

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ

LESNICKÁ A DŘEVAŘSKÁ FAKULTA

ÚSTAV GEOLOGIE A PEDOLOGIE



**Lesnická
a dřevařská
fakulta**

VLIV VYBRANÝCH STANOVIŠTNÍCH FAKTORŮ NA PROTEOLYTICKOU
AKTIVITU LESNÍCH PŮD S DŮRAZEM NA ORGANICKÉ A ANORGANICKÉ
LÁTKY

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: prof. Ing. Klement Rejšek, CSc.

Obor: Ekologie lesa

2017

Ing. Ladislav Holík

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Vliv vybraných stanovištních faktorů na proteolytickou aktivitu lesních půd s důrazem na organické a anorganické látky vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona ř. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědom/a, že na moji práci se vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně, dne 6. 4. 2017

Podpis

Poděkování

Chtěl bych poděkovat své rodině a všem lidem, kteří mne podporovali a poskytli mi vše potřebné k mému studiu na univerzitě. Dále bych chtěl poděkovat všem, kteří mi byli oporou při zpracování této práce a také Ústavu geologie a pedologie LDF MENDELU za vytvoření příjemné atmosféry, zejména pod vedením prof. Ing. Klementa Rejška, CSc.. Zvláště bych chtěl poděkovat mému školiteli prof. Ing. Klementu Rejškovi, CSc. a doc. Valerii Vranové za ochotu a čas věnovaný konzultacím a odborným radám při zpracování předkládané práce. Také bych chtěl poděkovat Ing. Peteru Dundekovi, Ing. Aleši Kučerovi Ph.D., Ing. Karlu Maroszovi, Ing. Janě Rosíkové a Ing. Soni Kočvarové za pomoc při realizaci mé vědecké práce.

Abstrakt

Disertační práce je zaměřena na půdní biochemii, konkrétně na ovlivnění proteolytické aktivity v lesních půdách organickými a anorganickými látkami. Práce je složená z článků, které byly publikovány v impaktovaných časopisech, a dvou rukopisů. Z organických látek byly zkoumány L- a D-kyselina vinná, fenolické látky, proteinogenní a neproteinogenní aminokyseliny, auxiny a cytokininy. Anorganické látky pak představovaly soli. Součástí práce je také článek, který se věnuje vlivu lesního managementu na aktivitu půdních enzymů (včetně proteáz). Je zde sledováno, jaký efekt má vytvoření obnovního prvku na aktivitu enzymů, kdy se zásahem do lesního ekosystému změni tepelné a vláhové poměry na stanovišti. Z výsledků vyplývá, že z organických látek mají pozitivní vliv na proteolytickou aktivitu L- a D-kyselina vinná, proteinogenní a neproteinogenní aminokyseliny a auxiny. Naopak jako inhibiční látky se ukázaly být fenoly a cytokininy. Zasolení mělo také negativní vliv na proteolytickou aktivitu lesních půd. Vliv lesního managementu prostřednictvím obnovního prvku na proteázovou aktivitu půd nebyl zjištěn. Na změnu klimatických poměrů na lesním stanovišti reagovaly pouze potenciální ureázy, které však nejsou tématem této práce.

Klíčová slova: nativní proteázy, aminokyseliny, fenoly, soli, auxiny, cytokininy, lesní management

Abstract

PhD thesis focuses on soil biochemistry, namely the effects of organic and inorganic substances on proteolytic activity in forest soils. The thesis is composed of several impacted journal articles and two manuscripts. Selected organic compounds feature L- and D-tartaric acid, phenolics, proteinogenic and non-proteinogenic amino acids, auxins and cytokinins, whilst inorganic substances are represented by salts. Furthermore, an article dealing with the effects of different forest management practises on soil enzymatic activity (including proteases) is adjoined. Its aim is to monitor the effect of forest regenerative elements (forest stand gaps) on enzymatic activity, whereas the intervention into forest activity changes the moisture and thermal conditions of the site. The results show that out of the organic substances tested L- and D-tartaric acid, proteinogenic and non-proteinogenic amino acids and auxins have a positive effect on the proteolytic activity. Conversely, phenols and cytokinins acted as inhibitors. Soil salinization also had a negative effect on proteolytic activity of forest soils. The Influence of forest management through forest regenerative elements on soil protease activity was not detected. Potential urease activity was the only enzyme that reacted to the change of climatic conditions of forest habitat; however, activity not a principal topic of this work.

Keywords: native protease, amino acids, phenols, salts, auxine, cytokinine, forest management

OBSAH

1	Úvod	8
1.1.1	Lesní ekosystém	8
1.1.2	Půdní enzymy	9
1.1.3	Proteázy v půdě	13
1.1.4	Proteinogenní a neproteinogenní aminokyseliny	17
1.1.5	Zasolení půd	20
1.1.6	Fytohormony v půdách	22
1.1.7	Auxiny	23
1.1.8	Cytokininy	26
1.1.9	Fenolické látky	29
1.1.10	Porostní mezery	30
	Publikace I	33
	Publikace II	42
	Publikace III	50
	Publikace IV	62
	Publikace V	75
	Publikace VI	93
	Publikace VII	108
2	Závěr	142
3	Summary	146
4	Literatura	150

1 ÚVOD

Problematika interakce mezi vybranými stanovištními faktory lesního prostředí a konkrétní enzymatickou složkou fungování půdního ekosystému je nedílnou součástí oblasti zájmu oboru ekologie lesa. V ekologii lesa jsou významné priority dány vztahy mezi živými a neživými komponenty lesních ekosystémů. Studium vzájemných vztahů vazeb mezi tak důležitou součástí fungování půdního ekosystému jako je proteolytická aktivita a konkrétních, vybraných stanovištních faktorů je z pohledu současného stupně poznání v oboru ekologie lesa nejen vysoce aktuální, ale i mezinárodně řešenou problematikou, kdy obor půdní biochemie dodává ekologii lesa jak mimořádně cenné podněty pro další studium, tak i výsledky z většinou velmi překvapivé (a tudíž i podnětné a inspirativní) perspektivy.

Předkládaná disertační práce je navíc součástí dnes celosvětově intenzivně řešené ekologické tematiky – koloběhu živin v ekosystému. Současná ekologie lesa pracuje s doloženými teoriemi o těsné vazbě v triádě „enzym – rostlina – stanoviště“. Koloběhy živin jsou dnes z ekologického hlediska studovány právě s důrazem na stimulaci a inhibici enzymů v půdě. Mobilizace základních makrobiogenních prvků, zde především dusíku, je dnes neodmyslitelně spojena právě s proteolytickou půdní aktivitou. Z tohoto hlediska je řešené téma předkládané disertační práce možno považovat za moderní a aktuální.

Současná ekologie lesa je předmětem svého zájmu těsně vázaná na globální klimatické změny a jejich vlivu na lesní ekosystémy. Platí přitom, že z pohledu vývoje klimatu poslední dekády je to pro střední Evropu především fenomén sucha, období nedostatku fyziologické vody rostlinám, které je předmětem celoevropsky zvýšeného vědeckého zájmu. Právě z tohoto pohledu byla tato tematika zařazena do vlastního řešení odborné ekologické problematiky této disertační práce.

1.1.10 Lesní ekosystém

Lesní ekosystém je jedním ze základních suchozemských ekosystémů a půda v lesním prostředí klíčovým prvkem pro existenci živých organismů (Montagnini et al. 2005; Cheng et al. 2013). V lesním ekosystému je rozklad organického materiálu z velké části výsledkem činnosti půdních enzymů, které produkují komunity bakterií a hub (Aragón et al. 2014). Mikroorganismy a enzymy v půdě jsou odpovědné za zachování úrodnosti

půdy prostřednictvím degradace a mineralizace organické hmoty. Změny v podmínkách pro růst rostlin, jako jsou například provedená pěstební opatření (vznik porostních mezer) způsobí změny v mikrobiálních společenstvech a ovlivní jejich biochemickou aktivitu a tedy dostupnost živin pro rostliny (Singh, 2005).

V půdním ekosystému stojí na straně vstupu organické hmoty nejen opad rostlinného materiálu, ale také fixace látek v rámci symbiotických interakcí na kořenech rostlin (hlízkové bakterie) a nesymbiotické vztahy (např. fixace dusíku půdními nitrogenázami) v rámci půdního prostředí jako celku. Do procesu následného rozkladu organické hmoty vstupují jako první oxidoreduktázy (dehydrogenáza, DHA), které prvotní oxidací umožní její rozklad především směrem k cyklu uhlíku (především respirace půd) a cyklu dusíku. V rámci dalšího rozkladu organické hmoty vstupuje do procesu proteáza, která rozkládá proteiny a aminokyseliny, a zprostředkovává tím částečně přímo dusík pro kořeny rostlin a část druhového spektra mikroorganismů (Kandeler et al. 1999). Směrem k výstupu živin se poté projevuje aktivita ureáz, zprostředkovávající amonný dusík pro rostliny a půdní biotu (Błońska a Lasota 2014). Zpětně ji pak ovlivňuje i množství amonného dusíku v prostředí pocházejícího z činnosti celkového spektra rozkladačů organické hmoty a půdy jako kolektoru různých produktů rozkladu (např. vázané enzymy, aminokyseliny, ionty prvků). Na aktivitu půdní bioty mají vliv také fyzikální faktory, jako jsou teplo a množství srážek, které se dostanou na povrch půdy, a jsou pak půdou jímány.

Všechny živé organismy vyžadují pro svůj život, růst a rozmnožování téměř stejné živiny. To je základem mezidruhové konkurence mezi rostlinami a mikroorganismy v živinami omezeném půdním prostředí. Tato soutěž o dostupné živiny je zvláště silná v rhizosféře. Rostliny i mikroorganismy jsou v půdách omezení dostupností uhlíku, dusíku, fosforu a některých makro- a mikroelementů (Kuzyakov a Xu 2013).

1.1.2 Půdní enzymy

Úloha půdních enzymů a jejich činnost jsou popisovány jako vztahy s půdou a jinými faktory v životním prostředí, jako např. kyselá dešť, těžké kovy nebo třeba zasolení (Hussain et al. 2009). Enzymy jsou mediátory a katalyzátory chemických reakcí probíhajících v půdním prostředí, mezi něž lze zahrnout: dekompozice organických vstupů, přeměna nativní půdní organické hmoty, uvolňování anorganických živin pro výživu rostlin, fixace plynného dusíku, nitrifikace a denitrifikace, detoxikace

cizorodých látek (Dick, 1997). Půdní enzymy tedy mají klíčovou roli v koloběhu uhlíku (β -glukosidázy a β -galaktosidázy), dusíku (proteázy, ureázy, nitrit- a nitrátreduktázy), fosforu (kyselé a zásadité fosfatázy) a síry (arylsulfatázy) (Karaca et al. 2011). Význam půdních enzymů je také vnímán jako popisování a tvorba předpovědí reakce ekosystému a jeho funkcí, kvalita a interakce mezi jednotlivými subsystémy v ekosystému a dále jako biologický proces, který slouží jako ukazatel dopadů antropogenní činnosti na půdní prostředí (Utobo a Tewari 2015).

Pro hodnocení změn v půdním prostředí, ať už vlivem činnosti člověka nebo změny klimatických poměrů, se často používají měření aktivity extracelulárních enzymů. Z často používaných enzymů jsou to alkalické a kyselé fosfatázy, které katalyzují přeměnu organického fosforu na jeho anorganické formy a činí je tak dostupnými pro mikroorganismy a rostliny. Proteázy, které hydrolyzují peptidové vazby v proteinech nebo pomáhají rozkládat samotné aminokyseliny. Degradace peptidů je spojena s uvolňováním amoniakálního dusíku sloužícího jako zdroj dusíku pro rostliny a mikroorganismy (Alkorta et al. 2003; Olivera et al. 2014). Dále to jsou β -glukosidázy rozkládající celulózu a jiné polysacharidy z organické hmoty a produkující glukózu jako zdroj energie a uhlíku pro růst mikrobů (Tabatabai, 1994). Používají se ale i aktivity dehydrogenáz, které se naopak řadí mezi intracelulární enzymy. Podílejí se na oxidačních procesech v živých mikrobiálních buňkách (Nannipieri et al. 2002). Množství a typy organických sloučenin ovlivňují produkci mikrobiálních extracelulárních enzymů, včetně regulace přítomnosti enzymu, substrátu a limitace přístupných živin pro jejich syntézu (Hernández a Hobbie 2010).

Rozklad rostlinného opadu je základní proces v koloběhu živin. Většina organických látek je uvolňována do půdního prostředí po odumření organismů a vyskytují se převážně jako nerozpustné polymery (celulóza, lignin, bílkoviny, chitin) a nemohou být rozloženy přímo rozkladači organické hmoty (bakterie, houby) (Allison a Vitousek 2005). Extracelulární enzymy musejí tyto polymery degradovat na rozpustné látky, které pak může půdní biota dále využít. Proto je aktivita extracelulárních enzymů limitujícím krokem v rámci mikrobiálně zprostředkované dekompozice organické hmoty (Schimel a Weintraub 2003). Rychlost rozkladu v zásadě koreluje s aktivitou enzymů odpovědných za degradaci (Sinsabaugh, 1994). Přítomnost vhodného substrátu vyvolává syntézu odpovídajícího extracelulárního enzymu (Duo-Chuan, 2006). Proto je aktivita extracelulárních enzymů vhodná pro poskytnutí informace o dostupnosti

organických látek a tedy i dostupnosti uhlíku a dusíku. Znalosti o enzymatické aktivitě mohou tedy přispět k pochopení interakcí mezi dostupností uhlíku a dusíku během rozkladu organické hmoty a vysvětlit některé variability v rychlosti a dynamice rozkladu dusíku u substrátů podobného chemického složení (Geisseler a Horwath 2009).

Některé studie dokládají, že enzymy, které jsou spojené s hydrolýzou sacharidů, mají tendenci zvyšovat svou aktivitu po přidání substrátu obsahujícího vyšší množství dusíku. Naopak aktivita oxidativních enzymů katabolizujících polyfenolické sloučeniny má klesající tendenci (Carreiro et al. 2000; Michel a Matzner 2003). Vztah mezi aktivitou enzymu a rozkladem substrátu může být komplikovanější působením několika faktorů. Výskyt vhodného substrátu k degradaci není jediným faktorem regulujícím aktivitu extracelulárního enzymu. Vysoké hladiny konečných produktů nebo molekul, které obsahují cílovou živinu, jako například dusík, mohou potlačit produkci enzymu. Nízké hladiny konečných produktů nebo cílových živin výrobu enzymů nepotlačují. Extracelulární enzymy jsou produkovány i při nízké úrovni dostupnosti vhodného substrátu a jsou tedy konstitučně nezávislé na přítomnosti tohoto substrátu. Tyto mechanismy se podílejí na regulaci produkce hlavních enzymů ovlivňující koloběh dusíku a uhlíku, mezi něž patří proteázy (Kalisz, 1988), celulázy (Hanif et al. 2004), a chitinázy (Duo-Chuan, 2006).

Indukce syntézy enzymů a jejich sekrece tedy obvykle řídí místní koncentrace substrátu, ačkoliv sám o sobě nemusí být skutečným induktorem. Předpokladem pro úspěšnou katalýzu a následnou mikrobiální proliferaci je také odpovídající hustota a složení mikrobiálních degradérů (Burns et al. 2013). Mnoho, a možná také všechny, mikroorganismy produkují a reagují na signály, které slouží k informování o jejich bezprostředním okolí (von Bodman et al. 2008). Bakterie uvolňují a vnímají molekuly (tzv. autoinduktory), pomocí kterých monitorují hustotu buněk ve svém okolí (Redfield, 2002). Tento jev se nazývá „quorum sensing“ (Shank a Kolter 2009), a tyto autoinduktory mohou také sloužit pro detekci rychlosti, kterou sekretované molekuly difundují pryč od buňky (Ekschmitt et al. 2005). Toto naznačuje, že producenti extracelulárních enzymů mohou použít řadu autoinduktorních molekul pro snímání polohy substrátu, jeho kvality a množství a pak odpovídajícím způsobem regulovat výrobu extracelulárních enzymů (Allison et al. 2007). Pokud je koncentrace autoinduktoru vyšší, než určitá prahová hodnota, tak to znamená, že substrát i hustota

mikrobiální populace je vhodná a produkce enzymů, respektive exprese genů pro produkci enzymů, může být indukována. Naopak, pokud jsou difúzní ztráty vysoké, anebo není vhodné složení mikrobiální populace, pak je výroba enzymů inhibována. Příkladem může být produkce extracelulárních hydroláz u rostlinných patogenních bakterií rodu *Erwinia*, které je regulována koncentrací autoinduktoru (Barnard a Salmond 2007). Jev „quorum sensing“ je důležitý jak v půdním, tak ve vodním prostředí a je považován za důležitý řídicí proces pro všechny mikrobiální interakce. Toto zahrnuje hydrolýzu organické hmoty (Hmelo et al. 2011), fosfatázovou aktivitu (Van Mooy et al. 2012) nebo bakteriální predace a invazi do hostitelských rostlin patogenními bakteriemi a mikrobi, kteří vážou dusík (Bonkowski, 2004).

Většina extracelulárních enzymů je difundována pryč od jejich mateřské buňky. Některé z těchto enzymů jsou odolnější než jejich intracelulární protějšky. Bývají glykosylované a mají disulfidické vazby. Mají například různé strukturní modifikace, které jim dodávají tepelnou stabilitu, umožňují aktivitu při širokém rozsahu pH, propůjčují odolnost proti proteázám a mohou modulovat buněčnou adhezi (Zhang a Ten Hagen 2011).

Mnoho extracelulárních enzymů je stabilizováno pomocí jílových minerálů, humínových kyselin a částic organické hmoty. Tímto způsobem je udržována vysoká úroveň jejich aktivity po delší časové období (Dick a Tabatabai 1987; Burns et al. 2013). Vázané enzymy mají často sníženou aktivitu ve srovnání s jejich volnými protějšky a příčinou je omezený přístup k substrátu, snížený počet aktivních míst a konformační změny (Nannipieri, 2006; Quiquampoix a Burns 2007). Přesto enzymy, imobilizované půdními koloidy, představují významnou zásobárnu potenciální aktivity a mohou jako první katalyticky reagovat na změněnou dostupnost substrátu v půdním prostředí a také posloužit jako generátor signálních molekul pro mikrobiální společenstvo. Koloidně vázané enzymy také mohou představovat prvotní zdroj pro degradaci substrátu v období, kdy stav mikrobiální biomasy je nízký z důvodu působení stresu (Stursova a Sinsabaugh 2008). Určité množství vázaných enzymů, např. fosfatáza, ureáza, mohou pocházet z lyzovaných mateřských buněk.

Činnost enzymů je ovlivněna faktory abiotickými, např. pH, teplota, vodní potenciál, a biotickými jako je syntéza a sekrece enzymů. Tyto změny mají závažné důsledky pro

fungování ekosystémů, koloběh živin, interakci mezi mikroorganismy a rostlinou (Burns et al. 2013).

Změny v abiotickém prostředí probíhají vlivem krátkodobé změny počasí nebo dlouhodobé změny klimatu a na enzymy může to mít komplexní vliv, který je obtížné předpovídat. Například aktivita enzymu se zvyšuje spolu s teplotou až do určitého optima, které obvykle překračuje teploty zaznamenané v jejich přirozeném prostředí. Oteplování, přinejmenším teoreticky, zvyšuje rychlost enzymaticky katalyzované reakce, ale množství enzymu v prostředí zůstává konstantní (Wallenstein a Weintraub 2008). Mikroorganismy mohou naopak snížit syntézu a sekreci enzymů jako reakci na vzrůst teploty v životním prostředí (Wallenstein et al. 2012). Dále míra enzymové denaturace a degradativních aktivit extracelulárních proteáz se může také zvyšovat spolu s rostoucí teplotou (Wallenstein et al. 2011). Období sucha nebo časté střídání suchých period a osmolytický stres ovlivňuje složení mikrobiálního společenstva a enzymové aktivity na což mikrobi reagují syntézou osmolytů a změnou intracelulární enzymatické aktivity (Chowdhury et al. 2011). Po zvýšení vlhkosti v prostředí dojde k uvolnění organických látek v důsledku fyzikálního narušení půdních agregátů a lýzi buněk způsobené osmotickým šokem. Toto způsobí krátkodobé zvýšení dispozice uhlíku a dusíku, dojde k rychlému růstu mikroorganismů a tedy ke zrychlení mineralizace organické hmoty (Fierer a Schimel 2003). Reakce půdních mikroorganismů na změny v životním prostředí jsou složité.

1.1.3 Proteázy v půdě

Proteázy hrají důležitou roli při mineralizaci půdního dusíku. Podílejí se na štěpení polypeptidů a oligopeptidů na aminokyseliny. Mikroorganismy jsou hlavním zdrojem proteáz v půdním prostředí a vzhledem k vysoké molekulové hmotnosti proteinů, jsou prvním krokem při jejich degradaci (Rejsek et al. 2008). Proteolýza je důležitý proces v koloběhu dusíku v mnoha ekosystémech a je považován za limitující krok při mineralizaci dusíku v půdě (Weintraub a Schimel 2005) s ohledem na pomalejší primární fázi mineralizace bílkovin v porovnání s mineralizací aminokyselin (Jan et al. 2009).

Během procesu hydrolytické degradace polypeptidů z mrtvé biomasy je dusík mobilizován a vrácen do globálního koloběhu dusíku. Bez tohoto procesu by organický dusík zůstal vázán ve formě, která nemůže být využita ostatní biotou (Fuka et al. 2009).

Většina půdních mikroorganismů produkuje proteolytické enzymy, s výjimkou některých termo-tolerantních lignolytických hub nalezených v lesních půdách, některých mykobakterií a klostridií (Heyndrickx, 2011; Cruz Ramírez et al. 2012). Proteázy se dělí podle místa svého působení na intracelulární a extracelulární. Intracelulární proteázy regulují koloběh dusíku uvnitř mikrobiální buňky, zatímco extracelulární proteázy jsou zodpovědné za degradaci odumřelé biomasy (Fuka et al. 2009).

Proteázy se rozdělují do pěti skupin:

Serinové proteázy-štěpí peptidové vazby v proteinech, ve kterých je aminokyselina v enzymově aktivním místě. Serinové proteázy spadají do dvou širokých skupin na základě jejich struktury, která je podobná buďto chymotrypsinu (podobná trypsinu) nebo orsubtilisinu (Yang a Lee 2001; Nisha a Sumathy 2014). V půdách jsou produkovány bakteriemi kmene *Bacillus* a *Pseudomonas*, a producenti z řad hub jsou: *Pythium sp.*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, a *Trichophyton sp.* Včetně kořenových symbiontů (Vranová et al. 2013).

Cysteinové proteázy nebo také **thiol** proteázy sdílejí podobný katalytický proces (obsahují cysteinový zbytek), který zahrnuje nukleofilní thiolové triády nebo dyády. Tyto proteázy se běžně vyskytují v ovoci a jejich podíl je vyšší, pokud plody nejsou zralé. Celkově jsou cysteinové proteázy známy z mnoha různých rostlinných druhů (Kumar et al. 1999). V půdním prostředí je produkují kmeny *Clostridium sp.*, *Micrococcus sp.*, *Streptococcus sp.* a *Microsporium sp.* A někteří prvoci (Wenig et al. 2004; Rudenskaya a Pupov 2008).

Threoninové proteázy jsou skupinou proteolytických enzymů, které na svém aktivním místě mají zbytek threoninu (Paliwal et al. 1994).

Metalloproteázy nebo také **metalloproteinázy** jsou proteázy, jejichž katalytický mechanismus zahrnuje kov. Většina metalloproteáz vyžaduje ke své funkci zinek, ale část z nich využívá i kobalt. Kovový ion je koordinován na protein přes tři ligandy (Kumar et al. 2002). Ligandy

koordinující kovový ion se mohou lišit histidinem, glutamátem, aspartátem, lysinem a argininem. Čtvrtá koordinační pozice je obsazena labilní molekulou vody. Přítomnost chelačních látek, jako je například EDTA, vede k úplné inaktivaci proteázy (Schickaneder, 1988). Podobně vede k inhibici přítomnost ortofenantrolinu. Producenty v půdách jsou kmeny *Bacillus sp.*, *Aspergillus oryzae*, *Proteus aeruginosa* a *Streptomyces sp.* (Ladd a Jackson 1982; Vranová et al. 2013).

Aspartátové proteázy je skupina proteázových enzymů, které používá aspartátový zbytek pro katalýzu peptidových vazeb. Mají dva, vysoce zakonzervované aspartátové zbytky v aktivním místě a jsou optimálně účinné při kyselém pH. Prakticky všechny aspartátové proteázy jsou inhibovány pepstatinem (Gerze et al. 2005). V půdách je produkují kmeny *Saccharomyces sp.*, *Mucor sp.*, *Aspergillus sp.*, *Candida sp.* a *Shewanella sp.* (Yegin et al. 2011; Vranová et al. 2013).

Mikroorganismy mohou proteázy vyrábět i recyklací půdní organické hmoty, čímž je zajištěna jejich výživa (Rahman et al. 2003). Proteázy hrají také roli v interakcích půdních mikroorganismů prostřednictvím štěpení proteinů buněčných stěn. Řadí se zde antihoubové proteázy bakteriálního původu a alkalické serinové proteázy produkované nematofágními nebo entomopatogenními bakteriemi a plísněmi (Tian et al. 2007; Chang et al. 2007). Proteázy mohou fungovat také jako prostředek k přežití mikroorganismů v období nepříznivých životních podmínek. Serinové proteázy se dále podílejí na vývoji, biokontroly a patogenezi mikroorganismů (Pöll et al. 2009). Optimální katalytické pH mikrobiálních proteáz je v rozsahu 3,0-12 (Singh et al. 2011). Většina mikroorganismů, které byly izolovány z půdy, má optimální pH 8-9 a teplotu 40-60°C (Shankar et al. 2011).

Produkce extracelulárních proteáz může být inhibována snadno využitelným uhlíkem v důsledku katabolické represe (Shivanand a Jayaraman 2009). Podobně potlačují vysoké koncentrace aminokyselin syntézu proteáz prostřednictvím represe mRNA transkripce, ale nemají vliv na její stabilitu (Glenn et al. 1973). Volné aminokyseliny mohou při koncentracích vyšších než 150 mikromolů v půdním prostředí a 1-10 milimolů v kořenech způsobit popraskání buněčných stěn (Rejsek et al. 2010). Kyselina

salicylová se také podílí na regulaci proteolytické genové exprese (Prithiviraj et al. 2005). Přirozeně se vyskytující antibiotika, jako např. chloramfenikol, také inhibují syntézu proteáz v půdě (Sims a Wander 2002). Naopak dodání proteinů syntézu proteáz silně indukuje, ale také přídavek glukózy, kdežto amoniakální dusík nemá na aktivitu vliv (Geisseler a Horwath 2008). Syntéza proteáz u hub je potlačena přítomností jen některých sacharidů (trehalóza, mannitol), zatímco glukóza, fruktóza, laktóza, dextróza nebo sacharóza produkci proteáz stimuluje (Patil a Shastri 1985).

Aktivitu proteáz vylučovaných do půdy mění mnoho faktorů, od koncentrace a rozpustnosti substrátu, teploty, pH, flavonoidů, tříslovin, iontů až po humínové látky (Rejšek et al. 2008; Renella et al. 2011). Aktivita proteáz v závislosti na teplotě je poměrně široká a pohybuje se v rozmezí 3-60°C v lesních a travnatých ekosystémech. V důsledku vysychání nastává pokles proteolytické aktivity zejména u alkalických proteáz, které jsou denaturovány rychleji než neutrální proteázy (Sardans et al. 2008). Proteolytickou aktivitu omezuje také dostupnost substrátu v některých obdobích vegetační sezóny. Dále ovlivňují aktivitu proteáz taniny, což jsou polyfenolické sloučeniny rostlinného původu a mohou tvořit až 30% suché hmotnosti hrabanky (Tharayil et al. 2011). Jsou schopny inhibovat jak proteolýzu, tak i jiné enzymatické aktivity (např. β -glukosidázy, peroxidázy) v půdách, v závislosti na koncentraci a chemické struktuře taninů (Triebwasser et al. 2012). Inhibice je prováděna kondenzací a polymerací enzymů a neenzymatických proteinů kvůli vodíkové vazbě mezi aminovými a hydroxylovými skupinami, anebo hydrofobní interakci (Adamczyk et al. 2009).

Z environmentálních faktorů ovlivňující proteázovou aktivitu jsou to např. půdní typ, množství oxidu uhličitého nebo výskyt znečišťujících látek (Sidari et al. 2008). Proteázy, podobně jako jakákoliv enzymatická aktivita závisí na půdním typu a hloubce, přičemž platí, že s rostoucí hloubkou klesá enzymatická aktivita. Důvodem je snižující se mikrobiální biomasa a také se snižuje množství organického materiálu (Bausenwein et al. 2008). K nejvyšší prostorové heterogenitě proteolytické aktivity dochází na rozhraní půdy a rostlinného opadu (Kandeler et al. 1999). Z fyzikálních vlastností půd je to půdní textura (zrnitost), pórovitost a objemová hmotnost (Landi et al. 2011). Projevuje se také orientace svahu (jestli je na jih nebo na sever), klima a složení vegetace (Sidari et al. 2008). Li et al. 2010 nebo Kim a Kang (2008) ve svých studiích pozorovali, že zvýšené množství oxidu uhličitého má stimulační vliv na mikrobiální biomasu a aktivitu proteáz.

Z dalších faktorů, již zmiňovaných, je to rostlinný pokryv, který ovlivňuje proteázovou aktivitu půd skrze vyluhování proteolytických enzymů z opadu, vstupy z rostlinných kořenů (včetně vlivu jejich hustoty a architektury), výskyt mezofauny a mykorrhizních hub (Adameczyk et al. 2010).

1.1.4 Proteinogenní a neproteinogenní aminokyseliny

Rhizosféra je bohatě zaplněna mikroorganismy, kteří se živí sloučeninami uvolněných z kořenů rostlin. Tito mikrobi mohou naopak zvýšit příjem živin kořeny rostlin zpřístupněním jinak nedostupných živin z půdy (Lugtenberg a Kamilova 2009; Moe, 2013). Aminokyseliny se mohou v půdě vyskytovat v takzvané volné formě, která není kovalentně vázána nebo se mohou vyskytovat v proteinech a aminokyselinových konjugátech. Na aminokyseliny je půdní organická hmota degradována pomocí půdních proteáz a jejich činnost pak určuje procento organického dusíku v bílkovinách vs. Různé formy aminokyselin (Moe, 2013).

Depolymerizace dusíkatých sloučenin (např. bílkovin) pomocí extracelulárních enzymů, jako jsou proteázy, na menší peptidy a aminokyseliny je často limitující krok v další mineralizaci půdní organické hmoty a celkově koloběhu dusíku v půdě (Jan et al. 2009; Wilkinson et al. 2014). Množství aminokyselin v půdách se mění v průběhu vegetačního období a odráží tak sezónní změny, které probíhají v půdě i v lesním ekosystému (Werden-Pfisterer et al. 2009). Všechny aminokyseliny se mohou vyskytovat jako L- nebo D- formy (tzv. enantiomery). Obě formy aminokyselin se v přírodě přirozeně vyskytují, ale častěji se v organismech a jejich metabolitech vyskytují jejich L-enantiomery. Z D-isomerů aminokyselin se nejčastěji vyskytují D-alanin a D-glutamová kyselina a obě se, jako peptidoglykany, podílejí na stavbě buněčných stěn mikroorganismů (O'Dowd a Hopkins 1998; Holík et al. 2016). Z pohledu chemického složení jsou L- a D-isomery aminokyselin totožné. Rozdíl mezi L- a D-enantiomerem aminokyseliny spočívá v prostorovém uspořádání substituentů na chirálním centru aminokyseliny, které tvoří opticky aktivní uhlík α . Podle toho, jak je stáčena rovina polarizovaného světla, se určuje, zda jde o L-isomer (stočení světla doleva) nebo D-isomer (stočení světla doprava) (Vodrážka, 1996; Holík, 2010). Veškeré proteiny ve všech živých organismech jsou, až na malé výjimky, složeny z 21 aminokyselin.

Patří mezi ně:

1. Aminokyseliny s alifatickým postranním řetězcem
 - Alanin
 - Glycin
 - Isoleucin
 - Leucin
 - Valin
2. S karboxylovou nebo amidovou skupinou na postranním řetězci (kyselá skupina)
 - Kyselina asparágová
 - Kyselina glutamová
 - Asparagin
 - Glutamin
3. S aminovou skupinou na postranním řetězci (bazická skupina)
 - Arginin
 - Lysin
4. S aromatickým jádrem nebo hydroxylovou skupinou na postranním řetězci
 - Fenyylalanin
 - Histidin
 - Threonin
 - Tryptofan
 - Tyrosin
 - Serin
5. Se sírou v postranním řetězci
 - Cystein
 - Methionin
6. Aminokyseliny obsahující sekundární amin (někdy též tzv. iminokyseliny)
 - Prolin

Jako 21 aminokyselina se uvádí Selenocystein, který nahrazuje cystein v lidském enzymu glutathionperoxidáze a v enzymech některých bakterií.

L-aminokyseliny hrají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech, jako například syntéza proteinů nebo tvorba fytohormonů. U rostlin exogenní příjem aminokyselin

zlepšuje proces fotosyntézy a pomáhá odolávat stresovým podmínkám (např. dehydratace, zasolení) (Sánchez-Hernández et al. 2013).

D-enantiomery aminokyselin se vyskytují v organické hmotě v menším množství než L-enantiomery. L-aminokyseliny mohou v půdním prostředí podléhat abiotické a biotické racemizaci na jejich D-enantiomery. K abiotické racemizaci dochází v důsledku působení tepla, změny pH, přítomnosti solí nebo aldehydů. V půdě se D-aminokyseliny rozpustí v půdním roztoku, a poté se označují jako volné aminokyseliny, nebo se výměně naváží na půdní koloidy, popřípadě na půdní organickou hmotu (Friedman, 1999; Vranová et al. 2012). D-aminokyseliny mohou mít vliv na biochemické procesy v půdě. Mikroorganismy i rostliny jsou schopny metabolizovat D-enantiomery aminokyselin, ale pouze v omezené míře a mohou inhibovat jejich růst (Svennerstam et al. 2007).

Rozdíly v mineralizaci mohou být způsobeny různými podíly L- oproti D-enantiomerům použitých pro anabolismus, katabolismus nebo kvůli různé adsorpci a jejich dostupnosti v půdě. Půdní vlastnosti, jako je nízké pH, mohou podpořit abiotickou racemizaci. Například L-alanin je protonován na karboxylovou skupinu. Snížení pH také vede k posunu složení mikrobioty směrem k většímu zastoupení hub a pro ty, jsou D-aminokyseliny horším zdrojem pro výživu (Vranová et al. 2012). Biotická racemizace aminokyselin má své optimum v alkalickém pH (Ju et al. 2009). Vysoké pH může být spojeno i s obsahem solí, které také mohou racemizaci stimulovat. Například hořčík racemizaci stimuluje, zatímco chlorid sodný nemá žádný vliv (Tokuyama, 2001). Zatímco proteinogenních aminokyselin je 21 a jsou přímo zapojeny do struktur proteinů, tak neproteinogenní aminokyseliny tuto úlohu nemají. Neproteinogenních aminokyselin bylo nalezeno již několik tisíc a přímo v rostlinách asi 250 a plní v nich různé role, např. ochrana proti stresu, antimikrobiální a alelochemickou činnost nebo skladování dusíku (Bell, 2003).

Neproteinogenní aminokyseliny mohou vstoupit do půdy z různých zdrojů, a to skrz nadzemní a podzemní rostlinnou biomasu, kořenové exudáty, mikroorganismy a výkaly zvířat (Vivanco, 2009). V půdě se objevují, podobně jako proteinogenní aminokyseliny, jako volné, rozpuštěné v půdním roztoku nebo výměně navázané na koloidní částice a případně na organickou hmotu. Yu et al. 2002 zjistili, že neproteinogenní aminokyseliny a alkyllaminy mohou tvořit až 31% z celkového množství aminokyselin. Rozklad rostlinného materiálu zvyšuje množství neproteinogenních aminokyselin,

přičemž nejvyšší koncentrace je ve starých žlutých listech (Casagrande a Given 1980; Vranová et al. 2011).

Největší pozornost ve výzkumných studiích je věnováno kyselině gama-aminomáselné a ornitinu. V půdě (ornice, listnaté lesy a borovicové lesy) pocházejí z živočišných a mikrobiálních zdrojů v hydrolyzovaných a nehydrolyzovaných formách (Schmidt a Stewart 1997). Nejvyšší množství bylo nalezeno v podmáčených půdách (až 50% celkových volných aminokyselin) a půdě borových lesů, kde tvoří asi 13% z celkového množství volných aminokyselin (Németh et al. 1988; Vranová et al. 2011). Ornitin se často vyskytuje v bakteriích a představuje významné množství volných neproteinogenních aminokyselin v půdě a je závislý na druhu vegetace. V rašelině a rašelinných hydrolyzátech byl zjištěna aminokyselina citrulin, spolu se stopovými množstvími ornitinu a kyseliny gama-aminomáselné (Casagrande a Given 1980). V hydrolyzátech půd a ve frakcích humínových látek byly zjištěny také kyselina cysteová, β -alanin, taurin, sarkosin, norvalin nebo norleucin (Szajdak a Österberg 1996). Nejširší spektrum neproteinogenních aminokyselin bylo nalezeno ve fulvokyselinách, kde celkové množství těchto aminokyselin dosahovalo až k 46% (Casagrande, 1974). V lučních půdách bylo zjištěno významně vyšší množství β -alaninu a kyseliny α -aminoadipinikové (Szajdak a Österberg 1996; Vranová et al. 2011).

1.1.5 Zasolení půd

Do lesního ekosystému se soli nejčastěji dostávají z okrajů silnic, které jsou v zimním období ošetřovány posypovým materiálem používaným pro zlepšení bezpečnosti silničního provozu. Nejčastěji (z celosvětového pohledu) se používají soli na bázi chloridů (Hintz a Relyea 2017), u nás nejčastěji NaCl. Sníh, smíchaný s posypovou solí, se pak dostává na okraje silnic a při jeho roztátí se transportuje sůl dále do přilehlého okraje lesního porostu. Zde dochází k její akumulaci a vyvolává stres, který negativně ovlivňuje rostliny, půdní mikroorganismy, houby a narušuje půdní strukturu. Půdní mikroorganismy hrají důležitou roli v udržování a zvyšování kvality půdy tím, že regulují rozklad organické hmoty a zpřístupňují živiny.

Mikrobiální parametry jsou citlivými indikátory změn kvality půdy v reakci na použitý management nebo environmentální stres (Wang et al. 2008; Egamberdieva et al. 2010). Jedním z jeho představitelů je zasolování půd. Zasolení ovlivňuje mikroorganismy především snížením osmotického potenciálu, přičemž některé z nich se mohou

přízpůsobit a mikrobi citliví na snížený osmotický potenciál zahynou (Chowdhury et al. 2011). Mikroorganismy se mohou přízpůsobit akumulací osmolytů (Hagemann, 2011), včetně aminokyselin v mikrobiálních buňkách a houby se přízpůsobují hromaděním polyolů (Beales, 2004). Zvyšující se obsah solí ovlivňuje i půdní strukturu a omezuje tím pohyblivost živin, což vede k nedostatku živin pro rostliny i půdní mikrobiotu (Wong et al. 2010). Obecně platí, že extracelulární enzymatická aktivita je nižší v půdách, které jsou přirozeně zasolené, než v půdách nezasolených (Ghollarata a Raiesi 2007). Testování enzymatické aktivity obvykle vyjadřuje potencionální aktivitu při substrátovém nasycení (Burns et al. 2013). Výsledky pak jsou pravděpodobně ovlivněny nižším obsahem organické hmoty a mikrobiální biomasy.

V půdách s různým stupněm zasolení bylo zjištěno, že enzymová aktivita klesá s rostoucím zasolením, což poukazuje na přímý negativní vliv solí na enzymovou aktivitu (Saviozzi et al. 2011). Citlivost půdních enzymů, resp. Vliv na jejich aktivitu, na zasolení se liší. Silně inhibována je aktivita ureáz, alkalických fosfatáz, β -glukosidáz (Pan et al., 2013) a proteáz, zatímco dehydrogenázy a katalázy jsou ovlivněny méně (Garcia a Hernandez 1996; Yan et al. 2015). V inkubačních testech provedených Saviozzi et al. 2011 byl podobný vliv, při aplikaci NaCl do půdy, zjištěn u amyláz a alkalických fosfatáz. U proteáz také klesala aktivita enzymu s přibývajícím množstvím NaCl, ale po 20-tém dni inkubace došlo při hodnotě elektrické konduktivity 2 ke zotavení a výsledek byl podobný, jako u kontrolních vzorků. Enzym mohl být ochráněn před vlivem NaCl jeho imobilizací v trojrozměrných sítích jílových a humusových komplexů (Rietz a Haynes 2003; Khalili et al. 2011).

Pathak a Rao (1998) ve své práci uvádí, že mineralizace dusíku může pokračovat i když je mikrobiální aktivita potlačena přítomností solí. Tato mineralizace může pokračovat pomocí enzymů, které se ještě nacházejí v půdě, ale jejich samotná aktivita ještě nebyla ovlivněna vysokou slaností a alkalitou půdního prostředí. Kromě sníženého množství biomasy se pro vysvětlení klesající aktivity enzymů používá i snižující se osmotický potenciál, se kterým se potýkají mikrobiální společenstva. Dochází při tom k nižší dostupnosti zdrojů pro výrobu bílkovin, které se pak ve sníženém množství uvolňují do půdy. Kromě toho, vysoké koncentrace solí denaturují proteiny a snižují jejich rozpustnost, čímž se snižuje aktivita enzymů (Rath a Rousk 2015). Vysoká koncentrace solí také může vést k dispergaci půdních koloidů, z nich se uvolní navázané extracelulární enzymy a ty jsou pak náchylné k rozkladu (Garcia a Hernandez 1996).

Zasolení půd snižuje aktivitu enzymů, ale může vést k větší rozmanitosti bakteriálních druhů než je v půdách nezasolených (Yang et al. 2016).

Změny ve složení mikrobiálního společenstva, při stresu vyvolaném solemi, jsou způsobeny odlišnou mezí tolerance v rámci mikrobiálních genotypů (Hasbullah a Marschner 2015). Zvrátit negativní vliv solí lze aplikací organických hnojiv do půdy (např. hnůj, kompost nebo mulč) (Guangming et al. 2017). Dokládají to svými výsledky Liu et al. 2010, kdy kombinací organických a chemických hnojiv dosáhli zvýšení uhlíku i dusíku v mikrobiální biomase. Zvýšila se také aktivita enzymů (dehydrogenázy, alkalické fosfatázy, β -glukosidázy a ureázy). Organická hnojiva (zbytky) mohou zlepšit dostupnost živin pro rostliny (Albuquerque et al. 2007), objemovou hmotnost půd a zvýšit strukturální stabilitu půdy (Tejada a Gonzalez 2005).

1.1.6 Fytohormony v půdách

Rostlinné hormony jsou signální molekuly, které působí jako chemičtí poslové ke kontrole růstu a vývoje rostlin. Kromě této role v reakci rostlin na změny podmínek okolního prostředí jsou hormony také hlavními prostředky, které regulují genetickou expresi v rostlinách. Fytohormony jsou organické látky, jejichž syntetizace probíhá v určitých orgánech rostlin a mohou být transportovány na jiná místa v těle rostliny, kde pak vyvolají specifickou biochemickou, fyziologickou nebo morfologickou odezvu. Příkladem vlivu těchto látek je např. tvorba kořenů, kvetení, větvení a tvorba odnoží či regulace klidového stavu a klíčení semen. Zvyšují také odolnost rostlin vůči různým biotickým a abiotickým faktorům prostředí. Nicméně, fytohormony jsou aktivní i v tkáních, které je syntetizují (Baca a Elmerich 2007).

Fytohormony se obvykle zařazují do pěti skupin, a jsou to: auxiny (především kyselina indol-3-octová), cytokininy, gibereliny, kyselina abcisová a etylen. Dále jsou jako k nim často přiřazovány brassinosteroidy, jasmonáty, kyselina salicylová a polyaminy (Kurepin et al. 2014). Kromě rostlin jsou schopny produkovat fytohormony i půdní bakterie a houby (Baca a Elmerich 2007). Fytohormony, které produkují mikroorganismy a houby, jsou využívány jako prostředníci v komunikaci mezi rostlinou a rhizosférou. Příznivé účinky produkce fytohormonů se projevují stimulovaným růstem kořenů, vytvářením míst pro infekci a nodulaci na kořenech rostlin (Amara et al. 2015). Mikrobiální syntetizace fytohormonů, ale také může znamenat jejich patogenitu,

protože mnohé patogeny produkují růstové regulátory v množstvích, které přesahují limity potřebné pro správnou komunikaci s rostlinou (Tsavkelova et al. 2006).

Rozsah bakteriálních rodů, u kterých je známa produkce růstových regulátorů a jsou také schopny kontrolovat patogenitu u rostlin, je poměrně široký a jsou to např. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Streptomyces*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhodococcus* nebo *Serratia* (Ahmad et al. 2008; Soltani et al. 2010; Prashar et al. 2014). Schopnost mikroorganismů syntetizovat rostlinné hormony jsou pokládány za jednu z hlavních vlastností rhizosférických, epifytických a symbiotických bakterií, které stimulují a usnadňují růst rostlin (Suzuki et al. 2003; Kravchenko et al. 2004). Některé volně žijící mikroorganismy (tj. ty, které netvoří v průběhu svého života asociace s rostlinami) jsou také schopny syntézy fytohormonů.

1.1.7 Auxiny

Vymezení pojmu rostlinný hormon auxin (z řečtiny „Auxein“, což znamená růst) upravuje celý repertoár rostlinných vývojových procesů. V jejich interakci s rostlinami mohou mikroorganismy rušit vývoj rostlin tím, že ruší auxinovou rovnováhu v rostlinách (Mole et al. 2007). Nejvíce produkovaným auxinem v rostlinách, ale je produkován i mikroorganismy a houbami, je indol-3-octová kyselina (indole-3-acetic acid) a méně zastoupená indol-3-máselná kyselina (indole-3-butyric acid) (Duca et al. 2014). Fytohormon auxin, resp. Indol-3-octová kyselina, ovládá v rostlinách téměř každý aspekt, který se týká jejich růstu a vývoje a je považován za základní sloučeninu modulující rostlinu (Halliday et al. 2009; Grossmann, 2010). Ústřední roli hraje v buněčném dělení, prodlužování, vývoji plodu a stárnutí. U dvouděložných rostlin iniciuje růst kořenů, listů a kvetení (Phillips et al. 2011), zatímco u jednoděložných rostlin hlavně růst postranních a adventivních kořenů (McSteen, 2010).

V jehličnatých dřevinách koordinuje vaskulární vývoj a kambiální růst a v krytosemenných rostlinách pak velikost xylémových buněk (Duca et al. 2014). Ovládá také schopnost rostlin vyhýbat se stínu a narušení této funkce vede k nedostatečnému růstu rostlin (Tao et al. 2008). Uvádí se, že až 80% mikroorganismů obývajících oblast rhizosféry má schopnost syntetizovat a uvolňovat auxiny, především indol-3-octovou kyselinu, a to jako sekundární metabolity (Patten a Glick 1996). Rhizobakteriemi

vylučovaný auxin interferuje s mnoha vývojovými procesy rostlin změnou jeho endogenního množství v rhizosféře (Glick, 2012; Spaepen et al. 2007). Na bakterie pak působí jako reciproční signální molekula, která ovlivňuje genovou expresi. V důsledku toho má indol-3-octová kyselina důležitou roli v interakcích na úrovni rhizosféra-rostlina (Spaepen a Vanderleyden 2011). Signalizace pomocí indole-3-octové kyseliny je spojena také s obrannými mechanismy rostlin proti patogenním bakteriím. Svědčí o tom větší citlivost rostlin vůči exogenní aplikaci auxinu a je jedno, jestli jej vyprodukovala rhizosféra nebo patogenní mikroorganismus (Ahemad a Kibret 2014).

K rozsáhlé komunikaci mezi rostlinou a bakteriemi dochází v různých vývojových fázích rostliny a signalizační molekuly tedy hojně používají oba partneři. Bakterie jsou schopné detekovat hostitelskou rostlinu a iniciovat její kolonizaci, upravit svou strategii a pomocí látek, jako je kyselina indole-3-octová regulovat růst. Na druhé straně jsou rostliny schopny rozpoznat sloučeniny, které produkují mikroorganismy, nastavit podle toho své obranné mechanismy a růstové odpovědi v závislosti na typu mikroorganismu, se kterým se setkaly. Konečný výsledek tohoto dialogu je v rozsahu od symbiózy po patogenezí. Jde tedy o vysoce koordinované procesy (Bais et al. 2004; Etesami et al. 2015). Auxiny stimulují kořenový systém rostlin, čímž zvětšují jeho velikost, hmotnost a kořenovou architekturu. Při inokulaci rostlin mikroorganismy, které produkují auxiny, dochází také k silné stimulaci růstu adventivních kořenů (Solano et al. 2008), ale může docházet i k inhibici růstu primárních kořenů (Schlindwein et al. 2008). Rostliny s rozsáhlejším kořenovým systémem lépe přijímají živiny z půdy (Mañero et al. 1996). Auxiny, ale mohou mít i inhibující vliv. Pokud se však koncentrace auxinů dostane mimo specifikované rozmezí, dojde buďto k zablokování růstu kořenů anebo auxiny nebudou mít vliv na jejich růst. Celkově pozitivní vliv auxiny produkujících mikroorganismů je možné demonstrovat na vyrovnávání negativního účinku stresu například zasolení půd nebo kontaminaci půd těžkými kovy (Brígido a Glick 2015). Z mikroorganismů, které žijí v půdě, produkují auxiny především rody *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Alcaligenes*, *Pantoea* a *Streptomyces* (Apine a Jadhav 2011). Kromě půdních bakterií produkují auxiny i sinice, epifytické, endofytické, metanotrofní a mořské bakterie (Sergeeva et al. 2002).

Hlavním prekurzorem k syntéze auxinů, resp. Kyseliny indol-3-octové, u rostlin i mikroorganismů je aminokyselina L-tryptofan. Biosyntetické dráhy, které vedou k výrobě kyseliny indol-3-octové, bylo identifikováno celkem pět. Rozdíly mezi

syntézou auxinů v rostlinách a mikroorganismech jsou malé a liší se pouze meziprodukty biosyntézy (Spaepen a Vanderleyden 2011). Mikroorganismy syntetizují indol-3-octovou kyselinu několika cestami. Nejčastěji se tvoří pomocí kyseliny indol-3-pyrohroznové a aldehydu indol-3-octové kyseliny, dále přeměnou L-tryptofanu na indol-3-octový aldehyd a u fytopatogenních bakterií biosyntézou pomocí indol-3-acetamidu (Costacurta a Vanderleyden 1995; Kameneva a Muronets 1999; Tsavkelova et al. 2006). Některé meziprodukty syntézy indol-3-octové kyseliny mohou být reverzibilně uloženy v buňkách, jako např. indol-3-mléčná kyselina, i když přesná funkce není známa. Auxiny často tvoří konjugáty, kdy jsou kovalentně navázány na cukry nebo aminokyseliny (Woodward a Bartel 2005). Tyto sloučeniny mají různorodé role. Nejčastěji se takto chrání před degradací a usnadňují dopravu do cílových míst působení, ale někteří autoři poukazují také možnost, že konjugace je prvním krokem k jejich degradaci (Seidel et al. 2006).

Syntéza auxinů mikroorganismy je rozdílná v rámci jednotlivých druhů, ale i kmenů stejného druhu a ovlivňují ji podmínky, ve kterých se nachází, růstová fáze a dostupnost substrátu pro růst a syntézu izolátů (Shokri a Emtiazi 2010). Samotná syntéza je jemně vyladěná a přizpůsobená růstovým podmínkám. Mezi faktory, které ovlivňují syntézu auxinů, a její regulaci lze zařadit: přítomnost aminokyseliny L-tryptofanu, solí, vitamínů, dále teplota a hodnota pH. Zásadní je samozřejmě dostupnost zdrojů uhlíku a dusíku (Apine a Jadhav 2011). Faktory v životním prostředí, které ovlivňují biosyntézu kyseliny indole-3-octové, jsou tedy rozmanité a souvisejí hlavně se stresem a na rostlinné signalizaci (Spaepen et al. 2007). Mezi vlivy lze tedy zařadit acidifikaci, osmotický stres (suchem nebo zasolením), omezení zdrojů uhlíku a dále chemické efekty a molekuly produkované samotnými rostlinami (Ona et al. 2005; Cassán et al. 2014). Produkci kyseliny indole-3-octové zvyšuje omezené množství dostupného uhlíku, kyselé pH a snižování růstové rychlosti bakterií a tedy fyziologickému stavu bakteriálních buněk. Syntéza auxinu probíhá ve všech růstových fázích mikrobů, ale výrazně se zvyšuje při přechodu do stacionární fáze (Malhotra a Srivastava 2009). Kyselé pH zvyšuje výrobu kyseliny indole-3-octové zvýšením exprese genu *ipdC*. Další faktory zvyšující produkci je osmotický stres (vliv sucha), kyselina abcisová, fytopatogenní houbové efekty a některé L-aminokyseliny. Naproti tomu oxidační stres, zasolení a metyl jasmonáty syntézu auxinu snižují (Cassán et al. 2014).

Mnoho bakterií je schopno produkovat auxiny, ale aktivně je degradovat umějí jen některé druhy (Scott et al. 2013; Zúñiga et al., 2013). Auxin, resp. Kyselina indole-3-octová, je ideálním zdrojem potravy pro mikroby, protože poskytuje uhlík i dusík potřebný pro přežití. Schopnost degradace auxinů může být pro některé mikroorganismy selektivní výhodou v prostředí, které je jimi bohatě nasyceno. Degradace auxinů může nastat také z důvodu jejich toxicity pro bakteriální buňky, protože kyselina indole-3-octová je slabá kyselina a její deprotonací v pH neutrální cytoplazmě může jejím okyselením inhibovat buněčný růst (Tromas a Perrot-Rechenmann 2010). Pomocí degradace mohou také mikroorganismy manipulovat s fyziologií rostlin a vytvářet si tak pro sebe vhodné prostředí pro přežití nebo kolonizaci (Scott et al. 2013). Kromě kyseliny indole-3-octové kyseliny se přirozeně vyskytuje ještě jeden auxin, a to kyselina indole-3-máselná (indole-3-butyric acid). Její přirozený výskyt byl zjištěn u rostlin a byla prokázána produkce u několika druhů mikroorganismů. Výskyt tohoto auxinu byl zjištěn v semenáčcích, listech, ale především v kořenech rostlin a vyvolává růst sekundárních kořenů (Bartel et al. 2001). Zdroj, ze kterého je tento auxin syntetizován je prozatím neznámý, má ale vyšší stabilitu vůči degradaci než indole-3-octová kyselina. Jsou také názory, že indole-3-máselná kyselina je ve skutečnosti jednoduchý konjugát kyseliny indole-3-octové a na tento auxin je převáděn oxidací (Ludwig-Müller, 2000). Tento auxin je využíván ke stimulaci zakořeňování u jehličnanů a řízků, které zakořeňují poměrně obtížně (Hunt et al. 2011). Jeho produkce byla zaznamenána v bakteriálních kulturách u druhů *Azospirillum brasilense* (Martínez-Morales et al. 2003), *Agrobacterium rubi* a *Bacillus subtilis* (Goswami et al. 2015). Indole-3-máselná kyselina byla také pozorována při inokulaci kořenů arbuskulárními mykorrhizními houbami a stimulován byl růst jemných postranních kořenů (Ludwig-Müller, 2000). Vliv auxinů na enzymovou aktivitu půdních bakterií, kromě této práce, dosud nebyl zkoumán.

1.1.8 Cytokininy

Cytokininy se řadí, podobně jako auxiny, mezi fytohormony. V rostlinách řídí dělení buněk, buněčný cyklus, ovlivňují diferenciaci a stimulují vývojové procesy rostlin (Srivastava, 2002). Strukturálně se cytokininy dělí do dvou podskupin, a to na adeninový a fenylnmočovinový (fenylurea) typ. Cytokininy adeninového typu představují přírodní a syntetické sloučeniny, jako je například kinetin, zeatin nebo 6-

benzylaminopurin. Cytokininy ze skupiny fenylurea jsou zastoupeny syntetickými molekulami difenylurea a thidiazuron (Gupta et al. 2016).

Po chemické stránce tvoří cytokininy adeninového typu většinou puriny a látky odvozené od adeninu a modifikované substitucí na N6 substituenty, které obsahují také několik ribosidů, ribotidů a glykosidy. Stimulační nebo inhibiční vliv cytokininů je většinou spojen s několika fyziologickými a biologickými procesy, včetně zpoždování stárnutí chlorofylu, tvorby orgánů v celé řadě tkání, rozvoji kořenů, kontrola apikální dominance (Sakakibara, 2006). Cytokininy indukují buněčné dělení, pokud jsou v kombinaci s optimální koncentrací auxinu. Biologická aktivita cytokininů a jim podobným sloučenin, není jednotná a normálně závisí na mnoha strukturálních aspektech. Například přírodní i umělé molekuly adeninového typu cytokininů (zeatin, isopentenyl adenin, kinetin a 6-benzylaminopurin) mají dvojí alkylový můstek na N6 pozici.

Rostliny mají velký povrch, kterým jsou v kontaktu se svým okolím s cílem maximalizovat dostupnost vody a živin pro jejich absorpci kořeny a mohly maximalizovat proces fotosyntézy a výměnu plynů prostřednictvím svých nadzemních částí. Toto velké rozhraní umožňuje pohyb cytokininů mezi rostlinou a jejím prostředím. Kořeny jsou hlavním místem biosyntézy cytokininů v krytosemenných rostlinách. V kořenech jsou vysoké koncentrace cytokininů a jejich pohyb mezi půdou a kořeny může potencionálně ovlivnit syntézu a metabolismus endogenních cytokininů v kořenech, a potažmo i fyziologické procesy v rostlině. Existují také důkazy o tom, že rostliny jsou schopny absorbovat cytokininy prostřednictvím svých kořenů (Stirk a Staden 2010). Dostupnost cytokininů pro rostliny závisí na typu spojení mezi mikroorganismem a rostlinou.

Mnoho bakteriálních kmenů žijících v oblasti rhizosféry je schopno produkce cytokininů a jejich spektrum je podobné jako u auxinů. Z bakteriálních kmenů jsou to například *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum rubrum*, *Serratia*, a *Xanthomonas* (García de Salome et al. 2001; Lugtenberg et al. 2013).

V půdě existují dvě skupiny mikroorganismů, a to volně žijící v rhizosféře a mikrobi, kteří jsou v úzkém vztahu s rostlinou od symbiózy po parazitismus. V mnoha případech je vztah mezi mikroorganismem a rostlinou patogenní, což má za následek tvorbu hálek

a nádorů. Tyto útvary obsahují zvýšené hladiny cytokininů, které pak mohou difundovat do mezibuněčných prostor v kůře kořenů (Bashan a Holguin 1997). Naproti tomu většina volně žijících mikroorganismů má na rostliny pozitivní vliv, jako například stimulace růstu kořenů, zvýšený příjem živin, potlačování chorob (Patten a Glick 1996). Cytokiny produkované těmito mikroorganismy mají na růst rostlin menší vliv, protože difundují do rhizosféry a mohou být degradovány dříve, než dosáhnou své cílové destinace (Patten a Glick 1996; Bashan a Holguin 1997).

Příkladem pozitivního vlivu bakterií, které jsou schopny syntetizovat cytokiny, mohou být bakteriální fixátoři dusíku. Tyto mikroorganismy mají specifický vztah s rostlinami. Jsou schopni vstoupit do kořenů rostlin, stimulovat v nich dělení zralých kortikálních buněk a vytvořit tak kořenovou uzlinu se specifickou morfologií. Fixací dusíku a jeho redistribucí se zlepšuje růst rostliny. Část tohoto příznivého účinku je přičítán hormonům, respektive zvýšeným hodnotám cytokininů v kořenových hálkách (Stirk a Staden 2010). Lohar et al. 2004 ve své práci poukazuje, že výsledky inokulací poskytují nepřímé důkazy, že rostliny jsou schopny využívat cytokiny mikrobiálního původu.

U patogenních půdních bakterií, například *Agrobacterium tumefaciens* a *Pseudomonas sp.* Bylo pozorováno, že jsou schopny manipulovat s koncentrací cytokininu v hostitelských rostlinách (Greene 1980). Při porovnání patogenních a nepatogenních kmenů bakterií se ukázalo, že aktivita cytokininů v patogenních kmenech bakterií byla vysoká, zatímco u nepatogenních bakterií byla zanedbatelná (Lichter et al. 1995). Naproti tomu Sakakibara et al. 2005 srovnával biosyntézu infikovaných a neinfikovaných rostlin, a došel k závěru, že bakteriální infekce nemá vliv na biosyntézu cytokininů v hostitelské rostlině.

Bakterie tedy jsou důležitým zdrojem cytokininů. Podílejí se na degradaci organické hmoty a při této činnosti se cytokiny mohou uvolňovat do půdního prostředí. Podobně tak mohou činit i patogenní bakterie, které žijí v úzkém spojení s rostlinami. Vzhledem k velké ploše, kterou jsou rostliny úzce spojeny se svým okolím, se nedá opomenout možnost, že ke kořenům rostlin je dodáváno velké množství exogenních cytokininů. Bakterie, které produkují cytokiny, mohou působit na endogenní hladiny cytokininů v kořenech a nepřímo tak ovlivnit růst a vývoj celé rostliny.

1.1.9 Fenolické látky

Fenolické látky patří mezi nejrozšířenější skupinu sekundárních metabolitů a mají velký význam při interakci mezi rostlinou a půdním prostředím. Jsou nedílnou součástí rostlinného těla, slouží jako pigment v květech, poskytují ochranu před invazivními organismy, fungují jako signální molekuly, působí jako alelopatické sloučeniny a ovlivňují rostlinný růst (Lynn a Chang 1990). Fenolické látky je možno rozdělit na hydrofilní a hydrofobní kyseliny (Qualls a Haines 1991; Suominen et al. 2003).

Do půdního prostředí se dostávají prostřednictvím výluhů a výměšků anebo z rozpadajících se zbytků rostlin a výkaly zvířat. Rostlinný opad a kořeny jsou tedy zapojeny do půdní fytotoxicity, přičemž kořeny nejvíce ovlivňují hladiny fenolů v půdním prostředí (Siqueira et al. 1991). Koncentrace fenolických kyselin v půdní organické hmotě se pohybuje na povrchu půdy od 2,11% do 4,39% a v kořenech dvouděložných rostlin v rozmezí 0,09% až 0,61% (Hartley a Whitehead 1985). V trávách jsou fenolické sloučeniny součástí buněčných stěn a obsahuje 1-3 % fenolických kyselin. V buněčných stěnách jsou zabudovány jako cukerné konjugáty a z rostlinného materiálu se uvolňují při napadení mikroorganismy, které degradují celulózu pomocí enzymu celulóza (Chesson et al. 1982). V půdním prostředí se uvolňují i rozkladem humínových látek, které pro některé půdní mikroorganismy představují zdroj uhlíku. V půdě spolupůsobí při rozpouštění a vyluhování půdních minerálů, tvorbě humusu, alelopatii a v parazitální asociaci mezi rostlinou a mikroorganismy (Beier, 1990). V půdách fenolové sloučeniny, zvláště pak taniny, ovlivňují mineralizaci uhlíku a dusíku, včetně degradace komplexních proteinů, a mohou mít negativní dopad na činnost extracelulárních enzymů (Nierop a kol. 2006; Kanerva et al. 2008). Pro lesní porosty mohou fenolické látky způsobit i problémy s obnovou a to vzhledem k tomu, že v lesních půdách je rychlost chemické oxidace pomalá. Bylo také zjištěno, že koncentrace fenolických monomerů koreluje s půdní podzolizací (Mallik, 1997). V písčitéch půdách, které mají nízkou adsorpční kapacitu, podléhají fenolické látky rychlému rozkladu. Fenolické látky se tedy uchovávají v půdní organické hmotě a představují až 50% z celkové půdní fenolové kapacity (Siqueira et al. 1991).

Důležitou roli hraje také pH půdy při adsorpci fenolů. Ve většině půd se tyto sloučeniny vyskytují v ionizovaném stavu se záporným nábojem. V půdách s vyšším pH může dojít k nevratné adsorpci (Read a Jensen, 1989). Mikroorganismy jsou schopny polymerovat

fenolické kyseliny prostřednictvím enzymu polyfenoloxidázy a peroxidázy na velmi stabilní a odolné látky. Volné fenolické látky v půdním roztoku mohou mikroorganismy také využít jako zdroj uhlíku (Rahouti et al. 1989). Tyto dva procesy jsou důležité mechanismy při detoxikaci půdního prostředí.

Degradace fenolických látek může být provedena několika odlišnými skupinami mikroorganismů a to prostřednictvím různých mechanismů. Většina bakterií degraduje fenolické kyseliny a výsledným produktem štěpení je kyselina maleylpyruvická. Obecně se rozklad fenolických látek realizuje konkrétními biochemickými cestami.

1.1.10 Porostní mezery („Gaps“)

Hlavním nástrojem cíleného využívání přírodních procesů je v lesním hospodářství přirozená obnova lesa, kdy se využívá především ekologicko-stabilizační efekt lesa v kontextu adaptačních schopností jednotlivých dřevin či jejich směsí. Součástí tohoto způsobu hospodaření je tvorba porostních mezer. Jejich velikost, tvar, nebo třeba orientace časově a prostorově ovlivňuje distribuci srážek, tepla a světla a kromě vlivu na samotné rostliny má přímý dopad na půdní mikroklima. Změnou mikroklimatu dochází ke změnám v půdní biochemii a v případě exponovaných stanovišť i částečně v půdní fyzice. V rámci biochemie dochází ke změnám v systému kořen – mikroorganismy a houby – půda, který má vliv na rozklad organické hmoty s dopadem na výživu rostlin (dřevin) a na ztráty vzniklé změnou aktivity půdní bioty. Tento systém má také zpětnou vazbu k samotným rostlinám, kdy dochází k ovlivnění jejich adaptačních schopností.

Postupy v obhospodařování lesa, jako jsou prořezávky, probírky, tvorba porostních mezer (kotlíky – „Gaps“) nebo holosečí, tedy ovlivňuje stanovištní klima změnami teploty a vlhkosti půdy, dostupností živin a produktivity vegetace. Vytváření porostních mezer v dospělých porostech může zlepšit vlastnosti v obnovovaném porostu a případně přispět k biologické rozmanitosti v přirozeně obhospodařovaných lesích (Bolton a D'Amato 2011; Pang et al. 2013; Pang et al. 2016). Vytvoření porostní mezery ovlivní vlastnosti kořenové biomasy (Peng a Thomas 2006), půdní mikroklima (Galhidy et al. 2006), rozložení uhlíku v půdě (Tian et al. 2010) a strukturu mikrobiálního společenstva (Zu et al. 2009). Dále se sníží rychlost respirace z kořenů stromů a v důsledku zlepšení mikroklimatu (zvýšení dostupnosti živin, tepla, světla a vlhkosti) ke zvýšení heterotrofní respirace (Pang et al. 2016). Změna v biotických a abiotických faktorech se

může lišit podle velikosti porostní mezery (Marthews et al. 2008). Ve velkých porostních mezerách nebo na holosečích je sorpce vody pomocí okolních stromů zanedbatelná, dochází k odpařování vody z povrchu půdy a případně je transpirována přítomnou vegetací (nejčastěji trávami). Teplotní režim pak závisí na množství přímého slunečního záření a intenzitě odpařování vody, které stanoviště naopak ochlazuje. V malých porostních mezerách naopak dochází k vysoušení půdy sorpcí vody kořeny okolních stromů. Teplotní režim je pak, podobně jako u velkých porostních mezer, řízen množstvím přímého slunečního záření a intenzitou odpařování vody. Tyto rozdíly v pohybu půdní vody a teplotním režimu mohou mít za následek změnu v aktivitě půdní biomasy (Tang et al. 2005; Pang et al. 2016).

Vytvoření porostní mezery může být hlavním faktorem zvýšení strukturální a prostorové heterogenity. Zvýšením dostupnosti zdrojů a uvolněním potlačených stínu tolerantních dřevin se také podpoří druhová diverzita porostu (Spies, 1991).

U holosečí bylo prokázáno, že zvyšují dostupnost dusíku a dochází zde k jeho ztrátám prostřednictvím vyluhování (Frazer et al. 1990; Thiel a Perakis 2009). Naproti tomu mezery vytvořené v porostu odumřením nebo odstraněním i jednoho stromu má malý vliv na zvýšení mineralizace dusíku, respektive $N-NO_3$ (Prescott et al. 2003). Dostupnost dusíku se zvyšuje, pokud je odstraněno více sousedních stromů. Například Parsons et al. 1994 zaznamenali zvýšení dostupnosti dusíku odstraněním 30 stromů v borovém lese, Prescott et al. 2003 ve smrkovém lese v porostní mezeře o velikosti 0,1 ha a nebo Scharenbroch a Bockheim (2007) v listnatém lese s plochou porostní mezery 300 až 2000 m².

V některých studiích byla zjištěna různá dostupnost dusíku v závislosti na poloze dle světových stran. Bauhus (1996) nebo Hope et al. 2003 zjistili zvýšenou dostupnost dusíku na severní straně porostní mezery a také podél okrajů porostů na této světové straně. Na holosečích zjistil Hayes (2002) významný nárůst množství anorganického dusíku směrem k jižním okrajům pasek, ale nezjistil žádné významné zvýšení dostupnosti dusíku na severním okraji paseky.

Zvýšená dostupnost dusíku v porostních mezerách a na holinách je přičítána sníženým příjmem dusíku rostlinami a rychlejší mineralizaci organické hmoty v důsledku teplejších a vlhčích půdních podmínek (Parsons et al. 1994; Thiel a Perakis 2009). Zbytková organická hmota, jako je například biomasa z odumřelých kořenů stromů,

také poskytuje labilní zdroj dusíku pro mineralizaci půdní mikrobiotou (Fahey et al. 1988; Chen et al. 2002). Jak uvádí Hope et al. 2003 může být zvýšená dostupnost dusíku v porostních mezerách důsledkem omezení dostupnosti uhlíku pro půdní mikroorganismy sníženým množstvím rostlinného opadu.

Zvýšené množství dostupného dusíku může změnit složení podrostní vegetace (Verheyen et al. 2012), zvýšit četnost nitrofilních druhů rostlin (Fenn et al. 2007), okyselit podpovrchové vody (Högberg et al. 2013) a samozřejmě i změnit půdní chemické vlastnosti (Breiner et al. 2007). Tyto změny mohou mít negativní vliv na stabilitu lesních ekosystémů a případně ztížit obnovu lesa. Výsledky jsou nicméně vázané na druhové složení porostu, způsob obhospodařování lesa a i na místní poměry (Lin et al. 2015).

**Vliv enantiomerů kyseliny vinné na
proteolytickou aktivitu půd.**

Holík, L., Vranová, V., Kočvarová, S., Rejšek, K. (2016).

Chemické listy, 110, 651-654.

VLIV ENANTIOMERŮ KYSELINY VINNÉ NA PROTEOLYTICKOU AKTIVITU
PŮD

LADISLAV HOLÍK, VALERIE VRANOVÁ, SOŇA KOČVAROVÁ, KLEMENT
REJŠEK

Ústav geologie a pedologie, Lesnická a dřevařská fakulta

Mendelova univerzita v Brně

Zemědělská 3, 613 00, Brno

e-mail: ladislav.holik@mendelu.cz

Klíčová slova: enantiomery kyseliny vinné; půdní proteáza; mineralizace dusíku; lesní ekosystém

Keywords: tartaric acid enantiomers; soil protease; nitrogen mineralization; forest ecosystem

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 salicylová⁵⁻⁷. U flavonoidů nebyl prokázán vliv na aktivitu půdních proteáz⁸. 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 smíšeném 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 MI 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.,

průměrnou roční teplotou 4,9°C a ročním úhrnem srážek okolo 1 100 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 provedeného zásahu a s úrovnovým proředěním. Na území ŠLP MI 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 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 v chladnu a temnu. Vzorky byly odebírány na podzim roku 2013. Tab. 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.

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 (kontrola), Oe horizont	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, Bwk	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

Stanovení proteolytické aktivity půd

Stanovení proteolytické aktivity půd proběhlo dle upravené metodiky¹². Do Erlenmeyerovy baňky byl navážen 1g 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, 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 4 000 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 poté 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 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 inkubací 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 pomocí modulu jednofaktorová ANOVA a vícenásobné porovnání pomocí 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 buko-dubového 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 % u množství 5 µg a 50 µg (tab. II). Naopak 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 u 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 úrovnovým 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 například aminokyseliny¹⁴ a ty jsou schopny ovlivnit (stimulačně/inhibičně) proteolytickou aktivitu¹⁵. Stimulačně, v kombinaci

s přidavkem 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.

Tabulka II. Proteolytická aktivita po přidavku L- and D- enantiomerů kyseliny vinné v množství 0, 5, 50 a 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ suché půdy.

Stanoviště	0	5	50	100	SE \pm
Louka, Ad horizont					
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
Smrk (kontrola), Oe horizont					
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
Smrk (úrovňový zásah), Oe horizont					
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
Listnatý porost, BK-DB, Oe horizont					
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
Listnatý porost, BK-DB , Ahk horizont					
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
Listnatý porost, BK-DB , Bwk horizont					
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
Listnatý porost, DB, Ah horizont					
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
Listnatý porost, DB, Bw horizont					
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

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, SE \pm pro Fisherův LSD test.

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.

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

LITERATURA

1. Qian X., Gu J., Sun W., Li Y-D., Fu Q-X., Wang X-J., Gao H.: *App. Soil. Ecol.* 77, 18 (2014).
2. Mikanová O., Šimon T., Kopecký J., Ságová-Marečková M.: *Open Life Sci.* 10, 249 (2015).
3. Purev D., Bayarmaa J., Ganchimeg B., Ankhtsetseg B., Anumandal O.: *Mongolian J. Chem.* 13, 16 (2012).
4. 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).
5. Miyazawa T., Iwanaga H., Yamada T., Kuwata S.: *Chirality* 4, 427 (1992).
6. Renella G., Landi L., Mina J.M.G., Giagnoni L., Nannipieri P.: *App. Soil Ecol.* 47, 106 (2011).
7. Lakzayi M., Sabbagh E., Rigi E., Keshtehgar A.: *Int. J. Farm. Alli. Sci.* 3, 980 (2014).
8. Tomasi N., Weisskopf L., Renella G., Landi L., Pinton R., Varanini Z., Nannipieri P., Torrent J., Martinoia E., Cesco S.: *Soil Biol. Biochem.* 40, 1971 (2008).
9. Lojková L., Vranová V., Rejšek K., Formánek P.: *Chirality* 26, 1 (2014).

10. Dundek P., Holik L., Vranova V., Rejsek K., Formanek 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.: *Biotech. Lett.* 36, 2325 (2014).
12. Nannipieri P, Pedrazzini F, Arcara PG, 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. Vranova V., Formanek P., Rejsek K.: *Chem. Listy* 105, 661 (2011).

L. Holík, V. Vranová, S. Kočvarová, K. Rejšek (Department of Geology nad 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 regulation of key processes of nitrogen mineralization and nitrogen cycling in terrestrial ecosystems. Soil samples taken from dense forest, thinned forest and meadow treated with L- or D- tartaric acid and casein-protease activity was measured. Results of this work indicate significant role of natural concentrations of L- and D-tartaric acid in the regulation of key processes of soil N mineralization in different terrestrial ecosystems.

**Proteasová aktivita lesních půd a její reakce na
přítomnost fenolických látek v půdě.**

Holík, L., Vranová, V., Rosíková, J., Rejšek, K. (2017).

Chemické listy, 111, 47-49

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

LADISLAV HOLÍK, VALERIE VRANOVÁ, JANA ROSÍKOVÁ, KLEMENT
REJŠEK

Ústav geologie a pedologie, Lesnická a dřevařská fakulta

Mendelova univerzita v Brně

Zemědělská 3, 613 00, Brno

e-mail: ladislav.holik@mendelu.cz

Klíčová slova: půdní proteasa, fenoly, lesní půda

Keywords: soil protease, phenols, forest soil

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, kteří 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 jemnými kořeny, jež se zapojují do ectomycorrhiz a jejich úkolem je chránit kořeny před útoky parazitických hub³⁻⁹. Fenolové kyseliny ovlivňují fyziologické procesy, jako je růst buněk, propustnost membrán, syntéza chlorofylu a bílkovin včetně enzymatické aktivity a dýchání^{10,9}.

Cílem této studie je zjistit, do jaké míry je proteolytická aktivita půd stimulována anebo 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 1 100 mm. Půdní vzorky byly odebírány na lučním 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 luvická. 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 v chladnu a temnu. Vzorky byly odebírány na podzim roku 2012. Tab I udává vybrané fyzikální a chemické vlastnosti testovaných půd.

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 hor.	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.

Stanovení proteolytické aktivity půd

Stanovení proteasové aktivity půd proběhlo dle upravené metodiky ¹¹. Do Erlenmeyerovy baňky byl navážen 1g 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 4 000 ot/min., 1 ml supernatantu byl odebrán, smíchan se 7 ml 3,7% roztoku Na₂CO₃ a

poté byl přidán 1 ml 0,06% roztoku CuSO_4 . Vzorky 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 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 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 $\mu\text{g}^{-1}\text{g}^{-1}$ 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 (ferulic acid) a 4-hydroxybenzoová (4-Hydroxybenzoic acid) byly přidány rozpuštěné v demineralizované vodě před inkubacemi 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. Použit byl statistický program Statistica 12.0.

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 (4-Hydroxybenzoic acid) nevykázala statistickou významnost ($P < 0,05$). Organominerální horizonty reagovaly naopak spíše stimulačně, přičemž kyselina ferulová (ferulic acid) působila stimulačně ve všech měřeních, zatímco kyselina 4-hydroxybenzoová (4-Hydroxybenzoic acid) 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 (ferulic acid) 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}.¹⁶ 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 proteázy. V ojedinělých případech sice byla zjištěna i zvýšená aktivita proteás, mohlo se však jednat o specifickou odpověď odlišného spektra mikroorganismů žijících v daném horizontu.

Tabulka II. Proteolytická aktivita půd ^a po přidavku fenolických kyselin v množství 0, 5, 50 a 100 µg g⁻¹ suché půdy.

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

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

Závěr

Cílem 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 enzymatickou 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.

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

LITERATURA

1. Lugtenberg B. , KAMILOVA F.: *Ann. Rev. Microbiol.* 63, 541 (2009).
2. Moe L.A.: *Amer. J. of 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., Rehfues 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. of 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, K. Rejšek (Department of Geology nad Soil Science, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno);

Protease activity of forest soils and their responses to the of phenolic compounds in soil

Soil proteolytic complex plays an important role in nutrient cycling in the activity . Interaction of this enzyme complex with phenolic acids were studied on selected soils. The aim was to determine how soil protease reacts to the presence of phenolic compounds, ie. Substances released during the decomposition of organic matter and reach the soil environment. Phenolic compounds in organic soil horizon caused inhibition of proteases, 4-hydroxybenzoic acid showed no statistical activity ce ($P < 0.05$) in the spruce stand. Organomineral horizons responded stimulant, with ferulic acid acted as a stimulant in all measurements, while the 4-hydroxybenzoic acid stimulates acted only with old deciduous stands. Mineral horizons reacted like organic horizons, namely inhibitory. The exception was ferulic acid at a young deciduous forest which did not show statistical activity ce.

**Vliv proteinogenních a neproteinogenních
aminokyselin na nativní proteasovou aktivitu
lesních půd.**

Holík, L., Vranová, V., Rejšek, K. (2016).

Chemické listy, 110, 812-817

VLIV PROTEINOGENNÍCH A NEPROTEINOGENNÍCH AMINOKYSELIN NA
NATIVNÍ PROTEASOVOU AKTIVITU LESNÍCH PŮD

LADISLAV HOLÍK, VALERIE VRANOVÁ, KLEMENT REJŠEK

Ústav geologie a pedologie, Lesnická a dřevařská fakulta

Mendelova univerzita v Brně

Zemědělská 3, 613 00, Brno

e-mail: ladislav.holik@mendelu.cz

Klíčová slova: aminokyseliny; půdní proteasa; mineralizace dusíku; lesní ekosystém

Keywords: amino acids; soil protease; nitrogen mineralization; forest activity

Úvod

Lesní ekosystém je jedním ze základních suchozemských ekosystémů a půda v lesním prostředí klíčovým prvkem pro existenci živých organismů^{1,2}. V lesním ekosystému je rozklad organického materiálu z velké části výsledkem činnosti půdních enzymů, které produkují komunity bakterií a hub^{3,4}. Půdní enzymy mají klíčové biochemické funkce v celkovém procesu rozkladu organické hmoty v půdním prostředí⁵⁻⁷. Mají důležitou roli pro životní procesy mikroorganismů v půdě, stabilizaci půdní struktury, rozklad organických zbytků, přeměnu organických látek a koloběh živin⁸⁻¹⁰. Hydrolýza bílkovin je první fází mineralizace půdního organického dusíku a je závislá na proteolytických enzymech, které jsou syntetizovány rostlinami a půdními mikroorganismy^{11,12}.

Půdní dusík obsažený v aminokyselinách představuje snadno dostupný zdroj dusíku a uhlíku pro výživu rostlin a pro půdní mikroorganismy¹³. Aminokyseliny se do půdy dostávají z různých zdrojů, ať už z biomasy rostlin, kořenových exudátů, mikroorganismů či výkalů zvířat¹⁴⁻¹⁷. Všechny biogenní (proteinogenní) aminokyseliny, se mohou, vyjma glycinu, vyskytovat jako tzv. enantiomery (tedy L- nebo D- formy). Obě formy aminokyselin se v přírodě vyskytují, ale v živých organismech a jejich metabolitech se častěji vyskytují L- izomery. Z D- enantiomerů aminokyselin se nejčastěji vyskytují D-alanin a D-glutamová kyselina, které se podílejí na stavbě buněčných stěn mikroorganismů jako peptidoglykany^{18,19}. Neproproteinogenní aminokyseliny se vyskytují v hydrolyzátech půd a humusových látkách. Koncentrace v humusových látkách se liší podle typu těchto látek a obecně nejširší spektrum a současně i největší podíl těchto aminokyselin se nachází ve fulvokyselinách. Ve výluzích z lesních půd byly zjištěny relativně vysoké koncentrace L-ornithinu a v zaplavovaných půdách a pod porosty borovice byly naměřeny vysoké koncentrace neproproteinogenní aminokyseliny γ -aminomáselné²⁰.

Práce je zaměřena na vliv vybraných proteinogenních a neproteinogenních aminokyselin na aktivitu tzv. nativní půdní proteasy. Jejich stimulace/inhibice byla studována v několika odstupňovaných koncentracích proteinogenních a neproteinogenních aminokyselin a měření byla provedena na výzkumných plochách v lesních porostech buku, dubu a smrku.

Experimentální část

Odběr půdních vzorků

Ke studiu proteázové aktivity byly zvoleny porosty na Školním lesním podniku Masarykův les Křtiny (ŠLP MI Křtiny), které se rozkládají v nadmořské výšce 210 – 575 m n. m., roční průměrná teplota je 7,5°C a průměrné roční srážky jsou 610 mm. Vybrány byly čtyři plochy, tři s listnatým porostem (2 x buk a 1x dub) a jedna s jehličnatým porostem (smrk). První lokalitou byl Máchův památník (N 49°19'2.4'', E 16°40'19''), kde se nachází porost buku lesního (BK, věk 70 let) s půdním typem rendzina melanická. Zde byly odebrány organický (Oe) a organominerální (Ahk) horizont. Druhou lokalitou byl Útěchov (N 49°18'1'', E 16°37'31'') s porostem dubu letního (DB, věk 35 let) a půdním typem kambizem modální. Odebírány byly organický (Oe) a organominerální (Ah) horizont. Poslední lokalita byly Jedovnice se dvěma zkoumanými porosty (BK, N 49°19'19'' E 16°47'48''; SM, N 49°19'21'', E 16°47'38''), a to bukový porost (BK, věk 90 let) a porost smrku (SM, věk 100 let). V obou porostech je půdní typ kambizem modální a odebíraly se organický a organominerální horizont (Oe a Ah). Byly odebírány směsné vzorky ze tří náhodných odběrů z jednotlivých půdních horizontů. Následně byly vzorky přesety přes síto s velikostí oka 2 mm a uskladněny v chladnu a temnu. Vzorky byly odebrány na konci června roku 2016. Tab. 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.

Tabulka I Vybrané fyzikální a chemické vlastnosti zkoumaných půd ^a

Stanoviště	C _{tot} [%]	N _{tot} [%]	C/N	pH H ₂ O	pH 1M KCl	jíl [%]	Prach [%]	písek [%]
BK, Oe horizont (rendzina)	10,26	0,94	10,9	7,13	6,55	-	-	-
BK, Ahk horizont (rendzina)	1,99	0,22	9,0	7,31	6,47	12,47	65,04	22,49
BK, Oe horizont (kambizem)	13,20	0,70	18,9	4,26	3,38	-	-	-
BK, Ah horizont (kambizem)	4,49	0,30	15,0	4,01	3,29	6,40	48,80	44,70
DB, Oe horizont (kambizem)	20,58	1,36	15,1	6,63	6,16	-	-	-
DB, Ah horizont (kambizem)	17,75	1,17	15,2	5,65	5,14	6,81	50,03	43,15
SM, Oe horizont (kambizem)	26,10	1,37	19,1	4,13	3,06	-	-	-
SM, Ah horizont (kambizem)	9,45	0,54	17,5	4,42	3,32	10,40	50,90	38,60

^aOe horizont – organický horizont; Ah, Ahk – organominerální horizont; DB – dubový listnatý porost; BK – bukový listnatý porost, SM – smrkový jehličnatý porost. C_{tot} – celkový uhlík; N_{tot} – celkový dusík; C/N – poměr celkového uhlíku a dusíku; pH – půdní reakce.

Stanovení proteolytické aktivity půd

Stanovení nativní proteasové aktivity půd proběhlo dle metodiky ²¹. V této metodice je TRIS-HCl pufr (pH 8,55) nahrazen demineralizovanou vodou (DEMI H₂O) s cílem měřit proteasovou aktivitu při hodnotách pH, které jsou blízké skutečnému pH půdy ve zkoumaném půdním vzorku. Do Erlenmeyerovy baňky byl navážen 1g vlhké půdy, přidáno 2 ml DEMI H₂O a 100 µl DEMI H₂O s rozpuštěnou aminokyselinou v koncentracích 5, 50 a 100 µg na gram suché půdy. Dále byly přidány 2 ml 1% roztoku kaseinu (sodná sůl) a vzorky byly inkubovány 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. Zastavení reakce (inkubace) proběhlo

přidáním 1 ml 7,5% kyseliny trichloroctové (TCA) a vzorky poté centrifugovány při 4 000 ot/min. Po centrifugaci byl odebrán 1 ml supernatantu a smíchán se 7 ml 3,7% roztoku Na_2CO_3 a poté byl přidán 1 ml 0,06% roztoku CuSO_4 . Vzorky byly ponechány 30 min při pokojové teplotě, následně se přidal 1 ml Folin-Ciocalteu reagentu (smíchán s demineralizovanou vodou v poměru 1:3) a tato směs se inkubovala 5 min při teplotě 37°C a následně byla ponechána 15 min při pokojové teplotě. Proteolytická aktivita byla měřena na základě produkce aminokyseliny L-tyrosinu pomocí spektrofotometrie při vlnové délce 578 nm (Biochrom Libra S22). Kalibrační křivka byla připravena z roztoku L-tyrosinu v demineralizované vodě a roztoku DEMI H_2O / 7,5% TCA (v poměru 3:1).

Studovány byly proteinogenní aminokyseliny L- a D-alanin (L- a D-Alanine), L- a D-glutamová kyselina (L- a D-glutamic acid) a neproteinogenní aminokyseliny kyselina gama-aminomáselná (γ -aminobutyric acid), L-Ornitin (L-Ornithine), L-Citrulin (L-Citrulline) a beta-alanin (β -Alanine).

Statistická analýza

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

Výsledky a diskuse

Přidání proteinogenních aminokyselin alaninu a kyseliny glutamové (jejich L- a D-enantiomerů) mělo převážně stimulační vliv na aktivitu nativní proteasové aktivity. Plně stimulační vliv se projevil v organickém horizontu (Oe horizont) bukového porostu s půdním typem kambizem (Tab II) a v organominerálním horizontu (Ah horizont) dubového a smrkového porostu (Tab II) se shodným půdním typem (kambizem). Shodnou opověď na přídavek proteinogenních aminokyselin ukázalo měření proteasové aktivity v bukovém porostu s půdním typem rendzina, kdy shodně došlo ke statisticky nevýznamné reakci ($P < 0,05$) u D-alaninu a to v organickém i organominerálním horizontu (Tab II). Velmi slabý vliv proteinogenních aminokyselin se ukázal

v organominerálním horizontu bukového porostu s půdním typem kambizem, kdy se stimulační efekt projevil jen u L-alaninu v koncentraci 100 µg a u ostatních nebyla zaznamenána statistická významnost ($P < 0,05$). Stimulační vliv nebyl zjištěn u organického horizontu smrkového porostu, kdy se aktivita nativní půdní proteasy nedostala nad hranici statistické významnosti ($P < 0,05$), ale naopak došlo k inhibici u D-enantiomeru kyseliny glutamové u koncentrací 50 µg a 100 µg (Tab II). Vliv L- i D-alaninu na nativní proteasovou aktivitu byl stimulační stejně jako v práci ²², kdy se měřila potencionální proteasová aktivita (byl použit TRIS-HCl pufr, pH 8,55), a celkově stejná byla i velikost stimulace (cca 10 %) i rozdíly mezi L- a D- enantiomerem alaninu. Rozdíl byl však u kyseliny glutamové, kdy autoři zjistili silnou inhibici proteas (cca 40 %), zatímco v našich měřeních došlo k inhibici pouze v jednom případě, a to u D-enantiomeru v organickém horizontu smrkového porostu. U D- enatiomerů však docházelo častěji k výskytu statisticky nevýznamných měření. Stimulující vliv alaninu a kyseliny glutamové se prokázal na mikrobiální biomasu jako celek, kdy ve studii ²³, došlo po jejich přidání do půdního vzorku k nárůstu mikrobiální biomasy i respirační aktivity. Stejně pozitivní vliv měly i alanin ve studii ²⁴ na množství půdního organického uhlíku.

Na přítomnost neproteinogenních aminokyselin reagovala proteasa podobně jako na proteinogenní aminokyseliny (Tab III). Statisticky nevýznamný vliv ($P < 0,05$) se ukázal u dubového porostu v organickém horizontu (Oe horizont), v organominerálním horizontu (Ah horizont) pak byly statisticky významné změny (stimulace) u aminokyseliny L-Citrulin a β-alanin a statisticky nevýznamné u kyseliny gama-aminomáselné a L-Ornitinu (Tab III). Zjištěna byla také inhibice proteasové aktivity a to v organominerálním horizontu (Ah horizont) smrkového porostu u aminokyselin L-Ornitin a L-Citrulin (Tab III), stimulační vliv měla naopak kyselina gama-aminomáselná (γ-aminobutyric acid). Neproteinogenní aminokyseliny jsou významnými zdroji organického dusíku v mnoha ekosystémech. Výzkumy naznačují, že hrají důležitou roli ve formě metabolitů, či jako signální látky při akvizici živin, nebo jako odpověď na stres ²⁵. Výsledky studie naznačují, že zvýšená mineralizace neproteinogenních aminokyselin by mohla být odpovědí mikroorganismů na stresující podmínky na stanovišti (vodní deficit v půdním prostředí). Kromě možného stresu může hrát roli jak kvantita a kvalita organické hmoty, vstupující do mineralizačního procesu

(v závislosti na dřevině), tak rozdílné pH jednotlivých stanovišť, které je vhodné pro dané druhy mikroorganismů žijících v tomto prostředí ²⁶.

Tabulka II. Nativní proteolytická aktivita ^a po přidavku proteinogenních aminokyselin v množství 0, 5, 50 a 100 µg g⁻¹ suché půdy.

Stanoviště ^c	0	5	50	100	SE ± ^b
Bukový porost, Oe horizont (rendzina)					
L-Alanine	553,15	565,07*	565,37*	563,58*	2,70
D-Alanine	553,15	555,54	557,62	558,52	3,35
L-Glutamic acid	553,15	558,52	563,28*	564,48*	2,80
D-Glutamic acid	553,15	555,83	562,09*	563,29*	2,98
Bukový porost, Ahk horizont (rendzina)					
L-Alanine	255,67	259,15	264,86*	268,33*	2,52
D-Alanine	255,67	258,41	256,17	255,67	2,51
L-Glutamic acid	255,67	261,88*	268,83*	274,54*	2,51
D-Glutamic acid	255,67	260,64	262,62*	260,64	2,32
Bukový porost, Oe horizont (kambizem)					
L-Alanine	30,26	40,61*	41,03*	46,00*	4,01
D-Alanine	30,26	35,64	41,85*	51,80*	3,90
L-Glutamic acid	30,26	43,10*	43,93*	40,20*	3,84
D-Glutamic acid	30,26	31,25	49,32*	42,68*	4,82
Bukový porost, Ah horizont (kambizem)					
L-Alanine	30,32	29,84	33,43	37,96*	1,70
D-Alanine	30,32	29,84	31,52	31,52	1,72
L-Glutamic acid	30,32	30,32	31,76	31,99	1,68
D-Glutamic acid	30,32	33,67	28,41	29,61	1,60
Dubový porost, Oe horizont (kambizem)					
L-Alanine	317,40	316,64	331,87*	327,55*	3,23
D-Alanine	317,40	313,60	315,63	312,08	2,60
L-Glutamic acid	317,40	326,28*	334,66*	341,51*	2,36
D-Glutamic acid	317,40	312,40	320,96	314,87	2,59
Dubový porost, Ah horizont (kambizem)					
L-Alanine	104,98	113,65*	118,52*	112,60*	0,89
D-Alanine	104,98	113,87*	122,97*	124,24*	1,07
L-Glutamic acid	104,98	109,84*	125,51*	122,12*	1,37
D-Glutamic acid	104,98	106,03	109,21*	125,72*	1,35
Smrkový porost, Oe horizont (kambizem)					
L-Alanine	38,58	35,99	40,91	41,17	1,61
D-Alanine	38,58	37,03	40,91	37,03	1,83
L-Glutamic acid	38,58	44,02	35,47	38,32	2,35
D-Glutamic acid	38,58	39,61	34,18*	29,77*	1,69
Smrkový porost, Ah horizont (kambizem)					
L-Alanine	37,60	58,17*	46,74*	47,78*	1,50
D-Alanine	37,60	38,85	41,96*	43,62*	1,19
L-Glutamic acid	37,60	42,17	42,58*	41,75	2,03
D-Glutamic acid	37,60	43,00*	41,34	40,71	1,66

Tabulka III. Nativní proteolytická aktivita ^a po přidavku neproteinogenních aminokyselin v množství 0, 5, 50 a 100 µg g⁻¹ suché půdy.

Stanoviště ^c	0	5	50	100	SE ± ^b
Bukový porost, Oe horizont (rendzina)					
γ-aminobutyric acid	557,03	572,23*	573,42*	568,65*	1,83
L-Ornithine	557,03	561,37	561,20	560,91	2,22
L-Citrulline	557,03	569,84*	573,72*	567,16*	2,77
β-alanine	557,03	576,70*	579,38*	582,96*	2,33
Bukový porost, Ahk horizont (rendzina)					
γ-aminobutyric acid	257,42	271,56*	262,13*	264,86*	2,12
L-Ornithine	257,42	271,56*	269,08*	269,08*	2,28
L-Citrulline	257,42	271,35*	271,35*	271,35*	1,72
β-alanine	257,42	270,32*	271,56*	269,08*	1,48
Bukový porost, Oe horizont (kambizem)					
γ-aminobutyric acid	30,25	43,10*	55,12*	60,51*	3,26
L-Ornithine	30,25	33,57	40,61	56,36*	5,98
L-Citrulline	30,25	63,41*	64,65*	65,06*	4,91
β-alanine	30,25	47,66*	58,02*	50,14*	4,43
Bukový porost, Ah horizont (kambizem)					
γ-aminobutyric acid	33,19	41,31*	37,49*	39,40*	1,77
L-Ornithine	33,19	35,81	35,81	38,20*	2,16
L-Citrulline	33,19	35,10	34,14	34,14	1,82
β-alanine	33,19	34,62	36,29	38,20*	1,66
Dubový porost, Oe horizont (kambizem)					
γ-aminobutyric acid	320,45	320,70	322,73	320,96	2,14
L-Ornithine	320,45	319,94	323,75	322,48	1,52
L-Citrulline	320,45	322,48	316,64	317,91	1,95
β-alanine	320,45	318,93	318,17	319,69	1,89
Dubový porost, Ah horizont (kambizem)					
γ-aminobutyric acid	104,55	111,11*	114,08*	115,14*	2,04
L-Ornithine	104,55	109,21*	108,57*	104,98	1,52
L-Citrulline	104,55	103,92	105,61	102,65	1,94
β-alanine	104,55	105,61	105,82	104,76	0,82
Smrkový porost, Oe horizont (kambizem)					
γ-aminobutyric acid	36,77	46,87*	47,90*	53,60*	2,00
L-Ornithine	36,77	46,35*	44,02*	49,71*	2,26
L-Citrulline	36,77	42,49*	50,49*	53,60*	1,78
β-alanine	36,77	38,58	38,06	47,38*	1,92
Smrkový porost, Ah horizont (kambizem)					
γ-aminobutyric acid	37,18	42,58*	44,04*	35,31	1,71
L-Ornithine	37,18	28,25*	29,29*	31,78*	1,28
L-Citrulline	37,18	28,25*	32,61*	28,25*	1,46
β-alanine	37,18	39,47	36,56	35,94	1,11

^aVýsledky představují množství produkovaného L-tyrosinu v $\mu\text{g} / \text{h}^{-1} / \text{g}^{-1}$ suché půdy, * jsou statisticky významné ($P < 0,05$, $n = 3$). Standardní chyba, ^bSE \pm pro Fisherův LSD test. ^cOe horizont – organický horizont; Ah, Ahk – organominerální horizont.

Závěr

Cílem této práce bylo zjistit, jak reagují nativní půdní proteasy na proteinogenní a neproteinogenní aminokyseliny. Dusík a uhlík obsažený v aminokyselinách představuje zdroj výživy a proteázy zprostředkovávají jeho dostupnost pro půdní prostředí. Výsledky ukazují, že vliv na nativní proteasovou aktivitu je převážně stimulační a vyskytly se pouze tři případy, kdy došlo k jejich inhibici.

Příspěvek vznikl za podpory grantu IGA 13/2013 MENDELU (Interní grantová agentura Mendelovy univerzity v Brně).

LITERATURA

1. Montagnini F., Jordan C.F.: *Tropical forest ecology: the basis for conservation and management*. Springer, Heidelberg 2005.
2. Cheng F., Peng X., Zhao P., Yuan J., Zhong C.: PloS ONE 8.6, e 67353, (2013).
3. Aragón R., Sardans J., Peñuelas J.: Plant Soil 384, 169 (2014).
4. Liu S., Hu R., Zhao J., Brüggemann N., Bol R., Cai G., Lin S., Shaaban M.: J. Plant Nutr. Soil Sci. 177, 541 (2014).
5. Burns R.G. v knize *Microbes in their natural environment* (Slater J.H., Wittenbury R., Wimpenny J.W.T.), kap. 8. Cambridge University Press, London 1983.
6. Sinsabaugh R.L., Antibus R.K., Linkins A.E.: Agric. Ecosys. Environ. 34, 43 (1991).
7. Turner S., Schippers A., Meyer-Stüve S., Guggenberger G., Gentsch N., Dohrmann R., Condon L.M., Eger A., Almond P.C., Peltzer D.A., Richardson S.J., Mikutta R.: Soil Biol. Biochem. 68, 31 (2014).
8. Dick R.P., Sandor J.A., Eash N.S.: Agric. Ecosyst. Environ. 50, 123 (1994).

9. Dilly O., Munch J.C., Pfeiffer E.-M.: *J. Plant Nutr. Soil Sci.* *170*, 197 (2007).
10. Karasawa T., Takebe M., Sato F., Komada M., Nagaoka K., Takenaka M., Urashima Y., Nishimura S., Takahashi S., Kato N.: *Soil Sci. Pl. Nut.* *61*, 295 (2014).
11. Ladd J.N.: *Soil Biol. Biochem.* *4*, 227 (1972).
12. Rasche F., Musyoki M.K., Röhl C., Muema E.K., Vanlauwe B., Cadisch G.: *Soil Biol. Biochem.* *74*, 204 (2014).
13. Owen A.G., Jones D.L.: *Soil Biol. And Biochem.* *33*, 651 (2001).
14. Christensen B.T., Bech-Andersen S.: *Soil Biol Biochem.* *21*, 35 (1989).
15. Henry H.A.L., Jefferies R.L.: *Plant Cell Environ.* *25*, 665 (2002).
16. Bown A.W., MacGregor K.B., Shelp B.J.: *Trends, Plant Sci.* *11*, 424 (2006).
17. Badri D.V., Vivanco J.M.: *Plant Cell Environ* *32*, 666 (2009).
18. Weidel W., Pelzer H.: *Adv. In Enzymol.* *26*, 193 (1964).
19. O'Dowd R.W., Hopkins D.W.: *Soil Biol. And Biochem.* *30*, 2009 (1998).
20. Vranová V., Formánek P., Rejšek K.: *Chem. Listy* *105*, 661 (2011).
21. Rejšek, K., Formanek, P., Pavelka, M.: *Amino Acids* *35*, 411 (2008).
22. Dundek P., Holík L., Vranová V., Rejšek K., Formánek P.: *Acta univ. Agric. Et silvic. Mendel. Brun.*, *59*, 29 (2011).
23. Hopkins D.W., O'Dowd' R.W., Shieli R.S.: *Soil Biol. Biochem.* *29*, 23 (1997).
24. Hamer U., Marschner B.: *Soil Biol Biochem.* *37*, 445 (2005).
25. Vranová V., Rejšek K., Skene K.R, Formánek P.: *Plant and Soil* *342*, 31 (2010).
26. Vranová V., Rejšek K., Formánek P.: *Appl. Soil Ecol.* *70*, 23 (2013).

L. Holík, V. Vranová, K. Rejšek (Department of Geology nad Soil Science, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno);

Effect of proteinogenic and non-proteinogenic amino acids of the native protease activity of forest soils

Soil proteolytic complex plays an important role in nutrient cycling in the activity . Interaction of this enzyme complex with proteinogenic and non-proteinogenic amino acids were studied on soil types cambisol (stands of beech, oak and spruce) and rendzic (beech stand). The aim of the study was to determine how it reacts native soil protease for the presence amino acids, ie. Substances released during the decomposition of organic matter and get into the soil and the environment are important sources of nitrogen and carbon. Overall activity was stimulated by the native soil protease proteinogenic and non-proteinogenic amino acids. In three cases there was inhibition. One has shown to have an inhibitory effect on proteinogenic amino acids (D-glutamic acid) in an organic horizon of a spruce stand and twice with non-proteinogenic amino acids (L-Ornithine and L-Citrulline) in organomineral horizon of a spruce stand.

Publikace IV

**The effect of salinity on native proteolytic activity
in soil**

Ladislav Holik, Valerie Vranová, Klement Rejšek

Polish Journal of Environmental Studies (Under Review)

The effect of salinity on native proteolytic activity in soil

Ladislav Holik *, Valerie Vranová, Klement Rejšek

Mendel University in Brno, Faculty of Forestry and Wood Technology, Department of Geology and Soil Science, Zemědělská 3, 61300, Brno, Czech Republic

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: ladislav.holik@mendelu.cz;
Tel.: +420 545 134 034.

Received:

Accepted:

Abstract:

Salinization of soil has a negative impact on activity of microorganisms and thus leads to disturbances in the cycling of nutrients in the soil environment. Our goal was to find out, what amount of salt has some measurable negative effect on enzymatic activity of soils, namely on native proteases. Inhibition of proteases was detected at as little as 0.5 mg of chloride salts in organomineral horizon from an oak stand, but in most cases, some inhibitory effect appeared from 1 – 2 mg of salt added to soil. Stimulatory effect of salt were also observed, however, in those cases it probably was not associated with activity of the microbial community. Our results indicate the levels, from which the activity of microorganisms will probably decrease and organic matter decomposition will be slowed down.

Keywords: enzymes, forest soil, salinity, soil environment, soil protease

Introduction

Application of road salt is a common practice in winter road maintenance with the objective to ensure safe driving conditions; the most widely used salt is NaCl [1]. However, extensive application of road salt presents a serious problem for the environment [2-3]. The applied salt enters the soil environment in the form of direct runoff, in splashing water or as aerosol deposition [4]. Soil salinization is a major factor leading to degradation [5-6] and decrease of soil fertility [7]. Biological activity often concentrates in the upper few centimetres of soil [8] and changes in this layer may strongly affect its biological properties. From the aspect of ecological function, soil biological activity is essential and its reduction has a significant impact on decomposition of organic matter in soil [9-10].

Salinization of soil causes alkaline reaction, high osmotic pressure and toxic effect of easily-soluble salts (sodium and magnesium chlorides, nitrates, sulphates and carbonates); besides, it also negatively affects hydro-physical properties of soils. Influence of sodium in the presence of chlorides dramatically restricts uptake of nutrients from the salinized soil, especially of nitrogen, phosphorus and magnesium. This leads to unbalanced mineral nutrition or even starvation of plants and also to lower chance of their survival upon exposition to extreme natural and anthropogenic influences [11].

In our work we investigated the impact of salts on native protease activity of soils. Sodium chloride (NaCl) was selected for the experiments as it constitutes 96 – 98% of road salt (the rest is anticaking agents). One chloride salt (KCl) and one sulphate salt (K_2SO_4) were also tested. The salts were applied into soil in graded amounts in order to find out how much salt (in mg) in the soil environment leads to inhibition of native proteases. The presumption of the negative effect of salts was based on the work of Saviozziet al. [9].

Experimental

Study area and soil sampling

The research of protease activity was carried out in the stands of the Training Forest Enterprise Masaryk Forest Křtiny (TFE Křtiny), with altitudes between 210 – 575 m a.s.l., mean annual temperature of 7.5°C and mean annual precipitation of 610 mm.

Four experimental plots were selected, three of them with a broadleaved stand (2 beech stands and one oak stand) and one with a coniferous stand (spruce).

The first locality was Mácha's memorial (N 49°19'2.4'', E 16°40'19'') with a stand of European beech (*Fagus sylvatica* L., aged 70 years), soil type rendzic Leptosol. Samples were collected from organic (Oe), organomineral (Ahk) and mineral horizon (Bwk). The second locality was Útěchov (N 49°18'1'', E 16°37'31'') with a stand of Pedunculate oak (*Quercus robur* L., aged 35 years), soil type haplic Cambisol. Samples were collected from organomineral (Ah) horizon and mineral horizon (Bw). At the third locality, Jedovnice, two stands were investigated: a beech stand (*Fagus sylvatica* L., aged 90 years, N 49°19'19'' E 16°47'48'') and a spruce stand (*Picea abies* /L./ Karst., aged 100 years, N 49°19'21'', E 16°47'38''). In both stands, the soil type is haplic Cambisol; samples were collected from organic (Oe), organomineral (Ah) and mineral horizon (Bw).

Sampling was performed in the middle of the vegetation season (end of June) when the highest biological activity is to be expected. Composite samples of three samplings from the individual horizons were sieved through a 2-mm sieve. Selected physical and chemical characteristics of the tested soils are shown in Table 1. The plots were chosen with the aim to reflect the heterogeneity of the soil environment, both with regard to the soil type and the tree species composition; the represented soil types and stands are typical for the territory of the Czech Republic.

Determination of soil proteolytic activity

Native protease activity of soils was determined according to Rejsek et al. [12]. 2 g of soil were mixed with 100 µl demineralized H₂O with dissolved salt at the concentrations of 0.5, 1, 2 and 4 mg per gram of dry soil. The tested salts were sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl) and potassium sulfate (K₂SO₄).

Statistical analysis

Statistical evaluation of the values of proteolytic activity detected in the individual samples was performed by one-way ANOVA and Fischer's LSD test (multiple comparison) with the use of the Statistica 12.0 software.

Results and Discussion

In beech stands, native protease was the most sensitive to potassium sulfate as inhibition of protease activity appeared already at the 0.5 mg and 1 mg of salt applied (Table 2); response to chloride salts (NaCl, KCl) was generally lower and inhibition occurred at 2 or 4 mg of salt (Table 2). Stimulation of native proteases was also observed in one measurement, after application of NaCl and K₂SO₄ to samples from the beech stand, soil type haplic Cambisol (Table 2). Influence of sodium chloride was not statistically significant ($P < 0.05$) in organic and organomineral horizon on rendzic Leptosol (Table 2). In the oak stand, inhibitory response of native protease to presence of salts in the organomineral horizon appeared at as little as 0.5 mg. In the mineral horizon, inhibition occurred with 1 mg NaCl and 4 mg K₂SO₄. Statistically significant effect ($P < 0.05$) was not observed in KCl.

In spruce stand, salts inhibited native protease activity from the amount of 0.5 mg in the organomineral horizon, while in the organic and mineral horizon it was at 1 – 2 mg of salt (Table 2). Similarly to the beech stand, 0.5 mg of salt had a stimulatory effect on the native proteolytic activity in the organic horizon; higher amounts of salt lead to inhibition. An exception from this was found in the organomineral horizon after addition of KCl, in which case stimulation of proteases was observed in all amounts of salt tested.

Excessive amount of salt has a negative impact on physical and chemical properties of soil [4]. In saline soils, microorganisms suffer from osmotic stress [14], which affects mineralization of carbon and nitrogen as well as enzymatic activity, which is crucial for the decomposition of organic matter [15]. Our objective was to find out, from what amount (mg) salts induce inhibition of native soil proteases. Generally speaking, the level from which inhibition appears is rather varied, both from the aspect of enzymatic response to individual salts as such, and in comparison of different sites and their soil horizons. Besides proteases, there are other enzymes sensitive to presence of salts in soil, for example, ureases and catalases [16]. Many authors, such as Saviozzi et al. [9], [17] or [18], report that salts reduce the activity of enzymes. Inhibition was detected in ureases or dehydrogenases, while amylases and phosphatases did not correlate with increasing salinity and catalases were actually slightly stimulated [9,19]. Zheng et al. [20] observed a slight stimulation of catalases as well, however, only in combination with addition of lead. In other enzymes – ureases and invertases – they also found

inhibited activity. Similar results were reported by Wei et al. [21] in nitrite reductases and nitrate reductases which are, just like proteases, directly linked to nitrogen mineralization. Inhibition may be partially caused by the tendency of salts to reduce solubility and denaturation of enzymes by disturbing their tertiary structure, necessary for enzymatic activity [20]. Salinity also reduces the production, solubility and denaturation of proteins and thus further reduces the enzymatic activity [19].

However, stimulatory effect of salts on proteolytic activity has been observed as well. It was found out that increased salinity may also support mineralization of nitrogen ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ and NO_3^-N) in soils [22-23]. Pathak and Rao [13] report that nitrogen mineralization may continue despite the microbial activity being suppressed by the presence of salts. This is possible thanks to the enzymes that are still present in soil, but their activity has not yet been affected by high salinity and alkalinity of the soil environment. It is probable that the same response appeared in our experiment, i.e. the activity of enzymes was not affected by alkalinity/salinity of the soil environment. This presumption is based on the fact that sorption capacity of the organic and organomineral horizons in forest environment is high and presence of enzymes bound by sorption is therefore to be expected here.

Conclusions

In the presented study we aimed to find out, what amount of salt is sufficient to induce inhibition of native proteases in soils of forest stands. In our experiments, inhibition appeared at as little as 0.5 to 1 mg of salt depending on soil horizon. These results may help to determine the level of salinity from which the microbial community activity will probably be disturbed, with consequences for decomposition of organic matter in soil.

Acknowledgements

This output was based on the project IGA 13/2013. I thank the Internal Grant Agency of Mendel University in Brno (MENDELU) for their support in its implementation.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References and Notes

1. GUESDON G., DE SANTIAGO-MARTIN A., GALVEZ-CLOUTIER R. Phytodesalination potential of *Typha angustifolia*, *Juncus maritimus*, and *Eleocharis palustris* for removal of de-icing salts from runoff water. Environ. Sci. Pollut. Res. **23**, 19634, **2016**.
2. KIM S.Y., KORETSKY C. Effects of road salt deicers on sediment biogeochemistry. Biogeochemistry **112**, 343, **2013**.
3. LI F., ZHANG Y., FAN Z., OH K. Accumulation of De-icing Salts and Its Short-Term Effect on Metal Mobility in Urban Roadside Soils. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **94**, 525, **2015**.
4. GREEN S.M., MACHIN R., CRESSER M.S. Effect of long-term changes in soil chemistry induced by roadsalt applications on N-transformations in roadside soils. Environ. Poll. **152**, 20, **2008**.
5. VAN ANTWERPEN R., MEYER J.H. Soil degradation under sugarcane cultivation in northern Kwa Zulu-Natal. Proc. S. Afr. Sug. Technol. Assoc. **70**, 29, **1996**.
6. HAYNES R.J., HAMILTON C.S. Effects of sugarcane production on soil quality: A synthesis of world literature. Proc. S. Afr. Sug. Technol. Assoc. **73**, 45, **1999**.
7. FERNÁNDEZ-LUQUEÑO F., CABRERA-LÁZARO G., CORLAY-CHEE L., LÓPEZ-VALDEZ F., DENDOOVEN L. Dissipation of Phenanthrene and Anthracene from Soil with Increasing Salt Content Amended with Wastewater Sludge. Pol. J. Environ. Stud. **26** (1), 29, **2017**.
8. MURPHY D.V., SPARLING G.P., FILLERY I.R.P. Stratification of microbial biomass C and N and gross N mineralization with soil depth in two contrasting western Australian agricultural soils. Austral. J. Soil Res. **36**, 45, **1998**.
9. SAVIOZZI A., CARDELLI R., DI PUCCIO R. Impact of Salinity on Soil Biological Activities: A Laboratory Experiment. Comm. Soil Sci. Plant. Anal. **42**, 358, **2011**.
10. ELMAJDOUB B., MARSCHNER P. Responses of soil microbial activity and biomass to salinity after repeated additions of plant residues. Pedosphere **25**, 177, **2015**.

11. ARTAMONOVA V.S., DITS L.Y., ELIZAROVA T.N., LYUTYKH I.V. Technogenic salinization of soils and their microbiological characterization. *Contem. Probl. Ecol.* **3**, 323, **2010**.
12. REJSEK K., FORMANEK P., PAVELKA M. Estimation of protease activity in soil at low temperatures by casein amendment and with substitution of buffer by demineralized water. *Amino Acids* **35**, 411, **2008**.
13. PATHAK H., RAO D.L.N. Carbon and nitrogen mineralization from added organic matter in saline and alkali soils. *Soil Biol. Biochem.* **30**, 695, **1998**.
14. YAN N., MARSCHNER P., CAO W., ZUO C., QIN W. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *Int. Soil and Water Cons. Res.* **3**(4), 316, **2015**.
15. DENDOOVEN L., ALCÁNTARA-HERNÁNDEZ R.J., VALENZUELA-ENCINAS C., LUNA-GUIDO M., PEREZ-GUEVARA F., MARSCH R. Dynamics of carbon and nitrogen in an extreme alkaline saline soil: a review. *Soil Biol. Biochem.* **42** (6), 865, **2010**.
16. GUANGMING L., XUECHEN Z., XIUPING W., HONGBO S., JINGSONG Y., XIANGPING W. Soil enzymes as indicators of saline soil fertility under various soil amendments. *Agric. Ecosys. Environ.* **237**, 274, **2017**.
17. PAN C., LIU C., ZHAO H., WANG Y. Changes of soil physico-chemical properties and enzyme activities in relation to grassland salinization. *Eur. J. Soil Biol.* **55**, 13, **2013**.
18. SINGH K. Microbial and enzyme activities of saline and sodic soils. *Land Degr. Develop.* **27** (3), 706, **2016**.
19. RATH K.M., ROUSK J. Salt effects on the soil microbial decomposer community and their role in organic carbon cycling: a review. *Soil Biol. Biochem.* **81**, 108, **2015**.
20. ZHENG L., ZHANG M., XIAO R., CHEN J., YU F. Impact of salinity and Pb on enzyme activities of a saline soil from the Yellow River delta: A microcosm study. *Phys. And Chem. Of the Earth* **97**, 77, **2017**.
21. WEI M.I.N., GUO H.J., ZHANG W., ZHOU G.W., JUN Y.E., HOU Z.A. Irrigation water salinity and N fertilization: Effects on ammonia oxidizer abundance, enzyme activity and cotton growth in a drip irrigated cotton field. *J. Integr. Agric.* **15** (5), 1121, **2016**.

22. GAO H., BAI J., HE X., ZHAO Q., LU Q., WANG J. High temperature and salinity enhance soil nitrogen mineralization in a tidal freshwater marsh. *PloS one* 9 (4), 95011, 2014.
23. JIA J., BAI J., GAO H., WEN X., ZHANG G., CUI B., LIU X. In situ soil net nitrogen mineralization in coastal salt marshes (*Suaeda salsa*) with different flooding periods in a Chinese estuary. *Ecol. Indic.* 73, 559, 2017.

List of Tables

Table 1. Selected physical and chemical properties of the tested soils.

Table 2. Protease activity after addition of the salts in an amount of 0, 0.5, 1, 2 and 4 mg g⁻¹ dry soil.

Table 1. Selected physical and chemical properties of the tested soils.

Plot	C_t	N_t	C/N	pH	pH	clay	silt	sand
	(%)	(%)		H₂O	1M	(%)	(%)	(%)
Beech, Oe horizon (rendzic Leptosol)	19.68	1.60	12.3	7.00	6.59	-	-	-
Beech, Ahk horizon (rendzic Leptosol)	13.70	1.07	12.8	7.18	6.91	12.47	65.04	22.49
Beech, Bwk horizon (rendzic Leptosol)	2.45	0.19	12.8	6.80	6.44	23.20	60.30	16.50
Beech, Oe horizon (Cambisol)	11.93	0.66	18.1	4.29	3.98	-	-	-
Beech, Ah horizon (Cambisol)	5.98	0.42	14.2	4.79	4.09	6.40	48.80	44.70
Beech, Bw horizon (Cambisol)	3.16	0.16	19.8	4.54	3.98	18.7	56.60	24.70
Oak, Ah horizon (Cambisol)	8.54	0.59	14.5	5.12	4.46	6.81	50.03	43.15
Oak, Bw horizon (Cambisol)	1.22	0.08	15.3	4.31	3.42	26.50	36.00	37.40
Spruce, Oe horizon (Cambisol)	26.76	1.34	20.0	4.07	3.35	-	-	-
Spruce, Ah horizon (Cambisol)	8.16	0.46	17.7	4.22	3.26	10.40	50.90	38.60
Spruce, Bw horizon (Cambisol)	1.22	0.08	15.3	4.50	3.60	21.60	52.50	25.80

Table 2. Protease activity after addition of the salts in an amount of 0, 0.5, 1, 2 and 4mg g⁻¹ dry soil. Results are reported as the average value of the amount of produced µg L-tyrosine h⁻¹ g⁻¹ dry soil, values marked with * are statistically significant (P < 0.05, n = 3). Results for Standard error (SE±) of Fisher's LSD tests.

Plot	0	0.5	1	2	4	SE ±
Beech, Oe horizon (rendzic Leptosol)						
NaCl	557.67	557.67	561.43	563.13	558.02	5.74
KCl	557.67	569.96	560.06	540.95*	528.32*	7.10
K ₂ SO ₄	557.67	546.07*	533.78*	524.23*	528.66*	2.85
Beech, Ahk horizon (rendzic Leptosol)						
NaCl	378.11	370.49	376.84	382.93	384.20	5.81
KCl	378.11	400.45*	379.63	373.85	385.72	4.11
K ₂ SO ₄	378.11	366.42*	366.96*	362.11*	358.55*	4.97
Beech, Bwk horizon (rendzic Leptosol)						
NaCl	82.27	77.18	71.03*	68.06*	68.27*	3.38
KCl	82.27	74.50	74.00	67.43*	63.40*	4.89
K ₂ SO ₄	82.27	76.12	72.09*	71.24*	59.79*	2.99
Beech, Oe horizon (Cambisol)						
NaCl	109.93	112.57	85.75*	58.48*	42.65*	6.19
KCl	109.93	138.08*	131.48*	108.61	97.62*	4.15
K ₂ SO ₄	109.93	124.45*	121.37*	106.42	100.70*	2.73
Beech, Ah horizon (Cambisol)						
NaCl	73.42	84.58*	75.93	67.56	60.58*	2.72
KCl	73.42	84.86*	67.28	66.16	55.55*	3.87
K ₂ SO ₄	73.42	74.53	65.32*	63.37*	61.97*	2.74
Beech, Bw horizon (Cambisol)						
NaCl	18.76	17.98	15.44*	16.02	12.70*	1.25
KCl	18.76	11.33*	13.29*	11.14*	8.79*	1.52
K ₂ SO ₄	18.76	11.33*	13.29*	12.11*	8.99*	1.69
Oak, Ah horizon (Cambisol)						
NaCl	120.54	113.11*	113.91*	112.21*	109.73*	2.61
KCl	120.54	112.66*	113.79*	112.43*	114.69*	2.10
K ₂ SO ₄	120.54	118.70	111.76*	112.21*	107.03*	2.82
Oak, Bw horizon (Cambisol)						
NaCl	11.18	8.52	6.74*	5.50*	5.50*	1.88

KCl	11.18	10.12	10.83	10.47	11.36	0.99
K ₂ SO ₄	11.18	10.12	10.29	10.29	7.27*	0.84
Spruce, Oe horizon (Cambisol)						
NaCl	93.54	86.19	84.96	79.24*	80.88*	4.61
KCl	93.54	120.50*	89.05	71.07*	56.78*	4.50
K ₂ SO ₄	93.54	105.39*	81.29*	74.34*	47.38*	5.30
Spruce, Ah horizon (Cambisol)						
NaCl	62.68	36.85*	36.23*	31.02*	30.61*	3.44
KCl	62.68	77.05*	71.22*	78.09*	83.29*	2.80
K ₂ SO ₄	62.68	33.31*	27.48*	21.86*	20.82*	2.80
Spruce, Bw horizon (Cambisol)						
NaCl	21.23	20.63	22.83	20.63	17.42*	1.50
KCl	21.23	18.42	13.42*	9.81*	7.61*	1.79
K ₂ SO ₄	21.23	22.63	19.83	14.82*	15.82*	1.74

Publikace V

Effect of auxins on the native proteolytic activity of forest soils

Holik Ladislav, Vranová Valerie, Rejšek Klement

Manuscript

(Will be submitted: European Journal of Soil Science)

Title: Effect of auxins on the native proteolytic activity of forest soils

Holik Ladislav*, Vranová Valerie, Rejšek Klement

Mendel University in Brno, Faculty of Forestry and Wood Technology, Department of Geology and Soil Science, Zemědělská 3, 61300, Brno, Czech Republic,

e-mail: holikladis@gmail.com, ktivit.vranova@mendelu.cz,
klement.rejsek@mendelu.cz

*Corresponding author

Article type: Research article

TEXT PAGES: 6

TABLES: 5

Abstract

The soil proteolytic complex displays an important role within mineral nutrient cycling in ecosystems. Both auxins and proteases are produced by soil microbiota, and reciprocally, their activities effect the metabolic role of biota in soil. The results presented here demonstrate the positive effect of auxins on the native proteolytic forest soil activity. Comparing organic and organomineral horizons, auxins promote a higher stimulation of protease activity in the organic horizons. Comparing the different forest stands, auxins promote a high stimulation of protease activity in European beech stands. In the organomineral soil horizons, auxins promote a high stimulation of protease activity in Leptosols in European beech stands and Cambisols in activity ted oak stands. The results confirmed the interrelationships between auxins and the native proteolytic forest soil activity from the viewpoint of dead organic matter decomposition. Furthermore, the general importance of substances produced by the rhizosphere for nitrogen cycling was supported.

Keywords: soil protease, auxins, forest soil, indole-3-acetic acid

1. Introduction

Syntheses of phytohormones, auxins and cytokinins in particular, make a symbiotic association between a plant and a microbial soil coenosis (Mishke, 1988; Kamneva and Muronets, 1999; Tsavkelova et al., 2005). Being concerned with auxins and plants, they affect vegetative growth, flowering, the photosynthetic assimilation of carbon dioxide and resilience against environmental stress (Dörffing, 1982; Merzaeva and Shirokikh, 2010). However, not only plants are capable of producing phytohormones, but rhizospheral microorganisms can also do the same (Arkhipova et al., 2005; Basharat et al., 2010). Phytohormones have been studied for decades, and auxins are some of the best known, which is especially valid because of indole-3-acetic acid and its physiological, biochemical and genetic effects on plants (Costacurta and van Derleyden, 1995; Sergeeva et al., 2002). Indole-3-acetic acid belongs to the most commonly produced, and the most active, auxins (Mohite, 2013). Its production has been monitored in a great range of phototrophic, heterotrophic, pathogenic and symbiotic

microorganisms, including non-rhizosphere microorganisms (Mishke, 1988; Kamneva and Muronets, 1999; Ahemad and Kibret, 2014).

Indole-3-acetic acid has been synthesized by soil microorganisms in different ways. First, indol-3-pyrrolic acid has been synthesized jointly with indole-3-acetic acid aldehyde. Second, L-tryptofan has been converted into indole-3-acetic acid aldehyde, and third, the biosynthesis of indole-3-acetamide, which is typical of phytopathogenic bacteria (Costacurta and Vanderleyden, 1995; Kameneva and Muronets, 1999; Tsavkelova et al., 2006). The formation of such phytohormones by soil microorganisms influences plants and their microbial producers; both of them can be either stimulated in their growth and activities or inhibited. Such ambiguity determines the interrelationship between a plant and a microbial coenoses (Tsavkelova et al., 2006).

The synthesis of auxins depends on a source of available nitrogen (Merzaeva and Shirokikh, 2010). Nitrogen, which limits the growth of both plants (Chapin III et al., 2004) and microorganisms (Demoling et al., 2007; Stavros et al., 2012), can be predominantly found in soil in the form of organic compounds that are not directly bioavailable (Foth and Ellis, 1997). In living tissues, most nitrogen forms proteins and peptides (Kögel-Knaber, 2006): Sowden et al. (1977), Schulten and Schnitzer (1998), Geisseler and Horwath (2008) and Kieloaho et al. (2013) have shown that 40% of total soil nitrogen is formed by proteins, glycoproteins, peptides and amino acids. Proteolytic enzymes, which split polypeptides, are present in plants, animals and microorganisms (Holík et al., 2016a). The intracellular proteases regulate the inner nitrogen cell cycling, and the extracellular proteases aid in soil organic matter decomposition (Wanatabe and Hayano, 1994; Fuka et al., 2009). The proteases are produced by a large number of bacteria, actinomycetes and fungi (Glenn, 1976; Kumar and Takagi, 1999; Vranova et al., 2013), which show high substrate specificity (Kalisz, 1988; Geisseler and Horwath, 2008). The role of proteases in an ecosystem is immense, and a great deal of bioavailable nitrogen originates from their activities (Geisseler and Horwath, 2008).

This paper aims to evaluate the interrelationships between auxins and the native proteolytic forest soil activity. Currently, the artificial production of auxins leads to routine applications focused on a higher rate of success in both young plant rooting and the stimulation of young plant vitality. This investigation of interrelationships between

auxins and the native proteolytic forest soil activity reinforces the role of proteases in dead organic matter decomposition (Holík et al., 2016b).

2. Materials and methods

2.1. Study area

The analysed soil samples were collected from Training Forest Enterprise Masaryk Forest Křtiny (TFE Křtiny) owned by Mendel University in Brno, Czech Rep. The study area was located at a mean altitude of 350 m above sea level, with a mean annual temperature of 7.5°C and a mean annual precipitation of 610 mm. The study plots chosen for this research represent both typical forest stands and soil units of Central Europe. Soils of four forest stands were sampled: i) Macha Memorial, N 49°19'2.4'', E 16°40'19'', a 70-year-old European beech (*Fagus sylvatica* L.) stand on Rendzic Leptosol (WRB, 2015), with organic Oe and organomineral Ahk horizons, ii) Utechov, N 49°18'1'', E 16°37'31'', a 35-year-old oak (*Quercus robur* L.) stand on Haplic Cambisol, with organic Oe and organomineral Ah horizons, iii) Jedovnice I, N 49°19'19'' E 16°47'48'', a 90-year-European beech stand on Haplic Cambisol, with organic Oe and organomineral Ah horizons, and iv) Jedovnice II, N 49°19'21'', E 16°47'38'', a 100-year Norway spruce (*Picea abies* /L./ Karst.) stand on Haplic Cambisol, with organic Oe and organomineral Ah horizons. Each of the horizons were sampled by three individual samples from which one representative sample was brought to the laboratory. The samples were air-dried and sieved through a 2-mm mesh. Table 1 summarises the basic physical and chemical soil properties of the soils studied.

2.2. Native proteolytic soil activity determination

The activity of native soil proteases was determined spectrophotometrically. The analysis comes from a hydrolysis of casein as the substrate, followed by the measurement of the L-tyrosine produced (Rejsek et al., 2008). Two grams of soil were mixed with 100 µl demineralized H₂O with a dissolved auxin at the concentrations of 0, 5, 50 and 100 µg per gram of dry soil. The following auxins were used: i) the naturally occurring indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA), and ii) synthetically prepared the 1-naphthalene acetic acid (NAA) and 2-naphthoxy acetic acid (NOA).

2.3. Statistical analyses

A statistical evaluation of the values of proteolytic activity detected in the individual samples was performed by a one-way ANOVA and Fischer's LSD test (multiple comparison) with the use of the Statistica 12.0 software. In Tables 2-5, the Pearson coefficients that come from the RegAnalysis of the obtained results are presented.

3. Results

Naturally occurring auxins determined at organic Oe horizons stimulated native proteolytic soil activity, even when two experiments proved their inhibition as well. Synthetically produced auxins stimulated proteolytic activity in the European beech forest stands (Tables 2, 3), where NOA led to the highest increase in L-tyrosine production (from 564.02 µg at 0 µg auxin to 645.19 µg at the auxin dose of 100 µg). In the activity tested oak forest stand, the synthetically produced auxins stimulated native proteolytic activity slightly (Table 4), and higher the L-tyrosine production was determined for NAA (398.30 µg) in comparison with NOA (387.61 µg, only). In the Norway spruce forest stand, the inhibition of proteolytic activity was shown (Table 5) when NAA displayed a stronger inhibitive effect (a decrease of the L-tyrosine production from 96.29 µg at 0 µg auxin to 73.82 µg at the auxin dose of 100 µg) in comparison with NOA (a decrease of the L-tyrosine production from 96.29 µg at 0 µg auxin to 82.91 µg at the auxin dose of 100 µg).

The IAA and IBA auxins stimulated native proteolytic soil activity in all study plots. In the European beech forest stands, IBA led to higher production of the L-tyrosine (Table 2, 3). In both activity tested oak and Norway spruce forest stands, IAA caused stronger stimulation of a native proteolytic soil activity, but the difference in stimulation caused by IBA was negligible. For organic Oe horizons, there were no statistically significant differences at $P < 0.05$.

At organomineral horizons, there were milder interrelationships between native proteolytic soil activity and the presence of auxins compared to organic horizons. All the added auxins stimulated proteolytic activity in the European beech forest stand on Rendzic Leptosol (Table 2) and in the activity tested oak forest stand on Haplic Cambisol (Table 4). In the European beech forest stand on Rendzic Leptosol, the

highest production of L-tyrosine followed the auxin dose of 50 µg, and the strongest effect was shown for IBA. In the cultivated oak forest stand, the synthetically produced auxins caused higher stimulation of a native proteolytic soil activity, with IAA stimulated the least (Table 4). In the Norway spruce forest stand, a marginal effect of auxins on a native proteolytic soil activity was determined, and NAA caused the highest production of L-tyrosine (Table 5). The effect of IAA on native proteolytic soil activity was not statistically significant at $P < 0.05$.

The lowest effect of auxins on L-tyrosine production was found in the European beech forest stand on Haplic Cambisol (Table 3). Stimulations of native proteolytic soil activity referred to IBA and NAA, but only for auxin doses of 100 µg. No statistically significant effects at $P < 0.05$ for native proteolytic soil activity were found for the addition of NOA and IAA (Table 3).

4. Discussion

The synthetically produced auxins tested, 1-naphthalene acetic acid (NAA) and 2-naphthoxy acetic acid (NOA), are naphthalene derivatives applied as plant growth regulators in agriculture. Furthermore, NAA has been used as a biocide and a substance that stimulates plant roots, while NOA has been used as a substance to stimulate fruit tree flowering. The routine application of them led to their occurrence in soils, groundwater and fruits (Pulgarín et al. 2012). Synthetically produced auxins are also used in research involved in root morphology (Hocking and Jeffery, 2012) and root exudation (Gómez and Carpena, 2014). This paper presented a stronger influence of NAA and NOA at organic horizons in the European beech forest stands and organomineral horizons in the cultivated oak forest stand. Both synthetically produced auxins showed a positive effect on native proteolytic forest soil activity, which is in agreement with the results obtained for root exudation and root growth in the literature.

Indole-3-butyric acid has an ambiguous position in which it is recognised as either a naturally occurring or synthetically prepared auxin, although some take it as a precursor for indole-3-acetic acid. Kim et al. (2007) regarded it as a synthetically prepared auxin and applied it for *in vivo* experiments with tissue cultures; Bideshki et al.

(2013) studied its effect on a root growth. Strader and Bartel (2011) recognised IBA as the precursor for IAA and studied its transport and metabolism in plants. The main difference between IAA and IBA lies in the number of side carbons, of which IBA has four and IAA has two. IBA is naturally found in plants: maize (*Zea mays* L.) (Ludwig-Müller et al., 1997), pea (*Pisum sativum* /L./ Merr.) (Rashotte et al., 2003), poplars (*Populus* spp.) (Ludwig-Müller, 2000), etc. Liu et al. (2013) and Goswami et al. (2015) showed production of IBA by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPB) even when there was not much information about the function of IBA in the rhizosphere. The presented paper can be compared with other ones focused on a root growth in an environment with added synthetically produced IBA or with inoculation by PGPB. The same conclusions were given by Trueman and Richardson (2008), reinforcing both the summer period and higher root growth stimulation by weaker concentrations of auxin. Kaldorf and Ludwig-Müller (2000) worked with IAA and IBA and incubated a root environment using a mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, and obtained the same results for soils in the oak and the Norway spruce forest stands. Similarly, Davies et al. (2002) presented the same conclusions in European beech and oak forest stands, where IBA showed stronger stimulation for European beech than oak.

Eighty percent of the bacteria in the rhizosphere produce IAA (Naveed et al. 2015). Bacterial IAA stimulates fine root growth while also promoting longer primary and lateral roots (Duca et al. 2014). In addition, Duca et al. (2014) and Sivasankari et al. (2014) confirmed the most prominent reaction of plants to the occurrence of IAA at its highest concentration – 100 µg. Yaqoob et al. (2013) stated that the IAA dose of 50 µg led to 28% longer roots and 16% heavier roots at a fresh state and 80% heavier in dry mass. Tsavkelova et al. (2007) studied the growth of bacterial biomass after adding auxins. For *Mycobacterium* sp. And *Sphingomonas* sp. They showed the highest growth stimulation at the IAA dose of 100 µg, for *Rhizobium* sp. The highest growth was at the IAA dose of 10 µg.

The interrelationships between auxins and the soil enzymatic activity refer to the concentration of auxins in an environment, the effect of auxins on soil bacteria (Tsavkelova et al. 2007) and the bioavailability of nutrients for a phytohormone synthesis (Sivasankari et al. 2014). The interrelationships between auxins and the native proteolytic forest soil activity have not yet been studied. The knowledge of these

interrelationships contributes to the understanding of soil organic matter transformation and nitrogen cycling.

5. Conclusions

The primary aim of the paper was to increase the understanding of interrelationships between auxins and the native proteolytic forest soil activity. The results presented showed a positive effect of auxins on soil proteolytic activity. Higher stimulation was measured in organic horizons than that in organomineral horizons. The interrelationships between auxins and the native proteolytic forest soil activity has not yet been studied, and thus, the data can be effectively used for a deeper understanding of soil organic matter transformation, the role of auxins on soil microorganisms and the process of making organic nitrogen compounds available to plants.

References

- Ahemad, M., Kibret, N. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science*. 2014, 26, 1–20.
- Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko, E.V., Kudoyarova, G.R. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*. 2005, 272, 201–209.
- Basharat, A., Anjum, N.S., Hasnain S. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010, 26, 1379–1384.
- Bideshki, A., Arvin, M.J., Darini, M. Interactive effects of Indole- 3-butyric acid (IBA) and salicylic acid (SA) on growth parameters, bulb yield and allicin contents of garlic (*Alliumsativum*) underdrought stress in field. *International journal of Agronomy and Plant Production*. 2013, 4(2), 271–279, 2013.
- Costacurta, A., Vanderleyden, J. Accumulation of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical Review of Microbiology*. 1995, 21, 1–18.

- Davies, M.J., Hipps, N.A., Kingswell, G. The effects of indole-3-butyric acid root dips on the root development and shoot growth of transplanted *Fagus sylvatica* L. and *Quercus robur* L. seedlings. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 2002, 77(2), 209–216.
- Demoling, F., Figueroa, D., Bååth, E. Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 2007, 39, 2485–2495.
- Dörffling, K. Das Hormonsystem der Pflanzen. Stuttgart, Thieme, 1982.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, Ch.L., Rose, D., Glick, B.R. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2014, 106, 85–125.
- Foth, H.D., Ellis, B.G. *Soil Fertility*. 1997, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 290.
- Fuka, M.M., Engel, M., Hagn, A., Munch, J.C., Sommer, M., Schloter, M. Changes of Diversity Pattern of Proteolytic Bacteria over Time and Space in an Agricultural Soil. *Microbiology Ecology*. 2009, 57, 391–401.
- Geisseler, D., Horwath, W.R. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon, *Soil Biology and Biochemistry*. 2008, 40, 3040–3048.
- Geisseler, D., Horwath, W.R. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon, *Soil Biology and Biochemistry*. 2008, 40, 3040–3048.
- Glenn, A.R., Production of extracellular proteins by bacteria. *Annual Review of*
- Gómez, D.A., Carpena, R.O. Effect of 1-naphthaleneacetic acid on organic acid exudation by the roots of white lupin plants grown under phosphorus-deficient conditions. *Journal of Plant Physiology*. 2014, 171, 1354–1361.
- Goswami, D., Janki N., J.N., Dhandhukia, P.C. Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from L-tryptophan (Trp) using HPTLC. *Journal of Microbiological Methods*. 2015, 110, 7–14.
- Hocking, P.J., Jeffery, S., Cluster-root production and organic anion exudation in a group of old-world lupins and a new-world lupin. *Plant and Soil*. 2004, 258, 135–150.

- aHolík, L., Vranová, V., Rejšek, K. Effect of Proteinogenic and Non-proteinogenic Amino Acids of the Native Protease Activity of Forest Soils. *Chemické listy*. 2016, 110, 812–817.
- bHolík, L., Vranová, V., Kočvarová, S., Rejšek, K. Effects of Tartaric Acid Enantiomers on Proteolytic Activity of Soils. *Chemické listy*. 2016, 110, 651–654.
- Chapin III, F.S., Mooney, H.A., Chapin, M.C., Matson, P. *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology*. 2004, Springer.
- Kalisz, H.M.,. *Microbial proteinases. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 1988, 36, 1–65.
- Kamneva, S.V., Muronets, E.M. Genetic Control of the Processes of Interaction of Bacteria with Plants in Associations. *Genetika*. 1999, 35(11), 1480–1494.
- Kieloaho, A-J., Parshintsev, J., Riekkola, M-L., Kulmala, M., Pumpanen, J., Heinonsalo, J.. Artificial stimulation of soil amine production by addition of organic carbon and nitrogen transforming enzymes. *Geophysical Research Abstracts*. 2013, 15, EGU 2013-8737.
- IUSS-ISRIC-FAO, 2007: World reference base for soil resources 2006 – A frame work for international classification correlation and communication. *World Soil Resources Reports*, FAO Rome, 128 p.
- Kim, Y-S., Yeung, E.C., Hahn, E-J., Paek K-Y.. Combined effects of phytohormone, indole-3-butyric acid, and methyl jasmonate on root growth and ginsenoside production in adventitious root cultures of *Panax ginseng* (Meyer), *Biotechnology Letters*. 2007, 29, 1789–1792.
- Kögel-Knaber, I. Chemical structure of organic N and organic P in soil. In: Kumar, C.G., Takagi, H.,. *Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial*
- Liu, F., Xing, S., Ma, H., Du, Z., Ma, B., Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2013, 97, 4617–4625.
- Ludwig-Müller, J., Indole-3-butyric acid in plant growth and development, *Plant Growth Regulation*. 2000, 32, 219–230.

- Ludwig-Müller, J., Kaldorf, M., Sutter, E.G. Epstein, E. Indole-3-butyric acid (IBA) is enhanced in young maize (*Zea mays* L.) roots colonized with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus traradices*. *Plant Science*. 1997, 125, 153–162.
- Ludwig-Müller, K. AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butyric acid biosynthesis, *Physiologia Plantarum*. 2000, 109, 58–67.
- Merzaeva, O.V., Shirokikh, I.G. The Production of Auxins by the Endophytic Bacteria of Winter Rye. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010, 46(1), 44–50.
- Microbiology. 1976, 30, 41–62.
- Mishke, I.V. Mikrobnye fitogormony v rastenievodstve. *Microbial Phytohormones in Agriculture*. Riga, Zinatne, 1988.
- Mohite, B., 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*. 2013, 13(3), 638–649.
- Nannipieri, P., Smalla, K. (Eds.), *Nucleic Acids and Proteins in Soil*. 2006 Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 23–48.
- Naveed, M., M. Qureshi, A., Zahir, Z.A., Hussain, M.B., Sessitsch, A., Mitter, B. L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Annual Microbiology*. 2015, 65, 1381–1389.
- Pulgarín, J.A.M., Bermejo, L.F.G., Robles, I.S-F., Rodríguez, S.B.. Simultaneous Determination of Plant Growth Regulators 1-Naphthylacetic Acid and 2-Naphthoxyacetic Acid in Fruit and Vegetable Samples by Room Temperature Phosphorescence. *Phytochemical Analysis*. 2012, 23, 214–221.
- Rashotte, A.M., Poupart, J., Waddell, C.S., Muday, G.K. Transport of the Two Natural Auxins, Indole-3-Butyric Acid and Indole-3-Acetic Acid, in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2003, 133.
- Rejsek, K., Formanek, P., Pavelka, M. Estimation of protease activity in soils at low temperatures by casein amendment and with substitution of buffer by demineralized water. *Amino Acids*. 2008, 35, 411–417.
- Sergeeva, E., Liaimer, A., Bergman, B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta*. 2002, 215, 229–238.

- Schulten, H.-R., Schnitzer, M. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biology and Fertility of Soils*. 1998, 26, 1–15.
- Sivasankari, B., Anandharaj, M., Daniel, T. Effect of PGR producing bacterial strains isolated from vermicompost on germination and growth of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Journal Biochemistry Technology*. 2014, 5(4), 808–813.
- Sowden, F.J., Chen, Y., Schnitzer, M.. The nitrogen distribution in soils formed under widely differing climatic conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 1977, 41, 1524–1526.
- Strader, L.C., Bartel, B. Transport and Metabolism of the Endogenous Auxin Precursor Indole-3-Butyric Acid. *Molecular Plant*, 2011, 4(3), 477–486.
- Trueman, S.J., Richardson, D.M. Relationships between Indole-3-Butyric Acid, Photoinhibition and Adventitious Rooting of *Corymbia torelliana*, *C. citriodora* and F1 Hybrid Cuttings. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*. 2008, 2(1), 26–33.
- Tsavkelova, E.A., Cherdynitseva, T.A., Klimova, S.Y., Shestakov, A.I., Botina, S.G., Netrusov, A.I. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Archives Microbiology*. 2007, 188, 655–664.
- Tsavkelova, E.A., Cherdynitseva, T.A., Netrusov, A.I. Auxin Production by Bacteria Associated with Orchid Roots. *Microbiology*. 2005, 74(1), 46–53.
- Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Yu., Cherdynitseva, T.A., Netrusov, A.I. Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2006, 42(2), 117–126.
- Veresoglou, S.D., Chen, B., Rillig, M.C. Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. *Soil Biology and Biochemistry*. 2012, 46, 53–62.
- Viewpoint. *Biotechnology Advances*. 1999, 17, 561–594.
- Vranova, V., Rejsek, K., Formanek, P. Proteolytic activity in soil: A review. *Applied Soil Ecology*. 2013, 70, 23–32.
- Watanabe, K., Hayano, K. Estimate of the source of soil protease in upland fields. *Biology and Fertility of Soils*. 1994, 18, 341–346.

Yaqoob, A., Farooq, N., Sajid, I., Ali, B. Auxin production by *Azospirillum*: Role in growth promotion of *Triticum aestivum* L. and *Lens culinaris* Medik. *Global Journal of Scientific Researches*. 2013, 1(1), 26–32.

Table 1. Selected physical and chemical properties of the tested soils.

Plot	C _t (%)	N _t (%)	C/N	pH H ₂ O	pH 1M KCl	clay (%)	silt (%)	sand (%)
Beech, Oe horizon (rendzic Leptosol)	19.68	1.60	12.3	7.00	6.59	-	-	-
Beech, Ahk horizon (rendzic Leptosol)	13.70	1.07	12.8	7.18	6.91	12.47	65.04	22.49
Beech, Oe horizon (Cambisol)	11.93	0.66	18.1	4.29	3.98	-	-	-
Beech, Ah horizon (Cambisol)	5.98	0.42	14.2	4.79	4.09	6.40	48.80	44.70
Oak, Oe horizon (Cambisol)	17.57	1.01	15.2	5.50	5.14	-	-	-
Oak, Ah horizon (Cambisol)	8.54	0.59	14.5	5.12	4.46	6.81	50.03	43.15
Spruce, Oe horizon (Cambisol)	26.76	1.34	20.0	4.07	3.35	-	-	-
Spruce, Ah horizon (Cambisol)	8.16	0.46	17.7	4.22	3.26	10.40	50.90	38.60

Table 2. The native proteolytic activity after addition of auxins in amounts from 0, 5, 50 and 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil in beech stand with soil type rendzic leptosol.

Plot	0	5	50	100	SD	SE \pm
Beech, Oe horizon (rendzic Leptosol)						
1-naphthaleneacetic acid	564.02	561.92	579.41*	573.81	9.97	6.34
2-naphthoxyacetic acid	564.02	634.70*	633.65*	645.19*	34.07	4.66
Indole-3-butyric acid	564.02	613.35*	629.45*	639.59*	30.47	3.04
Indole-3-acetic acid	564.02	574.51*	591.31*	602.86*	16.20	4.09
Beech, Ahk horizon (rendzic Leptosol)						
1-naphthaleneacetic acid	379.94	398.88*	407.36*	407.08*	12.17	3.43
2-naphthoxyacetic acid	379.94	385.88*	391.53*	391.81*	5.58	2.22
Indole-3-butyric acid	379.94	396.34*	412.45*	401.42*	12.56	2.74
Indole-3-acetic acid	379.94	393.23*	401.71*	386.44	8.95	2.87
Correlation coefficients (p)						
Beech, Oe horizon (rendzic Leptosol)						
1-naphthaleneacetic acid	1.000000					
2-naphthoxyacetic acid	0.325971	1.000000				
Indole-3-butyric acid	0.516288	0.957937**	1.000000			
Indole-3-acetic acid	0.555318	0.779757**	0.893315**	1.000000		
Beech, Ahk horizon (rendzic Leptosol)						
1-naphthaleneacetic acid	1.000000					
2-naphthoxyacetic acid	0.845912**	1.000000				
Indole-3-butyric acid	0.855436**	0.768119**	1.000000			
Indole-3-acetic acid	0.611541**	0.616061**	0.808292**	1.000000		

Results represent the amount of produced L-tyrosine in $\mu\text{g /h}^{-1} / \text{g}^{-1}$ dry soil, * are statistically significant ($P < 0.05$; $n = 3$). SD standard deviation and standard error \pm SE for Fisher's LSD test. A statistically significant correlation ($P < 0.05$; $n = 12$) are designated **

Table 3. The native proteolytic activity after addition of auxins in amounts from 0, 5, 50 and 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil in beech stand with soil type haplic Cambisol.

Plot	0	5	50	100	SD	SE \pm
Beech, Oe horizon (Cambisol)						
1-naphthaleneacetic acid	109.64	141.57*	142.99*	131.64*	14.01	1.42
2-naphthoxyacetic acid	109.64	155.06*	162.51*	137.32*	21.68	4.06
Indole-3-butyric acid	109.64	137.67*	133.06*	134.12*	11.88	2.54
Indole-3-acetic acid	109.64	119.57*	119.93*	121.70*	5.34	1.94
Beech, Ah horizon (Cambisol)						
1-naphthaleneacetic acid	68.57	71.52	68.84	76.07*	4.05	2.46
2-naphthoxyacetic acid	68.57	71.25	65.62	64.02	3.49	1.87
Indole-3-butyric acid	68.57	75.00*	73.66*	74.73*	3.06	1.35
Indole-3-acetic acid	68.57	68.57	73.39	69.11	4.32	3.61
Correlation coefficients (p)						
Beech, Oe horizon (Cambisol)						
1-naphthaleneacetic acid	1.000000					
2-naphthoxyacetic acid	0.954964**	1.000000				
Indole-3-butyric acid	0.919278**	0.817891**	1.000000			
Indole-3-acetic acid	0.800622**	0.757881**	0.858605**	1.000000		
Beech, Ah horizon (Cambisol)						
1-naphthaleneacetic acid	1.000000					
2-naphthoxyacetic acid	-0.325846	1.000000				
Indole-3-butyric acid	0.398379	-0.051256	1.000000			
Indole-3-acetic acid	-0.204184	-0.136198	0.288465	1.000000		

Results represent the amount of produced L-tyrosine in $\mu\text{g /h}^{-1} / \text{g}^{-1}$ dry soil, * are statistically significant ($P < 0.05$; $n = 3$). SD standard deviation and standard error \pm SE for Fisher's LSD test. A statistically significant correlation ($P < 0.05$; $n = 12$) are designated **

Table 4. The native proteolytic activity after addition of auxins in amounts from 0, 5, 50 and 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil in oak forest.

Plot	0	5	50	100	SD	SE \pm
Oak, Oe horizon (Cambisol)						
1-naphthaleneacetic acid	377.25	398.30*	384.93	380.59	9.12	3.49
2-naphthoxyacetic acid	377.25	387.61*	370.57	371.57	8.05	3.69
Indole-3-butyric acid	377.25	413.67*	398.63*	389.61*	14.31	3.35
Indole-3-acetic acid	377.25	415.01*	416.34*	418.02*	18.19	3.76
Oak, Ah horizon (Cambisol)						
1-naphthaleneacetic acid	123.19	139.03*	144.22*	144.72*	9.21	1.34
2-naphthoxyacetic acid	123.19	131.60*	139.03*	137.54*	6.78	1.86
Indole-3-butyric acid	123.19	127.15	129.13*	129.63*	3.65	2.41
Indole-3-acetic acid	123.19	126.90*	122.20	124.43	2.47	1.59
Correlation coefficients (p)						
Oak, Oe horizon (Cambisol)						
1-naphthaleneacetic acid	1.000000					
2-naphthoxyacetic acid	0.579253**	1.000000				
Indole-3-butyric acid	0.869740**	0.516669	1.000000			
Indole-3-acetic acid	0.485095	-0.024109	0.717187**	1.000000		
Oak, Ah horizon (Cambisol)						
1-naphthaleneacetic acid	1.000000					
2-naphthoxyacetic acid	0.929814**	1.000000				
Indole-3-butyric acid	0.712095**	0.746538**	1.000000			
Indole-3-acetic acid	0.108202	-0.011907	0.027628	1.000000		

Results represent the amount of produced L-tyrosine in $\mu\text{g /h}^{-1} / \text{g}^{-1}$ dry soil, * are statistically significant ($P < 0.05$; $n = 3$). SD standard deviation and standard error \pm SE for Fisher's LSD test. A statistically significant correlation ($P < 0.05$; $n = 12$) are designated **

Table 5. The native proteolytic activity after addition of auxins in amounts from 0, 5, 50 and 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil in spruce forest.

Plot	0	5	50	100	SD	SE \pm
Spruce, Oe horizon (Cambisol)						
1-naphthaleneacetic acid	96.29	82.18*	78.05*	73.67*	6.25	2.81
2-naphthoxyacetic acid	96.29	88.75*	84.37*	82.91*	3.53	2.06
Indole-3-butyric acid	96.29	108.20*	109.41*	109.41*	4.87	1.82
Indole-3-acetic acid	96.29	107.23*	107.47*	115.74*	3.01	1.80
Spruce, Ah horizon (Cambisol)						
1-naphthaleneacetic acid	57.98	61.20	71.22*	68.00*	9.33	2.86
2-naphthoxyacetic acid	57.98	64.07*	63.36	61.92	5.84	2.42
Indole-3-butyric acid	57.98	61.56	62.63	69.08*	6.08	2.40
Indole-3-acetic acid	57.98	62.25	57.98	59.77	7.45	2.29
Correlation coefficients (p)						
Spruce, Oe horizon (Cambisol)						
1-naphthaleneacetic acid	1.000000					
2-naphthoxyacetic acid	0.378722	1.000000				
Indole-3-butyric acid	0.508167	0.069994	1.000000			
Indole-3-acetic acid	-0.276520	0.148363	0.366642	1.000000		
Spruce, Ah horizon (Cambisol)						
1-naphthaleneacetic acid	1.000000					
2-naphthoxyacetic acid	0.888726**	1.000000				
Indole-3-butyric acid	-0.848570**	-0.783335**	1.000000			
Indole-3-acetic acid	-0.811700**	-0.821302**	0.834488**	1.000000		

Results represent the amount of produced L-tyrosine in $\mu\text{g /h}^{-1} / \text{g}^{-1}$ dry soil, * are statistically significant ($P < 0.05$; $n = 3$). SD standard deviation and standard error \pm SE for Fisher's LSD test. A statistically significant correlation ($P < 0.05$; $n = 12$) are designated **

Publikace VI

The role of cytokinins, etephon and chlorocholine chloride in the native proteolytic activity of forest soils

Holik Ladislav, Vranová Valerie, Rejšek Klement

Manuscript

(Will be submitted: Biology and Fertility of Soils)

Title: The role of cytokinins, etephon and chlorocholine chloride in the native proteolytic activity of forest soils

Holik Ladislav*, Vranová Valerie, Rejšek Klement

Mendel University in Brno, Faculty of Forestry and Wood Technology, Department of Geology and Soil Science, Zemědělská 3, 61300, Brno, Czech Republic

e-mail: holikladis@gmail.com, valerie.vranova@mendelu.cz,
klement.rejsek@mendelu.cz

* Corresponding author

Article type: Research article

TEXT PAGES: 5

TABLES: 5

Abstract

Proteases play an important role in nitrogen cycling and the transformation of soil organic matter. Cytokinins are produced by both plants and soil microorganisms that live in the rhizosphere. The present paper shows that both the cytokinin etephone and the plant growth regulator (PGR) chlorocholine chloride negatively affect the native proteolytic activity of forest soils except the organic and organomineral horizons of European beech (*Fagus sylvatica* L.) on a Rendzic Leptosol. In addition, 6-benzylaminopurine stimulates the native proteolytic activity of the organic horizon of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). The authors offer no explanation for cases not supported by publications on the topic. A negative effect of cytokinins on the soil proteolytic activity can decrease the rate of organic matter decomposition. The results submitted will provide soil biochemists with data describing the roles of rhizospheric substances on soil microbial activity.

Keywords: soil proteases, etephone, chlorocholine chloride, cytokinin, forest soil.

1. Introduction

The rhizosphere is a highly complex ecosystem densely inhabited by microorganisms, including bacteria, fungi, protozoa, nematodes and invertebrates (Venturi and Keel, 2016). Biological processes in the rhizosphere are strongly affected by the microbial degradation of organic acids, sugars and amino acids exuded by plant roots. The root exudation of these compounds stimulates microbial growth (Holík et al., 2017), leading towards an interrelationship between plants productivity and microbial coenoses (Kudoyarova et al. 2014). Microorganisms in the rhizosphere suppress plant pathogens and stimulate plant growth directly and indirectly by mechanisms such as a hormone production and a mycoparasitism (Ortíz-Castro et al. 2009).

Cytokinins are naturally occurring substances that regulate many physiological processes in plants (Großkinsky et al., 2016). Cytokinins affect cell replication, apical dominance and nutrient signalling (Stirk and Staden, 2010). The ability to produce cytokinins was proved in bacteria (Maheshwari et al., 2015; Goswami et al., 2016). *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Erwinia*, and *Pseudomonas*, among other genera, can produce cytokinins similar to those of plants (Lugtenberg et al. 2013). With

respect to their configuration, cytokinins form either isoprenoid or aromatic shapes. (2-Isopentenyl) adenine, trans-zeatine, cis-zeatine and dihydrozeatine belong to isoprenoid cytokinins (Zahajská et al., 2017), whereas benzyladenine and topoline belong to aromatic cytokinins (Stirk and Staden, 2010). Rhizospheric microorganisms are capable of producing more than 30 types of cytokinins (Umara et al. 2015).

The present investigation aimed at understanding the role of cytokinins and plant growth regulators (PGRs) in the native proteolytic activity of forest soils. Two cytokinins, aminopurine and adenine hemisulfate, were tested. Furthermore, etephon, which produces ethylene (Khan et al. 2008), and chlorocholine chloride, a PGR (Cycoń et al. 2012), were also used on the objects of this study.

2. Materials and Methods

2.1. Study area

Studied soil samples were collected from the Training Forest Enterprise Masaryk Forest Křtiny (TFE Křtiny) owned by Mendel University in Brno, Czech Republic. The study area was located at a mean altitude of 350 m above sea level; the mean annual temperature was 7.5°C, and the mean annual precipitation was 610 mm. The particular study plots were chosen to represent both typical forest stands and soil units of Central Europe. Soils of four forest stands were sampled: i) Macha Memorial, N 49°19'2.4'', E 16°40'19'', the 70-year-old European beech (*Fagus sylvatica* L.) stand on a Rendzic Leptosol (WRB, 2015), with organic (Oe) and organomineral (Ahk) horizons; ii) Utechov, N 49°18'1'', E 16°37'31'', the 35-year-old pedunculate oak (*Quercus robur* L.) stand on a Haplic Cambisol, with organic (Oe) and organomineral (Ah) horizons; iii) Jedovnice I, N 49°19'19'', E 16°47'48'', the 90-year-old European beech stand on a Haplic Cambisol, with organic (Oe) and organomineral (Ah) horizons; and iv) Jedovnice II, N 49°19'21'', E 16°47'38'', the 100-year-old Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) stand on a Haplic Cambisol, with organic (Oe) and organomineral (Ah) horizons. Each of the horizons were sampled by three individual samples from which one representative sample was brought to the laboratory. The samples were air-dried and sieved with a 2-mm mesh. Table 1 summarises the basic physical and chemical soil properties of the soils studied.

2.2. Determination of native proteolytic soil activity

The native soil proteolytic activity was determined spectrophotometrically. The analysis occurred via the hydrolysis of casein as an enzymatic substrate followed by measurement of the L-tyrosine produced (Rejsek et al., 2008). Two grams of soil were added to 100 µl of demineralised water containing the PGR chosen in the amount of 0, 5, 50 or 100 µg per gram of dried soil. The PGRs included 6-benzyl aminopurine (BA), adenine hemisulfate (AH), etePHONE (ET) and chlorocholine chloride (CCC).

2.3. Statistical analyses

Statistical evaluation of the values of proteolytic activity detected in the individual samples was performed by one-way ANOVA and Fischer's LSD test (multiple comparison) with the use of the Statistica 12.0 software. Tables 2-5 show the Pearson coefficients originating from the RegAnalysis of the obtained results.

3. Results

In general, addition of a PGR led to inhibition of the native proteolytic activity of the forest soils. Two exceptions were found – the organic horizon of the Haplic Cambisol in the pedunculate oak forest stand and the same soil unit in the European beech forest stand.

For the organic horizon in the European beech forest stands, BA, Ah and ET stimulated the native proteolytic activity of forest soils; the strongest stimulation was observed after doses of ET. CCC stimulated the native proteolytic activity of forest soils only at a dose of 5 µg of CCC. For the organomineral horizons, all PGRs stimulated the native proteolytic activity of forest soils. The most marked production of L-tyrosine was caused by AH (an increase of L-tyrosine production from 379.94 µg of L-tyrosine with 0 µg of AH to 413.86 µg of L-tyrosine with an AH dose of 50 µg) and BA (the maximum L-tyrosine production occurred with a BA dose of 50 µg). As mentioned above, PGRs inhibited the native soil proteolytic activity in the European beech forest stands. The most marked inhibition of the activity was proved i) for organic horizons following CCC applications, where the production of the L-tyrosine decreased from 109.64 µg (0 µg of PGR) to 87.28 µg of L-tyrosine (100 µg of PGR), and ii) for

organomineral horizons following AH applications, where the production of L-tyrosine decreased from 68.57 µg (0 µg of PGR) to 57.16 µg of L-tyrosine (100 µg of PGR).

In the pedunculate oak forest stand, the native soil proteolytic activity was stimulated only in the organic horizon by BA; both ET and CCC inhibited the native proteolytic activity, and AH did not elicit a significant effect at $P < 0.05$. Regarding the organomineral horizons, all PGRs inhibited the native proteolytic activity: the strongest inhibition was caused by CCC (a decrease in L-tyrosine production from 123.19 µg of L-tyrosine with a dose of 0 µg of CCC to 92.27 µg of L-tyrosine with a CCC dose of 100 µg) and AH (a decrease in L-tyrosine production to 95.24 µg with an AH dose of 100 µg).

In the Norway spruce forest stand, PGRs substantially inhibited the native soil proteolytic activity. BA showed the strongest inhibition in the organic horizon, and ET showed the strongest in the organomineral horizon.

4. Discussion

Applications of etePHONE are used as stimulating agents for the growth of adventive roots (Mori et al., 2011) due to the release of ethylene after autohydrolysis; therefore, etePHONE is recognised as an effective plant growth regulator (Buhrig et al., 2015). The results showed that ET decreases the native proteolytic activity of forest soils except for Rendzic Leptosols in the European beech forest stand. Similarly, Khan et al. (2008) presented data regarding the roles of ET and low soil nitrogen levels when both led to the inhibition of plant growth and lower nitrogen content in plant tissues. Thus, in compliance with the amount of nitrogen in the soil, ET applications affected the formation of ethylene. Rupp et al. (1989) studied mycorrhizal associations with the dwarf pine (*Pinus mugo* Turra) and reported that doses of ET inhibit mycorrhizae and stimulate a dichotomic shape of rooting of the pine. In contrast, Mori et al. (2011) stated that adventive root development in Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.) is not affected by ET applications. Therefore, the data in the literature point to both negative and positive effects on root growth.

Chlorocholine chloride (chlormequat) inhibits a gibberellin synthesis, increases a water stress tolerance and leads to increased root growth (Cycoń et al. 2012). The data

presented showed a similar effect of CCC doses as was measured for ET: we proved the inhibition of the native proteolytic activity of all forest soils except for Rendzic Leptosols in the European beech forest stand. Čatská and Vraný (1976) studied mycorrhizal associations and determined that an inhibitory effect of CCC on rhizospheric fungi such as *Fusarium* and *Penicillium* exists. In contrast, Farooq and Bano (2006) presented a positive effect of CCC application on the genus *Rhizobium*. Anosheh et al. (2012) studied the effect of CCC application on the production of plant enzymes and presented data on the stimulating effect of CCC on the soil catalytic activity and similarly on the activity of peroxidase; these authors also studied superoxide dismutase, but it was unaffected by CCC application.

Cytokinins, including 6-benzyl aminopurine and adenine hemisulfate, are produced by many bacteria (Glick 2012). In general, the data showed an inhibitory effect of the studied cytokinins on the native proteolytic activity of forest soils. Similar results were published by Laplaze et al. (2007) and Chi et al. (2016) studying the influence of cytokinins on root growth and development. In contrast, Kudoyarova et al. (2014) and Chang et al. (2016) published data about the stimulating effects of cytokinins on enzymes in plant roots that leads towards a higher activity of nitrate reductase, and Veselov et al. (2017) reported stimulating effects of cytokinins towards the catalytic activity of nitrate reductase by doses of the 6-benzyl aminopurine.

The authors do not offer any explanation for that which is not supported by publications on the topic. The topic itself has been studied from other viewpoints, such as the role of cytokinins in germination (Aka and Babalola, 2016), the growth of plants on saline soils (Zhu et al., 2016; Veselov et al., 2017) and root nodulation and symbiotic associations between plants and fungi (Miri et al., 2016; Cosme et al., 2016; Chanclud and Morel, 2016).

5. Conclusions

The present paper aimed at studying effects of cytokinins, etephon and chlorocholine chloride on the native proteolytic activity of forest soils. The results presented showed an inhibitory effect of cytokinins on the native soil proteolytic activity except for a European beech forest stand on a Rendzic Leptosol. The authors did not offer any

explanation for such a case due to the lack of publications on the topic. The results submitted will provide soil biochemists with data describing the roles of rhizospheric substances on soil microbial activity.

References

- Amara, U., Khalid, R., Hayat, R. Soil Bacteria and Phytohormones for Sustainable Crop Production, Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem D.K. Maheshwari (ed.), Vol. 12 of the series Sustainable Development and Biodiversity, 2015, Springer International Publishing Switzerland, pp. 87-103.
- Anosheh, H.P., Emam, Y., Ashraf, M., Foolad, M.R. Exogenous application of salicylic acid and chlormequat chloride alleviates negative effects of drought stress in wheat. *Advanced Studies in Biology*. 2012, 4(11), 501–520.
- Buhrig, W., Thornton, M.K., Olsen, N., Morishita, D., McIntosh, C. The Influence of Ethephon Application Timing and Rate on Plant Growth, Yield, Tuber Size Distribution and Skin Color of Red LaSoda Potatoes. *American journal of potato research*. 2015, 92(1), 100–108.
- Cosme, M., Ramireddy, E., Franken, P., Schmülling, T., Wurst, S. Shoot-and root-borne cytokinin influences arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*. 2016, 26(7), 709–720.
- Cycoń, M., Lewandowska, A., Piotrowska-Seget, Z. Mineralization Dynamics of Chlormequat Chloride (CCC) in Soils of Different Textures, *Polish Journal of Environmental Studies*. 2012, 21(3), 595–602.
- Čatská, V., Vraný, J. Rhizosphere mycoflora of wheat after foliar application of chlorocholine chloride, urea and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid. *Folia microbiologica*. 1976, 21(4), 268–273.
- Farooq, U. Z., Bano, A. Effect of abscisic acid and chlorocholine chloride on nodulation and biochemical content of *Vigna radiata* L. under water stress. *Pakistan Journal of Botany*. 2006, 38(5), 1511–1518.
- Glick, B.R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications, *Scientifica*. 2012, 15.
- Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P.C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food and Agriculture*. 2016, 2(1), 1127500.

- Großkinsky, D.K., Tafner, R., Moreno, M.V., Stenglein, S.A., García de Salamone, I.E., Nelson, L.M., Novák, O., Strnad, M., van der Graaff, E., Roitsch, T. Cytokinin production by *Pseudomonas fluorescens* G20-18 determines biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *Scientific Reports*. 2016, 6, 23310.
- Holík, L., Vranová, V., Rosíková, J., Rejšek, K. Protease Activity of Forest Soils and their Responses to Phenolic Compounds in Soil. *Chemické Listy*. 2017, 111, 47–49.
- Chanclud, E., Morel, J.B. Plant hormones: a fungal point of view. *Molecular plant pathology*. 2016, 17(8), 1289–1297.
- Chang, Z., Liu, Y., Dong, H., Teng, K., Han, L., Zhang, X. Effects of Cytokinin and Nitrogen on Drought Tolerance of Creeping Bentgrass. *PLoS ONE*. 2016, 11(4), e0154005.
- Chi, W., Li, J., He, B., Chai, X., Xu, X., Sun, X., Jiang, J., Feng, P., Zuo, J., Lin, R., Rochaix, J-D., Zhang, L. DEG9, a serine protease, modulates cytokinin and light signaling by regulating the level of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 4, E3568–E3576. *PNAS*. 2016, 1601724113
- Khan, N.A., Mir, M. R., Nazar, R., Singh, S. The application of ethephon (an ethylene releaser) increases growth, photosynthesis and nitrogen accumulation in mustard (*Brassica juncea* L.) under high nitrogen levels, *Plant Biology*. 2008, 10, 534–538.
- Kudoyarova, G.R., Melentiev, A.I., Martynenko, E.V., Timergalina, L.N., Arkhipova, T.N., G.V., Kuz'mina, L.Y., Dodd, I.C., Veselov, S.Y., Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots, *Plant Physiology and Biochemistry*. 2014, 83, 285–291.
- Kudoyarova, G.R., Melentiev, A.I., Martynenko, E.V., Timergalina, L.N., Arkhipova, T.N., Shendel, G.V., Kuz'mina, L.Y., Dodd, I.C., Veselov, S.Y. Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots, *Plant Physiology and Biochemistry*. 2014, 83, 285–291.
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Begon, M., Herrera-Rodriguez, Offringa, R., Graham, N., Doumas, P., Friml, J., Bogusz, D., Beeckman, T., Bennete, M. Cytokinins Act Directly on Lateral Root Founder Cells to Inhibit Root Initiation. *The Plant Cell*. 2007, 19, 3889–3900,

- Lugtenberg, B. J., Malfanova, N., Kamilova, F., Berg, G. Plant Growth Promotion by Microbes, chapter 53, Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere, Vol. 2, First Edition. Edited by Frans J. de Bruijn. 2013 John Wiley & Sons, pp. 561-573.
- Maheshwari, D.K., Dheeman, S., Agarwal, M. (2015). Phytohormone-producing PGPR for sustainable agriculture. In D. K. Maheshwari (Ed.), Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem. 2015, Springer International Publishing Switzerland, pp. 159–182.
- Miri, M., Janakirama, P., Held, M., Ross, L., Szczyglowski, K. Into the root: How cytokinin controls rhizobial infection. Trends in plant science. 2016, 21(3), 178–186.
- Mori, Y., Miyahara, F., Tsutsumi, Y., Kondo, R. Effects of combinational treatment with ethephon and indole-3-butyric acid on adventitious rooting of *Pinus thunbergii* cuttings. Plant growth regulation. 2011, 63(3), 271–278.
- Ndeddy Aka, R.J., Babalola, O.O. Effect of bacterial inoculation of strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* and *Bacillus subtilis* on germination, growth and heavy metal (Cd, Cr, and Ni) uptake of *Brassica juncea*. International journal of phytoremediation. 2016, 18(2), 200-209.
- Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., López-Bucio, J., The role of microbial signals in plant growth and development, Plant Signaling and Behavior. 2009, 4(8), 701–712.
- Rejsek, K., Formanek, P., Pavelka, M. Estimation of protease activity in soils at low temperatures by casein amendment and with substitution of buffer by demineralized water. Amino Acids. 2008, 35, 411–417.
- Rupp, L.A., Mudge, K.W., Negm, F.B. Involvement of ethylene in ectomycorrhiza formation and dichotomous branching of roots of mugo pine seedlings. Canadian Journal of Botany. 1989, 67(2), 477–482.
- Stirk, W.A., van Staden, J. Flow of cytokinins through the environment, Plant Growth Regulation. 2010, 62, 101–116.
- Venturi, V., Keel, Ch. Signaling in the Rhizosphere, Trends in Plant Science. 2016, 21(3).
- Veselov, D.S., Kudoyarova, G.R., Kudryakovab, N.V., Kusnetsov, V.V. Role of Cytokinins in Stress Resistance of Plants. Russian Journal of Plant Physiology. 2017, 64(1), 15–27.

- Zahajská, L., Nisler, J., Voller, J., Gucký, T., Pospíšil, T., Spíchal, L., Strnad, M. Preparation, characterization and biological activity of C8-substituted cytokinins. *Phytochemistry*. 2017, 135, 115–127.
- Zhu, H., Taylor, A.A., Astor, S.R., Terry, N. Enhancing saltgrass germination and growth in a saline soil contaminated with petroleum hydrocarbons. *Plant and Soil*. 2016, 1–11.

Table 1. Selected physical and chemical properties of the tested soils.

Plot	C_t (%)	N_t (%)	C/N	pH H₂O	pH 1M KCl	clay (%)	silt (%)	sand (%)
Beech, Oe horizon (rendzic Leptosol)	19.68	1.60	12.3	7.00	6.59	-	-	-
Beech, Ahk horizon (rendzic Leptosol)	13.70	1.07	12.8	7.18	6.91	12.47	65.04	22.49
Beech, Oe horizon (Cambisol)	11.93	0.66	18.1	4.29	3.98	-	-	-
Beech, Ah horizon (Cambisol)	5.98	0.42	14.2	4.79	4.09	6.40	48.80	44.70
Oak, Oe horizon (Cambisol)	17.57	1.01	15.2	5.50	5.14	-	-	-
Oak, Ah horizon (Cambisol)	8.54	0.59	14.5	5.12	4.46	6.81	50.03	43.15
Spruce, Oe horizon (Cambisol)	26.76	1.34	20.0	4.07	3.35	-	-	-
Spruce, Ah horizon (Cambisol)	8.16	0.46	17.7	4.22	3.26	10.40	50.90	38.60

Table 2. The native soil proteolytic activity after the cytokinine, etePHONE and chlorocholine chloride doses of 0, 5, 50 and 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil, the European beech forest stand on Rendzic Leptosol.

Plot	0	5	50	100	SD	SE \pm
Beech, Oe horizon (rendzic Leptosol)						
6-benzylaminopurine	564.02	575.92	591.31*	580.47*	11.64	5.33
Adenine hemisulfate	564.02	599.71*	599.01*	574.52*	16.69	3.91
Ethephon	564.02	591.66*	613.01*	608.10*	20.65	4.99
Chlorocholine chloride	564.02	581.16*	564.02	552.82*	11.21	3.56
Beech, Ahk horizon (rendzic Leptosol)						
6-benzylaminopurine	379.94	403.12*	411.32*	407.08*	12.99	2.68
Adenine hemisulfate	379.94	402.84*	413.86*	408.77*	13.78	2.44
Ethephon	379.94	395.49*	398.60*	407.08*	11.10	4.07
Chlorocholine chloride	379.94	404.25*	396.34*	391.53*	9.74	3.07
Correlation coefficients (p)						
Beech, Oe horizon (rendzic Leptosol)						
6-benzylaminopurine	1.000000					
Adenine hemisulfate	0.604721**	1.000000				
Ethephon	0.754212**	0.582224**	1.000000			
Chlorocholine chloride	-0.089937	0.565336	-0.215623	1.000000		
Beech, Ahk horizon (rendzic Leptosol)						
6-benzylaminopurine	1.000000					
Adenine hemisulfate	0.958337**	1.000000				
Ethephon	0.868647**	0.832046**	1.000000			
Chlorocholine chloride	0.733084**	0.690667**	0.536343	1.000000		

Results represent the amount of produced L-tyrosine in $\mu\text{g /h}^{-1} / \text{g}^{-1}$ dry soil, * are statistically significant ($P < 0.05$; $n = 3$). SD standard deviation and standard error \pm SE for Fisher's LSD test. A statistically significant correlation ($P < 0.05$; $n = 12$) are designated **

Table 3. The native proteolytic activity after addition of cytoinins in amounts from 0, 5, 50 and 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil in beech stand with soil type haplic Cambisol.

Plot	0	5	50	100	SD	SE \pm
Beech, Oe horizon (Cambisol)						
6-benzylaminopurine	109.64	111.41	106.80	102.19*	4.13	1.87
Adenine hemisulfate	109.64	108.57	103.96	105.02	3.75	2.70
Ethephon	109.64	111.06	96.51*	95.80*	8.41	3.78
Chlorocholine chloride	109.64	103.96	96.51*	87.28*	9.53	3.62
Beech, Ah horizon (Cambisol)						
6-benzylaminopurine	68.57	65.89	64.28	59.73*	4.35	2.65
Adenine hemisulfate	68.57	58.12*	58.39*	51.16*	6.86	2.15
Ethephon	68.57	67.23	65.09	61.60*	3.63	2.27
Chlorocholine chloride	68.57	67.23	72.05	68.03	3.15	2.39
Correlation coefficients (p)						
Beech, Oe horizon (Cambisol)						
6-benzylaminopurine	1.000000					
Adenine hemisulfate	0.351877	1.000000				
Ethephon	0.585891**	0.583751**	1.000000			
Chlorocholine chloride	0.726260**	0.514415	0.689099	1.000000		
Beech, Ah horizon (Cambisol)						
6-benzylaminopurine	1.000000					
Adenine hemisulfate	0.680456**	1.000000				
Ethephon	0.822973**	0.652158**	1.000000			
Chlorocholine chloride	0.413696	0.086695	0.124633	1.000000		

Results represent the amount of produced L-tyrosine in $\mu\text{g /h}^{-1} / \text{g}^{-1}$ dry soil, * are statistically significant ($P < 0.05$; $n = 3$). SD standard deviation and standard error \pm SE for Fisher's LSD test. A statistically significant correlation ($P < 0.05$; $n = 12$) are designated **

Table 4. The native proteolytic activity after addition of cytokinins in amounts from 0, 5, 50 and 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil in oak forest.

Plot	0	5	50	100	SD	SE \pm
Oak, Oe horizon (Cambisol)						
6-benzylaminopurine	377.25	399.30*	408.66*	394.29*	12.49	3.59
Adenine hemisulfate	377.25	372.57	372.57	378.25	5.18	4.22
Ethephon	377.25	378.25	362.55*	361.21*	9.33	4.05
Chlorocholine chloride	377.25	372.24	370.57*	361.21*	6.72	2.78
Oak, Ah horizon (Cambisol)						
6-Benzylaminopurine	123.19	107.36*	96.72*	96.48*	11.83	3.14
Adenine hemisulfate	123.19	99.94*	95.98*	95.24*	12.15	2.05
Ethephon	123.19	102.41*	100.43*	99.44*	10.37	1.80
Chlorocholine chloride	123.19	101.92*	96.48*	92.27*	12.52	1.56
Correlation coefficients (p)						
Oak, Oe horizon (Cambisol)						
6-benzylaminopurine	1.000000					
Adenine hemisulfate	-0.266176	1.000000				
Ethephon	-0.375425	-0.039186	1.000000			
Chlorocholine chloride	-0.286610	0.156572	0.683542**	1.000000		
Oak, Ah horizon (Cambisol)						
6-Benzylaminopurine	1.000000					
Adenine hemisulfate	0.885967**	1.000000				
Ethephon	0.893126**	0.979207**	1.000000			
Chlorocholine chloride	0.957271**	0.958761**	0.954850**	1.000000		

Results represent the amount of produced L-tyrosine in $\mu\text{g /h}^{-1} / \text{g}^{-1}$ dry soil, * are statistically significant ($P < 0.05$; $n = 3$). SD standard deviation and standard error \pm SE for Fisher's LSD test. A statistically significant correlation ($P < 0.05$; $n = 12$) are designated **

Table 5. The native proteolytic activity after addition of cytokinis in amounts from 0, 5, 50 and 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry soil in spruce forest.

Plot	0	5	50	100	SD	SE \pm
Spruce, Oe horizon (Cambisol)						
6-benzylaminopurine	96.29	93.61	87.77*	83.88*	5.76	1.35
Adenine hemisulfate	96.29	92.15*	86.56*	89.48*	10.39	1.51
Ethephon	96.29	94.58	88.75*	87.77*	12.71	1.39
Chlorocholine chloride	96.29	91.42*	90.45*	86.56*	7.08	1.35
Spruce, Ah horizon (Cambisol)						
6-benzylaminopurine	57.98	47.60*	47.24*	44.38*	5.26	1.94
Adenine hemisulfate	57.98	39.01*	36.15*	33.64*	4.06	2.66
Ethephon	57.98	36.86*	28.99*	29.35*	4.08	3.02
Chlorocholine chloride	57.98	54.40	44.38*	44.02*	3.88	2.89
Correlation coefficients (p)						
Spruce, Oe horizon (Cambisol)						
6-benzylaminopurine	1.000000					
Adenine hemisulfate	0.938852**	1.000000				
Ethephon	0.870504**	0.934033**	1.000000			
Chlorocholine chloride	0.736552**	0.723925**	0.731133**	1.000000		
Spruce, Ah horizon (Cambisol)						
6-benzylaminopurine	1.000000					
Adenine hemisulfate	0.726143**	1.000000				
Ethephon	0.917632**	0.854207**	1.000000			
Chlorocholine chloride	0.922447**	0.619370**	0.801717**	1.000000		

Results represent the amount of produced L-tyrosine in $\mu\text{g /h}^{-1} / \text{g}^{-1}$ dry soil, * are statistically significant ($P < 0.05$; $n = 3$). SD standard deviation and standard error \pm SE for Fisher's LSD test. A statistically significant correlation ($P < 0.05$; $n = 12$) are designated **

**Effect of gap size and forest type on mineral
nitrogen forms under influence of soil properties**

Aleš Kučera, Ladislav Holik, Elena Muñoz Cerro, Jan Petříček

Submitted in: Soil Science (Under review)

Title: Effect of gap size and forest type on mineral nitrogen forms under influence of soil properties

Aleš Kučera ^{1*}, Ladislav Holik ¹, Elena Muñoz Cerro ², Jan Petříček ¹

¹Department of Geology and Pedology, Mendel University in Brno, Czech Republic, Zemědělská 3, 61300, Brno, Czech Republic, e-mail: xkucera1@mendelu.cz, xholik01@node.mendelu.cz, jena.petricek@seznam.cz

²Institute for Research in Sustainable Forest Management, University of Valladolid, Spain, Palencia, Castille and León, Spain, e-mail: elena_mc90@hotmail.com

*Corresponding author:

Aleš Kučera

Address: Mendel University in Brno, Zemědělská 3, 61300 Brno, Czech Republic

Tel: +420 545 134 521

E-mail: xkucera1@mendelu.cz

Article type: Original Research Article

TEXT PAGES: 14

FIGURES: 5

TABLES: 4

Abstract

Three forest types – beech, mixed and spruce – were cut to create artificial gaps of two sizes (small, big) to investigate effect of gaps on soil properties. The six gaps were sampled in positions centre and parental neighbouring stand to investigate magnitude of the microclimate change for mineral nitrogen form (ammonium N-NH_4^+ and nitrate N-NO_3^-) concentration depending on simultaneously assessed soil properties such as soil reaction, base and acid cation contents, oxidative and microbial carbon, total nitrogen and enzymatic activity (catalase, protease, urease). The aim of the study was to investigate interrelation of the soil properties in each forest type and treatment and to determine independent variables, which influence abundance of mineral nitrogen forms in soil organomineral A horizon. Soil environment was found as distinctive when compared selected soil properties within forest types, gap sizes and gap centre versus parental stand. The spruce forest type exhibits significant nitrogen storage in both mineral forms: ammonium as well as nitrates. Moreover, significant linear dependence was determined between N-NO_3^- concentration versus base cation content (S-CEC) and potential ureolytic activity (UreasePot), as well as between N-NH_4^+ concentration versus hydrolytic acidity (Ha-CEC) and UreasePot, which is distinctive for each ForType, Gap size and Position. The dependence of the nitrate nitrogen concentration on S-CEC and UreasePot was notably negative, especially in parental stand. The dependence of ammonium nitrogen concentration is rather indifferent in beech and mixed forest type, while significantly positive in spruce forest type.

Keywords

gap, soil, mineral nitrogen, European beech, Norway spruce

Introduction

Innovative practices in forest management use natural processes in the forest development as models for increasing or maintaining biological diversity and forest stands stability (Kern et al., 2012). Gaps play a key role in the forest ecosystem development and they result from either natural process or artificially targeted forest management activities. The gaps can be considered innovative particularly within the context of standard clear-cutting forestry approaches: contemporary forestry is trying to

find a relevant alternative, especially in terms of the need for conservation of nature-friendly approaches in extensive forest management (Halldorsson et al., 2005).

Gaps effect significantly the habitat conditions (Bauhus, 1996; Kooch et al., 2010; Latif and Blackburn, 2010; Pang et al., 2016) also with regard to their size and causing subsequently regeneration (D'Oliveira and Ribas, 2011). They effect significantly the nutrient cycling dynamics, thermal flow, and site moisture conditions (He et al., 2012), and light conditions (Gálhidy et al., 2006). Then, these factors affect the soils microbial activity and gaps thus participate in shaping the specific microclimate environment, subsequent biological activity, biochemical processes, and substances and energy cycling within the ecosystem (Ritter and Bjørnlund, 2005; Ritter, 2005; Muscolo et al., 2007).

Microorganisms release nutrients, which can be incorporated into a new microbial biomass (Ritter and Bjørnlund, 2005) as well as into plants nutrition components and thus contribute to the forest regeneration. They have an integral role in substance cycling, inter alia, nitrogen (Xu et al., 2015) and produce enzymes within their environment; those enzymes decompose organic matter into simple organic compounds (monosaccharides, amino acids and other); there belong, e.g., catalase, protease and urease (Bárta et al., 2014) and many others (Burns, 1982; Wyszowska et al., 2009; Purev et al., 2012).

The three specifically mentioned extracellular constitutive enzymes belong to the elementary soil biochemistry paraphernalia (Wyszowska et al., 2009; Gobat et al., 2010; Purev et al., 2012). Being in the soil, they are characterized by a comparatively stable activity and can be regarded as a soil nutrient status indicators (Gobat et al., 2010). They are responsible both for the detoxifying effects associated with the “maintenance“ of optimal soil microenvironment (catalase) and they participate in various phases of nitrogen cycling.

The soil proteolytic complex plays an important role in the ecosystem nutrients cycling. The protein hydrolysis is the first phase of soil organic nitrogen mineralization; it is dependent on proteolytic enzymes (Ladd, 1972) and it is considered a step limiting the rate of nitrogen mineralization in soils (Wild et al., 2013; Holík et al., 2016). Urease is another important enzyme in nitrogen cycling. The soil urease is involved in organic matter mineralization through hydrolysis of urea and amine compounds to form an ammonium ion NH_4^+ . They both get into the soil together with exudates from plants,

through microorganisms synthesising and eventually from animal bodies (Salazar, 2011; Błońska and Lasota, 2014).

Nitrogen availability depends largely on the organic matter decomposition with macro biota and the conversion from organic nitrogen to its inorganic compounds (NH_4^+ , NO_3^-) (Gundersen and Rasmussen, 1990; Ritter and Bjørnlund, 2005; Gundersen et al., 2006). Soil nitrogen research and its availability are of great significance for understanding processes occurring in forest ecosystems (Muscolo et al., 2007). Mineral nitrogen forms and concentration reflex microbial processes in the soil (Setiawan et al., 2016). They subject to soil microclimate characteristics and are specific for various woody species, i.e., Norway spruce (*Picea abies*, (L.) Karsten), and European beech (*Fagus sylvatica*, L.). They also subject to a broad range of soil properties: physical-chemical properties (soil reaction, cation exchange capacity); chemical properties (oxidative carbon and total nitrogen content); biochemical properties (activity of catalase, protease and urease, microbial nitrogen content) and moisture conditions.

This paper examines the mineral nitrogen content in gaps soils and its forms in relation to predetermined factors from the category of mentioned above soil parameters and stand types (European beech, Norway spruce, mixed). The fundamental question is what factors determine the mineral nitrogen fraction content (nitrate and ammonium nitrogen) in selected stand types. Thus, the paper is focused on the internal system of gaps, which is edaphic determined. Its detailed specification can contribute to tackling the reaction of the soil environment as a forest regeneration medium to gap development.

In terms of internally determined relationships within the forest ecosystem, the questions have been raised as follows: (1) How do forest type, gap size and position in gap considered as categorical variables ForType (beech/spruce/mix), gap size (small/big) and Position (centre/parental) affect soil parameters from physical-chemical categories (soil reaction, cation exchange capacity), chemical (Cox, Nt, C/N, N-NO_3^- , N-NH_4^+) and biochemical ones (protease, urease, catalase activity, Cmic)? (2) What are the interrelationships of soil parameters in the context of categorical variables being focused on mineral nitrogen forms? (3) Which factors from the group of categorical variables and soil parameters determine most (and to what extent) the mineral nitrogen contents in terms of its individual forms?

Material and Methods

Area description and terrain work

The research plots (basic characteristics see in Table 1) were established in the Training Forest Enterprise Masaryk Forest Křtiny (TFE) as an organizational part of Mendel University in Brno (Czech Republic) in winter 2013/14. Natural conditions are typical with slightly undulated topography with altitudes from 520 to 570 m a.s.l. on a boarder of Moravian karst transiting in lower Cretaceous of Rudice plateau, with annual precipitation of approx. 610 mm and annual mean temperature of approx. ca 7.5°C; however, with sufficient water supply.

The plots are numbered from Gap 1 to Gap 6, situated in three mature stands (from 95 to 105 yrs.) with forest types beech (ForType-Beech) (Gap 1+2 – European beech dominance); mixed (ForType-Mixed) (Gap 3+4); spruce (ForType-Spruce) (Gap 5+6 – Norway spruce dominance).

Soil profiles were described in each forest type with determination of soil taxonomical unit and humus form and with determination of topsoil properties (Table 1). The six gaps (big gaps were marked as Gap size-Big; /B, small gaps were marked as Gap size-Small; /S) were sampled in autumn 2015 in centre (marked as Position-Centre; /C) and in neighbouring parental forest (marked as Position-Parental; /P), using four representative mixed samples from organomineral A horizon in each position, composed of three mixed samples. In total, the gaps were sampled using 144 samples mixed in 48 homogenized samples, which were sieved through 2 mm sieve and stored in PET bags at a temperature of 5°C.

Laboratory analyses

Ammonium and nitrate nitrogen in soils was determined according the methodology published in the study by Kučera et al. (2013), i.e., expressed in N amount in the relevant form of mineral nitrogen. The soil pH was measured in the suspension soil: water and soil:1 M KCl at a ratio of 1:2.5 (Zbiral et al., 2010). Hydrolytic acidity (Ha) and base cation content (S) were assessed in sodium acetate and hydrochloric acid, respectively (Lityński et al., 1976). Oxidative carbon (Cox) was assessed by sulfochromic oxidation (ISO/DIS, 1995). Total nitrogen (Nt) was assessed according to Kjeldahl (Houba et al., 1989). The soil catalase activity was measured manometrically using O₂ production (Gömöryova et al., 2009); the soil protease activity was measured spectrophotometrically based on the casein hydrolysis as a substrate and there was

measured the amount of L-tyrosine produced (Rejsek et al., 2008). Urease activity was determined spectrophotometrically according to the method by Kandeler and Gerber (1988); there was determined the amount of released ammonium nitrogen after soil samples incubation with urea. Protease activity is measured as native; urease activity is measured as both potential and native. The methodology for protease and urease activity was adjusted (Rejsek et al., 2008); demineralised water was added instead of buffer. The determined protease and urease activity is so called native; enzymes activity is limited by soil pH instead of pH of buffer added. The determination of microbial biomass carbon was performed using a fumigant extraction method. In the presence of strong sulphuric acid, the organic matter is oxidized and Cr (VI) is reduced to Cr (III). The loss of Cr (VI) is determined spectrophotometrically (Zbíral et al., 2011).

Some questions on proteolytic and ureolytic activity assessment

In our study, native protease was used to determine the protease activity as it is stated by Rejsek et al. (2008) and Vranová et al. (2009). There the protease activity is limited by pH in a soil sample instead of added buffer (it is substituted for DEMI H₂O). Its very activity is lower than in so called potential protease, which also results from the fact that there does not enter protease being in interaction with soil colloids (Rejsek, 1991), but only the one, which is currently excreted by microorganisms (Rejsek et al., 2008) in natural soil pH. Potential and native protease is described, for instance, by Weintraub and Schimel (2005) or perhaps by Reiskind et al. (2011); however, the potential protease is reported as that one, to which casein is added: then, the native one is without casein addition and pH is adjusted to a pH value found in a soil sample treated with NaOH addition: this fact is not appropriate for our study purpose. Urease enzyme followed the similar procedure and we measured with added buffer (pH 9.65) according to the methodology by Kandeler and Gerber (1988) and without buffer, which was substituted for DEMI H₂O as in case of native protease. The aim was also to measure enzyme activity in the environment with natural soil pH, which generally limits the activity of ureases and enzymes (Akmal et al., 2012). Tabatabai and Dick (2002), Qin et al. (2010) and some further authors refer to native urease as such, which is found naturally in the soil and is not artificially added into the soil sample during the experiment. We got inspired by Lai and Tabatabai (1992) work; the authors, in addition to clay minerals effect on urease immobilization, also measured native urease in our experiment concept; however, in contrast to us, the measurement ranged from value of

pH 6.5 to the optimal value within the range of 9.5 – 10 pH. We decided to keep pH in the soil sample to the natural level so that objectives of our study could be matched.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed in R software for statistical computing, version 3.2.3 (The R Foundation for Statistical Computing). First, we performed exploratory data analysis (EDA) using interaction plots, which showed independent data on orientation of sampling (N/S/E/W). In the following regression triplet (data, model, method) the data were observed using boxplots and ordination method of data projection within vegan package version 2.3-5 (Oksanen et al., 2016). To observe next relations of variables, correlation analysis was used using 'pairs' function.

Linear regression was performed using generalized linear model (GLM) with 'Gamma' distribution of errors and natural logarithm link function, where $E[y|x,z] = \exp(\alpha + \beta \cdot x + \gamma \cdot z) = \hat{y}$. The data were tested to verify a dependence of $(y \sim) \text{N-NO}_3^-$ and N-NH_4^+ concentration in soil on continuous variables such as soil properties from groups of physical-chemical, chemical and biochemical and categorical variables ('ForType', 'Position' and 'Gap size'), tested both with and without interactions. Graphics was performed with 'ggplot2' package, version 2.1.0 (Wickham and Chang, 2016). The final model was selected using Akaike's information criterion (AIC) (Sakamoto et al., 1986), variance inflation factors (vif) (Fox and Monette, 1982) and p-value when alpha = 0.05.

Results and discussion

General description of soil properties in ForType and treatments

In terms of considered parameters, the individual stand types and their gaps are soil-specific as it is already clear from Fig.1. Overall higher mineral nitrogen content is in ForType-Spruce; it has a higher average content of both nitrate (significantly) and ammonium (more balanced with ForType-Beech) N (Fig. 1a, b, c) but also the proportion of mineral nitrogen N_{min} in total nitrogen N_t (Fig. 1d). N_t ranges predominantly within 0.3-0.6 %; there is significantly lower content in ForType-Mixed/B a Mixed/S/C. The concentration values N-NO_3^- are the highest in ForType-Spruce, particularly in the Position-Centre. While comparing Position-Centre vs. Position-Parental, there is recorded higher N-NO_3^- concentration in Centre comparing to Parental in case of ForType-Beech and ForType-Mixed. In contrast, ForType-Spruce

shows lower nitrate N concentration in Centre. The ammonium ion (N-NH_4^+) does not show the uniform trend while comparing individual ForType.

C/N ratio (Fig. 1e) is significantly the lowest and most consistent in ForType-Beech and distinctly the highest in ForType-Mixed, particularly Mixed/B and Mixed/S/C where the value 30 is exceeded. In ForType-Spruce, values are approx. lower by 10 comparing to ForType-Mixed and they are more balanced. In terms of organic matter content (Fig. 1f), the upper topsoil parts are extremely strongly humus-rich. Microbial carbon (Fig. 1g) is characterized by a similar trend to ForType-Beech and ForType-Spruce. In ForType-Beech/B and Spruce/B there is more microbial community in Position-Centre.

The soil sorption complex (Fig. 1m-o) is specific for individual ForType. CEC is the highest for ForType-Mixed except Mixed/B/C, which is comparable with ForType-Beech. On the contrary, the lowest CEC values as well as S (base cation content) were in ForType-Beech and Spruce, which also has the lowest pH/KCl (Fig. 11); from that fact, the lowest base saturation can be deduced (Table 2). Therefore, ForType-Spruce meets the premise resulting from its litter properties: it is acidic, slowly degradable and in case the spruce grows in the medium and lower altitudes, the accumulation effect is demonstrated and contributes to the topsoil organic matter quality. Changes in soil reaction are considered regular by some authors cf. (Kooch et al., 2010) in connection with Position and Gap size; nevertheless, no analogous trend was demonstrated among all woody species (just in case of ForType-Beech).

Enzymatic activity is a factor specific for individual ForType as well as partial treatments. Urease activity is similar while comparing UreaseNat and UreasePot, which are balanced and generally more active in ForType-Beech, whereas remaining ForType shows more significant differences between treatments, in particular, UreasePot. Comparing to UreaseNat it is typical for more balanced values (Fig. 1i,j). Proteolytic activity (Protease) decreases from ForType-Beech through Mixed up to Spruce and shows significantly downward trend: it is the highest in ForType-Beech/B/C.

In terms of moisture, gaps show significantly higher water content, even more than twice (Fig. 1k).

Interrelationships among soil properties

The interrelationship of individual variables is assessed using the Principal component analysis (PCA) (Fig. 2) and scatter plots with the values of correlation coefficients R^2 (Fig. 3).

PCA shows the relationships between the individual variables and ForType position in factorial plane. ForType-Beech is determined particularly by soil enzymatic activity and related physical-chemical properties (base cation content, base saturation, soil reaction). Biochemical properties are also strongly positively correlated with physical-chemical ones and they together describe the 1st principal component. ForType-Mixed is determined by two variables: C/N ratio and T-CEC with strong positive correlation and significance for the second PCA component. ForType-Spruce is bound to the mineral nitrogen fraction, Cox and Cmic content. Cox shows the weakest positive correlation with other variables pointing to ForType-Spruce. At first sight, hydrolytic acidity (Ha-CEC), catalase activity and soil moisture are relatively indifferent in stand types; however, the further exploration of relationships between variables will make possible to discover the hidden linkage to Nmin fractions.

The correlation matrix (Fig. 3) indicates a frequently statistically significant correlation coefficient value R^2 (at a significance level $\alpha = 0.05$ $R^2_{crit} = 0.2377$), among others just in case of Ha, which has no correlation only to $N-NH_4^+$. Ammonium ion generally appears to be not predetermined by monitored parameters, in contrast to nitrate N, which shows a significant negative correlation with pH/KCl, S-CEC and BS-CEC and positive correlation of borderline significance with Ha-CEC. Enzymes activities are frequently in strong mutual correlation with physical-chemical properties.

Determination of $N-NO_3^-$ and $N-NH_4^+$ content

The optimized model result for $N-NO_3^-$ content is a determined $N-NO_3^-$ dependency on base cation content (S-CEC) and ureolytic activity (UreasePot, UreaseNat) as continuous variables and on ForType and Position as categorical variables. Three resulting models showed AIC values, coefficient of determination, vif and p-value of individual coefficients as significant in terms of interaction ForType and Position. Considering ureolytic activity, UreasePot was found more significant even resulting from vif; in both cases the value of 10 was exceeded, however, less than in case of UreaseNat (Table 3). The resulting model is characterized by a high coefficient of

determination (83 %) and significantly lower AIC (All coefficients are evaluated as significant when $\alpha = 0.05$).

Fig. 4 shows the graphic results of a final model including coefficients S-CEC and UreasePot in the function of categorical variables ForType and Position. N-NO_3^- content is strongly negatively correlated with S-CEC and specific within trends for each stand types. The actual trend is similar in stand types, however, the absolute values differ; having compared ForType-Beech and ForType-Spruce, they practically do not overlap (Fig. 4), while ForType-Mixed forms in this model a real transition between parameters. For Position, the interaction dependence on S-CEC is less significant; however, it is still specific with less steep curve and lower intercept and weaker dependence in Position-Centre.

The strongest N-NO_3^- concentration dependence is on S-CEC in ForType-Beech/B/C, when N-NO_3^- concentration decreases significantly with increasing base cation content; or, on the other hand, N-NO_3^- production (in the process of nitrification it includes the acidification process and subsequent H^+ releasing in the soil solution) causes decreasing of base cation content fixed on the soil sorption complex. This relationship is more striking in Parental; it might be caused, among others, by the absolutely higher N-NO_3^- concentration values in the gap centre.

A similar dependence is also apparent in relation to UreasePot; N-NO_3^- concentration decreases more significantly in Parental with increasing ureolytic activity.

Therefore, N-NO_3^- content relationship to S-CEC and UreasePot is also evaluated in this model as less significantly specific in terms of stand, there are clearly specified ForType-Beech and Spruce with the transition in Mixed. The most striking negative N-NO_3^- content dependency on UreasePot is in ForType-Spruce. However, this relationship is specific with respect to Position resulting from the fact that the dependency is steeper in Position-Parental than in Centre.

Thus, the gap soil environment can be evaluated as one reducing the gradient or interaction tightness resp., (here, without time factor specification) between nitrification and biochemical process interlinked with ureolytic activity; however, it can also be the issue where, in terms of above mentioned, there is reduced nitrification significance as an acidification process for decreasing the absolute content of base cations.

The optimized model for N-NH_4^+ content resulted in finding the negative N-NH_4^+ dependence on hydrolytic acidity (Ha-CEC) and ureolytic activity (UreasePot, UreaseNat) as continuous variables and on ForType and Position as categorical

variables. In correlation analysis, this dependency was evaluated as insignificant (Fig. 3); however, in multidimensional model taking into account interactions, there is especially manifested ForType-Spruce significance as a specific forest type. The model with interactions between categorical variables ForType and Position (Table 4) is the optimal model able to describe best the relationship between variables. Compared with N-NO₃⁻, the model has a lower coefficient of determination (60 %); however, individual coefficients being almost entirely considered, were evaluated as significant or close the level $\alpha = 0.05$.

N-NH₄⁺ concentration is slightly negatively correlated in ForType-Beech and Mixed; in Spruce it is strongly positively dependent, both in case of Ha-CEC and UreasePot. In ForType-Spruce there is a noticeable clear relationship of soil acidity, resp., concentration of proton H⁺, and N-NH₄⁺ content, resp. ammonium nitrogen ions as acidity promoters, thus acid cations also bound in the soil sorption complex: those are concurrently a nitrogen source and key nutrient. ForType-Spruce/P shows a strong positive dependence of N-NH₄⁺ content; its amount in the soil increases with increasing concentration of H⁺, resp. Ha-CEC. The concentration of N-NH₄⁺ related to UreasePot shows the similar trend – the strongest dependence in case of ForType-Spruce; in Beech and Mixed, the dependence is very weak (Fig. 5).

The resulting N-NO₃⁻ and N-NH₄⁺ concentration models (see supplementary material) present individual continuous variables (S-CEC and Ha-CEC, respectively, and UreasePot) and categorical variables ForType and Position with interactions, which were detected as significant for both forms of Nmin – more significant in case of nitrate and less significant in case of ammonium N.

Nmin in context of gaps in forest stand

The assessment of causes for changes or differences in N-NO₃⁻ and N-NH₄⁺ content is subject to comprehensive approach to that issue considering more aspects from the soil properties categories but also within the forest stand context and litter characteristics of relevant ForType. If the soil samples are taken in pedogenetically differentiated horizons Ah, the very litter reflects directly the woody species strategy in modifying soil environment in terms of its chemistry as well as water regime. Therefore, chemistry is at various dynamics always affected by any deforestation (change of above-ground vegetation structure), except for individual tree selection

(Prescott et al., 2003); however, thus the question is, to what extent and what the eventual risk is.

N-NO₃⁻ concentration is in ForType-Spruce in negative relationship with urease activity; N-NO₃⁻ concentration significantly decreases with slight increase of urease activity. Urease as a constitutive enzyme (Gobat et al., 2010) is a result of prolonged soil chemistry situation when at long-term nitrate presence, the need of ureolytic activity involved in N uptake in ammonium form of nitrogen is reduced. If nitrogen is present in the soil, albeit in the form of nitrate, soil biota is not “driven” to energy consuming biochemical processes of urea decomposition. This phenomenon is more striking in parental treatment than in gap centre. Quite the opposite the situation is at urease vs. N-NH₄⁺; there is a strong positive dependency, particularly in a spruce stand when N-NH₄⁺ concentration in the soil significantly increases with slight increase of active urease.

The rate of nitrogen mineralization and its nitrification are determined by quantity and quality of organic matter and by changes in quantity of inorganic nitrogen (Hart et al., 1994). A prerequisite is that NH₄⁺ is a nitrogen source for microorganisms rather than N-NO₃⁻ and its microbial immobilization is minimal (Tiedje et al., 1981; Myrold and Tiedje, 1986; Hart et al., 1994). Increasing the availability of NH₄⁺ can suppress the nitrite reductase synthesis (Van't Riet et al., 1968; Sias and Ingraham, 1979) or inhibit NO₃⁻ transport into cells (Betlach et al., 1981; Hart et al., 1994); therefore, NO₃⁻ concentration in the soil occurs. Due to the nitrogen availability from NO₃⁻ immobilization, microorganisms have no need to produce to a greater extent of urease, which produces NH₄⁺. Then, the production of urease and its metabolite NH₄⁺ occurs due to seasonal dynamics (Closa and Goicoechea, 2010), NO₃⁻ depletion as nitrogen source (Jones and Richards, 1977) during growing season, or possibly its loss caused by leaching into lower soil horizons. From this also follows that changes in nitrates concentrations in the soil do not necessarily have to be related to the selected management or gap size and the subsequent change of microclimatic conditions (Prescott et al., 2003) to such an extent, as to the nature of litter resulting from the stand type (in case of cited author *Picea engelmannii* a *Abies lasiocarpa*) and the harvesting itself.

Having considered all ForTypes, the differences in trends Position-Centre versus Parental (Fig. 5) show a negative dependence of N-NH₄⁺ content on Ha-CEC, and this is the case of Centre. Therefore, N-NH₄⁺ concentration decreases with increasing ions H⁺

concentration at concurrently high concentration of N-NO_3^- ; this fact results from overall larger stocks of overlying humus as a source of mineral N in case of spruce stand, which is typical for ectohumus accumulation (Formánek and Vránová, 2003; Vavříček et al., 2005; Olsson et al., 2012). That in itself represents a significant stock of nitrogen (particularly in spruce stands) (Sinsabaugh et al., 2005; Enowashu et al., 2009), which is released in the soil environment at accelerated mineralization, and thus the soil reaction to gap formation is more pronounced. This situation thus corresponds to Norway spruce strategy, which is adapted to poor, acidic, skeletal sites with low proportion of fine earth, where nutrient pool depends particularly on organic soil component (Guntiñas et al., 2012) and particularly the lack of fine earth is saturated with increased humus production. Therefore, on the one hand, the situation demonstrates the significance of overlying humus organic component in spruce stands, on the other hand, in contrast, there can be followed responses to sudden microclimate changes in deciduous stands, which are generally typical for faster cycling and lower buffering activity in topsoil due to humus absence (Bartsch, 2000; Kooch et al., 2010).

The very difference in treatment Position corresponds to the biological aspect of the tree layer and its effect on soils water regime. However some authors report different results (Arunachalam and Arunachalam, 2000), gaps - at micro sites level for determined disturbance and “biological water pump“ (Aragão, 2012) deprivation - constitute the initiation factor or subsequent changes in biological and enzymatic activity, humus ratios, soil chemistry and further parameters including water regime and soil aeration (Grigal, 2000; Peng et al., 2008; Olajuyigbe et al., 2012). Particularly in a bigger than large gap, the soils are characterized by increased nitrates concentration in the soil solution and related acidification with possible aluminium release in mobile forms (Bauhus and Bartsch, 1995). In gap scan thus be expected the change in the significance of nitrogen transformations, in terms of significantly increased moisture when both nitrates in the process of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) are transferred to ammonium form, and in denitrification process they are converted to gaseous form (Tiedje, 1988; van Groenigen et al., 2015). The graph (Fig. 1k) can show in all gaps the increased soil moisture, particularly in ForType-Spruce with the anticipated subsequent and the most striking anaerobism as well as with N-NO_3^- loss, which occurred in ForType-Spruce as in the only ForType because of high N-NO_3^- stock in abundantly present organic matter.

The gap size has the immediate effect on the rate of change in microclimatic and edaphic conditions (Zhang and Zak, 1995; Ferreira De Lima, 2005; Gálhidy et al., 2006; He et al., 2015). Selection system is an optimal type of forest management in terms of species diversity and microclimate stability (Brunet et al., 2010). However, in terms of forestry-harvest practice, it is not always possible to apply this method; the limit of 15-30 trees (Parsons et al., 1994) is considered to be a cutting-area size. In our case this fact means that no significant nitrogen losses occur: the gaps sizes fluctuate on a range of small and medium size class in case of the small gaps, and big size class in case of the big gaps. There just N-NO₃⁻ in relation to the gap size shows irregular fluctuations and dynamics with not quite obvious trend. This could also explain not always obvious trends in soil properties (Fig. 1).

Conclusion

From the total of 16 tested, the concentration of N mineral forms was most effected by 3 factors from the group of soil parameters of continuous variables (Ha-CEC and UreasePot for N-NH₄⁺; S-CEC and UreasePot for N-NO₃⁻) and 2 factors from the group of categorical variables (ForType a Position for both N-NH₄⁺ and N-NO₃⁻) as group factors.

N-NO₃⁻ relationship to the base cations content is more significant in terms of stand type comparing to Position-Centre versus Parental viewpoint. N-NO₃⁻ is thus more determined by bases content and ureolytic activity with respect to stand type; dependence significance gradient decreases in the gap centre. Equally, N-NO₃⁻ linkage to ureolytic activity is reduced in case of gap. As to stand type, N-NO₃⁻ concentration is the most closely determined by urease in spruce stand.

In contrast to N-NO₃⁻, which shows the same meaning of dependence in all ForType, N-NH₄⁺ shows different trends in individual stand types: while in beech and mixed stands, N-NH₄⁺ dependence on hydrolytic activity and potential urease activity is very weak, then, in spruce stand it always shows a significantly strong dependence. A significant negative dependence of nitrate nitrogen concentration on ureolytic activity may indicate a reduced need to encourage the energy-demanding biochemical process of urea decomposition.

In connection to the discussed topic, there can be specified some questions offering chances for follow-up studies: What is, at first sight, the indirect relationship of nitrate-nitrogen concentration and ureolytic activity in the soil? What is the degree of

importance of soil potential ureolytic activity in the process of urea decomposition, resp. in the production of mineral nitrogen? How does soil reaction vary in gaps of different sizes for determined stand types – at sizes with a resolution in a greater detail? The raised questions are important for a comprehensive understanding of forest ecosystem (and principles of provident forest management), within which the soil-plant relationship is a significant soil-forming factor for pedogenesis (Šamonil et al., 2009; Šamonil et al., 2010) and for topsoil related to nitrogen cycling (Mladenhoff, 1987).

Acknowledgements

This work was supported by Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno [IGA Mendelu in Brno “GAPS” 84/2013]; and the Ministry of Agriculture of the Czech Republic [QJ1320050].

References

- Akmal M., M. S. Altaf, R. Hayat, F. U. Hassan and M. Islam. 2012. Temporal changes in soil urease, alkaline phosphatase and dehydrogenase activity in rained wheat field of Pakistan. *J. Anim. Plant Sci.* 22:457–462.
- Aragão L. E. 2012. Environmental science: The rainforest's water pump. *Nature.* 489:217–218.
- Arunachalam A. and K. Arunaclam. 2000. Influence of gap size and soil properties on microbial biomass in a subtropical humid forest of north-east India. *Plant Soil.* 223:187–195.
- Bárta J., P. Šlajsová, K. Tahovská, T. Pícek and H. Šantrůčková. 2014. Different temperature sensitivity and kinetics of soil enzymes indicate seasonal shifts in C, N and P nutrient stoichiometry in acid forest soil. *Biogeochemistry.* 117:525–537.
- Bartsch N. 2000. Element release in beech (*Fagus sylvatica* L.) forest gaps. *Water, Air and Soil Poll.* 122:3–16.
- Bauhus J. 1996. C and N mineralization in an acid forest soil along a gap-stand gradient. *Soil Biol. Biochem.* 28:923–932.
- Bauhus, J. and N. Bartsch. 1995. Mechanisms for carbon and nutrient release and retention in beech forest gaps: I. Microclimate, water balance and seepage water chemistry. *Plant Soil.* 168:579–584.

- Betlach M. R., J. M. Tiedje and R. B. Firestone. 1981. Assimilatory nitrate uptake in *Pseudomonas fluorescens* studied using nitrogen-13. *Achiv. Microb.* 129:135–140.
- Błońska E. and J. Lasota. 2014. Biological and biochemical properties in evaluation of forest soil quality. *Fol. For. Pol. series A.* 56:23–29.
- Brêthes A., J. J. Brun, B. Jabiol, J.F. Ponge and F. Toutain. 1995. Classification of forest humus forms: a French proposal. *Annal. des Scien. Forest.* 52:535–546.
- Brunet J., Ö. Fritz and G. Richnau. 2010. Biodiversity in European beech forests – a review with recommendations for sustainable forest management. *Ecol. Bull.* 53:77–94.
- Burns R. G. 1982. Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biol. Biochem.* 14:423–427.
- Closa I. and N. Goicoechea. 2010. Seasonal dynamics of the physicochemical and biological properties of soils in naturally regenerating, unmanaged and clear-cut beech stands in northern Spain. *Eur. J. Soil Biol.* 46:190–199.
- D'Oliveira M. V. N. and L. A. Ribas. 2011. Forest regeneration in artificial gaps twelve years after canopy opening in Acre State Western Amazon. *Forest Ecol. Manag.* 261:1722–1731.
- Enowashu E., C. Poll, N. Lamersdorf and E. Kandeler. 2009. Microbial biomass and enzyme activities under reduced nitrogen deposition in a spruce forest soil. *Appl. Soil Ecol.* 43:11–21.
- Ferreira De Lima R. A. 2005. Gap size measurement: The proposal of a new field method. *Forest Ecol. Manag.* 214:413–419.
- Formánek P. and V. Vránová. 2003. A contribution to the effect of liming on forest soils : review of literature. *J. For. Sci.* 48:182–190.
- Fox J. and G. Monette. 1992. Generalized collinearity diagnostics. *JASA* 87:178–183.
- Gálhidy L., B. Mihók, A. Hagyó, K. Rajkai and T. Standovár. 2006. Effects of gap size and associated changes in light and soil moisture on the understorey vegetation of a Hungarian beech forest. *Plant Ecol.* 183:133–145.
- Gobat J. M., M. Aragno and W. Matthey. 2010. *Le sol vivant, Bases de pédologie - Biologie des sols* (3rd ed.). Presses polytechniques et universitaires Romandes
- Gömöryova E., D. Vass, V. Pichlera and D. Gömöry. 2009. Effect of alginite amendment on microbial activity and soil water content in forest soils. *Biologia.* 64:585–588.
- Grigal D. F. 2000. Effects of extensive forest management on soil productivity. *For.*

- Ecol. Manag. 138:167–185.
- Gudersen P. and L. Rasmussen. 1990. Nitrification in forest soils: Effect from nitrogen deposition on soil acidification and aluminium release. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 13:1–45.
- Gundersen P., I. K. Schmidt and K. Raulund-Rasmussen. 2006. Leaching of nitrate from temperate forests – effects of air pollution and forest management. Environ. Rev. 14:1–57.
- Guntinas M. E., M. C. Leiros, C. Trasar-Cepeda and F. Gil-Sotres. 2012. Effects of moisture and temperature on net soil nitrogen mineralization: A laboratory study. Eur. J. Soil Biol. 48:73–80.
- Halldorsson G., E. S. Oddsdorrrir and O. Eggertsson. 2005. Effects of afforestation on ecosystems, landscape and rural development. *In: Proceeding of the AFFONORD conference. June 18-22, 2005. Nordic Council of Ministers, Reykholt, Iceland.*
- Hart S. C., G. Nason, D. D. Myrold and D. A. Perry. 1994. Dynamics of gross nitrogen transformations in an old-growth forest: the carbon connection. Ecology. 75:880–891.
- He Z., J. Liu, S. Su, S. Zheng, D. Xu, Z. Wu and J. L. M. Wang. 2015. Effects of Forest Gaps on Soil Properties in *Castanopsis kawakamii* Nature Forest. Plos One. 10:1–10.
- He Z., J. Liu, C. Wu, S. Zheng, W. Hong, S. Su and Ch. Wu. 2012. Effects of Forest Gaps on Some Microclimate Variables in *Castanopsis kawakamii* Natural Forest. J. Mt. Sci. 9:706–714.
- Holík L., V. Vranová, S. Kočvarová and K. Rejšek. 2016. Effects of tartaric acid enantiomers on proteolytic activity of soils. Chem. Listy. 110:651–655.
- Houba V. G. J., J. J. van der Lee, I. Novozamsky and I. Walinga. 1989. Soil analysis procedures. Soil and plant analysis, Part 5. Wageningen Agricultural University, pp. 45.
- Christel C., P. B. R. Kern, A. M. Rebecca and F. S. Terry. 2012. Do deer and shrubs override canopy gap size effects on growth and survival of yellow birch, northern red oak, eastern white pine, and eastern hemlock seedlings? For. Ecol. Manag. 267:134–143.
- ISO/DIS (1995): ISO/DIS 14235 Soil Quality – Determination of organic carbon in soil by sulfochromic oxidation. International Organization for Standardization.

- IUSS Working Group W.R.B., 2015. World Reference Base for Soil Resources 2014, update 2015 international soil classification system for naming soil and creating legends for soil maps. World Soil Res Report No 106. FAO, Rome.
- Jones J. M. and B. N. Richards. 1977. Effect of reforestation on turnover of ¹⁵N-labelled nitrate and ammonium in relation to changes in soil microflora. *Soil Biol. Bioch.* 9:383–392.
- Kandeler E. and H. Gerber. 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 6:68–72.
- Kooch Y., S. M. Hosseini, J. Mohammadi and S. M. Hojjati. 2010. The effect of gap disturbance on soil chemical and biochemical properties in a mixed beech-hornbeam forest of Iran. *Ecol. Balk.* 2:39–56.
- Kučera A., L. Holik, K. Marosz, A. Martinik and D. Vavricek. 2013. Changes in forms of available nitrogen and respiration in soil of beech forest as a reaction to a deforestation resulting from wind storm. *Acta Univ. agric. Silv. Mendel. Brunensis* 61:107–113.
- Ladd J. N. 1972. Properties of proteolytic enzymes extracted from soil. *Soil Biol. Biochem.* 4:227–237.
- Lai C. M. and M. A. Tabatabai. 1992. Kinetic parameters of immobilized urease. *Soil Biol. Biochem.* 24:225–228.
- Latif Z. A. and G. A. Blackburn. 2010. The effects of gap size on some microclimate variables during late summer and autumn in a temperate broadleaved deciduous forest. *Inter. J. Biomet.* 54:119–129.
- Lityński T., H. Jurkowska and E. Gorlach. 1976. Chemical and agriculture analysis. PWN, Warszawa, pp. 129–132.
- Mladenhoff D. J. 1987. Dynamics of Nitrogen Mineralization and Nitrification in Hemlock and Hardwood Treefall Gaps. *Ecology.* 68:1171–1180.
- Muscolo A., M. Sidari and R. Mercurio. 2007. Influence of gap size on organic matter decomposition, microbial biomass and nutrient cycle in Calabrian pine (*Pinus laricio*, Poiret) stands. *For. Ecol. Manag.* 242:412–418.
- Myrold D. D. and J. M. Tiedje. 1986. Simultaneous estimation of several nitrogen cycling rates using in theory and application. *Soil Biol. Biochem.* 18:559–568.
- Oksanen J., F. G. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, P. R. Minchin, R. B. O’Hara, G. L. Simpson, P. Solymos, M. H. H. Stevens and H. Wagner. 2016. Package ‘vegan’,

- Community Ecology Package. R package version 2.3-5. Available online at <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>.
- Olajuyigbe S., B. Tobin, M. Saunders and M. Nieuwenhuis. 2012. Forest thinning and soil respiration in a Sitka spruce forest in Ireland. *Agric. For. Meteorol.* 157:86–95.
- Olsson B. A., K. Hansson, T. Persson, E. Beuker and H. S. Helmisaari. 2012. Heterotrophic respiration and nitrogen mineralisation in soils of Norway spruce, Scots pine and silver birch stands in contrasting climates. *For. Ecol. Manag.* 269:197–205.
- Pang X., B. Hu, W. Bao, T. de O. Vargas and G. Tian. 2016. Effect of thinning-induced gap size on soil CO₂ efflux in a reforested spruce forest in the eastern Tibetan Plateau. *Agric. For. Meteorol.* 220:1–9.
- Parsons W. F. J., D. H. Knight and S. L. Miller. 1994. Root gap dynamics in lodgepole pine forest: Nitrogen transformations in gaps of different size. *Ecol. Applic.* 4:354–362.
- Peng Y., S. C. Thomas and D. Tian. 2008. Forest management and soil respiration: implications for carbon sequestration. *Environ. Rev.* 16:93–111.
- Prescott C. E., G. D. Hope and L. L. Blevins. 2003. Effect of gap size on litter decomposition and soil nitrate concentrations in a high-elevation spruce–fir forest. *Canad. J. For. Res.* 33:2210–2220.
- Purev D., J. Bayarmaa, B. Ganchimeg, B. Ankhtsetseg and O. Anumandal. 2012. Catalase, protease and urease activity in some types of soil. *Mongol. J. Chem.* 13:16–18.
- Qin S., C. Hu, Y. Wang, X. Li and X. He. 2010. Tillage effects on intracellular and extracellular soil urease activities determined by an improved chloroform fumigation method. *Soil sci.* 175:568–572.
- Reiskind J. B., M. Lavoie and M. C. Mack. 2011. Kinetic studies of proteolytic enzyme activity of arctic soils under varying toluene concentrations. *Soil Biol. Biochem.* 43:70–77.
- Rejsek K., P. Formanek and M. Pavelka. 2008. Estimation of protease activity in soils at low temperatures by casein amendment and with substitution of buffer by demineralized water. *Amino acids* 35:411–417.
- Ritter E. 2005. Litter decomposition and nitrogen mineralization in newly formed gaps in a Danish beech (*Fagus sylvatica*) forest. *Soil Biol. Biochem.* 37:1237–1247.
- Ritter E. and L. Bjørnlund. 2005. Nitrogen availability and nematode populations in soil

- and litter after gap formation in a semi-natural beech-dominated forest. *Appl. Soil Ecol.* 28:175–189.
- Sakamoto Y., M. Ishiguro and G. Kitagawa. 1986. *Akaike Information Criterion Statistics*. D. Riedel Publishing Company, 290.
- Salazar S., L. E. Sánchez, J. Alvarez, A. Valverde, P. Galindo, J. M. Igual, A. Peix and I. Santa-Regina. 2011. Correlation among soil enzyme activities under different forest system management practices. *Ecol. Engin.* 37:1123–1131.
- Setiawan N. N., M. Vanhellemont, A. de Schrijver, S. Schelfhout, L. Baeten and K. Verheyen. 2016. Mixing effects on litter decomposition rates in a young tree diversity experiment. *Acta Oecol.* 70:79–86.
- Sias S. R. and J. L. Ingraham. 1979. Isolation and analysis of mutants of *Pseudomonas aeruginosa* unable to assimilate nitrate. *Achiv. Microb.* 48:802–806.
- Sinsabaugh R. L., M. E. Gallo, C. Lauber, M. P. Waldrop and D. R. Zak. 2005. Extracellular enzyme activities and soil organic matter dynamics for northern hardwood forests receiving simulated nitrogen deposition. *Biogeochemistry* 75:201–215.
- Šamonil P., L. Antolik, M. Svoboda and D. Adam. 2009. Dynamics of windthrow events in a natural fir-beech forest in the Carpathian mountains. *For. Ecol. Manag.* 257:1148–1156.
- Šamonil P., K. Král and L. Hort. 2010. The role of tree uprooting in soil formation: A critical literature review. *Geoderma.* 157:65–79.
- Tabatabai M. A. and W. A. Dick. 2002. Enzymes in soil. *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*. Marcel Dekker, New York, pp. 627.
- Tiedje J. M. 1988. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *In: Environmental Microbiology of Anaerobes*, Zehnder A. J. B. (Eds.), John Wiley and Sons, New York, pp 179–244.
- Tiedje J. M., J. Sorensen and Y. Y. L. Chang. 1981. Assimilatory nitrate reduction: perspectives and methodology for simultaneous measurements of several nitrogen cycle processes. *Ecol. Bull.* 33:331–342.
- van Groenigen J. W., D. Huygens, P. Boeckx, T. W. Kuyper, I. M. Lubbers, T. Rütting and P. M. Groffman. 2015. The soil N cycle: new insights and key challenges. *Soil* 1:235–256.
- Van't Riet J., A. H. Stouthammer and R. J. Planta. 1968. Regulation of nitrate assimilation and nitrate respiration in *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacter.* 96:1455–

1464.

- Vavříček D., P. Samec and P. Šimková. 2005. Soil properties as a component of predisposition factors of Norway spruce forest decline in the Hanušovická highland mountain zone. *J. For. Sci.* 51:527–538.
- Vranova V., P. Formanek, K. Rejšek and M. Pavelka. 2009. Impact of land-use change on proteolytic activity of mountain meadows. *Soil water. res.* 3:122–125.
- Weintraub M. N. and J. P. Schimel. 2005. Seasonal protein dynamics in Alaskan arctic tundra soils. *Soil Biol. Biochem.* 37:1469–1475.
- Wickham H. and W. Chang. 2016. Package 'ggplot2', An Implementation of the Grammar of Graphics. R package version 2.1.0. Available online at <https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/ggplot2.pdf>.
- Wild B., J. Schnecker, J. Bárta, P. Čapek, G. Guggenberger, F. Hofhansl, Ch. Kaiser, N. Lashchinsky, R. Mikutta, M. Mooshammer, H. Šantrůčková, O. Shibistova, T. Urich, S. A. Zimov and A. Richter. 2013. Nitrogen dynamics in Turbic Cryosols from Siberia and Greenland. *Soil Biol. Biochem.* 67:85–93.
- Wyszowska J., M. Kucharski, J. Kucharski and A. Borowik. 2009. Activity of dehydrogenases, catalase and urease in copper polluted soil. *J. Element.* 14:605–618.
- Xu Z., G. Yu, X. Zhang, J. Ge, N. He, Q. Wang and D. Wang. 2015. The variations in soil microbial communities, enzyme activities and their relationships with soil organic matter decomposition along the northern slope of Changbai Mountain. *Appl. Soil. Ecol.* 86:19–29.
- Zbiral J. and I.Honsa. 2010. *Soil Analysis, Volume 1, Soil Survey Laboratory Methods Manual*. Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture, Brno, pp. 290.
- Zhang Q. and J. C. Zak. 1995. Effects of Gap Size on Litter Decomposition and Microbial Activity in a Subtropical Forest. *Ecology* 76:2196–2204.

Figure titles:

Fig 1: Boxplots of investigated soil properties (y-axis) grouped in categorical variables ForType/size (x-axis) and Position (graph legend).

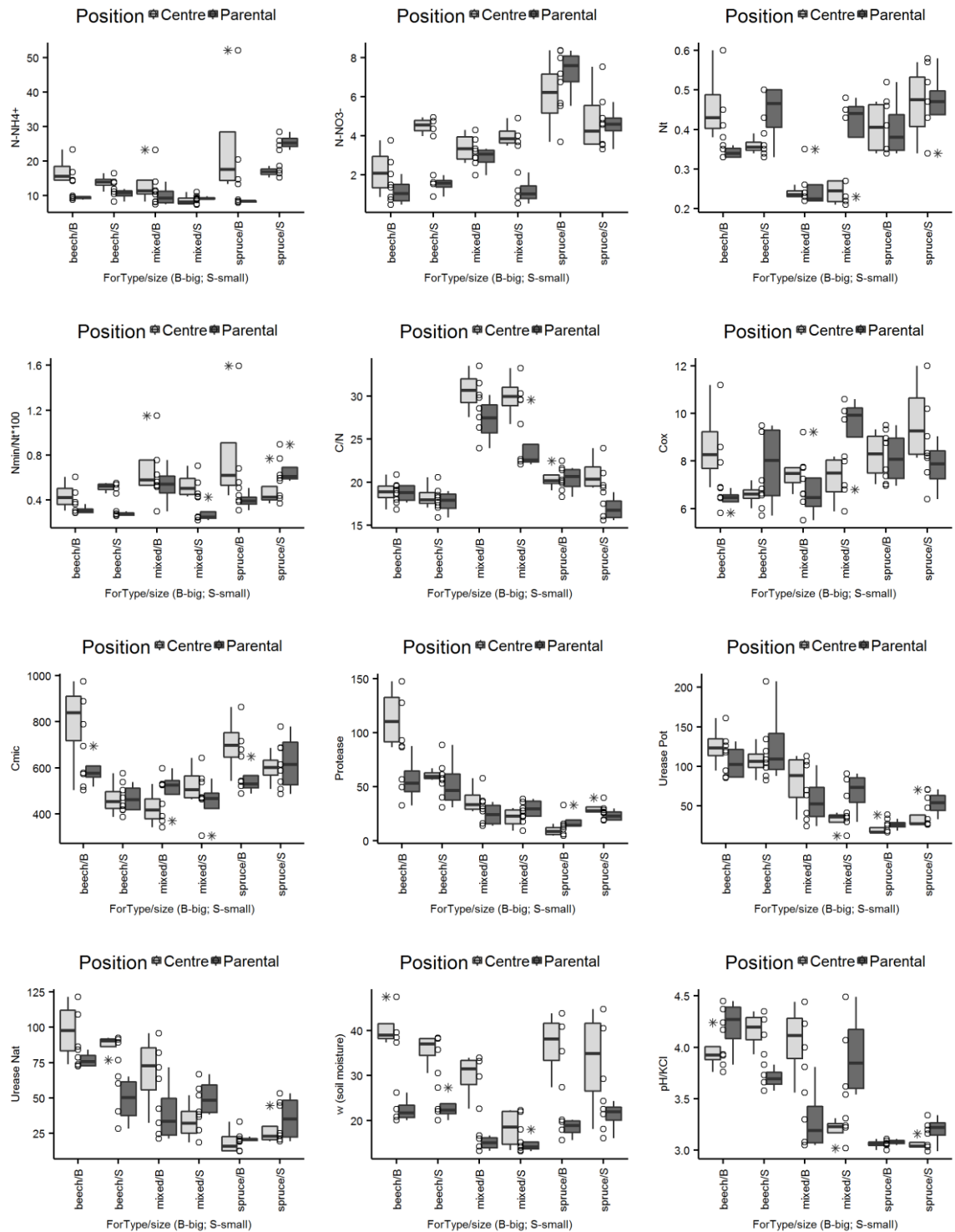
Fig 2: Ordination plot of soil parameters in projection together with ForType (expressed by ordispider).

Fig. 3: Results of correlation analysis of soil parameters from groups physical-chemical (pH, Ha_CEC, S_CEC, BS_CEC), chemical (N-NH_4^+ _av, N-NO_3^- _av) and biochemical (Catalase, Protease_av, UreasePot_av) properties with correlation coefficient below diagonal and histograms of data distribution on the diagonal.

Fig 4: N-NO_3^- dependence on S-CEC (base cations content) in function of ForType (a), Position (b) and on UreasePot (potential urolytic activity) in function of ForType (c), Position (d). Regression lines are fitted with use of GLM with Gamma distribution of errors and a natural logarithm link function.

Fig 5: N-NH_4^+ dependence on Ha-CEC (acid cations content) in function of ForType (a), Position (b) and on UreasePot (potential urolytic activity) in function of ForType (c), Position (d). Regression lines are fitted with use of GLM with Gamma distribution of errors and a natural logarithm link function.

Figure 1: Boxplots of investigated soil properties (y-axis) grouped in categorical variables ForType/size (x-axis) and Position (graph legend).



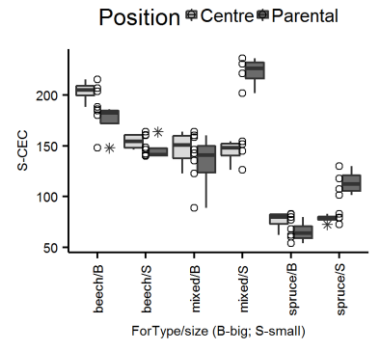
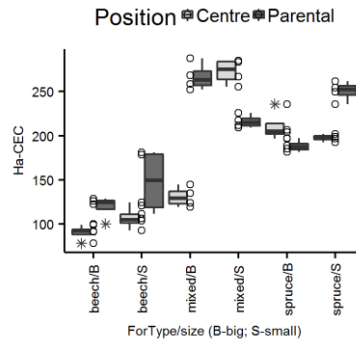
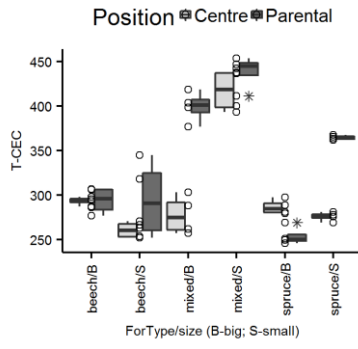


Figure 2: Ordination plot of soil parameters in projection together with ForType (expressed by ordispider).

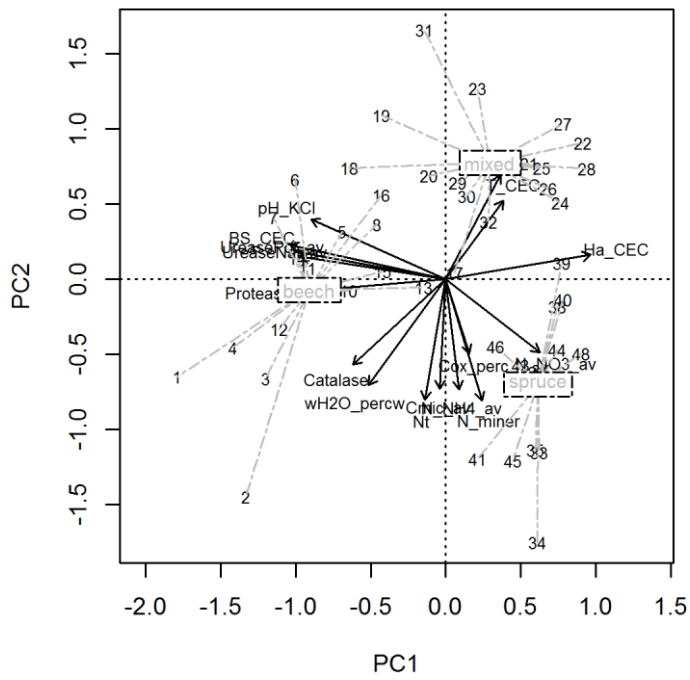


Figure 3: Results of correlation analysis of soil parameters from groups physical-chemical (pH, Ha_CEC, S_CEC, BS_CEC), chemical (N-NH₄⁺_av, N-NO₃⁻_av) and biochemical (Catalase, Protease_av, UreasePot_av) properties with correlation coefficient below diagonal and histograms of data distribution on the diagonal.

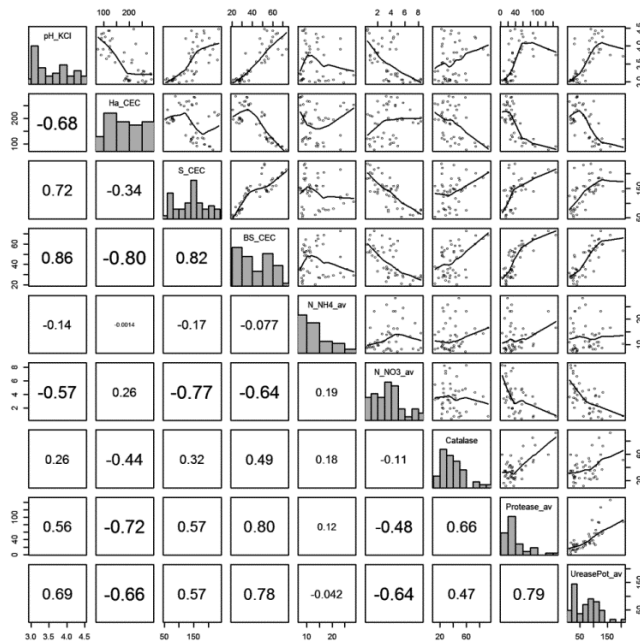


Figure 4: N-NO_3^- dependence on S-CEC (base cations content) in function of ForType (a), Position (b) and on UreasePot (potential urolytic activity) in function of ForType (c), Position (d). Regression lines are fitted with use of GLM with Gamma distribution of errors and a natural logarithm link function.

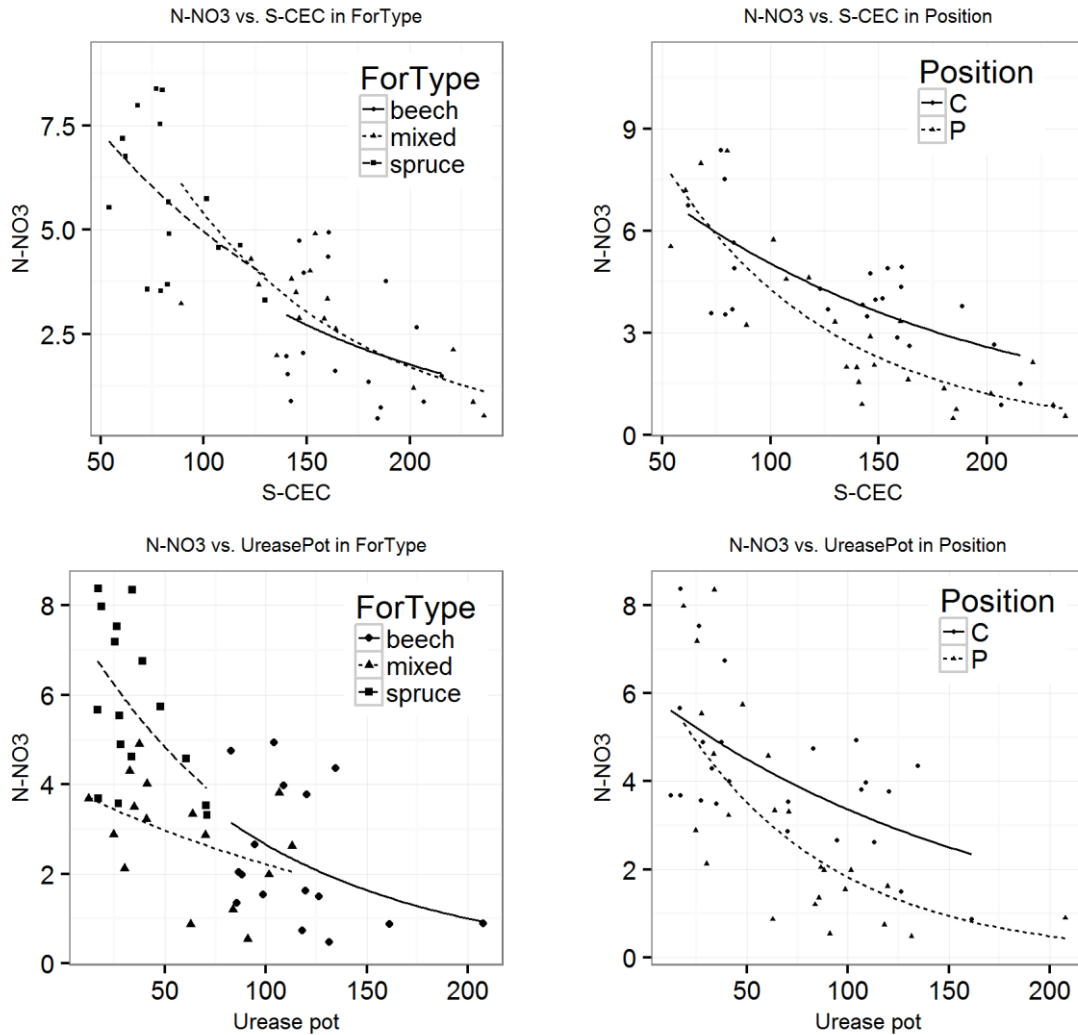


Figure 5: N-NH_4^+ dependence on Ha-CEC (acid cations content) in function of ForType (a), Position (b) and on UreasePot (potential urolytic activity) in function of ForType (c), Position (d). Regression lines are fitted with use of GLM with Gamma distribution of errors and a natural logarithm link function.

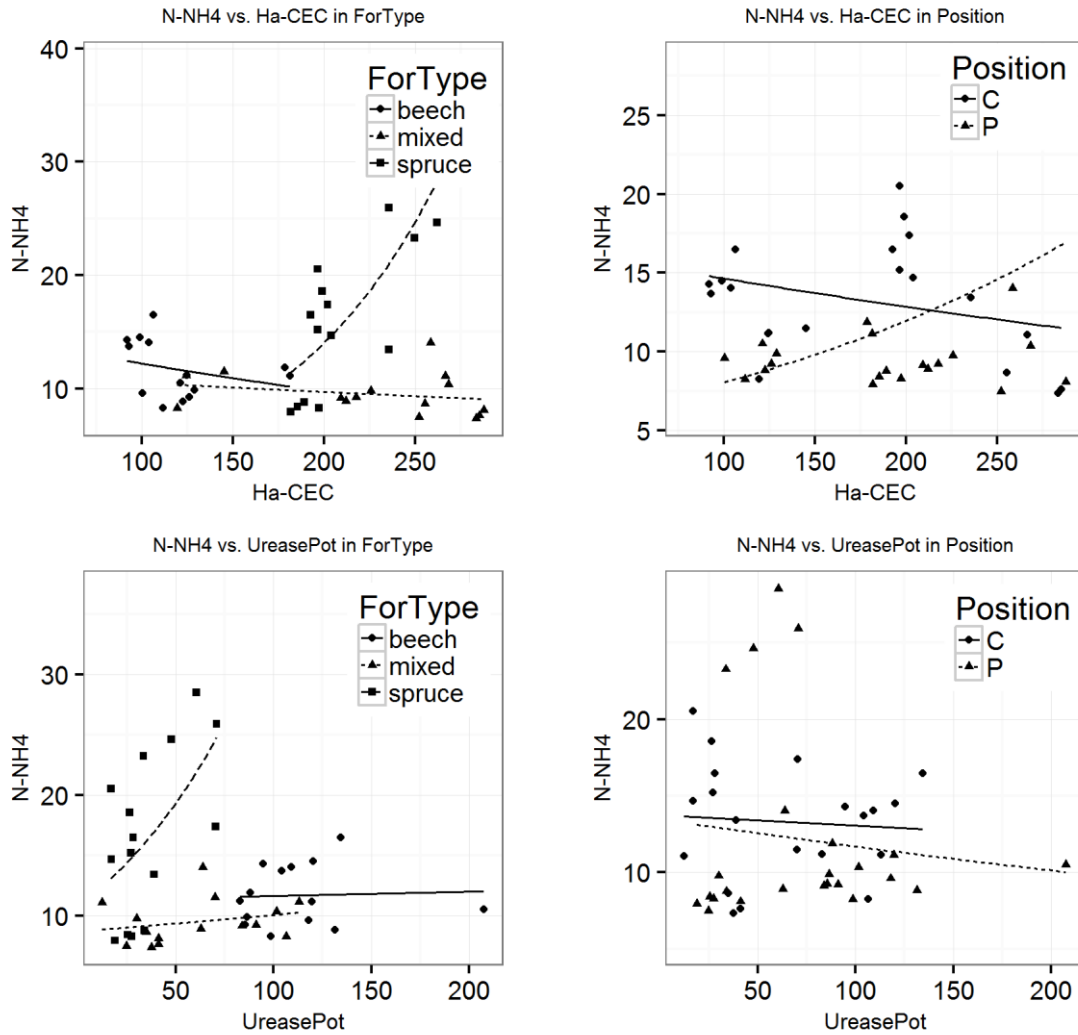


Table 1: Natural conditions at study plots explained by forest type (ForType), gap size (size), woody species percentage proportion, geological (bedrock, topsoil) and pedological (humus form, taxonomical unit) properties.

Gap No.	Coord (N/E) (WGS 84)	ForType/ size [m ²]	Species composition * [%]	Bedrock	Topsoil	Humus form**/ Taxonomical unit ***
1	49°19.03118' 16°43.66622'	beech/ big (1.291)	beech 90 spruce+larch 10	mixed (limestone, terra fusca)	loess loam	Dysmull/ ST-al-crn.slp.can
2	49°19.02657' 16°43.62308'	beech/ small (282)	beech 90 spruce+larch 10			
3	49°18.89250' 16°43.53232'	mixed/ big (904)	spruce 50, beech 30, larch+fir 20	mixed (limestone, terra fusca)	loess loam	Dysmoder/ LV-go.le.cr.can- df .slp
4	49°18.90320' 16°43.50110'	mixed/ small (226)	spruce 50, beech 30, larch+fir 20			
5	49°19.07415' 16°42.54572'	spruce/ big (716)	spruce 90, beech+larch 10	mixed (kaolinized, quartzose sandstone, loess admixture)	loess loam	Mor/ ST-skn-slp.rp
6	49°19.08453' 16°42.52463'	spruce/ small (255)	spruce 90, beech+larch 10			

* European beech (*Fagus sylvatica* L.); Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karsten); silver fir (*Abies alba* Mill.); European larch (*Larix decidua* Mill.)

** Brêthes et al. 1995

*** IUSS Working Group WRB 2015

Table 2: Characteristics of observed soil properties grouped in categorical variables ForType, gap size and Position.

Variable	stat	Unit	ForType (n=16)						Gap size (n=8)						Position (n=8)					
			Beech		Mixed		Spruce		Beech		Mixed		Spruce		Beech		Mixed		Spruce	
			mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd	mean	sd
WH₂O	mean	%w	30.45	19.48	27.37	31.56	29.35	22.44	16.51	27.62	27.13	38.21	22.69	24.04	14.92	35.02	19.73			
	sd		8.54	6.93	10.05	9.73	7.00	8.13	3.52	10.33	9.76	4.38	2.53	7.20	1.64	8.77	9.24			
pH/H₂O	mean	-	4.41	3.99	3.53	4.45	4.38	4.03	3.96	3.45	3.61	4.43	4.40	4.11	3.87	3.50	3.56			
	sd		0.27	0.52	0.12	0.28	0.25	0.51	0.53	0.06	0.11	0.24	0.29	0.42	0.58	0.04	0.43			
pH/KCl	mean	-	4.01	3.62	3.10	4.08	3.93	3.68	3.56	3.07	3.13	4.07	3.95	3.63	3.62	3.06	3.14			
	sd		0.27	0.48	0.09	0.24	0.27	0.49	0.46	0.03	0.12	0.20	0.31	0.49	0.46	0.05	0.48			
Ha-CEC	mean	mmolChemexkg ⁻¹	116.16	221.51	211.70	104.85	127.47	198.68	244.34	199.44	223.96	98.56	133.76	201.71	241.32	204.06	219.34			
	sd		27.92	57.80	25.52	17.51	31.57	68.88	29.91	15.88	27.38	12.73	27.89	71.77	27.33	12.64	67.94			
S-CEC	mean	mmolChemexkg ⁻¹	169.60	161.55	83.55	188.96	150.24	139.78	183.32	70.86	96.24	178.63	160.57	145.60	177.50	77.27	89.83			
	sd		24.58	39.71	20.16	19.37	9.17	23.13	40.87	10.43	19.55	26.12	19.07	13.72	49.56	6.63	22.52			
T-CEC	mean	mmolChemexkg ⁻¹	285.76	383.06	295.25	293.82	277.71	338.46	427.66	270.29	320.20	277.20	294.33	347.31	418.81	281.33	309.17			
	sd		25.23	64.84	42.12	9.54	32.44	63.03	21.42	18.31	44.36	17.56	28.60	72.26	25.13	8.07	56.76			
BS-CEC	mean	%	59.49	42.77	28.02	64.28	54.69	42.92	42.63	26.19	29.85	64.16	54.81	43.69	41.86	27.52	28.53			
	sd		7.72	9.66	3.47	6.08	6.03	10.94	8.18	3.26	2.60	5.95	6.34	9.49	9.75	2.70	12.13			
Cox	mean	%	7.37	7.70	8.46	7.53	7.21	7.12	8.28	8.19	8.73	7.63	7.11	7.29	8.11	8.95	7.97			
	sd		1.48	1.48	1.36	1.61	1.32	1.06	1.60	0.99	1.60	1.55	1.36	0.73	1.87	1.48	1.13			
Nt	mean	%	0.40	0.28	0.44	0.40	0.40	0.25	0.32	0.41	0.47	0.41	0.39	0.24	0.33	0.44	0.40			
	sd		0.08	0.09	0.08	0.08	0.06	0.04	0.11	0.07	0.09	0.08	0.07	0.02	0.11	0.08	0.10			
C/N	mean	-	18.40	28.00	19.69	18.79	18.01	28.93	27.08	20.39	18.99	18.62	18.18	30.28	25.72	20.73	18.64			
	sd		1.31	3.57	2.14	1.20	1.31	2.82	3.99	1.30	2.55	1.41	1.18	2.28	3.15	1.58	6.74			
N-NH₄⁺	mean	µg×g _{drymass} ⁻¹	12.72	10.36	19.00	13.30	12.14	11.77	8.96	16.77	21.24	15.53	9.91	11.11	9.62	21.05	16.96			
	sd		3.77	3.76	10.66	4.70	2.36	4.80	1.10	13.99	4.63	3.36	1.13	4.86	1.86	11.94	2.70			
N-NO₃⁻	mean	µg×g _{drymass} ⁻¹	2.34	2.87	5.71	1.68	3.01	3.13	2.60	6.69	4.72	3.36	1.33	3.71	2.02	5.50	5.91			
	sd		1.47	1.21	1.73	1.04	1.55	0.67	1.53	1.54	1.31	1.42	0.54	0.69	1.01	1.77	1.21			
Catalase	mean	ml O ₂ ×g _{drymass} ⁻¹ ×15min ⁻¹	53.73	29.00	36.23	61.27	46.19	25.74	32.26	39.39	33.07	64.95	42.51	30.82	27.18	41.02	31.44			
	sd		18.12	10.74	14.96	19.63	12.54	6.54	12.91	17.91	10.34	18.87	6.98	12.31	8.52	16.91	17.30			
Protease	mean	µg L-tyrosin × g _{drymass} ⁻¹ × hr ⁻¹	71.02	28.26	20.31	85.20	58.83	31.07	25.45	13.81	26.81	87.17	54.86	29.45	27.06	19.71	20.91			
	sd		31.59	11.41	9.71	36.43	16.31	12.76	9.05	8.14	6.12	32.07	21.10	13.30	8.98	11.68	21.93			
UreasePot	mean	µg N-NH ₄ ⁺ × g _{drymass} ⁻¹ × hr ⁻¹	116.74	59.13	34.93	115.48	118.00	69.08	49.18	24.32	45.53	116.55	116.93	55.95	62.32	30.16	39.69			
	sd		31.40	30.98	17.60	24.14	37.22	32.61	25.65	7.95	18.20	23.08	37.93	34.36	26.81	16.76	48.24			
UreaseNat	mean	µg N-NH ₄ ⁺ × g _{drymass} ⁻¹ × hr ⁻¹	77.68	48.11	25.86	87.31	68.04	54.18	42.05	20.10	31.61	92.57	62.78	51.02	45.20	23.44	28.28			
	sd		22.19	22.05	11.77	17.05	22.56	26.13	14.72	6.09	13.18	14.77	17.98	25.67	17.23	10.17	24.80			
Cmic	mean	µg C × g _{drymass} ⁻¹	579.04	476.52	618.03	690.07	468.00	464.99	488.05	624.88	611.18	628.09	529.98	477.21	475.83	649.96	586.10			
	sd		167.70	89.36	107.66	166.59	61.92	86.39	90.79	118.86	94.66	210.31	84.86	87.42	91.26	105.63	80.11			

Table 3: Selection of final model explaining the determination of nitrate nitrogen (N-NO₃⁻) depending on independent variables S-CEC, UreasePot (continuous) and ForType and Position either with or without interaction (categorical).

model (y = N-NO ₃ ⁻)/ coefficients	S-CEC + UreaseNat + ForType × Position		S-CEC + UreasePot + ForType + Position		S-CEC + UreasePot + ForType × Position	
	p-value	vif	p-value	Vif	p-value	vif
Intercept	< 0.001	-	< 0.001	-	< 0.001	-
S-CEC	< 0.001	3.78	< 0.001	3.00	< 0.001	3.43
UreaseNat	0.1624	3.30	-	-	-	-
UreasePot	-	-	0.0094	2.77	< 0.001	2.78
ForType-Mixed	0.1111	-	0.3769	-	0.0077	-
ForType-Spruce	0.0101	-	0.8036	-	< 0.001	-
Position – P	< 0.001	-	< 0.001	-	< 0.001	-
ForTypeMixed:PositionP	0.0037	-	-	-	0.0031	-
ForTypeSpruce:PositionP	< 0.001	-	-	-	< 0.001	-
ForType	-	12.43	-	5.05	-	11.70
Position	-	3.30	-	1.03	-	3.12
ForType:Position	-	10.24	-	-	-	9.19
AIC / R ²	145.4322 /	0.78	160.76 /	0.67	133.35 /	0.83

Table 4: Selection of final model explaining determination of ammonia nitrogen (N-NH₄⁺) depending on independent variables S-CEC, UreasePot (continuous) and ForType and Position either with or without interaction (categorical).

model (y = N-NH ₄ ⁺)/ coefficients	Ha-CEC + UreaseNat + ForType × Position		Ha-CEC + UreasePot + ForType + Position		Ha-CEC + UreasePot + ForType × Position	
	p-value	vif	p-value	Vif	p-value	vif
Intercept	< 0.001	-	< 0.001	-	< 0.001	-
Ha-CEC	0.0194	3.23	0.0111	3.17	0.0106	3.20
UreaseNat	0.0262	2.93	-	-	-	-
UreasePot	-	-	0.0059	2.76	0.0053	2.77
ForType-Mixed	0.0144	-	0.0734	-	0.0116	-
ForType-Spruce	0.2405	-	0.0211	-	0.2727	-
Position – P	0.0767	-	0.0108	-	0.0023	-
ForTypeMixed:PositionP	0.2205	-	-	-	0.0577	-
ForTypeSpruce:PositionP	0.4432	-	-	-	0.0931	-
ForType	-	13.40	-	3.86	-	10.52
Position	-	3.78	-	1.19	-	3.48
ForType:Position	-	10.55	-	-	-	9.40
AIC / R ²	237.14 /	0.57	235.38	0.55	234.26 /	0.60

Table 5: Model equations for expression of N-NO_3^- and N-NH_4^+ concentrations in soil depending on independent variables S-CEC and Ha-CEC, respectively, and UreasePot, ForType, Position.

$y \sim$	model	Equation
N-NO_3^-	S-CEC + UreasePot + ForType × Position	$3.557 - 0.009654 \times S_{CEC} - 0.0061 \times UreasePot - 0.487 \times ForTypeMixed - 0.934 \times ForTypeSpruce - 1.075 \times PositionP + e^{0.686 \times ForTypeMixed:PositionP + 1.314 \times ForTypeSpruce:PositionP}$
N-NH_4^+	Ha-CEC + UreasePot + ForType × Position	$1.824 + 0.003 \times Ha_{CEC} + 0.0046 \times UreasePot - 0.496 \times ForTypeMixed + 0.261 \times ForTypeSpruce - 0.478 \times PositionP + e^{0.379 \times ForTypeMixed:PositionP + 0.334 \times ForTypeSpruce:PositionP}$

2 ZÁVĚR

Předkládaná disertační práce je vypracována formou publikací postupně zveřejněných v impaktovaných časopisech a zabývá se vlivem organických anorganických látek na proteolytickou aktivitu lesních půd. Z organických látek byly vybrány proteino-genní a neproteino-genní aminokyseliny, fenolické látky, L- a D- kyselina vinná, auxiny, cytokininy a z anorganických látek soli (zasolení půd). V práci je dále publikace zabývající se vlivem velikosti obnovního prvku (kotlíku) na enzymovou aktivitu lesních půd, množství amonného a nitrátového dusíku a mikrobiální biomasy. Práce má dvě „pomyslné“ části. V první části je sledována proteázová aktivita pomocí neupravené metodiky a výsledky odpovídají aktivitě tzv. potencionálních proteáz. V této části byl sledován vliv fenolických látek a kyseliny vinné. Druhá část je věnována aktivitě tzv. nativních proteáz a touto metodou jsou stanovovány vlivy ostatních zájmových látek a vliv obnovních prvků. Pozornost je zaměřena na porosty dubu, buku, smrku a smíšeného lesa. Z pohledu pedologie pak na organické a organominerální, popř. i minerální horizonty a půdní typy kambizem, rendzina a podzol.

Kyselina vinná se spolu s mnoha aminokyselinami řadí mezi nízkomolekulární látky a vyskytuje se ve formě L-a D-enantiomerů. Přítomností enantiomerů kyseliny vinné byl prokázán spíše stimulační vliv na proteázovou aktivitu. Inhibiční efekt se projevil v organickém horizontu buko-dubového porostu, přičemž D-enantiomer inhiboval méně a v organominerálním horizontu (L-enantiomer). Ve většině ostatních výsledků došlo ke stimulaci proteolytické aktivity půd nebo byly výsledky statisticky nevýznamné ($P > 0.05$). Z výsledků je také možno říci, že vliv přídatku kyseliny vinné se nejčastěji projevil v množství 5 a 50 mikrogramů. Kyselina vinná, stejně jako jiné organické kyseliny, je zdrojem dusíku a tudíž mohl poskytnout vhodný substrát pro výživu mikroorganismů, přičemž ti reagovali vyšší sekrecí proteolytických enzymů. (Článek I)

Fenolické látky patří mezi nejrozšířenější sekundární metabolity a mají velký význam v půdách a jsou nedílnou součástí rostlin. Na rozdíl od kyseliny vinné, respektive jejích enantiomerů, byl vliv fenolických látek na proteázovou aktivitu půd převážně inhibiční. V organických a minerálních horizontech kyselina ferulová a kyselina 4-

hydroxybenzoová vyvolaly převážně inhibiči aktivity proteáz. V organominerálních horizontech působily fenolické látky spíše stimulačně, přičemž kyselina ferulová byla jako stimulant účinnější než kyselina 4-hydroxybenzoová. Dostupná literatura uvádí, že fenolické látky negativně ovlivňují činnost extracelulárních enzymů a v dosažených výsledcích je tento negativní trend také pozorovatelný. (Článek II)

Aminokyseliny představují pro mikroorganismy a rostliny snadno dostupný zdroj dusíku a uhlíku pro výživu a růst. Zdroj aminokyselin, které se dostávají do půdy, je poměrně široký a zahrnuje biomasu rostlin, kořenové exudáty nebo produkty a lyzáty mikrobiálních buněk. Celkově byla aktivita nativních půdních proteáz stimulována přidávkem proteinogenních a neproteinogenních aminokyselin. V několika případech došlo také k inhibiči aktivity nativních proteáz. U proteinogenních aminokyselin k tomu došlo u glutamové kyseliny, respektive u jejího D-enantiomeru v organickém horizontu smrkového porostu u půdního typu kambizem. V tomtéž porostu došlo k inhibiči také i u neproteinogenních aminokyselin, a to v organominerálním horizontu a konkrétně inhiboval nativní proteázovou aktivitu L-ornitin a L-citrulin. U výsledků proteinogenních aminokyselin lze také sledovat, že u D-enantiomerů docházelo častěji ke statisticky nevýznamným rozdílům ($P > 0.05$). Tento pozorovaný jev by mohl odpovídat faktu, že D-enantiomery aminokyselin jsou pro mikroorganismy obtížněji mineralizovatelné. (Článek III)

Zasolení půd představuje obtížně řešitelný problém, který se v našich podmínkách týká zemědělských půd při nevhodných agrotechnických opatřeních. V lesním prostředí se solemi a s problémy, které zasolení půd provází, setkáváme hlavně v okolí silnic, které jsou v zimním období udržovány sjízdné pomocí aplikace posypových solí. V půdním prostředí působí soli změnou hydrofyzikálních vlastností půd, způsobují osmotický stres a alkalickou reakci půd. Zkoumané soli způsobily, podle očekávání, inhibiči nativních proteáz. K vyvolání inhibice stačila aplikace 0,5 až 1 mg solí. Byl, ale zjištěn i stimulační vliv na aktivitu nativních proteáz. V těchto několika případech ovšem nejde o pozitivní vliv solí. V těchto několika případech, pravděpodobně došlo k uvolnění proteolytických enzymů z vazeb na koloidních částicích nebo aktivita enzymu ještě nebyla solemi potlačena, zatímco k inhibiči mikrobiální aktivity již došlo. (Článek IV)

Další z organických látek, které ovlivňují aktivitu mikrobiální biomasy, jsou auxiny. Tyto látky, podobně jako proteázy syntetizují a sekretují do svého okolí mikroorganismy a houby a ovlivňují tak jejich aktivitu v rhizosféře. K výzkumu byly vybrány dva syntetické auxiny (1-naphthaleneacetic acid a 2-naphthoxyacetic acid) a dva auxiny, které se v půdním prostředí přirozeně vyskytují (kyselina indole-3-octová a kyselina indole-3-máselná). Výsledky ukazují, že auxiny stimulují nativní proteolytickou aktivitu lesních půd. Vyšší stimulace bylo dosaženo v organických horizontech než v horizontech organominerálních. Když se porovnají jednotlivá stanoviště, tak nejvyšší aktivitu ukazují bukové porosty. Při podobném porovnání v rámci organominerálního horizontu dochází k nejvyšší stimulaci nativních proteáz opět v bukovém porostu, půdní typ rendzina. Dále pak v dubovém porostu, půdní typ kambizem. Naše výsledky nelze s literaturou porovnat, protože podobný výzkum ještě nebyl proveden. Může se poukazovat na vliv bakterií, které auxiny produkují, ve spojitosti se zakořeňováním rostlin a rozvoji jejich kořenového systému. (Článek V)

Cytokininy se, podobně jako auxiny, přirozeně vyskytují a mají zásadní význam při regulaci fyziologických procesů v buňce. Producenti cytokininů se nacházejí převážně v oblasti rhizosféry. K hodnocení vlivu těchto látek jsme vybrali 6-benzylaminopurin a adenin hemisulfate. Spolu s nimi byly testovány chlorocholin chlorid, což je látka používaná jako růstový regulátor rostlin a etephon, což je sloučenina zodpovědná za uvolňování etylenu. Všechny zkoumané látky měly na nativní proteolytickou aktivitu půd inhibiční vliv. Výjimkou byl 6-benzylaminopurin v organickém horizontu dubového porostu s půdním typem kambizem a bukový porost s půdním typem rendzina. V bukovém porostu stimulovaly nativní proteázovou aktivitu oba cytokininy (6-benzylaminopurin a adenin hemisulfate) a etephon, který stimuloval proteázy nejsilněji. Důvod, proč v těchto případech je nativní proteolytická aktivita stimulována, je neznámý. Podobně jako u auxinů nelze výsledky srovnat s literaturou, protože podobný výzkum ještě nebyl proveden. Lze najít jen výsledky vlivu cytokininů na klíčení, kořenovou nodulaci nebo symbiotický vztah s houbami. (Článek VI)

Důležitou roli ve vývoji lesního porostu hrají porostní mezery – „gapy“ (z angl. Gap - mezera), které se vytvořily přirozeně nebo byly uměle vytvořeny hospodářskou činností. Jejich velikost, tvar, prostorová a časová distribuce ovlivňuje půdní i vzdušné mikroklima, světelné poměry apod. a tím i strukturu fytoocenózy, včetně přirozeného zmlazení tedy nově vznikající generace lesa. Studovány byly porosty buku, smrku a smíšený porost, ve kterých se vytvořily porostní mezery o velikosti 0,12 ha a 0,03 ha. Cílem bylo sledovat vliv tohoto porostního prvku na aktivitu enzymů (nativní proteázy, potencionální a nativní ureázy, kataláza), uhlík v mikrobiální biomase, sorpční nasycenost, vliv na půdní reakci, minerální a celkový dusík. Ve smrkovém lese se ukazuje významné ukládání dusíku u obou jeho minerálních forem (amonný, dusičnanový). Byla nalezena významná lineární závislost mezi dusičnanovým dusíkem oproti obsahu bazických kationtů a potencionální ureolytické aktivitě. Dále mezi koncentrací amonného dusíku oproti hydrolytické aciditě a potencionální ureolytické aktivitě. Tyto lineární závislosti jsou charakteristické pro typ porostu a velikosti porostních mezer. Lineární závislost koncentrace dusičnanového dusíku na obsahu bazických kationtů a potencionální ureázy byla negativní, zejména v mateřských porostech. Závislost koncentrace amoniakálního dusíku ve smíšeném porostu a v porostu buku je malá, zatímco v porostech smrku je výrazně pozitivní. Vliv na půdní proteolytickou aktivitu nebyl prokázán. (Článek VII)

3 SUMMARY

Presented PhD thesis has been collated successively and takes the form of individual papers published in impacted journals. It discusses the influence of organic and inorganic compounds on proteolytic activity of forest soils. Selected organic compounds feature proteinogenic and non-proteinogenic amino acids, phenolic compounds, L- and D-tartaric acid, auxins and cytokinins. Selected inorganic substances are represented by salts (representatives of salinisation). The compilation also includes a publication dealing with the influence of size of a regeneration element (gap) on enzymatic activity of forest soils, the amount of ammonium and nitrate nitrogen, and microbial biomass. The work has two notional parts. The first part monitors protease activity by the means of unaltered methodology and the results correspond to the so-called activity of potential proteases. The effect of phenolic compounds, and tartaric acid was monitored in this section. The second part is devoted to the so-called activity of native proteases and used method determines the effects of other substances of interest and the effect of regenerative elements. Attention of this part turns to oak, beech, spruce and mixed forest stands. From the perspective of pedology the main focus is on organic and organomineral, alternatively even mineral, horizons and Cambisol, Rendzina (leptosol) and Spodosol soil types.

Tartaric acid, together with numerous amino acids, belongs to the low-molecular substances and can be found in the form of L- and D-enantiomers. The presence of the enantiomers of tartaric acid had rather stimulatory effect on protease activity. Inhibitory effect was noted in organic layers of beech-oak stands, while the D-enantiomer had a lesser inhibitory effect; similarly (L-enantiomer) in organomineral soil layers. Proteolytic activity of soils was stimulated in the majority of results or else, the results were statistically insignificant ($P > 0.05$). The results can also be interpreted by saying that the effect of tartaric acid addition is most commonly manifested and best visible when the amount of 5 and 50 micrograms is added. Tartaric acid, as well as other organic acids, is a nitrogen source and thus can provide a suitable substrate for nutrition of microorganisms, wherein their imminent reaction was higher secretion of proteolytic enzymes. (Article I)

Phenolics rank among the most common secondary metabolites, are of great importance in soils and are integral to plants. The effect of phenolic compounds on protease activity of soils was predominantly inhibitory, unlike that of tartaric acid and their enantiomers to be more precise. Ferulic acid and 4-hydroxybenzoic acid predominantly induced an inhibitory effect on the activity of proteases in organic and mineral horizons. Phenolics had a rather stimulating effect onto the organomineral horizons, wherein ferulic acid was more effective as a stimulant than 4-hydroxybenzoic acid. The available literature indicates that phenolic compounds affect the activity of extracellular enzymes adversely and this negative trend is also noticeable in past results. (Article II)

Amino acids constitute a readily available source of nitrogen and carbon. They are essential for nutrition and growth of microorganisms and plants. The source of amino acids, which enter the soil, is quite broad and includes plant biomass, root exudates, and lysates or products of microbial cells. Protease activity of native soils was generally stimulated by the addition of proteinogenic and non-proteinogenic amino acids. The activity of native protease was also inhibited in several cases. Firstly, it was noted in the case of glutamic acid and its D-enantiomer to be more precise (proteinogenic amino acids) in the organic horizon of cambisol in spruce stands. Secondly, the same reaction, in the same stands but in organomineral horizon, could also be seen in the case of non-proteinogenic amino acids where protease activity was inhibited by the native L-ornithine and L-citrulline. The results of proteinogenic amino acids also show that D-enantiomer more frequently featured statistically insignificant differences ($P > 0.05$). This observation could be attributable to the fact that the D-enantiomers of amino acids are more difficult to mineralize for microorganisms. (Article III)

Soil salinization represents a hard to solve problem, which in our conditions affects mainly agricultural land managed by unfavourable agro-technical methods. The same issues that accompany salinization in forest management can be encountered mainly in the vicinity of roads, which are kept passable during the winter season with the use of de-icing salts. Characteristic features of soils treated with salt are: change of hydro-physical properties, osmotic stress response and alkaline soil reaction. Examined salts caused, as expected, an inhibition of native proteases. Amounts of 0.5 to 1 mg of salt were sufficient to produce inhibition. A stimulating effect on the activity of native

protease was also detected. However, positive influence of salt in those few cases was probably caused by releasing of proteolytic enzymes from colloidal particle bonds or else the enzymatic activity has not yet been suppressed by salts, whereas the inhibition of microbial activity had already occurred. (Article IV)

Other organic substances that affect the activity of microbial biomass are auxins. These substances, very much alike proteases synthesized and secreted into their environment by microorganisms and fungi and thus influence the activity of the rhizosphere. Two synthetic auxins were selected for the research (1-naphthaleneacetic acid and 2-naphthoxyacetic acid), as well as two auxins, which naturally occur in soil (indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid). The results show that the auxins stimulate the native proteolytic activity of forest soils. Higher stimulation was achieved in organic horizons than organomineral horizons. When individual sites were compared the highest activity was noted beech stands. Similar comparison performed in organomineral horizon lead to the similar outcome with the highest native protease stimulation being in beech stands on Rendzine as well as in oak stands on Cambisol. Our results are incomparable since similar research has not yet been done. The results point towards the influence of bacteria that produce auxin, in connection with rooting of plants and their root system development. (Article V)

Cytokinins, just as auxins, occur naturally and are crucial in regulating physiological processes in a living cell. Cytokinin producers are located mainly in the rhizosphere. Several chosen chemical substances tested the effect on native proteolytic activity of soil: 6-benzylaminopurine and adenine hemisulfate together with chlorocholin chloride, which is a substance used as a plant growth regulator and etephon, which is responsible for the release of ethylene. All the tested compounds showed an inhibitory effect. The only exception was 6-benzylaminopurine in organic horizon of oak stands on Cambisol and beech stands on Rendzine. Both cytokinins (6-benzylaminopurine and adenine hemisulfate) stimulated native protease activity in the beech stands; moreover etephon stimulated the proteases the strongest. The reason why was the native proteolytic activity stimulated in these cases is unknown. Similarly to the auxin results, they cannot be crossreferenced with literature since similar research has not been done. Only the

results of cytokinin influence on germination, root nodulation and symbiotic relationship with fungi can be found. (Article VI)

Forest stand gaps play an important role in the development and growth of forests. They can be of natural or artificial origin - a produce of forest management activity. Their size, shape, spatial and temporal distribution affects soil and air microclimate, light conditions, etc. and thus the structure phytocoenoses including natural regeneration and so emerging forest formations. Beech, spruce and mixed stands were studied, in which gaps of 0.12 ha and 0.03 ha were formed. The objective was to observe the influence of this stand element on enzymatic activity (native proteases, potential and native urease and catalase), microbial biomass carbon, sorption saturation, soil reaction, mineral and total nitrogen. Spruce forest stands exhibit significant deposition of nitrogen in both its mineral forms (ammonium and nitrate). Significant linear relationship between the nitrate nitrogen content and the basic cation content was established as well as between the nitrate nitrogen content and potential ureolytic activity. Another linear relationship forms between the concentration of ammoniacal nitrogen and hydrolytic acidity as well as potential ureolytic activity. These linear dependences are distinctive for different stand types and sizes of forest stand gaps. Linear dependence of nitrate nitrogen concentration on the content of basic cations and potential urease was negative, particularly in parent stands. The dependence of ammonia nitrogen concentration is negative in the mixed and beech stands, whilst it is strongly positive in spruce stands. The effect of forest stand gaps on proteolytic activity was not statistically significant. (Article VII)

4 LITERATURA

ADAMCZYK B., KITUNEN V., SMOLANDER A., 2009. Polyphenol oxidase, tannase and proteolytic activity in relation to tannin concentration in the soil organic horizon under silver birch and Norway spruce. *Soil Biology and Biochemistry* 41. 2085 – 2093.

ADAMCZYK B., SMOLANDER A., KITUNEN V., GODLEWSKI M., 2010. Proteins as nitrogen source for plants: a short story about exudation of proteases by plant roots. *Plant signaling and behavior* 5(7). 817 – 819.

AHEMAD M., KIBRET M., 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University-Science* 26(1). 1 – 20.

AHMAD F., AHMAD I., KHAN M. S., 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research* 168(2). 173 – 181.

ALBURQUERQUE J. A., GONZALVEZ J., GARCIA D., CEGARRA J., 2007. Effects of a compost made from the solid by-product (“alperujo”) of the two phase centrifugation system for olive oil extraction and cotton gin waste on growth and nutrient content of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Bioresource Technology* 98. 940 – 945.

ALKORTA I., AIZPURUA A., RIGA P., ALBIZU I., AMEZAGA I., GARBISU C., 2003 Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. *Reviews on environmental health* 18(1). 65 – 73.

ALLISON S.D., VITOUSEK P. M., 2005. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. *Soil Biology and Biochemistry* 37. 937 – 944.

ALLISON V. J., CONDRON L. M., PELTZER D. A., RICHARDSON S. J., TURNER B. L., 2007. Changes in enzyme activities and soil microbial community composition along carbon and nutrient gradients at the Franz Josef chronosequence, New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry* 39. 1770 – 1781.

AMARA U., KHALID R., HAYAT, R., 2015. Soil bacteria and phytohormones for sustainable crop production. In: Maheshwari D. K. *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem* Springer International Publishing Switzerland. pp. 87 – 103.

- APINE O. A., JADHAV J. P., 2011. Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. *Journal of Applied Microbiology* 110(5). 1235 – 1244.
- ARAGÓN R., SARDANS J., PEÑUELAS J., 2014. Soil enzymes associated with carbon and nitrogen cycling in invaded and native secondary forests of northwestern Argentina. *Plant and Soil* 384. 169 – 183.
- BACA B. E., ELMERICH C., 2007. Microbial production of plant hormones. In *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations*. Springer Netherlands. pp. 113 – 143.
- BAIS H. P., PARK S. W., WEIR T. L., CALLAWAY R. M., VIVANCO J. M., 2004 How plants communicate using the underground information super highway. *Trends in Plant Science* 9. 26 – 32.
- BARNARD A. M. L., SALMOND G. P. C., 2007. Quorum sensing in *Erwinia* species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387. 415 – 423.
- BARTEL B., LE CLERE S., MAGIDIN M., ZOLMAN B. K., 2001. Inputs to the Active Indole-3-Acetic Acid Pool: De Novo Synthesis, Conjugate Hydrolysis, and Indole-3-Butyric Acid-oxidation. *Journal of Plant Growth Regulation* 20. 198 – 216.
- BASHAN Y., HOLGUIN G., 1997. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). *Canadian Journal of Microbiology* 43. 103 – 121.
- BAUHUS J., 1996. Carbon and nitrogen mineralization in an acid forest soil along a gap-stand gradient. *Soil Biology and Biochemistry* 28. 923 – 932.
- BAUSENWEIN U., GATTINGER A., LANGER U., EMBACHER A., HARTMANN H. P., SOMMER M., MUNCH J. C., SCHLOTTER M., 2008. Exploring soil microbial communities and soil organic matter: variability and interactions in arable soils under minimum tillage practice. *Applied Soil Ecology* 40. 67 – 77.
- BEALES N., 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3. 1 – 20.

- BEIER R. C., 1990. Natural pesticides and bioactive components in foods. In *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer, New York. pp. 47 – 137.
- BŁOŃSKA E., LASOTA J., 2014. Biological and biochemical properties in evaluation of forest soil quality. *Folia Forestalia Polonica, series A* 56 (1). 23 – 29.
- BOLTON N. W., D'AMATO A. W., 2011. Regeneration responses to gap size and coarsewoody debris within natural disturbance-based silvicultural systems innortheastern Minnesota, USA. *Forest Ecology and Management* 262. 1215 – 1222.
- BONKOWSKI M., 2004. Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. *New Phytologist* 162. 617 – 631.
- BREINER J., GIMENO B. S., FENN M., 2007. Calculation of theoretical and empirical nutrient N critical loads in the mixed-conifer ecosystems of southern California. *Scitific World Journal* 7. 198 – 205.
- BRÍGIDO C., GLICK B. R., 2015. Phytoremediation using rhizobia. In: Ansari et al. *Phytoremediation*. Springer International PublishingSwitzerland. Vol. 2, p. 95 – 114.
- BURNS R. G., DE FOREST J. L., MARXSEN J., SINSABAUGH R. L., STROMBERGER M. E., WALLENSTEIN M. D., WEINTRAUB M. N., ZOPPINI A., 2013. Soil enzymes in a changing environment: current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry* 58. 216 – 234.
- CARREIRO M. M., SINSABAUGH R. L., REPERT D. A., PARKHURST D. F., 2000. Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. *Ecology* 81. 2359 – 2365.
- CASAGRANDE D.J., 1974. Geochemistry of amino acids in some Florida peat accumulations-I. Analytical approach and total amino acid concentrations. *Geochimistry Cosmochimistry Acta* 38, 419 – 434.
- CASAGRANDE D.J., GIVEN P.H., 1980. Geochemistry of amino acids in some Florida peat accumulation-II. Amino acid distributions. *Geochimistry Cosmochimistry Acta* 44. 1493 – 1507.
- CASSÁN F., VANDERLEYDEN J., SPAEPEN, S., 2014. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria

(PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation* 33(2). 440 – 459.

COSTACURTA A., VANDERLEYDEN J., 1995. Accumulation of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 21(1). 1 –1 8.

DICK R.P., 1997. Soil Enzyme Activities as Integrative Indicators of Soil Health. In: Pankhurst C. E. et al. *Biological Indicators of Soil Health*, CABI Publishing. USA.

DICK W. A., TABATABAI M. A., 1987. Kinetics and activities of phosphatase-clay complexes. *Soil Science* 143. 5 – 15.

DUCA D., LORV J., PATTEN C. L., ROSE D., GLICK, B. R., 2014. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106(1). 85 – 125.

DUO-CHUAN L., 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161. 345 – 360.

EGAMBERDIEVA D., RENELLA G., WIRTH S., ISLAM R., 2010. Secondary salinity effects on soil microbial biomass. *Biology and fertility of soils* 46(5). 445 – 449.

EKSCHMITT K., LIU M. Q., VETTER S., FOX O., WOLTERS V., 2005. Strategies used by soil biota to overcome soil organic matter stability e why is dead organic matter left over in the soil? *Geoderma* 128. 167 – 176.

ETESAMI H., ALIKHAN, H. A., HOSSEINI H. M., 2015. Indole-3-acetic acid and 1-aminocyclopropane-1-carboxylatedeaminase: Bacterial traits required in rhizosphere, rhizoplane and/or endophytic competence by beneficial bacteria. In MAHESHWARI D. K. *Bacterial metabolites in sustainable agroecosystem*. Springer International Publishing Switzerland. Vol 12, pp. 183 – 258.

FAHEY T. J., HUGHES J. W., PU M., ARTHUR, M. A., 1988. Root decomposition and nutrient flux following whole-tree harvest of northern hardwood forest. *Forest Science*. 34(3). 744 – 768.

FENN M. E., GEISER L., BACHMAN R., BLUBAUGH T. J., BYTNEROWICZ A., 2007. Atmospheric deposition inputs and effects on lichen chemistry and indicator species in the Columbia River Gorge, USA. *Environmental Pollution* 146. 77 – 91.

- FIERER N., SCHIMEL J. P., 2003. A proposed mechanism for the pulse in carbon dioxide production commonly observed following the rapid rewetting of a dry soil. *Soil Science Society of America Journal* 67. 798 – 805.
- FRAZER D. W., MCCOLL J. G., POWERS R. F., 1990. Soil nitrogen mineralization in a clearcutting chronosequence in a northern California conifer forest. *Soil Science Society of America Journal* 54(4). 1145 – 1152.
- FRIEDMAN M., 1999. Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47. 3457 – 3479.
- FUKA M. M., ENGEL M., HAGN A., MUNCH J. C., SOMMER M., SCHLOTTER M. 2009. Changes of diversity pattern of proteolytic bacteria over time and space in an agricultural soil. *Microbial ecology* 57(3). 391 – 401.
- GALHIDY L., MIHOK, B., HAGYO A., RAJKAI K., STANDOVAR T., 2006. Effects of gap size and associated changes in light and soil moisture on the understorey vegetation of a Hungarian beech forest. *Plant Ecology* 183. 133 – 145.
- GARCIA C., HERNANDEZ T. 1996. Influence of salinity on the biological and biochemical activity of a calciorthird soil. *Plant and Soil* 178. 255 – 263.
- GARCÍA DE SALOME I.E., HYNES R.K., NELSON L.M., 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of Microbiology* 47. 404 – 411.
- GEISSELER D., HORWATH W. R., 2008. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. *Soil Biology and Biochemistry* 40. 3040 – 3048.
- GEISSELER D., HORWATH W. R., 2009. Relationship between carbon and nitrogen availability and extracellular enzyme activities in soil. *Pedobiologia* 53(1). 87 – 98.
- GERZE A., OMAI D., GUVENILIR Y., 2005. Partial purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis* and *Bacillus megatherium*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 121 – 124. 335 – 45

- GHOLLARATA M., RAIESI F., 2007. The adverse effects of soil salinization on the growth of *Trifolium alexandrinum* L. and associated microbial and biochemical properties in a soil from Iran. *Soil Biology and Biochemistry* 39. 1699 – 1702.
- GLENN A. R., BOTH G. W., MCLNNES J. L., MAY B. K., ELLIOTT W. H., 1973. Dynamic state of the messenger RNA pool specific for extracellular protease in *Bacillus amyloliquefaciens*: its relevance to the mechanism of enzyme secretion. *Journal of molecular biology* 73(2). 221 – 230.
- GLICK B. R., 2012. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Hindaw iPublishing Corporation, Scientifica 2012. 1 – 15.
- GOSWAMI D., THAKKER J. N., DHANDHUKIA P. C., 2015. Simultaneous detection and quantification of indole-3-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) produced by rhizobacteria from L-tryptophan (Trp) using HPTLC. *Journal of Microbiological Methods* 110. 7 – 14.
- GROSSMANN K., 2010. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science* 66. 113 – 120.
- GUANGMING L., XUECHEN Z., XIUPING W., HONGBO S., JINGSONG Y., XIANGPING W., 2017. Soil enzymes as indicators of saline soil fertility under various soil amendments. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 237. 274 – 279.
- GUPTA S., SETH R., SHARMA A., 2016. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Play a Role as Phytostimulators for Sustainable Agriculture. In *Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture*. Springer Singapore. 475–493.
- HAGEMANN M., 2011. Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *Fems Microbiology Reviews* 35(1). 87 – 123.
- HALLIDAY K. J., MARTÍNEZ-GARCÍA J. F., JOSSE E. M., 2009. Integration of light and auxin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biology* 1. 1 – 17.
- HANIF A., YASMEEN A., RAJOKA M. I. 2004. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 94(3). 311 – 319.

HARTLEY R. D., WHITEHEAD D. C., 1985. Phenolic acids in soils and their influence on plant growth and soil microbial processes. In Vaughan D. Soil Organic Matter and Biological Activity. Junk Publishers, Dordrecht, 1985. chap. 3.

HASBULLAH H., MARSCHNER P. 2015. Residue properties influence the impact of salinity on soil respiration. *Biology and fertility of soils* 51(1). 99 – 111.

HAYES T. D., 2002. Ecosystem consequences of forest fragmentation in the Pacific Northwest: biogeochemical edge effects within old-growth forest remnants. Ph.D. Dissertation, University of California, Berkeley, CA. p. 276.

HERNÁNDEZ D. L., HOBBIÉ S. E., 2010 The effects of substrate composition, quantity, and diversity on microbial activity. *Plant and Soil* 335. 397 – 411.

HEYNDRICKX M., 2011. The importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing. *Applied and Environmental Soil Science* 2011. 1 – 11.

HINTZ W. D., RELYEA R. A. 2017. Impacts of road deicing salts on the early-life growth and development of a stream salmonid: Salt type matters. *Environmental Pollution* 223. 409 – 415.

HMELO L. R., MINCER T. J., VAN MOOY B. A. S., 2011. Possible influence of bacterial quorum sensing on the hydrolysis of sinking particulate organic carbon in marine environments. *Environmental Microbiology Reports* 3. 682 – 688.

HÖGBERG M. N., HÖGBOM L., KLEJA D. B., 2013. Soil microbial community indices as predictors of soil solution chemistry and N leaching in *Picea abies* (L.) Karst. forests in S. Sweden. *Plant and soil* 372(1-2). 507 – 522.

HOLÍK L., 2010. Proteolytická aktivita v půdě: metodické aspekty a vliv managementu horských ekosystémů. Diplomová práce, 61 s.

HOLÍK L., VRANOVÁ V., REJŠEK K., 2016. Vliv proteinogenní a neproteinogenních aminokyselin na nativní proteasovou aktivitu lesních půd. *Chemické Listy* 110. 812 – 817.

- HOPE G. D., PRESCOTT C. E., BLEVINS L. L., 2003. Responses of available soil nitrogen and litter decomposition to openings of different sizes in dry interior Douglas-fir forests in British Columbia. *Forest Ecology Management*. 186. 33 – 46.
- HUNT M. A., TRUEMAN S. J., RASMUSSEN A., 2011. Indole-3-butyric acid accelerates adventitious root formation and impedes shoot growth of *Pinu selliottii* var. *elliottii* 3 *P. caribaea* var. *Hondurensis* cuttings. *New Forests* 41. 349 – 360.
- HUSSAIN S., SIDDIQUE T., SALEEM M., ARSHAD M., KHALID A., 2009. Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions. *Advances in Agronomy* 102. 160 – 190.
- CHANG W. T., CHEN Y. C., JAO C. L., 2007. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresource Technology* 98. 1224 – 1230.
- CHEN H., HARMON M. E., SEXTON J., FASTH B., 2002. Fine-root decomposition and N dynamics in coniferous forests of the Pacific Northwest, USA. *Canadian Journal of Forest Research* 32(2). 320 – 331.
- CHENG F., PENG X., ZHAO P., YUAN J., ZHONG C., 2013. Soil Microbial Biomass, Basal Respiration and Enzyme Activity of Main Forest Types in the Qinling Mountains. *PLoS ONE* 8(6). e67353.
- CHESSON A., STEWERT C. S., AND WALLACE R. J., 1982. Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 44(3). 597 – 603.
- CHOWDHURY N., MARSCHNER P., BURNS R. G., 2011. Soil microbial activity and community composition: impact of changes in matric and osmotic potential. *Soil Biology and Biochemistry* 43(6). 1229 – 1236.
- JAN M. T., ROBERTS P., TONHEIM S. K., JONES D. L., 2009. Protein breakdown represents a major bottleneck in nitrogen cycling in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 41. 2272 – 2282.

- JU J., XU S., WEN J., LI G., OHNISHI K., XUE Y., MA Y., 2009. Characterization of endogenous pyridoxal 5'-phosphate dependent alanine racemase from *Bacillus pseudofirmus* OF4. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107. 225 – 229.
- KALISZ H. M., 1988. Microbial proteinases. *Advanced Biochemistry Engineering Biotechnology* 36. 1 – 65.
- KAMENEVA S. V., MURONETS, E. M., 1999. Genetic control of processes of bacterial interactions with plants in associations. *Genetika* 35(11). 1480 – 1494.
- KANDELER E., LUXHOI J., TSCHERKO D., MAGID J., 1999. Xylanase, invertase and protease at the soil-litter interface of a loamy sand. *Soil Biology and Biochemistry* 31. 1171 – 1179.
- KANDELER E., PALLI S., STEMMER M., GERZABEK M. H., 1999. Tillage changes microbial biomass and enzyme activities in particle-size fractions of a Haplic Chernozem Soil *Biology and Biochemistry* 31. 1253 – 1264.
- KANERVA S., KITUNEN V., LOPONEN J., SMOLANDER A., 2008. Phenolic compounds and terpenes in soil organic horizon layers under silver birch, Norway spruce and Scots pine. *Biology and Fertility of Soils* 44(4). 547 – 556.
- KARACA A., CEMA C. C., TURGAY O. C., KIZILKAYA R., 2011. Soil Enzymes as Indicator of Soil Quality. - In: Varma G. A. *Soil Enzymology, Soil Biology* . Springer-Verlag Berlin Heidelberg, USA. P. 22.
- KHALILI B., NOURBAKHSH F., NILI N., KHADEMI H., SHARIFNABI B., 2011. Diversity of soil cellulase isoenzymes is associated with soil cellulase kinetic and thermodynamic parameters. *Soil Biology and Biochemistry* 43(8). 1639 – 1648.
- KIM S. Y., KANG H., 2008. Effects of elevated CO₂ on below-ground processes in temperate marsh microcosms. *Hydrobiologia* 605. 123 – 130.
- KRAVCHENKO L. V., AZAROVA T. S., MAKAROVA N. M., TIKHONOVICH I. A. 2004. *Mikrobiologiya*. vol. 73, 2. pp. 195 – 198.
- KUMAR A., SACHDEV A., BALASUBRAMANYAM S. D., SAXENA A. K., 2002. Optimization of conditions for production of neutral and alkaline protease from species of *Bacillus* and *Pseudomonas*. *Indian Journal of Microbiology* 42(3). 233 – 236.

- KUMAR C. G., TIWARI M. P., JANY K. D., 1999. Biosynthesis, processing, and stability of Protease. *Proceseding Biochemistry* 34. 441 – 449.
- KUREPIN L. V., ZAMAN M., PHARIS R. P., 2014. Phytohormonal basis for the plant growth promoting action of naturally occurring biostimulators. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(9). 1715 – 1722.
- KUZYAKOV Y., XU X., 2013. Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance. *New Phytologist* 198(3). 656 – 669.
- LADD J. N., JACKSON R. B., 1982. Biochemistry of ammonification. In: Stevenson F. J. *Nitrogen in Agricultural Soil*. American Society of Agronomy, USA. pp. 173 – 227.
- LANDI L., RENELLA G., GIAGNONI L., NANNIPIERI P., 2011. Activities of proteolytic enzymes. In: Dick, R.P. (Ed.), *Methods of Soil Enzymology*. Soil Science Society of America, Madison, USA. pp. 247 – 273.
- LI X., HAN S., GUO Z., SHAO D., XIN L., 2010. Changes in soil microbial biomass carbon and enzyme activities under elevated CO₂ affect fine root decomposition processes in a Mongolian oak ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* 42. 1101 – 1107.
- LICHTER A., MANULIS S., SAGEE O., GAFNI Y., GRAY J., MEILAN R., MORRIS R.O., BARASH I., 1995. Production of cytokinins by *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* and isolation of a locus conferring cytokinin biosynthesis. *Molecular Plant Microbe Interaction* 8. 114 – 121.
- LIN N., BARTSCH N., HEINRICHS S., VOR T., 2015. Long-term effects of gap creation and lime application on element input and output in a European beech (*Fagus sylvatica* L.) forest. *Soil Science and Plant Nutrition* 61(2). 249 – 258.
- LIU E., YAN C., MEI X., HE W., BING S. H., DING L., 2010. Long-term effect of chemical fertilizer, straw, and manure on soil chemical and biological properties in Northwest China. *Geoderma* 158. 173 – 180.
- LOHAR D.P., SCHAFF J.E., LASKEY J.G., KIEBER J.J., BILYEU K.D., BIRD D.Mc.K., 2004. Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and rhizobial symbioses. *Plant Journal* 38. 203 – 214.

- LUDWIG-MÜLLER J., 2000. Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulation* 32. 219 – 230.
- LUGTENBERG B., KAMILOVA F., 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* 63. 541 – 556.
- LUGTENBERG B. J., MALFANOVA N., KAMILOVA F., BERG G., 2013. Plant growth promotion by microbes. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*. Wiley, Hoboken, p. 561 – 573.
- LYNN D. G., CHANG M., 1990. Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development. *Annual Review of Plant Biology* 41(1). 497 – 526.
- MALHOTRA M., SRIVASTAVA S., 2009. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *European Journal of Soil Biology* 45. 73 – 80.
- MALLIK A. U., 1997. Effect of phenolic compounds on selected soil properties. *Forest Ecology and Management* 92(1-3). 11 – 18.
- MARTEWS T. R., BURSLEM D. F. R. P., PATON S. R., YANYUEZ F., MULLINS C. E., 2008. Soil drying in a tropical forest: three distinct environments controlled by gap size. *Ecological Modelling* 216. 369 – 384.
- MARTÍNEZ-MORALES L. J., SOTO-URZÚA L., BACA B. E., SÁNCHEZ-AHÉDO J. A., 2003. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters* 228. 167 – 173.
- MCSTEEN P., 2010. Auxin and monocot development. *Cold Spring Harb Perspect Biology* 2. 1 – 27
- MICHEL K., MATZNER E. 2003. Response of enzyme activities to nitrogen addition in forest floors of different C-to-N ratios. *Biology and Fertility of Soils* 38(2). 102 – 109.
- MOE L. A., 2013. Aminoacids in the rhizosphere: from plants to microbes. *American Journal of Botany* 100(9). 1692 – 1705.
- MOLE B. M., BALTRUS D.A., DANGL J. L., GRANT S. R., 2007. Global virulence Regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends Microbiology* 15. 363 – 371.

- MONTAGNINI, F., JORDAN, C.F., 2005. Tropical Forest Ecology: the Basis for Conservation and Management. Springer, 42 p.
- NANZIPIERI P., 2006. Role of stabilised enzymes in microbial ecology and enzyme extraction from soil with potential applications in soil proteomics. *Nucleic Acids and Proteins in Soil* 8. 75 – 94.
- NANZIPIERI P., KANDELER E., RUGGIERO P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns R. G. and Dick R. P. *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*. Marcel Dekker, New York. Pp. 1 – 33.
- NÉMETH K., BARTELS H., VOGEL M., MENGEL K., 1988. Organic nitrogen compounds extracted from arable and forest soils by electro-ultrafiltration and recovery rates of amino acids. *Biology Fertility of Soils* 5. 271 – 275.
- NIEROP K. G. J., PRESTON C. M., VERSTRATEN J. M., 2006. Linking the B ring hydroxylation pattern of condensed tannins to C, N and P mineralization. A case study using four tannins. *Soil Biology and Biochemistry* 38. 2794 – 2802
- NISHA G., SUMATHY J. H. V., 2014. Isolation, production and characterization of protease from *Bacillus subtilis* isolated from soil. *Discovery* 17(49), 36 – 44.
- O'DOWD R. W., HOPKINS D. W., 1998. Mineralization of carbon from D- and L-amino acids and D-glucose in two contrasting soils. *Soil biology and biochemistry* 30(14). 2009 – 2016.
- OLIVERA N. L., PRIETO L., CARRERA A. L., CISNEROS H. S., BERTILLER M. B. 2014. Do soil enzymes respond to long-term grazing in an arid ecosystem? *Plant and soil* 378(1-2). 35 – 48.
- ONA O., VAN IMPE J., PRINSEN E., VANDERLEYDEN J., 2005. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp. 245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiology Letters* 246. 125 – 132
- PALIWAL N., SINGH S. P., GARG S. K., 1994. Cation-induced thermal stability of an alkaline protease from a *Bacillus* sp. *Bioresource Technology* 50. 209 – 11.

- PAN C. C., LIU C. A., ZHAO H. L., WANG Y. 2013. Changes of soil physico-chemical properties and enzyme activities in relation to grassland salinization. *European Journal of Soil Biology* 55. 13 – 19.
- PANG X. Y., BAO W. K., ZHU B., CHENG W. X., 2013. Responses of soil respiration and its temperature sensitivity to thinning in a pine plantation. *Agricultural and Forest Meteorology* 171–172. 57 – 64.
- PANG X., HU B., BAO W., DE OLIVEIRA VARGAS T., TIAN, G., 2016. Effect of thinning-induced gap size on soil CO₂ efflux in a reforested spruce forest in the eastern Tibetan Plateau. *Agricultural and Forest Meteorology* 220. 1 – 9.
- PARSONS W. F., KNIGHT D. H., MILLER S. L., 1994. Root gap dynamics in lodgepole pine forest: nitrogen transformations in gaps of different size. *Ecological Applications* 4(2). 354 – 362.
- PARSONS W. F., MILLER S. L., KNIGHT D. H., 1994. Root-gap dynamics in a lodgepole pine forest: ectomycorrhizal and nonmycorrhizal fine root activity after experimental gap formation. *Canadian Journal of Forest Research* 24(8). 1531 – 1538.
- PATHAK H., RAO D. L. N., 1998. Carbon and nitrogen mineralization from added organic matter in saline and alkali soils. *Soil Biology and Biochemistry* 30(6). 695 – 702.
- PATIL M., SHASTRI N. V., 1985. Purification and properties of proteases produced by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, regulation of production by fructose. *Journal of Biosciences* 9(1-2). 1 – 11.
- PATTEN C. L., GLICK B.R., 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3- acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* 42(3). 207 – 220.
- PENG Y., THOMAS S. C., 2006. Soil CO₂ efflux in uneven-aged managed forests: temporal patterns following harvest and effects of edaphic heterogeneity. *Plant and Soil* 289. 253 – 264.
- PHILLIPS K. A., SKIRPAN A. L., LIU X., CHRISTENSEN A., SLEWINSKI T. L., HUDSON C. ., 2011. Vanishing tassel 2 encodes a grass specific tryptophan aminotransferase required for vegetative and reproductive development in maize. *Plant Cell* 23. 550 – 566.

- PÖLL V., DENK U., SHEN H. D., PANZANI R. C., DISSERTORI O., LACKNER P., HEMMER W., MARI A., CRAMERI R., LOTTSPEICH F., RID R., RICHTER K., BREITENBACH M., SIMON-NOBBE B., 2009. The vacuolar serine protease, a cross-reactive allergen from *Cladosporium herbarum*. *Molecular immunology* 46. 1360 – 1373.
- PRASHAR P., KAPOOR N., SACHDEVA S., 2014. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 13(1). 63 – 77.
- PRESCOTT C. E., HOPE G. D., BLEVINS L. L., 2003. Effect of gap size on litter decomposition and soil nitrate concentrations in a high-elevation spruce fir forest. *Canadian Journal of Forest Research* 33(11). 2210 – 2220.
- PRITHIVIRAJ B., BAIS H. P., WEIR T., SURESH B., NAJARRO E. H., DAYAKAR B. V., SCHWEIZER H. P., VIVANCO J. M., 2005. Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. *Infection and immunity* 73. 5319 – 5328.
- QUALLS R.G., HAINES B.L., 1991. Geochemistry of dissolved organic nutrients in water percolating through a forest ecosystem. *Soil Science Society of America Journal* 55. 1112 – 1123.
- QUIQUAMPOIX H., BURNS R. G., 2007. Interactions between proteins and soil mineral surfaces: environmental and health consequences. *Elements* 3. 401 – 406.
- RAHMAN R. N. Z. R. A., BASRI M., SALLEH A. B., 2003. Thermostable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1; nutritional factors affecting protease production. *Annals of Microbiology* 53(2). 199 – 210.
- RAHOUTI M., SEIGLE-MURANDI F., STEIMAN R., ERIKSSON, K. E., 1989. Metabolism of ferulic acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 55(9). 2391 – 2398.
- RATH K. M., ROUSK J. 2015. Salt effects on the soil microbial decomposer community and their role in organic carbon cycling: a review. *Soil Biology and Biochemistry* 81. 108 – 123.

- READ J. J., JENSEN E. H., 1989. Phytotoxicity of water-soluble substances from alfalfa and barely soil extracts on four crop species. *Journal of chemical ecology* 15(2). 619 – 628.
- REDFIELD R. J., 2002. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends in Microbiology* 10. 365 – 370.
- REJSEK K., FORMANEK P., PAVELKA M., 2008. Estimation of protease activity in soils at low temperatures by casein amendment and with substitution of buffer by demineralized water. *Amino Acids* 35. 411 – 417.
- RENELLA G., LANDI L., MINA J. M. G., GIAGNONI L., NANNIPIERI P., 2011. Microbial and hydrolase activity after release of indoleacetic acid and ethylene–polyamine precursors by a model root surface. *Applied Soil Ecology* 47. 106 – 110.
- RIETZ D. N., HAYNES R. J., 2003. Effects of irrigation-induced salinity and sodicity on soil microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry* 35. 845 – 854.
- RUDENSKAYA G. N., PUPOV D. V., 2008. Cysteine proteinases of microorganisms and viruses. *Biochemistry* 73. 1 – 13.
- SAKAKIBARA H., KASAHARA H., UEDA N., KOJIMA M., TAKEI K., HISHIYAMA S., ASAMI T., OKADA K., KAMIYA Y., YAMAYA T., YAMAGUCHI S., 2005. *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proc Natl Acad Sci USA* 102. 9972 – 9977.
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ L., SERRA N. S., MARINA M. L., CREGO A. L., 2013. Enantiomeric separation of free L- and D-amino acids in hydrolyzed protein fertilizers by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(21). 5022 – 5030.
- SARDANS J., PEÑUELAS J., ESTIARTE M., 2008. Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. *Applied Soil Ecology* 39(2). 223 – 235.
- SAVIOZZI A., CARDELLI R., DI PUCCIO R., 2011. Impact of salinity on soil biological activities: a laboratory experiment. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 42. 358 – 367.

- SCOTT J. C., GREENHUT I. V., LEVEAU, J. H., 2013. Functional characterization of the bacterial *iac* genes for degradation of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Journal of Chemical Ecology* 39(7). 942 – 951.
- SEIDEL C., WALZ A., PARK S., COHEN J. D., LUDWIG-MULLER J., 2006. Indole-3-acetic acid protein conjugates: Novel players in auxin homeostasis. *Plant Biology* 8. 340 – 345.
- SERGEEVA E., LIAIMER A., BERGMAN B., 2002. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta* 215. 229 – 238.
- SHANK E. A., KOLTER R., 2009. New developments in microbial interspecies signaling. *Current Opinion in Microbiology* 12. 205 – 214.
- SHANKAR S., RAO M., LAXMAN S., 2011. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. *Process biochemistry* 46(2). 579 – 585.
- SHIVANAND P., JAYARAMAN G., 2009. Production of extracellular protease from halotolerant bacterium. *Bacillus aquimaris* strain VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochemistry* 44. 1088 – 1094.
- SHOKRI D., EMTIAZI G., 2010. Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by taguchi design. *Current Microbiology* 61. 217 – 225.
- SCHARENBRUCH B. C., BOCKHEIM J. G., 2007. Impacts of forest gaps on soil properties and processes in old growth northern hardwood-hemlock forests. *Plant and Soil* 294. 219 – 233.
- SCHICKANEDER E., HÖSEL W., ELTZ H. V., GEUB U., 1988. Casein-resorufin, a new substrate for a highly sensitive protease assay. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 330(4). 360 – 360.
- SCHIMEL J. P., WEINTRAUB M. N., 2003. The implications of exoenzyme activity on microbial carbon and nitrogen limitation in soil: a theoretical model. *Soil Biology and Biochemistry* 35. 549 – 563.

- SIDARI M., RONZELLO G., VECHIO G., MUSCOLO A., 2008. Influence of slope aspects on soil chemical and biochemical properties in a *Pinus laricio* forest ecosystem of Aspromonte (Southern Italy). *European Journal of Soil Biology* 44(4). 364 – 372.
- SIMS G. K., WANDER M. M., 2002. Proteolytic activity under nitrogen or sulfur limitation. *Applied Soil Ecology* 19. 217 – 221.
- SINGH J. S. D. K., 2005. Available Nitrogen and Arginine Deaminase Activity in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Fields after Imidacloprid, Diazinon, and Lindane Treatments. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 53. 363 – 368.
- SINGH S. K., SINGH S. K., TRIPATHI V. R., KHARE S. K., GARG S. K., 2011. A novel psychrotrophic, solvent tolerant *Pseudomonas putida* SKG-1 and solvent stability of its psychro-thermoalkalstable protease. *Process Biochemistry* 46. 1430 – 1435.
- SINSABAUGH R. L., 1994. Enzymatic analysis of microbial pattern and processes. *Biology and Fertility of Soils* 17. 69 – 74.
- SOLTANI A. A., KHAVAZI K., ASADI-RAHMANI H., OMIDVARI M., DAHAJI P. A., MIRHOSEYNI H., 2010. Plant growth promoting characteristics in some *Flavobacterium* spp. isolated from soils of Iran. *Journal of Agricultural Science* 2(4). 106 – 115.
- SPAEPEN S., VANDERLEYDEN J., 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in Biology* 3(4). a001438.
- SPAEPEN S., VANDERLEYDEN J., 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in Biology* 3(4). 1 – 13.
- SPAEPEN S., VANDERLEYDEN J., REMANS R., 2007. Indole- 3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Review* 31. 425 – 448.
- SPIES T.A., 1991. Plant species diversity and occurrence in young, mature, and oldgrowth Douglas-fir stands in western Oregon and Washington. In: Ruggiero L.F. et al. *Wildlife and Vegetation of Unmanaged Douglas-fir forests*. USDA Forest Service, General Technical Report PNW-GTR-285, Portland, OR. pp. 91 – 110.
- SRIVASTAVA L.M., 2002. *Plant growth and development: hormones and environment*. Academic, San Diego.

- STIRK W. A., VAN STADEN J., 2010. Flow of cytokinins through the environment. *Plant Growth Regulation* 62(2). 101 – 116.
- STURSOVA M., SINSABAUGH R. L., 2008. Stabilization of oxidative enzymes in desert soil may limit organic matter accumulation. *Soil Biology and Biochemistry* 40. 550 – 553.
- SUOMINEN K., KITUNEN V., SMOLANDER A., 2003. Characteristics of dissolved organic matter and phenolic compounds in forest soils under silver birch (*Betula pendula*), Norway spruce (*Picea abies*) and Scots pine (*Pinus sylvestris*). *European Journal of Soil Science* 54(2). 287 – 293.
- SUZUKI S., HE Y., OYAZU H., 2003. Indole-3-acetic acid production in *Pseudomonas fluorescens* HP72 and its association with suppression of creeping bentgrass brown patch. *Current Microbiology* 47(2). 138 – 143.
- SVENNERSTAM H., GANETEG U., BELLINI C., NÄSHOLM T., 2007. Comprehensive screening of *Arabidopsis* mutants suggests the Lysine, Histidine Transporter 1 to be involved in plant uptake of amino acids. *Plant Physiology* 143. 1856 – 1860.
- SZAJDAK L., ÖSTERBERG R., 1996. Amino acids present in humic acids from soils under different cultivations. *Environment International* 22. 331 – 334.
- TABATABAI M. A., 1994 Soil enzymes. In: WEAVER R. W. et al. *Methods of soil analysis, part 2, microbiological and biochemical properties*. SSSA Book Series 5, Madison. Pp. 775 – 833.
- TANG J., QI Y., XU M., MISSON L., GOLDSTEIN A. H., 2005. Forest thinning and soil respiration in a ponderosa pine plantation in the Sierra Nevada. *Tree Physiology* 25. 57 – 66.
- TAO Y., FERRER J., LJUNG K., POJER F., HONG F., LONG J. A., MORENO J. E., BOWMAN M. E., IVANS L. J., CHENG Y., LIM J., ZHAO Y., BALLARE C. L., SANDBERG G., NOEL J., CHORY J., 2008. Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133. 164 – 176.

- TEJADA M., GONZALEZ J. L., 2005. Beet vinasse applied to wheat under dryland conditions affects soil properties and yield. *European Journal of Agronomy* 23. 336 – 347.
- THARAYIL N., SUSEELA V., TRIEBWASSER D. J., PRESTON C. M., GERARD P. D., DUKES J. S., 2011. Changes in the structural composition and reactivity of *Acer rubrum* leaf litter tannins exposed to warming and altered precipitation: climatic stress-induced tannins are more reactive. *New Phytology* 191. 132 – 145.
- THIEL A. L., PERAKIS S. S., 2009. Nitrogen dynamics across silvicultural canopy gaps in young forests of western Oregon. *Forest ecology and management* 258(3). 273 – 287.
- TIAN B., YANG J., LIAN L., WANG C., LI N., ZHANG K. Q., 2007. Role of an extracellular neutral protease in infection against nematodes by *Brevibacillus laterosporus* strain G4. *Applied microbiology and biotechnology* 74. 372 – 380.
- TIAN D. -L., PENG Y. -Y., YAN W. -D., FANG X., KANG W. -X., WANG G.-J., CHEN X.-Y., 2010. Effects of thinning and litter fall removal on fine root production and soil organic carbon content in masson pine plantations. *Pedosphere* 20. 486 – 493.
- TOKUYAMA S., 2001. Discovery and application of a new enzyme N-acylamino acid racemase. *Journal of Molecular Catal B: Enzymatic* 12. 3 – 14.
- TRIEBWASSER D. J., THARAYIL N., PRESTON C. M., GERARD P. D., 2012. The susceptibility of soil enzymes to inhibition by leaf litter tannins is dependent on the tannin chemistry, enzyme class and vegetation history. *New Phytology* 196. 1122 – 1132.
- TROMAS A., PERROT-RECHENMANN C., 2010. Recent progress in auxin biology. *Comptes Rendus Biologies* 333(4). 297 – 306.
- TSAVKELOVA E. A., KLIMOVA S. Y., CHERDYNTSEVA T. A., & NETRUSOV A. I., 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied biochemistry and microbiology* 42(2). 117 – 126.
- TSAVKELOVA E. A., KLIMOVA S. Y., CHERDYNTSEVA T. A., NETRUSOV A. I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42(2). 117 – 126.

- UGGLA C., MORITZ T., SANDBERG G., SUNDBERG B., 1996. Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(17). 9282 – 9286.
- UTOBO E. B., TEWARI L., 2015. Soil enzymes as bioindicators of soil ecosystem status. *Applied Ecology and Environmental Research* 13. 147 – 169.
- VAN MOOY B. A. S., HMELO L. R., SOFEN L. E., CAMPAGNA S. R., MAY A. L., DYHRMAN S. T., HEITHOFF A., WEBB E. A., MOMPEN L., MINCER T. J., 2012. Quorum sensing control of phosphorus acquisition in *Trichodesmium* consortia. *ISME Journal* 6. 422 – 429.
- VERHEYEN K., BAETEN L., DE FRENNE P., 2012. Driving factors behind the eutrophication signal in understory plant communities of deciduous temperate forests. *Journal of Ecology* 100. 352 – 365.
- VODRÁŽKA, Z., 1996. *Biochemie*. 2. vyd. Praha, Academia, 186 s. ISBN 80-200-0600-1.
- VON BODMAN S. B., WILLEY J. M., DIGGLE S. P., 2008. Cell-cell communication in bacteria: united we stand. *Journal of Bacteriology* 190. 4377 – 4391.
- VRANOVA V., REJSEK K., FORMANEK P., 2013. Proteolytic activity in soil: A review. *Applied Soil Ecology* 70. 23 – 32.
- VRANOVA V., REJSEK K., SKENE K. R., FORMANEK P., 2011. Non-protein amino acids: plant, soil and ecosystem interactions. *Plant and Soil* 342(1-2). 31 – 48.
- VRANOVA V., ZAHRADNICKOVA H., JANOUS D., SKENE K. R., MATHARU A. S., REJSEK K., FORMANEK P., 2012. The significance of D-amino acids in soil, fate and utilization by microbes and plants: review and identification of knowledge gaps. *Plant and Soil* 354(1-2). 21 – 39.
- WALLENSTEIN M. D., HADDIX M. L., LEE D. D., CONANT R. T., PAUL E. A., 2012. A litter-slurry technique elucidates the key role of enzyme production and microbial dynamics in temperature sensitivity of organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* 47. 18 – 26.

- WALLENSTEIN M. D., WEINTRAUB M. N., 2008. Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biology and Biochemistry* 40. 2098 – 2106.
- WANG V. N. L., DALAL R. C., GREENE R. S. B., 2008 Salinity and sodicity effects on respiration and microbial biomass of soil. *Biology and Fertility of Soils* 44. 943 – 953
- WEINTRAUB M. N., SCHIMEL J. P., 2005. Seasonal protein dynamics in Alaskan arctic tundra soils. *Soil Biology and Biochemistry* 37. 469 – 1475.
- WENIG K., CHATWELL L., VON PAWEL-RAMMINGEN U., BJÖRCK L., HUBER R., SONDERMANN P., 2004. Structure of the streptococcal endopeptidase IdeS, a cysteine proteinase with strict specificity for IgG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(50). 17371 – 17376.
- WERDIN-PFISTERER N. R., KIELLAND K., BOONE R. D., 2009. Soil amino acid composition across a boreal forest successional sequence. *Soil Biology and Biochemistry* 41(6). 1210 – 1220.
- WILKINSON A., HILL P. W., FARRAR J. F., JONES D. L., BARDGETT R. D., 2014. Rapid microbial uptake and mineralization of amino acids and peptides along a grassland productivity gradient. *Soil Biology and Biochemistry* 72. 75 – 83.
- WONG V. N., GREENE R. S. B., DALAL R. C., MURPHY B. W., 2010. Soil carbon dynamics in saline and sodic soils: a review. *Soil Use and Management* 26(1). 2 – 11.
- WOODWARD A. W., BARTEL B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95(5). 707 – 735.
- YAN N., MARSCHNER P., CAO W., ZUO C., QIN W. 2015. Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research* 3(4). 316 – 323.
- YANG S. S., LEE C. M., 2001. Effect of culture media on protease and oxytetracycline production with mycelium and protoplasts of *Streptomyces rimosus*. *World Journal Microbiology Biotechnology* 17. 403 – 410.
- YANG X., LIU J., MCGROUTHER K., HUANG H., LU K., GUO X., HE L., LIN X., CHE L., YE Z., 2016. Effect of biochar on the extractability of heavy metals (Cd, Cu, Pb, and Zn)

and enzyme activity in soil. *Environmental Science Pollution Research* 23(2). 974 – 984.

YEGIN S., FERNANDEZ-LAHOPE M., SALGADO A. J. G., GUVENC U., GOKSUNGUR Y., TARI, C., 2011. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Applied microbiology and biotechnology* 89(4). 949 – 960.

ZHANG L., TEN HAGEN K. G., 2011. The cellular microenvironment and cell adhesion: a role for O-glycosylation. *Biochemical Society Transactions* 39. 378 – 382.

ZU Y. -G., WANG W. -J., WANG H. -M., LIU W., CUI S., KOIKE T., 2009. Soil CO₂ efflux, carbon dynamics, and change in thermal conditions from contrasting clear-cut sites during natural restoration and uncut larch forests in northeastern China. *Climate Change* 96. 137 – 159.

ZÚÑIGA A., POUPIN M. J., DONOSO R., LEDGER T., GUILIANI N., GUTIÉRREZ R. A., GONZÁLEZ B. 2013. Quorum sensing and indole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26(5). 546 – 553.