

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Ověření vlivu rozpustných fenolických látek na aktivitu
extracelulárních enzymů v rašeliníštích**

Diplomová práce

Bc. Lucie Kovářová

Vedoucí práce: RNDr. Zuzana Urbanová Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Tomáš Hájek Ph.D.

České Budějovice

2018

Kovářová L. (2018): Ověření vlivu rozpustných fenolických látek na aktivitu extracelulárních enzymů v rašeliništích. [Verification of the influence of the soluble phenolic compounds on extracellular enzymes activities in peatlands. Mgr. Thesis, in Czech.] –74 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The aim of the study was to verify the influence of the soluble phenolic compounds on the activity of extracellular enzymes. We tested the effect of aerobic and anaerobic conditions and addition of soluble phenolic compounds on potential activity of extracellular enzymes in two laboratory experiments. The results showed, that potential activities of oxidative extracellular enzymes such as phenol oxidase and peroxidase did not decline in anaerobic incubations, and have no oxygen requirement. Potential activities of hydrolytic enzymes was not inhibited by phenolic compounds and are oxygen related or have no oxygen relationship. No negative relationship between hydrolytic enzymes and phenolic compounds was observed. In summary, our results do not support the “enzymatic latch” hypothesis.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce.

Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 12. 12. 2018

Lucie Kovářová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Zuzaně Urbanové Ph.D. za odborné vedení a věcné připomínky při psaní mé diplomové práce, a za veškeré věcné rady a připomínky při četných konzultacích. Dále bych chtěla velice poděkovat mému konzultantovi RNDr. Tomáši Hájkovi Ph.D. za velkou pomoc při vedení a zpracování experimentu v laboratoři. Oběma pak děkuji za trpělivost, předané zkušenosti a podporu, bez které by tato práce nevznikla.

Obsah

1	Úvod do problematiky a cíle	1
2	Literární přehled	3
2.1	Fenolické látky	3
2.1.1	Nízkomolekulární rozpustné fenolické látky	6
2.1.2	Polyfenolické rozpustné látky	6
2.2	Extracelulární enzymy	9
2.2.1	Fenolytické oxidativní enzymy	11
2.2.2	Hydrolytické enzymy	12
2.3	Dekompozice v rašeliništích	14
2.4	„Enzymic latch“ teorie	16
2.5	Shrnutí	20
2.6	Cíle práce	21
2.7	Hypotézy	21
3	Materiál a metody	22
3.1	Odběr a příprava materiálu pro laboratorní inkubační experimenty	22
3.1.1	Odběr substrátu a jeho příprava	22
3.1.2	Odběr a příprava roztoku fenolických látek z rašelinné vody	23
3.1.3	Odběr a příprava mikrobiálního inokula	23
3.1.4	Příprava roztoků živin	24
3.2	Rozvržení experimentů	25
3.2.1	Laboratorní inkubační experiment s plným přídatkem živin	25
3.2.2	Laboratorní inkubační experiment s částečným přídatkem živin	26
3.3	Měření a stanovení potenciální produkce CO ₂	28
3.3.1	Stanovení aktivity enzymů	29
3.3.1.1	Příprava vzorků	29
3.3.1.2	Stanovení aktivity hydrolytických enzymů	29
3.3.1.3	Stanovení aktivity oxidativních enzymů	29
3.3.2	Stanovení koncentrace fenolických látek	30
3.4	Statistické vyhodnocení dat	30
4	Výsledky	32
4.1	Laboratorní inkubační experiment s plným přídatkem živin	32
4.1.1	Aktivita hydrolytických enzymů	34

4.1.2	Aktivita oxidativních enzymů	38
4.2	Laboratorní inkubační experiment s částečným přídatkem živin	42
4.2.1	Aktivita hydrolytických enzymů	44
4.2.2	Aktivita oxidativních enzymů	49
5	Diskuze.....	55
5.1	Vliv aerobních a anaerobních podmínek na aktivitu oxidativních enzymů	55
5.2	Vliv aerobních a anaerobních podmínek na aktivitu hydrolytických enzymů	57
5.3	Změny koncentrací rozpustných fenolických látek v průběhu inkubace.....	57
5.4	Vliv rozpustných fenolických látek na aktivitu enzymů	58
5.5	Vliv fenolických látek na mikrobiální respiraci	60
6	Závěr.....	61
7	Literatura	63
	Přílohy.....	73

Seznam zkratek

C	uhlík
CO ₂	oxid uhličitý
H ₂ O	voda
HMW	fenolické látky jejichž molekulová hmotnost > 14 kDa
CH ₄	metan
LMW	fenolické látky jejichž molekulová hmotnost < 14 kDa
M _w	<i>molecular weight</i> , molekulová hmotnost
N	dusík
O ₂	kyslík
P	fosfor
PerOx	peroxidáza
PhOx	fenoloxidáza
TA	<i>tannic acid</i> , kyselina tříslová
TDN	<i>total dissolved nitrogen</i> , celkový obsah dusíku
TOC	<i>total organic carbon</i> , celkové množství organického uhlíku

1 Úvod do problematiky a cíle

Rašeliniště jsou terestrické mokřadní biotopy s velmi pomalou rychlostí dekompozice rostlinné organické hmoty. Výsledkem tohoto jevu je uložení částečně rozloženého organického materiálu ve formě rašeliny. Pro rašeliniště je charakteristická celá řada cévnatých rostlin, avšak dominujícími rostlinami jsou mechorosty rodu rašeliník (*Sphagnum spp.*). Opad (odumřelá biomasa) rašeliníků je jednou z hlavních složek, která přispívá k hromadění rašeliny pravděpodobně i kvůli jejich nesnadné rozložitelnosti, a to především v subboreálních a v boreálních rašeliništích.

Součástí opadu v rašeliništích tvoří nerozpustné a rozpustné fenolické látky, které souhrnně patří k nejrozšířenějším sekundárním metabolitům rostlin. Předmětem studie této diplomové práce jsou rozpustné fenolické látky, kterých je v rostlinách pouze několik málo procent. Předpokládá se, že tyto fenolické látky mají výrazný vliv na mechanismus rozkladu organické hmoty. Nepříznivé environmentální podmínky prostředí rašelinišť jako je především kyselé a vodou nasycené půdní prostředí znesnadňují jejich rozklad, což může vést k jejich akumulaci v ekosystému. Předpokládá se, že zvýšené koncentrace fenolických látek v rašeliništi mohou přispívat ke zpomalené dekompozici organické hmoty. Z toho důvodu jsou fenolické látky také dávány do souvislosti s ukládáním a toky uhlíku v rašelinných ekosystémech. Při rozkladu těchto látek se uplatňují extracelulární enzymy, vylučované především mikrobiálními společenstvy hub a bakterií. Rozklad fenolických látek v rašeliništích probíhá za pomoci oxidativních enzymů. Předpokládá se, že fenolické látky mohou být rozkládány právě pouze oxidativními enzymy v aerobních podmínkách, jejichž aktivita je v převládajícím anaerobním prostředí rašelinišť významně omezena (Freeman et al., 2001; 2004). Naopak, hydrolytické enzymy pracují jak v aerobním a anaerobním prostředí, avšak hromadění fenolických látek pravděpodobně snižuje nebo dokonce inhibuje jejich aktivitu (Appel, 1993; Freeman et al., 2001; Fenner & Freeman, 2011). Tento mechanismus je považován za hlavní řídicí faktor akumulace uhlíku v rašeliništích, avšak mnoho následujících studií jej nepodpořilo.

Není stále zcela jasně vysvětleno, čím je horší rozložitelnost rašeliníků ve srovnání s cévnatými rostlinami rašelinišť způsobena. Jedním z vysvětlení je, že jsou tyto mechy

bohaté na fenolické látky, které pravděpodobně přispívají k pomalé rychlosti dekompozice (Aerts et al., 2001). V důsledku jejich hromadění, a tím rostoucí koncentraci v půdě, dochází ke zpomalení mikrobiální dekompozice, a tedy toku uhlíku, jiných prvků a živin (Fenner & Freeman, 2011; Min et al., 2015). Nicméně neexistuje shoda o příčinách odolnosti těchto rostlin vůči dekompozici a do jaké míry je hromadění opadu řízeno vlastnostmi prostředí rašelinišť.

Cílem této diplomové práce je otestování takzvané teorie enzymatické smyčky (Freeman et al., 2001), která předpokládá že v důsledku nízké dostupnosti O₂ je potlačena aktivita oxidativních enzymů, což vede ke zvyšování koncentrace rozpustných fenolických látek, které mají schopnost se navázat na hydrolytické enzymy a inhibovat tak jejich funkci. Avšak některé nedávné studie tuto teorii nepotvrdily a ukázaly, že výrazný vliv na aktivitu oxidativních enzymů může mít vegetační složení, dostupnost živin, pH či teplota (Pinsonneault et al., 2016; Romanowicz et al., 2015; Williams et al., 2000; Wilson et al., 2016).

2 Literární přehled

2.1 Fenolické látky

Fenolické látky jsou široce rozšířenou skupinou přírodních sloučenin výhradně rostlinného charakteru (Cates & Rhoades, 1977). Jsou produkovány jako sekundární metabolity za účelem ochrany rostliny před stresem jako je herbivorie, mikrobiální infekce, ultrafialové záření nebo nízká dostupnost živin. Sekundární metabolity rostlin jsou strukturně i chemicky mnohem různorodější než primární metabolity a obsahují látky, které sice nejsou přímo nutné pro základní fotosyntetický nebo respirační aparát, nýbrž pro prosté přežití rostlin (Lattanzio, 2013). Všeobecně vykazují fenolické látky antioxidační a antibakteriální vlastnosti – z toho důvodu je jejich aplikace rozšířená především v potravinářském průmyslu (Hättenschwiler & Vitousek, 2000; Lattanzio, 2013).

Obecně jsou fenolické látky složeny nejméně z jednoho aromatického jádra nesoucí jednu nebo více hydroxylových funkčních skupin. Rozdělit je lze například na základě rozpustnosti ve vodě či podle molekulové hmotnosti. Na základě rozpustnosti ve vodě rozlišujeme dvě hlavní formy fenolických látek, a to nerozpustný polymer lignin a jeho deriváty a rozpustné jednoduché a oligomerní sloučeniny (Hättenschwiler & Vitousek, 2000). Fenolické látky v rašeliništích tvoří důležitou součást jak nerozpustných, tak rozpustných forem organického uhlíku. Lze je dále rozdělit na základě molekulové hmotnosti do dvou velkých skupin a to na – látky s nižší molekulovou hmotností ($M_w < 500$ Da) – většinou jde o jednodušší látky jako je například *p*-hydroxyacetofenon zařadit sem lze také rozvětvenější fulvonové kyseliny a látky s vyšší molekulovou hmotností ($M_w < 500$ Da) – oligomerní a polymerní fenolické látky – taniny, chinony a huminové kyseliny.

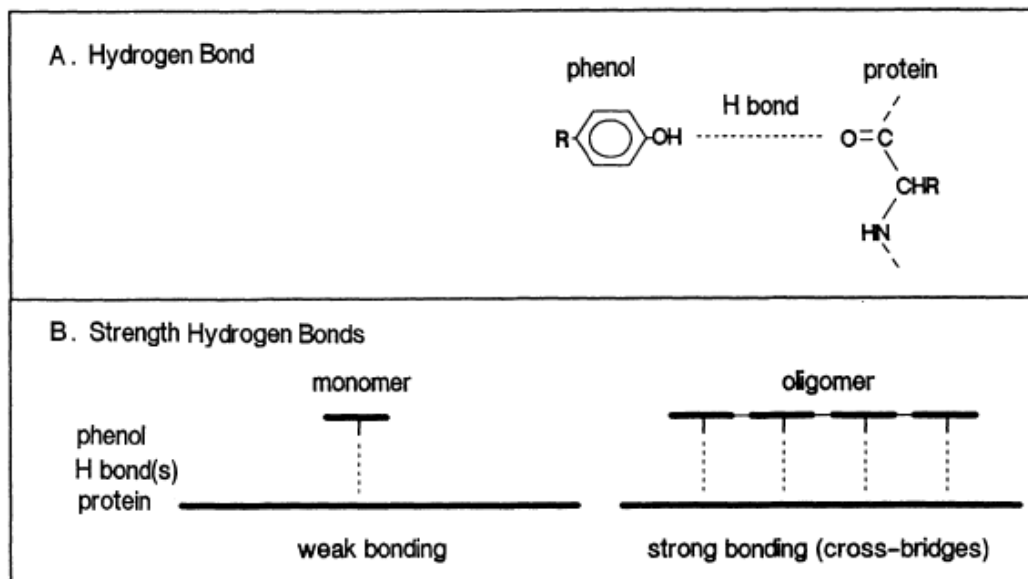
Do půdy se fenolické látky dostávají rozkladem organické hmoty nadzemní a podzemní části rostlin, avšak mohou být do půdního prostředí pasivně vylučovány také skrze kořenové exsudáty, kde se s nimi můžeme setkat ve formě flavonoidů a isoflavonoidů (Lattanzio, 2013; Rice, 1984). V závislosti na jejich koncentraci nebo molekulové hmotnosti mohou podporovat anebo omezovat růst mikrobiálních hub a bakterií či dokonce mohou ovlivňovat složení a aktivitu celého mikrobiálního

společenstva a ovlivňovat tím míru rozkladu a tím také dostupnost živin v půdě (Delaux et al., 2013; Lattanzio, 2013; Souto et al., 2000). Na jejich rozkladu se podílejí především houby z třídy Basidiomycetes a Ascomycetes ale také některé bakterie například z rodu *Pseudomonas* (Min et al., 2015). Degradovány jsou oxidativními enzymy, konkrétněji fenoloxidázami, peroxidázami, mangan-peroxidázami, lignin-peroxidázami a lakázami. Pro rašeliniště jsou typické a rozšířené spíše první dva zmíněné oxidativní enzymy (Min et al., 2015).

V půdě se fenolické látky vyskytují v rozpuštěné formě, která se volně pohybuje v půdním roztoku (tj. nízkomolekulární fenolové kyseliny či některé taniny). Také se mohou fenolické látky vyskytovat v sorbované formě, která se reverzibilně váže na částice půdy nebo proteiny či v polymerizované formě. Ta obsahuje huminové látky, z nichž má každá schopnost sorpce na půdní hmotu prostřednictvím hydrofobních, vodíkových a iontových vazeb (Appel, 1993; Min et al., 2015). Relativně stabilními látkami v půdě jsou huminové kyseliny, jež jsou vytvářeny polymerizací fenolických sloučenin, často s dalšími fenolickými látkami. Ovšem fenolické látky jsou schopny vytvářet komplexy také s celou řadou organických dusíkatých sloučenin jako jsou proteiny, nukleové kyseliny či s některými polysacharidy, například s chitinem (Kraus et al., 2003; Lattanzio, 2013).

Fenolické látky mají schopnost navázat se na některé enzymy a inhibovat tak jejich aktivitu. Pokud dojde k jejich spojení, molekula enzymu se „zablokuje“ a vytvoří se komplex fenolická látka–enzym. (Bull, 1970; Freeman et al., 2001; Handley, 1954). Freeman et al. (2004) uvádí, že už velmi nízké koncentrace fenolických látek ($2\text{--}5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) snižují aktivitu hydrolytických enzymů, jakými byly vybrané testované enzymy; β -glukosidáza, fosfatáza, sulfatáza, chitináza a xylosidáza, a to o 18-47 %. Inhibice enzymatického rozkladu fenolickými látkami může nastat několika způsoby (Min et al., 2015):

- i) tvorbou kovalentních vazeb s látkami proteinového charakteru (enzymy, nukleové kyseliny)
- ii) oxidací jednoduchých fenolických látek vedoucí k tvorbě složitějších fenolických molekul
- iv) vytvořením vodíkové vazby a komplexu fenolická látka-enzym (viz. Obr. 1)



Obr. 1. Schopnost fenolických látek tvořit vodíkovou vazbu s proteiny v závislosti na molekulové hmotnosti a počtu vodíkových vazeb (Field & Lettinga, 1992).

A. Umístění vodíkové vazby mezi hydroxylovou skupinou fenolu a karbonylovou skupinou peptidového proteinu.

B. Úloha vodíkových vazeb na síle interakce tanin-protein. Nízká interakce fenolický monomer-protein. Vysoká interakce oligomerní tanin-protein.

Tvorbě komplexu fenolická látka-enzym podléhají nejvíce oligomerní taniny (Obr. 1). Silná vodíková vazba se tvoří mezi fenolickou hydroxylovou skupinou a kyslíkem peptidické vazby proteinu–enzymu. Schopnost tvorby tohoto komplexu vzrůstá s počtem fenolických hydroxylových skupin a do určité velikosti molekuly s počtem fenolických jednotek v polymeru. Naopak jednoduché monomerní fenolické látky obsahují málo hydroxylových skupin navázaných na molekule, a proto mají obecně nízkou afinitu k proteinům a jim příbuzným polyamidům (Field & Lettinga, 1992; Lattanzio, 2013).

Důležité je zmínit, že každá fenolická látka má vůči každému enzymu jinou afinitu – jinými slovy inhibice konkrétní fenolickou látkou závisí na koncentraci dané fenolické látky (Field & Lettinga, 1992). Tento fakt ukazuje studie Goldstein & Swain (1965), kde byl studován vliv kyseliny tříslové ($M_w = 1701$ Da) na enzymy v koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Byla pozorována úplná inhibice laktátdehydrogenázy, ale pouze 41 % inhibice peroxidázy kyselinou tříslovou o koncentraci $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Goldstein & Swain, 1965). Řádově nižší koncentrace $0,12 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ pak zcela inhibovala malátdehydrogenázu a isocitrátdehydrogenázu (Firenzuoli et al., 1969).

2.1.1 Nízkomolekulární rozpustné fenolické látky

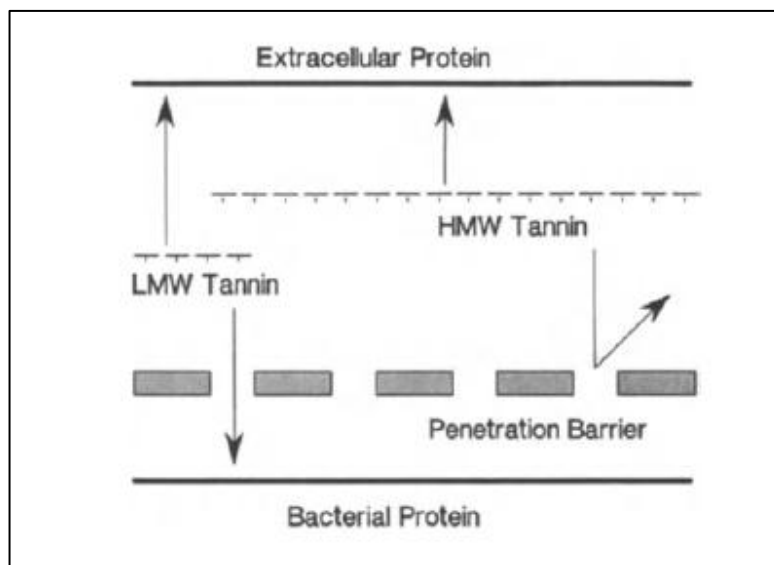
Do skupiny nízkomolekulárních fenolických látek patří fenolové kyseliny – například kyselina vanilová, k. *p*-hydroxybenzoová nebo k. *p*-kumarová. Ty se běžně nachází v opadu mechu rašeliníku (Mellegård et al., 2009; Min et al., 2015). Jsou to látky s nízkou molekulovou hmotností (<1000 Da), z nichž ovšem mnohé mají antibakteriální a antifungální účinky právě v důsledku nízké molekulární hmotnosti, tedy malé velikosti, která jim umožňuje pronikání do mikrobiálních buněk. Při vyšších koncentracích působí toxicky na tyto organismy zevnitř, čímž potlačují sekreci enzymů (Field & Lettinga, 1992). Vlivem nízké molekulové hmotnosti mohou být volně se nacházející rozpustné formy fenolických látek degradovány na jednodušší, asimilovatelné formy, než jsou jejich sorbované nebo polymerizované formy a působit tak jako vhodný zdroj uhlíku (Min et al., 2015). Nízkomolekulární fenolické látky a některé taniny mohou sloužit jako substrát podporující růst mikroorganismů, čímž pozitivně působí na dekompozici (Fierer et al., 2001). Naopak nepříznivými účinky na rozklad může v rašelinistích působit kyselina sphagnová ($M_w = 222$ Da) (*p*-hydroxy- β -[karboxymetyl]-skořicová kyselina) (Verhoeven & Liefveld, 1997). Kyselina sphagnová je v rašelinistích široce rozšířenou fenolickou látkou. Rudolph & Samland (1985) uvádějí extrakcí přítomnost kyseliny sphagnové u všech třiceti studovaných druhů rašeliníků. Minimální inhibiční efekt u této kyseliny byl zaznamenán při extrémně vysoké koncentraci $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, která se v rašelinistích pravděpodobně přirozeně nevyskytuje (Mellegård et al., 2009).

2.1.2 Polyfenolické rozpustné látky

Na základě molekulové hmotnosti lze polyfenolické rozpustné látky rozdělit na látky s nižší molekulovou hmotností na oligomery (500–3 000 Da) a na polymery s vyšší molekulovou hmotností (> 3 000 Da). V literatuře se oligomery často rozdělují na fulvonové a huminové kyseliny, do polyfenolických látek se řadí také taniny a chinony (Hättenschwiler & Vitousek, 2000). Rozpustné polyfenolické látky jsou důležitými regulátory půdních procesů stejně tak jako dekompozice a toku živin, kdy mohou například inhibovat proces nitrifikace a omezovat tím dostupnost dusíku (Baldwin et al., 1983; Horner et al., 1988; Rice & Pancholy, 1973). Charakteristická pro je pro ně tvorba

komplexu s proteiny čili jejich významný vliv na aktivitu enzymů. V důsledku imobilizace proteinů (enzymů) se tedy předpokládá, že s rostoucí molekulovou hmotností těchto komplexů klesá jejich šance na rozklad fenolických látek. Značný počet sorpčních míst v polyfenolické molekule dokáže také zadržovat kationty Ca, Mg a mikroživiny Al, Cu, Fe, Mn za vzniku organických komplexů (Zimmerman & Ahn, 2011).

Osud těchto látek může mít v půdě rašelinišť různou podobu – mohou být rozloženy a mineralizovány jako zdroj uhlíku heterotrofními organismy či mohou být pomocí polymeračních a kondenzačních reakcí půdních organismů přeměněny na hůře rozložitelné huminové látky či v některých případech dokonce až na nerozpustné formy. Také mohou být absorbovány na jílovité minerály nebo vytvářet cheláty s ionty železa a hliníku (sesquioxidy) či mohou setrvávat v systému jako součást rozpuštěného organického uhlíku (Hättenschwiler & Vitousek, 2000). Jedinečným rysem vysoce hydroxylovaných fenolů je jejich způsob vzniku – často se přeměňují oxidační polymerizací na látky s vysokou molekulovou hmotností. K polymerizaci dochází při neenzymatické reakci, známé jako „autooxidace“, ovšem k tomuto kroku je zapotřebí alkalické nebo neutrální pH prostředí (Field & Lettinga, 1992). Při nižších hodnotách pH, může být polymerizace zpočátku zprostředkována působením oxidačních enzymů, jako je tyrosináza, lakáza či peroxidáza (Sjoblad & Bollag, 1981). Bylo prokázáno, že proces autoxidace nebo oxidace fenolických monomerů na oligomery fenoloxidázami zvyšuje jejich inhibiční vlastnosti vůči enzymům, houbám a metanogenním bakteriím (Field et al., 1989; Oku, 1960). Pokud jsou toxické oligomerní sloučeniny taninů polymerizovány na huminové sloučeniny s vysokou molekulovou hmotností, mají nižší šanci pronikat do buněk mikroorganismů, a také nižší schopnost působit tak na ně přímo toxicky (viz. obr. 2). Zde ovšem závisí na stavbě a tvaru mikrobiální buňky. Například maximální molekulová hmotnost taninu schopného vniknout do buňky metanogenní bakterie je odhadována na přibližně 3000 Da (Field et al., 1990).



Obr. 2. Schopnost taninu v pronikání do mikrobiálních buněk v závislosti na molekulové velikosti:
 LMW = nízkomolekulární tanin; HMW = vysokomolekulární tanin (Field & Lettinga, 1992).

Taniny

Jedná se o skupinu vysoce hydroxylovaných rozpustných fenolických sloučenin s molekulovou hmotností pohybující se přibližně v rozmezí 500–3000 Da (Lattanzio, 2013). Rozdělují se na hydrolyzované a kondenzované taniny. Hydrolyzované taniny se skládají ze sacharidu, na který je esterifikací navázáno několik monomerních skupin kyseliny gallové (často nazývané také jako gallotaniny) nebo hexahydroxydifenové kyseliny, nazývané jako ellagitaniny (Dai & Mumper, 2010). Kondenzované taniny jsou monomery flavonových jednotek, označované jako proantokyanidy (Paul, 2007). Hydrolyzované taniny mají vysoký předpoklad k tomu tvořit komplexy s proteiny. Konkrétním příkladem může být zcela běžný zástupce opadu kyselina tříslová ($M_w = 1701$ Da), která je mimo jiné vlivem polymerizačních reakcí prekurzorem mnoha fulvonových kyselin (Gianfreda & Bollag 1994).

Fulvonové kyseliny

Fulvonové kyseliny řadíme do frakcí humózních sloučenin vyznačující se nižší molekulovou hmotností 0,3–2 kDa, nižším stupněm polymerace a jsou rozpustné ve vodě nezávisle na pH (Reddy & DeLaune, 2008; Zavarzina, 2011). Podle polyfenolové teorie vznikají polymerací nejprve fulvonové kyseliny, dále huminové kyseliny, a nakonec nerozpustné huminy (Stevenson, 1994).

Humínové kyseliny

Humínové kyseliny jsou vysoce polymerizované humózní sloučeniny o molekulové hmotnosti 5–100 kDa, které mají ve svých molekulách více aromatických jader, cyklických dusíkatých struktur a také více alifatických a peptidových zbytků (Paul, 2007; Reddy & DeLaune, 2008). Vznikají polymerizací nízkomolekulárních rozpustných fenolických sloučenin a to buď (1) polyfenolickou oxidační vazbou s dusíkatými sloučeninami a dalšími rozpustnými prekurzory (polyfenolová teorie) či (2) kondenzací cukru a aminokyseliny (Maillardova reakce) (Zavarzina, 2011). Jsou rozpustné v zásaditých roztocích, avšak jejich rozpustnost se snižujícím pH klesá. V anaerobních podmínkách rašelinišť mají humínové látky odolnost vůči rozkladu, a proto zde hrají důležitou roli při ukládání uhlíku a živin (Reddy & DeLaune, 2008). Humínové kyseliny mají oproti fulvonovým kyselinám větší obsah C, N, avšak méně O, což svědčí o jejich vyšší stupni přeměny a komplexování s ostatními organickými látkami (Haider, 1992).

2.2 Extracelulární enzymy

Extracelulární enzymy patří mezi biologicky produkované látky, proteiny, které zprostředkovávají degradaci živočišných a rostlinných látek mimo buněčný prostor. Obecně fungují jako katalyzátory v široké škále reakcí a procesů, jako je rozklad a tvorba organických látek, stabilizace struktury půdy či mineralizace půdní organické hmoty (Dick et al., 1994). Význam enzymů spočívá v katalyzaci počátečních reakcí katabolismu, tj. rozkladné děje či procesy, při nichž ze složitějších látek vznikají látky jednodušší, jež mohou být asimilovány a spotřebovány mikroorganismy. Z pohledu fungování ekosystému jsou enzymy zprostředkovateli rozkladu a stojí za produkcí rozpuštěného organického uhlíku, jehož jsou rozpustné formy fenolických látek součástí, ale také třeba za mineralizací N či P. V půdním prostředí se extracelulární enzymy aktivně sekretují do okolí mikrobními houbami a bakteriemi ale také kořeny rostlin (Bakshi & Varma, 2011). Z obecného hlediska je tedy v rozkladných procesech schopnost mikrobních rozkladačů nenahraditelná, a to právě z důvodu produkce a sekrece extracelulárních enzymů, které vstupují do půdního matrixu, kde fungují jako biokatalyzátory při rozkladu. Spolu s mikroorganismy jsou enzymy nepochybně esenciálními články dekompozice.

Klasifikace a funkce vybraných enzymů

Vzhledem k obrovskému množství enzymů a jejich široké škále reakcí, byla pro lepší přehled zavedena nomenklaturická kategorizace (*Enzyme Commission number*), jež je dělí do základních šesti tříd – oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy a ligázy. Tato klasifikace pramení z charakteru katalyzované reakce. Enzymy jsou často velmi specifické a obvykle katalyzují konkrétní chemickou reakci, při níž dochází k přeměně substrátu na produkt. Nicméně existují i nespecifické enzymy, které katalyzují širší spektrum chemických reakcí, často se jedná o třídu hydroláz (Chróst & Siuda, 2002).

Pozornost této práce se zaměřuje na extracelulární oxidativní enzymy degradující fenolické látky a hydrolytické enzymy nacházející se v rašeliništích. Fenolytické oxidativní enzymy můžeme rozdělit na oxygenázy a peroxidázy, tedy podle toho, zda je jejich akceptorem elektronů molekulární kyslík či peroxid vodíku. V rašeliništích najdeme rozšířené především fenoloxidázy a peroxidázy. Ty spojuje degradace nerozpustných forem fenolických látek (lignin, lignolytické deriváty) a rozpustné formy fenolických sloučenin (Min et al., 2015). Předpokládá se, že tyto dvě skupiny enzymů jsou jako jedny z mála schopny degradovat rozpustné a nerozpustné formy fenolických sloučenin, a že účinně pracují za aerobních podmínek. Proto je jejich aktivita spojována spíše s provzdušněnou vrstvou rašeliny (Freeman et al., 2004; Baldrian & Šnajdr, 2011). Na druhou stranu, hydrolytické enzymy pracují jak za aerobních, tak anaerobních podmínek a patří sem celá řada enzymů spojených s cyklem C, N, P a jiných prvků a živin. Příkladem může být chitináza, fosfatáza, sulfatáza či β -glukosidáza.

Mechanismus a kinetika enzymových reakcí

Mechanismus enzymových reakcí spočívá v relativně malé části enzymu, v takzvaném aktivačním centru. Toto místo obsahuje funkční skupiny, které mají schopnost reagovat s molekulou substrátu. Dojde-li ke vhodné orientaci enzymu a molekuly substrátu, je substrát v aktivním místě vázán a vzniká komplex enzym–substrát.

Pro vyjádření aktivity enzymů se používá veličina katalytická účinnost enzymu. Jde o stanovení aktivity enzymu na základě rychlosti, jakou enzym katalyzuje přeměnu substrátu na produkt, v určitém časovém intervalu. Katalytickou účinnost považujeme za aktivační energii, která se postupně snižuje v průběhu procesu chemické reakce. Pro stanovení rychlosti reakce je nutné znát počáteční rychlost na základě koncentrace

substrátu. Základním principem kinetiky enzymových reakcí je rovnice Michaelis-Mentenové, která popisuje jak se rychlost jednoduché enzymatické reakce (V) mění spolu s koncentrací substrátu (S). V_{max} představuje maximální rychlost dosaženou vlivem nasycení koncentrace substrátu. Konstanta K_m se rovná koncentraci substrátu, při které je počáteční rychlost reakce rovna právě polovině maximální rychlosti. Současně tato konstanta představuje afinitu substrátu k enzymu při nenasyčené koncentraci (Triebwasser-Freese et al., 2015).

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

2.2.1 Fenolytické oxidativní enzymy

Fenoloxidázy (EC 1.14.18.1)

Fenoloxidázy (PhOx) patří do skupiny enzymů schopných oxidovat fenolické látky od jednoduchých aromatických látek až po komplexní polyfenoly. Výsledkem je buď částečná oxidace, a tedy uvolňování oxidačních meziproductů či úplná degradace, kdy dochází k tvorbě nefenolických konečných produktů, jakým je například konečný produkt dekompozice CO_2 (Duran et al., 2002). PhOx produkují houby (např. *Termitomyces albuminosus* – Basidiomycota) ale také bakterie Actinobacteria (Burke & Cairney, 2002; Endo et al., 2003; Fenner et al., 2005; Johjima et al., 2003). Přestože optimální pH enzymu PhOx je ~8 (Frankenberger & Johanson, 1982; Pind et al., 1994; Williams et al., 2000), tak některé studie ukazují, že aktivita PhOx může být vysoká i při nižších hodnotách pH, ale při zaplavených podmínkách (Johjima et al., 2003; Zak & Kling, 2006; Toberman et al., 2008b).

Peroxidázy (EC 1.11.1.7)

Peroxidázy (PerOx) patří do skupiny oxido-reduktáz, katalyzující oxidaci látek za přítomnosti peroxidu vodíku, který funguje jako akceptor vodíku. Mezi PerOx se také řadí mangan-peroxidázy a lignin-peroxidázy. PerOx degradují lignin a další jemu příbuzné komplexní polymerní látky, například huminové kyseliny (Dari et al., 1995). Do půdy jsou PerOx vylučovány houbami ze skupiny Ascomycetes a Basidiomycetes (Rabinovich et al., 2004). PerOx jsou v rašeliništích pravděpodobně velmi významnými

oxidačními enzymy. Jasey et al. (2012) studovali aktivitu fenolytických oxidativních enzymů vyextrahovaných z mechů *Sphagnum fallax*. Bylo zjištěno, že peroxidázy jsou v rašeliništích velmi významné, neboť jejich naměřená aktivita byla tisíckrát vyšší než naměřená aktivita PhOx.

2.2.2 Hydrolytické enzymy

Hydrolytické enzymy představují velmi početnou skupinu extracelulárních enzymů v rašeliništích, které zde plní řadu nezastupitelných biochemických funkcí. Katalyzují hydrolýzu chemické vazby a mají široké spektrum specifických vlastností. Mezi nejvýznamnější v rašeliništích patří β -glukosidáza, fosfatáza, sulfatáza či chitináza, které odpovídají za degradaci jednodušších tak polymerních sloučenin rostlinného či mikrobiálního původu. Příkladem polymerních sloučenin může být rozšířený biopolymer celulóza, ale také hemicelulóza, chitin, peptidoglykan či látky proteinového charakteru. Hydrolytické enzymy jsou tedy důležitou součástí cyklu C, N, P a S. Fungují účinně jak v aerobních, tak aerobních podmínkách (Sinsabaugh et al., 1993). Bylo však zjištěno, že v případě některých hydrolytických enzymů jako je β -glukosidáza, fosfatáza či sulfatáza dochází vlivem snížení hladiny vody k výraznému zvýšení jejich aktivit (Freeman et al., 1996). To se může projevovat hlavně v letních měsících, kdy vlivem vyšších teplot a současně také občasných přísušků mohou být pozorovány vyšší aktivity hydrolytických enzymů (Kang & Freeman, 1999).

β -glukosidáza (EC 3.2.1.21)

Glukosidázy obecně katalyzují hydrolýzu glykosidické vazby mezi molekulou sacharidu a jinou skupinou vázaných sacharidových zbytků jako je hlavně glukóza, čímž poskytují rychlou a dostupnou energii a uhlík pro růst a rozvoj mikroorganismů. β -glukosidáza patří mezi celulózy, která degraduje rostlinné celulózy $(C_6H_{10}O_5)_n$, konkrétněji katalyzuje hydrolýzu koncových neredukujících β -glukózových zbytků. Podle některých studií pracuje tento enzym účinněji za aerobních podmínek, při teplotním optimu 30 °C a pH optimu 8,5 (King, 1986; Wright & Reddy, 2001).

Celobiohydroláza (3.2.1.91)

Celobiohydroláza (CBH) je exoceluláza, která štěpí celobiózu z konce sacharidového řetězce (Edwards et al., 2008). Dochází tak k hydrolyze 1-4-glykosidických vazeb a k tvorbě disacharidů a tetrasacharidů. Celobiohydroláza je tedy enzym, který se v terestrických ekosystémech úzce spojuje s tokem uhlíku. Největší aktivitu vykazuje při pH 7 (Kang & Freeman, 1998).

Fosfatáza (EC 3.1.3.1/2)

Fosfatáza je spojena s degradací nukleových kyselin, fosfolipidů a dalších esterových fosfátových molekul. Z toho důvodu představuje důležitost tohoto enzymu hlavně z hlediska toku P (Turner et al., 2002). Působí na esterových vazbách, kde odstraňuje fosfátovou skupinu ze substrátu hydrolyzou monoesterů kyseliny fosforečné na fosfátový iont a na molekulu s volnou hydroxylovou skupinou. Fosfatázu lze dělit na alkalickou (EC 3.1.3.1) a kyselou (EC 3.1.3.2). Kyselá fosfatáza vykazuje vyšší aktivitu za přístupu O₂ a za alkalických podmínek (Fenner & Freeman, 2013; Freeman et al., 1996).

Rašeliništní půdu charakterizuje vysoký poměr C:N:P, což naznačuje nízkou dostupnost N a především P. Z toho důvodu v mokřadech pozorujeme vysoké aktivity fosfatáz (Güsewell & Freeman, 2005; Parvin et al., 2018). V půdách jsou fosfatázy produkovány převážně bakteriemi jako jsou například *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, *Arthrobacter spp.* a *Streptomyces spp.* a houbami rodu *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.* a *Cunninghamella spp.* (Paul, 2007). Mimo mikroorganismů jej dokáží do půdy vylučovat také kořeny rostlin (Nannipieri et al., 2002).

Leucinaminopeptidáza (EC 3.4.11.1)

Leucinaminopeptidáza je exopeptidáza, která katalyzuje hydrolyzu oligomerních aminokyselinových zbytků peptidových řetězců, a tedy uvolňuje koncový dusík z aminokyselin, peptidů, amidů či arylamidů (Sinsabaugh et al., 1993). Leucinaminopeptidáza má rozhodující biologický význam při degradaci proteinů (Burley et al., 1990).

Chitináza (EC 3.2.1.14)

Chitináza představuje hydrolytický enzym, který katalyzuje depolymerizaci glykosidických vazeb chitinu, při čemž se uvolňují jednodušší organické sloučeniny (acetyl-glukosaminy) obsahující uhlík a dusík (Shi, 2011). Dominantními producenty chitinázy jsou v rašeliništích bakterie rodu *Streptomyces* a *Nocardia* a především houby, jejichž buněčné stěny tvoří chitin a které jsou převážně vázané na provzdušněnou vrstvu rašeliny (Paul & Clark, 1996).

2.3 Dekompozice v rašeliništích

Dekompozice je několikastupňový proces rozpadu a přeměny mrtvé organické hmoty. Konečný stupeň procesu se nazývá mineralizace, kde dochází k úplné přeměně organických látek na látky anorganické – minerální. Výslednými produkty rozkladu jsou CO_2 , CH_4 , amonný iont – NH_4 a H_2O (Rydin & Jeglum, 2006). Rozklad organického materiálu je jeden z hlavních předpokladů pro zajištění koloběhu a rovnováhy živin v ekosystémech. V rašeliništích tuto rovnováhu narušuje nízká primární produkce rostlin, avšak ještě nižší rychlost dekompozice. Výsledek této nerovnováhy znamená nahromadění rostlinných organických zbytků ve formě rašeliny, jež v průměru obsahuje asi 45–50 % uhlíku (Clymo, 1983; 1984). V subboreálních a boreálních rašeliništích je tak uloženo asi 30 % globálních zásob půdního organického uhlíku (Gorham, 1991; Clymo et al., 1998).

Rašeliniště patří mezi zamokřené ekosystémy, kde dochází jak k aerobnímu, tak k anaerobnímu rozkladu. Tyto dva typy rozkladu se výrazně liší podmínkami a rychlostí dekompozice rozkládané organické hmoty (Boelter, 1965; Rydin & Jeglum, 2006). Zpravidla platí, že aerobní dekompozice je rychlejší a účinnější, zatímco anaerobní dekompozice je velice pomalá a poměrně neúčinná. Prvotní fáze rozkladu se zahajuje v biologicky aktivní svrchní provzdušněné vrstvě, akrotelmu. Vstupující odumřelá organická hmota se v akrotelmu postupně rozkládá za pomoci aerobních mikrobiálních rozkladačů; hub ale také bakterií. Zvláště houby stojí za vylučováním oxidativních enzymů degradující fenolické látky (Sinsabaugh, 2010). Naopak trvale zaplavená zóna rašeliny, takzvaný katotelm, poskytuje podmínky pouze pro anaerobní rozklad a v důsledku nedostatku O_2 je v této vrstvě rychlost rozkladu výrazně zpomalena. Obecně platí, že rychlost dekompozice s rostoucí hloubkou v půdním profilu klesá. Tento neúplný

rozklad se v katotelmu řídí spíše anaerobními bakteriemi a archei, ale mohou se zde vyskytovat i některé houby (Lin et al., 2012; Sun et al., 2014). Konečným produktem anaerobního rozkladu může být CO₂ a CH₄ (Rydin & Jeglum, 2006).

Obecnou příčinou neúplného rozkladu a jeho nízké rychlosti v rašeliništích jsou nepříznivé podmínky prostředí, jakými je trvale vysoká hladina vody doprovázená nízkou dostupností O₂, nízké teploty, nízká kvalita opadu a nízké pH (pH <5). Kyselé anaerobní prostředí rašelinišť tak snižuje dostupnost živin a omezuje mikrobiální aktivitu (Rydin & Jeglum, 2006). K nízké rychlosti dekompozice přispívá špatná rozložitelnost některých látek, a to především fenolických. Odumřelá organická hmota vstupující do rozkladných procesů se postupně rozkládá podle složitosti dané molekuly. Obecně platí, že nejlépe podléhají rozkladu jednodušší molekuly; cukry, škrob a aminokyseliny, hůře uhlíkové polymery; například hemicelulózy a nejvíce odolné vůči rozkladu jsou aromatické polymery jako je nerozpustný polyfenolický lignin či rozpustné polyfenolické sloučeniny (např. polymerní taniny a huminové kyseliny) (Rydin & Jeglum, 2006).

Rostliny tvoří drtivou většinu organické složky, jenž v rašeliništích vstupuje do rozkladných procesů. Rychlost rozkládané organické hmoty je vyšší v živinami bohatších slatiništích, kde jsou rozšířené rostliny čeledi *Cyperaceae* a „hnědé mechy“, jejichž kvalita opadu je příznivější, zatímco v kyselějších a v živinami chudších slatiništích a vrchovištích jsou vegetačně rozšířené keříkovité formy rostlin a mechů rodu *Sphagnum*, a tedy je zde naopak nižší rychlost rozkladu (Rudolph & Samland, 1985; Rydin & Jeglum, 2006; Verhoeven & Toth 1995). V subboreálních a boreálních rašeliništích znamenají významnou složku vegetace mechorosty rodu *Sphagnum*, které díky svému dominantnímu zastoupení často vytvářejí a řídí dynamiku rašelinišť. Tyto mechorosty vytvářejí prostředí, které aktivně okyselují, tolerují či dokonce vyžadují nízké koncentrace minerálních živin a jejich opad se vyznačuje antibiotickou aktivitou a je do určité míry odolný vůči rozkladu. Buněčná stěna těchto mechů jim umožňuje vysokou kationtovou výměnnou kapacitu, která současně okyseluje prostředí a má schopnost zachycovat živiny (Verhoeven & Liefveld, 1997). Pomalý rozklad opadu rašeliničku se často přisuzuje k obsahu těžko rozložitelných fenolických látek (Clymo, 1965; Freeman et al., 2001; Verhoeven & Toth, 1995; Verhoeven & Liefveld, 1997). Mechy tohoto rodu nesyntetizují ve vodě nerozpustný lignin, typický po cévnaté rostliny, nýbrž obdobný polymer tvořený jednoduššími monomery. Syntetizují některé jiné fenylypropanoidy, jako

je například kyselina sphagnová a obsahují celou řadu ve vodě rozpustných jednoduchých a složitějších fenolických látek (Rasmussen et al., 1995; Weng and Chapple, 2010).

Další důležitou složku vegetace rašelinišť představují cévnaté rostliny, jakými jsou graminoidní šáchorovité rostliny nejčastěji rodu *Carex* či *Eriophorum* či erikoidní keříky rodu *Vaccinium* a *Calluna*. I tyto rostliny mohou být významným zdrojem fenolických látek vstupujících do dekompozičních procesů. Studie Dorrepaal et al. (2005) uvádí, že koncentrace rozpustných fenolických látek je vyšší v opadu keříků než v opadu z mechorostů rašeliníků. Chemické složení opadu má výrazný vliv na strukturu mikrobiálních dekompozitorů, a tudíž i jimi vylučované extracelulární enzymy (Cox et al., 2001; Lucas et al., 2007).

2.4 „Enzymic latch“ teorie

„Enzymic latch theory“ neboli teorie enzymatické smyčky vychází z experimentálně prokázané hypotézy, která byla publikovaná v prestižním vědeckém časopise Nature (Freeman et al., 2001). O několik let později byly výsledky experimentu v širším pojetí publikované v časopise Soil Biology & Biochemistry (Freeman et al., 2004). Tato teorie předpokládá řídicí roli PhOx v dekompozičních procesech v rašeliništi. V důsledku nízké dostupnosti O₂, a tedy anaerobních podmínek, je potlačena aktivita extracelulárních oxidativních enzymů podílejících se na rozkladu rozpustných fenolických látek. Postupně tak dochází k hromadění rozpustných fenolických látek, jejichž zvýšená koncentrace blokuje aktivitu hydrolytických enzymů (Freeman et al., 2001; 2004).

Anaerobní podmínky v rašeliništích mají negativní vliv na aktivitu oxidativních enzymů, které jako jedny z mála dokáží degradovat fenolické látky. Bez přítomnosti O₂ tedy nedokáží účinně pracovat a degradace fenolických látek se zpomaluje nebo zcela inhibuje (Freeman et al., 2001; 2004). Dochází tak k hromadění a zvyšující se koncentraci fenolických látek v rašeliništi, které inhibují aktivitu hydrolytických enzymů. Hydrolytické enzymy, jejichž aktivita je obecně nezávislá na přítomnosti O₂, jsou tedy nepřímo ovlivněny nízkou dostupností O₂. Celá tato enzymatická smyčka stojí dle Freemana za pomalou dekompozicí a hromaděním C v rašeliništích. Na základě této teorie se také předpokládá, že v případě klimatických změn spojených s větším suchem,

může dojít k provzdušnění rašeliny a tím k eliminaci tohoto enzymatického mechanismu a uvolnění obrovského množství C do atmosféry.

Nicméně samotné provedení a interpretace experimentu, ze kterého pramení teorie enzymatické smyčky je hned z několika hledisek nedostačující a závěry z tohoto experimentu se po důkladné analýze zdají být až příliš odvážné a jejich zobecnění na procesy ve všech rašeliništích velmi spekulativní. V následujících bodech shrnuji jednotlivá úskalí těchto studií, na jejichž základech stojí tato teorie. Současně jsou toto hlavní důvody, které vedou k našim hypotézám a k ověření teorie v praktické části této diplomové práce.

- Z velmi stručného popisu místa odběru vzorků vyplývá, že vzorky rašeliny byly odebrány pouze z jednoho místa na jedné lokalitě. Je tedy zcela na místě pochybovat o globálních zobecněních této studie pro všechna rašeliniště, pokud experiment nebyl proveden s více vzorky z různých typů rašelinišť.
- Postup, kterým bylo nakládáno se vzorky rašeliny vyvolává také mnoho otázek. Vzorky rašeliny byly homogenizovány a 20x naředěny H₂O. Tím muselo dojít k výraznému naředění přirozených koncentrací fenolických látek v rašelině, a tedy změně prostředí, na které jsou mikroorganismy adaptovány.
- Nebyla stanovena počáteční přirozená koncentrace fenolických látek v rašelině, do které se poté přidával přírůstek fenolických látek. Tedy autor studie nestanovil, jaké jsou počáteční hodnoty fenolických látek a následné přírůstky mohly být zcela irelevantní.
- Ve studii byly použity obecně nízké přírůstky fenolických látek získané z rašelinné vody (2-5 mg·l⁻¹). Z jiných prací vyplývá, že koncentrace fenolických látek získané z rašelinné vody mohou být i několikanásobně vyšší, navíc rozdíl v koncentracích fenolických látek v ombrotrofním a minerotrofním rašeliništi se může poměrně lišit (Dorrepaal et al., 2005). Např. Tobermann et al. (2008b; 2010) uvádí koncentraci rozpustných fenolických látek získaných z rašelinné vody na vrchovišti kolem 44 mg·l⁻¹ a kolem 63-84 mg·l⁻¹ na slatiništích. Koncentrace rozpustných fenolických látek může přesahovat i hranici 160 mg·l⁻¹ (Toberman et al., 2008a). Námi měřené koncentrace fenolických látek v pórové vodě rašeliny dosahovaly okolo 60 mg·l⁻¹ ve vrchovištích a okolo 30 mg·l⁻¹ ve slatiništích. To jsou mnohonásobně vyšší

koncentrace, než se kterými Freeman pracoval. Použité koncentrace v experimentu se tedy pravděpodobně vzdalují od reálných podmínek v rašeliništi.

- Doba inkubace vzorků je v experimentu velmi krátká – a to pouhých 18 hodin. Mohl se zde projevit efekt manipulace se vzorky, protože nebyla provedena předinkubace po homogenizaci, a to především v případě anaerobních vzorků, které byly připravovány a homogenizovány na vzduchu. Za druhé se mohl projevit pouze krátkodobý efekt přídatku fenolických látek na aktivitu PhOx. Mikroorganismy se na jiné podmínky prostředí dokáží adaptovat za nějaký čas. Například Toberman et al. (2008) uvádí signifikantní nárůst aktivity PhOx až po 6. dni inkubace.

Teorii enzymatické smyčky se sám autor snaží potvrdit v nedávné studii Dunn & Freeman (2018), avšak při podrobném studiu návrhu experimentu a výsledků dojdeme spíše k opačnému názoru. Tedy že tyto výsledky původní teorii zpochybňují. Experiment opět probíhal ve velmi krátkém časovém intervalu (24 hodin) a nebyla stanovena přirozená koncentrace fenolických látek v rašelině, se kterou se v experimentu pracovalo. Další úskalí této studie je použití nereálných, tedy nepřirozeně se vyskytujících vysokých koncentrací fenolických látek. Zde byla použita koncentrace fenolických látek $0-50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ a v předešlém experimentu $2-5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Freeman et al., 2001; 2004). Navíc použití některých fenolických látek je sporné. Tím je například kyselina skořicová, která se neřadí mezi fenolické látky a nejisté je i použití kyseliny lignosulfonové. Efekt inhibice enzymové aktivity vyšel průkazný pouze u nejvyšších použitých koncentrací fenolických látek ($50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), a to pouze u některých enzymů (β -D-glukosidáza, fosfatáza). Na některé enzymy dokonce ani tak vysoké koncentrace neměly téměř žádný vliv (β -D-xylosidáza, N-acetyl- β -D-glukosaminidáza).

Některé současné studie teorii enzymatické smyčky nepotvrdily nebo ji podpořily pouze částečně. Příkladem jsou studie Williams et al. (2000), kde aktivita PhOx nesouvisela s koncentracemi fenolických látek, nýbrž s vegetační složením, a to může odrážet množství dostupných živin. Romanowitz et al. (2015) udávají negativní korelaci mezi koncentracemi fenolických látek a aktivitou PhOx. Navíc autoři této studie nepozorovaly signifikantní vliv fenolických látek na aktivitu hydrolytických enzymů a udávají, že za aktivita hydrolytických enzymů je ovlivněna především sezónními změnami teploty půdy a zvýšením koncentrací DOC v pórové vodě. Studie Brouns et al.

(2016) a Sun et al. (2010) uvádí rozdílnou aktivitu enzymů mezi typem rašeliniště. Tyto studie se shodují na tom, že řídicím faktorem akumulace uhlíku není pouze nedostupnost O_2 v anaerobních vrstvách, jak tvrdí teorie enzymatické smyčky, ale kombinace mnoha faktorů, které se mohou lišit v závislosti na typu rašeliniště, vegetaci a klimatickém regionu.

2.5 Shrnutí

Rašeliniště jsou díky svým nehostinným podmínkám prostředí významným úložištěm C. Za hromaděním organické hmoty a jejím pouze částečným rozkladem stojí mnoho faktorů počínaje klimatem, trvalým zamokřením, nízkou dostupností živin a dále nízké pH, kvalita opadu a koncentrace fenolických látek, které se odráží v nízké mikrobiální aktivitě. Je však těžké určit jediný faktor jako rozhodující, jako tomu je v případě teorie enzymatické smyčky, kdy je hlavním řídicím faktorem hromadění C v rašeliništích nízká aktivita PhOx vlivem nízké dostupnosti O₂. Studie z posledních let naznačují, že za dlouhodobou akumulací C stojí celá řada faktorů, které se mohou lišit v závislosti na místních specifických podmínkách, typu rašeliniště či klimatickém regionu. Zároveň tyto studie zpochybňují i dramatické predikce rozkladu nahromaděné rašeliny, a tedy významného uvolňování uhlíku v případě klimatických změn a poukazují na relativně velkou stabilitu C nahromaděného v hlubších vrstvách rašeliny (Wilson et al., 2016).

Rozpustné fenolické látky se jako součást v odumřelé organické hmotě rostlin dostávají do dekompozičních procesů, kde jejich role není zcela jednoznačná. Z literatury je ovšem patrné, že vliv fenolických látek na enzymy řídí jak koncentrace fenolické látky, tak její molekulová hmotnost. Nejvyšší schopnost tvořit komplexy s proteiny, a inhibovat tím jejich funkci, se zdají mít taniny, nejnižší naopak jednoduché monomerní fenolické látky. Ty mohou být spotřebovány jako zdroj uhlíku, ovšem při vyšších koncentracích mohou díky své velikosti pronikat do buněk a inhibovat přímo mikrobiální aktivitu.

Dosud neexistuje shoda v tom, zda je přímá či nepřímá souvislost mezi koncentrací rozpustných fenolických látek a aktivitou enzymů a zda aktivita oxidativních enzymů souvisí s aktivitou ostatních hydrolytických enzymů. Není zcela jasné, zdali jsou oxidativní enzymy limitovány právě vlivem nedostatku O₂ v anaerobním prostředí rašelinišť, jak interpretuje samotná teorie enzymatické smyčky, anebo spíše jinými podmínkami prostředí jako je dostupnost živin, pH, teplota či kvalita opadu.

V důsledku těchto nejasností jsme se rozhodli tuto teorii otestovat a zjistit, jaká je souvislost mezi koncentrací fenolických látek a aktivitou oxidativních a hydrolytických enzymů. V následujících bodech jsou shrnuty cíle práce včetně hypotéz, které navazují na praktickou část této diplomové práce.

2.6 Cíle práce

Hlavním cílem práce je zjistit, jaká je souvislost mezi koncentrací fenolických látek a aktivitou oxidativních a hydrolytických enzymů.

Dílčí cíle práce jsou zaměřeny na:

- Ověření vlivu přítomnosti kyslíku na aktivitu oxidativních enzymů (PhOx, PerOx) použitím aerobní a anaerobní inkubace opadu. Byla měřena mikrobiální respirace v obou prostředích a zároveň byla měřena aktivita hydrolytických enzymů jako důkaz, jestli vyšší aktivita oxidativních enzymů má vliv na jejich aktivitu.
- Ověření vlivu koncentrace fenolických látek a jejich molekulární hmotnosti na aktivitu oxidativních a hydrolytických enzymů – inkubace opadu rašeliníku s přidávkou fenolických látek o různé molekulární hmotnosti a koncentracích a jejich vliv na mikrobiální respiraci a aktivitu enzymů.

2.7 Hypotézy

1. Předpokládáme, že anaerobní prostředí limituje aktivitu oxidativních enzymů, ale nemá přímý vliv na aktivitu hydrolytických enzymů. Vyšší aktivita oxidativních enzymů v aerobních podmínkách nebude mít vliv na aktivitu hydrolytických enzymů.
2. Rozpustné fenolické látky získané z rašelinné vody a rozdělené na vysokomolekulární (HMW [*high molecular weight*]; $M_w > 14$ kDa) a ostatní (LMW [*low molecular weight*]; $M_w < 14$ kDa, obsahující fenolické oligomery) se budou lišit svou schopností inhibovat enzymatickou aktivitu. Předpokládáme, že LMW budou mít vyšší schopnost inhibovat enzymovou aktivitu než HMW.

3 Materiál a metody

3.1 Odběr a příprava materiálu pro laboratorní inkubační experimenty

3.1.1 Odběr substrátu a jeho příprava

Byl vybrán mech rašeliník hnědý (*Sphagnum fuscum*), který představuje široce rozšířený druh tohoto rodu v boreálních a mírných oblastech severní polokoule. Rašeliník byl nasbírán na vrchovišti u Záhvozdí ve Vltavském luhu v říjnu roku 2017 (48°49'52''N, 13°56'28''E; 730 m n.m.). Po sběru byl rašeliník skladován při teplotě 4 °C. Následně byl zbaven nečistot ručním přebíráním a propíráním ve vodě. Pro pokusy byla vybrána odumřelá část stélky (opad), která ještě nejevila známky rozkladu (obvykle 2–5 cm dlouhý segment lodyžky se zachovalými větvemi a lístky). Takto připravený opad byl vysušen při 65 °C. 130 g suchého opadu bylo rozděleno do tří širokhrdlých uzavíratelných sklenic (objem 3,5 l). Opad byl zalit acetonem (2,5 l) a extrahován při teplotě jeho varu (57 °C) ve vodní lázni o teplotě 60 °C po dobu 5 minut. Nakonec byl opad vysušen v digestoři. Extrakce byla provedena třikrát po sobě. Při extrakci byly z opadu odstraněny rozpustné fenolické látky a pigmenty, ale i drobné nečistoty.

Následně byla část opadu delignifikována, aby mohl být vyloučen vliv jakýchkoli fenolických látek během experimentu, tedy i těch uvolněných při rozkladu fenolických polymerů. Opad byl rozdělen na pětiny (po 25 g). Tři pětiny byly delignifikovány pomocí chloritanu sodného; při delignifikaci byly z opadu odstraněny fenolické látky, zejména ligninu podobný fenolický polymer. Delignifikace probíhala ve třech 3,5 l sklenicích. 25 g opadu na sklenici bylo rozmícháno ve 2,5 l destilované vody ve vodní lázni o teplotě 75 °C a k suspenzi bylo přidáno 25 ml koncentrované kyseliny octové a poté 25 g chloritanu sodného (tato dávka chloritan byla rozdělena na tři díly přidávané po půl hodinách). Po třech hodinách se přídavky kyseliny octové a chloritanu sodného zopakovaly. Během delignifikace byl obsah lahví promíchán co 15 minut, jinak byly lahve uzavřeny, aby vyvíjející se oxid chloričitý neunikal. Po celkem 6 h delignifikace byl materiál zfiltrován, na filtru několikrát proprán v destilované vodě, dvakrát ve 2,5 l 20 mM roztoku HCl, aby byly vytěsněny zejm. sodné kationty z iontovýměnných skupin, a poté opět v destilované vodě, aby se vyplavila volná kyselina. Nakonec byl

tříkrát propláchnut acetonem, který odstraní kapilární vodu a dosušen v digestoři. Zbývající dvě pětiny opadu byly vystaveny stejným podmínkám, ovšem kromě přídavku chloritanu sodného a druhého přídavku kyseliny octové. Celkem tak bylo získáno zhruba po 50 g delignifikovaného a nedelignifikovaného rašeliníku. Tento připravený materiál byl skladován ve tmě a suchu při laboratorních podmínkách.

3.1.2 Odběr a příprava roztoku fenolických látek z rašelinné vody

Pro přípravu roztoků fenolických látek byla dne 27. 11. 2017 odebrána voda (cca 60 l) z mělkého rašelinného jezírka na lokalitě Červené blato (48°52'8.421"N, 14°48'20.858"E) a uložena ve 4 °C před zpracováním. Koncentrace fenolických látek byla 66,6 mg·l⁻¹, pH = 3,38. Pro inkubaci s částečným přídavkem živin (viz dále) byla odebrána voda z téhož místa dne 30. 6. 2018; koncentrace fenolických látek byla 83,4 mg·l⁻¹, pH = 3,30. Den následující po odběru byla rašelinná voda filtrována přes pískový filtr, poté přes čtyři vrstvy filtračního papíru a jeden skleněný filtr (0,40 μm). Filtrát byl následně lyofilizován; výtěžnost sušiny (huminových látek) byla cca 300 mg/l. Lyofilizát byl rozpuštěn v destilované vodě a přes dialyzační membránu (regenerovaná celulóza, dělicí molekulová hmotnost 14 kDa) rozdělen na látky o molekulové hmotnosti > a < 14 kDa. Látky s menší molekulovou hmotností (<14 kDa) zde označujeme jako LMW (*low molecular weight*) a látky s vyšší molekulovou hmotností (> 14 kDa) jako HMW (*high molecular weight*). V těchto dvou získaných variantách byl zjištěn celkový obsah rozpuštěného uhlíku a dusíku (LiquiTOC) a stanovena koncentrace fenolických látek (Box, 1983). Následně byly roztoky LMW a HMW lyofilizovány. Tyto lyofilizáty sloužily k přípravě roztoků o potřebných koncentracích - 10, 100, 1000 mg·l⁻¹.

3.1.3 Odběr a příprava mikrobiálního inokula

Do skleněných zkumavek bylo přidáno mikrobiální inokulum získané z čerstvě sesbíraných trsů rašeliníku hnědého (*Sphagnum fuscum*). Rašeliník byl nasbírán na lokalitě u Záhvozdí. Tento čerstvý rašeliník byl následně vyprán v destilované vodě v ultrazvukové lázni a ručně vyždímán. Získaný roztok byl zfiltrován přes polyamidovou síťovinu s velikostí ok 42 μm. V inokulu byla stanovena koncentrace fenolických látek;

v prvním experimentu (laboratorní inkubační experiment s plným přídatkem živin) bylo v inokulu s opadem rašeliníku naměřeno $9,08 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ rozpustných fenolických látek a s opadem delignifikovaného rašeliníku $3,91 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. V druhém experimentu (laboratorní inkubační experiment s částečným přídatkem živin) $32,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ rozpustných fenolických látek.

3.1.4 Příprava roztoků živin

Byly provedeny dva inkubační experimenty. První experiment s plným přídatkem minerálních živin měl odstranit živinovou limitaci mikrobiální aktivity, která tak byla limitována pouze dostupností uhlíku. V druhém experimentu byl pak přídatkem živin omezen pouze na dorovnání rozdílů mezi variantami přídatků fenolických látek. Koncentrace živin v prvním experimentu byla upravena přídatkem $1000 \text{ mg/l NH}_4\text{Cl}$, $1000 \text{ mg/l K}_2\text{HPO}_4$, 100 mg/l MgSO_4 a 15 mg/l CaCl_2 . Uvedené koncentrace odpovídají konečné hodnotě po přidání všech složek do inkubační vialky (ve skutečnosti byly přidávány dva zásobní $20\times$ zakoncentrované roztoky K_2HPO_4 a ostatních solí, doředěné inokulem a roztokem fenolických látek). Do každé vialky byl pak dodán $1 \mu\text{l}$ koncentrátu mikroprvků ($100\times$ koncentrované BMS médium). Na 1 litr tohoto koncentrátu bylo použito: $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,5g), $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,5 g), MnSO_4 (2,5g), CuSO_4 (2,5 g), CoCl_2 (0,05 g), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (0,05 g), $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,05 g).

Pro druhý experiment byly nejdříve stanoveny koncentrace živin v lyofilizovaných frakcích fenolických látek (LMW a HMW), a to z kyselinových mineralizátů metodami ICP–MS (P, Na, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn) a FIA (N). Poté byla vyčíslena koncentrace živin vnesených s maximálním přídatkem fenolických látek (cílová koncentrace 1000 mg_TA/l LMW resp. HMW ve vialce; viz dále) a koncentrace živin ve variantách s nižším či žádným přídatkem fenolických látek pak byla dorovnána na tuto maximální hodnotu přidáním roztoků solí těchto prvků (viz Tab. 5 v příloze).

3.2 Rozvržení experimentů

3.2.1 Laboratorní inkubační experiment s plným přídatkem živin

Pro tento první experiment byly použity 40-ml skleněné inkubační vialky IPA (JG Finneran). Celkově bylo připraveno 252 vialek a 18 prázdných suchých čistých vialek (*blanků*). Do poloviny těchto vialek (126 vzorků) bylo naváženo 200 mg ($\pm 0,05$ mg) suchého rašeliníku a do další poloviny vialek jeho delignifikovaná varianta. Do takto připravených vialek s rašeliníkem byly přidány různé koncentrace fenolických látek (0, 10, 100, 1000 mg·l⁻¹) pro obě varianty $>$ a <14 kDa. Varianta s přídatkem 0 fenolických látek představovala kontrolu. Aby nedocházelo k limitaci živinami, byl do všech vialek přidán stejný roztok živin o objemu 1 ml. Do všech vialek byly nakonec dodány 4 ml mikrobiálního inokula. Celkový objem roztoku ve vialkách byl doplněn na 10 ml destilovanou vodou. Všechny varianty vzorků byly připraveny ve třech opakováních a ve třech časových variantách pro různou délku inkubace (7, 17 a 56 dnů). Před inkubací bylo ve vzorcích stanoveno pH (pH 315i WTW, Německo).

Inkubace vzorků probíhala za aerobních a anaerobních podmínek a konstantní teploty 15 °C (Sanyo, USA) po dobu 7, 17 a 56 dní. Ve všech vzorcích bylo po ukončení inkubace změřeno pH, odebrána část vzorku (1 g) na stanovení enzymové aktivity a roztok z vialek byl zfiltrován přes skleněné filtry a v něm stanovena koncentrace fenolických látek, koncentrace NH₄-N, NO₃-N (FIA, Lachat QC8500, Lachat Instruments, USA) a koncentrace celkového rozpuštěného N (TDN) a celkového rozpuštěného uhlíku (DOC) (LiquiTOC, Elementar, Germany).

Současně se zahájením experimentu byly připraveny vialky, které představovaly 1. den experimentu. Vialky obsahovaly rašeliník (6 opakování) a delignifikovaný rašeliník (6 opakování) a bylo do nich přidáno pouze mikrobiální inokulum pro stanovení hodnot 1. dne všech měřených parametrů před inkubací vzorků. V těchto vzorcích byla stanovena aktivita hydrolytických a oxidativních enzymů. Ve filtrátu roztoku byla stanovena koncentrace fenolických látek. Zároveň byla v roztoku stanovena koncentrace NO₃-N a NH₄-N, DOC a TDN.

Tab. 1: Varianty připravených vzorků pro laboratorní inkubační experiment s plným přidavkem živin. Platí pro oba typy inkubace (aerobní, anaerobní).

Kód	Substrát	Přídavek živin	Mikrobiální inokulum	Typ fenolických látek (LMW/HMW)	Koncentrace fenolických látek [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]
R-Control 0	Rašeliník	Ano	Ano	-	-
R-LMW 10	Rašeliník	Ano	Ano	LMW	10
R-LMW 100	Rašeliník	Ano	Ano	LMW	100
R-LMW 1000	Rašeliník	Ano	Ano	LMW	1000
R-HMW 10	Rašeliník	Ano	Ano	HMW	10
R-HMW 100	Rašeliník	Ano	Ano	HMW	100
R-HMW 1000	Rašeliník	Ano	Ano	HMW	1000
D-Control 0	Delignifikovaný rašeliník	Ano	Ano	-	-
D-LMW 10	Delignifikovaný rašeliník	Ano	Ano	LMW	10
D-LMW 100	Delignifikovaný rašeliník	Ano	Ano	LMW	100
D-LMW 1000	Delignifikovaný rašeliník	Ano	Ano	LMW	1000
D-HMW 10	Delignifikovaný rašeliník	Ano	Ano	HMW	10
D-HMW 100	Delignifikovaný rašeliník	Ano	Ano	HMW	100
D-HMW 1000	Delignifikovaný rašeliník	Ano	Ano	HMW	1000

3.2.2 Laboratorní inkubační experiment s částečným přidavkem živin

Pro tento druhý experiment bylo celkově připraveno 156 40-ml zkumavek, do kterých bylo naváženo 200 mg ($\pm 0,05$ mg) suchého rašeliníku včetně 12 prázdných suchých čistých vialek (*blanků*). Polovina vzorků obsahovala přídavek živin (přizpůsobené podle dodaného množství fenolických látek), druhá polovina byla bez přídavku živin. Ke vzorkům byly přidány roztoky fenolických látek o koncentracích 0, 10, 100 a 1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ pro oba typy fenolických látek $>$ a <14 kDa (HMW/LMW). Do všech vialek byla opět dodána suspenze mikrobiálního inokula o objemu 4 ml. Celkový objem roztoku ve vialkách byl opět doplněn na 10 ml destilovanou vodou. Všechny varianty vzorků byly připraveny ve třech opakováních a ve dvou časových variantách (inkubace 10 a 35 dnů).

Opět byly připraveny dvě varianty inkubace – aerobní a anaerobní. Vzorky byly inkubovány při stejné teplotě 15 °C jako v předešlém experimentu. Před inkubací bylo ve všech vzorcích opět změřeno pH.

Se zahájením experimentu byly paralelně připraveny vialky, které představovaly 1. den experimentu, do kterých bylo přidáno pouze mikrobiální inokulum, a ve kterých byla stanovena aktivita hydrolytických a oxidačních enzymů, koncentrace fenolických látek, koncentrace NH₄-N, NO₃-N, TDN a DOC.

Ve všech vzorcích bylo po ukončení inkubace změřeno pH, byla odebrána část vzorku (1 g) na stanovení enzymové aktivity a roztok z vialky byl zfiltrován přes skleněné filtry a v něm stanovena koncentrace fenolických látek, koncentrace NH₄-N, NO₃-N, TDN a DOC.

Tab. 2: Varianty připravených vzorků pro laboratorní inkubační experiment s částečným přídatkem živin. Platí pro oba typy inkubace (aerobní, anaerobní).

Kód	Substrát	Přídavek živin [%]	Mikrobiální inokulum	Přídavek fenolických látek (LMW/HMW)	Koncentrace fenolických látek [mg·l ⁻¹]
Control 0	Rašeliník	-	Ano	-	-
LMW 10	Rašeliník	-	Ano	LMW	10
LMW 100	Rašeliník	-	Ano	LMW	100
LMW 1000	Rašeliník	-	Ano	LMW	1000
LMW 0+	Rašeliník	100	Ano	-	-
LMW 10+	Rašeliník	99	Ano	LMW	10
LMW 100+	Rašeliník	90	Ano	LMW	100
HMW 10	Rašeliník	-	Ano	HMW	10
HMW 100	Rašeliník	-	Ano	HMW	100
HMW 1000	Rašeliník	-	Ano	HMW	1000
HMW 0+	Rašeliník	100	Ano	-	-
HMW 10+	Rašeliník	99	Ano	HMW	10
HMW 100+	Rašeliník	90	Ano	HMW	100

3.3 Měření a stanovení potenciální produkce CO₂

V průběhu inkubace byla ve vialkách měřena koncentrace CO₂ pro stanovení mikrobiální respirace. Koncentrace CO₂ byla měřena pomocí plynového chromatografu HP 6850 (Agilent, USA). Pro zajištění aerobních podmínek byly vzorky průběžně po každém měření důkladně vyvětrány a protřepány na vortexu, opět uzavřeny a dále inkubovány do dalšího měření. Atmosféra ve vialkách anaerobních vzorků byla před zahájením inkubace profouknuta plynem N₂. V anaerobních vzorcích byla pro kontrolu anaerobních podmínek měřena i koncentrace O₂. Mikrobiální respirace pro *laboratorní experiment s plným přidavkem živin* byla měřena v časových intervalech: 2., 4., 7., 10., 14., 17., 21., 28., 35., 42., 49. a 56. den a pro *laboratorní experiment s částečným přidavkem živin* v časových intervalech: 2., 4., 7., 10., 14., 17., 21., 28. a 35. den.

Výpočet kumulativní respirace CO₂

Množství CO₂ vyprodukované při aerobní a anaerobní respiraci bylo vypočítáno následovně:

- 1) Objem CO₂ v headspace vialky

$$G = \frac{C_{CO_2} \cdot V_g}{1000} [\mu\text{l CO}_2]$$

C_{CO_2} Koncentrace CO₂ změřená na plynovém chromatografu [ppm]

V_g objem headspace vialky [ml]

- 2) Objem CO₂ rozpuštěného v roztoku

$$L = \frac{1,0190 \cdot G \cdot V_L}{V_G} [\mu\text{l CO}_2]$$

V_L objem roztoku ve vialce [μl]; $V_L = (1 - \text{suchá hmotnost vzorku}) \cdot \text{navážka} + \text{dodaná voda}$

1,0190 koeficient rozpustnosti CO₂ ve vodě při 15 °C

- 3) Celkový objem CO₂ vyprodukovaný na 1 g vzorku

$$T = \frac{(G+L)}{\text{navážka} \cdot \text{suchá hmotnost}} [\mu\text{l CO}_2 \text{ g}^{-1}]$$

- 4) Celková hmotnost uhlíku vyprodukovaného na 1 g vzorku

$$Y = 0,536 \cdot T \text{ [}\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}\text{]}$$

koeficient 0,536 je přepočtem z $\mu\text{l CO}_2$ na $\mu\text{g C-CO}_2$

Kumulativní aerobní a anaerobní respirace byla stanovena jako celková hmotnost C-CO₂ vyprodukovaná na 1 g vzorku za celou dobu inkubace, tj. 35 dnů.

3.3.1 Stanovení aktivity enzymů

3.3.1.1 Příprava vzorků

Z eppendorfové zkumavky bylo 0,5 g každého vzorku kvantitativně převedeno do skleněné kádinky o objemu 100 ml a doplněno destilovanou vodou na 50 ml. Větší kousky byly rozmělněny a homogenizovány sterilní lžičkou. Aby se enzymy uvolnily do roztoku s destilovanou vodou, byly kádinky se vzorky ponořeny do ultrazvukové lázně a sonikovány po dobu 4 min. V závěru byly vzorky filtrovány přes sítko.

3.3.1.2 Stanovení aktivity hydrolytických enzymů

Aktivita hydrolytických enzymů byla stanovena pomocí metodiky Marx et al. (2001). Aktivita enzymů β -glukosidázy, celobiohydrolázy, fosfatázy a chitinázy byla stanovena spektrofluorometricky s využitím fluorescenčně značených substrátů 4-metylmethylferyl (MUF). Aktivita leucinaminopeptidázy byla stanovena pomocí fluorescenčně značeného substrátu 7-amido-4-metylkumarin (AMC). Fluorescence byla měřena při vlnové délce 460 nm během třech kinetických cyklů: po 30 min (T₀), po 90 min (T₁) a po 150 min (T₂) pomocí mikrodestičkového analyzátoru (Infinite 200, Tecan, Švýcarsko).

3.3.1.3 Stanovení aktivity oxidativních enzymů

Aktivita oxidativních enzymů byla stanovena podle metodiky Hendel et al. (2005) pomocí fluorescenčně značeného substrátu L-3,4-dihydroxyfenylalaninu (L-DOPA) za

použití 96-jamkových mikrodestiček. Mikrodestičky byly inkubovány ve tmě při laboratorní teplotě. Po 18 hodinách inkubace byla měřena aktivita enzymů na mikrodestičkovém analyzátoru (Infinite 200, TECAN, Švýcarsko) při absorbanci 460 nm.

3.3.2 Stanovení koncentrace fenolických látek

Koncentrace fenolických látek byla stanovena pomocí metody Folina a Ciocalteu (Box, 1983). Ke stanovení koncentrace fenolických látek bylo použito 0,5 ml zfiltrovaného roztoku z inkubovaných vzorků. K roztoku bylo přidáno 2,5 ml 2 % uhličitanu sodného (Na_2CO_3 v 0,1 M NaOH) a protřepáno na vortexu. Po 5 minutách bylo přidáno 0,25 ml činidla Folin-Ciocalteu a zkumavky byly opět protřepány na vortexu. Takto připravené vzorky se ponechaly 1 hod inkubovat při laboratorní teplotě a poté byla změřena absorbance při vlnové délce 765 nm na spektrofotometru SPECORD 210 PLUS (Analytik Jena). Jako standard byla použita kyselina tříslová.

3.4 Statistické vyhodnocení dat

Pro zpracování dat a výpočty výše uvedených charakteristik byl použit program MS Office Excel 2016 (Microsoft, USA). Statistické zpracování dat bylo provedeno v programu Statistica 13 (Dell, USA).

Změny koncentrace fenolických látek v průběhu inkubace (v čase 7. a 56 dne inkubace v případě prvního experimentu a v případě druhého experimentu v čase 10. a 35. dne inkubace) byly srovnávány s časem koncentrace fenolických látek v 1. dni; k otestování těchto změn byla použita faktoriální ANOVA s následným Dunnettovým testem. Vliv přídatku fenolických látek na aktivitu jednotlivých enzymů a mikrobiální respiraci byl testován pomocí faktoriální ANOVY s použitím Dunnettova testu (v porovnání s kontrolou). Tento test byl proveden samostatně pro jednotlivé dny inkubace a pro aerobní a anaerobní varianty. Současně byl pomocí jednocestné ANOVY vyhodnocen rozdíl mezi aerobní a anaerobní inkubací. Stejným způsobem byl testován rozdíl mezi rašeliníkem a delignifikovaným rašeliníkem.

Na vyhodnocení souvislostí mezi koncentrací fenolických látek, mikrobiální respirací a aktivitou jednotlivých enzymů byly použity korelační matice. Vše bylo testováno na hladině významnosti $p = 0,05$.

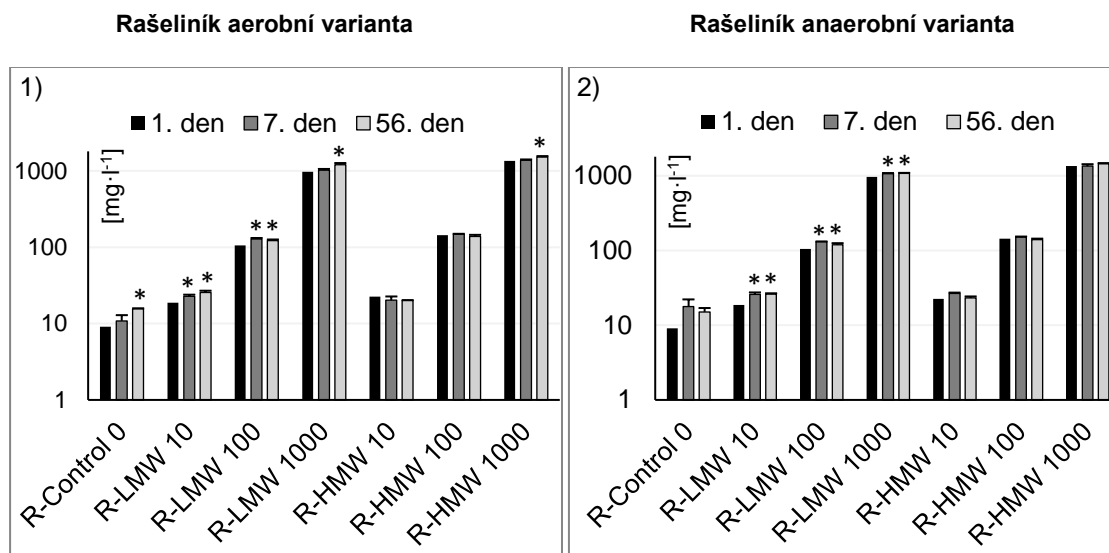
4 Výsledky

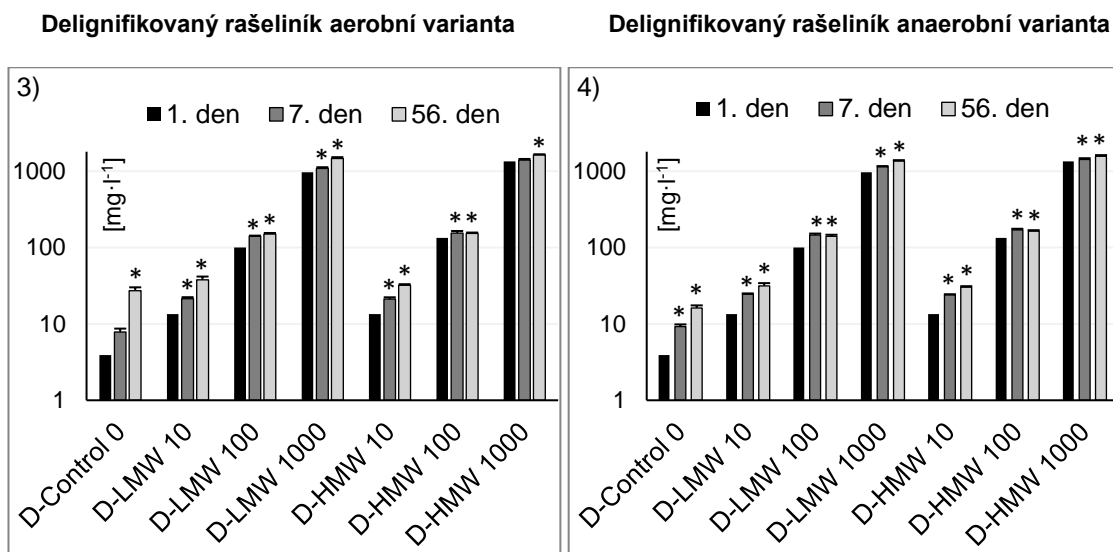
4.1 Laboratorní inkubační experiment s plným přidavkem živin

Z prvního experimentu jsou prezentovány aktivity vybraných hydrolytických enzymů (β -glukosidázy a celobiohydrolázy), u kterých byl zjištěn významný rozdíl v jejich aktivitách vlivem podmínek prostředí (aerobní, anaerobní inkubace), typu opadu (rašeliník, delignifikovaný rašeliník) a přidavků fenolických látek (10, 100, 1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Dále jsou prezentovány aktivity oxidativních enzymů PhOx a PerOx a koncentrace fenolických látek.

Mikrobiální respirace obou inkubačních variant byla z důvodu nedostatečné těsnosti sept vyřazena z výsledků. Výsledky z měření mikrobiálních respirací byly nevěrohodné, a tudíž nevhodné pro jakékoli statistické vyhodnocení. V důsledku špatné manipulace se vzorky, byly výsledky naměřených koncentrací fenolických látek ze 17. dne taktéž vyloučeny z výsledků.

Koncentrace fenolických látek





Graf 1-4: Koncentrace fenolických látek [mg·l⁻¹] (průměr ± SD, n=3) v čase: 1. den – stanovení koncentrace fenolických látek před inkubací; 7. a 56. den inkubace. R/D-Control 0 (kontrola): R-rašeliník; D-delignifikovaný rašeliník + mikrobiální inokulum + přísávek živin. R/D-LMW/HMW10,100,1000: R-rašeliník; D-delignifikovaný rašeliník + mikrobiální inokulum + přísávek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 10, 100, 1000 mg·l⁻¹. LMW: fenolické látky M_w < 14 kDa. HMW: fenolické látky M_w > 14 kDa. Hvězdičky nad sloupečky ukazují statisticky významné výsledky Dunnettova testu. Hvězdička nad sloupečkem ukazuje průkazný rozdíl ve srovnání s kontrolou v daném čase (R- nebo D-Control 0).

Koncentrace fenolických látek se mezi aerobní a anaerobní inkubací nelišily.

Koncentrace fenolických látek LMW a HMW v průběhu času v aerobních i anaerobních podmínkách narůstaly.

V aerobní inkubaci, kde byl opad rašeliníku je statisticky průkazný nárůst koncentrací fenolických látek od 1. k 35. dni u variant: *R-LMW10*, *R-LMW100*, *R-LMW1000* a *R-HMW1000* ($p < 0,05$) a u všech variant koncentrací s delignifikovaným rašeliníkem (D-) ($p < 0,05$). Také v kontrolách narůstala v čase koncentrace fenolických látek: *R-Control 0*, *D-Control 0*.

V anaerobní inkubaci s opadem rašeliníku je statisticky průkazný nárůst koncentrací fenolických látek od 1. k 35. dni u variant: *R-LMW10*, *R-LMW100*, *R-LMW1000* ($p < 0,05$) a u všech variant koncentrací s delignifikovaným rašeliníkem (D-) ($p < 0,01$).

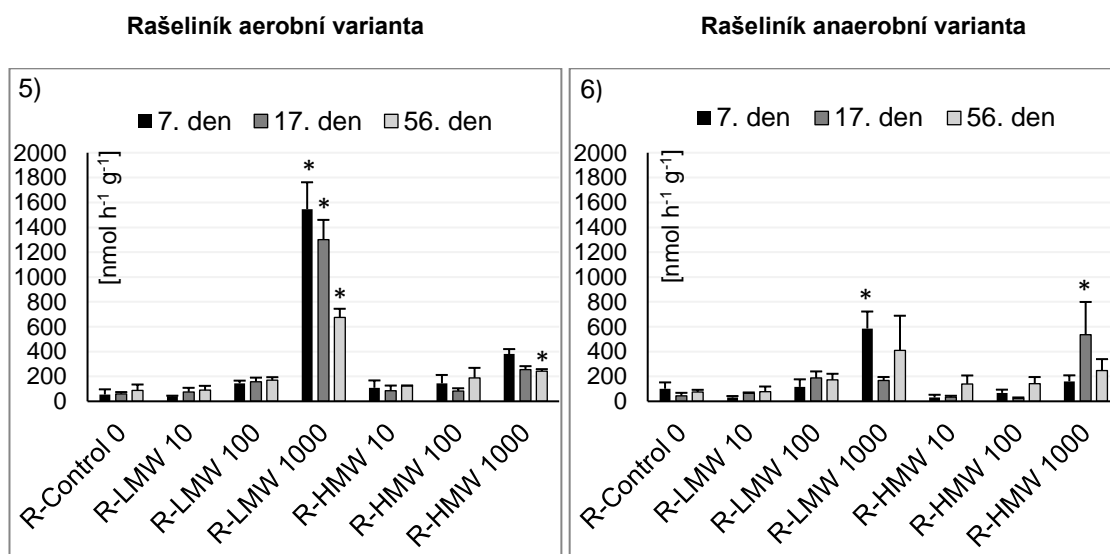
Koncentrace fenolických látek v aerobní variantě s rašeliníkem pozitivně korelovaly s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,56$), PhOx ($r = 0,86$), PerOx ($r = 0,94$) a s TOC ($r = 0,95$), TDN ($r = 0,57$), naopak negativně korelovaly s fosfatázou ($r = -0,38$) a ve variantě

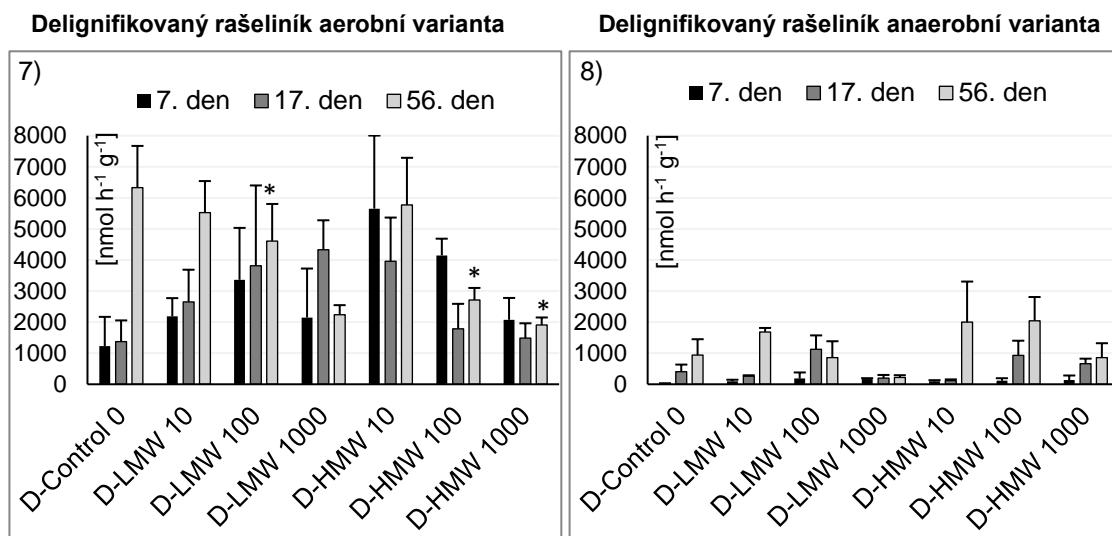
s delignifikovaným rašeliníkem pozitivně korelovaly s aktivitou PhOx ($r = 0,87$) a PerOx ($r = 0,94$) a s TOC ($r = 0,96$), naopak negativně korelovaly s aktivitou β -glukosidázy ($r = -0,49$), celobiohydrolázy ($r = -0,46$) a fosfatázy ($r = -0,32$).

Koncentrace fenolických látek v anaerobní variantě s rašeliníkem pozitivně korelovaly s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,61$), celobiohydrolázy ($r = 0,34$), fosfatázy ($r = 0,40$) PhOx ($r = 0,68$), PerOx ($r = 0,72$), TOC ($r = 0,84$) a ve variantě s delignifikovaným rašeliníkem s aktivitou celobiohydrolázy ($r = 0,50$), leucinaminopeptidázy ($r = 0,42$), fosfatázy ($r = 0,35$), PhOx ($r = 0,76$) a PerOx ($r = 0,82$) a s TOC ($r = 0,95$) a TDN ($r = 0,39$).

4.1.1 Aktivita hydrolytických enzymů

β -glukosidáza





Graf 5-8: Aktivita β -glukosidázy [$\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$] (průměr \pm SD, $n=3$) v čase: 7., 17. a 56. den inkubace. R/D-Control 0 (kontrola): R/D-Control 0 (kontrola): R-rašeliník; D-delignifikovaný rašeliník + mikrobiální inokulum + přísávek živin. R/D-LMW/HMW10,100,1000: R-rašeliník; D-delignifikovaný rašeliník + mikrobiální inokulum + přísávek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 10, 100, 1000 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. LMW: fenolické látky $M_w < 14$ kDa. HMW: fenolické látky $M_w > 14$ kDa. Hvězdičky nad sloupečky ukazují statisticky významné výsledky Dunnettova testu. Hvězdička nad sloupečkem ukazuje průkazný rozdíl ve srovnání s kontrolou v daném čase (R- nebo D-Control 0).

Aktivita enzymu β -glukosidázy se nelišila mezi aerobní a anaerobní inkubací ve variantě s rašeliníkem. Naopak, delignifikovaný rašeliník vykazoval vyšší aktivitu v aerobních než v anaerobních podmínkách inkubace ($p < 0,01$).

V porovnání s kontrolou opadu rašeliníku (R-Control 0) měly na aktivitu β -glukosidázy v aerobní a anaerobní inkubaci vliv pouze varianty s nejvyššími přísávkami fenolických látek: *R-LMW 1000* a *R-HMW 1000* ($p < 0,05$).

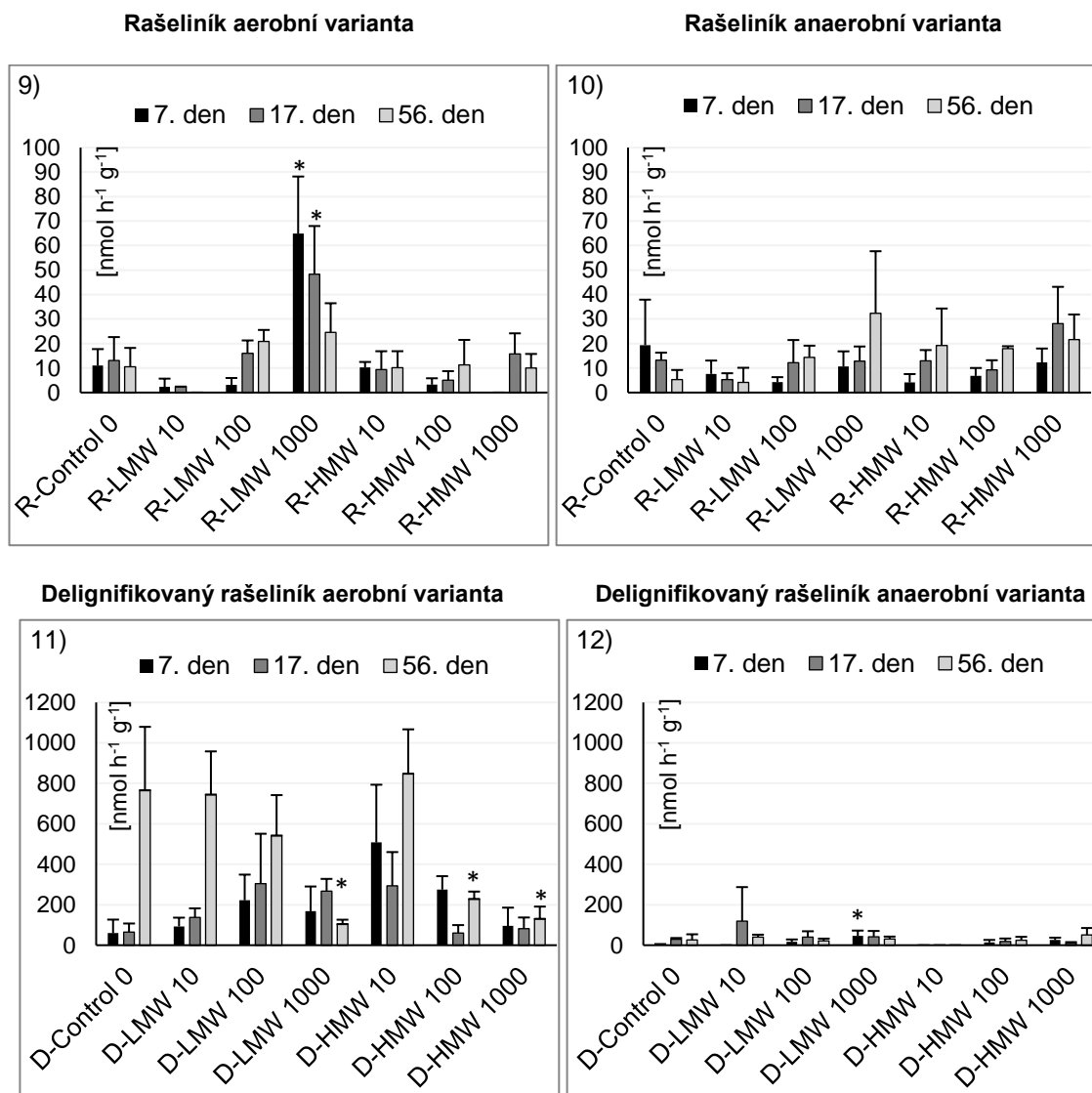
V případě delignifikovaného rašeliníku v aerobních podmínkách byla zaznamenána klesající aktivita β -glukosidázy až v 56. den inkubace v porovnání s kontrolou (D-Control 0), a to u variant s vyššími přísávkami fenolických látek: *D-LMW 1000*, *D-HMW 100*, *D-HMW 1000*. Naopak aktivita β -glukosidázy v anaerobní inkubaci nevykazovala žádné rozdíly mezi různými přísávkami fenolických látek v porovnání s kontrolou delignifikovaného rašeliníku (D-Control 0).

Aktivita β -glukosidázy v aerobní variantě s rašeliníkem pozitivně korelovala s aktivitou celobiohydrolázy ($r = 0,80$), chitinázy ($r = 0,49$), PhOx ($r = 0,40$) a PerOx ($r = 0,32$), TOC ($r = 0,76$) a TDN ($r = 0,48$) a ve variantě s delignifikovaným rašeliníkem pozitivně

korelovala s aktivitou všech hydrolytických enzymů; s celobiohydrolázou ($r = 0,92$), fosfatázou ($r = 0,33$), leucinaminopeptidázou ($r = 0,29$) a chitinázou ($r = 0,28$), naopak negativně korelovala s aktivitou oxidativních enzymů PhOx ($r = -0,35$) a PerOx ($r = -0,36$).

Aktivita β -glukosidázy v anaerobní variantě s rašeliníkem pozitivně korelovala s aktivitou celobiohydrolázy ($r = 0,34$), fosfatázy ($r = 0,46$), chitinázy ($r = 0,36$), s aktivitou oxidativních enzymů PhOx ($r = 0,36$) a PerOx ($r = 0,47$) a s TOC ($r = 0,60$) a ve variantě s delignifikovaným rašeliníkem byly nalezena velmi silná pozitivní korelace s aktivitou hydrolytických enzymů; s celobiohydrolázou ($r = 0,89$), fosfatázou ($r = 0,99$) a chitinázou ($r = 0,99$).

Celobiohydroláza



Graf 9-12: Aktivita celobiohydrolázy [$\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$] (průměr \pm SD, $n=3$) v čase: 7., 17. a 56. den inkubace. R/D-Control 0 (kontrola): R-rašeliník; D-delignifikovaný rašeliník + mikrobiální inokulum + přídavek živin. R/D-LMW/HMW10,100,1000: R-rašeliník; D-delignifikovaný rašeliník + mikrobiální inokulum + přídavek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 10, 100, 1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. LMW: fenolické látky $M_w < 14$ kDa. HMW: fenolické látky $M_w > 14$ kDa. Hvězdičky nad sloupečky ukazují statisticky významné výsledky Dunnettova testu. Hvězdička nad sloupečkem ukazuje průkazný rozdíl ve srovnání s kontrolou v daném čase (R- nebo D-Control 0).

Aktivita enzymu celobiohydrolázy se nelišila mezi aerobní a anaerobní inkubací ve variantě s rašeliníkem. Naopak, delignifikovaný rašeliník vykazoval vyšší aktivitu v aerobních než v anaerobních podmínkách inkubace ($p < 0,01$).

Vyšší aktivita celobiohydrolázy v aerobních podmínkách byla měřena pouze v 7. a 17. dni inkubace jen ve variantě s nejvyšším přídavkem fenolických látek – 1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$: *R-LMW1000* ($p < 0,01$) v porovnání s kontrolou rašeliníku (R-Control 0). V anaerobní inkubaci nebyl shledán žádný statisticky průkazný rozdíl mezi aktivitou celobiohydrolázy mezi různými přídavky fenolických látek v porovnání s kontrolou.

V porovnání s kontrolou delignifikovaného rašeliníku (D-Control 0) v aerobní inkubaci byla průkazně nižší aktivita celobiohydrolázy až v 56. dni inkubace, a to u variant s vyššími přídavky fenolických látek: *D-LMW1000*, *D-HMW100* a *D-HMW1000* ($p < 0,05$). V porovnání s kontrolou delignifikovaného rašeliníku (D-Control 0) v anaerobní inkubaci byla průkazně vyšší aktivita celobiohydrolázy pouze v 7. dni inkubace u varianty *D-LMW1000* ($p < 0,05$).

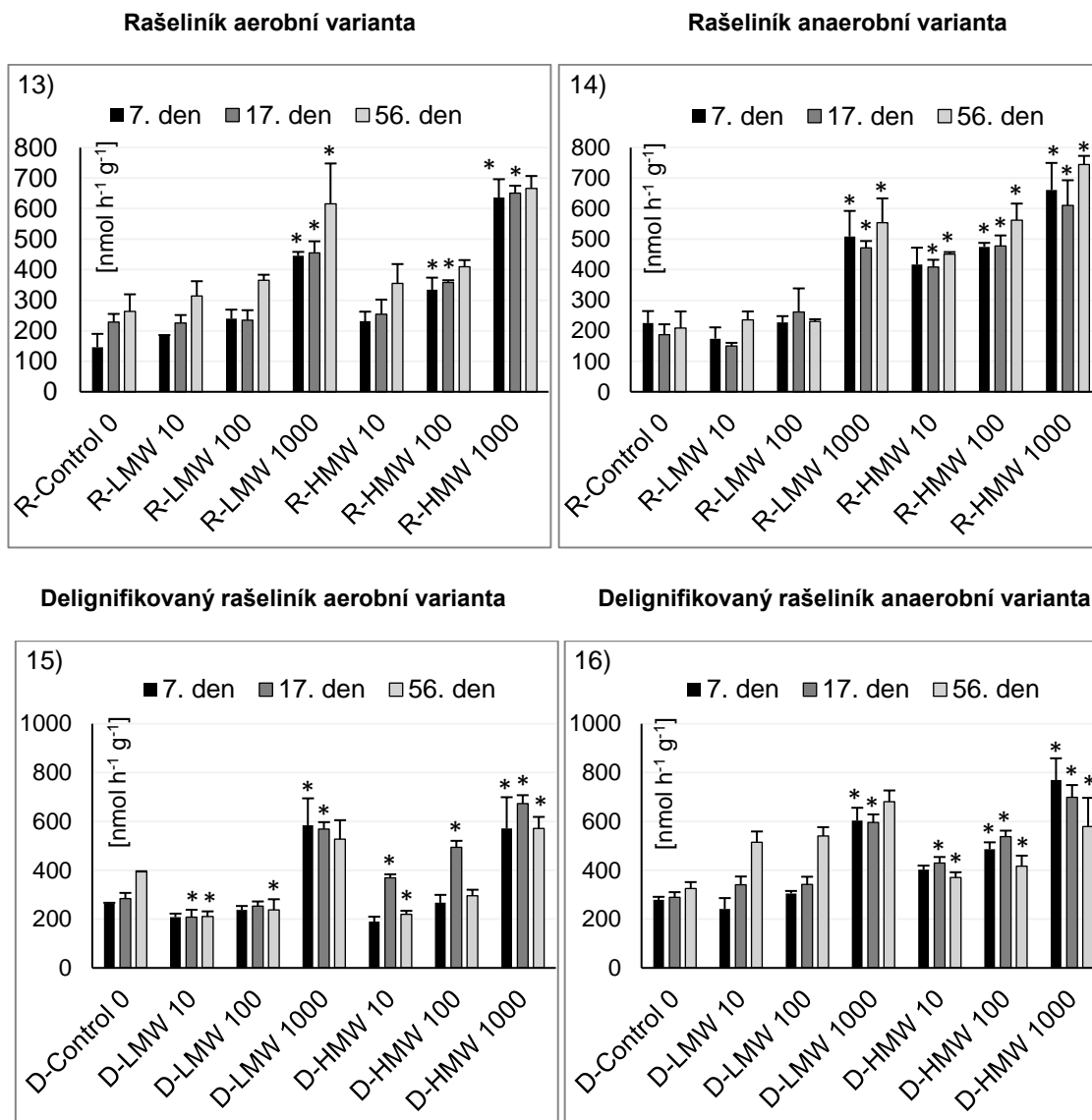
Aktivita celobiohydrolázy v aerobní variantě s rašeliníkem pozitivně korelovala s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,80$), chitinázy ($r = 0,38$), PhOx ($r = 0,40$), TOC ($r = 0,54$) a TDN ($r = 0,44$) a ve variantě s delignifikovaným rašeliníkem pozitivně korelovala s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,92$), fosfatázy ($r = 0,51$), leucinaminopeptidázy ($r = 0,49$), naopak negativně korelovala s aktivitou oxidativních enzymů PhOx ($r = -0,35$), PerOx ($r = -0,34$) a s TOC ($r = -0,26$).

Aktivita celobiohydrolázy v anaerobní variantě s rašeliníkem pozitivně korelovala s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,34$), fosfatázy ($r = 0,45$), chitinázy ($r = 0,69$), s aktivitou oxidativních enzymů PhOx ($r = 0,37$), PerOx ($r = 0,33$) a s TOC ($r = 0,33$) a ve variantě s delignifikovaným rašeliníkem byla nalezena pozitivní korelace

s aktivitou hydrolytických enzymů; celobiohydrolázou ($r = 0,89$), fosfatázou ($r = 0,90$) a chitinázou ($r = 0,91$).

4.1.2 Aktivita oxidativních enzymů

Fenoloxidáza



Graf 13-16: Aktivita fenoloxidázy (PhOx) [$\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$] (průměr \pm SD, $n=3$) v čase: 7., 17. a 56. den inkubace. R/D-Control 0 (kontrola): R-rašelinik; D-delignifikovaný rašelinik + mikrobiální inokulum + přidavek živin. R/D-LMW/HMW10,100,1000: R-rašelinik; D-delignifikovaný rašelinik + mikrobiální inokulum + přidavek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 10, 100, 1000 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. LMW: fenolické látky $M_w < 14$ kDa. HMW: fenolické látky $M_w > 14$ kDa. Hvězdičky nad sloupečky ukazují statisticky významné výsledky Dunnettova testu. Hvězdička nad sloupečkem ukazuje průkazný rozdíl ve srovnání s kontrolou v daném čase (R- nebo D-Control 0).

Aktivita fenoloxidázy se nelišila mezi aerobní a anaerobní inkubací ve variantě s rašeliníkem. Naopak, delignifikovaný rašeliník vykazoval vyšší aktivitu v anaerobních podmínkách inkubace ($p < 0,01$).

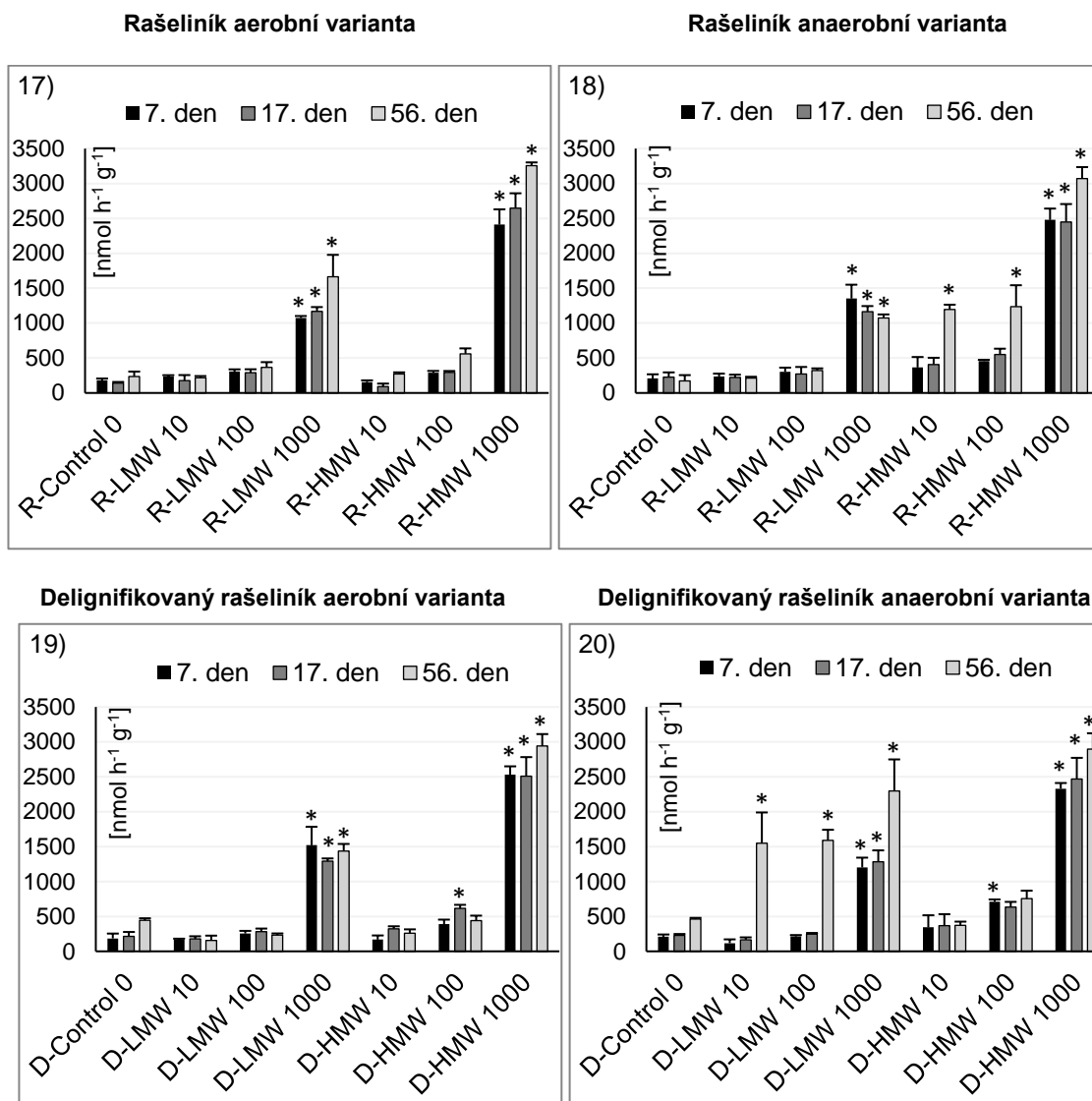
V porovnání s kontrolou rašeliníku (R-Control 0) v aerobní inkubaci byla statisticky průkazně vyšší aktivita PhOx ve variantách s vyššími přídávky fenolických látek: *R-LMW1000*, *R-HMW100* a *R-HMW1000*. ($p < 0,01$). V porovnání s kontrolou rašeliníku (R-Control 0) v anaerobní inkubaci je situace obdobná, navíc je zde vyšší nárůst aktivity PhOx u varianty s nízkým přídávkem fenolických látek: *R-HMW10*.

V porovnání s kontrolou delignifikovaného rašeliníku (D-Control 0) v aerobní inkubaci byla nižší aktivita PhOx ve variantách *D-LMW10*, *D-LMW100*. Naopak vyšší aktivita PhOx byla měřena u varianty s nejvyšším přídávkem fenolických látek *D-LMW1000*, *D-HMW1000*. V porovnání s kontrolou delignifikovaného rašeliníku (D-Control 0) v anaerobní inkubaci byla vyšší aktivita PhOx u variant *D-LMW1000*, *D-HMW10*, *D-HMW100*, *D-HMW1000* ($p < 0,05$).

Aktivita PhOx v aerobní variantě s rašeliníkem pozitivně korelovala s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,40$), PerOx ($r = 0,89$), TOC ($r = 0,80$) a TDN ($r = 0,39$), negativně korelovala s aktivitou leucinaminopeptidázy ($r = -0,42$). Ve variantě s delignifikovaným rašeliníkem aktivita PhOx pozitivně korelovala pouze s aktivitou PerOx ($r = 0,85$) a s TOC ($r = 0,83$) naopak negativně korelovala s aktivitou hydrolytických enzymů; β -glukosidázou ($r = -0,35$), celobiohydrolázou ($r = -0,35$), fosfatázou ($r = -0,29$).

Aktivita PhOx v anaerobní variantě s rašeliníkem pozitivně korelovala s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,40$), PerOx ($r = 0,89$), TOC ($r = 0,71$), TDN ($r = 0,41$), negativně korelovala s aktivitou leucinaminopeptidázy ($r = -0,42$). Ve variantě s delignifikovaným rašeliníkem byla nalezena pozitivní korelace s aktivitou PerOx ($r = 0,83$) a s TOC ($r = 0,68$).

Peroxidáza



Graf 17-20: Aktivita peroxidázy (PerOx) [nmol·h⁻¹·g⁻¹] (průměr ± SD, n=3) v čase: 7., 17. a 56. den inkubace. R/D-Control 0 (kontrola): R-rašeliník; D-delignifikovaný rašeliník + mikrobiální inokulum + přídavek živin. R/D-LMW/HMW10,100,1000: R-rašeliník; D-delignifikovaný rašeliník + mikrobiální inokulum + přídavek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 10, 100, 1000 mg·l⁻¹. LMW: fenolické látky M_w < 14 kDa. HMW: fenolické látky M_w > 14 kDa. Hvězdičky nad sloupečky ukazují statisticky významné výsledky Dunnettova testu. Hvězdička nad sloupečkem ukazuje průkazný rozdíl ve srovnání s kontrolou v daném čase (R- nebo D-Control 0).

Mezi aerobní a anaerobní inkubací nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v aktivitě PerOx ani v jednom typu opadu.

V porovnání s kontrolou rašeliníku (R-Control 0) v aerobní inkubaci byla zaznamenána vyšší aktivita PerOx ve variantách s nejvyššími přídávky fenolických látek 1000 mg·l⁻¹ *R-LMW1000*, *R-HMW1000* ($p < 0,01$). V porovnání s kontrolou rašeliníku (R-Control 0) v anaerobní inkubaci byla navíc zaznamenána vyšší aktivita 56. dni inkubace u variant přídavek *R-HMW10*, *R-HMW100* ($p < 0,01$).

V porovnání s kontrolou delignifikovaného rašeliníku (D-Control 0) v aerobní inkubaci byla statisticky průkazně vyšší aktivita PerOx variantách s nejvyššími přídávky fenolických látek: *D-LMW1000*, *D-HMW1000* ($p < 0,01$) a navíc u varianty *D-HMW100* ($p < 0,01$). V porovnání s kontrolou delignifikovaného rašeliníku (D-Control 0) v anaerobní inkubaci byla vyšší aktivita PerOx ve variantách přídavek *D-LMW1000*, *D-HMW1000* ve všech časech. Vyšší aktivita PerOx byla naměřena u varianty *D-HMW100* pouze v 7. dni aerobní inkubace a v anaerobní inkubaci u variant *D-LMW10*, *D-LMW100* pouze v 56. dni ($p < 0,01$).

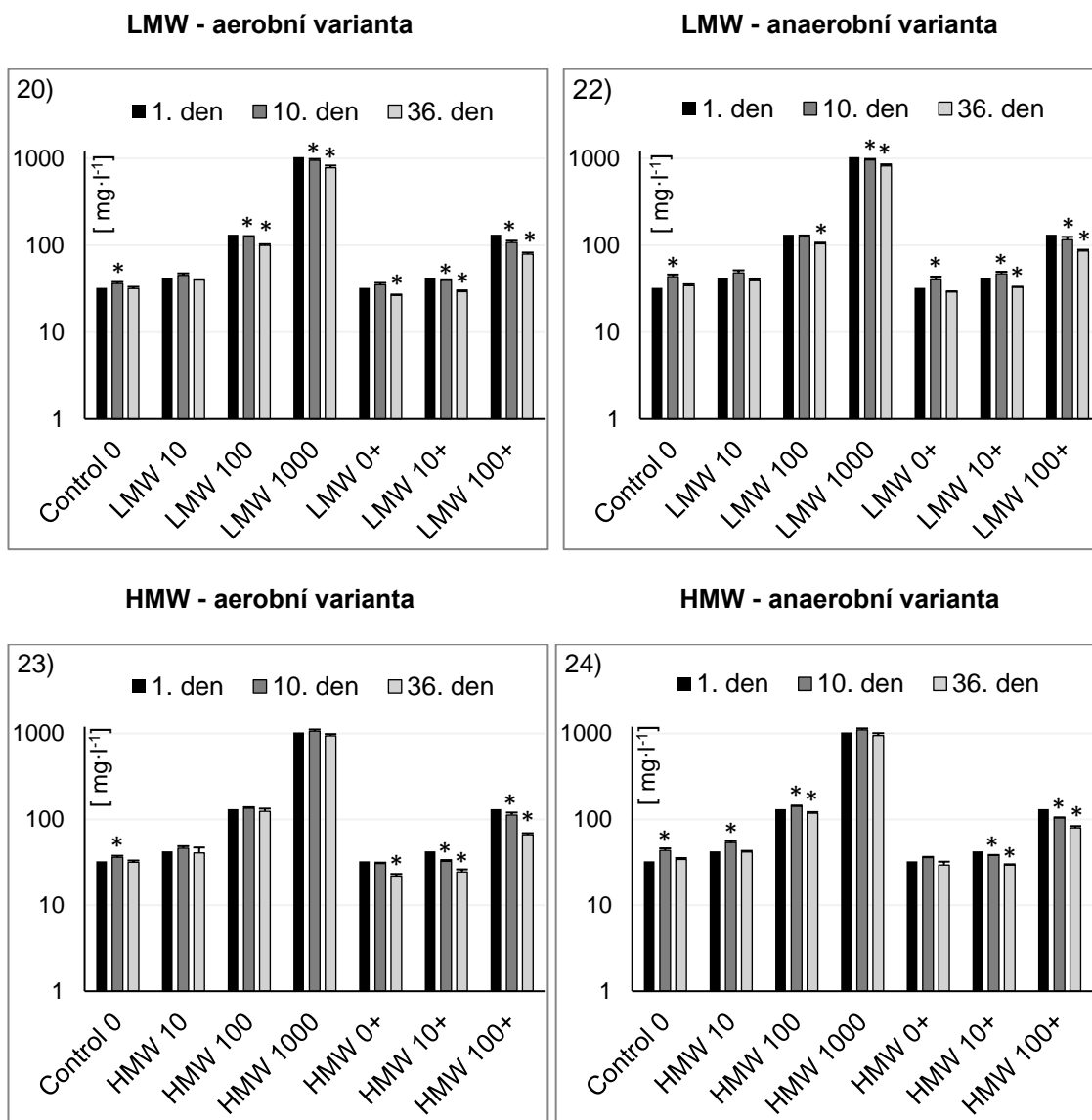
Aktivita PerOx v aerobní variantě s rašeliníkem pozitivně korelovala s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,32$), PhOx ($r = 0,89$), TOC ($r = 0,82$), TDN ($r = 0,36$), negativně korelovala s aktivitou leucinaminopeptidázy ($r = -0,28$). Ve variantě s delignifikovaným rašeliníkem aktivita PhOx pozitivně korelovala pouze s aktivitou PerOx ($r = 0,85$), TOC ($r = 0,85$) naopak negativně korelovala s aktivitou β -glukosidázy ($r = -0,36$) a celobiohydrolázy ($r = -0,36$).

Aktivita PerOx v anaerobní variantě s rašeliníkem pozitivně korelovala s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,47$), celobiohydrolázy ($r = 0,33$), fosfatázy ($r = 0,53$), PhOx ($r = 0,82$), TOC ($r = 0,82$), TDN ($r = 0,46$). Ve variantě s delignifikovaným rašeliníkem byla nalezena pozitivní korelace s aktivitou leucinaminopeptidázy ($r = 0,29$), PhOx ($r = 0,83$) a TOC ($r = 0,81$).

4.2 Laboratorní inkubační experiment s částečným přídatkem živin

Na základě výsledků z prvního experimentu byl navržen druhý experiment, ve kterém byl použit jeden typ opadu (rašeliník) a odlišné přídatky živin upravené podle přídatků koncentrací fenolických látek (LMW/HMW) či žádné přídatky živin.

Koncentrace fenolických látek



Graf 21-24: Koncentrace fenolických látek [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$] (průměr \pm SD, $n=3$) v čase: 1. den – stanovení koncentrace fenolických látek před inkubací; 10. a 35. den inkubace. Control 0 (kontrola): rašeliník + mikrobiální inokulum. LMW/HMW 10,100,1000 – rašeliník + mikrobiální inokulum + přídatvek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 10, 100, 1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. LMW/HMW 0+,10+,100+ – rašeliník + mikrobiální inokulum + přídatvek živin (+) a přídatvek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 0, 10, 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. LMW: fenolické látky $M_w < 14$ kDa.

HMW: fenolické látky $M_w > 14$ kDa. Hvězdičky nad sloupečky ukazují statisticky významné výsledky Dunnettova testu. Hvězdička nad sloupečkem ukazuje průkazný rozdíl ve srovnání s kontrolou v daném čase (Control 0).

Koncentrace fenolických látek se mezi aerobní a anaerobní inkubací nelišily.

Koncentrace fenolických látek LMW v průběhu času v obou inkubacích klesaly. Statisticky průkazný pokles od 1. k 35. dni je u variant s vyššími přídávky fenolických látek – 100 a 1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$: *LMW100* a *LMW1000* a u variant, kde byly navíc dodány živiny: *LMW0+*, *LMW10+*, *LMW100+* ($p < 0,05$).

Koncentrace fenolických látek HMW v průběhu času kolísaly a v 35. dni poklesly. Statisticky průkazný pokles od 1. k 35. dni je v aerobní inkubaci u variant s přídávky fenolických látek a živin: *HMW10+*, *HMW100+* a u varianty bez přídávku živin: *HMW0+* ($p < 0,01$).

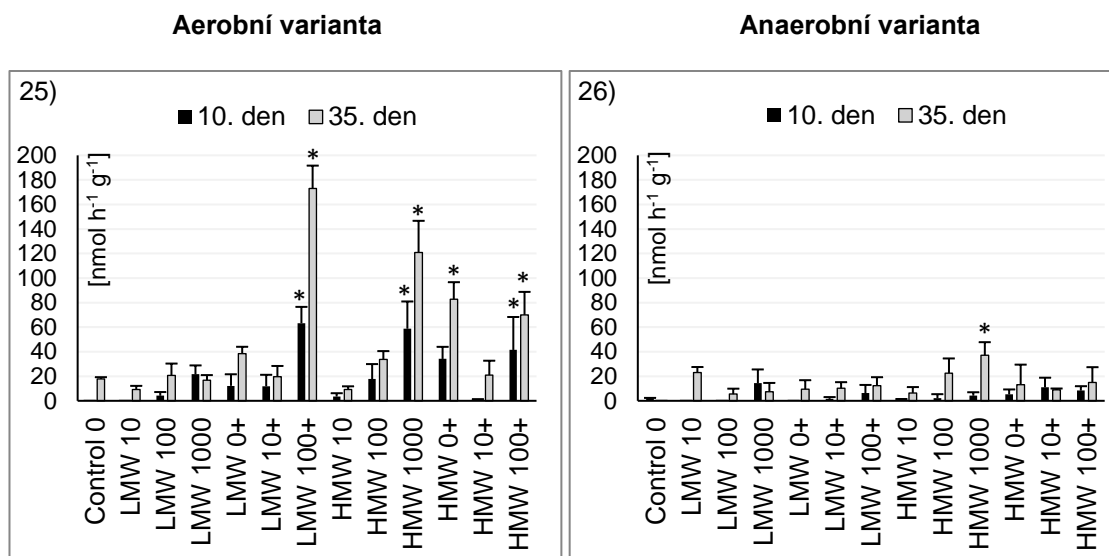
Statisticky průkazný pokles od 1. k 35. dni je v anaerobní inkubaci u variant s přídávky fenolických látek a živin: *HMW10+*, *HMW100+* a u variant bez přídávku živin: *HMW10*, *HMW100*.

Koncentrace fenolických látek v aerobní variantě pozitivně korelovaly s aktivitou celobiohydrolázy ($r = 0,29$), PhOx ($r = 0,68$), PerOx ($r = 0,79$), TOC ($r = 0,96$) a TDN ($r = 0,32$).

V anaerobní variantě koncentrace fenolických látek pozitivně korelovaly s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,31$), chitinázy ($r = 0,34$), PhOx ($r = 0,60$), PerOx ($r = 0,67$), TOC ($r = 0,95$), TDN ($r = 0,31$).

4.2.1 Aktivita hydrolytických enzymů

β-glukosidáza



Graf 25-26: Aktivita β -glukosidázy [nmol·h⁻¹·g⁻¹] (průměr ± SD, n=3) v čase: 10. a 35. dne inkubace. Control 0 (kontrola): rašeliník + mikrobiální inokulum. LMW/HMW10,100,1000: rašeliník + mikrobiální inokulum + přírdek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 10, 100, 1000 mg·l⁻¹. LMW/HMW0+,10+,100+: rašeliník + mikrobiální inokulum + přírdek živin (+) a přírdek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 0, 10, 100 mg·l⁻¹. LMW: fenolické látky M_w < 14 kDa. HMW: fenolické látky M_w > 14 kDa. Hvězdičky nad sloupečky ukazují statisticky významné výsledky Dunnettova testu. Hvězdička nad sloupečkem ukazuje průkazný rozdíl ve srovnání s kontrolou v daném čase (Control 0).

β -glukosidáza vykazovala vyšší aktivitu v aerobních podmínkách než v anaerobních ($p < 0,01$).

V porovnání s kontrolou byl v aerobní inkubaci v 10. dni nalezen průkazný nárůst aktivity u variant s vyššími přírdky fenolických látek – 100 a 1000 mg·l⁻¹: LMW100+, HMW100+ a HMW1000 ($p < 0,05$) a v 35. dni u variant: HMW0+, LMW100+, HMW100+, HMW1000 ($p < 0,01$).

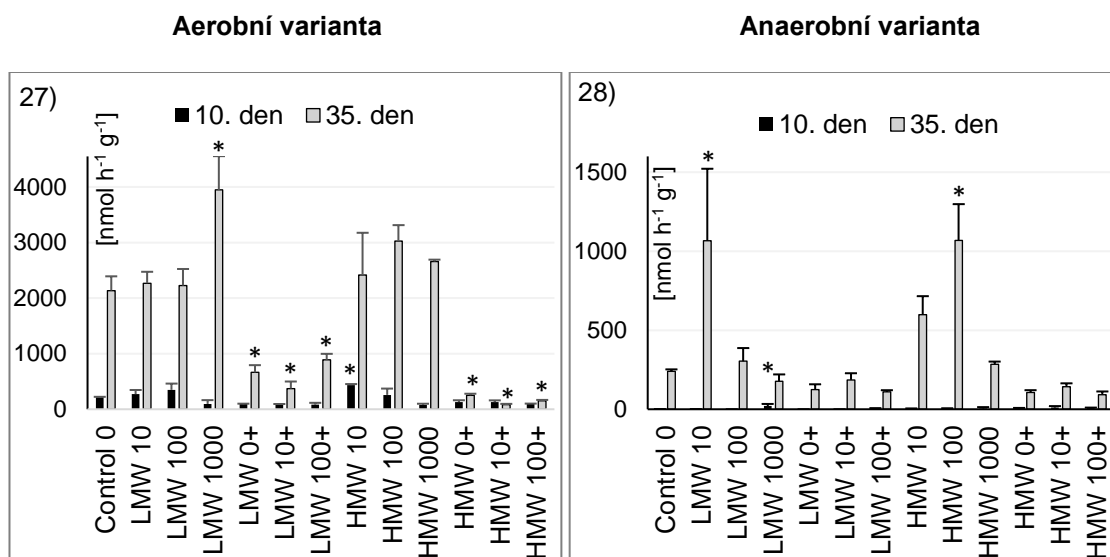
V porovnání s kontrolou byl v anaerobní inkubaci nalezen průkazný rozdíl pouze v 35. dni u vysokého přírdku fenolických látek – 1000 mg·l⁻¹: HA1000 ($p < 0,01$).

Aktivita β -glukosidázy v čase rostla.

Aktivita β -glukosidázy v aerobní variantě pozitivně korelovala s aktivitou celobiohydrolázy ($r = 0,61$), chitinázy ($r = 0,42$), PerOx ($r = 0,29$) a s TDN ($r = 0,41$).

V anaerobní variantě korelovala aktivita β -glukosidázy se všemi aktivitami ostatních enzymů; celobiohydrolázou ($r = 0,43$), fosfatázou ($r = 0,43$), leucinaminopeptidázou ($r = 0,32$), chitinázou ($r = 0,41$) a s oxidativními enzymy PhOx ($r = 0,27$) a PerOx ($r = 0,28$).

Fosfatáza



Graf 27-28: Aktivita fosfatázy [$\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$] (průměr \pm SD, $n=3$) v čase: 10. a 35. dne inkubace. Control 0 (kontrola): rašeliník + mikrobiální inokulum. LMW/HMW10,100,1000: rašeliník + mikrobiální inokulum + přídavek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 10, 100, 1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. LMW/HMW0+,10+,100+: rašeliník + mikrobiální inokulum + přídavek živin (+) a přídavek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 0, 10, 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. LMW: fenolické látky $M_w < 14$ kDa. HMW: fenolické látky $M_w > 14$ kDa. Hvězdičky nad sloupečky ukazují statisticky významné výsledky Dunnettova testu. Hvězdička nad sloupečkem ukazuje průkazný rozdíl ve srovnání s kontrolou v daném čase (Control 0).

Fosfatáza vykazovala vyšší aktivitu v aerobní inkubaci než v inkubaci anaerobní a byl mezi nimi shledán statisticky průkazný rozdíl ($p < 0,01$).

V porovnání s kontrolou byla v aerobní inkubaci v 10. dni statisticky průkazně odlišná pouze varianta *HMW10* ($p < 0,05$). V 35. dni všechny byly varianty s přídavkem živin průkazně nižší než kontrola *LMW/HMW0+*, *LMW/HMW10+*, *LMW/HMW100+*. Pouze varianta *LMW1000* byla průkazně vyšší než kontrola ($p < 0,01$).

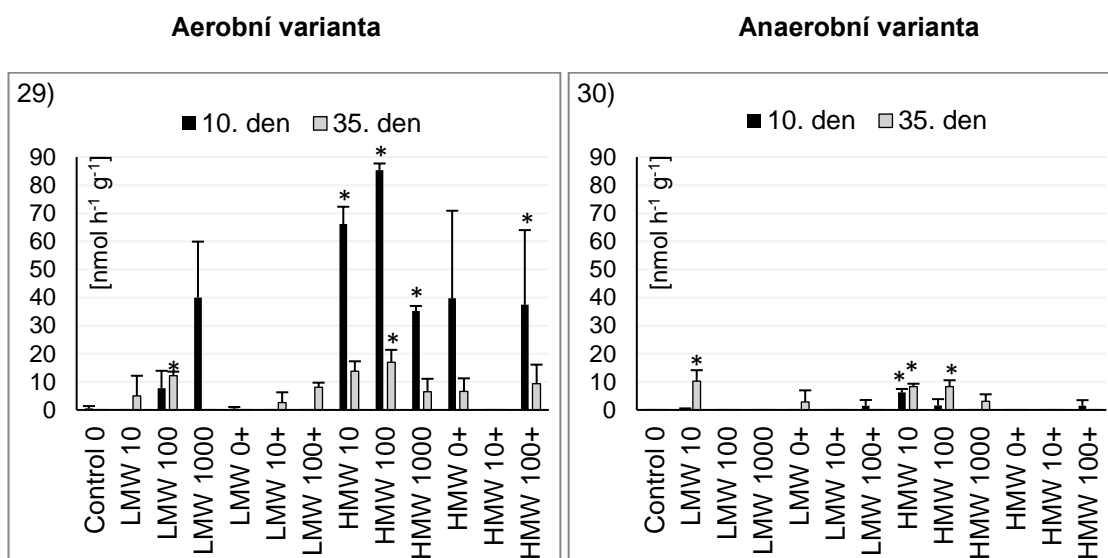
V porovnání s kontrolou byla v anaerobní inkubaci v 10. dni statisticky průkazně odlišná varianta s nejvyšším přídavkem fenolických látek 1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ *LMW1000* ($p < 0,05$). V 35. dni byly vyšší pouze varianty *LMW10* a *HMW100* ($p < 0,01$).

Aktivita fosfatázy v čase rostla.

V aerobní variantě nebyl nalezen statisticky průkazný korelační vztah mezi aktivitou fosfatázy a ostatními enzymy. Aktivita fosfatázy zde negativně korelovala s TDN ($r = -0,37$).

V anaerobní variantě aktivita fosfatázy pozitivně korelovala s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,43$), celobiohydrolázy ($r = 0,40$) a leucinaminopeptidázy ($r = 0,75$), naopak negativně korelovala s TDN ($r = -0,39$).

Leucinaminopeptidáza



Graf 29-30: Aktivita leucinaminopeptidázy [nmol·h⁻¹·g⁻¹] (průměr ± SD, n=3) v čase: 10. a 35. dne inkubace. Control 0 (kontrola): rašelínik + mikrobiální inokulum. LMW/HMW10,100,1000: rašelínik + mikrobiální inokulum + přídatek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 10, 100, 1000 mg·l⁻¹. LMW/HMW0+,10+,100+: rašelínik + mikrobiální inokulum + přídatek živin (+) a přídatek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 0, 10, 100 mg·l⁻¹. LMW: fenolické látky M_w < 14 kDa. HMW: fenolické látky M_w > 14 kDa. Hvězdičky nad sloupečky ukazují statisticky významné výsledky Dunnettova testu. Hvězdička nad sloupečkem ukazuje průkazný rozdíl ve srovnání s kontrolou v daném čase (Control 0).

Leucinaminopeptidáza vykazovala vyšší aktivitu v aerobní inkubaci než v inkubaci anaerobní a byl mezi nimi shledán statisticky průkazný rozdíl ($p < 0,01$).

V porovnání s kontrolou byly v aerobní inkubaci v 10. dni statisticky průkazně vyšší varianty *HMW10*, *HMW100*, *HMW1000*, *HMW100+*. V 35. dni varianty *LMW/HMW100* ($p < 0,05$).

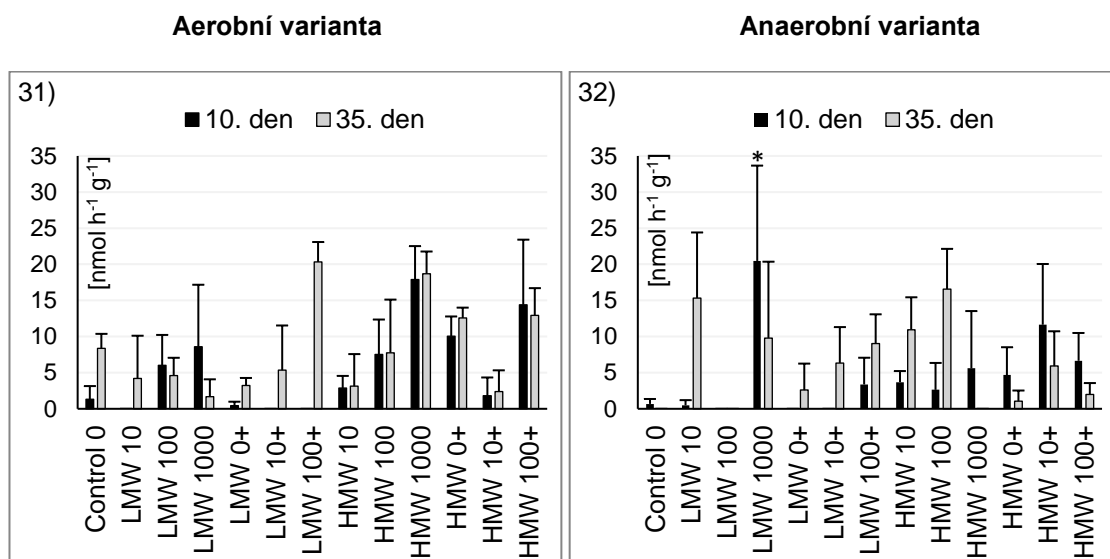
V porovnání s kontrolou byla v anaerobní inkubaci v 10. dni statisticky průkazně vyšší pouze varianta s nejnižším přídatkem fenolických látek 10 mg·l⁻¹: *HMW10* ($p < 0,01$). V 35. dni varianty *LMW/HMW10*, *HMW100*.

Aktivita leucinaminopeptidázy v aerobní inkubaci v čase klesala. V anaerobní inkubaci je efekt času nejednoznačný.

Aktivita leucinaminopeptidázy v aerobní variantě pozitivně korelovala s aktivitou PhOx ($r = 0,29$), negativně korelovala s TDN ($r = -0,32$).

V anaerobní variantě aktivita leucinaminopeptidázy pozitivně korelovala s aktivitami všech ostatních hydrolytických enzymů; β -glukosidázou ($r = 0,32$), celobiohydrolázou ($r = 0,39$), fosfatázou ($r = 0,75$) a chitinázou ($r = 0,23$). Negativní korelační vztah byl nalezen s TDN ($r = -0,41$).

Celobiohydroláza



Graf 31-32: Aktivita celobiohydrolázy [nmol·h⁻¹·g⁻¹] (průměr ± SD, n=3) v čase: 10. a 35. dne inkubace. Control 0 (kontrola): rašeliník + mikrobiální inokulum. LMW/HMW10,100,1000: rašeliník + mikrobiální inokulum + přídatkem fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 10, 100, 1000 mg·l⁻¹. LMW/HMW0+,10+,100+: rašeliník + mikrobiální inokulum + přídatkem živin (+) a přídatkem fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 0, 10, 100 mg·l⁻¹. LMW: fenolické látky M_w < 14 kDa. HMW: fenolické látky M_w > 14 kDa. Hvězdičky nad sloupečky ukazují statisticky významné výsledky Dunnettova testu. Hvězdička nad sloupečkem ukazuje průkazný rozdíl ve srovnání s kontrolou v daném čase (Control 0).

Aktivita celobiohydrolázy se nelišila mezi aerobní a anaerobní inkubací.

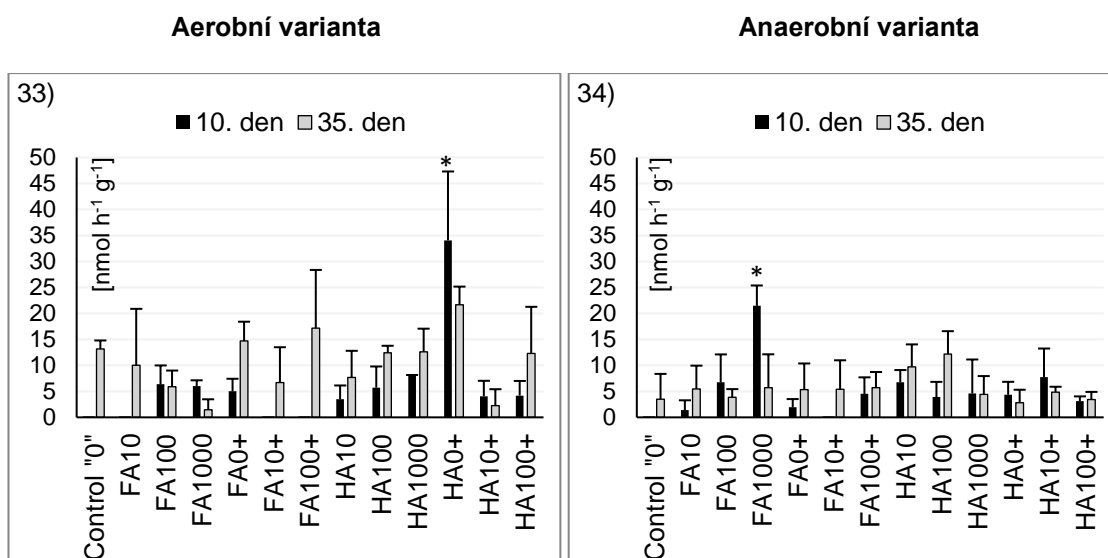
V porovnání s kontrolou neměly v aerobní inkubaci v 10. a 35. dni různé přídavky fenolických látek a živin žádný vliv na aktivitu celobiohydrolázy.

V porovnání s kontrolou byl v anaerobní inkubaci nalezen rozdíl pouze v 10. dni s nejvyšším přídavkem fenolických látek 1000 mg·l⁻¹: *LMW1000* ($p < 0,05$).

Aktivita celobiohydrolázy v aerobní variantě pozitivně korelovala s aktivitou β-glukosidázy ($r = 0,61$), chitinázy ($r = 0,49$) a PerOx ($r = 0,30$).

V anaerobní variantě aktivita celobiohydrolázy pozitivně korelovala s aktivitou β-glukosidázy ($r = 0,43$), fosfatázy ($r = 0,40$), leucinaminopeptidázy ($r = 0,39$) a chitinázy ($r = 0,70$).

Chitináza



Graf 33-34: Aktivita chitinázy [nmol·h⁻¹·g⁻¹] (průměr ± SD, n=3) v čase: 10. a 35. dne inkubace. Control 0 (kontrola): rašeliník + mikrobiální inokulum. LMW/HMW10,100,1000: rašeliník + mikrobiální inokulum + přídavek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 10, 100, 1000 mg·l⁻¹. LMW/HMW0+,10+,100+: rašeliník + mikrobiální inokulum + přídavek živin (+) a přídavek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 0, 10, 100 mg·l⁻¹. LMW: fenolické látky M_w < 14 kDa. HMW: fenolické látky M_w > 14 kDa. Hvězdičky nad sloupečky ukazují statisticky významné výsledky Dunnettova testu. Hvězdička nad sloupečkem ukazuje průkazný rozdíl ve srovnání s kontrolou v daném čase (Control 0).

Aktivita chitinázy se nelišila mezi aerobní a anaerobní inkubací.

V porovnání s kontrolou byl v aerobní inkubaci nalezen průkazný rozdíl pouze v 10. dni u varianty *HMW0+* ($p < 0,01$).

V porovnání s kontrolou byl v anaerobní inkubaci nalezen průkazný rozdíl pouze v 10. dni u varianty s nejvyšším přidavkem fenolických látek 1000 mg·l⁻¹: LMW1000 ($p < 0,01$).

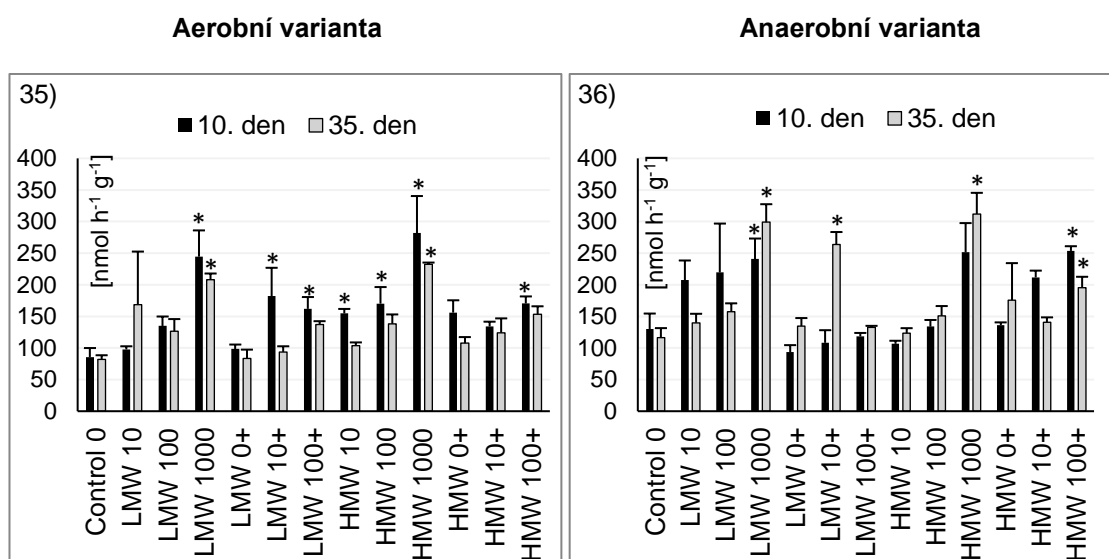
Nebyl nalezen jednoznačný trend aktivity chitinázy v čase.

Aktivita chitinázy v aerobní variantě pozitivně korelovala pouze s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,42$) a celobiohydrolázy ($r = 0,49$).

V anaerobní variantě aktivita chitinázy pozitivně korelovala s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,41$), celobiohydrolázy ($r = 0,70$), leucinaminopeptidázy ($r = 0,23$) a s TOC ($r = 0,24$).

4.2.2 Aktivita oxidativních enzymů

Fenoloxidáza



Graf 35-36: Aktivita fenoloxidázy (PhOx) [nmol·h⁻¹·g⁻¹] (průměr ± SD, n=3) v čase: 10. a 35. dne inkubace. Control 0 (kontrola): rašeliník + mikrobiální inokulum. LMW/HMW10,100,1000: rašeliník + mikrobiální inokulum + přidavek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 10, 100, 1000 mg·l⁻¹. LMW/HMW0+,10+,100+: rašeliník + mikrobiální inokulum + přidavek živin (+) a přidavek fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 0, 10, 100 mg·l⁻¹. LMW: fenolické látky M_w < 14 kDa. HMW: fenolické látky M_w > 14 kDa. Hvězdičky nad sloupečky ukazují statisticky významné výsledky Dunnettova testu. Hvězdička nad sloupečkem ukazuje průkazný rozdíl ve srovnání s kontrolou v daném čase (Control 0).

Aktivita PhOx se v 10. den inkubace mezi aerobní a anaerobní variantou nelišila. V 35. dni již byla aktivita PhOx vyšší v anaerobních podmínkách ($p < 0,01$).

V porovnání s kontrolou byla v aerobní inkubaci v 10. dni nalezena průkazně vyšší aktivita u variant s různým přídatkem fenolických látek: *LMW1000*, *LMW10+*, *LMW100+*, *HMW10*, *HMW100*, *HMW1000*, *HMW100+*. V 35. dni pouze u variant s vysokým přídatkem fenolických látek $1000 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$: *LMW/HMW1000* ($p < 0,01$).

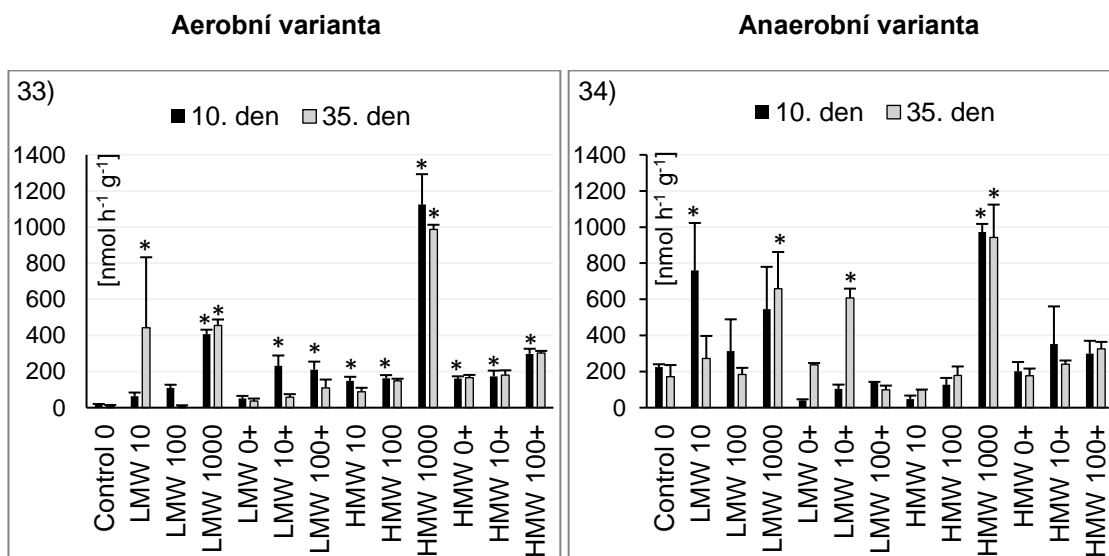
V porovnání s kontrolou byla v anaerobní inkubaci v 10. dni měřena vyšší aktivita PhOx u variant s vyšším přídatkem fenolických látek: *LMW1000*, *HMW100+* ($p < 0,01$). V 35. dni u variant *LMW1000*, *LMW10+*, *HMW1000*, *HMW100+* ($p < 0,05$).

V aerobní inkubaci se v průběhu času aktivita PhOx snižovala ($p = 0,044$). V anaerobní inkubaci neměl čas na aktivitu PhOx vliv ($p = 0,521$).

Aktivita PhOx v aerobní variantě pozitivně korelovala s aktivitou leucinaminopeptidázy ($r = 0,29$), PerOx ($r = 0,80$), TOC ($r = 0,64$) a TDN ($r = 0,27$).

V anaerobní variantě aktivita PhOx pozitivně korelovala s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,27$), PerOx ($r = 0,75$) a s TOC ($r = 0,58$).

Peroxidáza



Graf 37-38: Aktivita peroxidázy (PerOx) [$\text{nmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$] (průměr \pm SD, $n=3$) v čase: 10. a 35. dne inkubace. Control 0 (kontrola): rašeliník + mikrobiální inokulum. LMW/HMW10,100,1000: rašeliník + mikrobiální inokulum + přídatkem fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 10, 100, 1000 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. LMW/HMW0+,10+,100+: rašeliník + mikrobiální inokulum + přídatkem živin (+) a přídatkem fenolických látek (LMW/HMW) v koncentracích 0, 10, 100 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. LMW: fenolické látky $M_w < 14 \text{ kDa}$. HMW: fenolické látky $M_w > 14 \text{ kDa}$. Hvězdičky nad sloupečky ukazují

statisticky významné výsledky Dunnettova testu. Hvězdička nad sloupečkem ukazuje průkazný rozdíl ve srovnání s kontrolou v daném čase (Control 0).

Aktivita PerOx se v 10. den inkubace mezi aerobní a anaerobní variantou nelišila, avšak v 35. dni je aktivita PerOx vyšší v anaerobních podmínkách než v aerobních ($p = 0,05$).

V porovnání s kontrolou byly v aerobní inkubaci v 10. dni nalezeny průkazně vyšší aktivity u všech variant kromě *LMW10*, *LMW100* a *LMW0+*. V 35 dni však jen u *LMW10*, *LMW/HMW1000*. ($p < 0,05$).

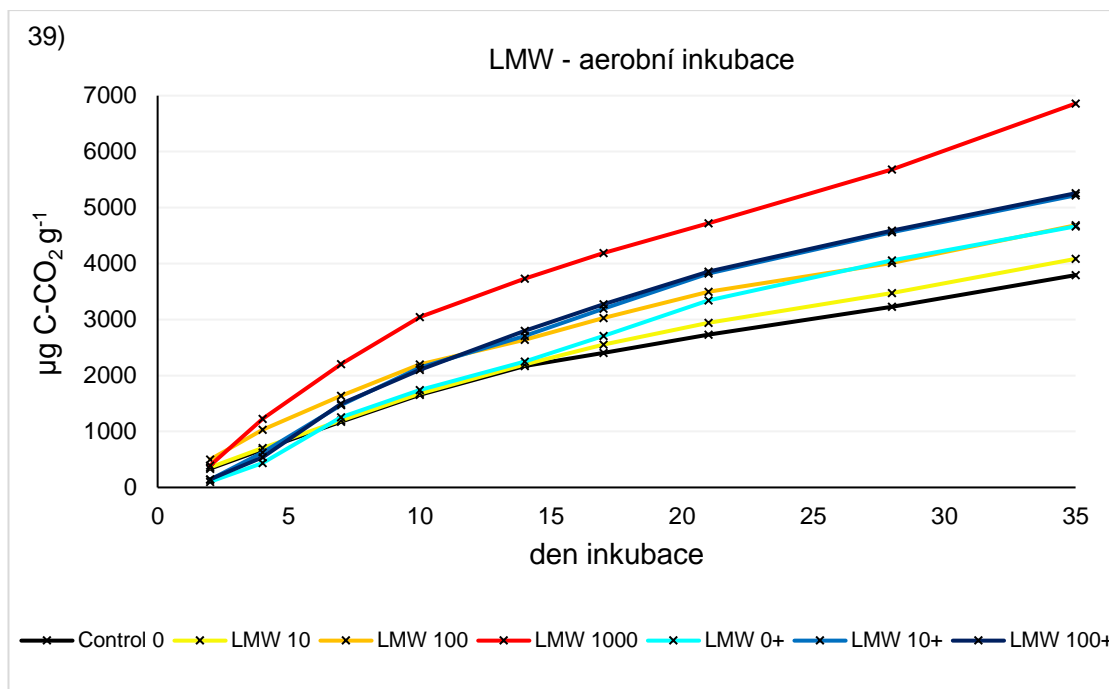
V porovnání s kontrolou byla v anaerobní inkubaci v 10. dni měřena průkazně vyšší aktivita u variant *LMW10* a *HMW1000*. V 35. dni byla průkazně vyšší aktivita u variant s nejvyšším přídatkem fenolických látek *LMW/HMW1000* a *LMW10+* ($p < 0,01$).

Aktivita PerOx se v čase neměnila.

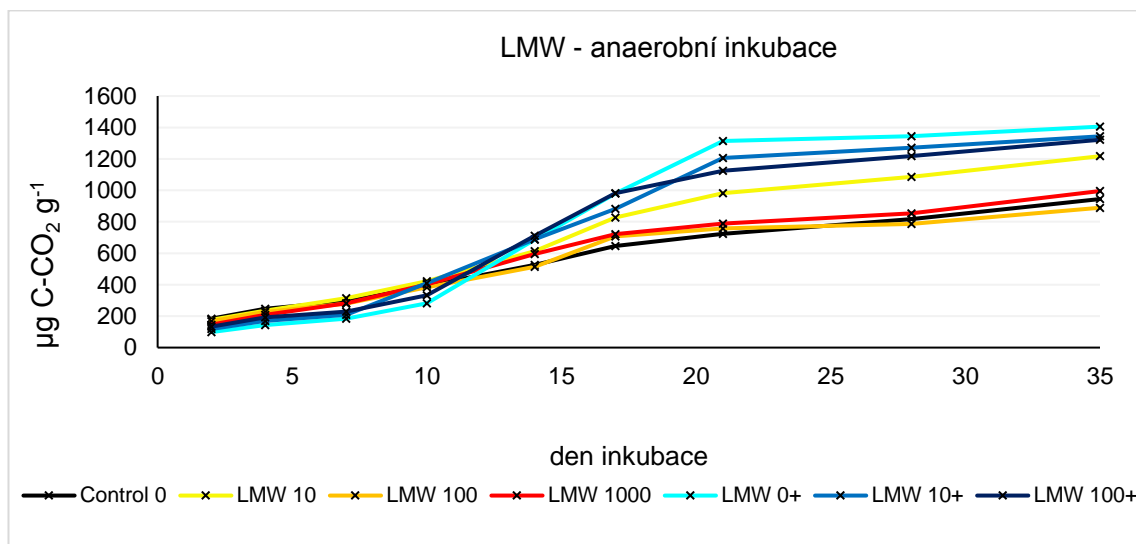
Aktivita PerOx v aerobní variantě pozitivně korelovala s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,29$), celobiohydrolázy ($r = 0,30$), PerOx ($r = 0,80$), TOC ($r = 0,66$), a s TDN ($r = 0,28$).

V anaerobní variantě aktivita PerOx pozitivně korelovala s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,28$), PerOx ($r = 0,75$) a s TOC ($r = 0,57$).

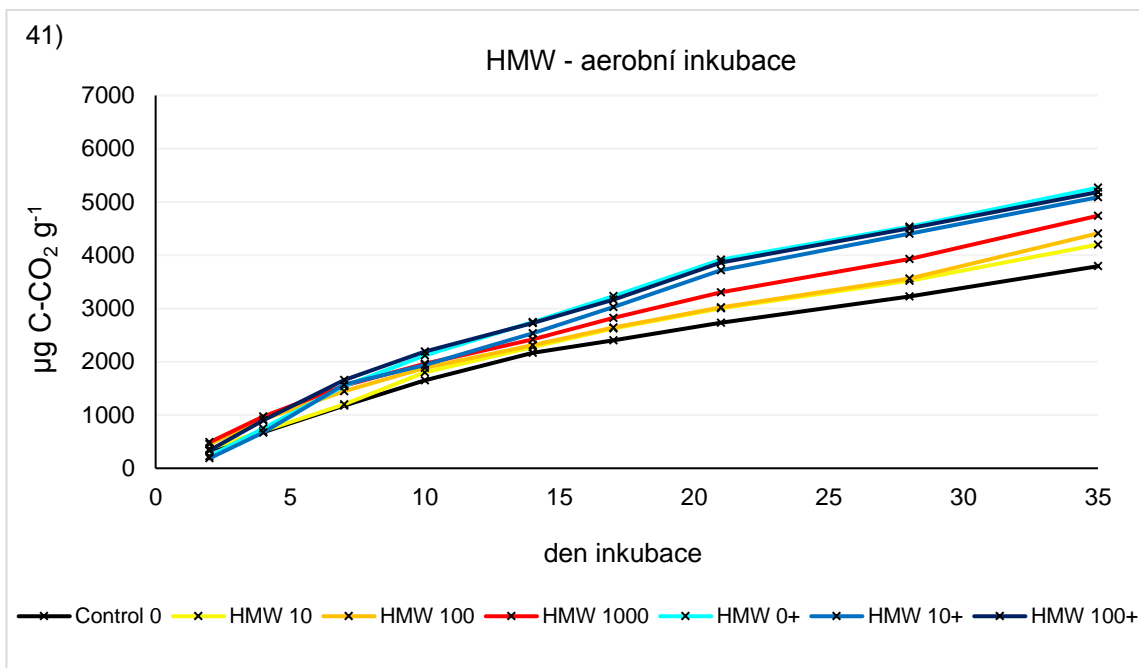
Kumulativní mikrobiální respirace



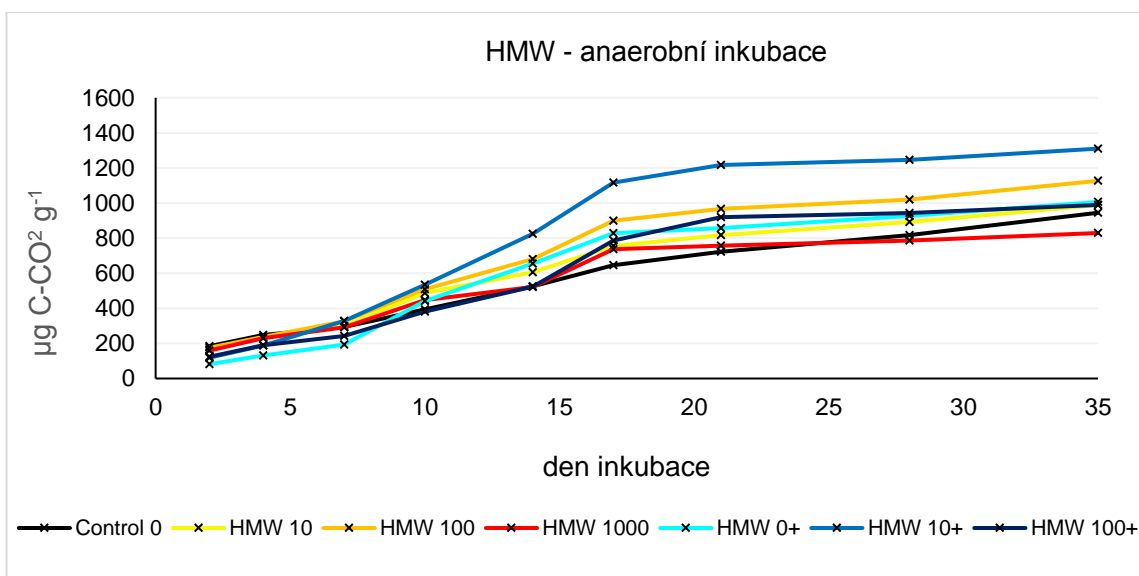
Graf 39: Kumulativní mikrobiální respirace aerobní inkubace za 35 dnů s přidavkem fenolických látek $M_w < 14$ kDa (LMW). Control 0 (kontrola): rašeliník + mikrobiální inokulum. LMW10,100,1000: rašeliník + mikrobiální inokulum + přidavek fenolických látek (LMW) v koncentracích 10, 100, 1000 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. LMW0+,10+,100+: rašeliník + mikrobiální inokulum + přidavek živin (+) a přidavek fenolických látek (LMW) v koncentracích 0, 10, 100 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$.



Graf 40: Kumulativní mikrobiální respirace anaerobní inkubace za 35 dnů s přidavkem fenolických látek $M_w < 14$ kDa (LMW). Control 0 (kontrola): rašeliník + mikrobiální inokulum. LMW10,100,1000: rašeliník + mikrobiální inokulum + přidavek fenolických látek (LMW) v koncentracích 10, 100, 1000 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. LMW0+,10+,100+: rašeliník + mikrobiální inokulum + přidavek živin (+) a přidavek fenolických látek (LMW) v koncentracích 0, 10, 100 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$.



Graf 41: Kumulativní mikrobiální respirace aerobní inkubace za 35 dnů s přidavkem fenolických látek $M_w > 14$ kDa (HMW). Control 0 (kontrola): rašeliník + mikrobiální inokulum. HMW10,100,1000: rašeliník + mikrobiální inokulum + přidavek fenolických látek (HMW) v koncentracích 10, 100, 1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. HMW0+,10+,100+: rašeliník + mikrobiální inokulum + přidavek živin (+) a přidavek fenolických látek (HMW) v koncentracích 0, 10, 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.



Graf 42: Kumulativní mikrobiální respirace anaerobní inkubace za 35 dnů s přidavkem fenolických látek $M_w > 14$ kDa (HMW). Control 0 (kontrola): rašeliník + mikrobiální inokulum. HMW10,100,1000: rašeliník + mikrobiální inokulum + přidavek fenolických látek (HMW) v koncentracích 10, 100, 1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. HMW0+,10+,100+: rašeliník + mikrobiální inokulum + přidavek živin (+) a přidavek fenolických látek (HMW) v koncentracích 0, 10, 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Kumulativní respirace je v aerobní inkubaci několikrát vyšší než v inkubaci anaerobní.

V porovnání s kontrolou bylo celkové množství vyrespirovaného C v aerobních podmínkách za dobu inkubace (35 dnů) vyšší u všech variant s přídávkami živin (+) a u variant s vyššími přídávky fenolických látek: *LMW100*, *LMW1000*, *HMW1000*.

V případně anaerobní varianty neměl přídavek fenolických látek a živin vliv na mikrobiální respiraci.

Kumulativní mikrobiální respirace v aerobní variantě pozitivně korelovaly s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,37$), fosfatázy ($r = 0,55$) a chitinázy ($r = 0,33$). Negativně korelovala s aktivitou leucinaminopeptidázy ($r = -0,35$).

Kumulativní mikrobiální respirace v anaerobní variantě pozitivně korelovaly s aktivitou β -glukosidázy ($r = 0,30$), fosfatázy ($r = 0,50$) a leucinaminopeptidázy ($r = 0,26$).

Pro lepší přehlednost dosažených kumulativních mikrobiálních respirací a jejich interpretaci byly hodnoty směrodatných odchylek (\pm SD) z grafů vyloučeny.

5 Diskuze

5.1 Vliv aerobních a anaerobních podmínek na aktivitu oxidativních enzymů

Obecně mají vodou nasycené anaerobní podmínky rašelinišť negativní vliv na rozkladné procesy a mikrobiální aktivitu. Některé studie uvádějí, že anaerobní podmínky rašelinišť jsou zodpovědné za akumulaci fenolických látek vlivem nízké aktivity oxidativních enzymů, které jako jedny z mála dokáží degradovat těžko rozložitelné fenolické látky. Jejich hromadění může vést k následné inhibici hydrolytických enzymů, a tedy k celkovému potlačení rozkladu organické hmoty (např. Appel et al., 1993; Fenner et al., 2005; Fenner & Freeman, 2011; Freeman et al., 2001;2004). V posledních letech se však objevilo mnoho studií, které tyto souvislosti nepotvrzují nebo je potvrzují pouze částečně (např. Brouns et al., 2014; Toberman et al., 2010; Williams et al., 2000). V důsledku těchto protichůdných názorů a skutečností se ukazuje, že souvislosti mezi fenolickými látkami a oxidativními a hydrolytickými enzymy nejsou tak jednoznačné, a že do řízení dekompozičních procesů vstupují další faktory, než je pouze dostupnost O₂.

Na základě dosavadních studií jsem tedy předpokládala, že aktivita oxidativních enzymů bude v anaerobním prostředí limitována. Výsledky, které byly zcela v rozporu s očekáváním, přineslo anaerobní prostředí, kde vykazovaly oba oxidativní enzymy stejné aktivity jako v aerobních podmínkách. V případě prvního experimentu lze pravděpodobně vysvětlit tuto vyšší aktivitu v anaerobních podmínkách dodanými přísadkami živin, které mohly odstranit limitaci dostupného O₂. S přísadkami živin se zároveň dodaly elektronové akceptory, které mohly v anaerobních podmínkách potlačit limitaci O₂ a sloužit jako elektronový akceptor pro fungování oxidativních enzymů. Dostupnost elektronových akceptorů ovlivňuje množství mikroorganismů, tvorbu enzymů a rozklad organické hmoty (McLatchey & Reddy, 1998). Během inkubace mohlo tedy pravděpodobně docházet k využívání jiných elektronových akceptorů jako jsou například ionty železa (Ponnamperuma, 1972). Při nízkých koncentracích O₂ dokáže PhOx za přítomnosti iontů Fe²⁺ účinně oxidovat fenolické látky (Bodegom et al., 2005; Hall & Silver, 2013). Výsledky z prvního experimentu dobře zapadají do výsledků studie McLatchey & Reddy (1998) kde zjistili, že v anaerobních podmínkách je řídicím faktorem aktivity enzymů nedostatek dostupných elektronových akceptorů. Naopak

Freeman et al. (2001; 2004) uvádí asi sedmkrát nižší aktivitu PhOx v anaerobních podmínkách ve srovnání s aerobním prostředím a považuje dostupnost O₂ za hlavní řídicí faktor ovlivňující aktivitu PhOx.

Ovšem podobně vysoké aktivity oxidativních enzymů byly naměřeny i v druhém experimentu, kde byly použity přídatky fenolických látek bez přídatku živin anebo byly přídatky živin oproti prvnímu experimentu značně zredukovány. To ovšem zdůrazňuje fakt, že aktivita oxidativních enzymů nebyla limitována nedostatkem dostupného O₂ i přes značné zredukování množství živin. To tedy může znamenat, že mikroorganismy a jejich vylučované oxidativní enzymy jsou adaptované na anaerobní a živinami chudé prostředí rašelinišť. Rovněž ve studii Sun et al. (2010) pozorovali vyšší aktivitu PhOx v anaerobních podmínkách v porovnání s aerobními. Zde ale vysvětlují, že pro aktivitu PhOx je zásadní vlhkost půdy ale nevylučují také efekt fyzikálních vlastností půdy, se kterým souvisí vodivost nebo pórovitost půdy. Podobné výsledky publikuje také studie Toberman et al. (2008) kde zjistili, že během období sucha docházelo v horní vrstvě rašeliny k významnému snížení aktivity PhOx. Z výsledků těchto studií vyplývá, že pro aktivitu oxidativního enzymu PhOx je pravděpodobně zásadní také určitá optimální půdní vlhkost. S půdní vlhkostí souvisí také změny v klimatických poměrech, kdy během suchých období dochází k vysušení a rozšíření horní aerobní vrstvy rašeliny, jejichž důsledkem je snížení pH rašeliny. To může vést ke snížení aktivity PhOx, jelikož tento enzym reaguje velice rychle na změny v pH (Pind et al., 1994; Xiang et al., 2013)

Studie, které se zabývaly srovnáním enzymové aktivity enzymů mezi různými typy rašelinišť, pozorovaly vyšší aktivitu oxidativních enzymů v minerotrofních rašeliništích v porovnání s ombrotrofními rašeliništi (např. Brouns et al., 2016; Sun et al., 2010). To je přisuzováno především rozdílu v kvalitě rašelinného substrátu v důsledku různého vegetačního složení, ale také rozdílným hodnotám pH, což celkově ovlivňuje dostupnost substrátu a živin pro mikroorganismy a tím tedy také sekreci enzymů (Pind et al., 1994; Williams et al., 2000).

Výsledky našich experimentů ukázaly, že oxidativní enzymy nejsou limitovány anaerobním prostředím, jak předpokládá teorie enzymatické smyčky. Současně i z výsledků jiných studií vyplývá, že za limitací aktivit oxidativních enzymů stojí celá řada spolu souvisejících faktorů.

5.2 Vliv aerobních a anaerobních podmínek na aktivitu hydrolytických enzymů

Aktivita hydrolytických enzymů není přímo závislá na přítomnosti dostupného O₂ (Reddy & DeLaune, 2008). Přesto několik studií ukazuje, že v anaerobních podmínkách může docházet ke snížení jejich aktivit o 24-47 % (Freeman et al., 2001; 2004). Teorie enzymatické smyčky předpokládá, že je tento pokles způsoben právě hromaděním fenolických látek v anaerobním prostředí (Freeman et al. 2001; 2004). Druhým vysvětlením je celkové snížení mikrobiální aktivity a mikrobiální biomasy v anaerobních podmínkách, kdy je energetický výnos rozkladných reakcí nižší než za přítomnosti O₂, a tedy možnosti mikroorganismů investovat do produkce enzymů jsou omezené (McLatchey & Reddy 1998). Významný vliv na aktivitu hydrolytických enzymů v rašelinistích může mít také periodické zaplavování rašeliny. To může vést k vyrovnání aktivit hydrolytických enzymů, jelikož makropóry a mikropóry rašeliny nemusí být zcela zasyceny vodou (Hall et al., 2014). Zdá se tedy, že hydrolytické enzymy mají schopnost být aktivní po delší dobu ve vrstvách rašeliny, kde může docházet k periodickému zaplavení a vysušení. Výsledky mých experimentů jsou částečně v souladu s výše uvedenými studiemi, jelikož se ukázalo, že většina hydrolytických enzymů měla vyšší aktivitu v aerobním než v anaerobním prostředí. Koncentrace rozpustných fenolických látek korelovaly pozitivně s aktivitou hydrolytických enzymů v aerobním i anaerobním prostředí. To může souviset s celkově vyšší mikrobiální aktivitou v aerobních podmínkách, kterou jsem také zaznamenala ve srovnání s anaerobními podmínkami nikoli však inhibicí fenolickými látkami, jak předpokládá teorie enzymatické smyčky (Freeman et al., 2001; 2004).

5.3 Změny koncentrací rozpustných fenolických látek v průběhu inkubace

Rozklad fenolických látek je podmíněn především molekulovou hmotností. Nízkomolekulární rozpustné fenolické látky jsou poměrně dobře rozložitelné a mohou sloužit jako zdroj snadno dostupné energie a uhlíku, avšak mohou také působit toxicky na mikroorganismy. Naopak vysokomolekulární fenolické látky jsou těžko rozložitelné (Fiend & Lettinga, 1972; Reddy & DeLaune, 2008).

V průběhu inkubace prvního experimentu rostla koncentrace fenolických látek ve všech variantách. To může souviset s přidavky živin, kdy mikroorganismy nebyly limitovány jejich nedostatkem (Kang et al., 2005; Sinsabaugh & Moorhead, 1994). Následkem toho nebyly fenolické látky mikroorganismy využívány a mohlo tak dojít k nárůstu koncentrací fenolických látek bez ohledu na typ opadu a podmínek prostředí. Ve druhém experimentu došlo k poklesu koncentrací fenolických látek obou frakcí, a to ve všech variantách vzorků. V tomto experimentu bylo dodáno pouze omezené nebo žádné množství živin, což mohlo vést k větší potřebě mikroorganismů získat živiny právě rozkladem i fenolických látek. V 10. dni inkubace jsem u většiny přídavek fenolických látek bez ohledu na molekulární hmotnost znamenala mírný nárůst koncentrací v porovnání s 1. dnem inkubace. Tento nárůst může být vysvětlen tím, že v průběhu procesu dekompozice mohly být rozpustné fenolické látky meziproduktem rozkladu, a proto jejich koncentrace v počátku inkubace narůstaly (Burke & Cairney 2002; Hall et al., 2014; Toberman et al. 2008).

V prvním experimentu byl inkubován také opad delignifikovaného rašeliníku. U delignifikovaného rašeliníku jsem zaznamenala vyšší koncentrace fenolických látek než u jeho nedelignifikované varianty. Ačkoli byl možný efekt uvolnění fenolických látek z delignifikovaného rašeliníku vyloučen, byla zaznamenána vyšší koncentrace fenolických látek než tam, kde byl použit rašeliník nedelignifikovaný. Delignifikací se odstranily z rašeliníku všechny fenolické látky, zejména ligninu podobné fenolické polymery a zbyl téměř čistý polysacharid. Tento polysacharid se mohl rozkládat na jednodušší molekuly, které mohly účinně reagovat s činidlem Folin-Ciocalteu. Toto činidlo dokáže reagovat se snadno oxidovatelnými látkami jako je například glukóza, kyselina askorbová, oxid siřičitý nebo aromatické aminy (Shahidi & Naczki, 2004; Zoecklein et al., 1990). Při použití této metody může tedy docházet k nadhodnocení koncentrace fenolických látek (Ohno & First, 1998).

5.4 Vliv rozpustných fenolických látek na aktivitu enzymů

Výše jsme diskutovali, jak dostupnost O_2 ovlivňuje aktivitu oxidativních a hydrolytických enzymů a jak se koncentrace rozpustných fenolických látek měnila v čase inkubace. Dalším z cílů této práce bylo zjistit, jak rozpustné fenolické látky

ovlivňují aktivitu těchto enzymů, především hydrolytických a ověřit tak teorii enzymatické smyčky (Freeman et al., 2001; 2004).

Vlivem přísad fenolických látek o různé molekulární hmotnosti jsem očekávala, že fenolické látky LMW obsahující fenolické oligomery, budou mít vyšší schopnost inhibovat jejich aktivitu než HMW. Ukázalo se však, že první ani druhý experiment neprokázal vliv inhibice hydrolytických enzymů fenolickými látkami frakcí LMW a ani HMW. V souladu s mými výsledky je studie Hall et al. (2014), kde za použití velmi nízkých koncentrací rozpustných fenolických látek ($0,45-2,01 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) nebyly hydrolytické enzymy inhibovány. To je zcela v rozporu se studií Freeman et al. (2004) kde již podobně nízké přísady fenolických látek ($2-5 \text{ mg l}^{-1}$) inhibovaly aktivitu různých hydrolytických enzymů, a to o 18-47 %. Obecně lze v našich experimentech sledovat trend, kdy s vyššími přísadky fenolických látek naopak docházelo k podpoření aktivit hydrolytických enzymů. Lze také vidět, že v některých případech neměly přísady fenolických látek na aktivitu hydrolytických enzymů signifikantní vliv. Nejvyšší hodnoty potenciálních aktivit hydrolytických enzymů jsem pozorovala u β -glukosidázy a celobiohydrolázy, právě u vysokých přísadky fenolických látek 100 a 1000 mg l^{-1} . V našich experimentech mohla aktivitu hydrolytických enzymů značně podporovat koncentrace DOC, které bylo součástí roztoku fenolických látek, podobně jako tomu bylo ve studiích (Hall et al., 2014; Romanowitz et al., 2015). Koncentrace DOC vykazovala pozitivně korelační vztah se všemi hydrolytickými enzymy v obou experimentech. Zajímavý trend v aktivitě lze sledovat u fosfatázy, jejíž aktivita v aerobní inkubaci klesla tam, kde byly navíc dodány minerální živiny. V přítomnosti dostupného P vykazuje fosfatáza sníženou aktivitu (Keuskamp et al., 2015).

Rovněž aktivita oxidativních enzymů PhOx a PerOx byla vlivem přísadky rozpustných fenolických látek podpořena ve srovnání s kontrolou. Pro aktivitu oxidativních enzymů, je totiž obsah fenolických látek stejně jako O_2 často považován za zásadní pro jejich aktivitu (Sinsabaugh, 2010). Koncentrace fenolických látek pozitivně korelovaly s aktivitami PhOx a PerOx a byly zaznamenány i pozitivní korelace s některými hydrolytickými enzymy. Naše výsledky z experimentů tedy vyloučily inhibiční efekt fenolických látek na hydrolytické enzymy a nepotvrdili jsme teorii enzymatické smyčky.

5.5 Vliv fenolických látek na mikrobiální respiraci

Kumulativní mikrobiální respirace charakterizuje celkové množství uhlíku, které bylo zmineralizováno za celkovou dobu inkubace, tedy za 35 dní. Obecně se předpokládá, že fenolické látky mají negativní vliv na mikrobiální aktivitu (např. Hättenschwiler & Vitousek, 2000; Lattanzio, 2013). V aerobním prostředí byly naměřeny téměř 4x vyšší hodnoty vyrespirovaného CO₂ než v anaerobním prostředí. Anaerobní dekompozice je z hlediska energetického výnosu v porovnání v aerobní dekompozici nákladnější, má nižší energetický zisk, a to celkově vede k pomalejšímu růstu mikroorganismů (Reddy & DeLaune, 2008; Rydin & Jeglum, 2006). Na základě literatury jsem předpokládala, že frakce fenolických látek LMW bude inhibovat mikrobiální aktivitu, nejen kvůli přítomnosti oligomerních taninů ale také vlivem přítomnosti nízkomolekulárních fenolických látek, které mohou působit toxicky na mikroorganismy zevnitř a potlačit tak sekreci enzymů (Field & Lettinga, 1992). Výsledky z naměřených hodnot respirací ukázaly, že vlivem přísad fenolických látek LMW a HMW vedly naopak k podpoře mikrobiální respirace, a tedy pravděpodobně k využívání fenolických látek. Zároveň může být značně podpořena přidáním jednoduchých ale také složitějších organických sloučenin, které byly součástí našich frakcí fenolických látek LMW a HMW (Meier & Bowman, 2008). Zvýšení mikrobiálních respirací vlivem přísad fenolických látek publikuje také studie Dieleman et al. (2016) a vysvětluje, že mikroorganismy jsou v přítomnosti fenolických látek méně efektivní při zabudování uhlíku do biomasy. Výsledky našeho experimentu ukázaly, že mikrobiální respirace byly podpořeny přísadky fenolických látek, pravděpodobně byly tedy dodané fenolické látky zdrojem uhlíku a živin. Toto zjištění je zcela v rozporu s teorií enzymatické smyčky (Freeman et al., 2001; 2004).

6 Závěr

- První hypotéza, na základě které jsem očekávala limitaci aktivity oxidativních enzymů v anaerobním prostředí, nebyla potvrzena. Anaerobní prostředí nemělo na aktivitu oxidativních enzymů PhOx a PerOx vliv. Naopak se ukázalo, že podmínky prostředí výrazně působily na aktivitu hydrolytických enzymů, jenž byly vyšší v aerobním prostředí. Toto zjištění ukazuje, že dostupnost O₂ není hlavním určujícím faktorem aktivit oxidativních enzymů a má nepřímo vliv na aktivitu hydrolytických enzymů, jejichž aktivita je pravděpodobně závislá na mikrobiální aktivitě.
- V prvním experimentu docházelo ke zvyšování koncentrací rozpustných fenolických látek obou frakcí. Pravděpodobně se zde projevil efekt přídavku živin, kdy mikroorganismy nebyly limitovány jejich nedostatkem a fenolické látky se během inkubace hromadily. Během inkubace druhého experimentu, kde bylo dodáno redukované nebo žádné množství živin, již docházelo k úbytku rozpustných fenolických látek LMW a HMW, což značí o využívání těchto fenolických látek mikroorganismy a schopnosti je využívat jak v aerobním, tak anaerobním prostředí.
- Na základě druhé hypotézy jsem předpokládala, že rozpustné fenolické látky LMW, které obsahovaly fenolické oligomery, budou mít vyšší schopnost inhibovat aktivitu hydrolytických enzymů než HMW. Tato hypotéza taktéž nebyla podpořena, jelikož jsem nezaznamenala efekt inhibice na žádný z testovaných hydrolytických enzymů. Ukázalo se však, že s vyššími přídávky rozpustných fenolických látek docházelo k podpoření aktivit hydrolytických enzymů. Přídavky rozpustných fenolických látek LMW a HMW působily pozitivně na aktivity oxidativních enzymů PhOx a PerOx a se zvyšující se koncentrací fenolických látek rostly jejich aktivity.
- Přídavky rozpustných fenolických látek v různých koncentracích zvyšovaly mikrobiální respiraci v porovnání s kontrolou což svědčí o tom, že tyto fenolické látky podporují aktivitu mikroorganismů a jsou pravděpodobně vhodným zdrojem uhlíku pro jejich růst a rozvoj.
- Naše data v souhrnu ukázaly, že mikroorganismy a jejich vylučované oxidativní a hydrolytické enzymy jsou adaptované na redukované a živinami chudé prostředí rašelinišť a že fenolické látky podporují nejen jejich enzymatickou ale také mikrobiální

aktivitu (respiraci). Oxidativní enzymy jsou limitovány jinými faktory, než je pouze dostupnost O_2 , zatímco hydrolytické enzymy nejsou limitovány rozpustnými fenolickými látkami.

7 Literatura

- Aerts R., Wallén B., Malmer N., De Caluwe H. (2001).** Nutritional constraints on Sphagnum-growth and potential decay in northern peatlands. *Journal of Ecology* **89**, 292–299.
- Appel H.M. (1993).** Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology* **19**, 1521–1552.
- Bakshi M., Varma A. (2011).** Soil Enzyme: The State-of-Art. In: Shukla G., Varma A. (Eds.), *Soil Enzymology*. Springer, 1–23
- Baldrian P. & Šnajdr J. (2011).** Lignocellulose-degrading enzymes in soils. In: Shukla G., Varma A. (Eds.), *Soil Enzymology*. Springer, 167–186
- Baldwin I.T., Olson R. K., Reiners W.A. (1983).** Protein binding phenolics and the inhibition of nitrification in subalpine balsam fir soils. *Soil Biology and Biochemistry* **15**, 419–423
- Boelter D.H. (1965).** Hydraulic conductivity of peats. *Soil Science*, **100**, 227–231
- Box J.D. (1983).** Investigation of the Folin–Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Research* **17**, 511–522
- Brouns K., Keuskamp J.A., Potkamp G., Verhoeven J.T.A., Hefting M.M. (2016).** Peat origin and land use effects on microbial activity, respiration dynamics and exo-enzyme activities in drained peat soils in the Netherlands. *Soil Biology and Biochemistry* **95**, 144–155
- Bull A. T. (1970).** Inhibition of polysaccharases by melanin: enzyme inhibition in relation to mycolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **137**, 345–356
- Burke R.M., Cairney J.W.G. (2002).** Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **12** (3), 105–116
- Burley S.K., David P.R., Sweet R.M., Taylor A., Lipscomb W.N. (1992).** Structure determination and refinement of bovine lens leucine aminopeptidase and its complex with bestatin. *Journal of Molecular Biology* **224** (1), 113–140

- Cates R.G., Rhoades D.F. (1977).** Patterns in the production of antiherbivore chemical defenses in plant communities. *Biochemical Systematics and Ecology* **5(3)**, 185–193
- Clymo R. S. (1965).** Experiments on breakdown of Sphagnum in two bogs. *Journal of Ecology* **53**, 747–758
- Clymo R. S. (1983).** Peat. In: Gore A. J. P. (Ed.), *Ecosystems of the World 4A, Mires: Swamp, Bog, Fen, and Moor*. Elsevier. New York, 159–224
- Clymo R.S. (1984).** The limits to peat bog growth. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* **303**, 605–654
- Clymo R.S., Turunen J., Tolonen K. (1998).** Carbon accumulation in peatland. *Oikos*, **81**, 368–388
- Cox P., Wilkinson S.P., Anderson J.M. (2001).** Effects of fungal inocula on the decomposition of lignin and structural polysaccharides in *Pinus sylvestris* litter. *Biology and Fertility of Soils* **33**, 246–251
- Dai J., Mumper R.J. (2010).** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* **15**, 7313–7352
- Dari K., Bechet M., Blondeau R. (1995).** Isolation of soil Streptomyces strains capable of degrading humic acids and analysis of their peroxidase activity. *FEMS Microbiology Ecology* **16**, 115–122
- Delaux P.M., Séjalon-Delmas N., Bécard G., Ané J.M. (2013).** Evolution of the plant-microbe symbiotic ‘toolkit’. *Trends in Plant Science* **18**, 298–304
- Dick R.P., Sandor J.A., Eash N.S. (1994).** Soil enzyme activities after 1500 years of terrace agriculture in the Colca Valley, Peru. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **50**, 123–131.
- Dieleman C.M., Branfireun B.A., McLaughlin J.W., Lindo Z. (2016).** Enhanced carbon release under future climate conditions in a peatland mesocosm experiment: the role of phenolic compounds. *Plant and Soil* **400**, 81–91
- Dorrepaal E., Cornelissen J.H.C., Aerts R., Wallén B.O., Van Logtestijn R.S.P. (2005).** Are growth forms consistent predictors of leaf litter quality and decomposability across peatlands along a latitudinal gradient? *Journal of Ecology* **93**, 817–828

- Dunn C., Freeman C. (2018).** The role of molecular weight in the enzyme-inhibiting effect of phenolics: the significance in peatland carbon sequestration. *Ecological Engineering* **114**, 162–166
- Duran N., Rosa M.A., D'Annibale A., Gianfreda L. (2002).** Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology* **31**, 907–931
- Edwards I.P., Upchurch R.A., Zak D.R. (2008).** Isolation of fungal cellobiohydrolase I genes from sporocarps and forest soils by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 3481–3489
- Endo K., Hayashi Y., Hibi T., Hosono K., Beppu T., Ueda K. (2003).** Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *Journal of Biochemistry* **133** (5), 671–677
- Fenner N., Freeman C. (2011).** Drought-induced carbon loss in peatlands. *Nature Geoscience* **4**, 895–900
- Fenner N., Freeman C. (2013).** Carbon preservation in humic lakes; a hierarchical regulatory pathway. *Global Change Biology* **19**, 775–784
- Fenner N., Freeman C., Reynolds B. (2005).** Hydrological effects on the diversity of phenolic degrading bacteria in a peatland: implications for carbon cycling. *Soil Biology and Biochemistry* **37**(7), 1277–1287
- Field J. A., Kortekaas S., Lettinga G. (1989).** The effect of autoxidation on the methanogenic toxicity and anaerobic biodegradability of pyrogallol. *Biological Wastes* **30** (2), 111–121
- Field J. A., Lettinga G., Habets L.H.A. (1990).** Measurement of low molecular weight tannins: Indicators of methanogenic toxic tannins. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **69** (3), 148–153
- Field J.A., Lettinga G. (1992).** Toxicity of tannic compounds to microorganisms. In: Hemingway R.W., Laks P.E. (Eds.), *Plant Polyphenols*. Plenum Press. New York, 673–692

- Fierer N., Schimel J.P., Cates R.G., Zou J. (2001).** Influence of balsam poplar tannin fractions on carbon and nitrogen dynamics in Alaskan taiga floodplain soils. *Soil Biology and Biochemistry*, **33**, 1827–1839
- Firenzuoli A.M., Vanni P., Mastronuzzi E. (1969).** The effect of some aromatic compounds on pure enzymes and their subsequent reactivation by PVP and Tween 80. *Phytochemistry* **8**, 61-64
- Frankenberger W.T. Jr, Johanson J.B. (1982).** Effect of pH on enzyme stability in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **14 (5)**, 433–437
- Freeman C., Liska G., Ostle N.J., Lock M.A., Reynolds B., Hudson J. (1996).** Microbial activity and enzymic decomposition processes following peatland water table drawdown. *Plant and Soil* **180**, 121–127
- Freeman C., Ostle N., Kang H. (2001).** An enzymic ‘latch’ on a global carbon store. *Nature* **409**, 149.
- Freeman C., Ostle N.J., Kang F.H. (2004).** A regulatory role for phenol oxidase during decomposition in peatland. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 1663–1667
- Gianfreda L., Bollag J.M. (1994).** Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes. *Soil Science Society of America Journal* **58**, 1672–1681
- Goldstein J.L., Swain T. (1965).** The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry* **4**, 185–192
- Gorham E. (1991).** Northern peatlands: role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. *Ecological Applications* **1**, 182–195
- Güsewell S., Freeman C. (2005).** Nutrient limitation and enzyme activities during litter decomposition of nine wetland species in relation to litter N : P ratios. *Functional Ecology* **19**, 582–593
- Haider K. (1992).** Problems related to the humification process in soils of temperate climates. In: Stotsky G., Bollag J.-M. (Eds.), *Soil Biochemistry*. CRC Press, 55–94
- Hall S., Treffkorn J., Silver W.L. (2014).** Breaking the enzymatic latch: impacts of reducing conditions on hydrolytic enzyme activity in tropical forest soils. *Ecology* **95(10)**, 2964–2973

- Handley W. R. C. (1954).** Mull and Mor formation in relation to forest soils. 1. vydání. *Imperial Forestry Institute*. London, 132p
- Hättenschwiler S., Vitousek P.M. (2000).** The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology & Evolution* **15 (6)**, 238-243
- Hendel B., Sinsabaugh R.L., Marxsen J. (2005).** Lignin-degrading enzymes: phenoloxidase and peroxidase. In: Graça M.A.S., Bärlocher F., Gessner M.O. (Eds.), *Methods to study litter decomposition: a practical guide*. Springer, 273–278
- Horner J.D., Gosz J.R., Cates R.G. (1988).** The role of carbon-based plant secondary metabolites in decomposition in terrestrial ecosystems. *The American Naturalist* **132**, 869–883
- Chróst R.J., Siuda W. (2002).** Ecology of Microbial Enzymes in Lake Ecosystems. In: Burns R., Dick R. (Eds.), *Enzymes in the Environment*. CRC Press, 47-84
- Jassey V.E.J., Chiapusio G., Gilbert D., Toussaint M-L., Binet P. (2012).** Phenoloxidase and peroxidase activities in *Sphagnum*-dominated peatland in a warming climate. *Soil Biology & Biochemistry* **46**, 49-52
- Johjima T., Ohkuma M., Kudo T. (2003).** Isolation and cDNA cloning of novel hydrogen peroxide-dependent phenol oxidase from the basidiomycete *Termitomyces albuminosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61 (3)**, 220–225
- Kang H., Freeman C. (1999).** Phosphatase and arylsulphatase activities in wetland soils: annual variation and controlling factors. *Soil Biology and Biochemistry*, **31(3)**, 449–454
- Keuskamp J.A., Feller I.C., Laanbroek H.J., Verhoeven J.T.A. Hefting M.M. (2015).** Short- and long-term effects of nutrient enrichment on microbial exoenzyme activity in mangrove peat. *Soil Biology & Biochemistry* **81**, 38–47
- King G. M. (1986).** Characterization of β -glucosidase activity in intertidal marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **51**, 373–380
- Kraus T. E. C., Dahlgren R. A., Zasoski R. J. (2003).** Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems – a review. *Plant and Soil* **256 (1)**, 41–66

- Lattanzio V. (2013).** Phenolic Compounds: Introduction. In: Ramawat K.G., Mérillon J.M. (Eds.), *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer, 1543-1580
- Lin X., Green S., Tfaily M.M., Prakash O., Konstantinidis K.T., et al. (2012).** Microbial community structure and activity linked to contrasting biogeochemical gradients in bog and fen environments of the Glacial Lake Agassiz Peatland. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 7023–7031.
- Lucas R.W., Casper B.B., Jackson J.K., Balser T.C. (2007).** Soil microbial communities and extracellular enzyme activity in the New Jersey Pinelands. *Soil Biology and Biochemistry* **39**, 2508–2519
- Marx M.-C., Wood M., Jarvis S.C. (2001).** A microplate fluorimetric assay for the study of enzyme diversity in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **33**, 1633–1640
- McLatchey G. P., Reddy K.R. (1998).** Regulation of organic matter decomposition and nutrient release in a wetland soil. *Journal of Environmental Quality* **27**, 1268–1274
- Meier C., Bowman W. (2008).** Phenolic-rich leaf carbon fractions differentially influence microbial respiration and plant growth. *Oecologia* **158**, 95–107
- Mellegård H., Stalheim T., Hormazabal V., Granum P.E., Hardy S.P. (2009).** Antibacterial activity of sphagnum acid and other phenolic compounds found in *Sphagnum papillosum* against foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology* **49**, 85–90
- Min K., Freeman C., Kang H., Choi S-U. (2015).** The regulation by phenolic compounds of soil organicmatter dynamics under a changing environment. *BioMed Research International*, Article ID 825098.
- Nannipieri P., Kandeler E., Ruggiero P. (2002).** Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: Burns R., Dick R. (Eds.), *Enzymes in the Environment*. CRC Press, 1–33
- Ohno T., First P.R. (1998).** Assessment of the Folin and Ciocalteu's method for determining soil phenolic carbon. *Journal of Environmental Quality* **27(4)**, 776–782

- Oku H. (1960).** Biochemical studies on *Cochliobolus miyabeanus*. *Journal of Phytopathology* **38** (4), 342–354
- Parvin S., Blagodatskaya E., Becker J.N., Kuzyakov Y., Uddin S., Dorodnikov M. (2018).** Depth rather than microrelief controls microbial biomass and kinetics of C-, N-, P- and S-cycle enzymes in peatland. *Geoderma* **324**, 67-76
- Paul E.A. & Clark F.E. (1996).** *Soil Microbiology and Biochemistry*. 2. vydání. Academic Press. United States of America, 340p
- Paul, E.A., 2007.** *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. 3. vydání. Elsevier Science. Burlington, 598p
- Pind A., Freeman C., Lock M.A. (1994).** Enzymic degradation of phenolic materials in peatlands — measurement of phenol oxidase activity. *Plant and Soil* **159**, 227–31
- Pinsonneault A.J., Moore T.R., Roulet N.T. (2016).** Temperature the dominant control on the enzyme-latch across a range of temperate peatland types. *Soil Biology and Biochemistry* **97**, 121–130
- Rabinovich M.L., Bolobova A.V., Vasilchenko, L.G. (2004).** Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **40** (1), 1-17
- Rasmussen S., Wolff C., Rudolph H. (1995).** Compartmentalization of phenolic constituents in Sphagnum. *Phytochemistry* **38**, 35–39
- Reddy K.R., DeLaune R.D. (2008).** *Biogeochemistry of Wetlands: Science and Applications*. 1. vydání. CRC Press. United States of America, 800p
- Rice E.L. (1984).** *Allelopathy*. 2. vydání. Academic Press. New York, 368p
- Rice E.L., Pancholy S.K. (1973).** Inhibition of nitrification by climax ecosystems. II. Additional evidence and possible role of tannins. *American Journal of Botany* **60**, 691–702
- Romanowicz K.J., Kane E.S., Potvin L.R., Daniels A.L., Kolka R.K., et al. (2015).** Understanding drivers of peatland extracellular enzyme activity in the PEATcosm experiment: mixed evidence for enzymic latch hypothesis. *Plant and Soil* **397**, 371–386

- Rudolph H., Samland J. (1985).** Occurrence and metabolism of sphagnum acid in the cell walls of bryophytes. *Phytochemistry* **24**, 745–749
- Rydin H. & Jeglum J.K. (2006).** *The Biology of Peatlands*. 1. vydání. Oxford University Press. Oxford, 343p
- Shi W. (2011).** Agricultural and ecological significance of soil enzymes: soil carbon sequestration and nutrient cycling. In: Shukla G., Varma A. (Eds.), *Soil Enzymology*. Springer, 43–60
- Sinsabaugh R.L. (2010).** Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry* **42**, 391–404
- Sinsabaugh R.L., Antibus R.K., Linkins A.E., McClaugherty C.A., Rayburn L., et al. (1993).** Wood decomposition – nitrogen and phosphorus dynamics in relation to extracellular enzyme-activity. *Ecology* **74** (5), 1586–1593
- Sinsabaugh R.L., Moorhead D.L. (1994).** Resource allocation to extracellular enzyme production: A model for nitrogen and phosphorus control of litter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* **26** (10), 1305–1311
- Sjogblad R.D., Bollag J.M. (1981).** Oxidative coupling of aromatic compounds by enzymes from soil microorganisms. In: Paul E.A., Ladd J.N. (Eds.) *Soil Biochemistry*. CRC Press, 113–152
- Souto C., Pellissier F., Chiapusio G. (2000).** Allelopathic effects of humus phenolics on growth and respiration of mycorrhizal fungi. *Journal of Chemical Ecology* **26**, 2015–2023
- Stevenson F.J. (1994).** *Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions*. 2. vydání. John Wiley and Sons. New York, 512p
- Sun H., Terhonen E., Koskinen K., Paulin L., Kesanen R., et al. (2014).** Bacterial diversity and community structure along different peat soils in boreal forest. *Applied Soil Ecology* **74**, 37–45
- Sun X., Xiang W., He L., Zhao Y. (2010).** Impacts of hydrological conditions on enzyme activities and phenolic concentrations in peatland soil: An experimental simulation. *Frontiers of Earth Science in China* **4** (4), 463–470

- Toberman H., Evans C.D., Freeman C., Fenner N., White M. et al. (2008b).** Summer drought effects upon soil and litter extracellular phenol oxidase activity and soluble carbon release in an upland Calluna heathland. *Soil Biology & Biochemistry* **40**, 1519–1532
- Toberman H., Freeman C., Artz R.R.E., Evans C.fD., Fenner N. (2008a).** Impeded drainage stimulates extracellular phenol oxidase activity in riparian peat cores. *Soil Use and Management* **24**, 357–365.
- Toberman H., Laiho R., Evans C.D., Artz R.R.E., Fenner N., et al. (2010).** Long-term drainage for forestry inhibits extracellular phenol oxidase activity in Finnish boreal mire peat. *European Journal of Soil Science* **61**, 950–957
- Triebwasser-Freese D. J., Tharavil N., Preston C. M., Gerard P. G. (2015).** Catalytic kinetics and activation energy of soil peroxidases across ecosystems of differing lignin chemistries. *Biogeochemistry* **124**, 113–129
- Turner B.L. McKelvie I.D., Haygarth P.M. (2002).** Characterisation of water extractable soil organic phosphorus by phosphatase hydrolysis. *Soil Biology and Biochemistry* **34** (1), 27–35
- Verhoeven J.T.A., Liefveld W.M. (1997).** The ecological significance of organochemical compounds in Sphagnum. *Acta Botanica Neerlandica* **46** (2), 117–130
- Verhoeven J.T.A., Toth E. (1995).** Decomposition of Carex and Sphagnum litter in fens: effect of litter quality and inhibition by living tissue homogenates. *Soil Biology and Biochemistry* **27**, 271–275
- Weng J.-K., Chapple C. (2010).** The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol.* **187**, 273–285
- Williams C.J., Shingara E.A., Yavitt J.B. (2000).** Phenol oxidase activity in peatlands in New York State: response to summer drought and peat type. *Wetlands* **20** (2), 416-421
- Wilson R.M., Hopple A.M., Tfaily M.M., Sebestyen S.D., Schadt C.W., et al. (2016).** Stability of peatland carbon to rising temperatures. *Nature communications* **7**:13723 DOI: 10.1038/ncomms13723

Wright A. L., Reddy K.R. (2001). Phosphorus loading effects on extracellular enzyme activity in Everglades wetland soil. *Soil Science Society of America Journal* **65**, 588–595

Xiang W., Wan X., Yan S., Wu Y., Bao Z. (2013). Inhibitory effects of drought induced acidification on phenol oxidase activities in Sphagnum-dominated peatland. *Biogeochemistry* **116**, 293–301

Zak D.R., Kling G.W. (2006). Microbial community composition and function across an arctic tundra landscape. *Ecology* **87**, 1659–1670

Zavarzina A.G (2011). Heterophase synthesis of humic acids in soils by immobilized phenol oxidases. In: Shukla G., Varma A. (Eds.), *Soil Enzymology*. Springer, 187–205

Zimmerman A.R., Ahn M-Y. (2011). Organo-mineral–enzyme interaction and soil enzyme activity. In: Shukla G., Varma A. (Eds.), *Soil Enzymology*. Springer, 271–292

Přílohy

Tab. 3: Naměřené hodnoty koncentrací fenolických látek v prvním experimentu (průměr ± SD), přepočtené na standard kyseliny tříslové (TA) [mg·l⁻¹]. 1. den – stanovení koncentrací fenolických látek před inkubací, 17. a 56. den inkubace.

Den inkubace	1. den	7. den		56. den	
Typ inkubace	Aerobní, anaerobní	Aerobní	Anaerobní	Aerobní	Anaerobní
R-Control 0	9,08	10,85 ± 2,04	17,80 ± 4,35	15,61 ± 0,24	15,09 ± 1,90
R-LMW 10	18,69	22,69 ± 1,21	25,83 ± 1,63	25,64 ± 1,29	26,07 ± 0,66
R-LMW 100	105,13	128,62 ± 3,49	131,09 ± 0,92	122,44 ± 3,76	119,11 ± 6,25
R-LMW 1000	969,54	1021,60 ± 37,82	1062,86 ± 24,76	1199,74 ± 66,45	1071,34 ± 22,01
R-HMW 10	22,53	20,23 ± 2,41	26,68 ± 0,63	20,06 ± 0,24	23,30 ± 0,96
R-HMW 100	143,55	147,54 ± 2,28	150,64 ± 3,08	138,22 ± 6,93	140,29 ± 3,78
R-HMW 1000	1353,72	1375,89 ± 33,97	1344,05 ± 84,44	1517,94 ± 42,47	1450,71 ± 27,89
D-Control 0	3,91	7,80 ± 0,88	9,19 ± 0,66	27,32 ± 2,83	16,17 ± 1,32
D-LMW 10	13,51	21,44 ± 0,95	24,53 ± 0,56	37,70 ± 4,01	31,60 ± 2,63
D-LMW 100	99,95	140,19 ± 3,05	145,39 ± 7,02	150,58 ± 4,65	140,55 ± 6,65
D-LMW 1000	964,36	1089,47 ± 38,11	1144,03 ± 22,63	1466,93 ± 59,84	1354,52 ± 41,07
D-HMW 10	13,45	21,08 ± 1,23	23,90 ± 0,56	32,08 ± 1,04	30,13 ± 1,07
D-HMW 100	134,46	155,21 ± 9,65	171,00 ± 5,19	152,57 ± 4,64	163,47 ± 5,33
D-HMW1000	1344,63	1390,69 ± 56,34	1418,94 ± 60,99	1631,65 ± 33,03	1570,69 ± 53,86

Tab. 4: Naměřené hodnoty koncentrací fenolických látek ve druhém experimentu (průměr ± SD), přepočtené na standard kyseliny tříslové (TA) [mg·l⁻¹]. 1. den – stanovení koncentrací fenolických látek před inkubací, 10. a 35. den inkubace.

Den inkubace	1. den	10. den		35. den	
Typ inkubace	Aerobní, anaerobní	Aerobní	Anaerobní	Aerobní	Anaerobní
Control 0	32,4	36,19 ± 1,58	43,47 ± 2,58	31,76 ± 1,47	34,20 ± 1,31
LMW 10	42,4	45,07 ± 2,42	47,93 ± 3,55	39,86 ± 0,70	39,12 ± 2,29
LMW 100	132,4	124,58 ± 2,90	125,26 ± 4,34	99,38 ± 3,58	104,35 ± 2,83
LMW 1000	1032,4	954,08 ± 31,05	956,24 ± 29,20	779,33 ± 48,28	820,07 ± 34,75
LMW 0+	32,4	35,10 ± 1,73	41,21 ± 2,41	26,37 ± 0,72	28,92 ± 0,60
LMW 10+	42,4	39,35 ± 1,18	47,06 ± 2,50	29,29 ± 0,96	32,72 ± 0,60
LMW 100+	132,4	107,90 ± 4,87	115,84 ± 9,03	79,09 ± 3,36	85,76 ± 2,96
HMW 10	42,4	36,19 ± 2,64	43,47 ± 2,19	31,76 ± 6,25	34,20 ± 1,09
HMW 100	132,4	46,16 ± 3,98	53,63 ± 2,38	40,83 ± 9,18	41,95 ± 3,57
HMW 1000	1032,4	134,98 ± 45,84	142,79 ± 47,64	124,68 ± 43,55	118,36 ± 59,72
HMW 0+	32,4	1068,83 ± 0,85	1099,68 ± 0,75	941,40 ± 1,33	949,89 ± 2,72
HMW 10+	42,4	30,53 ± 1,01	35,90 ± 0,54	21,84 ± 1,79	29,49 ± 0,60
HMW100+	132,4	32,62 ± 7,54	38,04 ± 1,16	24,38 ± 2,65	29,41 ± 4,19

Tab. 5: Koncentrace živin v lyofilizovaných frakcích fenolických látek (LMW a HMW) metodami ICP–MS a FIA. Platí pro druhý pokus – laboratorní inkubační experiment s částečným přídatkem živin.

	mg/g		µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g	µg/g
živiny	<u>C</u>	<u>C:N</u>	<u>N</u>	<u>P</u>	<u>Na</u>	<u>K</u>	<u>Ca</u>	<u>Mg</u>	<u>Fe</u>	<u>Mn</u>	<u>Cu</u>	<u>Zn</u>
LMW	435	61	7 164	158	7 456	2 685	9 727	2 885	1 188	32	53	842
HMW	352	53	6 597	251	79	114	8 784	1 745	3 556	23	91	779