

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin**



**Česká zemědělská  
univerzita v Praze**

**Studium změn aktivit vybraných enzymů v půdě  
po přidavku triazolových fungicidů  
Diplomová práce**

**Bc. Sabina Buriancová**  
**Výživa a ochrana rostlin**

**Vedoucí práce: Ing. Michal Jakl, Ph.D.**  
**Konzultant: doc. RNDr. PhDr. Ing. Jana Jaklová Dytrtová, Ph.D.**

© 2021 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci “Studium změn aktivit vybraných enzymů v půdě po přidavku triazolových fungicidů“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.04.2021

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Michalu Jaklovi, Ph.D. a konzultantce doc. RNDr. PhDr. Ing. Janě Jaklové Dytrtové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a především trpělivost a shovívavost při zpracovávání mé práce. Dále mé poděkování patří také externímu grantu GAČR č. 18-01710S „Skupinové interakce azolových pesticidů a jejich efekt na esenciální enzymy“ v rámci Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, díky kterému mohla vzniknout experimentální část diplomové práce. Zároveň bych chtěla poděkovat své rodině za všestrannou podporu během celého studia.

# Studium změn aktivit vybraných enzymů v půdě po přidavku triazolových fungicidů

## Souhrn

Fungicidy slouží primárně k potlačení fytopatogenních hub, plísní a jejich spór. Triazolové fungicidy, kterými se diplomová práce zabývá patří mezi důležité sloučeniny, jejichž fungicidní účinek je založen na schopnosti narušovat biosyntézu sterolů inhibicí CYP51. Aplikace triazolů může mít vliv na fyzikálně-chemické procesy v půdě a celou řadu necílových organismů a s tím související produkce enzymů. Organismy v půdním prostředí uvolňují do půdy značné množství látek a s nimi i extracelulární enzymy, které jsou syntetizovány v buňkách a z těchto buněk se uvolňují do okolního prostředí.

Dílčími cíli stanovenými v diplomové práci bylo určení, zda a která enzymatická aktivita je v rámci působení fungicidních látek narušena, dále stanovení dopadu jednotlivých triazolů na jednotlivé enzymatické aktivity a odhadnutí potenciálního dopadu na různé skupiny mikroorganismů a půdní procesy. Dalším záměrem bylo nalezení univerzálního markeru mikrobiálních změn v půdě po vstupu triazolů či jiných fungicidů do půdy. Pro posouzení a stanovení parciálních cílů a hypotéz byl v rámci experimentální části založen nádobový pokus s rajčetem (*Solanum lycopersicum* L. var. „Sweet Cherry“). V průběhu vegetace byly do půdy injekčně vpravovány vybrané triazolové fungicidy a jejich směs (penkonazol, cyprokonazol, cyprokonazol+penkonazol). Po sklizni byly jednotlivé substráty analyzovány z hlediska obsahu studovaných enzymů ( $\beta$ -D-glukosidáza, kyselá fosfatáza, arylsulfatáza, chitináza).

První stanovená hypotéza se týkala přítomnosti triazolů v půdě a následného ovlivnění některých mikroorganismů. Tato hypotéza byla potvrzena po aplikaci cyprokonazolu a penkonazolu v rámci ovlivnění mikroorganismů podílejících se především na produkci  $\beta$ -D-glukosidáz, fosfatáz a arylsulfatáz. Naproti tomu, v souvislosti s chitinázovou aktivitou došlo k vyvrácení této hypotézy. Bylo zjištěno, že aplikované triazoly neovlivňují organismy produkující chitinázy a z tohoto důvodu nelze chitinázu hodnotit k potenciálnímu využití jako markeru účinku triazolů na organismy v půdním prostředí.

Následné hypotézy říkaly, že dopad triazolů na různé enzymatické aktivity bude různý a dopad přítomnosti různých triazolů v půdním prostředí bude mít různý vliv. Na základě výsledků a diskutovaných závěrů byla počáteční hypotéza potvrzena, protože nelze dojít k jednomu obecnému závěru, zda jsou enzymatické aktivity hydroláz po styku s triazolovými látkami inhibovány či stimulovány. Rovněž u poslední hypotézy došlo k jejímu potvrzení, jelikož zkoumané triazolové látky působily v půdním prostředí odlišně. Byla shledána potenciální vhodnost monitoringu fosfatáz jako markeru účinku některých triazolů (cyprokonazol, propikonazol a tebukonazol) na půdní organismy. Účinným markerem se jevila rovněž arylsulfatáza, poněvadž indikuje vliv cyprokonazolu a tebukonazolu. Naopak  $\beta$ -D-glukosidázovou aktivitu nelze hodnotit jako marker pro studium změn půdních mikrobiálních aktivit v rámci působení tebukonazolu, cyprokonazolu a směsi cyprokonazol-penkonazol.

**Klíčová slova:** enzymatická aktivita; hydrolázy; necílové mikroorganismy; triazoly

# Study of changes in activities of selected soil enzymes after triazole fungicides addition

## Summary

Fungicides serve primarily to suppress phytopathogenic fungi, molds and their spores. Triazole fungicides are important compounds whose fungicidal action is based on the ability to disrupt sterol biosynthesis by inhibiting CYP51. The application of triazoles can affect the physico-chemical processes in soil and a wide range of non-target organisms and the related production of enzymes. Organisms in the soil environment release a significant amount of substances into the soil and with them extracellular enzymes, which are synthesized in cells. From these cells they are released into the environment.

One of the objectives set out in this thesis was to determine whether and which enzymatic activity is disturbed by fungicides, to determine the impact of individual triazoles on individual enzymatic activities and assessing potential impact on different groups of microorganisms and soil processes. The second objective was to find a universal marker of microbial changes in the soil after the entry of triazoles or other fungicides into the soil. To assess and determine objectives and hypotheses, a container experiment with a tomato (*Solanum lycopersicum* L. var. "Sweet Cherry") was established in the experimental part. Selected triazole fungicides and their mixture (penconazole, cyproconazole, cyproconazole + penconazole) were injected into the soil during the growing season. After harvest, individual substrates were analyzed for the content of studied enzymes ( $\beta$ -D-glucosidase, acid phosphatase, arylsulfatase, chitinase).

The first hypothesis tests the presence of triazoles in the soil and the subsequent influence of some microorganisms. This hypothesis was confirmed after the application of cyproconazole and penconazole mainly due to their effects on the production of  $\beta$ -D-glucosidases, phosphatases and arylsulfatases. On the other hand, hypothesis about the chitinase activity was disproved. It was found that the applied triazoles do not affect chitinase-producing organisms and therefore chitinase cannot be evaluated for potential use as a marker of the effect of triazoles on organisms in the soil environment.

Following hypotheses stated that the impact of triazoles on different enzymatic activities will be varying and the impact of the presence of different triazoles in the soil environment will have different effects. Based on the results, the initial hypothesis was confirmed, however one general conclusion cannot be drawn to whether the enzymatic activities of hydrolases are inhibited or stimulated after contact with triazole substances. The last hypothesis was also confirmed, as the investigated triazole substances acted differently in the soil environment. The potential suitability of phosphatase monitoring as a marker of the effect of some triazoles (cyproconazole, propiconazole and tebuconazole) on soil organisms was found. Arylsulfatase also appeared to be an effective marker, as it indicates the effect of cyproconazole and tebuconazole. However,  $\beta$ -D-glucosidase activity cannot be evaluated as a marker for the study of changes in soil microbial activities under the action of tebuconazole, cyproconazole and the cyproconazole-penconazole mixture.

**Keywords:** enzymatic activity; hydrolases; non-target microorganisms; triazoles

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2 Vědecké hypotézy a cíle práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3 Literární rešerše</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1 Vlastnosti půdy</b> .....	<b>10</b>
3.1.1 Složení půdy .....	10
3.1.2 Organická hmota.....	10
3.1.3 Edafon.....	11
3.1.4 Možnosti stanovení mikroorganismů v půdě.....	13
<b>3.2 Enzymy</b> .....	<b>14</b>
3.2.1 Charakteristika enzymů .....	14
3.2.2 Enzymy v půdě .....	14
3.2.3 Enzymatická aktivita .....	16
3.2.4 Regulace metabolismu půdních organismů .....	18
3.2.5 Vybrané enzymy a jejich aktivity .....	19
3.2.5.1 $\beta$ -D-Glukosidáza.....	20
3.2.5.2 Kyselá fosfatáza.....	21
3.2.5.3 Alkalická fosfatáza .....	22
3.2.5.4 Chitináza .....	23
3.2.5.5 Arylsulfatáza.....	24
<b>3.3 Fungicidy</b> .....	<b>25</b>
3.3.1 Chování fungicidů v půdě.....	26
3.3.2 Vliv fungicidů na půdní edafon .....	27
3.3.3 Triazolové fungicidy.....	28
3.3.3.1 Cyprokonazol.....	29
3.3.3.2 Penkonazol.....	30
3.3.3.3 Vliv triazolů na enzymatickou aktivitu v půdě a souvislost triazolů s mikrobiální činností .....	31
<b>4 Metodika</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1 Vegetační experiment</b> .....	<b>33</b>
<b>4.2 Aplikované triazolové fungicidy</b> .....	<b>35</b>
<b>4.3 Příprava vzorků lyofilizací</b> .....	<b>35</b>
<b>4.4 Stanovení aktivit vybraných extracelulárních enzymů</b> .....	<b>36</b>
4.4.1 Fluorescenční stanovení enzymatické aktivity .....	36
<b>4.5 Zpracování výsledků</b> .....	<b>39</b>
<b>5 Výsledky</b> .....	<b>40</b>
<b>5.1 <math>\beta</math>-D-glukosidáza</b> .....	<b>40</b>

<b>5.2</b>	<b>Kyselá fosfatáza .....</b>	<b>41</b>
<b>5.3</b>	<b>Chitináza .....</b>	<b>43</b>
<b>5.4</b>	<b>Arylsulfatáza.....</b>	<b>45</b>
<b>5.5</b>	<b>Porovnání aplikovaných triazolů a enzymatických aktivit .....</b>	<b>47</b>
5.5.1	Cyprokonazol.....	48
5.5.2	Penkonazol.....	49
5.5.3	Směs cyprokonazol-penkonazol .....	50
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>52</b>
<b>6.1</b>	<b><math>\beta</math>-D-glukosidáza .....</b>	<b>52</b>
<b>6.2</b>	<b>Kyselá a alkalická fosfatáza .....</b>	<b>54</b>
<b>6.3</b>	<b>Chitináza .....</b>	<b>55</b>
<b>6.4</b>	<b>Arylsulfatáza.....</b>	<b>56</b>
<b>6.5</b>	<b>Dopad triazolů na mikroorganismy a půdní procesy .....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>60</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>61</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů .....</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

Aplikace fungicidů slouží primárně k potlačení nežádoucích hub a plísní v zemědělství a veterinární i humánní medicíně. Nicméně jejich použití v ochraně zemědělských plodin může mít vliv i na mobilitu a přijatelnost makro- a mikroprvků, necílové organismy, zejména půdní mikroorganismy a jejich enzymatickou aktivitu.

Enzymy v půdě mohou v zemědělských systémech sloužit jako jeden z ukazatelů kvality půdy. Způsob, jakým fungují půdní enzymy a faktory, jež ovlivňují jejich enzymatickou aktivitu, lze chápat jako zásadní předpoklad pro zlepšení hospodaření s půdou, kvality půdy a následné produkce potravin.

Enzymatická aktivita v půdě byla studována již několik desetiletí. Jednotlivé půdní enzymatické aktivity jsou poměrně citlivé a také snadno měřitelné. Jejich činnost může být ovlivněna mnohými faktory, např. hloubkou a půdním typem, teplotou, vlhkostí a v neposlední řadě kvalitou a množstvím dostupné organické hmoty.

Velmi často testovanými enzymy jsou ty, které se podílejí na degradaci polysacharidů buněčné stěny rostlin, ligninu a biopolymerů vytvářejících mikrobiální biomasu – polysacharidové hydrolázy a oxidační ligninolytické enzymy. Vzhledem k významu dusíku, fosforu a síry pro výživu rostlin a mikrobiální metabolismus se často studují také enzymy podílející se na asimilaci těchto prvků – fosfatázy, arylsulfatázy, proteázy, peptidázy a další. Jinými slovy, půdní enzymy reflektují aktivitu mikroorganismů v půdním prostředí. V tomto prostředí se tedy nacházejí skupiny enzymů, jež určují metabolické procesy v půdě. Množství enzymů v půdních systémech se liší převážně díky skutečnosti, že každá půda má unikátní množství organických látek, složení a aktivitu svých živých organismů a intenzitu biologických procesů.

Triazoly (penkonazol a cyprokonazol), kterými se diplomová práce zabývá, jsou poměrně často používány k ochraně obilnin, ovocných plodin, zeleniny a dalších plodin. V této práci je studován vliv aplikace komerčních triazolových fungicidů s výše zmíněnými účinnými látkami na enzymatické aktivity v půdě.



## 2 Vědecké hypotézy a cíle práce

Fungicidy jsou látky aplikované člověkem k potlačení nežádoucích hub a plísní. Jejich následný vstup do půdy může ovlivnit mobilitu a dostupnost živin a rizikových prvků. Struktura používaných triazolů často umožňuje tvorbu komplexů s ionty přítomnými v půdě/půdním roztoku, čímž ovlivňují transport přes membrány kořenových buněk rostlin. Vzhledem k tomu, že se jedná o biologicky aktivní látky, mohou narušit také činnost necílových mikroorganismů v půdě. Simulovanými reakcemi je možné hodnotit aktivitu produkovaných enzymů (glukosidáza, fosfatázy, arylsulfatáza, chitináza) a odhadovat tak dopad xenobiotika na jednotlivé půdní procesy a organismy.

Cílem této práce je:

- 1) určit, zda a která enzymatická aktivita v půdě je přítomností fungicidů narušena,
- 2) určit dopad jednotlivých triazolů na jednotlivé enzymatické aktivity v půdě,
- 3) odhadnout potenciální dopad na různé skupiny mikroorganismů a půdní procesy.

Hypotézy:

- (1) Přítomností triazolů v půdě jsou ovlivňovány některé mikroorganismy a s tím související činnosti produkovaných enzymů.
- (2) Dopad triazolů na různé enzymatické aktivity bude různý.
- (3) Dopad přítomnosti různých triazolů v půdě bude různý.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Vlastnosti půdy

Půda je nezbytnou součástí agroekosystémů a také hlavním zdrojem zemědělské a lesnické produkce. Je složitým a heterogenním systémem sestávající z živé a neživé složky (Hashmi et al. 2017). Všechny tyto složky půdy se navzájem ovlivňují a prolínají. Například kořeny rostlin absorbují a exudují látky, které mění distribuci a rozpustnost iontů prvků. Půda zajišťuje většinu živin, které jsou nezbytné pro růst a vývoj rostlin, je také prostředím umožňujícím recyklaci a detoxikaci organických materiálů (Šarapatka et al. 2002; Strawn et al. 2015).

Abychom porozuměli fungování půd a předcházeli poškození půdy v důsledku antropogenních a klimatických faktorů, je důležité mít k dispozici vhodné nástroje pro hodnocení a kvantifikaci půdních procesů prováděných půdními mikroorganismy a dalšími členy půdní bioty (Baldrian 2009).

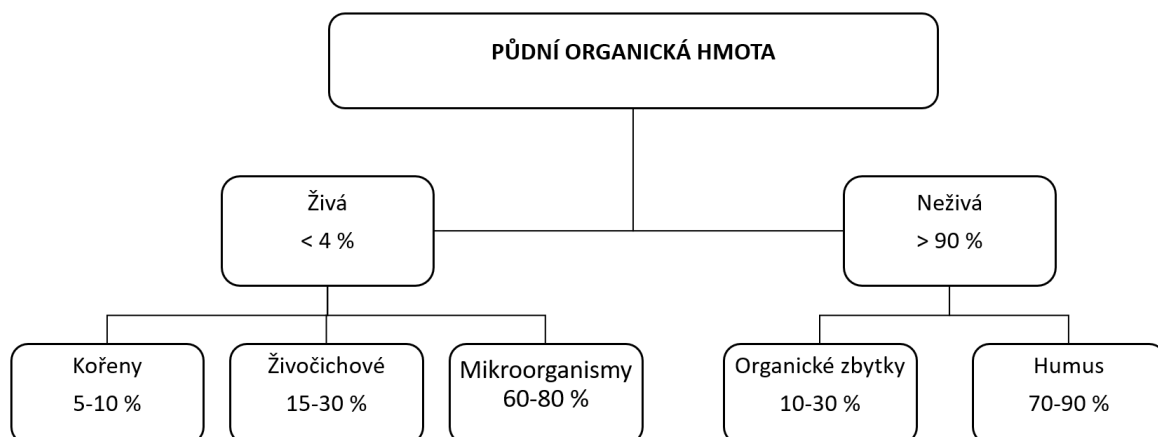
#### 3.1.1 Složení půdy

Půda je tvořena čtyřmi hlavními komponenty (zde záleží na literatuře, některá řadí organickou část zvlášť a v některé půdní organismy spadají do pevného podílu): minerálním a organickým podílem půdy, vodou a vzduchem. Asi 50 % objemových tvoří pevná část půdy (45 % minerální a 5 % organická) a zbývající polovina je tvořena půdní vodou (30 %) a vzduchem (20 %) (Šarapatka 2014).

Chemické procesy v půdě jsou silně ovlivněny interakcemi s pevnými látkami v půdě, takže studium vlastností pevné fáze (půdní mineralogie) je dílčí disciplínou vědy o půdě, která má pro půdní procesy velký význam (Strawn et al. 2015).

#### 3.1.2 Organická hmota

Půdní organická hmota (Obrázek 1) obsahuje zbytky rostlin a živočichů v různé fázi přeměny. Považuje se za páteř zdraví a kvality půdy, a zároveň reguluje řadu různých fyzikálních, chemických a biologických procesů a také půdních vlastností. Například ovlivňuje strukturu půdy, retenční kapacitu, biologickou aktivitu v půdě, infiltraci vody, výměnu vzduchu, chování xenobiotik v půdním prostředí, živiny, pH, kapacitu kationtů a aniontů. Jedná se o důležitou vlastnost, která určuje funkčnost a využití dané půdy.



Obrázek 1 Rozdělení organické hmoty v půdě a přibližné zastoupení jednotlivých složek (hmotnostní procenta) (Šimek et al. 2019)

Hlavním zdrojem organické hmoty v půdě jsou autotrofní organismy. Tyto organismy jsou schopny vytvářet organické látky z anorganických sloučenin a současně využívají sluneční nebo chemickou energii. Dalším důležitým zdrojem organických látek jsou organické zbytky hoření („uhlí“, saze) a atmosféra. Splachy z okolí a záplavy, případně závlahová voda představují nepravidelný zdroj organických látek (Šimek et al. 2019).

V půdě se nachází organický uhlík – volný, stabilní a aktivní. Volný uhlík není seskupován s minerálními agregáty, ani není vázán na žádné minerály. Stabilní uhlík, který je odolný k mineralizaci a biodegradaci, lze nalézt ve specifických humusových látkách, huminových kyselinách a fulvokyselinách. Kdežto aktivní uhlík tvoří lehce rozložitelné sloučeniny a může být snadno metabolizovatelný (Šarapatka 2014).

Množství organické hmoty v půdě se velmi liší a zároveň je ovlivněno mnoha faktory. Významnými faktory jsou teplota a srážky, za vyšších teplot obecně dochází k rychlejšímu rozkladu organických látek, tudíž k snížení obsahu organické hmoty v půdě. Naopak vyšší obsah půdní organické hmoty je důsledkem i vyšší vlhkosti v půdě. Tedy v zamokřených půdách, kde je špatná aerace, se většinou nachází více organické hmoty než v půdách dobře provzdušněných. Obsah organické hmoty je též ovlivňován i konkrétním způsobem obhospodařování (Šimek et al. 2019).

Na závěr je třeba dodat, že nelze obecně říci, zda je vyšší obsah organické hmoty vždy výhodnější nebo lepší pro určitou půdu a naopak, zároveň také záleží na jejím složení.

### 3.1.3 Edafon

Půdní prostředí je pravděpodobně nejsložitější biologickou komunitou. Souhrnně se všechny půdní organismy nazývají edafon. Edafon lze dle velikosti členit na mikro-, mezo-, makro- a megaedafon. Pod skupinu mikroedafonu (< 0,2 mm) je řazena mikrofauna (např. prvoci, hlístice) a mikroflóra (bakterie, řasy a většina hub). Do mezoedafonu (0,2-2 mm) lze

zahrnout hlístice, chvostostoky, roztoče a některé houby. Makroedafon vymezuje organismy v rozmezí 2-20 mm (např. hmyz, pavouky a měkkýše). A poslední skupinu (> 20 mm) reprezentují žížaly a obratlovci. I když edafon představuje pouze malou část z půdní masy (zhruba tisícinu hmotnosti z celku), je naprosto nepostradatelný pro správnou funkci půd, a tím i všech dalších komponent suchozemských nadzemních i podzemních ekosystémů, ovlivňuje pedotvorbu a půdní strukturu (Barrios 2007; Šarapatka 2014; Šimek et al. 2019).

Složení a rozmanitost půdních organismů jsou ovlivňovány mnoha faktory, včetně klimatu, vegetačního pokryvu, fyzikálních a chemických vlastností půd. Na půdách s kyselou půdní reakcí se nachází zcela odlišné druhy organismů, oproti půdám s reakcí alkalickou. Jedním z důsledků kyselých půd je snížení počtu a aktivity hlízkových bakterií. Šarapatka (2014), rovněž dodává, že na polích, jež jsou obdělávána, je obecně menší množství biomasy organismů oproti půdám nenarušeným.

Činnost půdních živočichů spočívá především v mechanickém zpracování organické hmoty a poskytnutí živin rostlinám. Mrtvou organickou hmotu rozmělnují a v zaživacím traktu promíchávají s minerálními částicemi, velká část půdních živočichů transportuje organické i minerální látky v půdě na jiná místa. S půdními živočichy jsou funkčně spojeny mikroorganismy, a vytvářejí tak složitou strukturu potravních, symbiotických, konkurenčních a dalších vztahů, jež jsou nezbytné pro udržitelnou funkci přírodních a řízených ekosystémů (Barrios 2007; Van Der Heijden et al. 2008; Šarapatka 2014).

Mikrobiální aktivita v půdním prostředí je důležitou součástí koloběhu živin. Mikroby jsou proto nezbytné pro udržení produktivity půdy a jejího vegetačního pokryvu (Imfeld & Vuilleumier 2012; Kranz & Whitman 2019). Větší množství mikrobiální biomasy podporuje půdní mikrobiální konkurenci, která zabraňuje dominanci malého počtu mikroorganismů a přispívá k potlačování půdních patogenů (Soonvald et al. 2019).

Nelze opomenout ani kořenové exudáty jež jsou směsí mnoha nízkomolekulárních sloučenin, včetně aminokyselin, organických kyselin, mastných kyselin, sacharidů a sekundárních metabolitů (Vives-Peris et al. 2020). Kořenové exudáty z rostlin rajčat s vezikulárně-arbuskulární mykorhizou mohou obsahovat vyšší množství aminokyselin, organických kyselin a cukrů než rostliny bez této mykorhizy (Sood 2003).

Kořeny drtivé většiny rostlinných druhů rozvíjejí symbiotické asociace – arbuskulární mykorhizu. Symbiotické spojení mezi kořeny rostlin a arbuskulárními mykorrhizními houbami zlepšuje výkon rostlin za normálních, ale i stresujících podmínek. Inokulace rhizobakteriemi podporujícími růst rostlin zlepšuje růst různých druhů plodin, včetně rajčat, papriky, kukuřice, fazole a hlávkového salátu, které rostou v zasolených půdách. Byl také izolován z kořenů rajčat kmen, jež byl identifikován jako *Bacillus amyloliquefaciens* T-5 a mohl by potlačit *Ralstonia solanacearum* (původce bakteriální hnědé hniloby bramboru) a účinně kolonizuje kořeny rajčat (Liu et al. 2016; Hahm et al. 2017).

Za hlavní zdroj enzymů v půdě jsou považovány především mikroorganismy, dále půdní živočichové a rostliny. Jakmile dojde k rozkladu buňky, dostávají se enzymy do půdy, kde se určitá část rozloží a další část se stává zdrojem zásoby extracelulárních enzymů, které lze monitorovat. Podrobněji je tato problematika rozebrána v následujících kapitolách.

### 3.1.4 Možnosti stanovení mikroorganismů v půdě

Jednou z metod stanovení mikrobiální půdní biomasy je **analýza fosfolipidových mastných kyselin** (PLFA), hlavní složky buněčných membrán živých buněk. Každá ze skupin PLFA je charakteristická pro určité skupiny mikroorganismů (grampozitivní/gramnegativní bakterie, aerobní/anaerobní bakterie, houby a paraziti). Jak je známo, mikroorganismy jsou schopné reagovat na změny v půdním prostředí (např. vlivem působení xenobiotik), tudíž PLFA mikroorganismů jsou vhodnými bioindikátory ke stanovení vlivů stresových faktorů. Pokud jsou známy faktory, které změny v mikrobiálně osídlených substrátech vyvolaly, je možné z nerovnováhy v optimálním poměru skupin mikroorganismů předpokládat obdobný vliv xenobiotik jako na půdách testovacích. Tato metoda spočívá v extrakci lipidů, následně dochází k izolaci fosfolipidů a uvolnění mastných kyselin a převedení mastných kyselin na methylestery. Methylestery se detekují za pomoci plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Slabou stránkou metody je, že na základě poměru jednotlivých PLFA dochází pouze k odhadu kolonií mikroorganismů (Zelles 1999; Frostegård et al. 2011; Sułowicz et al. 2016)

Nelze opomenout ani možnost stanovení mikroorganismů metodou **polymerázové řetězové reakce** (PCR). Tato metoda umožňuje amplifikaci specifického úseku DNA, z tohoto důvodu je proto nezbytná znalost genomu daného druhu mikroorganismu. Základním principem je opakující se enzymatická syntéza nových řetězců DNA. PCR lze rozdělit do třech kroků, které se opakovaně střídají. Prvním krokem je denaturace, následuje nasednutí primerů a posledním krokem je elongace. Během denaturace se uvolňují vodíkové můstky a z dvouřetězcové molekuly DNA vzniknou dvě jednořetězcová vlákna, ve druhém kroku se primery připojí na specifická místa DNA. Tím dojde k ohraničení cílové sekvence, která bude namnožena, poté dochází k elongaci DNA řetězců. Pro každý z těchto kroků existují specifické podmínky (ku příkladu různé teploty a doba trvání jednotlivých kroků). Je známá také modifikace PCR, označována jako Real-time PCR. Rozdíl mezi těmito metodami spočívá v tom, že Real-time PCR umožňuje sledování amplifikovaných produktů v průběhu jednotlivých reakčních cyklů v reálném čase, zatímco u klasické PCR je detekce výsledného produktu možná až po skončení celého procesu (Bustin et al. 2005; Smith et al. 2009; Navarro et al. 2015).

Kromě přímých měření ke stanovení mikrobiální půdní biomasy je možné k hodnocení mikrobiální činnosti v půdě použití jednotlivých enzymatických aktivit, tedy metodu nepřímou. Byla navržena řada metod pro **stanovení enzymatických aktivit** v půdě. Techniky se často liší ve způsobu detekce (spektrofotometrie, fluorescence), reakčních podmínkách (teplota, použití pufrů, doba reakce) a/nebo v použití různých reakčních substrátů pro měření enzymatické aktivity. Nejčastěji používanými substráty pro kvantifikaci relativně velké skupiny exoštěpících hydroláz jsou molekuly založené na *p*-nitrofenolu, 4-methylumbelliferolu a amidomethylcoumarinu. *p*-nitrofenol se používá pro spektrofotometrické techniky. Substráty vykazují relativně nízkou citlivost a barevná reakce je nepoužitelná u tmavých nebo zakalených vzorků. 4-methylumbelliferol a amidomethylcoumarin jsou substráty, které se používají při fluorescenční detekci. Jsou vysoce citlivé, ačkoli fenolové sloučeniny (např. huminové látky) mohou způsobit zhášení fluorescence. Kromě toho je fluorescence MUF silně závislá

na pH. Slabiny metod využívajících MUF nebo AMC lze překonat výběrem vhodného souboru standardů (Baldrian 2009).

V rámci půdních enzymatických aktivit je skupina hydroláz nejčastěji měřenými enzymy v půdách, a proto je mnoho autorů navrhuje jako potenciální ukazatele stavu půdy. Vzhledem k diplomové práci, bude blíže pojednáno o těchto látkách v následujících kapitolách.

## **3.2 Enzymy**

### **3.2.1 Charakteristika enzymů**

Enzymy se nachází ve všech živých systémech a zároveň představují největší a zdaleka nejsložitější skupinu složených bílkovin. Jsou biologickými katalyzátory biochemických reakcí, z čehož vyplývá jejich nepostradatelnost pro každou buňku i složitý organismus. Buněčné enzymy jsou plně funkčními pouze v případě, že se nachází v živé buňce. Jakmile buňka odumře a rozpadne se, tak se enzymy inaktivují a rozloží jako většina biomasy. Nicméně některé buněčné enzymy mohou zůstat aktivní i po zániku buňky (Vodrážka 1992; Schomburg et al. 2017; Šimek et al. 2019).

V současné době je známo více než 2000 různých druhů enzymů. Klasifikace enzymů je založena na specifitě účinku a specifitě substrátové. V mezinárodním katalogu enzymů je uveden každý enzym s příslušným čtyřčíselným kódem, tzv. EC-číslem. Téměř každý enzym má své specifické působení. A to jak co do typu katalyzované reakce (specifita účinku), tak i sloučenin („substrátů“), jejichž přeměnu katalyzují (substrátová specifita). Enzymy, které jsou v buňce víceméně stále přítomné, jsou enzymy konstituční (strukturní), zatímco jinou velkou skupinu enzymů reprezentují indukované (induktivní) enzymy. Indukované enzymy se mohou tvořit např. v případě, že se v okolí buňky vyskytne látka, kterou buňka může využít (výskyt látky vyvolává tvorbu enzymy) (Šimek et al. 2019).

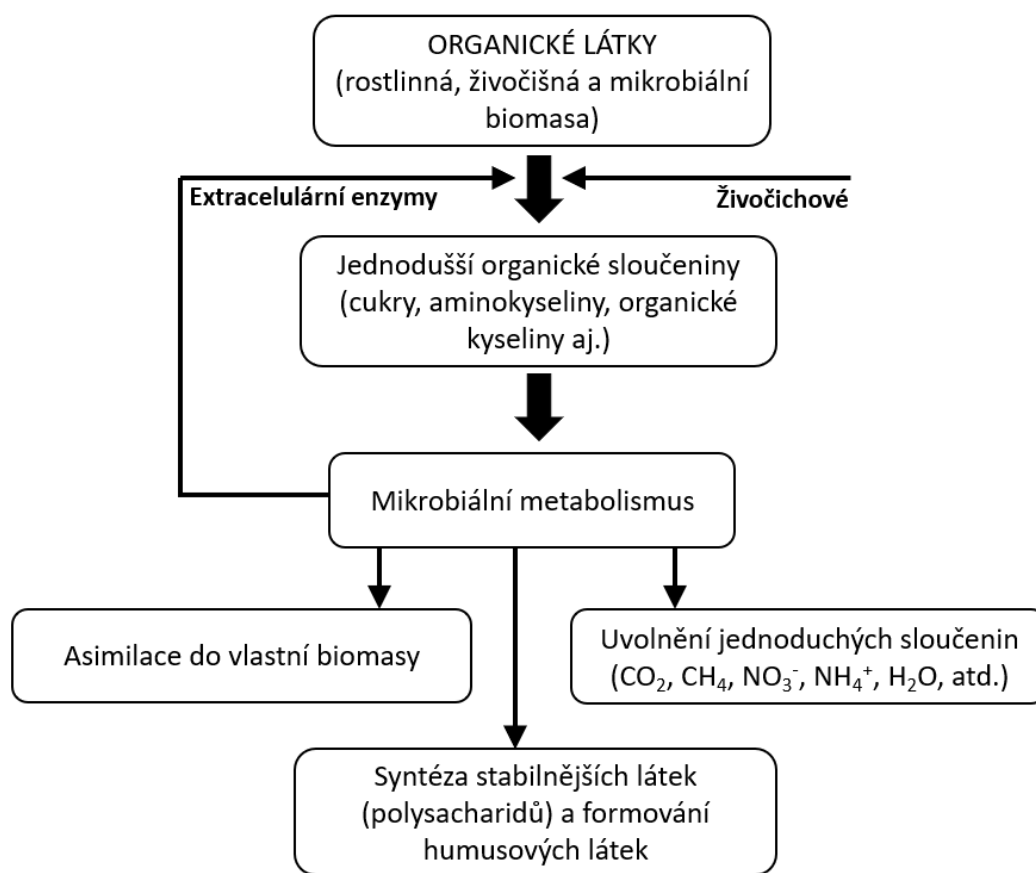
### **3.2.2 Enzymy v půdě**

Kromě živých organismů se v půdě nachází i mnoho biochemických sloučenin, které pocházejí z organismů. Půdní mikroorganismy a živočichové uvolňují do půdy značné množství látek, a to např. pro usnadnění pohybu v půdě, jako signální látky pro jiné organismy, jako obranné nebo „útočné“ látky vůči jiným organismům, nebo za účelem získávání potravy. K posledně jmenované skupině látek uvolňovaných organismy patří enzymy, respektive exoenzymy, čili extracelulární enzymy (Šimek et al. 2019). Všechny půdy obsahují skupiny intracelulárních a extracelulárních enzymů různého původu, které mohou být syntetizovány rostlinami, zvířaty a mikroorganismy (Adetunji et al. 2017).

Exoenzymy jsou enzymy, které jsou syntetizovány v buňkách a z těchto buněk se uvolňují do okolního prostředí (prostředím může být např. krev nebo trávicí systém vlastního těla, či u půdních organismů též i půdní prostředí). Jsou produkovány především půdními

mikroorganismy v trávicích traktách živočichů a exkrementech a v menší míře kořeny rostlin a půda je díky nim nepřímě obohacena o enzymy. V půdě je lze nalézt v půdním roztoku nebo ve stabilizované formě na povrchu jílových minerálů a oxidů a hydroxidů železa či vázané organickými koloidy (Steinauer et al. 2015; Šimek et al. 2019).

Půdní mikroorganismy produkují extracelulární enzymy k získání biologicky dostupných živin z půdní organické hmoty (Obrázek 2) pro mikrobiální a rostlinné využití. Produkce enzymů v půdních mikroorganismech je regulována jejich potřebou a dostupností živin, což je zase ovlivněno několika faktory, jako je především teplota a množství půdní vody (Steinauer et al. 2015; Xiao et al. 2018).



Obrázek 2 Extracelulární enzymy v půdě (Šimek et al. 2019)

Tyto zmíněné enzymy degradují polymerní látky (např. celulóza, chitin, lignin) z rostlinných zbytků a ostatní organické hmoty vstupující do půdy na dostupné podjednotky (např. cukr, aminokyseliny, amonium, fosfát) pro metabolismus a růst půdních mikroorganismů a rostlin (Steinauer et al. 2015; Veres et al. 2015; Šimek et al. 2019). Dále jsou nenahraditelné při mineralizaci organických látek v půdě a uvolňování minerálních živin a mají také podstatnou úlohu při syntéze nových organických látek a při tvorbě humusu v půdním prostředí a rovněž pro stabilizaci půdní struktury (Makoi & Ndakidemi 2008; Veres et al. 2015; Šimek et al. 2019). Kromě toho jsou extracelulární enzymy ovlivněny fyzikálními, chemickými, mikrobiologickými a biochemickými vlastnostmi půdy (Makoi & Ndakidemi 2008).

Konstituční enzymy jsou v půdě přítomné stále a jejich koncentrace se téměř nemění ani při dodání nového substrátu. Konstituční enzymy nejspíše aktivují a rozštěpí část makromolekuly. Uvolněné monomerní nebo dimerní produkty této enzymatické reakce následně buňka snázeji přijme a jejich přítomnost v buňce spustí syntézu a následnou exkreci daného enzymu do okolního prostředí. Po rozštěpení substrátu jsou štěpné produkty přijaty buňkou. Půdní enzymy, kterými se tato práce zabývá, mohou být zahrnuty do těchto skupin (Tabulka 1) (Šimek et al. 2019).

Tabulka 1 Příklady kategorií půdních enzymů a jejich reakce (Šimek et al. 2019)

<b>Skupina</b>	<b>Funkce</b>	<b>Enzym</b>	<b>Enzymová reakce</b>
Depolymerázy	Hydrolyza glykosidické vazby	Xylanáza	Hydrolyza xylanů (hemicelulóz)
		Celuláza	Hydrolyza celulózy
		Invertáza	Hydrolyza sacharózy
		Pektináza	Hydrolyza pektinů
		<b>Chitináza</b>	Hydrolyza chitinu
Mineralizační enzymy	Mineralizace sloučenin fosforu	<b>Fosfatáza</b>	Rozklad organických sloučenin fosforu na orthofosfáty
	Mineralizace sloučenin síry	<b>Sulfatáza</b>	Rozklad organických sloučenin síry na sulfáty

Novější studie poukazují na to, že řada enzymů může být přichycena na vnějším povrchu mikrobiálních buněk, což umožňuje poměrně snadný přístup k substrátům. Reakční produkty těchto enzymů, které jsou produkovány v nejtěsnější blízkosti buněk, by tudíž mohly fungovat jako efektivní spouštěče syntézy a též i exkrece nových enzymů z buněk do prostředí (Šimek et al. 2019).

### 3.2.3 Enzymatická aktivita

Jak již bylo pojednáno výše, rozšíření enzymů v půdě je velmi podobné jako u většiny organismů a jejich množství a rovněž aktivita klesá s narůstající hloubkou půdy. Ovšem, Šimek et al. (2019) uvádí, že v rhizosféře se vyskytuje mnohem více enzymů než v okolní půdě. Mimo to je aktivita půdních enzymů ovlivňována ku příkladu agrotechnickými zásahy či degradačními procesy.

Změny aktivit extracelulárních enzymů, které degradují hlavní složky půdní organické hmoty, se liší v závislosti na druhu a společenství rostlin. Jsou spojeny s tím, jak kvalitní jsou zdroje uhlíku a se změnami rychlosti rozkladu a ukládání uhlíku v půdě. Kvantifikací potenciální aktivity těchto enzymů je možné učinit závěry o relativním úsilí mikroorganismů



zaměřeném mikroorganismy na získání uhlíku, dusíku nebo fosforu ze specifických zdrojů (viz Tabulka 2) (Steinauer et al. 2015; Veres et al. 2015).

Tabulka 2 Význam vybraných půdních enzymů (Adetunji et al. 2017)

<b>Půdní enzym</b>	<b>Enzymatická reakce</b>	<b>Katalytická reakce</b>	<b>Indikátor mikro- biální aktivity</b>
Dehydrogenáza	Elektronový transportní řetězec	$XH_2 + A \rightarrow X + AH_2$	Koloběh uhlíku
$\beta$ -D-glukosidáza	Hydrolyza celobiózy	$Glukosid + H_2O \rightarrow ROH +$ glukóza	Koloběh uhlíku
Celuláza	Hydrolyza celulózy	Hydrolyza vazby $\beta$ -1,4- glukanů	Koloběh uhlíku
Fenol oxidáza	Hydrolyza ligninu	$A + H_2O_2 \rightarrow oxidace A +$ $H_2O$	Koloběh uhlíku
Ureáza	Hydrolyza močoviny	$Močovina \rightarrow 2NH_3 + CO_2$	Koloběh dusíku
Amidáza	Mineralizace dusíku	Amid karboxylové kyseliny + $H_2O \rightarrow$ karboxylová kyselina + $NH_3$	Koloběh dusíku
Proteáza	Mineralizace dusíku	Proteiny $\rightarrow$ peptidy a aminokyseliny	Koloběh dusíku
Fosfatáza	Uvolnění $PO_4^-$	Fosfátový ester + $H_2O \rightarrow$ ROH fosfát	Koloběh fosforu
Arylsulfatáza	Uvolnění $SO_4^-$	$ROSO_3^- + H_2O \rightarrow ROH$ $SO_4^{2-}$	Koloběh síry
Jiné enzymy	Hydrolyza	Hydrolyza	Obecné enzymové aktivity využívané k degradaci organické hmoty

Aktivity půdních enzymů se často úzce spojují s důležitými parametry kvality půdy, jako jsou organická hmota, fyzikální vlastnosti půdy a aktivita, resp. přítomnost půdních mikroorganismů. Mohou se začít měnit mnohem dříve (1–2 roky) než jiné vlastnosti (např. půdní organický uhlík), čímž poskytují včasnou indikaci změn v souvislosti s hospodařením s půdou (Adetunji et al. 2017). Enzymatická aktivita může být integračním půdním biologickým indexem dřívějšího hospodaření s půdou a testy aktivity jsou relativně jednoduché a citlivé ve srovnání s metodami používanými k odhadu dalších důležitých vlastností kvality půdy. Jordan et al. (1995) považovali měření enzymatické aktivity v kombinaci s fyzikálními a chemickými vlastnostmi půdy za spolehlivé, včasné ukazatele změn v kvalitě půdy a za použitelné pro hodnocení krátkodobých i dlouhodobých dopadů.

Volba sledovaných enzymů pro hodnocení kvality půdy je založena na jejich citlivosti v rámci hospodaření s půdou, rozkladu organických látek a relativní nenáročnosti během analýzy (Balota & Chaves 2010). Ukázalo se, že stanovení úrodnosti půdy a výnosu rostlin pomocí jediné enzymatické aktivity je nepřesné. Je tomu tak proto, že aktivity půdních enzymů katalyzují konkrétní reakci, a proto nemohou být spojeny s obecnou mikrobiologickou aktivitou půdy, která zahrnuje širokou škálu různých enzymatických reakcí.

Jak již bylo zmíněno, individuální enzymatická aktivita tedy neodráží stav kvality půdy, protože jednotlivé enzymatické aktivity nemohou představovat rychlost všech metabolických procesů (pokud katalyzují jednu konkrétní reakci). Mělo by se tedy hodnotit několik enzymatických aktivit, aby bylo možné účinně posoudit kvalitu půdy. Je však nutné zdůraznit skutečnost, že druh použitého substrátu a charakter enzymatické aktivity vystihují funkční diverzitu, zatímco charakter nukleových kyselin a fosfolipidových mastných kyselin poskytují informace o strukturálním složení mikrobiální biomasy (Vepsäläinen et al. 2001).

Z dlouhodobého hlediska je měření enzymatických aktivit uplatňováno ve spojitosti s hodnocením úrodnosti půdy a kvantifikací procesů napříč různých ekosystémů. Dle Veres et al. (2015), odhad aktivity extracelulárních enzymů tedy přímo hodnotí mikrobiální aktivitu a mikrobiální přínos ke koloběhu živin.

Je nutné vyzdvihnout činnost půdních enzymů jako důležitých markerů při hodnocení požadavků na mikrobiální živiny a mikrobiální funkční reakce na změny prostředí. Studium enzymatické aktivity v půdě může přinést důležité poznatky o účincích zvyšujících se teplot a změn v rozmanitosti rostlin na fungování půdních mikrobiálních společenství. Je také jedním z klíčových parametrů používaných při hodnocení kvality a úrodnosti půdy kontaminované pesticidy, rizikovými prvky a jinými xenobiotiky. Vzhledem k výše uvedenému, se měření enzymatických aktivit stále častěji používá ke zkoumání změn mikrobiálních funkcí v důsledku antropogenních dopadů.

### **3.2.4 Regulace metabolismu půdních organismů**

Regulace metabolismu je založena na rychlosti enzymatických reakcí. Tyto reakce vytvářejí metabolické dráhy a také cykly, které vedou k určitým produktům. Avšak ne všechny kroky metabolických drah bývají regulovány. Z pohledu regulace je nejefektivnější cestou ovlivňování nejpomalejší reakce určité metabolické dráhy, která rozhoduje o její celkové rychlosti. Šimek et al. (2019) uvádí, že mnohdy bývá regulována první vstupní reakce dráhy. Tuto reakci katalyzuje regulační enzym.

V předchozí kapitole bylo stručně pojednáno o vlivu substrátu vzhledem k enzymatickým aktivitám. Z tohoto důvodu je možné zmínit skutečnost, že rychlost enzymatických reakcí je dána koncentrací substrátu a produktu a koncentrací aktivní molekul enzymu. Z čehož vyplývá, že enzymatické reakce mohou být regulovány změnou koncentrace enzymů nebo ovlivněním jejich aktivity. To dokládá Šimek et al. (2019), reakce je urychlena při zvýšení koncentrace substrátu, což následně vede k poklesu jeho koncentrace. Jakmile se změní koncentrace substrátů a produktů, tak může dojít ke stabilizaci rychlosti dílčích

enzymatických reakcí. Nicméně je zapotřebí dodat, že pro regulaci rychlosti celých metabolických drah je nutná regulace na úrovni koncentrace nebo aktivity enzymů. Klíčový mechanismus regulace je založen na změně koncentrace aktivní formy (regulačního) enzymu. Existuje několik základních mechanismů, dle kterých je změna realizována – regulací rychlosti syntézy enzymu, regulací rychlosti degradace enzymu, kompartmentací metabolických dějů (především u eukaryot a ve tkáních mnohobuněčných živočichů), kovalentní chemickou modifikací enzymu, alosterickou interakcí.

Operonový model slouží k popisu mechanismů indukce (aktivace) či represe (inhibice) exprese genu, který kóduje daný enzym. Operony (skládají se z promotoru a operátoru) fungují jako transkripční jednotka a kódují většinou enzymy určité metabolické dráhy. V půdě je indukce a represe mikrobiálních genů důležitá v široké škále důležitých procesů – produkce extracelulárních enzymů, exprese enzymů aerobního a anaerobního metabolismu (během střídání aerobních a anaerobních podmínek v půdě) dále při přizpůsobování metabolismu novým substrátům nebo aktivace metabolismu po vstupu živin do půdního prostředí. Podle regulace syntézy enzymů indukci a represí jsou rozlišovány konstitutivní enzymy (vznikají neustále), indukovatelné enzymy (jsou syntetizovány v přítomnosti substrátu indukující jejich produkci) a reprimovatelné enzymy (jejich produkce začíná, pokud v prostředí chybí látka, jejíž biosyntézu katalyzují) (Šimek et al. 2019).

Dalším mechanismem je kompartmentace metabolických dějů, kde v důsledku rozdělení biochemických pochodů (u eukaryotických buněk a mnohobuněčných organismů) může docházet k tvorbě specifických optimálních podmínek (např. různé úrovně pH) pro průběh enzymaticky katalyzovaných reakcí.

Při alosterické interakci se daný metabolit, což je zpravidla produkt metabolické dráhy, který zahrnuje regulovaný enzym, naváže na enzym tak, že změní konformaci jeho molekuly. Tím je znemožněn průběh enzymatické reakce (enzym je inaktivován) a s rostoucí koncentrací metabolitu klesá koncentrace aktivní formy enzymu a důsledkem toho se snižuje rychlost reakce (Šimek et al. 2019). Z toho plyne, že je tak zachována zpětná vazba ve vztahu produkce metabolitů a aktivitou enzymů, které je produkují. Zároveň, jakmile poklesne koncentrace metabolitu, dojde k obnovení rychlosti reakce.

Závěrem lze podotknout skutečnost, že mikroorganismy jsou schopné přizpůsobení se změnám vzhledem k vnějším podmínkám za pomoci využití různých kombinací právě výše uvedených mechanismů.

### 3.2.5 Vybrané enzymy a jejich aktivity

V následující kapitole jsou charakterizovány vybrané půdní enzymy, kterými se tato práce zabývá –  $\beta$ -D-glukosidáza, kyselá fosfatáza a alkalická fosfatáza, chitináza a arylsulfatáza.

### 3.2.5.1 $\beta$ -D-Glukosidáza

$\beta$ -D-glukosidáza (EC 3.2.1.21) patří do třídy enzymů, které zprostředkovávají hydrolýzu  $\beta$ -glukosidických vazeb v aryl-, amino- nebo alkyl- $\beta$ -D-glukosidech, kyanogenních glukosidech a oligo- nebo disacharidech (Asati & Sharma 2019).  $\beta$ -DG je důležitá pro degradaci celulózy, hlavní složky rostlinných polysacharidů. Je aktivní v prvních fázích rozkladu organických sloučenin, které snižují molekulární velikost organických struktur, čímž usnadňují budoucí aktivitu mikrobiálních enzymů. Tento enzym je zásadní v koloběhu uhlíku a obecně pro půdu a organickou hmotu (Masciandaro et al. 2008; Lammirato et al. 2010; Veres et al. 2015).

$\beta$ -D-glukosidáza se vyskytuje převážně mezi rostlinami, zvířaty, houbami, bakteriemi a kvasinkami. Je odvozena především z půdních mikrobiálních heterotrofů, zejména z čeledi plísňotvaré (mucorales), jako je *Actinomucor* a *Mortierella*. Syntéza enzymů v těchto organismech je vyvolána produkty rozkladu celulózy, včetně cellobiózy, glukózy a jejich metabolitů (Turner et al. 2002; Veres et al. 2015). Tento enzym hraje roli i v obraně proti rostlinným patogenům a ve využití oligosacharidových substrátů mnoha houbami a bakteriemi. Kromě toho existuje několik dalších použití, např. výroba biopaliv a ethanolu ze zemědělského odpadu (Asati & Sharma 2019).

Oxidační enzymy ve statkových hnojivech a půdě, různě klasifikované jako fenol oxidázy, polyfenol oxidázy, lakázy nebo peroxidázy, zprostředkovávají tvorbu a degradaci ligninu a humusu (Veres et al. 2015). Kvůli důležité funkci, kterou hraje  $\beta$ -D-glukosidáza při rozkladu polysacharidů na monosacharidy, jež mohou mikroorganismy mineralizovat, má potenciál jako důležitý ukazatel kvality půdy (Turner et al. 2002; Lammirato et al. 2010; Yang et al. 2019). Zároveň může být  $\beta$ -DG adsorbována na montmorillonit, to může snížit její hydrolytickou aktivitu a snížená enzymatická aktivita byla také pozorována pro  $\beta$ -D-glukosidázu, když byla adsorbována na kaolinit a goethit.

### Aktivita $\beta$ -D-Glukosidázy

Aktivita  $\beta$ -D-glukosidázy je ovlivněna kvalitou rostlinných zbytků a řadou metod obhospodařování půdy. Tento enzym je citlivý na postupy zemědělské praxe a na změny podmínek prostředí. Systém bez kultivace a snížení četnosti zpracování půdy vede ke zvýšení aktivity  $\beta$ -D-glukosidázy i mikrobiální biomasy uhlíku a dusíku na rozdíl od konvenčního systému zpracování půdy (Pandey et al. 2014; Khadem & Raiesi 2019). Proto konvenční systém zpracování půdy může způsobit vyčerpání půdní organické hmoty, což může vést k nižšímu množství jednoduchých cukrů pro mikrobiální fungování, a to v důsledku snížení  $\beta$ -D-glukosidázové aktivity. Z čehož vyplývá, že aktivitu  $\beta$ -D-glukosidázy je možné zvýšit přidáním jednoduchých organických látek obsažených v rostlinných zbytcích (Adetunji et al. 2017). Aktivita  $\beta$ -D-glukosidázy je často nižší v orných půdách než v lesních a lučních půdách. Její aktivita může odhalit změny v hospodaření s půdou v relativně krátkých časových obdobích (1–3 roky) a je poměrně stabilní s ročními obdobími (Bandick & Dick, 1999; Knight & Dick 2004; Moscatelli et al. 2012).

Hayano a Katami (1977) porovnávali pH optima s hodnotami z literatury, aby určili zdroj aktivity  $\beta$ -D-glukosidázy v půdním extraktu. Zjistili Langmuirův vztah mezi objemem půdního extraktu a  $\beta$ -D-glukosidázovou aktivitou, což znamená, že enzym byl v extraktu sorbován na půdní koloidy (Knight & Dick 2004).

Dle Eivazi & Tabatabai (1990) aktivita  $\beta$ -D-glukosidázy klesala se zvyšujícím se pH půdy ze 4,5 na hodnotu 8,5 (Adetunji et al. 2017). Citlivost  $\beta$ -DG na změny pH může sloužit jako spolehlivý biochemický ukazatel pro hodnocení změn prostředí způsobených acidifikací půdy (Acosta-Martinez & Tabatabai 2000).

Aktivita  $\beta$ -D-glukosidázy je ovlivněna i vlhkostí půdy. Sardans & Penuelas (2005) uvádějí, že aktivita tohoto enzymu se snížila o 10–80 % a 35–83 %, když se vlhkost půdy snížila o 10 % a 21 %, v závislosti na hloubce půdy. Sucho tedy ovlivňuje aktivitu  $\beta$ -D-glukosidázy a její katalytické vlastnosti, což způsobuje pomalejší výměnu živin a snížený přísun živin rostlinám (Adetunji et al. 2017). Aktivita  $\beta$ -DG klesá s hloubkou půdy, příčinou je, že mikroorganismy produkující tento enzym jsou aktivní především ve vrchní vrstvě půdy.

Obecně je  $\beta$ -D-glukosidázová aktivita úzce spjata s půdní organickou hmotou, biologickou aktivitou a koloběhem uhlíku a může poskytovat známky o změnách organického uhlíku dlouho předtím, než je to možné správně určit jinými rutinními technikami. Tyto vlastnosti významně umožnily její přijetí pro testování kvality půdy v zemědělství. Je však zapotřebí více znalostí, aby bylo možné prokázat dynamiku  $\beta$ -D-glukosidázy a dalších faktorů ovlivňujících jejich aktivitu. A to z důvodu lepšího porozumění biologickým procesům a úrodnosti půdy v zemědělství (Adetunji et al. 2017).

### 3.2.5.2 Kyselá fosfatáza

Fosfatázy zahrnují pět hlavních skupin enzymů: fosfomonoesterázy, fosfodiesterázy, fosfotriesterázy, pyrofosfatázy a fosfoamidázy. Z těchto enzymů jsou fosfomonoesterázy v půdách nejhojnější. A to pravděpodobně kvůli nízké substrátové specificitě této skupiny enzymů. Fosfomonoesterázy zahrnují kyselou (EC 3.1.3.2) a alkalickou (EC 3.1.3.1) fosfatázu, kterou lze rozlišit podle optimálního pH pro svou aktivitu (De Cesare et al. 2000).

Kyselá fosfatáza je v přírodě velmi rozšířená a vyskytuje se u mnoha živočišných a rostlinných druhů (Bull et al. 2002). Za hlavní zdroj fosfatázy v půdě lze považovat rostliny a mikroorganismy. Množství fosfatázy přítomné v půdě se liší podle počtu mikroorganismů a rozsahu organických materiálů, minerálních a organických hnojiv, zpracování půdy a dalších zemědělských postupů (Banerjee et al. 2012; Adetunji et al. 2017).

Tento popisovaný enzym se podílí na četných procesech metabolismu rostlin účastnících se asimilace, transportu a distribuce fosforu (Schneider et al. 2001; Yan et al. 2001). Kyselá fosfatáza je řazena k fosfatázám, které katalyzují hydrolyzu fosfátových monoesterů a uvolňují volné fosfátové skupiny v kyselém prostředí, které jsou široce distribuovány v mikroorganismech, rostlinách a zvířatech (Behera et al. 2017).

Kyselé fosfatázy vyloučené z kořenů a buněčných kultur jsou poměrně nespecifické enzymy, které se zdají být důležité při hydrolýze a mobilizaci fosforu z extracelulárních fosfomonoesterů pro výživu rostlin. Vnitrobuněčné kyselé fosfatázy se bezpochyby podílejí na obvyklém využití rezerv fosforu nebo jiných sloučenin obsahujících fosfor (Duff et al. 1994; Wang & Liu 2018).

Přiměřená hodnota pH pro růst plodin může být definována jako pH, při kterém nastane příznivý poměr aktivity alkalické fosfatázy/kyselé fosfatázy. Kyselá fosfatáza je rozšířena v půdách s kyselým a neutrálním pH, a v určitém množství i v alkalických půdách (Dick et al. 2000; Amoozadeh et al. 2020). Jako optimální pH pro aktivitu imobilizované kyselé fosfatázy se jeví pH 7,0. Avšak i při alkalickém pH si imobilizovaná kyselá fosfatáza je schopna udržet 40% relativní aktivitu. Obecně je kyselá fosfatáza rozšířena v půdách s kyselým a neutrálním pH a v určitém množství i v alkalických půdách.

Kyselé a alkalické fosfomonoesterázy jsou považovány za dominantní fosfatázy ve většině typů půd. Změny úrovně aktivity fosfatáz v přirozeném prostředí, obzvláště v kompostech, jsou realizovány na dvou úrovních. Zaprvé, regulaci jejich syntézy lze studovat pro samostatný kmen, ale ne pro společenstvo mikroorganismů, protože mechanismus regulace je velmi složitý a často se liší jeden mikroorganismus od druhého. Za druhé, změny úrovně fosfatázových aktivit jsou také závislé na povaze každé fosfatázy, protože některé z nich jsou potlačitelné anorganickým fosfátem a jiné nikoli (Albrecht et al. 2010).

### 3.2.5.3 Alkalická fosfatáza

Alkalická fosfatáza a kyselá fosfatáza jsou dva důležité enzymy fosfatázy, které se vyskytují v organismech od bakterií až po savce (Amoozadeh et al. 2020). Tyto zmíněné fosfatázy mají význam při uvolňování anorganického fosforu z organických forem fosforu přítomných v půdě. Alkalická fosfatáza pochází zejména z půdních mikroorganismů, především z různých rodů bakterií, tj. *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* a *Azospirillum* (Chen et al. 2019; Yousafi et al. 2019).

Alkalická fosfatáza je proteinem se dvěma zinečnatými ionty a jedním hořečnatým iontem, které jsou nezbytné pro katalytickou aktivitu enzymu (Babaknejad et al. 2020). Může katalyzovat defosforylaci širokého spektra fosforylovaných substrátů, čímž hraje důležitou roli v různých biologických procesech (Amoozadeh et al. 2020). Katalyzuje hydrolýzu jak esterů, tak anhydridů kyseliny fosforečné a hraje důležitou roli při přenosu fosfátových skupin (Khadem & Raiesi 2019).

Alkalické fosfatázy vykazují vysokou aktivitu na alkalických půdách. A mají optimální aktivitu v alkalickém pH, tj. 9 až 11. Přičemž optimální pH se liší v závislosti na původu enzymu. Aktivita alkalických fosfatáz může sloužit jako nepřímé měřítko mikrobiální biomasy (Labidi et al. 2010; Kelly et al. 2019; Yousafi et al. 2019; Amoozadeh et al. 2020). Je známo, že hnojení organickými hnojivy zvyšuje obsah organického uhlíku v půdě, přičemž dochází ke zvýšené sekreci alkalické fosfatázy pomocí mikroorganismů

## Aktivita fosfatáz

Aktivitou enzymů fosfatáz jsou ovlivněny fyzikální a chemické vlastnosti půdy. Fosfatázy jsou dobrým indikátorem kvality a množství organické hmoty v půdě a tím obecně kvality a stavu půdy, protože jejich aktivita odráží situaci v půdě. V současné době existuje stále relativně malé množství informací o vlivu chemických vlastností půd na tyto enzymy (Nahas 2015; Šimek et al. 2019).

Kyselá fosfatáza je v kyselých půdách do určité míry zodpovědná za mineralizaci organických sloučenin fosfátů. Syntéza a aktivita fosfatázy může být ovlivněna fosforem z minerálního hnojení v půdě. To potvrzuje, že fosfatáza zvyšuje dostupné zásoby fosforu, když je tato živina v omezeném množství. A také že přidání fosforu do půdy je alternativou ke zvýšení dostupnosti tohoto prvku (Huang & Shindo 2000; Bautista-Cruz & Ortiz-Hernandez 2015). Aktivita fosfatázy je tedy spolehlivý ukazatel kvality půdy, protože okamžitě detekuje změny v půdní organické hmotě způsobené orbou. Zpracování půdy by mělo být omezeno, aby se zvýšila biologická aktivita v půdě. A také aby se zlepšily procesy koloběhu fosforu a struktura půdy. Z toho lze soudit, že aktivita kyselé fosfatázy se mění v závislosti na dostupnosti fosforu (Yan et al. 2001).

Aktivita alkalické a kyselé fosfatázy lze použít ke zkoumání optimálního pH půdy pro produkci plodin. Při vysoké hladině salinity v půdě se zároveň zvyšuje i aktivita kyselé fosfatázy. Kyselá fosfatáza je nejspíše vylučována z kořenů. Vyšší sekrece kyselé fosfatázy byla spojena s peroxidací kořenových lipidů v reakci na zvýšenou salinitu spojenou s augmentací nenasycených kyselin, které by mohly vyvolat poškození membrány kořenových buněk (Dick et al. 2000; Labidi et al. 2010). Byl také zaznamenán účinek sucha: když byla vlhkost půdy snížena o 21 %, došlo k 31-40 % snížení aktivity kyselé fosfatázy (Sardans & Penuelas, 2005).

### 3.2.5.4 Chitináza

Chitinázy (EC 3.2.1.14) patří do skupiny glykosylhydroláz a jsou produkovány celou řadou organismů, včetně hub, rostlin, hmyzu a bakterií (např. *Actinobacteria* a *Proteobacteria*). Hydrolyzují chitin, který je jinak poměrně odolný vůči degradaci, aby umožnil využití konečných produktů jako zdroje energie, uhlíku a/nebo dusíku (Hjort et al. 2009). Toto je důležitý krok v biogeochemickém koloběhu uhlíku a dusíku v životním prostředí. V půdě je chitin široce distribuován v tělech hmyzu a buněčných stěnách hub. Jinak řečeno, chitinázy hrají důležitou roli při rozkladu chitinu a potenciálně při využívání chitinu jako obnovitelného zdroje (Gooday 1990; Bhattacharya et al. 2007). Rostlinné chitinázy jsou proteiny související s patogenezí, o kterých se předpokládá, že hrají důležitou roli v obraně rostlin proti infekci patogeny. Chitinázy jsou indukovány v rostlinách po invazi patogeny a různými abiotickými stresovými faktory (Khan & Shih 2004; Hjort et al. 2009).

Klasifikace chitinolytických enzymů se týká enzymatického působení na chitinové substráty. Exochitinázy katalyzují degradaci z neredukujícího konce chitinu a uvolňují acetylchitobiózu nebo N-acetylglukosamin. Endochitinázy katalyzují hydrolýzu vnitřních bodů chitinového řetězce (Santos et al. 2008).

### Aktivita chitinázy

Chitinázy I. třídy se v reakci na poškození a patogenní infekci rostlin hromadí ve vakuolách. A to v poměrně velkém množství. Tyto chitinázy mají antimykotickou aktivitu proti různým patogenním houbám (Maximova et al. 2005; Poulsen et al. 2008).

Shrestha et al. (2008) pozorovali, že aktivita chitinázy se významně zvýší ve většině infikovaných rostlin, ve srovnání s jejich zdravými kontrolními variantami. Vyšší aktivitu chitinázy po infekci *Trichoderma fusarium* oproti kontrolním rostlinám zaznamenali také Shoresh & Harman (2010). Její aktivitu lze snadno testovat pomocí jednoduché spektrofotometrie. Vzhledem k velké pestrosti chitinolytických enzymů v rostlinách není moc vhodné využívat celkovou aktivitu chitinolytických enzymů jako kvantitativní měřítko indukované rezistence nebo jiných faktorů. Nicméně pokud jde o odolnost vůči chorobám, jsou rozdíly mezi exo- a endo enzymy poměrně veliké (Shoresh & Harman 2010).

Dle Poulsen et al. (2008) by přítomnost mikrobiální populace spojená s vysokou chitinázovou aktivitou v konkrétním kompostu mohla naznačovat, že přidání chitinu by mohlo indukovat zvýšenou aktivitu chitinázy, a tím podpořit růst rostlin.

#### 3.2.5.5 Arylsulfatáza

Sulfatázy (sulfohydrolázy, EC 3.1.6.1) jsou enzymy třídy esteráz, které katalyzují hydrolýzu esterových sulfátů, kde vazba se síranem je ve formě R–O–S a R představuje rozmanitou skupinu. V přírodě se vyskytuje několik typů sulfatáz, včetně arylsulfatáz, alkylsulfatáz, steroidních sulfatáz, glukosulfatáz, chondrosulfatáz a mykosulfatáz. Arylsulfatáza hraje důležitou roli v koloběhu síry. Hydrolyzuje sulfátové estery na sírany, je klíčovým enzymem mineralizace organické síry v půdě. Tento enzym může katalyzovat hydrolýzu organických sulfátových esterů a někdy může představovat stupeň omezující rychlost v celém cyklu (Cregut et al. 2009; Klose et al. 2011).

Arylsulfatáza se nachází v rostlinách, houbách, bakteriích a zvířatech, ale předpokládá se, že hlavním zdrojem tohoto enzymu v půdě jsou mikroorganismy. AS byla izolována z mnoha mikroorganismů (Cregut et al. 2009; Klose et al. 2011). A Galletti et al. (2008) uvádí, že druhy *Aspergillus*, které jsou v prostředí rozšířené a běžně se vyskytují v půdě, produkují arylsulfatázu. Kromě mikroorganismů jsou hlavními zdroji arylsulfatázy v půdě i kořeny rostlin. V důsledku toho lze očekávat, že negativní jevy ovlivňující kořenovou zónu, a tím i ekologii a aktivitu půdního mikrobiálního společenství, ovlivní enzymatickou aktivitu.



## Aktivita arylsulfatázy

Aktivita arylsulfatázy koreluje s obsahem organických látek v půdě a klesá s hloubkou půdy. Nedávné studie naznačují, že aktivita arylsulfatázy je dána spíše množstvím a kvalitou dostupného uhlíku než celkovým organickým uhlíkem (Klose et al. 2011). V důsledku toho se úroveň aktivity arylsulfatázy v rhizosféře může lišit v závislosti na druhu rostliny. Kromě toho se tato aktivita může měnit během fenologických fází rostliny, protože translokace uhlíku v půdě klesá během vegetačního období (Warembourg & Estelrich, 2001; Knauff et al., 2003).

Aktivita je ovlivněna také fyzikálně-chemickými vlastnostmi půdy. Optimální hodnoty pH tohoto enzymu jsou mezi 5,5 a 6,2. Studie naznačují, že aktivita arylsulfatázy je spojena s množstvím síry, protože biochemická mineralizace závisí na uvolňování  $\text{SO}_4^{2-}$  z frakce esterového sulfátu enzymatickou hydrolýzou a většina mineralizovatelné půdní organické S v půdě je ve formě sulfátu esteru. Aktivita tohoto enzymu může být použita jako indikátor potenciálu biochemické mineralizace organických esterových sulfátů v půdě. Je pravděpodobné, že aktivita arylsulfatázy je nižší v lesních půdách, které jsou vystaveny zvýšené atmosférické depozici síry, nebo v těch, které byly doplněny síranovými hnojivy na zemědělské půdě (Prietzel 2001; Dedourge et al. 2004; Klose et al. 2011).

## 3.3 Fungicidy

Pesticidy jsou často klasifikovány podle typu škodlivých organismů, které regulují. Zahrnují především herbicidy, insekticidy, nematocidy, fungicidy a půdní fumiganty. Pesticidy jsou tedy definovány jako jakákoli látka nebo směs látek používaných k prevenci, ničení, odpuzování nebo potlačení škůdce (Nollet & Rathore 2009). Dalším způsobem, jak přemýšlet o pesticidech, je zvažovat jejich chemickou strukturu, jejich společný zdroj nebo způsob, jakým se vyrábějí. Představují rozmanitou skupinu anorganických a organických látek vstupujících do ekosystému v širším měřítku, zejména díky cílené činnosti člověka (Imfeld & Vuilleumier 2012). Jejich použití se však neomezuje pouze na zemědělské účely, ale také na ochranu dřeva, dezinfekci a ochraně proti škůdcům v domácnostech (Almeida & Nogueira 2012; Zhang et al. 2019b).

Rozsáhlé aplikace pesticidů, jejich toxicita, mobilita a perzistence mohou vést k jejich rozptýlení do všech sfér životního prostředí. Nadměrné používání pesticidů a jejich rezidua jak v životním prostředí, tak v zemědělské produkci je stále hlavním problémem ovlivňujícím stav životního prostředí. A proto se stále více studií provádí s cílem určit jejich účinky na živé organismy (Imfeld & Vuilleumier 2012; Zhang et al. 2019b). Jak uvádějí Baćmaga et al. (2015), velké množství aplikovaných pesticidů se hromadí v půdě, čímž může docházet ke změnám v půdním prostředí, což se často projevuje snížením půdní úrodnosti a změnou mikrobiální aktivity půdy.

Předmětem této práce jsou fungicidy – látky přírodního nebo syntetického původu používané k potlačení fytopatogenních hub, plísní a jejich spór. Choroby plodin jsou způsobeny širokou škálou organismů, které zahrnují pravé houby (např. *Ascomycota* a *Basidiomycota*), ale také oomycety (např. *Phytophthora* a *Pythium*), *Plasmodiophora*, bakterie, viry a hlístice. Pod

pojmem fungicid se obvykle rozumějí sloučeniny regulující pravé houby, *Plasmodiophora* a *Oomycota* (Oliver & Hewitt 2014).

Fungicidy lze dělit dle různých kritérií. Obecně jsou klasifikovány na základě jejich chemických vlastností, formy aplikace nebo způsobu účinku proti patogenům. Podle Matthews (2018) je možné vývoj fungicidů rozdělit na tři období: anorganické fungicidy, syntetické organické protektanty a organické systémové fungicidy. V současné době jsou nejčastěji používanými fungicidy převážně látky organické. Klasifikace fungicidů podle chemického hlediska je možná v souladu se základní chemickou strukturou nebo podle převažujícího prvku na sloučeniny obsahující ve své struktuře např. měď, rtuť, síru, chinon a jeho deriváty.

Způsob účinku proti patogenům je dalším možným klasifikačním klíčem sloužícím k rozdělení fungicidů na kontaktní nebo systémové. Kontaktní fungicidy působí pouze v místě aplikace a na povrchu rostliny vytváří ochranný film. Inhibují klíčení spór nebo růst mycelia. Typickým příkladem fungicidního kontaktního účinku mohou být přípravky na bázi mědi nebo síry. Systémové fungicidy naopak pronikají do rostliny, kde jsou následně rozváděny po celé rostlině. Jejich výhodou je, že mohou působit nejen preventivně, ale rovněž kurativně a eradikativně. Nicméně u nich existuje velké riziko vzniku rezistence. Takovým příkladem mohou být fungicidní přípravky ze skupiny triazolových fungicidů (např. tebukonazol, penkonazol). Jistou alternativou mezi kontaktními a systémovými fungicidními látkami jsou fungicidy s translaminárním účinkem. Tyto přípravky po aplikaci na povrch listu pronikají do listové tkáně, kde jsou následně rozváděny i na neošetřenou stranu listu rostliny a dochází k ochraně proti škodlivým organismům i na neošetřených místech. Jako příklad lze uvést účinnou látku azoxystrobin, vykazující translaminární až systémové účinky.

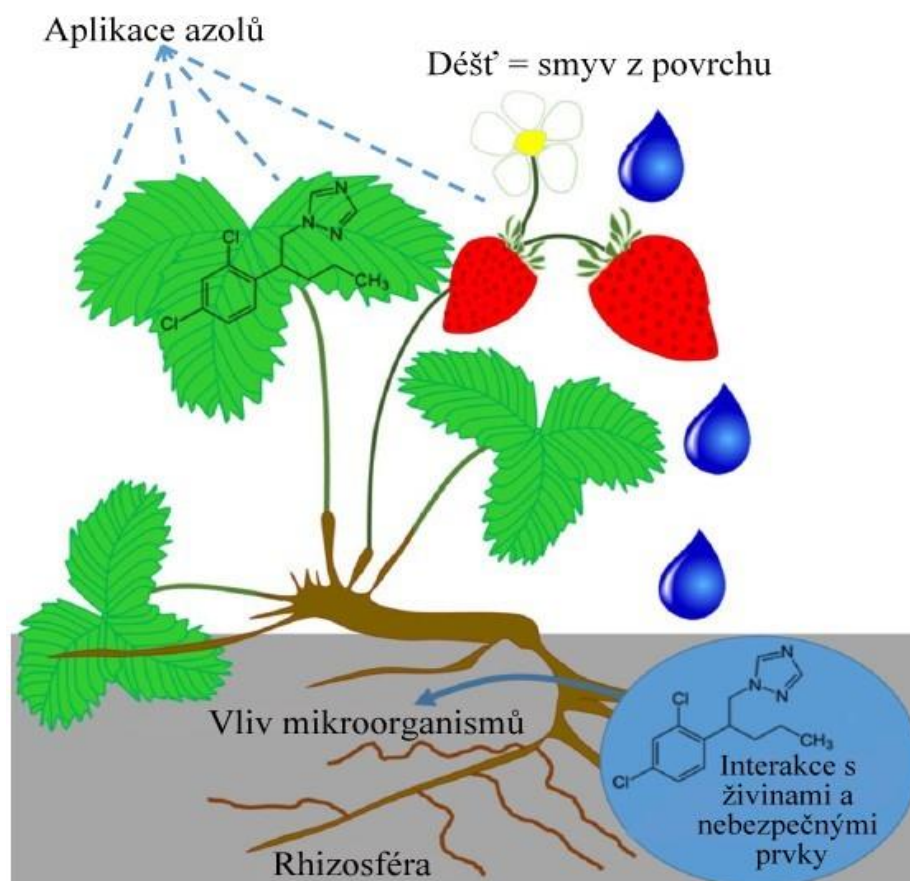
Fungicidní přípravky lze rozdělit i dle způsobu aplikace: na látky aplikované do půdy, látky chránící semena rostlin (moření) a na přípravky sloužící k ošetření listů, květů a plodů (foliární aplikace). U fungicidů aplikovaných do půdy je negativním účinkem zředovací efekt půdy. Vzhledem k fyzikálně-chemickým půdním vlastnostem potřebným pro působení fungicidních látek v půdě, je poptávka po vysoce aktivních sloučeninách se středně nízkou lipofilitou, aby se zabránilo sorpci na půdní částice.

### 3.3.1 Chování fungicidů v půdě

Typ půdy a její vlastnosti, včetně půdní struktury, mohou výrazně ovlivnit chování fungicidů v půdě. Experimenty zahrnující půdy s různými vlastnostmi a podmínkami jsou nezbytné k posouzení širšího dopadu fungicidů na půdní systémy a jejich perzistenci v půdě (Vyas 1988; Almasudy et al. 2015).

Perzistence a potenciál jako kontaminujících látek životního prostředí závisí na jejich degradaci a retenci na půdních částicích (Worrall et al. 2001; Fenoll et al. 2010). Sorpce zabráňuje pesticidům znečišťovat například vodní útvary, ale zároveň brání volatilizaci a biodegradaci. Sorpce fungicidů na povrch půdních kompartmentů je určena koncentrací pesticidů v půdě a půdním roztoku, a proto tento proces také do značné míry určuje, jak jsou pesticidy degradovány a transportovány. Sorpce je ovlivněna nejen koncentrací pesticidů,

ale také především jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi a rovněž vlastnostmi půdy, vlhkostí a teplotou (Gevao et al. 2000; Pose-Juan et al. 2010). Vliv teploty na odbourávání pesticidů je založen na zvýšení desorpce, mikrobiální aktivity a/nebo na zvýšení účinku katalytických látek (Fenoll et al. 2010). Během deště se chemické látky mohou odplavit a případně se mohou dostat do rhizosféry (Obrázek 3) (Takala et al. 2019).



Obrázek 3 Schematické znázornění možného osudu azolů po jejich aplikaci (upraveno z Takala et al. 2019)

### 3.3.2 Vliv fungicidů na půdní edafon

Fungicidy, které jsou značně mobilní v prostředí půda/rostlina, mají efekt na necílové organismy v rhizosféře. Systemické fungicidy tak mohou ovlivnit houby v rhizosféře, stejně jako cílové původce houbových chorob. V ohrožení tak může být i mykobiont v mykorrhizní symbióze. Obdobně mohou působit i regulátory růstu rostlin, a to ty, které jsou fungicidní.

Jak již bylo poznamenáno, aplikace fungicidů může mít vliv na celou řadu necílových organismů, a tím měnit jejich biochemickou aktivitu, stejně tak i strukturální a genetickou diverzitu (Šarapatka et al. 2002; Sułowicz et al. 2016). Změny mikrobiální aktivity se mohou projevit jejich nižším počtem a biodiverzitou, což má silný dopad na udržení správné kvality půdy (Bačmaga et al. 2015).

Půdní mikroorganismy se mohou rychle adaptovat a množit, aby dovedly degradovat určité fungicidy. Obnovení přítomnosti může v některých případech nastat poměrně rychle, zejména když je stimulováno hnojení organickými hnojivy (Šarapatka et al. 2002; Topp 2003).

U některých fungicidů existuje signifikantní inhibiční vliv na nitrifikaci a na populace saprofytických hub, které mají významnou roli v půdě při dekompozici organické hmoty. Mikroorganismy účastníci se nitrifikace a fixace dusíku jsou ovlivňovány zejména insekticidy a fungicidy. Nicméně je popsán i určitý pozitivní vliv pesticidů na fixátory dusíku, a to zejména redukcí aktivity prvoků a dalších organismů, které jsou jejich kompetitory a predátory. I pro žížaly byly jak mezi insekticidy, tak fungicidy a též i herbicidy popsány přípravky, které jsou obzvláště toxické. Výzkumy prokázaly i korelace mezi koncentrací pesticidů v půdě a v tělech žížal. Je zde však nutno zdůraznit, že je vedle typu přípravku důležitý i způsob jeho aplikace (Šarapatka et al. 2002).

Pesticidy mohou zároveň vyvolat škodlivé účinky na půdní mikrobiální společenství, která jsou nezbytná pro strukturu a funkci půdního ekosystému, a proto mají zásadní význam pro kvalitu půdy (Muñoz-Leoz et al. 2011).

### 3.3.3 Triazolové fungicidy

Triazolové fungicidy jsou deriváty 1,2,4-triazolu substituovaného v poloze N<sup>1</sup> triazolového kruhu. Tyto systémové širokospektrální fungicidy mají významnou roli při regulaci rostlinných patogenů, zejména u obilovin, vinné révy a olejnin. Dále slouží také k úpravě dřeva, pro průmyslové aplikace a ve farmakologii (Mazur & Kenneke 2007; Zhang et al. 2019a; Jaklová Dyrtrtová et al. 2020). Tyto sloučeniny nacházejí své využití také jako antimykotika při lidských mykózách a v produktech určených pro osobní hygienu (např. šampóny a mýdla) (Egbuta et al. 2014; Assress et al. 2020).

Triazoly jsou celosvětově používanými biocidy, jejichž účinek je založen převážně na inhibici dvou enzymů – 14 $\alpha$ -demethylázy (CYP51) a aromatázy (CYP19) (Azevedo et al. 2015, Conner et al. 2012). Fungicidní účinek je založen na schopnosti triazolů narušovat biosyntézu sterolů inhibicí CYP51 (enzymu cytochromu P450), který hraje důležitou roli při přeměně lanosterolu na ergosterol v houbách a kvasinkách (Steven & James 1999; De Jong et al. 2011). Jinými slovy, inhibicí CYP51 dochází především k destabilizaci buněčné membrány (Alcazar-Fuoli et al. 2008).

V souvislosti s jejich potenciálním účinkem na inhibici enzymů cytochromu P450 si azolové pesticidy zasloužily zvláštní pozornost kvůli vlivu na endokrinní systém necílových organismů, včetně vlivu na lidské zdraví. U zdravých necílových organismů se azoly považují za potenciální endokrinní disruptory (Saxena et al. 2015; Jaklová Dyrtrtová et al. 2020)

Tato práce se zabývá triazoly penkonazolem a cyprokonazolem, jenž jsou často používány k ochraně plodin. Tyto sloučeniny mohou významně narušit vratké rovnováhy mezi rostlinami (exudace a příjem živin), půdními mikroorganismy a živinami v půdě (dostupnost) (Takala et al. 2019).

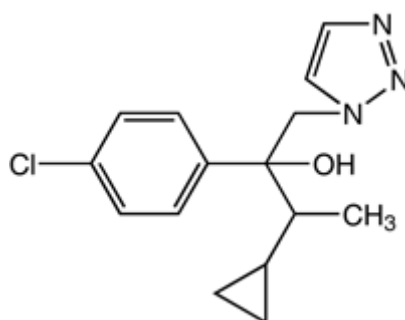
### 3.3.3.1 Cyprokonazol

Cyprokonazol (Cyp) je druh triazolového fungicidu s preventivním a léčebným účinkem, jehož mechanismem účinku je inhibice demetylace sterolů (ChemicalBook 2017a). Cyp se používá k ochraně plodin proti celé řadě plísňových patogenů, jako širokospektrální fungicid s mimořádnou silou proti rzím, plísním, *Cercospora* a *Septoria* v obilovinách, ovoci a révě vinné (Di Renzo et al. 2011). Také se hojně používá jako biocid pro ochranu olejnin, ovocných a zeleninových plodin (Miyachi et al. 2005; Saraiva et al. 2018; Cao et al. 2019).

Vzhledem k tomu, že steroly jsou prekurzory bioaktivních molekul, které regulují vývojové procesy, byl pozorován jejich vliv na regulaci ekdysteroidů v členovcích a metamorfózu v obojživelnících (Saraiva et al. 2018).

Cyp má  $\log K_{ow} > 2,9$  a proto se pravděpodobně váže na organickou hmotu v půdě (Saraiva et al. 2018). Cyp je v půdním prostředí stabilní a rozklad byl po 2 letech menší než 5 %. Stabilitu vykazuje také ve vodných roztocích (při pH 1-9) po dobu 35 dnů (50 °C) nebo 14 dní (80 °C) (ChemicalBook 2017a).

Systematickým názvem je 2-(4-chlorofenyl)-3-cyclopropyl-1-(1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol, obsahuje jeden chirální uhlík (Obrázek 4). Jedná se o poměrně malou, stálou a poměrně málo ve vodě rozpustnou sloučeninu (Tabulka 3), rozpustná je v organických rozpouštědlech.



Obrázek 4 Strukturální vzorec cyprokonazolu

Tabulka 3 Vlastnosti cyprokonazolu (ChemicalBook 2017a; PubChem 2005a)

Vlastnosti	
Sumární vzorec	$C_{15}H_{18}ClN_3O$
Molární hmotnost	291,77 g/mol
Bod tání	108 °C
Bod varu	>250 °C
Rozpustnost ve vodě	140 mg/L (25 °C)

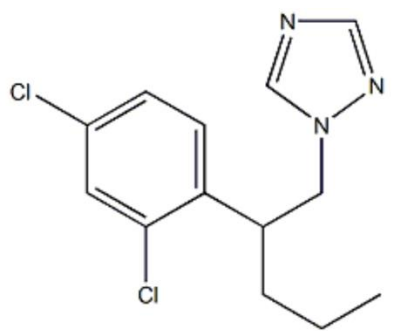
### 3.3.3.2 Penkonazol

Penkonazol (Pen) je systémový triazolový fungicid používaný k potlačení plísní a dalších patogenních zástupců z kmenů *Ascomycota*, *Basidiomycota* a *Deuteromycota*, které se běžně vyskytují na révě vinné, jádřovinách, ovoci, peckovinách, okrasných rostlinách, na zelenině a ve chmelnicích (Pose-Juan et al. 2010; Mercadante et al. 2016). Pen zastavuje vývoj plísní tím, že zasahuje do biosyntézy sterolů v buněčných membránách (Wolterink & Inayat-Hussain 2015). Fungicidní vlastnosti jsou dosahovány inhibicí aktivity 14 $\alpha$ -demethylázy závislé na cytochromu P450, která je nutná při přeměně lanosterolu na ergosterol, základní složky fungálních biologických membrán, a rozpadu celulárních membrán (Husak et al. 2017).

Aplikuje se foliárně na rostliny, kde se rychle absorbuje a distribuuje (Kim et al. 2002). Může se však (analogicky vůči jiným pesticidům) dostat do půdy tím, že je aplikován i mimo rostlinu, steče s povrchu rostliny, deštěm či závlahou je smyt, nebo se uvolní při rozkladu rostlinných zbytků, a proto představuje riziko pro půdní ekosystémy a povrchové a podzemní vody (Komárek et al. 2010; Jiang et al. 2016). Pen je považován za stabilní látku a má tendenci se hromadit v půdě a zároveň byl klasifikován jako nebezpečný pro člověka a životní prostředí (Mercadante et al. 2016).

Arias et al. (2006) zjistili, že nižší pH zvyšuje sorpci tohoto fungicidu. Což je přisuzováno skutečnosti, že při nízkém pH je významná část fungicidu kladně nabitá a poté je více přitahována k negativně nabitým jílovým minerálům přítomným v půdě. Vliv pH na adsorpci pesticidů závisí na složení půdy a vlastnostech sloučeniny (Kah & Brown 2006).

Systematickým názvem je 1-[2-(2,4-dichlorophenyl)pentyl]-1,2,4-triazol (Obrázek 5). Jedná se o poměrně malou a ve vodě perzistentní sloučeninu s vysokým bodem varu (Tabulka 4).



Obrázek 5 Strukturální vzorec penkonazolu

Tabulka 4 Vlastnosti penkonazolu (ChemicalBook 2017b; PubChem 2005b)

<b>Vlastnosti</b>	
Sumární vzorec	C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub>
Molární hmotnost	284,18 g/mol
Bod tání	58,5 °C
Bod varu	436,06 °C
Rozpustnost ve vodě	73 mg/L (25 °C)

### 3.3.3.3 Vliv triazolů na enzymatickou aktivitu v půdě a souvislost triazolů s mikrobiální činností

Negativní dopady fungicidů na půdní enzymy, jako jsou hydrolázy, oxidoreduktázy a dehydrogenázy, byly v literatuře už mnohokrát popsány. Existují také důkazy, že půdní enzymy mohou poskytnout cenné a obecné informace o přeměně pesticidů v půdě (Riah et al. 2014). Jak uvádí Gianfreda & Bollag (1996), přírodní a antropogenní faktory mohou přímo nebo nepřímo ovlivnit aktivitu enzymů v půdě.

Fungicidy mohou vstoupit do půdy buď přímými aplikacemi (např. zemědělskou činností) nebo nepřímo (např. náhodným únikem, únikem ze skladů, vypouštěním odpadů z výrobních zařízení nebo znečištěním měst). Jakmile je triazolový fungicid uvolněn do životního prostředí, je jeho osud spojen s mikrobiologickým složením půdy a zejména s půdními enzymatickými aktivitami. Účinky na půdní mikroorganismy lze určit studiem funkčních parametrů, jako je mineralizace uhlíku a dusíku, které se řídí enzymatickými činnostmi. Tyto činnosti hrají důležitou roli, protože všechny biochemické transformace v půdě závisí na přítomnosti enzymů, nebo jsou s nimi spojeny. Jsou to ukazatele biologické rovnováhy, úrodnosti a změn biologického stavu v důsledku znečištění půdy (Gevao et al. 2000; Sannino & Gianfreda 2001; Riah et al. 2014; Jaklová Dyrtrtová et al. 2020).

Značná část aplikovaných fungicidů často končí v půdě, kde podléhá biologickým a fyzikálně-chemickým změnám. V tomto ohledu je mikrobiální degradace hlavní cestou k jejich odstranění, což je v přímé souvislosti s perzistencí a náchylností k vyplavování. Fungicidy mohou naopak negativně ovlivnit mikrobiální společenství, která hrají klíčovou roli ve fungování půdního ekosystému (Bending et al., 2006; Muñoz-Leoz et al. 2011).

Jako příklad lze uvést hojně aplikovaný tebukonazol (Teb), který je v půdě perzistentní a vykazuje nízkou až střední mobilitu (Gámiz et al. 2016). Teb je chirální pesticid a skládá se ze dvou enantiomerů s R- a S-konfigurací, které vykazují (–) a (+) rotaci. Fungicidní aktivita R-enantiomeru je silnější než S-enantiomeru. Enantioselektivní rozptyl tebukonazolových enantiomerů byl nalezen například v půdě a v zelenině. Tento rozptyl R(–)-tebukonazolu a S(+)-tebukonazolu v půdě a organismech může vést k enantioselektivní akumulaci v půdních organismech (Cui et al. 2018).

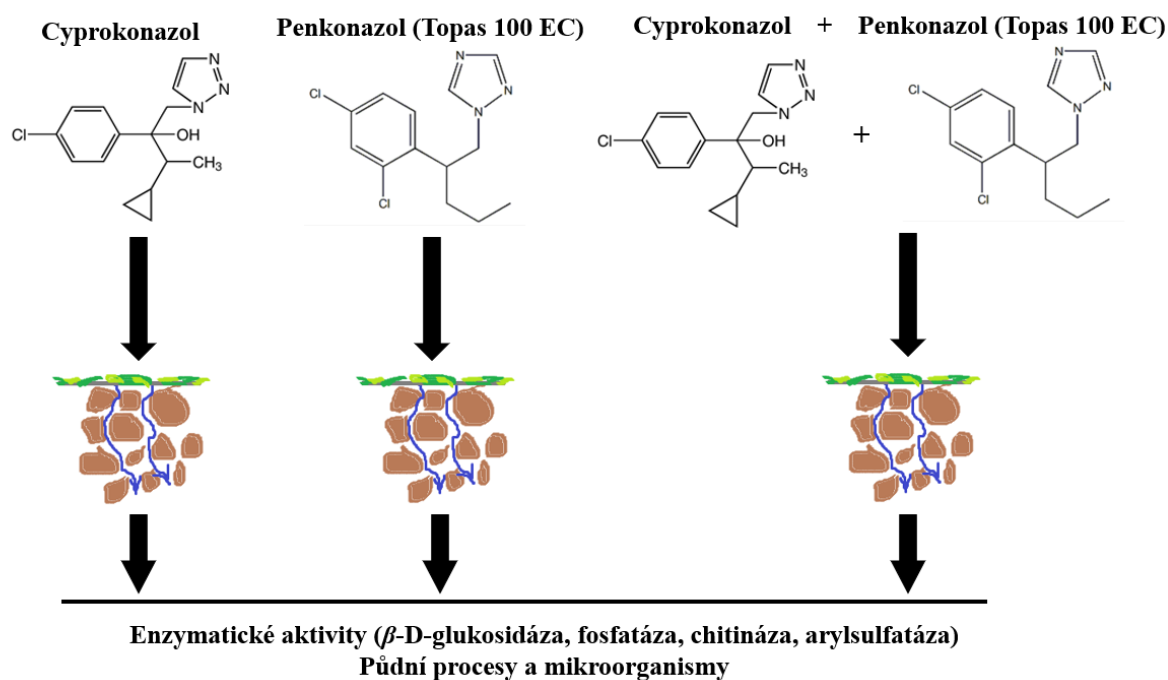
Vzhledem k tomu, že biologicky zprostředkované procesy jsou důležité při odbourávání triazolových fungicidů v půdě, může se míra degradace půdy u jednotlivých enantiomerů R a S lišit a mohou být různě ovlivněny zemědělskými postupy, jako je aplikace organických látek do půdy, opakované ošetření pesticidy nebo typ použité formulace (Potter et al. 2005, Sehnem et al. 2010; Gámiz et al. 2016).



## 4 Metodika

V rámci experimentální části byl založen nádobový pokus s rajčetem, kde byly v průběhu vegetace do půdy injekčně vpravovány vybrané triazolové fungicidy a jejich směs (penkonazol, cyprokonazol, cyprokonazol + penkonazol). Po sklizni byly jednotlivé substráty analyzovány z hlediska obsahu vybraných enzymů ( $\beta$ -D-glukosidáza, kyselá fosfatáza, arylsulfatáza, chitináza).

Záměrem experimentu bylo stanovení vlivu aplikace triazolových fungicidů na jednotlivé enzymatické aktivity v půdě a následný odhad dopadu na jednotlivé půdní procesy a organismy (Obrázek 6).



Obrázek 6 Schéma experimentální části

### 4.1 Vegetační experiment

Pro experiment byla použita jednoletá bylina lilek rajče (*Solanum lycopersicum* L. var. „Sweet Cherry“) z řádu lilkotvaré (*Solanales*), čeledi lilkovité (*Solanaceae*), rodu lilek (*Solanum*). Varieta Sweet Cherry se vyznačuje drobnými, kulatými a sladkými plody červené barvy. Jedná se o poměrně nenáročnou odrůdu s vysokou plodností a odolností vůči teplotním extrémům a většině houbových chorob.

53-denní experiment byl založen dne 28. května 2019 s různými variantami pro aplikaci vybraných triazolových fungicidních přípravků (Tabulka 5), a to v pěti opakováních.

Tabulka 5 Systém aplikace triazolů

Číslo	Zkratka	Způsob aplikace	Triazol(y) aplikované ve směsi	Množství (μmol/rostlinu)	Množství (mg/kg)
1	Con	-	Kontrola	0	0
2	Cyp	Do půdy	Cyprokonazol	3,52	0,205
3	Pen	Do půdy	Penkonazol	3,52	0,20
4	Cyp-Pen	Do půdy	Cyprokonazol+penkonazol	1,76	0,1

Rostliny byly pěstovány ve vegetační hale v nádobách za přirozené teploty a osvit (Obrázek 7), s pravidelným zavlažováním demineralizovanou vodou. Každá 4 l nádoba obsahovala 0,5 kg hotové suché směsi „Zahradnický substrát s aktivním humusem“ s přidávanými minerálními živinami (AGRO CS a.s., Česká republika) a také jednu náhodně vybranou sazenici rajčete.



Obrázek 7 Nádobový pokus se *Solanum lycopersicum* L. var. „Sweet Cherry“

Po 4 a 7 týdnech byla každá půda přihnojena tekutou směsí NPK (LOVOFLOR NPK 4-2,5-3, Lovochemie, Česká republika) v obvyklé dávce.

## 4.2 Aplikované triazolové fungicidy

Za účelem stanovení účinku fungicidní látky přímo ve formě, ve které je aplikována (včetně aditiv), byl použit komerční přípravek obsahující pouze jednu účinnou látku a smáčedlo. Druhý přípravek se běžně používá buď ve směsi, nebo jen jako rozpuštěná (suspendovaná) čistá látka ve vodě. Byl aplikován přípravek Topas 100 EC (Syngenta Czech s.r.o.; účinná látka penkonazol), čistý cyprokonazol (Sigma-Aldrich, ČR) a jejich směs v poměru účinných látek 1:1.

Množství aplikované dávky bylo určeno na základě aplikačního listu a udané koncentrace výrobcem pro ošetření rostlin rajčat, aby celková suma triazolů byla  $3,52 \cdot 10^{-6}$  mol na rostlinu (vypočtená z deklarovaného obsahu v přípravku). Celkem bylo ošetření rostlin daným triazolem nebo směsí triazolů provedeno pětkrát, a to každý týden ve stejné dávce, jako byla počáteční dávka. Pro eliminaci nepřímých vstupů triazolových fungicidů do půdy byla zvolena injekční aplikace suspenze přímo do půdy. Níže je popsán použitý přípravek Topas (Syngenta) s účinnou látkou penkonazolem. O čistém cyprokonazolu je pojednáváno v rešeršní části (Kapitola 3.3.3.1).

Přípravek Topas je kapalina, která se vyznačuje světle žlutou až hnědavou barvou s charakteristickým zápachem. Účinná látka je penkonazol. Jedná se o přípravek ve formě emulgovatelného koncentrátu určený k fungicidní ochraně angreštu, černého rybízu, baklažánu, jádrovin, jahodníku, vinné révy a zeleniny proti houbovým chorobám. Je systemicky působícím fungicidem s výrazným účinkem proti pravému padlí. Patří do DMI (demetylační inhibitory) skupiny fungicidních látek s účinnou látkou penkonazol. Účinná látka proniká rychle do rostlinných pletiv, a to do 24 hodin po aplikaci. V rostlině se pohybuje akropetálně. Účinek penkonazolu se projevuje především na myceliu, respektive hyfách. Použití přípravku může být preventivní i kurativní. Fungicidní účinnost penkonazolu spočívá v principu brzdění syntézy ergosterolu a tím snížení funkce buněčných membrán. Doporučená aplikační dávka přípravku je 0,5 l/ha s aplikační dávkou kapaliny 300-1200 l/ha (ÚKZÚZ 2014-2020).

## 4.3 Příprava vzorků lyofilizací

Z nádobového pokusu byly odebrány vzorky substrátu, které byly zpracovány lyofilizací pomocí lyofilizační jednotky LYOVAC GT 2 (Leybold-Heraeus, Německo), s chladičem R507 neobsahujícím chloridy. Je postaven podle osvědčeného principu dvou komor; tj. prostorové oddělení oblastí sušení a kondenzace.

Lyofilizace je optimální proces pro uchování látek, které jsou citlivé na vysoké teploty. Žádný jiný proces neudrží původní vlastnosti materiálu tak úplně, jako je vymrazení vody. Není proto překvapivé, že je tento proces preferován v oblasti farmacie, biologie, medicíny a při konzervování potravin. Je běžnou metodou pro přípravu vzorků bílkovin určených pro dlouhodobé skladování (Anchordoquy et al. 2001).

Princip mrazové sublimace (lyofilizace) je založen na tom, že za sníženého tlaku zmrazený roztok (zpravidla vodný), či suspenze, uvolní rozpouštědlo z pevného skupenství

do skupenství plynného. Odstraňuje většinu vody v produktu, s výjimkou toho, co je pravděpodobně spojeno s bílkovinou (obvykle méně než 1 %). V lyofilizaci existují tři hlavní kroky, a to zmrazení, primární sušení a sekundární sušení. Předpokládá se, že zmrazený produkt obvykle obsahuje 18–20 % vody a všechny rozpuštěné látky v jediné amorfní fázi, jiné než led (Rathore & Rajan 2008). Rozpouštědlo či jakékoli disperzní médium se ze zmrazeného vzorku ve vakuu odpaří a následně namrazí na kondenzační spirálu. Pevná část, která zbyla, si zachovává svou speciální pórovitou strukturu. Tato struktura je tvořena kanálky, jež vznikly po odpařeném rozpouštědle, a po kontaktu s vodou je umožněn průnik do struktury lyofilizátu.

## 4.4 Stanovení aktivit vybraných extracelulárních enzymů

Enzymy, které se nejčastěji používají pro hodnocení faktorů regulujících rozklad rostlinných zbytků a kvalitu půdy, jsou ty, které se podílejí na degradaci hlavních složek hydroláz, které jsou spojeny s uhlíkem ( $\beta$ -D-glukosidáza,  $\beta$ -galaktosidáza), dusíkem (ureáza), fosforem (fosfatáza) a sírou (arylsulfatáza) (Karaca et al., 2010). Pro tuto práci byly za potenciální markery vybrány  $\beta$ -D-glukosidáza, kyselá fosfatáza, chitináza a arylsulfatáza.

### 4.4.1 Fluorescenční stanovení enzymatické aktivity

Fluorescence se široce používá jako nástroj pro výzkum ve fyzikálních, chemických, biologických a lékařských vědách. Fluorescencí se rozumí emise záření z molekuly. Projeví se v případě, když dojde k přechodu zpět na základní elektronovou hladinu vyzářením nadbytečné nashromážděné energie emisí fotonu. Časové rozpětí mezi absorpcí světla a jeho následnou reemisí poskytuje čas pro několik procesů, z nichž každý vede ke změnám fluorescenčních spektrálních pozorování. Výsledkem je, že spektrální charakteristiky fluoroforů (fluorescenčních barviv) mohou poskytnout velké množství informací o chování makromolekul v roztoku (Valeur 2009; Lakowicz 2013).

Testy enzymatických aktivit vybraných hydrolytických enzymů ( $\beta$ -D-glukosidázy, kyselá fosfatázy, arylsulfatázy a chitinázy) v půdních extraktech byly provedeny podle Štursově & Baldriana (2011). Pro stanovení jednotlivých enzymů v substrátu byla připravena suspenze přesným navážením  $0,2 \pm 0,002$  g zlyofilizovaného vzorku a přidáním 20 ml fosfátového pufru s hodnotou pH 7 o koncentraci 50 mmol/l. Fosfátový pufr byl připraven navážením 2,8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 1,32 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  do 1000 ml destilované vody. Aby došlo k homogenizaci takto připravené suspenze, byl vzorek zpracováván pomocí mixéru Ultra-Turrax (IKA Labortechnik, Německo) po dobu 30 sekund při 8 000 ot/min za laboratorní teploty (23 °C). Jednotlivé enzymatické aktivity byly měřeny ve třech opakováních v 96-jamkových mikrotitračních destičkách (Obrázek 8) fluorescenčně pomocí modulárního readeru Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko). Jedna jednotka aktivity enzymu na 1 g sušiny (U/g sušiny) byla definována jako množství enzymu, jenž katalyzuje tvorbu 1  $\mu\text{mol}$  reakčního produktu ze substrátu za 1 minutu.



Obrázek 8 Mikrotitrační destička

Aktivity půdních enzymů se hodnotí pomocí specifických umělých substrátů (Tabulka 6) měřením fluorescence vzniklého MUF (Baldrian 2009). K dílčím vzorkům půdy byly přidány jednotlivé enzymatické substráty (MUFG, MUFP, MUFS, MUFN), přičemž za přítomnosti jednotlivých enzymů ( $\beta$ -DG, AP, AS, CHN) došlo k metabolizaci na MUF, který byl měřen. Z rozdílu množství vzniklého produktu ve dvou různých časech byla vypočtena rychlost enzymatické reakce, tedy enzymatická aktivita.

Pro přípravu enzymových substrátů bylo naváženo přesné množství jednotlivých odpovídajících enzymů do 10 ml odměrných baněk (viz Tabulka 7) a doplněno dimethylsulfoxidem (DMSO) po rysku. Dále bylo zapotřebí 1 mmol/l MUF zředit na požadované koncentrace, tzn. 0,1 mmol/l a 0,01 mmol/l. Krátkodobé skladování připravených roztoků je možné v lednici při teplotě 4 °C a temnu, zabalených v alobalu.

Tabulka 6 Testované extracelulární hydrolytické enzymy a odpovídající substráty

Číslo	Zkratka	Způsob aplikace	Triazol(y) aplikované ve směsi	Množství ( $\mu$ mol/rostlinu)	Množství (mg/kg)
1	Con	-	Kontrola	0	0
2	Cyp	Do půdy	Cyprokonazol	3,52	0,205
3	Pen	Do půdy	Penkonazol	3,52	0,20
4	Cyp-Pen	Do půdy	Cyprokonazol+penkonazol	1,76	0,1

Tabulka 7 Příprava enzymových substrátů a 4-methylumbelliferolu

MUF (4-methylumbelliferol)	0,00176 g MUF	10 ml DMSO
MUFG (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glukopyranosid)	0,00930 g MUFG	10 ml DMSO
MUFP (4-methylumbelliferyl-fosfát)	0,00704 g MUFP	10 ml DMSO
MUFS (4-methylumbelliferyl sulfát sodná sůl)	0,00736 g MUFS	10 ml DMSO
MUFN (4-methylumbelliferyl-N-acetylglukosamin)	0,00379 g MUFN	10 ml DMSO

4-methylumbelliferol (MUF) je látka stanovená fluorescenčním detektorem. Je vysoce citlivý, ačkoli fenolové sloučeniny (např. huminové látky) mohou fluorescence zhaset. Kromě toho je fluorescence MUF silně závislá na pH. Slabé stránky metod využívajících MUF lze překonat výběrem vhodných standardů. Standardy MUF byly měřeny samostatně pro každý vzorek půdy, aby bylo možné vzít v úvahu zhasení fluorescence (Vepsäläinen et al. 2001; Baldrian 2009).

Aktivity  $\beta$ -D-glukosidázy ( $\beta$ -DG, EC 3.2.1.21), kyselá fosfatázy (AP, EC 3.1.3.2), arylsulfatázy (AS, EC 3.1.6.1), chitinázy (CHN, EC 3.2.1.14) v půdních extraktech se změřily podle Baldriana (2009). Aktivity hydrolytických enzymů byly měřeny ve 200  $\mu$ l půdního extraktu v přítomnosti příslušného substrátu (40  $\mu$ l) v konečné koncentraci takto (viz Tabulka 6):

1. 2,75 mmol/l MUFG (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glukopyranosid) v DMSO pro  $\beta$ -D-G,
2. 2,75 mmol/l MUFP (4-methylumbelliferyl-fosfát) v DMSO pro AP,
3. 2,50 mmol/l MUFS (4-methylumbelliferyl sulfát sodná sůl) v DMSO pro AS
4. 1,00 mmol/l MUFN (4-methylumbelliferyl-N-acetylglukosamin) v DMSO pro chitinázu.

Pro změření 55 vzorků, bylo zapotřebí provést celkem 14 měření, tzn. použití 14 mikrotitračních destiček. Půdní extrakty v 96-jamkových mikrotitračních destičkách byly překryty víčkem a následně inkubovány v laboratorním inkubátoru při teplotě 40 °C po dobu 5 minut. Poté byla měřena fluorescence s excitační vlnovou délkou 355 nm a emisní vlnovou délkou 460 nm. Následně se mikrotitrační destička vložila zpátky do inkubátoru na 2 hodiny. Po dvou hodinách byla znovu změřena fluorescence. Rychlost je měřena z rozdílu množství produktu po 5 min a po 125 min. Kvantitativní enzymatické aktivity byly vypočteny na základě měření fluorescence (Vepsäläinen et al. 2001). Hodnoty fluorescence po odečtení slepého vzorku byly přepočteny na množství produktu na základě kalibračních přímek pro MUF (Baldrian 2009).

## 4.5 Zpracování výsledků

Enzymatická aktivita je vyjádřena pomocí rychlosti v nM/min/ml. Pro jednotlivé enzymy ( $\beta$ -D-glukosidáza, kyselá fosfatáza, chitináza, arylsulfatáza) a aplikované triazoly (penkonazol, cyprokonazol, cyprokonazol-penkonazol) byly vyhotoveny sloupcové grafy pomocí programu Microsoft Excel 2016.

U každého vzorku proběhlo 5 opakování, která byla následně zprůměrována a vypočtena směrodatná odchylka. K identifikaci odlehlých hodnot a lepší interpretaci dat byly v rámci statistického programu OriginPro 8 (OriginLab) vypracovány boxploty. Pro statistické vyhodnocení vlivu aplikovaných triazolů na enzymatické aktivity byl aplikován Fisherův LSD test.

## 5 Výsledky

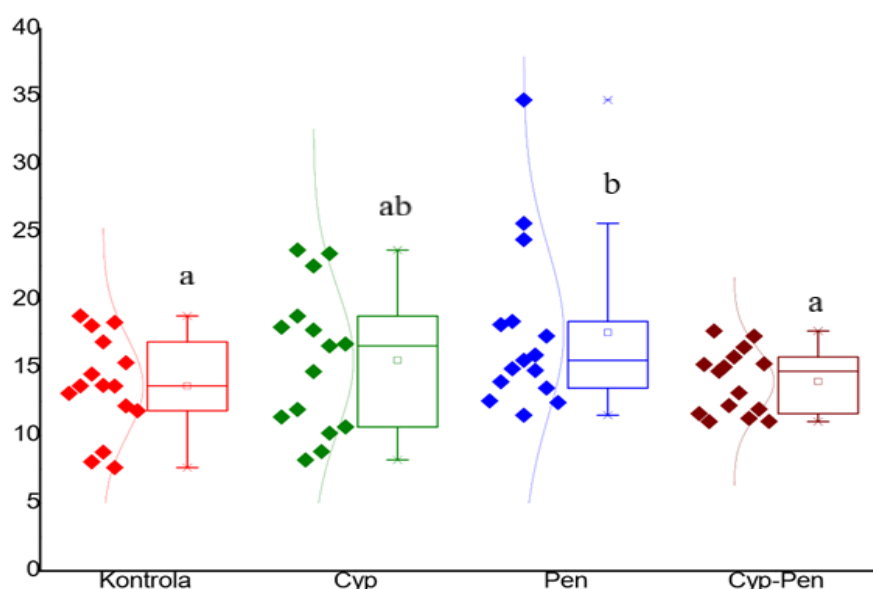
V této kapitole jsou vypsány a graficky znázorněny vlivy aplikovaných triazolů na měřené hydrolázy. Podkapitoly jsou rozděleny dle zkoumaných enzymů ( $\beta$ -D-glukosidáza, kyselá fosfatáza, chitináza a arylsulfatáza) a následně jsou popsány výsledky podle jednotlivých aplikovaných triazolů (penkonazol, cyprokonazol a cyprokonazol-penkonazol).

Byl hodnocen vliv aplikovaných triazolů na aktivitu posuzovaných enzymů. Cílem a zároveň výsledkem je porovnání dopadu triazolů na různé enzymatické aktivity a doporučení pro případný monitoring vlivu těchto xenobiotik v půdách.

### 5.1 $\beta$ -D-glukosidáza

Z Grafu 1 je zřejmé, že medián aktivity  $\beta$ -D-glukosidázy se mírně zvýšil po aplikaci Cyp a Pen. Lze také pozorovat, že  $\beta$ -D-glukosidáza vykazuje největší variabilitu po aplikaci cyprokonazolu a také penkonazolu. Variabilita enzymatické aktivity je nejmenší pro triazol použitý ve směsi Cyp-Pen. Byly také zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi kontrolní variantou a penkonazolem. Enzymatická aktivita tohoto enzymu po aplikaci Cyp a Cyp-Pen v porovnání s kontrolou statisticky významné rozdíly nevykazovala (Graf 1).

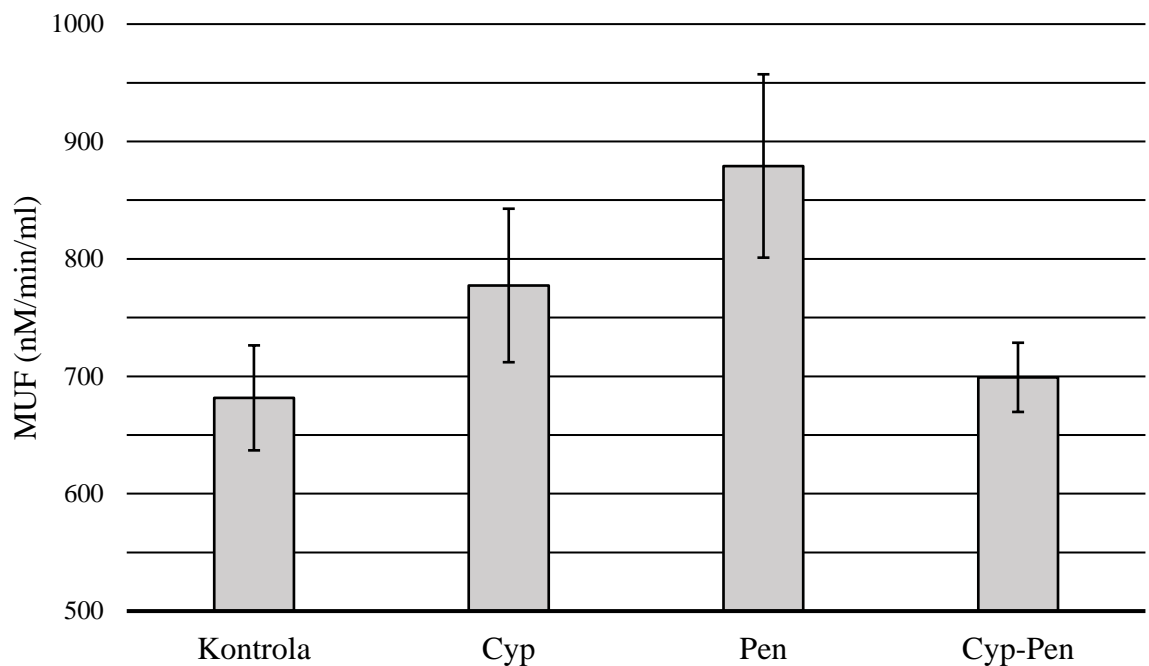
Dle popisných statistik bylo také zjištěno, že jsou zde podprůměrné hodnoty více soustředěny kolem průměru než hodnoty nadprůměrné. Naopak u kontroly jsou kolem průměru hojnější spíše nadprůměrné hodnoty. Kromě toho bylo shledáno, že přítomnost Pen přinesla strmé rozložení naměřených hodnot.



Graf 1 Aktivita  $\beta$ -D-glukosidázy. Výsledky reprezentují maxima, minima, horní a dolní kvartily, průměry a mediány. Mezi jednotlivými variantami označenými rozdílnými písmeny byly zaznamenány statisticky významné rozdíly ( $p \leq 0,05$ ).



Po aplikaci jednotlivých triazolů prokázala  $\beta$ -D-glukosidáza nejvyšší aktivitu u aplikovaného přípravku Topas s účinnou látkou penkonazol (3,52  $\mu$ mol/rostlinu). Enzymatická aktivita tohoto enzymu byla v tomto případě oproti kontrole vyšší o 29 % (viz Graf 2). Aplikace čistého cyprokonazolu (3,52  $\mu$ mol/rostlinu) do půdy přinesla mírné zvýšení aktivity, respektive o 14 %.



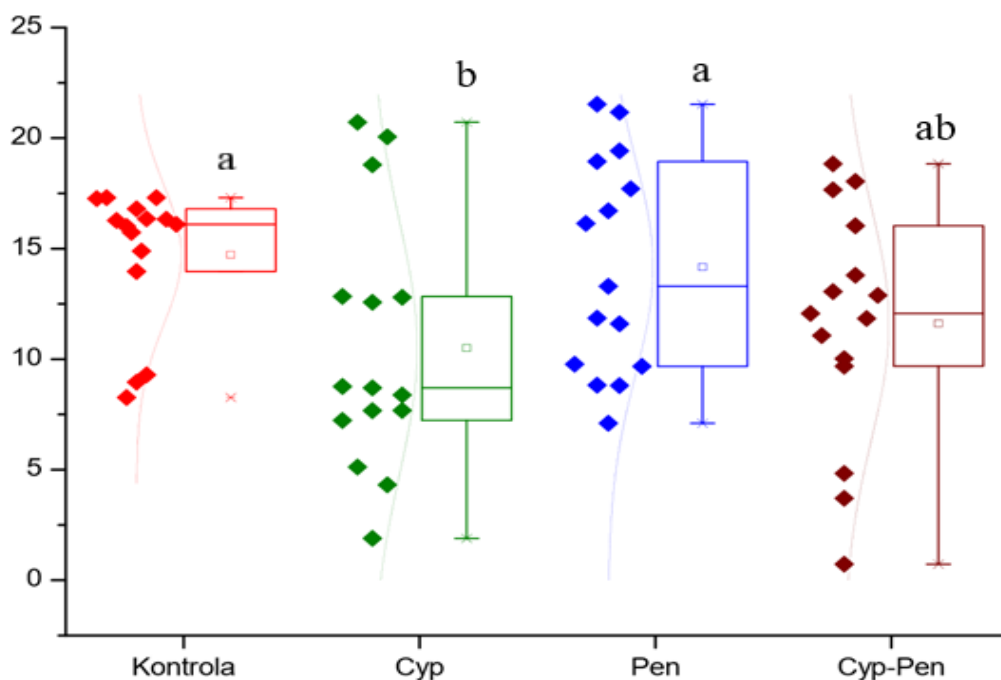
Graf 2 Aktivita  $\beta$ -D-glukosidázy po aplikaci triazolů

## 5.2 Kyselá fosfatáza

Jak je patrné ze znázornění hodnot pomocí boxplotů (Graf 3), mediány vykazují oproti kontrole poměrnou nesourodost. Velmi odlišný je medián aktivity kyselé fosfatázy po aplikaci cyprokonazolu (dvakrát menší). Avšak téměř totožné mediány jsou po přidavku Pen a Cyp-Pen.

Graf 3 nasvědčuje o statisticky významném rozdílu mezi kontrolní variantou a Cyp. Ovšem po aplikaci Pen a směsi Cyp-Pen statisticky významné rozdíly zaznamenány nebyly.

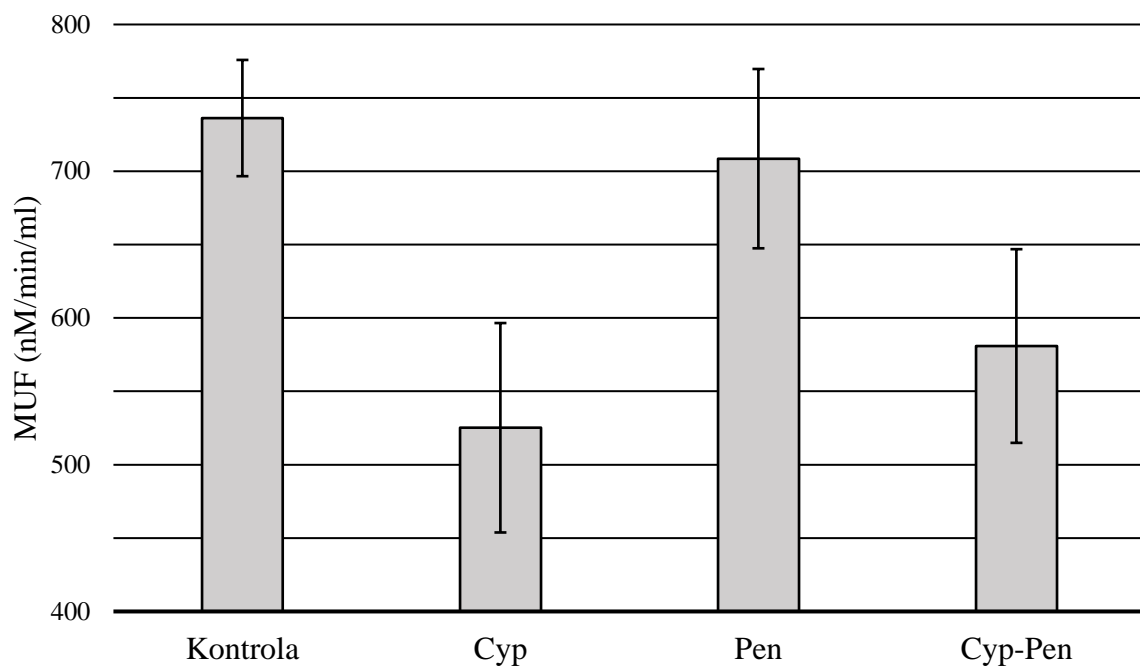
O rozložení dat lze podotknout, že kromě kontroly a Cyp-Pen jsou nadprůměrné hodnoty více nahuštěny k aritmetickému průměru. Také bylo shledáno, že využití triazolů mají vliv na rozložení hodnocených dat, poněvadž po aplikaci triazolů se ze strmého rozložení dat změnilo rozložení hodnoty fosfatázové aktivity na ploché rozložení.



Graf 3 Aktivita kyselého fosfatázy. Výsledky reprezentují maxima, minima, horní a dolní kvartily, průměry a mediány. Mezi jednotlivými variantami označenými rozdílnými písmeny byly zaznamenány statisticky významné rozdíly ( $p \leq 0,05$ ).

Ze sloupcového grafu (Graf 4) je viditelné, že po aplikaci triazolů, tedy cyprokonazolu, penkonazolu (přípravek Topas) a kombinace Cyp-Pen došlo ke snížení aktivity kyselého fosfatázy. Největší rozdíl v enzymatické aktivitě byl zaznamenán za přítomnosti Cyp, kde tato diference činila 211 nM/min/ml, tedy aktivita se snížila o 29 %. Na druhou stranu nejmenší diference (28 nM/min/ml) se projevila po aplikaci přípravku Topas (Pen). V tomto případě se enzymatická aktivita lišila pouze o 4 %.

Půdní substrát s využitím kombinace triazolů ve směsi Cyp-Pen je z velké části ovlivněn právě cyprokonazolem. Jelikož, jak již bylo uvedeno, Cyp způsobil snížení aktivity o 29 % a Pen nemá na enzymatickou aktivitu kyselého fosfatázy vliv.

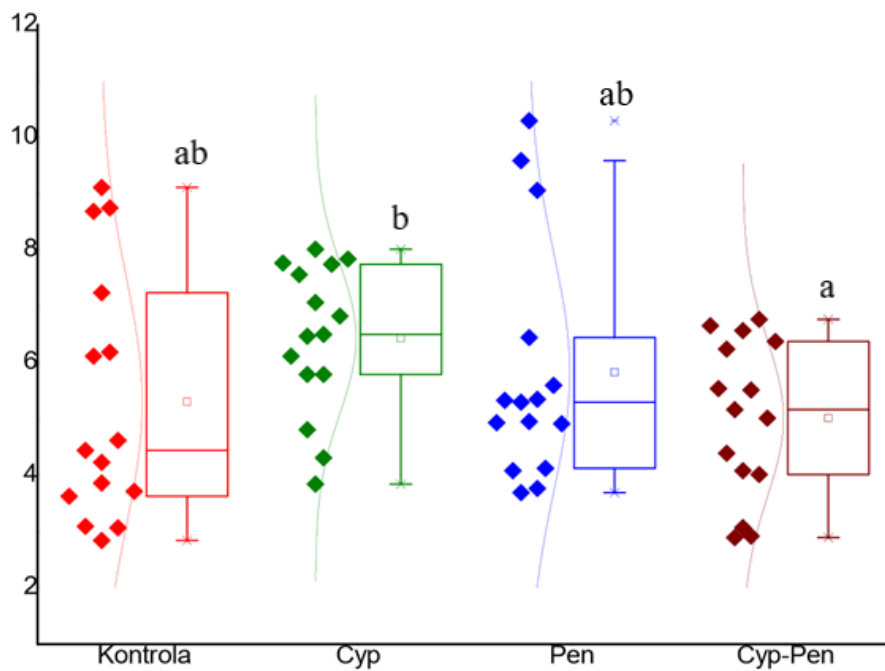


Graf 4 Aktivita kyselá fosfatázy po aplikaci triazolů

### 5.3 Chitináza

Je zřejmé, že mezi jednotlivými triazolovými fungicidy nebyly pozorovány významné odchylky v aktivitě chitinázy pro průměry a mediány (viz Graf 5). Výskyt cyprokonazolu a cyprokonazolu-penkonazolu svědčí o tom, že nadprůměrné hodnoty jsou více nahuštěné k průměru, oproti hodnotám podprůměrným. Hodnocená data svědčí o plochém rozložení, tudíž jsou shodná s kontrolou, ovšem toto zmiňované rozmístění neplatí po použití přípravku Topas (Pen).

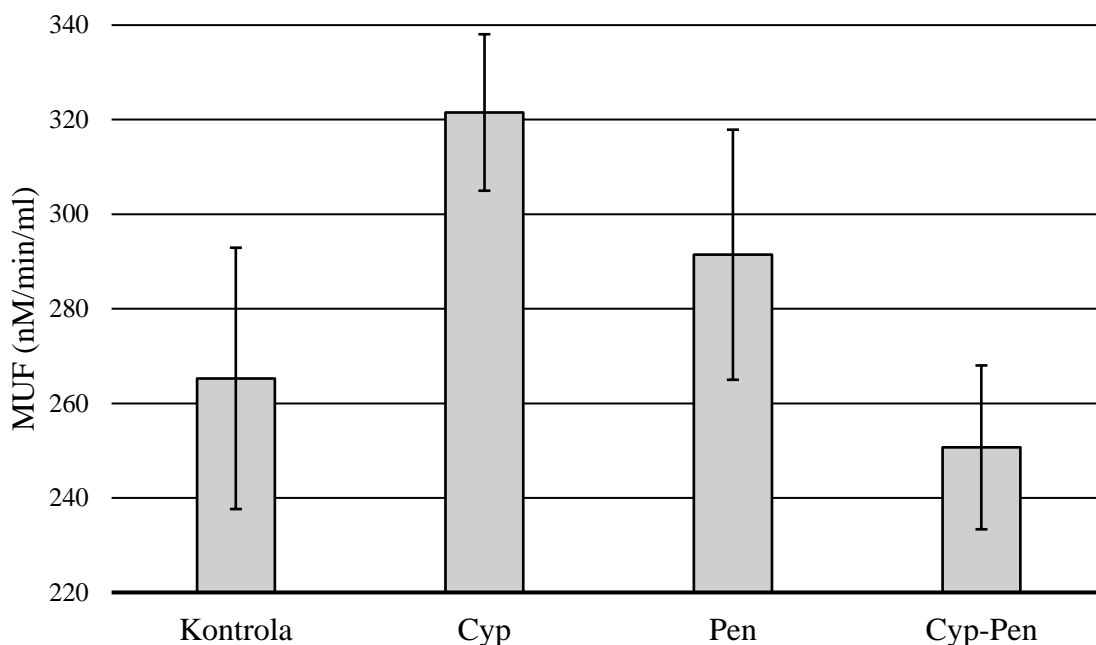
V souladu s naměřenými hodnotami enzymatické aktivity chitinázy je možné konstatovat, že z použitých triazolů má na tento zmiňovaný enzym mírně znatelnější dopad pouze přítomnost čistého cyprokonazolu. Ovšem v porovnání s kontrolní variantou nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly (Graf 5).



Graf 5 Aktivita chitinázy. Výsledky reprezentují maxima, minima, horní a dolní kvartily, průměry a mediány. Mezi jednotlivými variantami označenými rozdílnými písmeny byly zaznamenány statisticky významné rozdíly ( $p \leq 0,05$ ).

Chitináza vykazuje oproti  $\beta$ -D-glukosidáze a kyselá fosfatáze nižší aktivitu. Ve srovnání s  $\beta$ -D-glukosidázou byla u chitinázy naměřena více než 2,5krát nižší aktivita a aktivita kyselá fosfatázy je oproti chitináze vyšší o 471 nM/min/ml.

Na základě Grafu 6 je možno říci, že nejvyšší hodnota enzymatické aktivity chitinázy byla naměřena u půdních substrátů, kde byl aplikován čistý cyprokonazol, konkrétně 321,52 nM/min/ml (21% nárůst). Ke značně mírnému zvýšení aktivity došlo také po použití přípravku Topas s účinnou látkou Pen (o 10 %). Proto bylo velmi mírné snížení chitinázové aktivity pozorováno po aplikaci Cyp-Pen do půdy (pokles o 14,59 nM/min/ml).



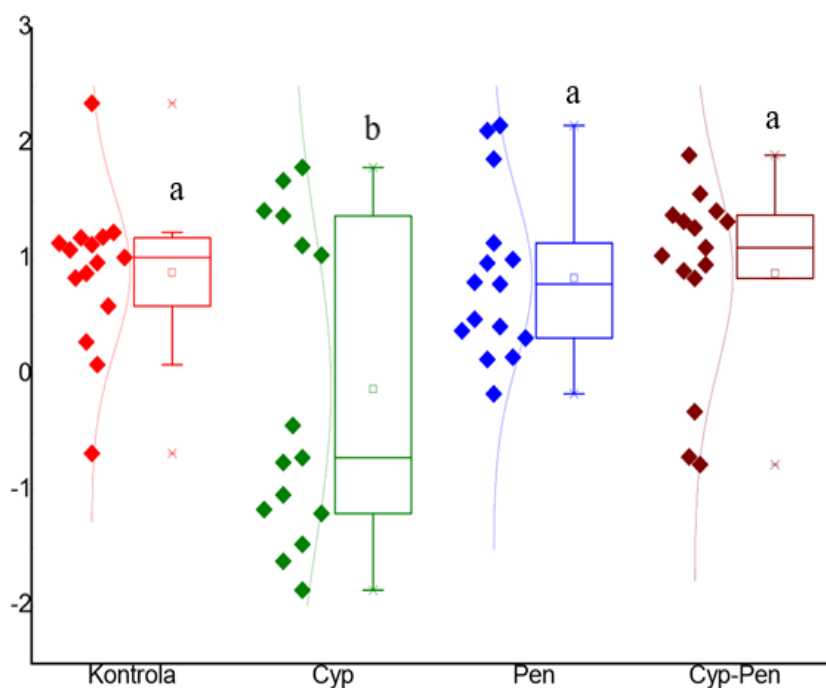
Graf 6 Aktivita chitinázy po aplikaci triazolů

## 5.4 Arylsulfatáza

Z daných naměřených a vypočtených dat, znázorněných pomocí boxplotů (Graf 7) lze vyvozovat, že největší variabilita, která klesá dokonce do záporných hodnot (více viz Diskuse) se projevila po přidavku Cyp. Medián je také záporný a poměrně výrazně se odlišuje od aritmetického průměru. Naproti tomu vyrovnané mediány a též i průměry jsou pozorovatelné u zbylých posuzovaných variant. Jak již bylo shledáno, proměnlivost po aplikaci čistého cyprokonazolu je větší než proměnlivost při přítomnosti triazolů cyprokonazol-penkonazol, jak je patrné z charakteristiky variability.

Mezi porovnávanými variantami byly zaznamenány statisticky významné rozdíly (Graf 7). Jak je signifikantní, arylsulfatázová aktivita je statisticky významně ovlivněna použitím triazolu Cyp. Kontrolní varianta se lišila od cyprokonazolu, ale naopak Pen a Cyp-Pen statisticky významné rozdíly nevykazovaly.

U půdního substrátu, kde nedošlo k uplatnění triazolů a také u substrátu po aplikaci Cyp-Pen jsou nadprůměrné hodnoty více nahuštěné k průměru. Ovšem u zbylých dvou substrátů (aplikace Pen a Cyp), došlo ke změně a podprůměrné hodnoty jsou nahuštěny více k průměru než hodnoty nadprůměrné. Rozdílné rozložení dat oproti kontrole se jeví u půd, za přítomnosti přípravku Topas (Pen) a triazolu Cyp. V tomto případě se rozložení dat projevuje jako ploché, avšak v kombinaci těchto triazolů (Cyp-Pen) je shodné s kontrolou (ploché).

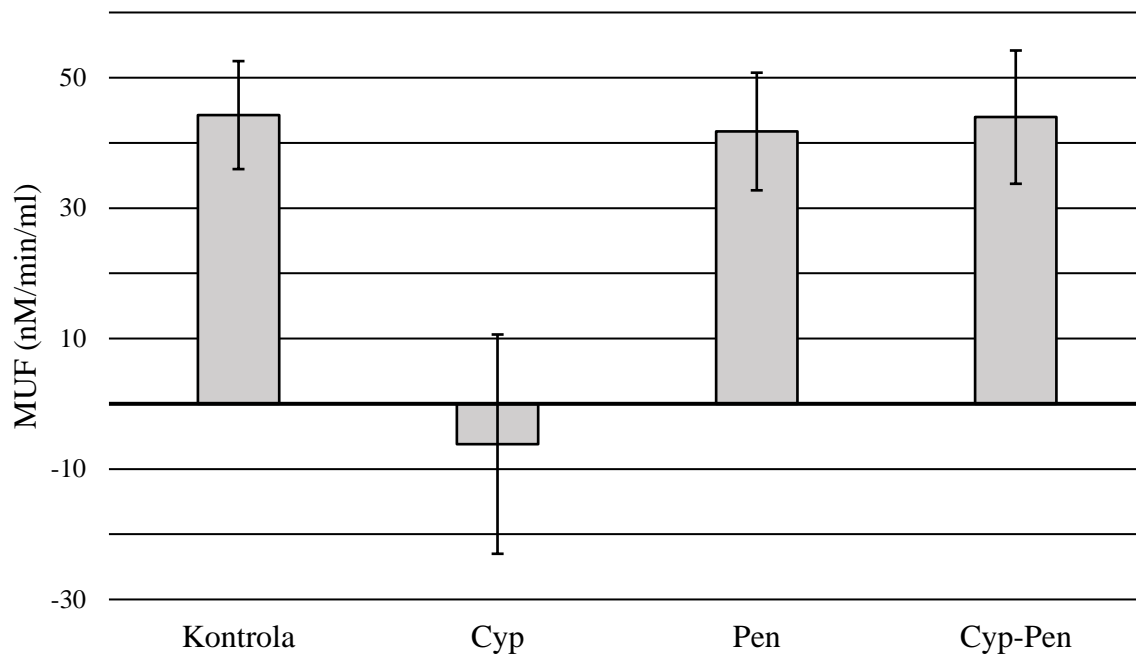


Graf 7 Aktivita arylsulfatázy. Výsledky reprezentují maxima, minima, horní a dolní kvartily, průměry a mediány. Mezi jednotlivými variantami označenými rozdílnými písmeny byly zaznamenány statisticky významné rozdíly ( $p \leq 0,05$ ).

Jak je signifikantní ze sloupcového grafu (Graf 8), nejnižší enzymatické hodnoty byly získány vzhledem k arylsulfatáze. U tohoto popisovaného enzymu jsou nejmarkantnější rozdíly zaznamenány pro fosfatázovou aktivitu, protože aktivita kyselé fosfatázy je ve srovnání s arylsulfatázovou aktivitou 16,5krát vyšší. Lze tedy konstatovat, že v analyzovaném půdním substrátu je enzymatická aktivita arylsulfatázy na rozdíl od ostatních zkoumaných enzymů prokazatelně nižší.

Po aplikaci komerčního přípravku Topas (Pen) nebyla identifikována prokazatelná změna v arylsulfatázové aktivitě, z tohoto důvodu nelze považovat dopad Pen na enzymatickou aktivitu tohoto charakterizovaného enzymu za relevantní.

Naproti tomu, při užití samotného Cyp do půdy, klesla enzymatická aktivita do záporných hodnot. Na základě naměřených výsledků, zde byl zaznamenán 1,14krát nižší pokles arylsulfatázové aktivity oproti kontrole (44,26 nM/min/ml). Po použití triazolů ve směsi Cyp-Pen nebyl identifikován žádný vliv na arylsulfatázovou aktivitu.

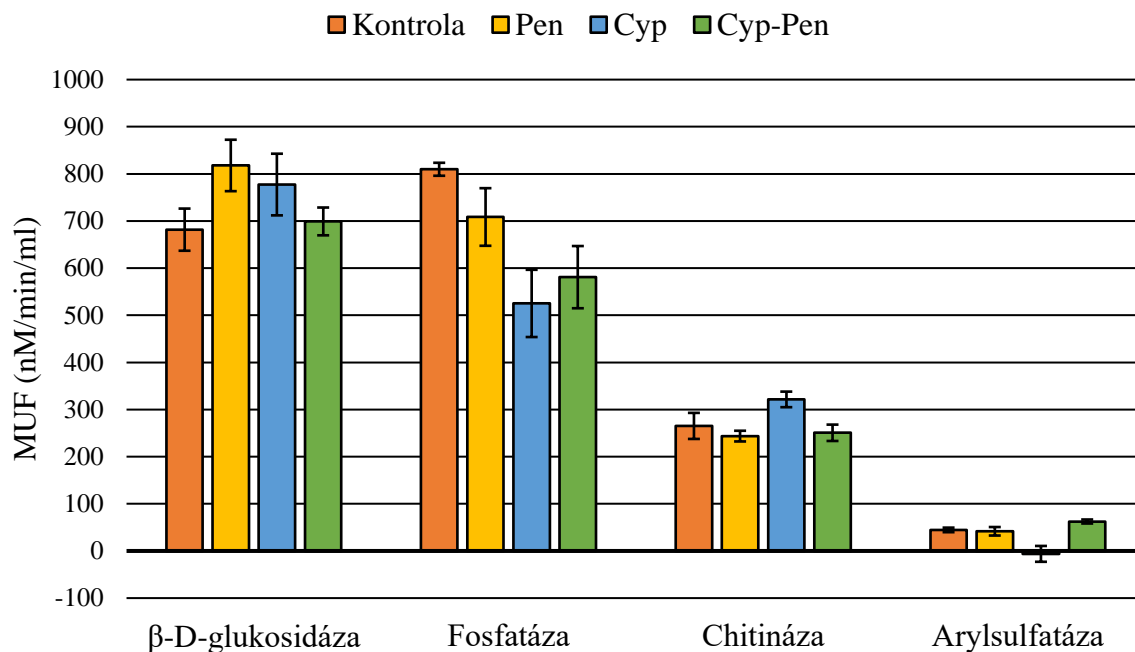


Graf 8 Aktivita arylsulfatázy po aplikaci triazolů

## 5.5 Porovnání aplikovaných triazolů a enzymatických aktivit

Níže jsou popsány a vyhotoveny sloupcové grafy pro aplikované triazoly, tedy cyprokonazol, penkonazol (komerční přípravek Topas) a směs cyprokonazol-penkonazol. V této kapitole jsou porovnány vlivy jednotlivých triazolů na enzymatické aktivity. Zprvu je pro přehledné znázornění přiložen souhrnný graf (Graf 9) a následně je vždy vyhotoven graf pro Cyp, Pen, Cyp-Pen a v něm zahrnutý sledované hydrolázy ( $\beta$ -D-glukosidáza, fosfatáza, chitináza, arylsulfatáza).

O možných příčinách poklesu či navýšení enzymatické aktivity je dále pojednáváno v kapitole 6 Diskuze.



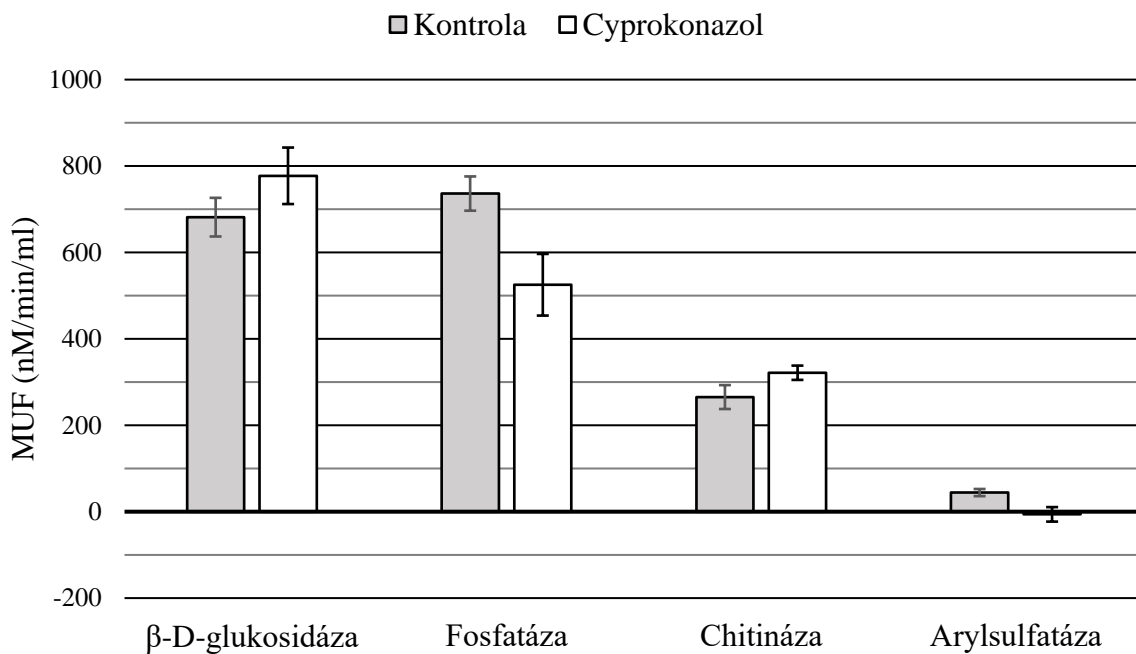
Graf 9 Vliv aplikace triazolů na enzymatické aktivity

### 5.5.1 Cyprokonazol

Při přítomnosti cyprokonazolu v půdě lze na základě naměřených dat tvrdit, že dopad tohoto triazolu má na sledované hydrolázy různý vliv. Na základě Grafu 10 lze konstatovat, že Cyp mírně zvyšuje aktivitu  $\beta$ -D-glukosidázy a chitinázy. U  $\beta$ -D-glukosidázy dochází k navýšení o 14 % (777 nM/min/ml). Jak již bylo shledáno výše (Graf 6), po aplikaci cyprokonazolu stoupá také aktivita chitinázy o 21 % (322 nM/min/ml). U těchto dvou enzymů nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl.

Je zřejmé, že ke značnému poklesu enzymatické aktivity nastává u kyselá fosfatázy (736 nM/min/ml) a především arylsulfatázy, neboť hladina arylsulfatázové aktivity je znatelně nižší než aktivita kyselá fosfatázy. V souladu s Grafem 10, je viditelné, že aktivita arylsulfatázy klesá až do záporných naměřených hodnot (-6,19 nM/min/ml). Byly zde shledány statisticky významné rozdíly. Cyprokonazol významně ovlivňuje aktivitu kyselá fosfatázy a arylsulfatázovou aktivitu (Kapitola 1.2 a 1.4).

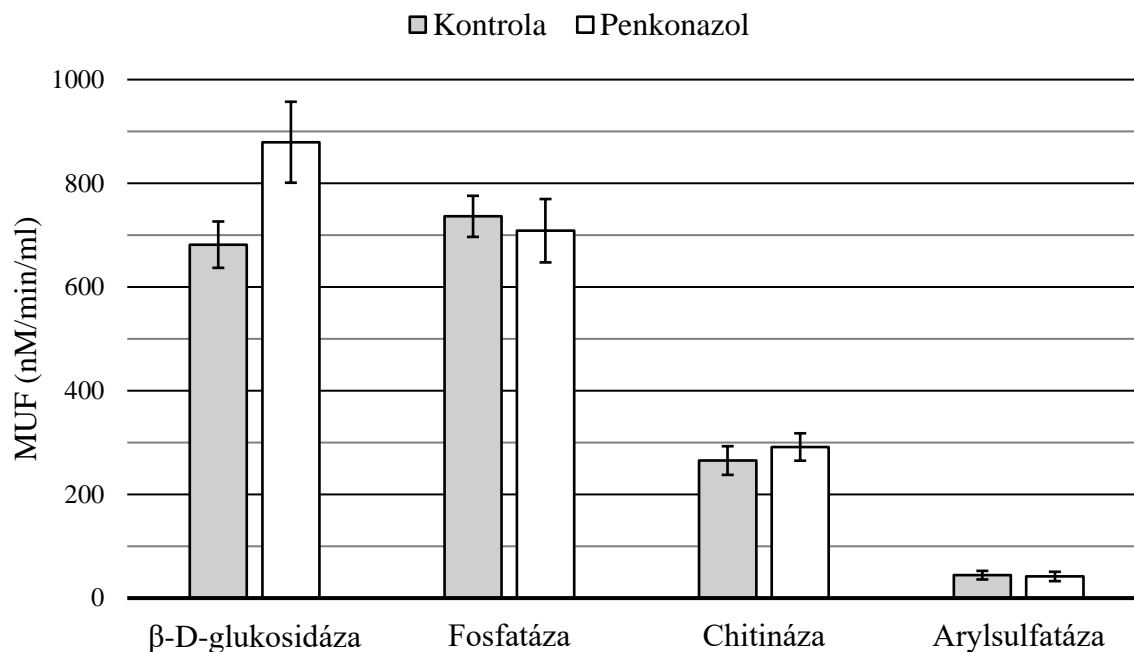




Graf 10 Vliv aplikace cyprokonazolu na enzymatickou aktivitu

### 5.5.2 Penkonazol

Po aplikaci Pen nastává k výraznějšímu navýšení enzymatické aktivity pouze u  $\beta$ -D-glukosidázy, o 29 % (879,17 nM/min/ml). U této hydrolázy byl zaznamenán statisticky významný rozdíl. Dále bylo shledáno, že penkonazol nevyvolal téměř žádný vliv na chitinázovou aktivitu (zvýšení o 26,15 nM/min/ml). Jak je patrné z grafu (Graf 11), triazolový fungicid Topas (Pen) neprokazuje také žádný účinek vůči arylsulfatázové aktivitě. Její enzymatická aktivita se snížila pouze o 2,51 nM/min/ml. A aktivita kyselé fosfatázy klesla o 27,67 nM/min/ml.

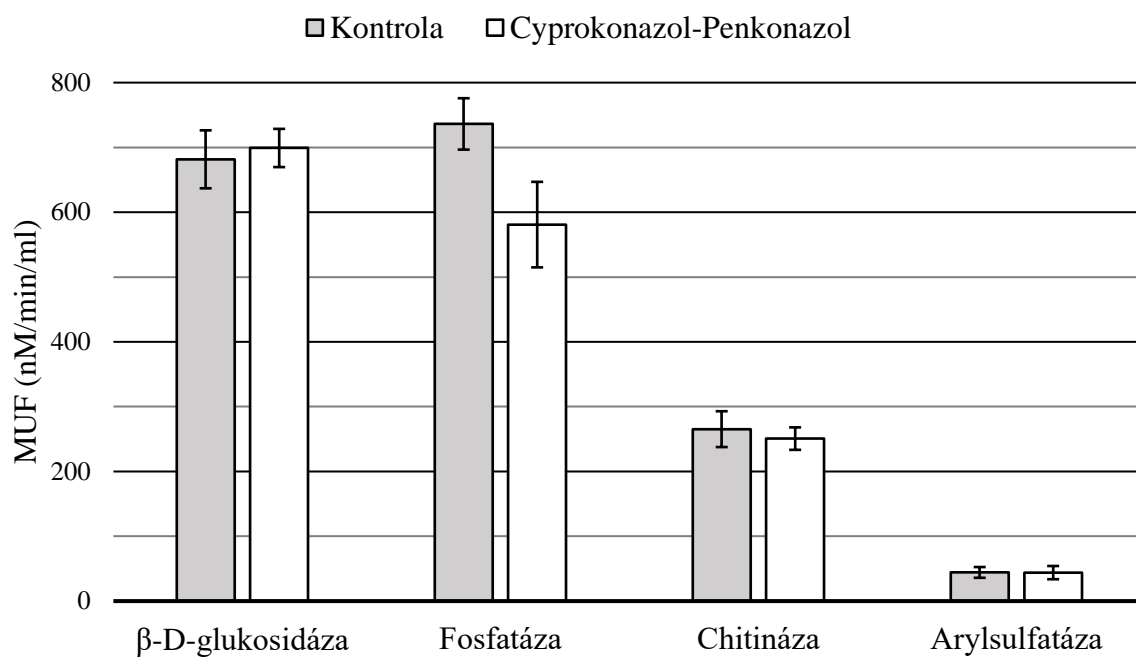


Graf 11 Vliv aplikace penkonazolu na enzymatickou aktivitu

### 5.5.3 Směs cyprokonazol-penkonazol

U půdních substrátů, kde byla uplatněna směs triazolů Cyp-Pen, bylo zjištěno, že se hladina fosfatázové aktivity snižuje, respektive o 21 % (581 nM/min/ml). Na základě tohoto šetření lze konstatovat, že z kombinace těchto dvou triazolů výrazně ovlivňuje fosfatázovou aktivitu cyprokonazol. Nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi kontrolní variantou a kyselou fosfatázou.

Jak je signifikantní z Grafu 12, přítomností triazolů cyprokonazol-penkonazol v půdě nedochází k ovlivnění  $\beta$ -D-glukosidázové a chitinázové aktivity. Je možné poznamenat, že se hladina  $\beta$ -D-glukosidázové a chitinázové aktivity v půdě při využití Pen a Cyp zvýšila (kapitola 5.1 a 5.3). Graf 12 nasvědčuje, že enzymatická aktivita arylsulfatázy (43,95 nM/min/ml) je ve srovnání s kontrolní variantou totožná (44,26 nM/min/ml). Po použití směsi Cyp-Pen do půdy nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl.



Graf 12 Vliv aplikace směsi cyprokonazolu-penkonazolu na enzymatickou aktivitu

## 6 Diskuze

Tato diplomová práce si kladla za cíl určit, zda a která enzymatická aktivita je přítomností triazolů v půdě ovlivněna, dále stanovení konkrétního vlivu aplikovaných triazolů na zvolené enzymatické aktivity a v poslední řadě posouzení potenciálního dopadu fungicidů na různé skupiny mikroorganismů a také procesy odehrávající se v půdě. Zásadní motivací je také postupná snaha nalézt co možná nejuniverzálnější marker mikrobiálních změn v půdě po vstupu triazolů, případně dalších fungicidních látek. Dílčí výsledky a jejich hodnocení jsou diskutovány na základě stanovených cílů a hypotéz v následujících podkapitolách dle posuzovaných enzymatických aktivit.

Enzymatická aktivita půdy je parametr používaný k určení změn v půdě kontaminované různými chemickými sloučeninami. Posouzení půdního prostředí je většinou založeno na úrovních aktivity dehydrogenáz, ureázy, kyselých fosfatáz a alkalických fosfatáz, vzhledem k jejich rozšířenému výskytu a jejich významné roli v procesu transformace organické hmoty.

Existuje mnoho studií o účincích pesticidů na aktivity půdních enzymů a jak již bylo publikováno, pesticidy mohou mít dopad na enzymy nebo modifikovat mikroby a půdní procesy. Zároveň se potvrzuje, že reakce půdních enzymů na různé pesticidy nejsou stejné (Šarapatka et al. 2002; Floch et al. 2011; Muñoz-Leoz et al. 2011; Baćmaga et al. 2015; Sułowicz et al. 2016). Fungicidy ovlivňují enzymy v půdě, což může vést k jejich vazbě na aktivní místa těchto enzymů a ovlivnit tak katalytickou aktivitu enzymu. Jak uvádí Antonious (2003) a Riah et al. (2014), lze obecně konstatovat, že fungicidy mají především negativní vliv na enzymatické aktivity hydroláz. Je ovšem zapotřebí brát v úvahu pH, aplikovanou dávku a také samozřejmě typ daného fungicidu.

### 6.1 $\beta$ -D-glukosidáza

Úvodem je potřeba zmínit studii Hayano & Tubaki (1985) zabývající se distribucí aktivity  $\beta$ -D-glukosidázy v půdě, kde byly pěstovány rostliny rajčat. Z celkové enzymatické aktivity tohoto enzymu bylo >50 % v jemnozemi (<2 mm), 20 % v biomase a významný podíl také v kořenech. Nicméně je tato podkapitola věnována vlivu xenobiotik na  $\beta$ -DG. Z výsledků v rámci naší studie lze konstatovat, že aplikace triazolů v kombinaci cyprokonazol-penkonazol (1,76  $\mu$ mol/rostlinu)  $\beta$ -D-glukosidázovou aktivitu neovlivňují. Dopad aplikovaných triazolů měl v našem experimentu na enzymatickou aktivitu  $\beta$ -D-glukosidázy prokazatelný vliv projevující se zvýšením této aktivity pouze v případě přípravku Topas (Pen). Tuto odezvu enzymatické aktivity lze přikládat k reakci mikroorganismů na penkonazol a možnému zvýšení určitých mikroorganismů schopných degradovat tento triazol.

Podle nashromážděných údajů o aplikaci fungicidních látek a jejich vlivu na  $\beta$ -D-glukosidázovou aktivitu nelze obecně konstatovat, že je  $\beta$ -DG inhibována. Na druhou stranu, potenciální vhodnost použití monitoringu  $\beta$ -DG jako markeru účinku různých fungicidů na půdní organismy dokládá studie Demanou et al. (2004), kteří zkoumali vliv Ridomilu gold plus – účinná látka metalaxyl a měď. Po aplikaci doporučené dávky Ridomilu gold plus se projevil

jeho negativní účinek na mikrobiologické vlastnosti půdy, což se ukázalo změnami enzymatických aktivit. Jinak řečeno, došlo k negativnímu ovlivnění aktivity  $\beta$ -DG.

Muñoz-Leoz et al. (2012) zjistili, že triazol difenokonazol způsobil pouze krátkodobý inhibiční účinek na aktivitu  $\beta$ -D-glukosidázy, zatímco tebukonazol aplikovaný do půdy v dávkách 5, 50 a 500 mg/kg tuto aktivitu zcela inhiboval (Muñoz-Leoz et al. 2011). Podobný inhibiční fenomén na tento enzym, avšak při mnohem větší koncentraci tebukonazolu (2 499 mg/kg), zaznamenali Baćmaga et al. (2019). Další triazol inhibující  $\beta$ -DG aktivitu ve vysoké koncentraci (1000krát vyšší oproti doporučené dávce) je epoxykonazol (Riah-Anglet et al. 2018). To je v rozporu s našimi závěry, kdy právě komerční přípravek Topas (Pen) přispěl ke stimulaci enzymatické aktivity  $\beta$ -DG, avšak je zapotřebí brát také v úvahu aplikované množství těchto triazolových fungicidů. Velké množství  $\beta$ -D-glukosidázy v půdním prostředí může souviset také s činností mikroorganismů, poněvadž mnoho druhů mikroorganismů, ať už plísňů nebo bakterií, tento enzym produkují a jsou schopny degradace určitých xenobiotik.

Ovšem ne vždy může mít dopad fungicidů významný vliv na  $\beta$ -DG aktivitu. Například po aplikaci fungicidů s účinnou látkou fluazinam (skupina účinných látek 2,6-dinitro-aniliny) do půdy nebyl pozorován významný dopad na enzymatickou aktivitu tohoto enzymu (Niemi et al. 2009). Další skupinou účinných látek, respektive triazoly (tebukonazol) se zabývali Baćmaga et al. (2021) kteří dospěli ke stejnému závěru, jako v našem experimentu, kdy po aplikaci Cyp a směsi Cyp-Pen do půdy, nedošlo k prokazatelnému ovlivnění  $\beta$ -DG. V souladu s našimi výsledky a se studiemi Niemi et al. (2009) a Baćmaga et al. (2021), je možné konstatovat, že nelze hodnotit  $\beta$ -DG aktivitu jako marker pro studium změn půdních mikrobiálních aktivit v rámci působení fluazinamu, prochlorazu a některých triazolových fungicidů (tebukonazol, cyprokonazol a směs cyprokonazol-penkonazol).

Na extrakci enzymatické aktivity mají rovněž vliv různá extrakční činidla, např. fosfátový pufr, pyrofosfát sodný (pH 7,0-7,3), fosfátový-KCl-EDTA pufr (pH 7,0) (Nannipieri et al. 1974; Ruggiero & Radogna 1984; Hayano & Katami 1977; Busto & Perez-Mateos 1995; Masciandaro & Ceccanti 1999). Masciandaro et al. (2008) ve své studii zkoumali účinnost různých extrakčních činidel [0.1 M pyrofosfát sodný (pH 7), 0.5 M síran draselný (pH 6.6)] a mezi nimi fosfátový pufr (67 mmol/l) s hodnotou pH 6 pro získání  $\beta$ -D-glukosidázy (z lesních půd). V naší studii byl použit fosfátový pufr (koncentrace 50 mmol/l) s hodnotou pH 7. Masciandaro et al. (2008) uvádí, že nejvyšší aktivita  $\beta$ -D-glukosidázy byla zjištěna v extraktu pyrofosfátu sodného, čímž se potvrdila schopnost extrakce enzymu  $\beta$ -D-glukosidázy vázaného na humin ve stabilní a aktivní formě. Je možné také dodat, že daná extrakční činidla si vedla odlišně v rámci dvou typů zkoumaných lesních půd.

Fosfátový pufr (0,1 M, pH 7) k extrakci  $\beta$ -D-glukosidázy z orné půdy úspěšně použili i Hayano & Katami (1977), mimo jiné dle Masciandaro & Ceccanti (1999) a Busto & Perez-Mateos (1995) lze také použít pyrofosfát sodný (pH 7.0–7.3). Busto & Perez-Mateos (1995) na základě svých výsledků tvrdí, že extracelulární aktivita  $\beta$ -D-glukosidázy má souvislost s huminovými látkami v půdě. K podobným výsledkům došli také Hayano & Katami (1977) s tvrzením, že  $\beta$ -DG je absorbována na povrchu půdních částic iontovými vazbami.

## 6.2 Kyselá a alkalická fosfatáza

Kyselá a alkalická fosfatáza patří mezi fosfomonoesterázy a lze je rozlišit dle optimálního pH specifického pro jejich aktivitu. Avšak v některých studiích není rozdíl mezi alkalickou a kyselou fosfatázou rozlišován. Dále je možné úvodem konstatovat, že dostupné informace z různých studií naznačují, že  $\beta$ -D-glukosidáza a alkalická fosfatáza jsou velmi náchylné k pesticidům, včetně fungicidů. Obecně aktivity fosfatáz po aplikaci různých fungicidních látek reagují velmi odlišně a celkově se zdá, že pesticidy mají převážně inhibiční účinek na fosfatázové enzymatické aktivity.

Enzymatická aktivita v naší studii prokázala inhibiční účinek po aplikaci Cyp (o 29 %). Tuto odezvu enzymatické aktivity na tento triazol je možné přikládat k vazbě hydroláz na specifické substráty a také reakci mikroorganismů na přítomnost xenobiotik v půdním prostředí. Ovšem inhibiční účinek fungicidu na enzymatickou aktivitu může trvat tak dlouho, dokud je koncentrace pesticidu dostatečně vysoká, aby umožňovala jeho interakci s molekulou enzymu. Jiným triazolem způsobující inhibiční aktivity půdní fosfatázy je propikonazol (inhibice o 46,6 %) a tebukonazol (Kalam et al. 2004; Muñoz-Leoz et al. 2011). Baćmaga et al. (2019) uvádějí potlačení aktivity alkalické fosfatázy (o 11,4 %) po přidavku tebukonazolu v dávce 0,125 mg/kg, ale největší změny vyvolala jeho dávka 2 499 mg/kg (pokles aktivity o 20,8 %). Rovněž Baćmaga et al. (2021) se v rámci jejich experimentu zaměřili na ovlivnění kyselé a alkalické fosfatázy působením triazolového fungicidu tebukonazolu. Jeho dávka 10 mg/kg inhibovala růst *Actinobacteria* a také fosfatázy. Ovšem dávka 0,02 mg/kg tebukonazolu stimulovala množení *Actinobacteria* a organotrofních bakterií, což může být možným důvodem k tomu, že došlo ke zvýšení fosfatázových aktivit, jelikož tyto bakterie mohou využít fungicid jako zdroj uhlíku pro svůj metabolismus. Z těchto studií a současně v rámci našeho experimentu, lze hodnotit fosfatázu jako vhodný marker účinku triazolových fungicidů na půdní organismy.

V naší studii nebyl zaznamenán prokazatelný inhibiční účinek na aktivitu kyselé fosfatázy po přidavku Cyp-Pen do půdy. Nicméně v jiném experimentu po aplikaci směsi dvou fungicidů ve směsi mankozeb (skupina účinných látek dithiokarbamáty) + dimethomorph (skupina účinných látek amidy kyseliny skořicové) reagovaly fosfatázy významným snížením enzymatických aktivit (Cycoń et al. 2010). Fungicidy s různými chemickými strukturami mají své specifické mechanismy účinku, ale Jastrzębska & Kucharski (2007) dokazují, že enzymatická aktivita půdy v jejich studii byla ovlivněna převážně dávkou fungicidu a následně také dobou působení daného fungicidu. Nicméně v mnohem menší míře záleželo na typu fungicidu – Swing Top 183 SC ((dimoxystrobin – skupina účinných látek oximino-acetamidů a epoxykonazol – skupina účinných látek triazoly)) a Unix 75 WG (cyprodinil – skupina účinných látek anilino-pyrimidiny). Oba tyto fungicidy měly srovnatelný účinek na enzymy, navzdory skutečnosti, že obsahovaly různé účinné látky, charakterizované různými mechanismy účinku. Dále výsledky ze studie Jastrzębska & Kucharski (2007) naznačují, že typ fungicidu měl významný účinek pouze v případě aktivity alkalické fosfatázy, kdy byla enzymatická aktivita tohoto enzymu významně inhibována Swingem (dimoxystrobin a epoxykonazol), zejména při aplikaci vysokých dávek, a naopak stimulována Unixem (cyprodinil). Jiným faktorem, který modifikoval enzymatickou aktivitu, byla doba fungicidního

působení. Aktivita všech enzymů pozitivně korelovala s dobou fungicidního působení, což znamená, že se s časem zvyšovala.

Další pokles v enzymatické aktivitě po aplikaci fungicidů, ovšem z odlišných skupin účinných látek, zaznamenali ku příkladu i Walia et al. (2014) (mankozeb – dithiokarbamáty), Baćmaga et al. (2015) (azoxystrobin – methoxy-akryláty) a Chen et al. (2001) (benomyl – benzimidazolový fungicid a captan – phthalimidy). Podle těchto zjištění by mohla být fosfatáza použita jako užitečný marker těchto zmiňovaných fungicidů na organismy v půdním prostředí, to je ovšem v rozporu s Bello et al. (2008), jelikož trichlorophenol neovlivňuje enzymatickou aktivitu fosfatáz

Jak je patrné, ve většině studií mají aplikované fungicidy inhibiční účinek na fosfatázy při vyšších koncentracích. To může být zapříčiněno potlačením citlivé frakce půdní bioty. V našem experimentu byla aplikována pouze doporučená koncentrace, avšak i v této koncentraci došlo k prokazatelnému inhibičnímu efektu po aplikaci Cyp, ovšem v přítomnosti penkonazolu a aplikované směsi (Cyp-Pen) nebyla fosfatázová aktivita ovlivněna. Zde se nabízí vysvětlení, že jako extracelulární enzymy jsou fosfatázy sorbovány na půdní koloidy, a tím je omezena degradace v půdě za přítomnosti xenobiotik. Navíc vyšší pokles fosfatázové aktivity může být spojen se sníženou aktivitou mikroorganismů, jakožto producentů fosfatáz.

### 6.3 Chitináza

Mikroorganismy, především bakterie, jsou jedním z hlavních zdrojů chitinázy a chitináza hraje zároveň důležitou roli při rozkladu chitinu (Bhattacharya et al. 2007). Studie zaměřené na studium změn enzymatické aktivity chitinázy po přidavku pesticidů jsou velmi vzácné. Z tohoto důvodu bylo porovnání této enzymatické aktivity oproti předchozím enzymům složitější.

V našem experimentu byly u chitinázy naměřeny nižší enzymatické aktivity oproti  $\beta$ -D-glukosidáze a kyselé fosfatáze. Lze tvrdit, že snížení hladiny chitinázové aktivity na rozdíl od popisovaných enzymů (viz kapitola 5.1 a 5.2) je signifikantní. Obecně jednotlivé enzymatické reakce vykazují různé enzymatické rychlosti. Pokud probíhá enzymatická reakce katalyzovaná chitinázou pomaleji, povede to při dodržení stejných časů k nižší produkci měřeného MUF. V důsledku toho může nastat problém s jeho detekčním limitem. Na druhou stranu nemusí být tento jev dán nižší rychlostí, ale obecně nižší přítomností chitinázy v půdě. V takovém případě doporučují Štursová & Baldrian (2011) využití extrakčních technik.

V rámci experimentální části diplomové práce došlo ke stimulaci CHN aktivity u půdních substrátů s přidavkem Cyp. Mírné zvýšení následovalo rovněž po aplikaci triazolu Topas (Pen). Ovšem slabý inhibiční dopad měla v této studii právě směs Cyp-Pen. V rámci tohoto studovaného enzymu a jeho ovlivnění triazolovými fungicidy nebyly prokázány statisticky významné rozdíly. Tyto naše výsledky jsou v souladu s Niemi et al. (2009), kteří zkoumali dopad fungicidu fluazinam (skupina účinných látek 2,6-dinitro-aniliny) na enzymatické aktivity. Dle jejich výsledků se ukázalo, že enzymatická aktivita chitinázy nebyla v důsledku aplikace této účinné látky významně poznamenána.

Jak již bylo zmíněno, účinky fungicidů v půdním profilu nejpravděpodobněji souvisí s jejich perzistencí a odbouratelností. Jsou rovněž důkazy o tom, že aktivita půdních enzymů je významně ovlivněna dobou fungicidního působení (Jastrzębska & Kucharski 2007). Je taktéž možné, že nižší hodnoty chitinázové aktivity jsou způsobeny hydrolyzou jiných enzymů.

Vzhledem k tomu, že v rámci experimentální části této diplomové práce nedošlo k ovlivnění enzymatické aktivity chitinázy po aplikaci triazolů, lze tvrdit, že Pen, Cyp ani použitá směs Cyp-Pen neovlivňují organismy produkující chitinázy.

## 6.4 Arylsulfatáza

Arylsulfatáza je intracelulární i extracelulární enzym, z tohoto důvodu je zapotřebí posoudit její aktivitu v obou těchto formách (Vong et al. 2008). Příkladem lze uvést studii Klose & Tabatabai (1999), kde 45 % stanovené skupiny arylsulfatáz bylo extracelulárních a 55 % se vyskytovalo v živých buňkách mikroorganismů. Vynikajícím markerem znázorňujícím přeměny v půdě vyvolané chemickými látkami je právě například arylsulfatáza, ale rovněž  $\beta$ -D-glukosidáza patřící do třídy hydroláz. AS může být také nepřímým indikátorem hub, protože pouze houby (nikoli bakterie) obsahují sulfátové estery – substrát arylsulfatázy (Bandick & Dick, 1999; Acosta-Martínez et al. 2008).

Vzhledem ke skutečnosti, že od roku 2000 jsou studie zaměřené na účinky pesticidů vůči enzymatické aktivitě arylsulfatázy omezené (Omar & Abdel-Sater 2001; Riah et al. 2014), bylo i v rámci tohoto studovaného enzymu poměrně obtížné porovnat vliv fungicidních látek na arylsulfatázovou aktivitu (obdobně jako u chitinázy).

V našem experimentu vykazovala arylsulfatáza v porovnání s předešlými měřenými enzymy nejnižší enzymatické hodnoty. Po aplikaci komerčního přípravku Topas (Pen) nebyla identifikována prokazatelná změna v enzymatické aktivitě tohoto enzymu. Naproti tomu, prokazatelná změna v AS aktivitě byla zaznamenána při užití samotného Cyp do půdy, kde došlo k výraznému inhibičnímu účinku. S tímto tvrzením souhlasí také Muñoz-Leoz et al. (2011), zjistili velmi znatelnou inhibici AS aktivity za přítomnosti fungicidní účinné látky ze skupiny triazolů – tebukonazolu (5, 50 a 500 mg/kg). Rovněž Baćmaga et al. (2019) prokázali inhibiční vliv na enzymatickou aktivitu po přidavku tebukonazolu do půdy, avšak při mnohem vyšší koncentraci tohoto triazolu (2 499 mg/kg). Na základě těchto šetření lze shledat arylsulfatázu jako marker účinku triazolových fungicidů – cyprokonazolu a tebukonazolu na organismy v půdním prostředí. To je ovšem v rozporu s Baćmaga et al. (2021), v jejichž studii aplikace tebukonazolu do půdy v koncentraci 10 mg/kg stimulovala AS aktivitu. Naopak významného inhibičního efektu na AS aktivitu, avšak při použití fungicidu mankozeb (ze skupiny účinných látek dithiokarbamáty) inhibuje aktivitu arylsulfatázy. Inhibiční vliv vzhledem k aktivitě arylsulfatázy byl okamžitý a aktivity arylsulfatázy byly po 12 měsících stále značně inhibovány (Floch et al. 2011).

Nižší obsah organického uhlíku v půdě může částečně souviset s činností mikroorganismů a tím i s produkcí arylsulfatázy. Jelikož bylo provedeno minerální přihnojení během vegetace



a neproběhlo hnojení organickými hnojiv, tak se na základě tohoto tvrzení nabízí vysvětlení pro inhibiční vliv na AS aktivitu v rámci našeho experimentu.

## 6.5 Dopad triazolů na mikroorganismy a půdní procesy

Je známo, že extracelulární enzymy napomáhají rozkladu organické hmoty. A jak uvádí Anderson (1984), mikrobiální aktivita je důležitým faktorem pro studium působení agrochemikálií v půdním prostředí. Kromě přímých měření mikrobiálních aktivit je možné k hodnocení mikrobiální činnosti v půdě použít jednotlivé enzymatické aktivity. Například Bandick & Dick (1999) uvádí, že rhizosféra má pozitivní dopad na aktivity  $\alpha$ - a  $\beta$ -D-glukosidázy v půdním profilu.

Nelze však jednoznačně předvídat vztah mezi chemickou strukturou fungicidu a jeho vlivem na určité skupiny půdních mikroorganismů. Fungicidy mohou mít různé účinky na růst a vývoj mikroorganismů a jejich dopad není určen pouze druhem a aplikovanou dávkou daného fungicidu, ale závisí také na mikroorganismech nacházejících se v půdním prostředí (Lo 2010). Campos et al. (2016) dodávají, že v půdách kontaminovaných fungicidy lze nalézt především tyto gramnegativní bakterie – *Alphaproteobacteria*, *Acidobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* a *Deltaproteobacteria*. Na druhé straně bylo shledáno, že ku příkladu  $\beta$ -D-glukosidázová a  $\beta$ -xylosidázová aktivita má menší souvislost se složením společenstva mikrobů než například peroxidáza a celobiohydroláza. Jakmile fungicidy proniknou do půdního profilu, může dojít nejen k negativnímu působení na množení a růst mikroorganismů, ale také k ovlivnění schopnosti exkrece enzymů do okolního prostředí, zejména pokud jde o enzymy jako ureáza, dehydrogenázy, proteázy nebo námi studované fosfatázy či  $\beta$ -D-glukosidáza. Pochopitelně ne všechny fungicidní přípravky inhibují růst mikroorganismů, ale jiné fungicidní látky mohou mít naopak stimulační účinky, anebo nemají na mikroorganismy žádný vliv.

Jak uvádějí Pose-Juan et al. (2017) a jak již bylo shledáno výše, dlouhodobé a intenzivní používání fungicidů může vést ke kontaminaci půdy a v důsledku toho ke změnám půdního mikrobiomu. Tyto změny byly pozorovány v rámci našeho experimentu, kdy v půdě ošetřené Cyp byl prokázán významný inhibiční účinek na fosfatázu i arylsulfatázu a vlivem působení Pen došlo ke stimulaci  $\beta$ -DG aktivity. Právě stimulační efekt penkonazolu na  $\beta$ -DG lze přikládat možnému vytvoření vhodných podmínek pro růst a vývoj půdních mikroorganismů, které jsou schopné vývoje za přítomnosti Pen, jelikož penkonazol mohou využít jako zdroj uhlíku (viz Obrázek 5). Toto tvrzení dokládají i Arora & Sahni (2016), kteří zmiňují možnou detoxikaci mikroorganismy triazolového tebukonazolu. Tebukonazolem se zabývali také Baćmaga et al. (2021), v jejich experimentu tebukonazol ovlivnil množství i rozmanitost bakterií a také biochemické procesy v půdě. Stimuloval proliferaci organotrofních bakterií (ve srovnání s kontrolní variantou se jejich počet zvýšil o 62 %). Ahemad & Khan (2012) dospěli k závěru, že pokud je tebukonazol aplikován samostatně, nikoliv ve směsi, může stimulovat růst gramnegativních bakterií rodu *Bradyrhizobium*. Naopak grampozitivní *Actinobacteria* reagovaly na přítomnost tebukonazolu negativně, to může být zapříčiněno jejich nízkou tolerancí k nadměrnému množství tohoto triazolu v půdě (Arora & Sahni, 2016; Baćmaga et al. 2021). Ovšem na druhou stranu Baćmaga et al. (2019) zaznamenali stimulační

účinek na *Actinobacteria* (tebukonazol v koncentraci 0,042 mg/kg a 0,083 mg/kg), ale při vyšších koncentracích (2 499 mg/kg) zmiňovaného triazolu se stal pro mikroorganismy toxickým. Velmi citlivými gramnegativními bakteriemi na tebukonazol v dávce 10,0 mg/kg jsou *Acidobacteria* (inhibice o 74 %), zatímco nejrezistentnější se zdají být gramnegativní bakterie z kmene *Verrucomicrobia* (Baćmaga et al. 2021). Ze studie Zhang et al. (2014) plyne, že grampozitivní bakterie jsou velmi rezistentní vůči působení tetrakonazolu, a to nejspíše díky specifické struktuře buněčné stěny těchto bakterií.

Ke zvýšení relativního množství bakterií z kmene *Proteobacteria* dochází za přítomnosti triazolů – penkonazolu a epoxykonazolu (Riah-Anglet et al. 2018; Baćmaga et al. 2021), ale proliferaci *Proteobacteria* potvrdili také Hussain et al. (2009) a Lu & Lu (2018). Jejich studie naznačují, že v půdních profilech po aplikaci fungicidů jsou tyto bakterie schopné se přizpůsobit měnícím se půdním podmínkám. *Proteobacteria* by navíc měly být schopné se spojit s jinými bakteriemi (např. s gramnegativními *Bacteroidetes*) v procesu degradace xenobiotik. Také nitrifikační bakterie jsou velmi citlivé na aplikaci fungicidů (Chen & Edwards 2001; Černošková et al. 2009) a triazolové fungicidy, respektive tebukonazol (Cycoń et al. 2006; Muñoz-Leoz et al. 2011).

K prokazatelnému inhibičnímu vlivu v rámci působení cyprokonazolu v půdě došlo v našem experimentu u fosfatázy a arylsulfatázy. Z těchto výsledků by bylo možné soudit, že tyto dva enzymy mohou být vhodným markerem k hodnocení dopadu triazolů na půdní organismy. Tato inhibice může také indikovat eliminaci některých druhů mikroorganismů, které nevyvinuly obranné mechanismy proti stresovým faktorům. Tudíž v naší studii mohl Cyp v rámci působení vůči fosfatáze a arylsulfatáze představovat stresový faktor, protože se ukázal být toxickým pro určité druhy mikroorganismů, které nejsou schopné se adaptovat na změny v půdním prostředí. Redukci mikrobiální biomasy pozorovali také Cycoń et al. (2006) po aplikaci tebukonazolu (270 mg/kg). Na druhou stranu triazolové fungicidy nemusí vždy významně inhibovat mikrobiální biomasu (Strickland et al. 2004). Tyto protichůdné závěry je možné přičíst rozdílným metodikám, jelikož Cycoń et al. (2006) neaplikovali tebukonazol přímo na půdní vzorky, ale použili komerční formu tebukonazolu, kde mohlo dojít k synergickému či antagonistickému ovlivnění mezi fungicidem a adjuvanty. Nepříznivé účinky fungicidů na mikrobiologickou aktivitu půdy byly shledány také ku příkladu u Ullah & Dijkstra (2019). Účinek fungicidů na množení půdních mikroorganismů je obvykle krátkodobý. S tím souvisí i zjištění Muñoz-Leoz et al. (2011) kteří shledali, že čím je koncentrace tebukonazolu vyšší, tím delší je jeho poločas rozkladu. Obecně se poločas rozkladu tohoto triazolu pohybuje od 49 (Muñoz-Leoz et al. 2011) do 610 dnů (Strickland et al. 2004) a poločas rozkladu difenokonazolu 33-55 dní (Wang et al. 2008). To lze vysvětlit tím, že právě při vyšších koncentracích triazolů může docházet k negativnímu ovlivnění aktivity půdních mikroorganismů.

Zjištění ze studií ukazují, že azoxystrobin (skupina účinných látek methoxy-akryláty) mění počty organotrofních bakterií, aktinomycet a hub. Tento fungicidní přípravek, který ve studii Baćmaga et al. (2015) projevil inhibiční účinek na aktivitu fosfatáz a jiných měřených enzymů, může taktéž způsobit změny v mikrobiální diverzitě. Množství mikroorganismů v půdním prostředí významně korelovalo s aplikovanou dávkou fungicidu a také s inkubační dobou

v půdě. Významná redukce plísní byla sledována po aplikaci nejvyšší dávky azoxystrobinu (22,5 mg/kg) a s počtem dní postupně plísně ubývaly. V jiných studiích dospěli někteří autoři k podobným závěrům jako Baćmaga et al. (2015). Po aplikaci fungicidu mankozeb (skupina účinných látek dithiokarbamáty) došlo rovněž k prokazatelnému inhibičnímu účinku na houby (Walia et al. 2014). Podobně Chen et al. (2001) zaznamenali určitý inhibiční vliv na půdní mikrobiální aktivitu v rámci působení třech fungicidů (benomyl, captan a chlorothalonil). Účinky těchto tří fungicidů na mikrobiální aktivitu závisely na kvalitě organických materiálů přidaných do půdy a ukázalo se, že captan má celkově výraznější účinky na půdní mikrobiální aktivitu než benomyl nebo chlorothalonil. Rovněž fungicid fenpropimorph aplikovaný v doporučené dávce inhiboval plísně a také některé bakterie. Ovšem kupříkladu *Pseudomonas* a *Actinomyces* ovlivněny nebyly. Podobně například diuron a chlorotoluron neprojevily žádnou odezvu na půdní mikroorganismy (Lo 2010).

Jak již bylo úvodem v této podkapitole uvedeno, odlišné účinky pesticidů na půdní mikroorganismy mohou vyplývat z různých chemických struktur účinných látek nebo snášenlivosti mikroorganismů na tyto látky. Pesticidy mohou být pro některé mikroorganismy zdrojem živin nebo energie, ale zároveň můžou být toxické a způsobovat poruchy buněčného metabolismu. Ovšem je nutno dodat, že postupem času dochází k poklesu mikrobiální biomasy v půdě, aniž by byl zaznamenán vliv působících fungicidů.

Jakmile půdní mikroorganismy odumřou, mikrobiální produkce enzymů se zastaví. Důvodem, proč některé enzymy dostatečně nereagují na určité fungicidy, může být ten, že se enzymy ve stabilizované formě naváží na půdní koloidy či na povrch jílových minerálů a oxidů a hydroxidů železa, a to i v případě, když jsou enzymy vyloučeny půdními mikroorganismy. Rovněž obsah organického uhlíku v půdním prostředí ovlivňuje způsob chování fungicidů v půdě. Bylo zjištěno, že v půdách s nízkým obsahem organického uhlíku (0,4-0,5 %) se Pen velmi adsorboval a zároveň měl značně malou mobilitu ve srovnání s ostatními triazolovými fungicidy (hexakonazol, propikonazol, triadimefon). Dle těchto výsledků lze soudit, že obsah půdní organické hmoty není jediným faktorem ovlivňujícím sorpci. Rodríguez-Cruz et al. (2008) dodávají, že Pen adsorbovaný na půdní částice v půdách s vysokým obsahem organické hmoty je stabilnější než penkonazol vázaný v půdách s nízkým obsahem organické hmoty. V naší studii mohlo dojít k stabilizaci měřených enzymů huminovými látkami nebo jílovými minerály, a tím bylo částečně zabráněno denaturaci.

## 7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo posouzení vlivu triazolů (penkonazolu, cyprokonazolu a jejich směsi), případně dalších fungicidních látek na enzymatické aktivity vybraných hydroláz ( $\beta$ -D-glukosidáza, fosfatázy, chitináza a arylsulfatáza) a necílové mikroorganismy. Dalším neméně důležitým záměrem bylo nalezení co možná nejuniverzálnějšího markeru mikrobiálních změn odehrávajících se v půdním prostředí po vstupu triazolů či jiných fungicidů do půdy. Byly stanoveny tři hypotézy týkající se dopadu triazolových fungicidů na enzymatické aktivity, dále jejich dopadu v půdě a poslední hypotéza se týkala ovlivnění některých mikroorganismů a s tím související činnosti produkovaných enzymů.

První hypotézou bylo, že přítomností triazolových látek v půdě jsou ovlivňovány některé mikroorganismy a s tím související činnost produkovaných enzymů. Tuto hypotézu lze vyvrátit v rámci působení triazolů na mikroorganismy produkující chitinázu. Jelikož po aplikaci cyprokonazolu, penkonazolu a ani po jejich použití ve směsi (cyprokonazol+penkonazol) nedošlo k ovlivnění enzymatické chitinázové aktivity. A z tohoto důvodu tyto triazoly neovlivňují organismy produkující chitinázy a chitinázu nelze hodnotit k potenciálnímu použití jako markeru účinku triazolů na půdní organismy. Naopak došlo k negativnímu ovlivnění necílových organismů po styku s účinnou triazolovou látkou – cyprokonazolem. Dopad tohoto triazolu měl nepříznivý účinek na organismy produkující fosfatázu a arylsulfatázu. Bylo možné také dedukovat, že došlo k negativnímu vlivu na bakterie z těchto z rodů, tj. *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* a *Azospirillum*, protože produkují především alkalickou fosfatázu. Dalším triazolem byl penkonazol, který stimuloval půdní organismy produkující  $\beta$ -D-glukosidázu. V rámci těchto závěrů byla potvrzena hypotéza, že přítomností některých triazolových fungicidů jsou ovlivněny mikroorganismy, respektive organismy produkující především fosfatázy, arylsulfatázu a  $\beta$ -D-glukosidázu.

Další hypotéza se týkala dopadu triazolů na enzymatické aktivity a jejich různého ovlivnění. Tato hypotéza byla potvrzena, protože u všech zkoumaných hydroláz nelze vyvodit jeden univerzální závěr, tedy zda jsou měřené enzymatické aktivity po styku s vybranými triazolovými látkami ovlivněny pozitivně nebo negativně. Po přidavku penkonazolu byla  $\beta$ -D-glukosidáza stimulována, zatímco cyprokonazol inhiboval fosfatázu a arylsulfatázu, chitináza zůstala neovlivněna. Poslední hypotézou bylo posouzení dopadu přítomnosti různých triazolů v půdě a jejich různého vlivu. Použití triazolů ve směsi nemělo statisticky průkazný vliv. Naopak účinným markerem se dle nashromážděných údajů a současně v rámci výsledků diplomové práce jeví fosfatázy, jelikož indikují vliv cyprokonazolu, propikonazolu a tebukonazolu. Monitoring arylsulfatázy k potenciálnímu použití jako vyhovujícího markeru účinku byl shledán též pro cyprokonazol a tebukonazol.

## 8 Literatura

- Acosta-Martínez V, Tabatabai M. 2000. Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soils* **31**: 85-91.
- Acosta-Martínez V, Acosta-Mercado D, Sotomayor-Ramírez D, Cruz-Rodríguez L. 2008. Microbial communities and enzymatic activities under different management in semiarid soils. *Applied Soil Ecology* **38**: 249–260.
- Adetunji AT, Lewu FB, Mulidzi R, Ncube B. 2017. The biological activities of  $\beta$ -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a Review. *Journal of soil science and plant nutrition* **17**: 794-807.
- Ahemad M, Khan MS. 2012. Productivity of greengram in tebuconazole-stressed soil, by using a tolerant and plant growth-promoting Bradyrhizobium sp. MRM6 strain. *Acta physiologiae plantarum* **34**: 245-254.
- Albrecht R, Petit JL, Calvert V, Terrom G, Périssol C. 2010. Changes in the level of alkaline and acid phosphatase activities during green wastes and sewage sludge co-composting. *Bioresource Technology* **101**: 228-233.
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Garcia-Effron G, Lopez JR, Grimalt JO, Cuenca-Estrella JM, Rodríguez-Tudela JL. 2008. Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids* **73**: 339–347.
- Almasudy AM, You MP, Barbetti MJ. 2015. Influence of fungicidal seed treatments and soil type on severity of root disease caused by *Rhizoctonia solani* AG-8 on wheat. *Crop Protection* **75**: 40-45.
- Almeida C, Nogueira JMF. 2012. Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction—Application to trace level analysis of fungicides in real matrices. *Journal of Chromatography A* **1265**: 7-16.
- Amoozadeh M, Behbahani M, Mohabatkar H, Keyhanfar M. 2020. Analysis and comparison of alkaline and acid phosphatases of Gram-negative bacteria by bioinformatic and colorimetric methods. *Journal of Biotechnology* **308**: 56-62.
- Anderson, JPE. 1984. Herbicide degradation in soil: influence of microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* **16**: 483-489.
- Anchordoquy TJ, Izutsu KI, Randolph TW, Carpenter JF. 2001. Maintenance of Quaternary Structure in the Frozen State Stabilizes Lactate Dehydrogenase during Freeze–Drying. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **390**: 35-41.
- Antonious GF. 2003. Impact of soil management and two botanical insecticides on urease and invertase activity. *Journal of Environmental Science and Health* **38**: 479–488.
- Arias M, Paradelo M, López E, Simal-Gándara J. 2006. Influence of pH and soil copper on adsorption of metalaxyl and penconazole by the surface layer of vineyard soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**: 8155–8162.

- Arora S, Sahni D. 2016. Pesticides effect on soil microbial ecology and enzyme activity-An overview. *Journal of Applied and Natural Science* **8**: 1126-1132.
- Asati V, Sharma PK. 2019. Purification and characterization of an isoflavones conjugate hydrolyzing  $\beta$ -glucosidase (ICHG) from *Cyamopsis tetragonoloba* (guar). *Biochemistry and Biophysics Reports* **20**: 100669.
- Assress HA, Nyoni H, Mamba BB, Msagati TAM. 2020. Occurrence and risk assessment of azole antifungal drugs in water and wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **187**: 109868.
- Azevedo MM, Faria-Ramos I, Costa Cruz L, Pina-Vaz C, Goncalves Rodriguez A. 2015. Genesis of azole antifungal resistance from agriculture to clinical settings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**: 7463–7468.
- Babaknejad N, Shareghi B, Saboury AA. 2020. Study of alkaline phosphatase interaction with putrescine using multi-spectroscopic and docking methods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **185**: 110509.
- Babaknejad N, Shareghi B, Saboury AA. 2020. Study of alkaline phosphatase interaction with putrescine using multi-spectroscopic and docking methods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **185**: 110509.
- Baćmaga M, Kucharski J, Wyszowska J. 2015. Microbial and enzymatic activity of soil contaminated with azoxystrobin. *Environmental Monitoring and Assessment* **187**: 615.
- Baćmaga M, Wyszowska J, Kucharski J. 2019. Biostimulation as a process aiding tebuconazole degradation in soil. *Journal of Soils and Sediments* **19**: 3728-3741.
- Baćmaga M, Wyszowska J, Kucharski J. 2021. Bacterial diversity and enzymatic activity in a soil recently treated with tebuconazole. *Ecological Indicators* **123**: 107373.
- Baldrian P. 2009. Microbial enzyme-catalyzed processes in soils and their analysis. *Plant, Soil and Environment* **55**: 370-378.
- Balota EL, Chaves JCD. 2010. Enzymatic activity and mineralization of carbon and nitrogen in soil cultivated with coffee and green manures. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **34**: 1573-1583.
- Bandick AK, Dick RP. 1999. Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry* **31**: 1471-1479.
- Banerjee A, Sanyal S, Sen S. 2012. Soil phosphatase activity of agricultural land: A possible index of soil fertility. *Agricultural Science Research Journals* **2**: 412-419.
- Barrios E. 2007. Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics* **64**: 269-285.
- Bautista-Cruz A, Ortiz-Hernandez YD. 2015. Hydrolytic soil enzymes and their response to fertilization: A short review. *Comunicata Scientiae* **6**: 255.
- Behera BC, Yadav H, Singh SK, Mishra RR, Sethi BK, Dutta SK, Thatoi HN. 2017. Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of

- Mahanadi river delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **15**: 169-178.
- Bello D, Trasar-Cepeda C, Leiros MC, Gil-Sotres F. 2008. Evaluation of various tests for the diagnosis of soil contamination by 2,4,5-trichlorophenol (2,4,5-TCP). *Environmental Pollution* **156**: 611–617.
- Bending GD, Lincoln SD, Edmondson RN. 2006. Spatial variation in the degradation rate of the pesticides isoproturon, azoxystrobin and diflufenican in soil and its relationship with chemical and microbial properties. *Environmental Pollution* **139**: 279-287.
- Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK. 2007. Bacterial chitinases: properties and potential. *Critical Reviews in Biotechnology* **27**: 21-28.
- Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN. 2002. Acid phosphatases. *Journal of Clinical Pathology – Molecular Pathology* **55**: 65-72.
- Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. 2005. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of molecular endocrinology* **34**: 597-601.
- Busto MD, Perez-Mateos M. 1995. Extraction of humic- $\beta$ -glucosidase fractions from soil. *Biology and Fertility of Soils* **20**: 77-82.
- Campos SB, Lisboa BB, Camargo FA, Bayer C, Sczyrba A, Dirksen P, Albersmeier A, Kalinowski J, Beneduzi A, Costa PB, Passaglia LMP, Vargas LK, Wendisch VF. 2016. Soil suppressiveness and its relations with the microbial community in a Brazilian subtropical agroecosystem under different management systems. *Soil Biology and Biochemistry* **96**: 191-197.
- Cao F, Souders II CL, Li P, Pang S, Qiu L, Martyniuk CJ. 2019. Developmental toxicity of the triazole fungicide cyproconazole in embryo-larval stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Pollution Research* **26**: 4913–4923.
- Conner KP, Vennam P, Woods CM, Krzyaniak MD, Bowman MK, Atkins WM. 2012. 1,2,3-triazole-heme interactions in cytochrome P450: functionally competent triazole–water–heme complexes. *Biochemistry* **51**: 6441–6457.
- Cregut M, Piutti S, Vong P, Slezack-Deschaumes S, Crovisier I, Benizri E. 2009. Density, structure, and diversity of the cultivable arylsulfatase-producing bacterial community in the rhizosphere of field-grown rape and barely. *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 704-710.
- Cui N, Xu H, Yao S, He Y, Zhang H, Yu Y. 2018. Chiral triazole fungicide tebuconazole: enantioselective bioaccumulation, bioactivity, acute toxicity, and dissipation in soils. *Environmental Science and Pollution Research* **25**: 25468–25475.
- Cycoń M, Piotrowska-Seget Z, Kaczyńska A, Kozdrój J. 2006. Microbiological characteristics of a sandy loam soil exposed to tebuconazole and  $\lambda$ -cyhalothrin under laboratory conditions. *Ecotoxicology* **15**: 639-646.

- Cycoń M, Piotrowska-Seget Z, Kozdroj J. 2010. Responses of indigenous microorganisms to a fungicidal mixture of mancozeb and dimethomorph added to sandy soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* **64**: 316–323.
- Černohlávková J, Jarkovský J, Hofman J. 2009. Effects of fungicides mancozeb and dinocap on carbon and nitrogen mineralization in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**: 80-85.
- De Cesare F, Garzillo AMV, Buonocore V, Badalucco L. 2000. Use of sonification for measuring acid phosphatase activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 825–832.
- Dedourge O, Vong PC, Lasserre-Joulin F, Benizri E, Gukert A. 2004. Effects of glucose and rhizodeposits (with or without cysteine-S) on immobilized-<sup>35</sup>S, microbial biomass-<sup>35</sup>S and arylsulphatase activity in a calcareous and an acid brown soil. *European Journal of Soil Science* **55**: 649-656.
- De Jong E, Barenys M, Hermsen SA, Verhoef A, Ossendorp BC, Bessems JG, Piersma AH. 2011. Comparison of the mouse embryonic stem cell test, the rat whole embryo culture and the zebrafish embryotoxicity test as alternative methods for developmental toxicity testing of six 1,2,4-triazoles. *Toxicology and Applied Pharmacology* **253**: 103-111.
- Demanou J, Monkiédjé A, Njiné T, Foto SM, Nola M, Zebaze Togouet SH, Kemka N. 2004. Changes in soil chemical properties and microbial activities in response to the fungicide Ridomil Gold Plus Copper. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **1**: 26-34.
- Dick W, Cheng L, Wang P. 2000. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1915-1919.
- Di Renzo F, Bacchetta R, Bizzo A, Giavini E, Menegola E. 2011. Is the amphibian *X. laevis* WEC a good alternative method to rodent WEC teratogenicity assay? The example of the three triazole derivative fungicides Triadimefon, Tebuconazole, Cyproconazole. *Reproductive Toxicology* **32**: 220-226.
- Duff SMG, Sarath G, Plaxton WC. 1994. The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiologia Plantarum* **90**: 791-800.
- Egbuta Ch, Lo J, Ghosh D. 2014. Mechanism of inhibition of estrogen biosynthesis by azole fungicides. *Endocrinology* **155**: 4622–4628.
- Eivazi F, Tabatabai M. 1990. Factors affecting glucosidase and galactosidase in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **22**: 891-897.
- Fenoll J, Ruiz E, Hellín P, Navarro S, Flores P. 2010. Solarization and biosolarization enhance fungicide dissipation in the soil. *Chemosphere* **79**: 216–220.
- Floch C, Chevremont AC, Joanico K, Capowiez Y, Criquet S. 2011. Indicators of pesticide contamination: soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via biolog ecoplates. *European Journal of Soil Biology* **47**: 256–263.
- Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E. 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **43**: 1621-1625.



- Galletti S, Sala E, Leoni O, Cinti S, Cerato C. 2008. *Aspergillus flavus* transformation of glucosinolates to nitriles by an arylsulfatase and a  $\beta$ -thio-glucosidase. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 2170-2173.
- Gámiz B, López-Cabeza R, Facenda G, Velarde P, Hermosín MC, Cox L, Celis R. 2016. Effect of synthetic clay and biochar addition on dissipation and enantioselectivity of tebuconazole and metalaxyl in an agricultural soil: laboratory and field experiments. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **230**: 32–41.
- Gevao B, Semple KT, Jones KC. 2000. Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental Pollution* **108**:3–14.
- Gianfreda L, Bollag J-M, 1996. Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil. Pages: 123–193 in Stotzky G, Bollag J-M, editors. *Soil Biochemistry*. CRC Press, New York.
- Gooday GW. 1990. The ecology of chitin degradation. *Advances in Microbial Ecology* **11**: 387–430.
- Hahm MS, Son JS, Hwang YJ, Kwon DK, Ghim SY. 2017. Alleviation of salt stress in pepper (*Capsicum annum* L.) plants by plant growth-promoting *Rhizobacteria*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**: 1790–1797.
- Hashmi MZ, Kumar V, Varma A. 2017. *Xenobiotics in the Soil Environment: Monitoring, Toxicity and Management*. Springer, Cham.
- Hayano K, Katami A. 1977. Extraction of  $\beta$ -glucosidase activity from pea field soil. *Soil Biology and Biochemistry* **9**: 349-351.
- Hayano K, Tubaki K. 1985. Origin and properties of  $\beta$ -glucosidase activity of tomato-field soil. *Soil Biology and Biochemistry* **17**: 553-557.
- Hjort K, Bergström M, Adesina MF, Jansson JK, Smalla K, Sjöling S. 2009. Chitinase genes revealed and compared in bacterial isolates, DNA extracts and a metagenomic library from a phytopathogen-suppressive soil. *FEMS Microbiology Ecology* **71**: 197-207.
- Huang Q, Shindo H. 2000. Effects of copper on the activity and kinetics of free and immobilized acid phosphatase. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1885-1892.
- Husak VV, Mosiichuk NM, Storey JM, Storey KB, Lushchak VI. 2017. Acute exposure to the penconazole-containing fungicide Topas partially augments antioxidant potential in goldfish tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology* **193**: 1-8.
- Hussain S, Siddique T, Saleem M, Arshad M, Khalid A. 2009. Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. *Advances in agronomy* **102**: 159-200.
- ChemicalBook. 2017a. Cyproconazole. Available from [https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB3716690\\_EN.htm](https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB3716690_EN.htm) (accessed February 2020).

- ChemicalBook. 2017b. Penconazole. Available from [https://www.chemicalbook.com/ProductList\\_en.aspx?kwd=penconazole](https://www.chemicalbook.com/ProductList_en.aspx?kwd=penconazole) (accessed February 2020).
- Chen SK, Edwards CA, Subler S. 2001. Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 1971–1980.
- Chen SK, Edwards CA. 2001. A microcosm approach to assess the effects of fungicides on soil ecological processes and plant growth: comparisons of two soil types. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 1981-1991.
- Chen X, Jiang N, Condrón LM, Dunfield KE, Chen Z, Wang J, Chen L. 2019. Soil alkaline phosphatase activity and bacterial *phoD* gene abundance and diversity under long-term nitrogen and manure inputs. *Geoderma* **349**: 36-44.
- Imfeld G, Vuilleumier S. 2012. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. *European Journal of Soil Biology* **49**: 22-30.
- Jaklová Dyrtrtová J, Bělonožníková K, Jakl M, Ryšlavá H. 2020. Triazoles and aromatase: The impact of copper cocktails. *Environmental Pollution* **266**: 115201.
- Jastrzębska E, Kucharski J. 2007. Dehydrogenases, urease and phosphatases activities of soil contaminated with fungicides. *Plant soil and environment* **53**: 51-57.
- Jiang L, Lin JL, Jia LX, Liu Y, Pan B, Yang Y, Lin Y. 2016. Effects of two different organic amendments addition to soil on sorption-desorption, leaching, bioavailability of penconazole and the growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Environmental Management* **167**: 130-138.
- Jordan D, Kremer RJ, Bergfield WA, Kim KY, Cacnio VN. 1995. Evaluation of microbial methods as potential indicators of soil quality in historical agricultural fields. *Biology and Fertility of Soils* **19**: 297-302.
- Kah M, Brown CD. 2006. Adsorption of ionizable pesticides in soils. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **188**: 149–217.
- Kalam A, Tah J, Mukherjee AK. 2004. Pesticide effects on microbial population and soil enzyme activities during vermicomposting of agricultural waste. *Journal of Environmental Biology* **25**: 201–208.
- Karaca A, Cetin SC, Turgay OC, Kizilkaya R. 2010. Soil enzymes as indication of soil quality. Pages 119-148 in Shukla G, Varma A, editors. *Soil Enzymology*. Soil Biology. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Khadem A, Raiesi F. 2019. Response of soil alkaline phosphatase to biochar amendments: Changes in kinetic and thermodynamic characteristics. *Geoderma* **337**: 44-54.
- Khan AA, Shih DS. 2004. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of two class II chitinase genes from the strawberry plant. *Plant Science* **166**: 753-762.

- Kim IS, Beaudette LA, Shim JH, Trevors JT, Suh YT. 2002. Environmental fate of the triazole fungicide propiconazole in a rice-paddy-soil lysimeter. *Plant Soil* **239**: 321–331.
- Kelly LT, Ryan KG, Wood SA. 2019. Differential strain response in alkaline phosphatase activity to available phosphorus in *Microcoleus autumnalis*. *Harmful Algae* **89**: 101664.
- Klose S, Bilen S, Tabatabai MA, Dick WA. 2011. Sulfur Cycle Enzymes. Pages 125-159 in Dick RP, Ulery A, Dick W, Brummer EC, Logsdon S, Savin M, Casler M, Clay D, Al-Amoodi L, editors. *Methods of Soil Enzymology*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
- Klose S, Tabatabai MA. 1999. Arylsulfatase activity of microbial biomass in soils. *Soil Science Society of America Journal* **63**: 569–574.
- Knauff U, Schulz M, Scherer HW. 2003. Arylsulfatase activity in the rhizosphere and roots of different crop species. *European Journal of Agronomy* **19**: 215-223.
- Knight TR, Dick RP. 2004. Differentiating microbial and stabilized  $\beta$ -glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biology and Biochemistry* **36**: 2089-2096.
- Komárek M, Čadková E, Chrastný V, Bordas F, Bollinger JC. 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environment International* **36**: 138–151.
- Kranz C, Whitman T. 2019. Short communication: Surface charring from prescribed burning has minimal effects on soil bacterial community composition two weeks post-fire in jack pine barrens. *Applied Soil Ecology* **144**: 134-138.
- Labidi N, Snoussi S, Ammari M, Metoui W, Yousfi NB, Hamrouni L, Abdely C. 2010. Enhancement of acid phosphatase secretion and Pi acquisition in *Suaeda fruticosa* on calcareous soil by high saline level. *Acta Biologica Hungarica* **61**: 470–485.
- Lakowicz JR. 2013. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer Science & Business Media, New York.
- Lammirato C, Miltner A, Wick LY, Kästner M. 2010. Hydrolysis of cellobiose by  $\beta$ -glucosidase in the presence of soil minerals – Interactions at solid–liquid interfaces and effects on enzyme activity levels. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 2203-2210.
- Liu A, Chen S, Wang M, Liu D, Chang R, Wang Z, Lin X, Bai B, Ahammed GJ. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungus alleviates chilling stress by boosting redox poise and antioxidant potential of tomato seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation* **35**: 109-120.
- Lo CC. 2010. Effect of pesticides on soil microbial community. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, **45**: 348-359.
- Lu XM, Lu PZ. 2018. Response of microbial communities to pesticide residues in soil restored with *Azolla imbricata*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**: 475-484.
- Makoi JHJR, Ndakidemi PA. 2008. Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. *African Journal of Biotechnology* **7**: 181-191.

- Masciandaro G, Ceccanti B. 1999. Assessing soil quality in different agro-ecosystems through biochemical and chemico-structural properties of humic substances. *Soil and Tillage Research* **51**: 129-137.
- Masciandaro G, Macci C, Doni S, Maserti BE, Leo ACB, Ceccanti B, Wellington E. 2008. Comparison of extraction methods for recovery of extracellular  $\beta$ -glucosidase in two different forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 2156-2161.
- Matthews GA. 2018. *A History of Pesticides*. CABI, Boston, MA.
- Maximova SN, Marelli JP, Young A, Pishak S, Verica JA, Gultinan MJ. 2005. Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Planta* **224**: 740–749.
- Mazur CS, Kenneke JF. 2007. Cross-species comparison of conazole fungicide metabolites using rat and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatic microsomes and purified human CYP 3A4. *Environmental Science & Technology* **42**: 947-954.
- Mercadante R, Polledri E, Scurati S, Moretto A, Fustinoni S. 2016. Identification of metabolites of the fungicide penconazole in human urine. *Chemical Research in Toxicology* **29**: 1179-1186.
- Miyauchi T, Mori M, Ito K. 2005. Application of solid-phase extraction to quantitatively determine cyproconazole and tebuconazole in treated wood using liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A* **1063**: 137-141.
- Moscatelli MC, Lagomarsino A, Garzillo AMV, Pignataro A, Grego S. 2012.  $\beta$ -Glucosidase kinetic parameters as indicators of soil quality under conventional and organic cropping systems applying two analytical approaches. *Ecological Indicators* **13**: 322-327.
- Muñoz-Leoz B, Ruiz-Romera E, Antigüedad I, Garbisu C. 2011. Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil Biology and Biochemistry* **43**: 2176-2183.
- Muñoz-Leoz B, Garbisu C, Antigüedad I, Ruiz-Romera E. 2012. Fertilization can modify the non-target effects of pesticides on soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **48**: 125-134.
- Nannipieri P, Ceccanti B, Cervelli S, Sequi P. 1974. Use of 0.1 M pyrophosphate to extract urease from a podzol. *Soil Biology and Biochemistry* **6**: 359-362.
- Nahas E. 2015. Control of acid phosphatases expression from *Aspergillus niger* by soil characteristics. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **58**: 658-666.
- Niemi RM, Heiskanen I, Ahtiainen JH, Rahkonen A, Mäntykoski K, Welling L, Laitinen P, Ruuttunen P. 2009. Microbial toxicity and impacts on soil enzyme activities of pesticides used in potato cultivation. *Applied Soil Ecology* **41**: 293–304.
- Nollet LML, Rathore HS. 2009. *Handbook of Pesticides*. CRC Press, Florida.

- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 2005a. Cyproconazole. Available from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/86132> (accessed March 2020).
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 2005b. Penconazole. Available from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Penconazole> (accessed March 2020).
- Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* **439**: 231-250.
- Omar SA, Abdel-Sater MA. 2001. Microbial populations and enzyme activities in soil treated with pesticides. *Water, Air, and Soil Pollution* **127**: 49–63.
- Oliver R, Hewitt HG. 2014. Fungicides in crop protection. CABI, Wallingford.
- Pandey D, Agrawal M, Bohra JS. 2014. Effects of conventional tillage and no tillage permutations on extracellular soil enzyme activities and microbial biomass under rice cultivation. *Soil and Tillage Research* **136**: 51-60.
- Pose-Juan E, Rial-Otero R, Lopez-Periago JE. 2010. Sorption of penconazole applied as a commercial water-oil emulsion in soils devoted to vineyards. *Journal of Hazardous Materials* **182**: 136–143.
- Pose-Juan E, Igual JM, Sánchez-Martín MJ, Rodríguez-Cruz MS. 2017. Influence of herbicide triasulfuron on soil microbial community in an unamended soil and a soil amended with organic residues. *Frontiers in Microbiology* **8**: 378.
- Poulsen PHB, Møller J, Magid J. 2008. Determination of a relationship between chitinase activity and microbial diversity in chitin amended compost. *Bioresource Technology* **99**: 4355-4359.
- Prietzl J. 2001. Arylsulfatase activities in soils of the Black Forest/Germany—seasonal variation and effect of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fertilization. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 1317-1328.
- Potter TL, Strickland TC, Joo H, Culbreath AK. 2005. Accelerated soil dissipation of tebuconazole following multiple applications to peanut. *Journal of Environmental Quality* **34**: 1205-1213.
- Rathore N, Rajan RS. 2008. Current perspectives on stability of protein drug products during formulation, fill and finish operations. *Biotechnology Progress* **24**: 504-514.
- Riah W, Laval K, Laroche-Ajzenberg E, Mougín Ch, Latour X, Trinsoutrot-Gattin I. 2014. Effects of pesticides on soil enzymes: a review. *Environmental Chemistry Letters* **12**: 257-273.
- Riah-Anglet W, Trinsoutrot-Gattin I, Norini MP, Gauthier A, Latour X, Laval K. 2018. Initial state of soil microbial communities determines their stress response. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **6**: 5470-5480.

- Rodríguez-Cruz MS, Andrades MS, Sánchez-Martín MJ. 2008. Significance of the long-chain organic cation structure in the sorption of the penconazole and metalaxyl fungicides by organo clays. *Journal of hazardous materials* **160**: 200-207.
- Ruggiero P, Radogna VM. 1984. Properties of laccase in humus–enzyme complexes. *Soil Science* **138**: 74-87.
- Sannino F, Gianfreda L. 2001. Pesticide influence on soil enzymatic activities. *Chemosphere* **45**: 417-425.
- Santos P, Fortunato A, Ribeiro A, Pawlowski K. 2008. Chitinases in root nodules. *Plant Biotechnology Journal* **25**: 299-307
- Saraiva AS, Sarmiento RA, Golovko O, Randak T, Pestana JLT, Soares AMVM. 2018. Lethal and sub-lethal effects of cyproconazole on freshwater organisms: a case study with *Chironomus riparius* and *Dugesia tigrina*. *Environmental Science and Pollution Research* **25**: 12169–12176.
- Sardans J, Penuelas J. 2005. Drought decreases soil enzyme activity in a mediterranean quercus ilex l. Forest. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 455-461.
- Saxena AK, Devillers J, Bhunia SS, Bro E. 2015. Modelling inhibition of avian aromatase by azole pesticides. SAR and QSAR in Environmental Research **26**: 757-782.
- Sehnm NT, Souza-Cruz P, Peralba MDCR, Ayub MAZ. 2009. Biodegradation of tebuconazole by bacteria isolated from contaminated soils. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **45**: 67-72.
- Shoresh M, Harman GE. 2010. Differential expression of maize chitinases in the presence or absence of *Trichoderma harzianum* strain T22 and indications of a novel exo- endo-heterodimeric chitinase activity. *BMC Plant Biology* **10**: 136.
- Shrestha CL, Oña I, Muthukrishnan S, Mew TV. 2008. Chitinase levels in rice cultivars correlate with resistance to the sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani*. *European Journal of Plant Pathology* **120**: 69–77.
- Schneider K, Turrion MB, Grierson PF, Gallardo JF. 2001. Phosphatase activity, microbial phosphorus, and fine root growth in forest soils in the Sierra de Gata, western central Spain. *Biology and Fertility of Soils* **34**: 151–155.
- Schomburg I, Jeske L, Ulbrich M, Placzek S, Chang A, Schomburg D. 2017. The BRENDA enzyme information system–From a database to an expert system. *Journal of Biotechnology* **261**: 194-206.
- Smith CJ, Osbor AM. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **67**: 6-20.
- Sood SG. 2003. Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. *FEMS Microbiology Ecology* **45**: 219-227.

- Soonvald L, Loit K, Runno-Paurson E, Astover A, Tedersoo L. 2019. The role of long-term mineral and organic fertilisation treatment in changing pathogen and symbiont community composition in soil. *Applied Soil Ecology* **141**: 45-53.
- Steinauer K, Tilman D, Wragg PD, Cesarz S, Cowles JM, Pritsch K, Reich PB, Weisser WW, Eisenhauer N. 2015. Plant diversity effects on soil microbial functions and enzymes are stronger than warming in a grassland experiment. *Ecology* **96**: 99-112.
- Steven LL, James TO. 1999. Enhancement of acute parathion toxicity to fathead minnows following pre-exposure to Propiconazole pesti. *Journal of Biochemistry and Physiology* **65**: 102-109.
- Strickland TC, Potter TL, Joo H. 2004. Tebuconazole dissipation and metabolism in Tifton loamy sand during laboratory incubation. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science* **60**: 703-709.
- Štursová M, Baldrian P. 2011. Effects of soil properties and management on the activity of soil organic matter transforming enzymes and the quantification of soil-bound and free activity. *Plant and Soil* **338**: 99–110.
- Sułowicz S, Cycoń M, Piotrowska-Seget Z. 2016. Non-target impact of fungicide tetraconazole on microbial communities in soils with different agricultural management. *Ecotoxicology* **25**:1047–1060.
- Šarapatka B, Dlapa P, Bedrna Z. 2002. Kvalita a degradace půdy. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Šarapatka B. 2014. Pedologie a ochrana půdy. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Strawn DG, Bohn HL, O'Connor GA. 2015. *Soil Chemistry*. John Wiley & Sons, New York.
- Šimek M, et al. 2019. Živá půda: biologie, ekologie, využívání a degradace půdy. Academia, Praha.
- Takala N, Sirén H, Jakl M, Jaklová Dytrtová J. 2019. Determination of important azoles in soil solution using CE. *Monatshefte für Chemie – Chemical Monthly* **150**: 1625–1631.
- Topp E. 2003. Bacteria in agricultural soils: diversity, role and future perspectives. *Canadian Journal of Soil Science* **83**: 303-309.
- Turner BL, Hopkins DW, Haygarth PM, Ostle N. 2002.  $\beta$ -Glucosidase activity in pasture soils. *Applied Soil Ecology* **20**: 157-162.
- Ullah MR, Dijkstra FA. 2019. Fungicide and bactericide effects on carbon and nitrogen cycling in soils: A Meta-analysis. *Soil Systems* **3**: 23.
- Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský. Rostlinolékařský portál. Topas 100 EC. Available from [http://eagri.cz/public/app/srs\\_pub/fytoportal/public/#rlp|prip|uredni|detail:Topas%20100%20EC|popis](http://eagri.cz/public/app/srs_pub/fytoportal/public/#rlp|prip|uredni|detail:Topas%20100%20EC|popis) (accessed March 2020).
- Valeur B. 2009. Molecular Fluorescence. Pages 477-531 in *Digital Encyclopedia of Applied Physics*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

- Van Der Heijden MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **11**: 296–310.
- Vepsäläinen M, Kukkonen S, Vestberg M, Sirvio H, Niemi RM. 2001. Application of soil enzyme activity test kit in a field experiment. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 1665–1672.
- Veres Z, Kotroczó Z, Fekete I, Tóth JA, Lajtha K, Townsend K, Tóthmérész B. 2015. Soil extracellular enzyme activities are sensitive indicators of detrital inputs and carbon availability. *Applied Soil Ecology* **92**: 18-23.
- Vives-Peris V, de Ollas C, Gómez-Cadenas A, Pérez-Clemente RM. 2020. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports* **39**: 3-17.
- Vodrážka Z. 1992. *Biochemie 1*. Academia, Praha.
- Vong PC, Piutti S, Slezack-Deschaumes S, Beniziri E, Guckert A. 2008. Sulphur immobilization and arylsulphatase activity in two calcareous arable and fallow soils as affected by glucose additions. *Geoderma* **148**: 79–84.
- Vyas SC. 1988. *Nontarget Effects of Agricultural Fungicides*. CRC Press, Boca Raton.
- Walia A, Mehta P, Guleria S, Chauhan A, Shirkot CK. 2014. Impact of Fungicide Mancozeb at Different Application Rates on Soil Microbial Populations, Soil Biological Processes, and Enzyme Activities in Soil. *The Scientific World Journal* **2014**: 1-9.
- Wang ZH, Yang T, Qin DM, Gong Y, Ji Y. 2008. Determination and dynamics of difenoconazole residues in Chinese cabbage and soil. *Chinese Chemical Letters* **19**: 969-972.
- Wang L, Liu D. 2018. Functions and regulation of phosphate starvation-induced secreted acid phosphatases in higher plants. *Plant Science* **271**: 108-116.
- Warembourg FR, Estelrich HD. 2001. Plant phenology and soil fertility effects on below-ground carbon allocation for an annual (*Bromus madritensis*) and a perennial (*Bromus erectus*) grass species. *Soil Biology & Biochemistry* **33**: 1291-1303.
- Wolterink G, Inayat-Hussain SH. 2015. Penconazole. *Joint Meeting on Pesticide Residues*. 501-558.
- Worrall F, Fernandez-Perez M, Johnson A, Flores-Cesperedes F, Gonzalez-Pradas E. 2001. Limitations on the role of incorporated organic matter in reducing pesticide leaching. *Journal of Contaminant Hydrology* **49**: 241–262.
- Xiao W, Chen X, Jing X, Zhu B. 2018. A meta-analysis of soil extracellular enzyme activities in response to global change. *Soil Biology and Biochemistry* **123**: 21-32.
- Yan X, Liao H, Trull MC, Beebe SE, Lynch JP. 2001. Induction of a major leaf acid phosphatase does not confer adaptation to low phosphorus availability in common bean. *Plant Physiology* **125**: 1901–1911.



- Yang Z, Liao Y, Fu X, Zaporski J, Peters S, Jamison M, Liu Y, Wullschleger SD, Graham DE, Gu B. 2019. Temperature sensitivity of mineral-enzyme interactions on the hydrolysis of cellobiose and indican by  $\beta$ -glucosidase. *Science of The Total Environment* **686**: 1194-1201.
- Yousafi Q, Kanwal S, Rashid H, Khan MS, Saleem S, Aslam M. 2019. *In silico* structural and functional characterization and phylogenetic study of alkaline phosphatase in bacterium, *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879). *Computational Biology and Chemistry* **83**: 107-142.
- Zelles L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and fertility of soils* **29**: 111-129.
- Zhang W, Xu J, Dong F, Liu X, Zhang Y, Wu X, Zheng Y. 2014. Effect of tetraconazole application on the soil microbial community. *Environmental Science and Pollution Research* **21**: 8323-8332.
- a) Zhang ZX, Gao BB, He ZZ, Li LS, Zhang Q, Kaziem AE, Wang MH. 2019. Stereoselective bioactivity of the chiral triazole fungicide prothioconazole and its metabolite. *Pesticide biochemistry and physiology* **160**: 112-118.
- b) Zhang Z, Du G, Gao B, Hu K, Kaziem AE, Li L, He Z, Shi H, Wang M. 2019. Stereoselective endocrine-disrupting effects of the chiral triazole fungicide prothioconazole and its chiral metabolite. *Environmental Pollution* **251**: 30-36.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

AP – Kyselá fosfatáza

AS – Arylsulfatáza

$\beta$ -DG –  $\beta$ -D-glukosidáza

Cyp – Cyprokonazol

Cyp-Pen – Cyprokonazol-Penkonazol

CHN – Chitináza

DMSO – Dimethylsulfoxid

MUF – 4-methylumbelliferol

MUFG – 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glukopyranosid

MUFP – 4-methylumbelliferyl-fosfát

MUFP-K – 4-methylumbelliferyl-fosfát-kyselý

MUFS – 4-methylumbelliferyl sulfát sodná sůl

MUFN – 4-methylumbelliferyl-N-acetylglukosamin

PCR – Polymerázová řetězová reakce

Pen – Penkonazol

PLFA – Fosfolipidové mastné kyseliny

Teb – Tebukonazol

## 10 Samostatné přílohy

Pro měření pozadí fluorescence bylo 200  $\mu\text{l}$  suspenze pipetováno sterilními špičkami do jamek v mikrotitrační destičce, zvláště pro každý vzorek půdy a enzym. Následně se odpipetovalo 20  $\mu\text{l}$  DMSO do jamek v mikrotitrační destičce – 1-6 pro A, B, E, F. Dále dle Tabulky P-1 uvedená množství MUF, a to od nejnižší koncentrace (0,01 mmol/l MUF) až po nejvyšší koncentraci (1 mmol/l MUF). Jednotlivé barvy (žlutá, zelená, modrá a červená) značí jednotlivé vzorky. Tedy žlutá barva značí vzorek č. 1, zelená vzorek č. 2, modrá vzorek č. 3 a červená vzorek č. 4 a znovu následuje žlutá barva pro vzorek č. 5 a následují další vzorky.

Tabulka P-1 Stanovení aktivity enzymů ve vzorcích půd

Stanovení aktivity enzymů ve vzorcích půd  
Phosphate buffer 50 mM, pH 7.0

Vzorek

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFG 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFG 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFG 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFG 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFG 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFG 20 $\mu\text{l}$ DMSO			200 $\mu\text{l}$ suspenze Blank	200 $\mu\text{l}$ suspenze Blank	200 $\mu\text{l}$ suspenze Blank	200 $\mu\text{l}$ suspenze Blank	A
B	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFP-K 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFP-K 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFP-K 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFP-K 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFP-K 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFP-K 20 $\mu\text{l}$ DMSO			200 $\mu\text{l}$ suspenze 10 $\mu\text{l}$ MUF 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 10 $\mu\text{l}$ MUF 0.01 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 10 $\mu\text{l}$ MUF 0.01 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 10 $\mu\text{l}$ MUF 0.01 mM	B
C	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFS	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFS	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFS	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFS	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFS	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFS			200 $\mu\text{l}$ suspenze 20 $\mu\text{l}$ MUF 0.01 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 20 $\mu\text{l}$ MUF 0.01 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 20 $\mu\text{l}$ MUF 0.01 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 20 $\mu\text{l}$ MUF 0.01 mM	C
D	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFN	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFN	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFN	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFN	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFN	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFN			200 $\mu\text{l}$ suspenze 50 $\mu\text{l}$ MUF 0.01 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 50 $\mu\text{l}$ MUF 0.01 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 50 $\mu\text{l}$ MUF 0.01 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 50 $\mu\text{l}$ MUF 0.01 mM	D
E	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFG 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFG 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFG 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFG 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFG 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFG 20 $\mu\text{l}$ DMSO			200 $\mu\text{l}$ suspenze 20 $\mu\text{l}$ MUF 0.1 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 20 $\mu\text{l}$ MUF 0.1 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 20 $\mu\text{l}$ MUF 0.1 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 20 $\mu\text{l}$ MUF 0.1 mM	E
F	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFP-K 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFP-K 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFP-K 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFP-K 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFP-K 20 $\mu\text{l}$ DMSO	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFP-K 20 $\mu\text{l}$ DMSO			200 $\mu\text{l}$ suspenze 50 $\mu\text{l}$ MUF 0.1 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 50 $\mu\text{l}$ MUF 0.1 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 50 $\mu\text{l}$ MUF 0.1 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 50 $\mu\text{l}$ MUF 0.1 mM	F
G	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFS	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFS	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFS	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFS	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFS	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFS			200 $\mu\text{l}$ suspenze 10 $\mu\text{l}$ MUF 1 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 10 $\mu\text{l}$ MUF 1 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 10 $\mu\text{l}$ MUF 1 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 10 $\mu\text{l}$ MUF 1 mM	G
H	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFN	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFN	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFN	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFN	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFN	200 $\mu\text{l}$ suspenze 40 $\mu\text{l}$ MUFN			200 $\mu\text{l}$ suspenze 20 $\mu\text{l}$ MUF 1 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 20 $\mu\text{l}$ MUF 1 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 20 $\mu\text{l}$ MUF 1 mM	200 $\mu\text{l}$ suspenze 20 $\mu\text{l}$ MUF 1 mM	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	