit, a to na Experimentálním ekologickém pracovišti Bílý Kříž a v lesích Školního lesního podniku Masarykův les Křtiny (ŠLP Ml Křtiny). Experimentální pracoviště Bílý Kříž se nachází v Moravskoslezských Beskydech (N 49°30'17'', E 18°32'28'') v nadmořské výšce 825–860 m. n. m., s průměrnou roční teplotou 4,9 °C a ročním úhrnem srážek okolo 1100 mm. Půdní vzorky byly odebírány na lučním stanovišti z organominerálního horizontu (Ad horizont, půdní typ pseudoglej kambický) a z organického (humusového) horizontu (Oe horizont, půdní typ podzol) experimentálního lesního porostu smrku ztepilého (věk 35 let) bez provedení zásahu a s úrovnovým proředěním. Na území ŠLP Ml Křtiny byly vzorky odebírány ze dvou ploch, a to Máchův památník (N 49°19'2.4'', E 16°40'19'') se smíšeným porostem buku lesního a dubu zimního (BK-DB, věk 70 let) a s půdním typem rendzina melanická. Zde byl odebrán organický, organominerální a minerální horizont (horizonty Oe, Ahk a Bwk). Druhá plocha Útěchov (N 49°18'1'', E 16°37'31'') s porostem dubu letního (DB, věk 35 let) a půdním typem kambizem modální. Odebíral se zde organominerální a minerální horizont (Ah a Bw horizont). 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 smíšené 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 v chladnu a temnu. Vzorky byly odebírány na podzim roku 2013. Tabulka I udává vybrané fyzikální a chemické vlastnosti testovaných půd. Plochy byly vybrány tak, aby zachytily heterogenitu půdního prostředí ve vazbě jak na vlastní půdní typ, tak na různou dřevinnou skladbu, přičemž platí, že zastoupené půdní typy i porosty jsou typické pro území České republiky.

Stanovení proteolytické aktivity půd

Stanovení proteolytické aktivity půd proběhlo dle upravené metody¹². 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 h. Kontrolní vzorky byly připraveny stejným způsobem, 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 poko-

Tabulka I
Vybrané fyzikální a chemické vlastnosti zkoumaných půd^a

Stanoviště	C _{tot} [%]	N _{tot} [%]	C/N	pH H ₂ O	pH 0,01 M CaCl ₂	Jíl [%]	Prach [%]	Písek [%]
Louka, Ad	4,8	0,29	16,4	4,1	3,3	18,6	26,0	55,4
Smrk (kontrola), Oe	23,1	1,01	22,8	4,1	3,4	–	–	–
Smrk (úrov. zásah), Oe	27,3	1,21	22,5	4,1	3,4	–	–	–
List. porost, BK-DB, Oe	26,2	2,00	13,1	7,7	7,2	–	–	–
List. porost, BK-DB, Ahk	11,1	0,97	11,4	7,5	7,1	12,5	65,0	22,5
List. porost, BK-DB, Bw	2,2	0,21	10,5	7,1	6,6	23,2	60,3	16,5
List. porost, DB, Ah	4,3	0,29	14,8	5,1	3,8	6,8	50,0	43,2
List. porost, DB, Bw	1,1	0,07	15,7	4,7	3,7	26,5	36,0	37,4

^aOe – organický horizont, Ad, Ah, Ahk – organominerální horizont, Bw – 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

jové teplotě a poté se přidal 1 ml činidla Folin-Ciocalteu (smíchan s demineralizovanou vodou v poměru 1:3) a tato směs byla inkubována 5 min při teplotě 37 °C a pak ponechána 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 vinná byla přidána rozpuštěná v demineralizované vodě před inkubacemi v množství 0, 5, 50 a 100 μg na gram suché půdy, pipetovaný objem byl 100 μl . Koncentrace 5 μg na gram suché půdy odpovídá přirozenému množství, které uvádí literatura¹³.

Statistická analýza

Statistické zhodnocení výsledků proteolytické aktivity jednotlivých vzorků bylo provedeno modulem jednofaktorová ANOVA a vícenásobné porovnání LSD Fischerovým testem. Použit byl statistický program Statistica 12.0.

Výsledky a diskuse

Přidání L- nebo D-enantiomerů kyseliny vinné významně ($P < 0,05$) inhibovalo proteolytickou aktivitu u všech koncentrací v organickém horizontu bukodubového listnatého porostu, přičemž D-enantiomer měl menší inhibiční účinek (tab. II). Další inhibice se projevila u L-enantiomeru v organominerálním horizontu (Ahk horizont) v tomtéž porostu. Naopak byla zaznamenána stimulace proteolytické aktivity u minerálního horizontu, a to o 20–25 % v množství 5 μg a 50 μg (tab. II). U stejného horizontu v dubovém listnatém porostu nebyl vliv kyseliny

vinné zaznamenán. U organominerálního horizontu byla naměřena stimulace proteolytické aktivity u obou enantiomerů, ale u rozdílných koncentrací. L-enantiomer stimuloval při množství 5 μg a D-enantiomer v množství 50 μg . Poté, ale dochází opět ke snížení proteolytické aktivity pod hranici statistické významnosti ($P < 0,05$). U horských stanovišť s porosty smrku došlo ke stimulaci proteolytické aktivity, a to v kontrolním porostu, tak i v porostu s provedeným úrovňovým zásahem (tab. II). K silnější stimulaci došlo u kontrolního porostu, a to u obou enantiomerů. Na stanovišti s horskou loukou byla zaznamenána také stimulace proteolytické aktivity, a to u D-enantiomeru. Naopak L-enantiomer nevykázal statistickou významnost ($P < 0,05$).

Přídavek enantiomerů kyseliny vinné měl efekt na půdní proteolytickou aktivitu spíše stimulační. Přídavek organických kyselin zvyšuje dostupnost huminových látek a různých forem dusíku v půdě, jako jsou např. aminokyseliny¹⁴ a ty jsou schopny ovlivnit (stimulačně/inhibičně) proteolytickou aktivitu¹⁵. Stimulačně, v kombinaci s přidávkem organické kyseliny, však může způsobit větší dostupnost amonného dusíku (NH_4^+)¹⁶. Příkladem mohou být námi studovaná horská stanoviště, kde dominantní formou biologicky přístupného dusíku je amonný dusík¹⁷.

Závěr

Cílem práce bylo prozkoumat vliv enantiomerů kyseliny vinné na proteolytickou aktivitu půd. Kyselina vinná se přirozeně vyskytuje v půdním prostředí a podílí se na koloběhu dusíku jakožto součást půdní organické hmoty. Výsledky ukazují, že L- a D-enantiomery kyseliny vinné mohou stimulovat i inhibovat mineralizaci dusíku, kterou zprostředkovávají půdní proteasy.

Tabulka II

Proteolytická aktivita^a po přidavku L- a D-enantiomerů kyseliny vinné v množství 0, 5, 50 a 100 µg g⁻¹ suché půdy

Stanoviště ^c	0	5	50	100	SE ± ^b
<i>Louka, Ad</i>					
L-kyselina vinná	129,26	136,37	128,66	121,96	4,29
D- kyselina vinná	129,26	132,92	147,33*	158,69*	3,68
<i>Smrk (kontrola), Oe</i>					
L-kyselina vinná	91,74	98,86*	90,68	93,06	2,46
D-kyselina vinná	91,74	106,24*	106,50*	119,68*	4,82
<i>Smrk (úrovňový zásah), Oe</i>					
L-kyselina vinná	76,02	83,81	90,39*	83,51	5,36
D-kyselina vinná	76,02	107,45*	95,78*	90,69*	5,32
<i>Listnatý porost, BK-DB, Oe</i>					
L-kyselina vinná	688,72	617,04*	566,71*	553,04*	8,63
D-kyselina vinná	688,72	661,38*	647,05*	617,38*	6,40
<i>Listnatý porost, BK-DB, Ahk</i>					
L-kyselina vinná	290,89	278,42	260,37*	266,13*	8,19
D-kyselina vinná	290,89	285,68	311,36	280,47	9,33
<i>Listnatý porost, BK-DB, Bwk</i>					
L-kyselina vinná	58,58	75,06*	72,01*	60,37	3,47
D-kyselina vinná	58,58	82,58*	72,37*	65,38	4,70
<i>Listnatý porost, DB, Ah</i>					
L-kyselina vinná	292,60	310,49*	288,32	289,88	4,48
D-kyselina vinná	292,60	301,16	303,49*	287,35	4,88
<i>Listnatý porost, DB, Bw</i>					
L-kyselina vinná	23,69	23,54	27,92	27,61	2,49
D-kyselina vinná	23,24	21,88	22,03	25,35	2,82

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

Príspevek vznikl za podpory grantu IGA 13/2013 MENDELU (Interní grantová agentura Mendelovy univerzity v Brně) a TAČR č. projektu TA04020888.

LITERATURA

- Qian X., Gu J., Sun W., Li Y-D., Fu Q-X., Wang X-J., Gao H.: *App. Soil Ecol.* 77, 18 (2014).
- Mikanová O., Šimon T., Kopecký J., Ságová-Marečková M.: *Open Life Sci.* 10, 249 (2015).
- Purev D., Bayarmaa J., Ganchimeg B., Ankhtsetseg B., Anumandal O.: *Mongolian J. Chem.* 13, 16 (2012).
- Wild B., Schneckner J., Bárta J., Čapek P., Guggenberger G., Hofhansl F., Kaiser Ch., Lashchinsky N., Mikutta R., Mooshammer M., Šantrůčková H., Shibistova O., Urich T., Zimov S. A., Richter A.: *Soil Biol. Biochem.* 67, 85 (2013).
- Miyazawa T., Iwanaga H., Yamada T., Kuwata S.: *Chirality* 4, 427 (1992).
- Renella G., Landi L., Mina J. M. G., Giagnoni L., Nannipieri P.: *App. Soil Ecol.* 47, 106 (2011).
- Lakzayi M., Sabbagh E., Rigi E., Keshtehgar A.: *Int. J. Farm. Alli. Sci.* 3, 980 (2014).
- Tomasi N., Weisskopf L., Renella G., Landi L., Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P., Torrent J., Martinola E., Cesco S.: *Soil Biol. Biochem.* 40, 1971 (2008).
- Lojková L., Vranová V., Rejšek K., Formánek P.: *Chirality* 26, 1 (2014).
- Dundek P., Holik L., Vranova V., Rejšek K., For-

- manek P.: *Acta Univ. Agric. Silvic. Mendelianae Brun.* 59, 29 (2011).
11. Cheng Y., Wang L., Haifeng P., Bao W., Sun W., Xie Z., Zhang J., Zhao Y.: *Biotechnol. Lett.* 36, 2325 (2014).
 12. Nannipieri P., Pedrazzini F., Arcara P. G., Piovaneli C.: *Soil Sci.* 127, 26 (1979).
 13. Liao Y. C., Chang Ch. S. W., Wang M. C., Shen Y., Hung P. L., Biswanath D.: *Chemosphere* 65, 343 (2006).
 14. Reeve J. R., Smith J. L., Carpenter-Boggs L., Renagold J. P.: *Soil Biol. Biochem.* 40, 2547 (2008).
 15. Vranova V., Rejsek K., Formanek P.: *App. Soil. Ecol.* 70, 23 (2013).
 16. Enowashu E., Poll C., Lamersdorf N., Kandeler E.: *App. Soil. Ecol.* 43, 11 (2009).
 17. Vránová V., Formánek P., Rejšek K.: *Chem. Listy* 105, 661 (2011).

L. Holík, V. Vranová, S. Kočvarová, and K. Rejšek (*Department of Geology and Soil Science, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno*): **Effects of Tartaric Acid Enantiomers on Proteolytic Activity of Soils**

The aim of this work was to investigate the role of naturally occurring soil L- and D-enantiomers of tartaric acid in the regulation of key processes of the nitrogen mineralization and nitrogen cycling in terrestrial ecosystems. Soil samples taken from a dense forest, a thinned forest and a meadow were treated with L- or D-tartaric acid, and the casein-protease activity was measured. Results of this work indicate a significant role of natural concentrations of L- and D-tartaric acid in the regulation of key processes of the soil nitrogen mineralization in various terrestrial ecosystems.