

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin**



**Vliv přítomnosti penkonazolu v půdě na enzymatickou aktivitu**

**Diplomová práce**

**Bc. Jaroslav Charvát**

**Technologie zpracování a využití odpadů**

**Ing. Michal Jakl, Ph.D.**

© 2019 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv přítomnosti penkonazolu v půdě na enzymatickou aktivitu" jsem vypracoval 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 autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4.2019

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval panu Ing. Michalovi Jaklovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a pomoc při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat svým dobrým přátelům, a především své rodině, která mě vždy ve studiu plně podporovala.

# Vliv přítomnosti penkonazolu v půdě na enzymatickou aktivitu

## Souhrn

Tato diplomová práce se zabývá vlivem přítomnosti triazolového fungicidu (penkonazolu) na enzymatickou aktivitu dehydrogenázy a ureázy v odlišných půdách. Cílem práce bylo stanovit aktivitu půdních enzymů u tří půd s rozdílnými vlastnostmi (Humpolec, Poděbrady a Suchdol) v závislosti na stupňovaných dávkách fungicidu, porovnat aktivity a zhodnotit vytvořené hypotézy. Změny enzymatických aktivit byly sledovány v delších časových intervalech v rámci inkubačního experimentu jednotlivých půd se v koncentrační řadě přidaného penkonazolu.

Hlavními hypotézami výzkumu bylo, že (1) zvyšující se množství účinné látky fungicidu bude v půdě negativně ovlivňovat její enzymatickou aktivitu, (2) vliv fungicidu na aktivitu enzymů se bude mezi různými půdami lišit a (3) enzymatická aktivita se bude v půdě měnit v čase, s ohledem na postupnou degradaci fungicidu.

V teoretické části je k zevrubnému popisu dané problematiky využito podkladů čerpaných z odborné literatury, článků periodik a dalších dokumentů. Důraz je kladen na popis půdy, jako životního prostředí významných mikroorganismů, problematiku fungicidních látek vstupujících do prostředí, jejich mobilitu a sorpci a vliv na půdní enzymatickou aktivitu.

V praktické části jsou pak mimo jiné popsány vlastní metodiky stanovení jednotlivých vlastností vybraných půd a stanovení aktivit navržených půdních enzymů, včetně kompletních výsledků a závěrů.

U obou stanovovaných enzymů byly zjištěny odlišnosti mezi různými půdami a také změna aktivity v čase, s pravděpodobnou degradací u většiny vzorků patrnou již po 14 dnech inkubace. Tím byly 2 hypotézy potvrzeny, avšak u hypotézy č. 1 nebyly zjištěny statisticky průkazné rozdíly, avšak trend je nejlépe patrný na půdě Humpolec s kyselým pH a tím se dá brát pouze jako částečně potvrzená.

**Klíčová slova:** enzymy, mikroorganismy, penkonazol, půda, triazolové fungicidy

# Effects of penconazole in soil on enzymatic activity

## Summary

This thesis deals with the effect of present triazole fungicide (penconazole) on enzymatic activity of dehydrogenase and urease in diverse soils. The main goal was to assess the activity of soil enzymes in three soils with different qualities (Humpolec, Poděbrady and Suchdol) in relation on scaled doses of fungicide, compare activities and evaluate created hypothesis. The changes in enzymatic activities were watched in longer time periods within the framework of incubation experiment with individual soils in concentration queues of rising amount of added penconazole.

The main hypothesis of this research were, that (1) with rising amount of the fungicide content in soil the less soil enzymatic activity will be, (2) that the impact of fungicide on enzymatic activity among different soils will significantly differs and (3) that the enzymatic activity varies in time with the respect to degradation of fungicide.

In theoretical part were created detailed description of the issue based on scientific literature, papers and other documents. The emphasis is placed on the description of the soil, as the environment of important microorganisms, the problém of fungicidal substances entering the environment, their mobility and sorption and the effect on soil enzymatic activity.

In the practical part there are described techniques used for the assessment of individual characteristics in chosen soils and assessments of soil enzymatic activity including complete results and conclusions.

At both of assessed enzymes were detected variations between different soils and the change of the activity in time, even with presumable degradation at most of the samples already after first 14 days of incubation. This way were 2 hypothesis confirmed, but in hypothesis no. 1 were not found any statistically significant differences. However, the trend is most noticeable on acidic soil of Humpolec and therefore can be only taken as partially confirmed.

**Keywords:** enzymes, microorganisms, penconazole, soil, triazole fungicides, ,

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Půda</b>	<b>3</b>
3.1.1	Složení a struktura půdy	3
3.1.2	Půdní organická hmota	6
3.1.3	Edafon	8
3.1.3.1	Mikroedafon	8
3.1.3.2	Rhizosféra	9
3.1.4	Metody monitoringu	10
3.1.5	Půdní enzymy	12
3.1.5.1	Aktivita dehydrogenázy	15
3.1.5.2	Aktivita ureázy	15
<b>3.2</b>	<b>Fungicidy</b>	<b>16</b>
3.2.1	Využití a účinnost	17
3.2.2	Chování v půdě, degradace a persistence	17
3.2.3	Triazolové fungicidy	18
3.2.3.1	Vliv na mikrobiální činnost	19
3.2.4	Penkonazol	20
<b>4</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Použité půdy</b>	<b>23</b>
<b>4.2</b>	<b>Stanovení jednotlivých vlastností půd</b>	<b>24</b>
4.2.1	Fyzikální vlastnosti půd	24
4.2.2	Půdní reakce (aktivní a výměnná)	24
4.2.3	Množství C <sub>ox</sub> (oxidovatelného uhlíku)	25
<b>4.3</b>	<b>Založení inkubačního pokusu</b>	<b>27</b>
<b>4.4</b>	<b>Aktivita dehydrogenázy</b>	<b>29</b>
<b>4.5</b>	<b>Aktivita ureázy</b>	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>32</b>
<b>5.1</b>	<b>Aktivita dehydrogenázy</b>	<b>32</b>
5.1.1	Humpolec	32
5.1.2	Poděbrady	33
5.1.3	Suchdol	33
5.1.4	Korelace mezi půdami	34

<b>5.2</b>	<b>Aktivita ureázy .....</b>	<b>35</b>
5.2.1	Humpolec.....	35
5.2.2	Poděbrady.....	36
5.2.3	Suchdol.....	37
5.2.4	Korelace mezi půdami.....	38
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých internetových zdrojů.....</b>	<b>51</b>
<b>10</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>52</b>

# 1 Úvod

Půdní prostředí má obrovský význam pro udržitelnost lidstva. Poskytuje velké množství potřeb a služeb ekosystému, ve kterém člověk žije. Ty se odrážejí na čistotě vzduchu, vody, ale i na produkci potravin. Proto by měla být starost o toto prostředí větší. Neudržitelné metody člověka způsobují v prostředí degradaci a znehodnocování půd spolu s jejich obvyklým poškozením, zatímco ty udržitelné metody, které v současnosti nejsou tolik využívány mohou zachovat nebo i zlepšovat půdní systémy.

V dnešní době se čím dál více využívá značné množství druhů ochranných látek pro rostliny neboli pesticidů. Pro tuto činnost zabezpečují důležité fungicidy především ochranu zemědělských plodin před onemocněními houbovitého původu.

I přesto, že výroba těchto ochranných látek pokročila, tak stále neúmyslně člověkem indukované kontaminace jak půdního prostředí, tak i povrchových a podzemních vod pesticidy jsou mnohem více pozorovány. Již delší dobu, a především v současnosti je toto téma vlivu různých xenobiotik zkoumáno, protože velký podíl těchto sloučenin způsobuje škody jak v životním prostředí, tak i újmy na lidském zdraví. Často jejich aplikace do prostředí mohou mít negativní vliv, a to i právě na aktivitu mikroorganismů a jejich enzymů v půdě, která těmito aplikacemi může být narušena.

Enzymatická aktivita je v přírodním prostředí řízena jak faktory abiotickými (pH, vodní potenciál, teplota), tak biotickými (tvorba enzymů a vylučování). Tyto negativní změny způsobené fungicidy mohou mít vážné důsledky na funkce ekosystému jako je rozklad, koloběh živin nebo vzájemné reakce mezi rostlinami a mikroorganismy.

Z těchto důvodů a negativních vlivů fungicidních látek na prostředí a zejména mikroedafon v půdě byla vypracována tato diplomová práce, která má za úkol zhodnotit jeden z mnoha fungicidů spolu s jeho vlivy na významnou činnost půdních mikroorganismů.



## 2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je určit vztah mezi množstvím penkonazolu a jeho účinkem na enzymatickou aktivitu půdy. Dále je důležité zhodnotit vliv odlišných půdních vlastností na změny enzymatické aktivity způsobené přítomností penkonazolu. Jako další cíl je určení vlivu délky inkubace na změny enzymatické aktivity půd

### **Hypotézy**

**Pro potřeby práce byly vytvořeny 3 základní hypotézy:**

Hypotéza č. 1: Zvyšující se množství fungicidní látky v půdě negativně ovlivní enzymatickou aktivitu půdy.

Hypotéza č. 2: Vliv fungicidu na enzymatickou aktivitu se bude mezi různými půdami lišit.

Hypotéza č. 3: Enzymatická aktivita půdy se bude měnit v čase, s ohledem na degradaci fungicidu

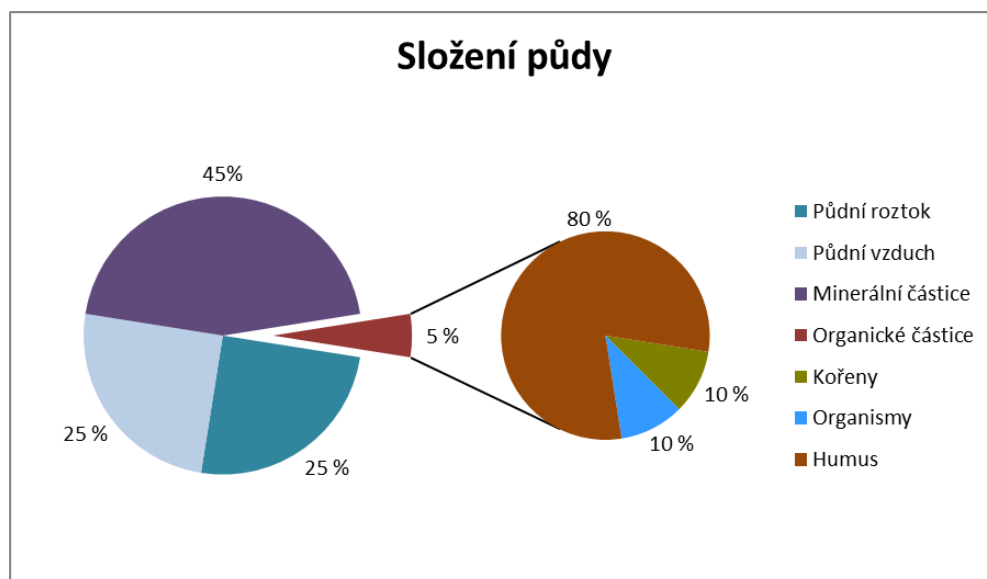
## 3 Literární rešerše

### 3.1 Půda

Půdou označujeme přírodou utvářené prostředí působením pedogeneze. Procesy pedogeneze jako je zvětrávání, transformace či vznik nebo přenos látek mohou být ovlivňovány faktory, které můžeme dělit na biotické a abiotické. Mezi ně patří např. antropogenní činnost nebo působení organismů, matečná hornina, terén, podmínky podnebí či podzemní depozice vody (Kutílek 1978). Půda je jedním z nejvíce různorodých prostředí na Zemi a obsahuje rozmanitý soubor živých organismů. Netransparentnost tohoto světa však velice omezila naše chápání přínosu jejich funkcí pro půdní procesy a odolnost celého ekosystému (Briones 2014).

#### 3.1.1 Složení a struktura půdy

Půdu můžeme považovat za prostředí více složek společně utvářející otevřený biochemický systém, ve kterém probíhá uvnitř i na povrchu řada fyzikálně-chemických a biologických procesů (Prado & Airoldi 2002). Půdy se skládají ze složky pevné, půdního vzduchu a půdního roztoku (Šimek 2003). V tomto systému mohou být vyměňovány jak hmota, tak i energie s okolním prostředím (Prado & Airoldi 2002). Typ, množství nebo kvalita půdních složek záleží na daných podmínkách prostředí, které určují jednotlivé půdní vlastnosti a funkce (Pereira et al. 2017).

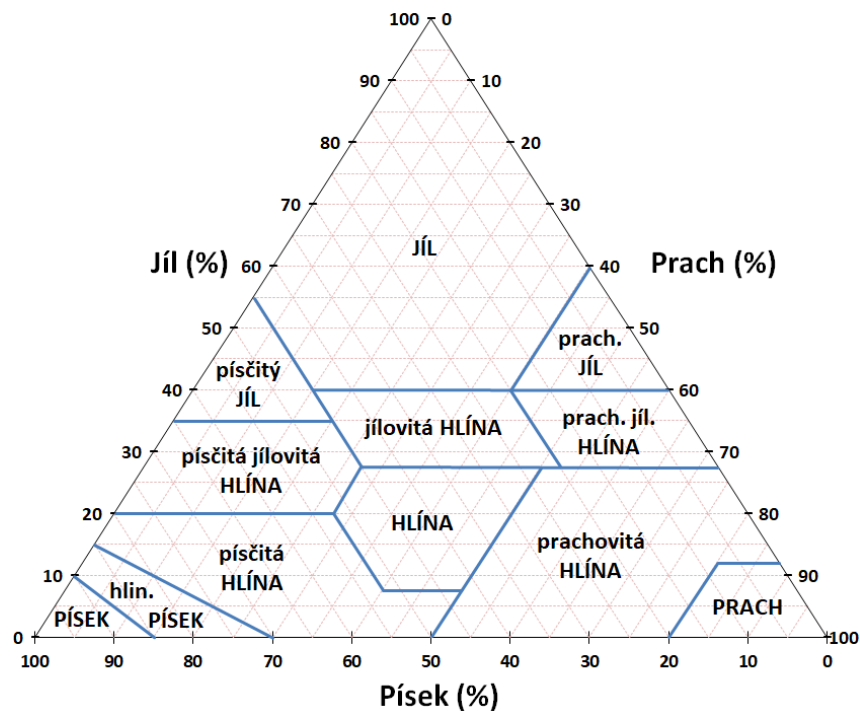


Obrázek 1: Přibližné procentuální zastoupení jednotlivých složek půdy (upraveno dle Vrtíšková, 2013)

Anorganická frakce pevné složky půd je tvořena primárními a sekundárními minerály různého složení a je především ovlivněna složením matečné horniny, ze které vzniká. Jako primární minerály označujeme částice hrubší (nad 0,002 mm) a za sekundární považujeme minerály jílové (částice menší než 0,002 mm). Různý podíl těchto částic v půdě ovlivňuje např. její pórovitost, provzdušnění nebo i míru navázání vody, živin či organické hmoty. Podle zrnitosti, tedy jednotlivých podílů velikostně odlišných částic se určuje textura půdy a následně je půda zařazena do jednoho z druhů půd. Částice o velikosti 2 mm rozdělují půdu na skelet, tedy frakci větší než 2 mm a jemnozem o velikosti zrn menší než 2 mm (Šimek 2003).

Půdní strukturou rozumíme uspořádání jednotlivých částic navzájem v prostoru. Ve většině případů se nachází půdní částice ve formě agregátů, tj. menších či větších shluků. Ty lze dělit podle velikosti na makroagregáty či mikroagregáty (Šálek 1986). Mezi půdy, které agregáty nevytváří, řadíme např. kamenné a písčité suti nebo půdy sypké (Kutílek 1978). Pro vlastní stanovení se ze separované jemnozeme určí procentuální podíl částic písku, prachu i jílu. Nakonec se vybere metoda pro určení půdního druhu. Pro samotné zařazení půdního druhu se u nás v České republice nejvíce využívají 2 metody, a to texturního trojúhelníku nebo podle Nováka (Němeček a kol. 2001).

Klasifikace půd v ČR používá často převzatý systém od Ministerstva zemědělství USA (USDA). Při použití trojúhelníkového diagramu (texturního trojúhelníku) je stanovení půdního druhu sice složitější, ale zato přesnější. Tato metoda je využívána po celém světě a stanovení zahrnuje frakce písku, prachu či jílu udávaných ve hmotnostních procentech, díky čemuž lze odlišit 12 hlavních druhů půd (Kameníčková 2013).



Obrázek 2: Trojúhelníkový diagram zrnitosti (převzato dle USDA, upravil Marek Rusek)

Oproti diagramu využívá stanovení druhu půd dle Nováka pouze tzv. jemné částice (menší než 0,01 mm) ve vzorku jemnozeme a celkově je toto určování mnohem jednodušší. Novák také vytvořil stupnici hodnocení půd dle procentuálního zastoupení jílu, avšak podle současné klasifikace je nutný přepočít. Do kategorií zrnitosti uvedené v Tabulce 1 lze zařadit jen ty půdy, které mají obsah skeletu menší než 50 % (Kameníčková 2013).

Tabulka 1: Stanovení půdního druhu dle Nováka (upraveno dle Němeček a kol. 2001)

Obsah částic < 0,01mm	půdní druh	Označení půdy
< 10 %	Písčité	lehké půdy
10 - 20 %	Hlinitopísčité	
20 - 30 %	Písčitohlinitá	středně těžké půdy
30 - 45 %	Hlinitá	
45 - 70 %	Jílovitohlinitá	těžké půdy
60 - 75%	Jílovité	
> 75 %	Jíl	

Půdní roztok a vzduch tvoří asi 50 % celkového objemu půdy. Společně vyplňují prostory mezi částicemi minerálními a organickými. Půdní vodu nebo lépe roztok můžeme rozlišit podle jejího výskytu a přístupu pro rostliny. Množství roztoku je spojeno především s půdními póry a přístupnost s jejich druhem. Ten prostor, který není vyplněn vodou, je tedy zaplněn vzduchem. Za normálních podmínek je půdní vzduch složen téměř ze stejných složek jako ten atmosférický. Procesy jako je např. dýchání organismů, při kterém se zvyšuje v prostředí oxid uhličitý, mohou upravovat složení půdních plynů. Bez přístupu vzduchu, kdy jsou v půdě vyšší koncentrace oxidu uhličitého či metanu se může obsah dusíku snížit. V důsledku toho se mohou objevit většinou další plyny jako např. sirovodík, oxidy dusíku a síry (Šimek 2003). Půdy živí obrovské množství různorodých mikrobů, avšak velký podíl z nich stále zůstává neobjeven (Torsvik & Øvreås 2002).

### **3.1.2 Půdní organická hmota**

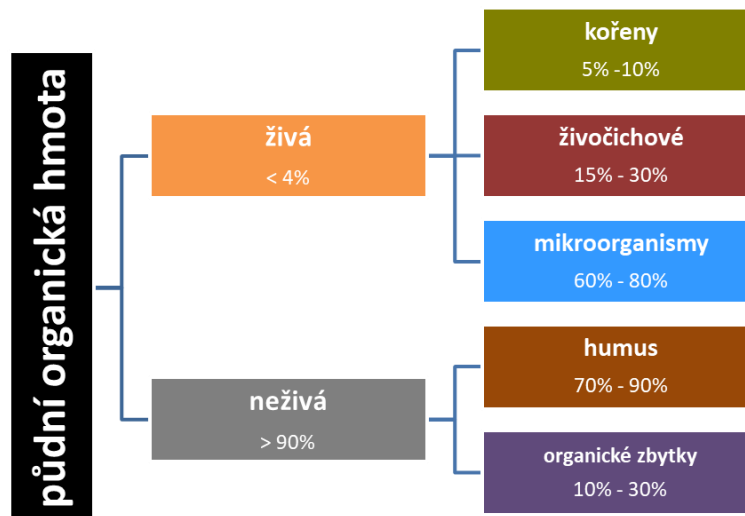
Existuje silná korelace mezi půdní strukturou a uhlíkem, stejně jako mikrobiální aktivitou a uhlíkem. To dokazuje obousměrnou funkci uhlíku regulovaného hospodařením v prostředí. Dobrá struktura půdy podporuje rozklad primární organické hmoty zejména díky optimálním fyzikálním podmínkám, které poskytují zdroj živin půdním mikrobům. Naopak půdní procesy dominované mikrobiální aktivitou jsou výhodné pro utváření půdní struktury (Cui & Holden 2015). Podobně uvádí Lo (2010), že je úrodnost půdy závislá nejen na textuře, ale i na vnitřní biologické aktivitě.

Nízká kvalita půdního organického uhlíku omezuje množství energie přístupné pro půdní mikroorganismy (Fontaine et al. 2003). Organická hmota je přítomna ve všech půdách, avšak její podoba a rozmístění záleží na množství půdních procesů, které se mohou stávat nezávisle či v souladu s ostatními složkami. Většina z těchto procesů souvisí s výchozím rozkladem zbytků rostlin půdními organismy, jejich následným přenosem a kumulací. A protože je půdní organická hmota nejdynamičtější z půdních složek, účinky změn v půdním prostředí jsou často zaznamenatelné kvalitou a rozdělením organické hmoty (Kilmer & Hanson 2018). Výměna živin, energie a uhlíku mezi půdní organickou hmotou, půdním prostředím, vodními systémy a atmosférou je velmi důležitá pro zemědělskou produkci, kvalitu vody i klima. Podle přetrvávající teorie je půdní organická hmota složena ze stabilních

a chemicky jedinečných sloučenin, avšak podle Lehmann & Kleber (2015) je tato hmota spíše složena ze stále se rozkládajících organických sloučenin.



Obrázek 3: Zdroje půdní organické hmoty (převzato a upraveno dle AVČR 2015)



Obrázek 4: Složení organické hmoty v půdě (převzato a upraveno dle AVČR 2015)

Rozklad půdní organické hmoty velmi záleží na přítomnosti různých druhů mikroorganismů a také na jejich enzymatické činnosti (Loeppmann et al. 2016). Rychlý nárůst specializovaných mikroorganismů, které rozkládají pouze primární organickou hmotu lze vyvolat přidáním čerstvé hmoty do půdy. Při tom se uplatňuje tzv. „priming effect“. Předpokládá se, že tento jev vzniká kompeticí o energii a živiny mezi mikroorganismy

specializujícími se na rozklad čerstvé organické hmoty a těmi, kteří se živí vysokomolekulární půdní organickou hmotou (Fontaine et al. 2003). Takové hospodaření zvyšující podíl půdní organické hmoty je prospěšné pro zlepšení struktury půdy a zvýšení enzymatické aktivity (Cui & Holden 2015).

### 3.1.3 Edafon

Terestriční ekologové a pedobiologové tradičně vystihují obyvatele půdy jako skupinu označovanou „půdní fauna“. Často také usuzují, že zdejší skupiny pouze rozkládají a recyklují dostupnou odumřelou rostlinnou hmotu (Briones 2014). Pojem edafon však zahrnuje veškerou floru (fytoedafon) i všechnu faunu (zooedafon) dosahující dle rozdělení velikostí od tzv. mikroedafonu (protista, vířníci), přes mezoedafon (hádátka a malí členovci), až po makroedafon (velcí členovci, mravenci či žížaly). Úlohy zooedafonu v ekosystémech jsou obecně hodnoceny podle jejich reakcí na změny globálního prostředí (Savin 2014).

#### 3.1.3.1 Mikroedafon

Půdní mikroorganismy jako např. bakterie a houby jsou nezbytnou součástí živé půdy a mají nemalý význam pro úrodnost půdy, podporu rostlin a zdraví celého systému. Z tohoto důvodu je možné jejich využití jako specifických indikátorů tohoto ekosystému (Nielsen & Winding 2002; Kirk et al. 2004). Mnoho mikrobů žije mimo půdu i na plodinách, kde mají velmi různorodé funkce. Mezi ně patří rozdíly metabolických drah či různé vztahy s rostlinou a prostředím, kde působí. Rovnováha mikrobiálního společenstva, stejně jako mikrobů a samotné plodiny se může projevovat jako ochrana proti onemocnění nebo jako podpora růstu rostliny (Shen 1997). Půdy jako živé prostředí jsou velmi citlivé na jakékoli antropogenní zásahy. Aplikace hnojiv, způsoby sklizně plodin nebo metody obdělávání jak samostatně, tak kombinovaně mají různé vlivy na činnost i počet zastoupených druhů půdních mikroorganismů (Habig & Swanepoel 2015). Jedná se o komplexní a dynamický systém, ve kterém je i v současnosti složité určování složení mikrobiálních společenstev. Zejména proto, že jednotlivé procesy nebo enzymatické látky neumožňují přesné identifikace mikrobů přímo zapojených v námi měřených a hodnocených procesech (Nannipieri et al. 2003). Tyto mikroorganismy přímo či nepřímo ovlivňují procesy probíhající v půdě a terestrických ekosystémech (Fierer 2017).

Půdní mikrobiální společenstva vykonávají v procesech ekosystému důležité funkce, které mohou být využity pro zhodnocení dopadu zemědělských praktik na udržitelnou produkci úrody (Habig & Swanepoel 2015). Úpravy mikrobiální aktivity u půd ošetřovaných prostředky na ochranu plodin mohou následně pozměňovat půdní úrodnost a ovlivňovat růst či vývoj rostlin (Cycoń & Piotrowska-seget 2007). Zejména teplota může hrát významnou roli při úpravě rozkladu půdní organické hmoty kvůli rozdílům v relativní citlivosti mikrobiálních činností na teplo. Výzkum citlivosti mikrobiální aktivity na teplo a obratu živin v půdě nám poté může pomoci pochopit eventuální následky globálního oteplování (Koch et al. 2007).

Bakterie a houby se setkávají s organickou hmotou v půdě, která je pro ně potenciálním zdrojem energie, uhlíku i živin důležitých pro údržbu či růst buněk (Burns et al. 2010). Interpretace procesů půdních mikroorganismů je však složitá kvůli své jak regionální, tak sezónní různorodosti a nedostatku získávaných reprezentativních hodnot. Jednou z možností, jak tato omezení překonat je pracovat s principem teorie neurčitých souborů, která vnímá přírodní systémy mnohem více realisticky a počítá s přírodní nejasností a složitostí (Tscherko et al. 2007). Kopriva et al. (2017) poukazují na dlouho známé vlastnosti mikroorganismů jako např. mykorrhizních hub či symbiotických bakterií, které zlepšují dostupnost minerálních živin a mají vliv na výkon rostlin. Nicméně je teprve zkoumáno mnoho dalších mikroorganismů spojovaných s rostlinami a jejich potenciál nahrazovat námi syntetizované zemědělské látky. Velká část půdních mikroorganismů zatím však nebyla objevena a izolována. Jejich funkce nám prozatím nejsou známy, ačkoli již víme, že půdní mikroorganismy provádí velice důležité procesy jako je podpora růstu rostlin nebo koloběhu uhlíku a ostatních živin (Jansson & Hofmockel 2018).

### 3.1.3.2 Rhizosféra

Rhizosférou je označován v půdě kořenům blízký prostor, kde mikroorganismy získávají uhlík hlavně z rostlinných exudátů. Reprezentuje místo intenzivní kompetice půdních mikroorganismů a reaktivních částic na povrchu právě o dostupný uhlík a živiny. Tato kompetice v půdě může snižovat množství dostupného uhlíku až na hodnoty limitující mikrobiální růst nebo rozklad půdní organické hmoty (Merino et al. 2015). Mnozí půdní činitelé napříč zoedafonem jsou známí svým zvyšováním přístupnosti živin a produktivity u rostlin. Za nejvíce ovlivňující se však mohou považovat organismy zahrnující mikrobiální



společenstva rhizosféry (Chaparro et al. 2012). Rhizosféra je pro mikroorganismy velmi významným místem především kvůli vstupu látek vedoucím k vysoké hojnosti, specifické rozmanitosti či různorodosti funkcí vykonávaných mikrobiálními společenstvy (Loeppmann et al. 2016). Změnami ve složení mikrobiální biomasy a rozmanitosti jejich funkcí mohou být ovlivněny kořeny až v několik milimetrové vzdálenosti do půdy (Kandeler et al. 2002).

Rostliny mohou ve svých kořenech tvořit mnohé sloučeniny, které odpuzují nebo zamezují vniknutí patogenů či jinak ohrožujících činitelů. Některé jejich vytvářené metabolity jsou využívány jako zdroje uhlíku prospěšnými půdními organismy. Ty mohou pomáhat rostlině ať přímo při omezování onemocnění produkcí antimikrobiálních látek, nebo i nepřímo vyvoláním odolnosti rostliny. Proto složení jejich kořenových exudátů odráží jak chování koexistenčně lákavé, tak i negativní pro půdní mikroorganismy. Kořenné exudáty mohou mít také dopad na koloběhy uhlíku i dusíku, kvůli čemuž mohou někdy ovlivňovat až inhibovat proces nitrifikace specifických mikroorganismů (Badri & Vivanco 2009). Podobně popisuje Raaijmakers et al. (2009) rostlinou vypouštěné exudáty jako hlavní zdroj živin pro mikroorganismy a hnací sílu pro zvyšování jejich hustoty populace nebo činností.

#### **3.1.4 Metody monitoringu**

Půdní mikroflóra je první biotou, která podstupuje přímé i nepřímé toxické účinky sloučenin vstupujících do půdy. Díky svým rychlým reakcím na kontaminace, svou všudypřítomností, velikostí a přeměnou prvků je vhodná jako ukazatel negativních účinků cizích látek vstupujících do půdy. Proto je běžně využívána v ekotoxikologických testech hodnocení vlivu xenobiotik na základní biologické procesy v půdě (Cycoń & Piotrowska-seget 2007). Taxonomické dělení založené na tradičním určování morfologie a anatomie se pomalu nahrazuje rychlou identifikací dostupnými molekulárními technikami (Briones 2014). Pro monitoring a následnou úspěšnou obnovu znečištěných prostředí je důležitým ukazatelem přítomnost tzv. indikátorů kvality půdy, které nám dávají významné poznatky o průběhu žádoucích procesů v půdě (Muñoz-Rojas 2018). Tradiční metody analýz jsou stále výhodné, avšak s použitím modernějších molekulárních metod je možné určit jak kultivovatelné, tak i nekultivovatelné druhy mikroorganismů. Obecně není při studiu geneticky upravených bakterií přímo popisován problém s mikrobiální rozmanitostí, ale většinou se vědci zaměřují na jejich setrvání v prostředí, schopnost rozšíření v rhizosféře nebo samotné přežití (Lynch et al. 2004).

Podle Cui & Holden (2015) je většina výzkumů půdní struktury a mikrobiálních činností založena na laboratorních měřeních půdních vlastností, které však o opravdových podmínkách svědčí nepřímo, a velmi málo výzkumů využívá data získaná přímo z terénu. Většina využívaných metod se zabývá odhadováním celkové mikrobiální biomasy a různých procesů (např. hodnocením respirace) nebo určitých enzymatických aktivit (ureázy, proteázy apod.). Avšak aktivní podíl mikroorganismů, který řídí většinu procesů, tím ztrácí na svém hodnocení (Nannipieri et al. 2003; Blagodatskaya & Kuzyakov 2013). Karolina et al. (2017) ve své práci charakterizují porovnáváním mikrobiologie substrátů a indexů diverzity odlišnosti složení a aktivitu společenstev. Díky tomu uvádí závislost na rozdílných technikách kultivace a období odběrů jako dva významné faktory.

Podle potřeby předchozí inkubace můžeme rozlišit metody monitoringu mikroorganismů na kultivačně závislé nebo naopak nezávislé na kultivaci. Velký povrch bakterií vůči prostředí, které je obklopuje, nám poskytuje potenciální citlivé indikátory ovlivnění půdy pesticidními látkami nebo xenobiotiky. Monitoring mikrobiálních společenstev a jejich složení či inhibici lze provádět způsobem *in situ*, tedy přímo na místě nebo odběrem vzorků a vytvořením potřebných podmínek v laboratoři (*ex situ*) (Kirk et al. 2004; Liu et al. 2006). Významné množství neobvyklých metod, které jsou založeny na genetických analýzách rRNA či rDNA objevilo část z přítomných půdních společenstev (Torsvik & Øvreås 2002).

Tabulka 2: Fyzikální metody měření kontaminovaných půd (upraveno dle Imfeld & Vuilleumier 2012)

Bioindikátor	Popis metody
<b>Mikrobiální biomasa</b>	Měření nárůstu biomasy mikrobiálních společenstev
<b>Mikrokalorimetrie</b>	Měření metabolické aktivity půdních bakterií a hub
<b>Respirace vyvolaná substrátem (SIR)</b>	Odhad přínosu bakterií k celkové mikrobiální respiraci měřením vylučovaného oxidu uhličitého -> Nárůst respirace po přidavku substrátu představuje celkový přínos jak rostoucích, tak nerostoucích mikroorganismů

<b>Půdní enzymatická aktivita</b>	Měření přínosu enzymatické aktivity mrtvých či nerostoucích organismů k celkové aktivitě v půdě
-----------------------------------	---

Tabulka 3: Metody identifikace mikroorganismů v kontaminovaných půdách (upraveno dle Imfeld & Vuilleumier 2012)

<b>Bioindikátor</b>	<b>Popis metody</b>
<b>Biologické profilování společenstev: CLPP (fyziologické profilování společenstev) nebo CLCPs (profilování dle katabolické aktivity společenstev)</b>	Hodnocení aktuálního stavu struktury společenstev mikroorganismů pomocí jejich fyziologické identifikace Použití na pH závislých zbarvení tetrazoliovými solemi, které sdělují redoxní status buněk, pro zjištění metabolických aktivit mikrobů
<b>Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR)</b>	Metoda rychlého zmnožení úseku DNA principem replikace DNA či RNA
<b>Analýzy lipidů: FAME (Methyl estery mastných kyselin) či PLFA (analýza Fosfolipidových derivátů mastných kyselin)</b>	Analýzy závislé na kultivaci pro náhled a zjištění struktury mikrobiálních společenstev, stavu živin či odpovědí na fyziologický stres ovlivňující složení společenstva

### 3.1.5 Půdní enzymy

Enzymy jsou makromolekulární bílkoviny, které katalyzují důležité přeměny či chemické reakce související s rozkladem i koloběhem živin a mají zároveň jedinečné vlastnosti odlišující je od ostatních katalyzátorů. Těmi jsou především jejich vysoká efektivita související zároveň s určitou specificitou reakcí, možná úprava enzymu pro kontrolu koncentrací a toku metabolitů nebo jejich působení za normálních fyziologických podmínek jako je teplota i tlak (Dick 2011; Kotroczo et al. 2014). Enzymy reprezentují nejkompexnější a největší skupinu bílkovin. Mají zásadní roli ve všech procesech života včetně metabolismu, tvorbě genů, dělení buněk, imunitního systému a dalších (Schomburg et al. 2017).

Obecně názvy jednotlivých enzymů vznikají přidáním koncovky „-asa“ a v českém jazyce „-áza“ k vlastnímu názvu substrátu, u kterého katalyzují transformaci. Komise mezinárodní unie biochemie a molekulární biologie (IUBMB) zavedla názvosloví a klasifikaci

enzymů již v roce 1961. Jednotlivé enzymy jsou značeny čtyřmístnými kódy. Název se skládá ze zkratky „EC“, což označuje pojem „Enzyme Commission“ a čtyř čísel. Každé čtyřčíslí (např. 3.2.1.4 – celulóza) značí jednu ze sedmi tříd, skupinu chemické vazby, na kterou působí, dále podskupinu, a nakonec pořadové číslo v této podskupině.

Celkem rozlišujeme již 7 tříd enzymů podle typu reakcí, které katalyzují:

1. **oxidoreduktázy**: katalyzují oxidačně-redukční děje
2. **transferázy**: katalyzují přenos funkčních skupin
3. **hydrolázy**: katalyzují hydrolytické štěpení substrátů
4. **lyázy**: katalyzují štěpení vazeb C-C a C-N bez vstupu vody
5. **izomerázy**: katalyzují přeskupení izomerů uvnitř molekul
6. **ligázy** (synthetázy): spojují dvě molekuly kovalentní vazbou za štěpení ATP
7. **translokázy**: katalyzují pohyb atomů a molekul skrz membrány nebo jejich separaci

(Brenda 2019; Jeske et al. 2019)

Podle složení můžeme enzymy dělit na jednoduché či složené. Jednoduché enzymy jsou tvořeny pouze bílkovinou, která nese specifitu substrátu. Častěji jsou v organismech přítomny enzymy složené, tvořené částí bílkovinnou (apoenzym), která specifikuje, jaká látka se bude přeměňovat, a složkou nebílkovinnou (kofaktor), která určuje typ probíhající reakce. Dohromady tyto části tvoří takzvaný holoenzym (Vodrážka 1992).

Funkce enzymů jsou často spojovány s většinou nemocí, ale i s regulací stresu, což z nich dělá zajímavé cíle pro výzkum a využití v biotechnologiích, léčbě onemocnění či vhodné pro diagnostické účely (Schomburg et al. 2017). Půdní enzymy bývají považovány za užitečné indikátory kvality kvůli svému vztahu k půdní organické části, citlivosti a jednoduchosti měření. Někdy jsou popisovány jako biologické pozůstatky původních způsobů hospodaření související s obděláváním půdy a její strukturou (Utobo & Tewari 2015). Znalosti půdní enzymologie a jejich aktivity v půdách mohou být využity pro bioindikaci zdraví půdy, lidských snah o změny ekosystémů, zemědělské praktiky a znečištění nepůvodními látkami (Kotroczo et al. 2014; Utobo & Tewari 2015).

Látky s enzymatickou aktivitou můžeme nalézt ve všech živých systémech, tedy u rostlin, živočichů a u většiny mikroorganismů. Podle místa, kde enzymy působí, je lze dělit na intracelulární a extracelulární. Intracelulární zůstávají uvnitř buňky, kde vznikly a zde provádí své specifické funkce. Extracelulární jsou vylučovány z buněk, které je vytvořily a lze je tedy pozorovat ve vnějším prostředí (Vodrážka 1992). Extracelulární enzymy jsou nejčastějšími činiteli při rozkladu organické hmoty. Z tohoto důvodu může být měření těchto enzymatických aktivit využito k určování živin, které pro tento rozklad mikroorganismy potřebují (Sinsabaugh et al. 2008). V pokusu Kotroczo et al. (2014) uvádí, že aktivitu enzymů velmi snížilo odstranění kořenů a tedy narušení rhizosféry.

Sinsabaugh et al. (2008) uvádí, že je potenciál enzymatického rozkladu labilních složek půdních organických látek vázán na dostupnost substrátu, pH půdy a potřebu živin mikroorganismů. Aktivity enzymů jsou citlivým indikátorem úrodnosti, metabolických procesů nebo koloběhů hmoty. Stejně tak mohou detekovat přítomné kontaminace půdního prostředí (Bennicelli et al. 2009).

Zkoušky půdní enzymatické aktivity jsou jednou z možností, jak měřit stav půdního ekosystému. Tyto metody bývají celkem jednoduché a poskytují nám reprodukovatelné výsledky. Nejsou však vhodné pro poskytnutí obecně akceptovatelných výsledků, ale dávají nám alespoň některé informace o stavu půdního prostředí. V současnosti mají praktický význam především pro hodnocení vlivu těžkých kovů, agrochemikálií, průmyslových znečištění nebo půdní úrodnosti (Utobo & Tewari 2015). Často je využíváno mnoha nedokonalých metod nebo je enzymatická aktivita špatně vyhodnocena. Nejdůležitější chybou je však nedostatečné využití dřívějších poznatků a ignorace přesných protokolů. To může mít za následek nadbytečnost upravených metod a může to od základu měnit pochopení půdní mikrobiologie i biochemie (Nannipieri et al. 2018). Významný vliv na půdní enzymatické reakce mají pesticidní látky obecně. Tyto reakce jsou nezbytné především pro vhodné ovlivňování jakosti půdy. Zejména aktivita těchto enzymů reguluje koloběhy živin a půdu zúrodňuje (Riah et al. 2014).

### 3.1.5.1 Aktivita dehydrogenázy

Dehydrogenázy jsou intracelulárními enzymy patřícími do skupiny oxido-reduktáz, které jak už název naznačuje katalyzují oxidačně-redukční reakce (Bennicelli et al. 2009). Půdní dehydrogenázy jsou jedny z hlavních složek aktivních enzymů zabezpečujících správný sled všech biochemických cest v půdních cyklech. Rozmanitost biotických a abiotických faktorů jako je čas inkubace, teplota, provzdušnění nebo vlhkost má na aktivitu dehydrogenázy v půdě významný vliv (Kumar et al. 2013). Jako enzymy přítomné ve všech mikroorganismech jsou obvykle využívány pro měření celkové mikrobiální aktivity v půdách (Lo 2010). Často jsou používány také pro měření některých narušení způsobených pesticidy, stopovými prvky nebo nesprávnými půdními praktikami. Nejnižší hodnoty enzymatické aktivity jsou pozorovány spíše ze znečištěných území než obnovených či nenarušených stanovišť. Dehydrogenázová aktivita může být považována za dobrý ukazatel oxidace v půdním prostředí. Aktivita těchto enzymů je měřena pomocí dvou metod využívajících rozdílný substrát (Kumar et al. 2013). Obvykle je měřena jako množství umělého akceptoru elektronů, tedy např. rozpustné tetrazoliové soli s červenou barevnou formou (formazan), která je redukována mikrobiální aktivitou v půdě a lze ji následně extrahováním ve vhodném rozpouštědle určit kolorimetricky (Camiña et al. 1998).

### 3.1.5.2 Aktivita ureázy

Ureáza, která patří mezi enzymy amidohydrolázy, katalyzuje hydrolýzu močoviny na oxid uhličitý a amoniak, který následně vytékává (Kandeler et al. 2013). V půdě má především mikrobiální původ a její aktivita především závisí na jejím celkovém množství. Porovnávání hodnot měřené ureázy je složité kvůli častým modifikacím jednotlivých stanovení. Proto jsou těžko hodnotitelné faktory ovlivňující její aktivitu a zároveň korelace s půdními vlastnostmi. V organo-minerálních komplexech nalézajících se v půdě je tento enzym mimořádně stabilní. Problémy spojené s vysokou aktivitou ureázy jsou např. únik plynného dusíku, poškození rostlin vlivem amoniaku nebo nahromaděných dusitanů (Thenabadu 1996). Spolu s potenciální nitrifikací jsou zahrnuty v metabolismu dusíku a obvykle využívány pro hodnocení toxicity pesticidů a ostatních v zemědělství používaných chemikálií (Lo 2010). Ureázy u rostlin jsou již déle známy pro svoji ureolytickou činnost. Jsou potenciálně toxické pro hmyz, který není ovlivněn Bt toxiny, a jsou také fungitoxické. Jak rostlinné, tak i mikrobiální ureázy způsobují sekreci v živočišných buňkách, čímž mohou

chránit před patogeny (Carlini & Polacco 2008). Mimořádný zájem je obzvláště o nalezení některého inhibitoru ureázy, který by omezil ztráty vytékavajícího amoniaku z půd (Utobo & Tewari 2015). Podle Margesin et al. (2000) je aktivita ureázy jednou z vhodných metod jak sledovat biodegradaci xenobiotik a různých dalších sloučenin v půdách.

### **3.2 Fungicidy**

Fungicidy jsou přípravky používané zejména k potlačení hub parazitujících na rostlinách, kde způsobují velké škody. Tyto nižší organismy rostlinné říše nejsou fotosynteticky aktivní, a proto pro své přežití a vývoj získávají živiny z organických materiálů či živých rostlin. Tímto způsobem působí již zmíněné škody na dřevinách, ovoci a zelenině nebo na jiných plodinách. Celkové využití pesticidů v zemědělství se velmi zvýšilo během posledních 40 let (Riah et al. 2014). Fungicidy, jako součást skupiny pesticidních látek, byly centrem sporů po dlouhou dobu a jsou stále spojovány s nebezpečím pro půdní prostředí nebo zdraví lidí a živočichů (Cycoń & Piotrowska-seget 2007). Používání fungicidů při ochraně plodin stále efektivně odstraňuje houbové patogeny rostlin. Avšak fungicidy se mohou rozšířit do různých složek prostředí a způsobovat zde nezvratné změny jako např. eutrofizaci povrchových zdrojů vody, ovlivňovat půdní reakce či mikrobiální společenstva (Baćmaga et al. 2015).

Podle působení na cílový organismus rozlišujeme fungicidy kontaktní a systémové. U kontaktních typů se nedostává účinná látka až do tkáně rostlin, ale setrvává na povrchu rostliny. Nevýhodou těchto fungicidů je především, že nechrání po aplikaci nové přírůstky a jejich účinek závisí na vlivech počasí (slunečním záření, větru či dešti). Výhodou je naopak třeba kratší doba ochrany a rychlejší degradace. Účinná látka u systémových fungicidů oproti kontaktním prostupuje až do pletiv rostliny a šíří se většinou od kořenů až k vrcholům. Výhodou je tedy komfortnější aplikace díky vlastnostem a bezpečnější ochrana i nových přírůstků. Nevýhodou může být možný fytotoxický vliv na rostliny nebo pravděpodobnější vznik rezistence (Cremllyn 1989).

Za rok 2017 bylo spotřebováno v České republice celkem 3 896 299 kg (l) mořidel a fungicidních prostředků na ochranu rostlin (EAGRI 2018).

### 3.2.1 Využití a účinnost

Během aplikace fungicidu jsou cílem především nadzemní části rostlin. Při postřiku je však fungicid nejprve zachycen a absorbován na listech či plodech. Tím je vystaven různým přírodním vlivům jako je např. sluneční světlo či vítr, což může snižovat efektivitu a fungicid degradovat (Schwack & Hartmann 1994). Mnohonásobné aplikace nejen tzv. azolových fungicidů společenstva hub modifikují a jako odpověď na snižující se citlivost vůči DMI sloučeniny je nutné používat stále novější přípravky (Holb & Schnabel 2007).

### 3.2.2 Chování v půdě, degradace a persistence

Nadměrné používání průmyslově vyráběných pesticidů v zemědělství má za následek kontaminaci půdních ekosystémů (Imfeld & Vuilleumier 2012) a zvyšující se kontaminace vodních zdrojů (Howard 2017). Mnoho autorů poukazuje na přítomnost používaných zemědělských pesticidů ve vodních zdrojích. Především kvůli zdrojům difúzní či bodové kontaminace, kde především ty bodové mají největší vliv na kvalitu povodí daných oblastí (Jacobsen et al. 1999). Využívané pesticidy mohou negativně ovlivňovat půdní prostředí a nesčetné množství procesů, za které jsou odpovědna půdní mikrobiální společenstva (Cycoń & Piotrowska-seget 2007). Rezidua fungicidů mohou způsobovat vážné problémy v půdním prostředí jako např. snižovat biochemickou či mikrobiální aktivitu vedoucí ke snížení úrodnosti. Půdy kontaminované fungicidy by měly být tedy remediovány pro udržení svých optimálních funkcí (Baćmaga et al. 2018). Podle Karas et al. (2018) je toxicita pesticidních látek na půdní mikroorganismy až dosti znepokojující.

Obecně intenzivní používání pesticidů např. na vinicích v současnosti způsobuje obavy veřejnosti, kvůli následně přítomným reziduíům ve vodě či vinařské produkci určené pro lidskou spotřebu. Vzhledem k environmentálním a toxikologickým rizikům spojeným se značným využíváním fungicidů by měl jejich výběr být prováděn opatrně podle fyzikálně-chemických vlastností půd nebo klimatických a hydrogeologických vlastností vinařské oblasti (Komárek et al. 2010).

Chování, mobilita či setrvání pesticidů v půdním prostředí je blízce propojeno s různými v půdě se vyskytujícími procesy jako je např. sorpce a desorpce, volatilizace, různé



typy degradace, absorpce rostlinami nebo i vyluhování (Komárek et al. 2010). Podle Singh & Dureja (2009) jsou pro správu reziduí pesticidů důležité půdní doplňky, které mohou svojí přítomností a vlastnostmi podpořit potřebný rozklad a snižování hodnot pesticidů.

Půdní organická hmota je považována za primárního adsorbenta neiontových pesticidů. Je nutné myslet především na stanovení koncentrací těchto pesticidů v půdním roztoku či určení jejich transportu médii. Obecně se předpokládá, že sorpční kapacita různých půd je stejná dle množství půdní organické hmoty, avšak reaktivita záleží na skladbě této hmoty a zároveň na pH média. Pro pH vyšší než 5 se rozdělení fungicidů mezi pevnou fázi a půdní roztok neměnilo se zvyšováním pH. U nižšího pH, než je hodnota 5, se zvyšovala adsorpce na pevnou fázi s tím, jak pH klesalo. Tento efekt souvisí pravděpodobně s množstvím skupin karboxylových kyselin v půdní organické hmotě (Gondar et al. 2013).

Neobvyklé, avšak dobře reprodukovatelné metody by mohly poskytovat hlubší hodnocení ekotoxicity těchto látek na půdní prostředí. Ze svých pokusů uvádí Karas et al. (2018) amoniak-oxidující mikroorganismy jako nejreaktivnější skupinu mikrobů na pesticidy a zároveň uvažují nad nimi jako možnými kandidáty k zahrnutí do posuzování rizik pesticidů.

Dnešní bioinženýrství nám nabízí dostatek řešení, která umožňují efektivní řízení biologických remediací včetně biostimulace a bioaugmentace. K tomu jsou využívány pro obohacení prostředí rozmanité sloučeniny přírodního původu, sorbenty, mikrobiologické a enzymatické preparáty nebo nanočástice. Využití genetických úprav pro získání mikroorganismů či rostlin schopných efektivního rozkladu znečištění může mít nebezpečné následky související se zavedením takovýchto rostlin nebo mikroorganismů do prostředí (Wołejko et al. 2016)

### **3.2.3 Triazolové fungicidy**

Triazoly jsou hojně využívány jako širokospektrální fungicidy, nesteroidové antiestrogeny a pro různá další průmyslová použití. Jádra triazolů jsou heterocyklická a obsahují tři atomy dusíku ve dvou izomeriích (1,2,3-triazol a 1,2,4-triazol)(Aromí et al. 2011). V přírodě se triazoly normálně nevyskytují, avšak jejich rezidua bývají často objevena kvůli jejich zanesení v přírodě, ale i organismu člověka, což se zvyšujícími se oznámeními o jejich

toxickém působení je prezentuje jako kontaminanty prostředí nebo potenciálně zdraví ohrožující látky (Lv et al. 2017). Podobně Husak et al. (2017) popisují jak často jsou tyto fungicidy nalézány ve vodním prostředí. Je toho však velmi málo, co víme o jejich akutní toxicitě nebo vlivu na ryby. I když jsou azolové fungicidy známé pro své systémové účinky na listech rostlin, není stále úplně jasné, zdali se stejně chovají i na jejich plodech (Schwack & Hartmann 1994). Například synteticky vyráběné fungicidy používané ve vinařství pochází z různých chemických tříd, a proto jejich adsorpce či přenos v prostředí hodně záleží na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech (Komárek et al. 2010). Pose-Juan et al. (2010) uvádí, že bylo přibližně 70 % z celkového množství penkonazolu zadrženo pevnou fází a sorbováno tedy na půdu, zatímco ostatních 30 % bylo zachyceno činnými přítomnými v používané komerční směsi.

Z pěti sledovaných triazolových fungicidů vykázaly všechny kromě propikonazolu vyšší rezidua, než je jejich povolený, limit pravděpodobně kvůli své vysoké stabilitě. Také bylo zjištěno, že rezidua některých fungicidů neklesala vůbec (Angioni et al. 2003). Podobně ve své práci Rodríguez-Cruz et al. (2008) uvádí vysokou sorpční nevratnost penkonazolu u všech jílovitých minerálů upravených kationtovými detergenty. Zkoušky na modelových systémech ukázaly, že byla fotodegradace sluncem jedním z hlavních mechanismů vedoucím k rozkladu a snižování množství triazolů (Angioni et al. 2003).

### 3.2.3.1 Vliv na mikrobiální činnost

Není jednoduché předurčit vztah mezi chemickou strukturou pesticidu a jejím účinkem na různorodé skupiny půdních mikroorganismů. Právě pochopení účinků na půdní mikroflóru a jejich prospěšné činnosti je však důležitou součástí hodnocení rizika pesticidu (Lo 2010). Jacobsen & Hjelmsø (2014) popisují změny i zlepšení možností hodnocení účinků pesticidů na jednotlivá mikrobiální společenstva a jejich aktivitu v půdě. Variabilita metod jak závislých, tak nezávislých na kultivaci může být použita k měření a interpretaci účinků na mikroorganismy po vystavení pesticidům (Imfeld & Vuilleumier 2012).

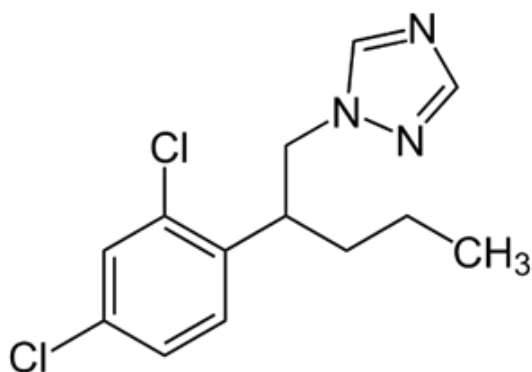
Při posuzování vlivu studovaných pesticidů na životní prostředí by se podle Sułowicz et al. (2016) měly brát v úvahu i historie aplikací pesticidů či zemědělský management území. Často bývá poukazováno na ovlivňování biomasy necílových mikroorganismů aplikacemi

fungicidních látek. Sem patří především změny jejich biochemických činností stejně jako jejich strukturální, funkční a genetické diverzity. Zjištění, že některé fungicidy mohou ovlivňovat strukturu půdních společenstev nasvědčuje podle Podio et al. (2008) právě tomu, že samotné použití selektivních technik, které měří složky půdních mikroorganismů jako biomasy nebo jejich celkovou aktivitu, může poskytovat pouze omezené představy o reakcích půdních společenstev na užití biocidů. Proto je potřeba přístupu z více úhlů v dalších studiích o reakcích těchto společenstev na změny prostředí. Na enzymatickou aktivitu mají právě především fungicidy negativní vliv (Riah et al. 2014). Podle výzkumu Zhu et al. (2016) všech pět hodnocených triazolů vykazovalo významné potlačení enzymatické aktivity androgenních cytochromů. Proto je tedy možné jejich působení jako endokrinních disruptorů.

### **3.2.4 Penkonazol**

Penkonazol, systematickým názvem (dle IUPAC): 1-[2-(2,4-dichlorophenyl)pentyl]-1H-1,2,4-triazole, je typickým zástupcem triazolových fungicidů. Tato skupina funguje jako tzv. demethylační inhibitory (DMI), které potlačují enzymy cytochromu P450, sterol demethylázu a zastavují syntézu ergosterolu (Holb & Schnabel 2007). Jde o systémový fungicid, který působí na povrchu rostlin a zároveň proniká do pletiv rostlin a šíří se pomocí svazků cévních do dalších částí rostliny. Penkonazol byl představen světu již roku 1983 a je využíván ve většině evropských zemí.

Penkonazol je považovaný za stabilní fungicid s tendencemi se akumulovat v půdě. Podíl z aplikovaného fungicidu se může dostávat do půdy během aplikace, spolu s deštěm nebo pomocí rozkládajícího se rostlinného materiálu (Kim et al. 2002). U nás je běžně využíván v zemědělství jako komerční přípravek Topas 100 EC (Komárek et al. 2010; Husak et al. 2017). Většinou má formu bílého prášku aplikovaného ve vodné suspenzi, který se používá na regulaci různých houbových patogenů (plísni, strupovitosti nebo rzí) na vinicích nebo při pěstování ovocných stromů a zeleniny ve sklenících (Wang et al. 2014). Penkonazol je většinou aplikován postřikem přímo na rostliny, rychle se vstřebává a roznáší dovnitř listů (Kim et al. 2002). Mezi metabolity tohoto fungicidu patří jeho izomer 1,2,4-triazol a také triazolactová kyselina (CHMI 2019).



Obrázek 5: Struktura Penkonazolu

Tabulka 4: Vlastnosti penkonazolu (CHMI 2019)

Vybrané vlastnosti látky	
<b>Molekulární hmotnost</b>	<b>284,18</b>
<b>Souhrnný vzorec</b>	<b>C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub></b>
<b>Barva a skupenství</b>	Bílý prášek
<b>Zápach</b>	Bez zápachu
<b>Poločas rozpadu (v půdě)</b>	133 až 343 dní
<b>Log Kow</b>	3,72 (střední potenciál k bioakumulaci)
<b>Rozpustnost (ve vodě)</b>	73 mg/ L (při 20-30 °C)
<b>Toxicita a nebezpečí</b>	R51 (toxický pro vodní organismy) R53 (může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí) R63 (možné nebezpečí poškození plodu v těle matky)

Podle informačního štítku u nás používaný přípravek Topas nemá dlouhodobější účinky na mikrobiální aktivitu v půdě. Přesto je zde nízká pravděpodobnost ovlivnění. Není však potřebný přímo risk management. Podle WHO je označen penkonazol jako pravděpodobně bezpečný (CHMI 2019).

V roce 2017 byla na území České republiky celková spotřeba účinné látky penkonazolu 132,2 kg. Z toho byl tento fungicid použit především na postřiky ovoce (117,5 kg), vinné révy (11,6 kg), zeleniny (2,8 kg) a ostatních plodin (EAGRI 2018).

Navzdory WHO klasifikují Fustinoni et al. (2016) penkonazol jako nebezpečný jak pro člověka, tak i pro prostředí, ve kterém se vyskytuje. Jejich výzkum se zaměřoval na identifikaci metabolitů penkonazolu v lidské moči a měl za výsledek nalezení sedmi různých oxidovaných forem. Závěrem bylo doporučeno zavedení hlavní formy těchto látek jako biomarkeru vystavení člověka tomuto fungicidu.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Použité půdy

Pro potřeby praktické části diplomové práce byly použity půdní vzorky ze tří různých stanovišť nacházejících se na území České republiky. Každý vzorek půdy se liší oblastí původu, fyzikálně-chemickými vlastnostmi (Tabulka 5) a také rozdílným složením. Tyto popsané půdy byly vybrány především pro své rozdílné vlastnosti a zároveň aby výsledná měření aktivit vybraných enzymů byla lépe hodnotitelná a porovnatelná.

Tabulka 5: Vlastnosti vybraných půd

Vlastnost	Humpolec	Poděbrady	Suchdol
<b>Půdní typ</b>	Kambizem	Fluvisol	Černozem
<b>Obsah písku [%]</b>	30,22	56,57	13,16
<b>Obsah jílu [%]</b>	21,40	24,50	60,05
<b>Obsah prachu [%]</b>	48,38	18,93	26,77
<b>Půdní druh</b>	Hlinitá	Písčitohlinitá	Jílovitohlinitá
<b>Podíl sušiny [%]</b>	89,0	96,0	93,1
<b>WHC</b>	30,5	28,1	39,0
<b>pH (H<sub>2</sub>O)</b>	5,7	6,8	8
<b>pH (KCl)</b>	5,4	6,2	7,4
<b>KVK [mmol/kg]</b>	90,3 ± 2,0	150,3 ± 1,0	249,3 ± 4,0
<b>C<sub>ox</sub> [%]</b>	1,20 ± 0,02	1,58 ± 0,15	1,60 ± 0,15

#### A) Humpolec

Půdní vzorek ze stanoviště Humpolec je typ hlinité kambizemě s téměř polovičním obsahem prachových částic. Má velmi nízkou hodnotu pH (je tedy půdou kyselou), její kationtová výměnná kapacita je nízká a množství půdní organické hmoty je také nízké.

#### B) Poděbrady

Stanoviště Poděbrady je typově písčitohlinitou fluvisolí kvůli vyššímu obsahu částic písku. Její pH je slabě kyselé, hodnota kationtové výměnné kapacity je podle hodnocení nižší střední a celkově je její množství oxidovatelného uhlíku malé.

### **C) Suchdol**

Půda ze stanoviště Suchdol je podle hodnocených vlastností jílovitohlinitou černozemí s 60 % jílu, a tedy půdou těžkou. Dle stanovení je pH velmi slabě kyselé, téměř neutrální, hodnota KVK je vyhodnocena jako vysoká a množství humusové frakce je nízké.

## **4.2 Stanovení jednotlivých vlastností půd**

Půda svými vlastnostmi ovlivňuje mnohé aktivity zde žijících organismů. Kvůli tomu je nutné stanovit tyto potřebné vlastnosti a dále podle toho pokračovat při následujících hodnoceních půdního prostředí. Obvykle určované charakteristiky (druh a typ půdy, pH, KVK, množství organického uhlíku aj.) jsou velice podstatné i u rozborů cizorodých látek a jejich vlivu na mikrobiální činnost, rostliny či prostředí samotné. Proto je důležité znát tyto vlastnosti kvůli dalším vyhodnocením. Veškeré výsledky měřených vlastností půd, které jsou uvedené v souhrnné Tabulce 5, byly stanoveny na katedře agroenvironmentální chemie a výživy rostlin České zemědělské univerzity v Praze. Jejich stanovení bylo vždy provedeno podle příslušných metodik popsaných níže.

### **4.2.1 Fyzikální vlastnosti půd**

Na každém z výše uvedených stanovišť byla odebrána půda svrchního horizontu do 20 cm. Následně byly půdní vzorky ponechány pro vysušení na vzduchu a poté byla půda upravena na jemnozem prosetím sítem o velikosti ok 2 mm a homogenizována. Stanovení sušiny u jednotlivých půd proběhlo gravimetricky dle metodiky při 105 °C ve třech opakováních.

Vodozadržná kapacita (WHC) byla stanovena gravimetricky pro každou půdu dle Nováka s použitím Mitscherlichova válečku. Váleček se vzorkem byl nejdříve plně nasycen vodou, poté byla voda odsávána po dobu 2 hodin a váleček byl zvážen. Následně byl tentýž váleček vysušen při teplotě 105 °C a zvážen znovu. Rozdíl obou hmotností udává hodnotu půdní vodozadržné kapacity.

### **4.2.2 Půdní reakce (aktivní a výměnná)**

Půdní reakce aktivní neboli pH (H<sub>2</sub>O) je zapříčiněna přítomností volných iontů vodíků. Dle metodiky je stanovována ze suspenze půdy zalité destilovanou vodou (jemnozemě 2 mm

po prosátí). Samotné měření je prováděno potenciometricky pomocí elektrod. Volnými vodíkovými ionty a solí vytěsnitelnými vodíkovými ionty z organominerálního komplexu je reprezentována výměnná půdní reakce označována jako pH (KCl). Pro samotné vytěšňování z komplexu se používá 0,2 M roztok chloridu draselného. Měření této půdní reakce je většinou prováděno spolu s reakcí aktivní, a to také potenciometricky pomocí skleněných typů elektrod. Pro obě stanovení půdní reakce (aktivní i výměnné) je postup shodný, s pouhou změnou použitých reagensů. U každé půdy byla obě stanovení provedena ve dvou opakováních.

#### **Postup stanovení:**

Do 100 ml třepacích baněk bylo naváženo 20 g suché jemnozeme o upravené velikosti 2 mm a následně přidáno 50 ml daného roztoku podle druhu stanovení. Pro aktivní půdní reakci tedy 50 ml destilované vody a pro reakci výměnnou 50 ml 0,2 M roztoku KCl (Zbíral 2001). Všechny vzorky byly následně třepány po dobu 60 minut na mechanické třepačce a poté byly jednotlivé hodnoty pH měřeny potenciometricky pomocí skleněné elektrody WTW pH340i.

#### **4.2.3 Množství $C_{ox}$ (oxidovatelného uhlíku)**

Kolorimetrické stanovení množství oxidovatelného uhlíku ( $C_{ox}$ ) je prováděno oxidací uhlíku sloučenin organického původu dle metodiky Sims & Haby (1971) provázené redukcí chromu v přítomném dichromanu draselném. V kyselém prostředí (kyseliny sírové) vzniká trojmocný kation chromu, který přímo koresponduje s množstvím organického uhlíku v daném vzorku. Při vlnové délce 600 nm se měří absorbance světla pohlceného kationty  $Cr^{3+}$ , kdy světlo není absorbováno kationty  $Cr^{6+}$  přítomnými v nadbytku dichromanu draselného.

Pro stanovení je třeba vytvořit kalibrační přímkou přípravou řady standardů se známou koncentrací oxidovatelného uhlíku. V tomto případě je standardním roztokem sacharóza o koncentraci 5 mg/l. Nejprve je odpipetováno do 5 stejných 100 ml baněk určené množství zásobního roztoku (1, 2, 4, 8, 12, 16 ml) sacharózy. Poté je přidáno do jednotlivých baněk se sacharózou 10 ml dichromanu ( $K_2Cr_2O_7$ ) a zároveň 10 ml kyseliny sírové ( $H_2SO_4$ ). Po 20 min



reakce jsou všechny baňky doplněny na objem 100 ml demineralizovanou vodou a zfiltrvány (eliminace vlivu filtrace).

Tabulka 6: Hodnoty jednotlivých standardů

<b>ml sacharózy</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>16</b>
<b>mg sacharózy</b>	5	10	20	40	60	80
<b>absorbance</b>	0,118	0,22	0,409	0,788	1,108	1,22

Při vlastním stanovení bylo naváženo do každé baňky přesně 1 g vzorku půdy. Stejně jako u standardů bylo následně k půdě vždy přidáno 10 ml dichromanu draselného a 10 ml kyseliny sírové. Každá baňka se vzorkem půdy a všemi reagensy se nechala po 20 minut odstát a následně byla doplněna na objem asi 70 ml destilovanou vodou. Je velmi důležité chladit baňku pod studenou tekoucí vodou, protože je probíhající reakce exotermická. Tuto reakci popisuje vzorec:  $2 \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + 3 \text{C} + 8 \text{H}_2\text{SO}_4 = 2 \text{K}_2\text{SO}_4 + 2 \text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 + 3 \text{CO}_2 + 8 \text{H}_2\text{O}$

Po dostatečném vychladnutí směsi je vzorek doplněn na celkový objem 100 ml, promíchán a následně je filtrován s použitím sestavené filtrační soustavy. Pro naše potřeby nebylo nutné roztoky ředit. Nakonec byl výsledek vypočítán s použitím kalibrační křivky vytvořené z hodnot standardů.

### 4.3 Založení inkubačního pokusu

Pro stanovení jednotlivých aktivit vybraných enzymů po vystavení fungicidní látce byla prováděna inkubace tří půdních vzorků *ex situ* obsahující přirozeně přítomné mikroorganismy. Pro každou z půd byly určeny 4 časy, 3 koncentrace fungicidu a 2 opakování (celkem 72 vzorků).

Tabulka 7: Koncentrace roztoků penkonazolu

50 g suché půdy (105 °C)		
mg/L	mL	mg/kg
14	7,1	1,99
70	7,1	9,97

Zásobní roztok (100%) penkonazolu o koncentraci 70 mg/l byl nejprve připraven do 1 litrové odměrné baňky rozpuštěním účinné látky v demineralizované vodě. Kvůli nedostatečné rozpustnosti penkonazolu byla voda temperována a látka postupně rozpouštěna. Z tohoto roztoku byl následně připraven naředěním roztok pracovní (20%) o koncentraci 14 mg/l. Tím byly vytvořeny všechny potřebné koncentrace pro inkubace (14 mg a 70 mg látky; uvedeno v Tabulce 7).

Tabulka 8: Schéma založení inkubačního pokusu

varianta	čas	koncentrace	Obsah látky
	den	mg/L	mg/kg
1	7	0	0
2	14	0	0
3	21	0	0
4	28	0	0
5	7	14	2,0
6	14	14	2,0
7	21	14	2,0
8	28	14	2,0
9	7	70	10,0
10	14	70	10,0
11	21	70	10,0
12	28	70	10,0

Pomocí analytických vah bylo naváženo do uzavíratelných nádobek SecurTainer III SIMPORT P-lab o objemu 60 ml odpovídající množství vzorků půdy vysušených na vzduchu (air-dry) z Humpolce (56,2 g), Poděbrad (52,1 g) a Suchdolu (53,7 g). Do takto odvážených půd byly následně přidány daná množství jednotlivých koncentrací předem vytvořených roztoků penkonazolu podle uvedeného schématu (viz Tabulka 8). Pro každou půdu a koncentraci roztoku byly použity čisté špičky, kvůli zamezení nechtěné kontaminaci půd mezi sebou a ovlivnění výsledných hodnot. Podle vypočítané vodozadržné kapacity byly vzorky doplněny pipetou demineralizovanou vodou na 70% vlhkost půdy (viz Tabulka 9).

Tabulka 9: Navážky a přidavek roztoku účinné látky a vody ke vzorkům půd

<b>Půda</b>		<b>Hmotnost air-dry (g)</b>	<b>Přídavek roztoku látky (ml)</b>	<b>Přídavek vody (ml)</b>
<b>Humpolec</b>	vzorek	56,2	7,1	0
	kontrola	56,2	0	7,1
<b>Poděbrady</b>	vzorek	52,1	7,1	2,5
	kontrola	52,1	0	9,6
<b>Suchdol</b>	vzorek	53,7	7,1	8,4
	kontrola	53,7	0	15,5

Připravené nádoby s půdou, přidaným množstvím roztoků účinné látky a doplněné na svoji vypočítanou WHC byly přivřeny a umístěny do „inkubačního boxu“ a do tmavé místnosti se stálou pokojovou teplotou (20 °C). Průběžně byly nádoby s inkubovanou půdou po dobu 4 týdnů (2x v týdnu s odstupem min. 3 dní) váženy a doplňovány na svojí přibližnou 70% vodozadržnou kapacitu destilovanou vodou. Každý týden byla vždy čtvrtina nádobek se vzorky odebrána a uložena ke zmrazení, kvůli zastavení aktivity mikroorganismů a udržení jejich stálých hodnot až do stanovení.

#### 4.4 Aktivita dehydrogenázy

Pro měření aktivity enzymu byla použita metoda dle ČSN EN ISO 23753-1 s využitím trifenyltetrazolium-chloridu (TTC) jako substrátu. Hydrolýzou vzniklý trifenylformazan (TPF) byl díky svému červenému zbarvení po extrakci měřen spektrofotometricky při 482 nm. Zjištěné hodnoty absorbance jsou přímo úměrné koncentraci enzymu v půdě.

Aktivita byla vztažena na hmotnost sušiny vzorku a vyjádřena v jednotkách mg/kg/h. V našich laboratorních podmínkách byl proces stanovení upraven pouze snížením množství navážky a objemu reagensů na polovinu.

##### *Postup analýzy:*

Do tří Erlenmeyerových baněk je naváženo po 2,50 g čerstvého půdního vzorku. Do dvou z nich se přidá 2,5 ml připraveného roztoku substrátu (vzorky) a do třetí baňky (kontrola) se odpipetuje 2,5 ml TRIS pufru upraveného dle pH jednotlivých půd. Obsah baňky se promíchá, uzavře parafilmem a následně inkubuje po dobu 20 hodin při 25 °C v termostatu. Po inkubaci se do vzorků i kontroly přidá 12,5 ml acetonu pro extrakci vytvořeného TPF, obsah se zamíchá, znovu uzavře a nechá se po dobu 2 hodin stát ve tmě (každou hodinu se obsah znovu protřepe). Vzorky se filtrují skládaným filtračním papírem v polotmavé místnosti do připravených kádinek. Filtráty vzorků i kontroly se spolu s kalibračními standardy měří spektrofotometricky při vlnové délce 482 nm během 1 hodiny.

##### *Výpočet a hodnocení:*

Ze získaných kalibračních standardů je sestavena přímka závislosti koncentrace TPF v roztoku na hodnotách absorbance. Aktivita dehydrogenázy vztažená na hmotnost sušiny vzorku se vypočítá dle rovnice:

$$a = \frac{(\rho_{cs} - \rho_{bs}) * V * 100}{m * DM * t}$$

<i>Kde:</i>	<i>a</i>	Dehydrogenázová aktivita	(mg/kg/h)
	$\rho_{cs}$	koncentrace TPF ve vzorku	(mg/L)
	$\rho_{bs}$	koncentrace TPF v kontrole	(mg/L)
	<i>V</i>	celkový objem roztoku	(L)

(substrátu nebo pufru + extrakčního činidla)

*m* počáteční hmotnost vzorku (kg)

*DM* obsah sušiny vzorku (%)

*t* doba inkubace (h)

## 4.5 Aktivita ureázy

Pro měření aktivity enzymu byla použita metodika dle Kandelera a Gerbera. Tato metoda je založena na inkubaci vzorků s močovinou bez použití pufru a následném kolorimetrickém stanovení vzniklého amoniaku. Aktivita ureázy byla vyjádřena v jednotkách  $\mu\text{g NH}_4 - \text{N} / \text{g} * \text{dwt} * 2\text{h}$  a poté přepočítána na  $\text{mg NH}_4 - \text{N} / \text{kg}$ .

### *Postup analýzy:*

Do tří Erlenmeyerových baněk je naváženo po 2,50 g čerstvého půdního vzorku. Do dvou z nich se přidá 1,25 ml roztoku močoviny (vzorky) a do třetí baňky (kontrola) se močovina nepřidává. Obsah baňky s roztokem se promíchá, uzavře gumovou zátkou a následně inkubuje po dobu 2 hodin při 37 °C v termostatu. Termoskříň se předejde 30 minut před samotnou inkubací. Po inkubaci se do kontroly přidá také 1,25 ml močoviny a zároveň do všech baněk se odpipetuje 25 ml roztoku KCl o koncentraci 1 mol/l s přídavkem 10 ml 0,01 M HCl. Erlenmeyerovy baňky se znovu uzavřou zátkami, obsah se zamíchá a nechá se po dobu 30 minut třepat na mechanické třepačce. Získaná suspenze se filtruje skládaným filtračním papírem do připravených kádinek.

Ke kolorimetrickému stanovení se připraví 20 ml kalibrované zkumavky, do kterých se odpipetuje vždy 1 ml filtrátu. Ten se pomocí stříčky opatrně naředí demineralizovanou vodou na 10 ml a následně se automatickou pipetou přidá 5 ml vytvořený roztok Na-salicylátu/NaOH a 2 ml 0,1 % roztoku Na-dichloroisocyanurátu. Zkumavky se uzavřou pomocí parafilmu a několikrát se promíchají. Následuje minimálně 30 minut inkubace při laboratorní teplotě a poté se spolu s kalibračními standardy měří spektrofotometricky při vlnové délce 690 nm.

### *Výpočet a hodnocení:*

$$\frac{\mu\text{g NH}_4 - \text{N} \cdot \text{ml}^{-1} * V * 10}{\text{dwt} * 2,5}$$

*Kde:*  $V$  celkový objem extraktu (26,25 ml)  
10 ředící faktor  
 $dwt$  relativní sušina vzorku

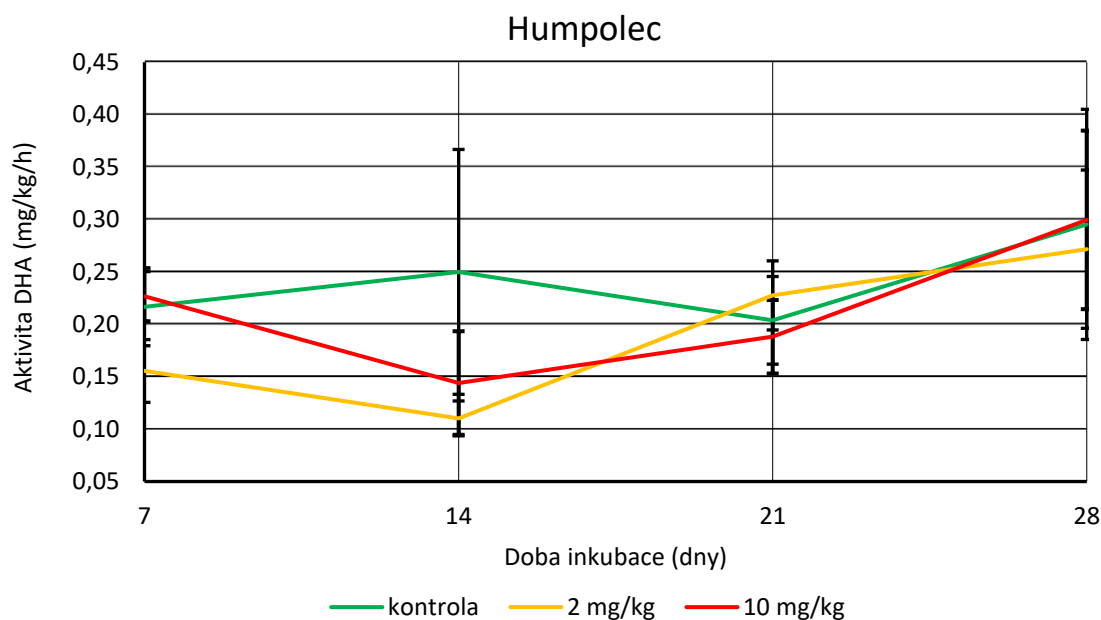
## 5 Výsledky

### 5.1 Aktivita dehydrogenázy

Podle uvedené metody (kap. 4.4) byly jednotlivé půdní vzorky postupně připraveny na filtraci potřebných extraktů půdy. Filtráty byly následně během 1 hodiny, kvůli rychlé degradaci na světle, proměřeny pomocí spektrometru PerkinElmer Lambda 25. Jednotlivé koncentrace TPF v roztoku byly přepočítány dle vzorce na hodnoty aktivity dehydrogenázy. Pro potřeby přepočtů aktivity a následných hodnot byl použit program Microsoft Excel. Ze stanovených opakování byly vypočítány v tomto programu průměrné hodnoty aktivity enzymu. Pro každou z používaných půd byly vytvořeny v programu MS Excel grafy závislosti času inkubací na aktivitu dehydrogenázy pro jednotlivé koncentrace penkonazolu.

#### 5.1.1 Humpolec

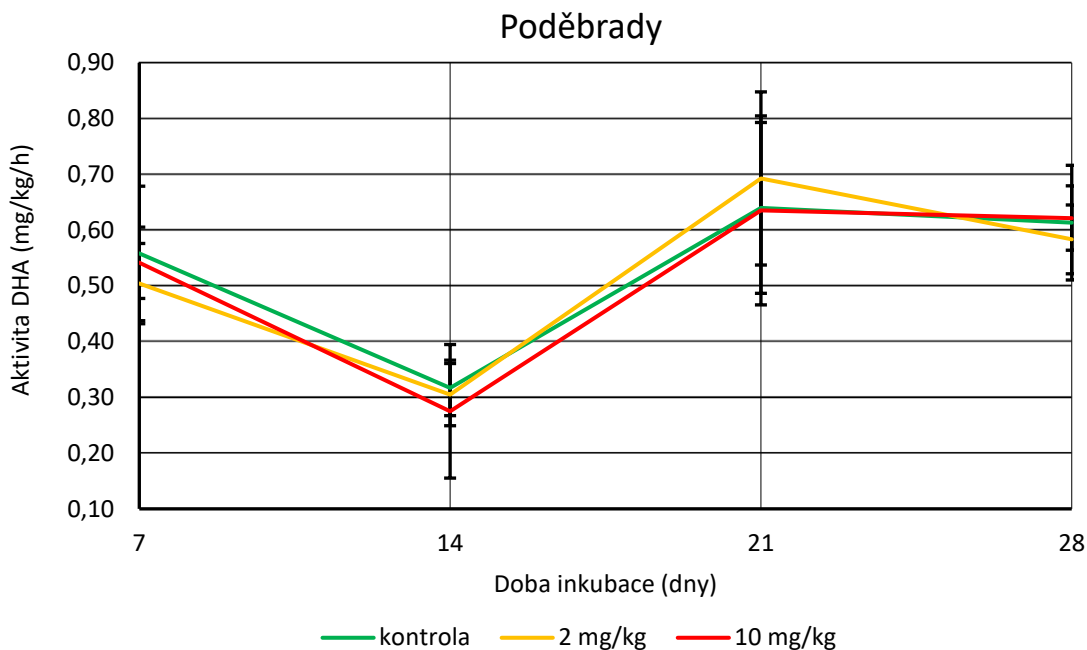
Při porovnání všech půd byla aktivita dehydrogenázy u Humpolce celkově nejnižší. Z Grafu 1 lze pozorovat, že obě křivky půd s rozpuštěným penkonazolem zřetelně ukazují za prvních 14 dní pokles celkové aktivity v půdě, a naopak hodnoty u kontroly jsou v této době vysoké. Poté o další týden později se pravděpodobně možnou biodegradací inhibičních látek aktivita u obou roztoků fungicidu přiblížila hodnotám aktivity kontroly.



Graf 1: Aktivita dehydrogenázy v půdě Humpolec

### 5.1.2 Poděbrady

U Grafu 2 lze pozorovat vysokou podobnost průběhu všech vyobrazených křivek, kdy aktivita enzymu klesala do 14 dní od inkubace a následně zase vzrůstala na velice vysoké hodnoty pravděpodobným půdním odbouráváním xenobiotika až skoro ke stagnaci na aktivitě 0,6 mg/kg/h. Vliv půdních vlastností na průběh je také možný, ale zde téměř neprůkazný.

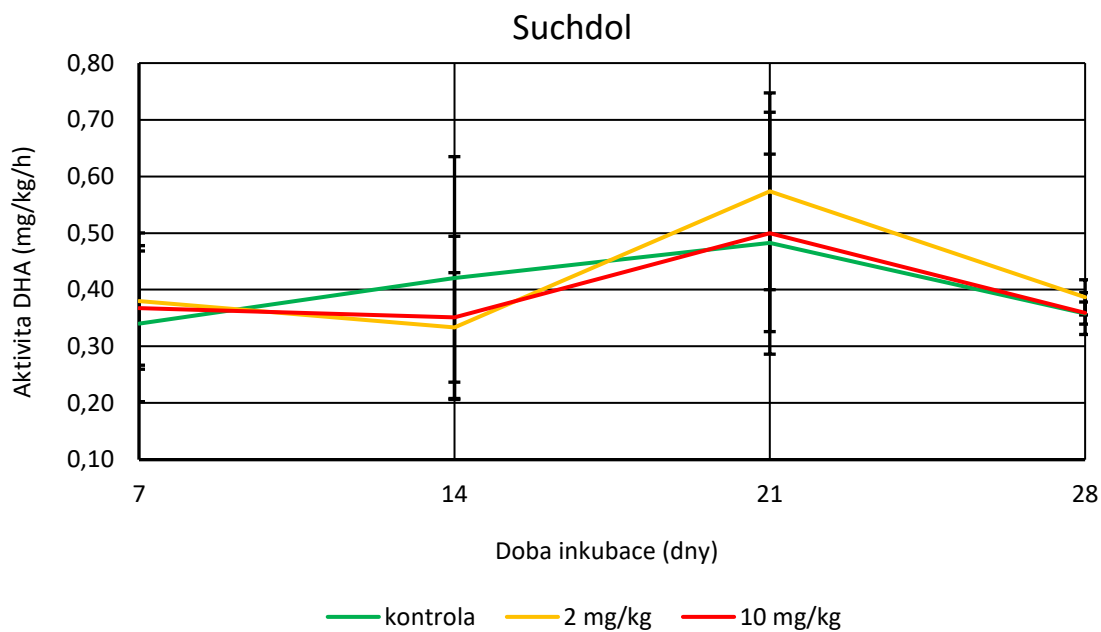


Graf 2: Aktivita dehydrogenázy v půdě Poděbrady

### 5.1.3 Suchdol

Graf 3 nám prezentuje střední hodnoty aktivity v porovnání s ostatními půdami. Stejně jako u dvou předešlých půd je do 14 dnů pozorován pokles hodnot enzymatické aktivity s následným vzrůstem ke třetímu týdnu. Do 21. dne se u kontrolních vzorků aktivita bez omezení zvyšuje, avšak následně spolu s ostatními křivkami i ona klesá k aktivitě počátečního stavu. Oproti hodnotám půd Poděbrad však počáteční pokles během prvních 14 dnů není tak veliký, což může být způsobeno sorpcí na jílovou frakci nebo nízkou mobilitou díky neutrálnímu pH a dalším vlastnostem dané půdy. Je zde pravděpodobnost i toho, že pokles od 21. dne může být způsoben uvolněním většího množství předtím adsorbovaného penkonazolu, který následně znovu omezuje enzymatickou aktivitu přítomných mikrobů.





Graf 3: Aktivita dehydrogenázy v půdě Suchdol

#### 5.1.4 Korelace mezi půdami

Pro výpočet korelace mezi půdami byla použita analýza ANOVA (MS Excel 2016), přesněji dvoufaktorová analýza rozptylu s opakováním. Ze získaných hodnot je pro hodnocení nejdůležitější hodnota pravděpodobnosti P pro korelaci (sloupců).

Tabulka 6: Statistický výstup ANOVA DHA

ANOVA						
Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F krit
Výběr	5,276697	11	0,4797	46,90688	4,98E-47	1,842165
Sloupce	0,010858	2	0,005429	0,53085	<b>0,589022</b>	3,046148
Interakce	0,170765	22	0,007762	0,759003	0,772153	1,601741
Dohromady	1,840795	180	0,010227			
<b>Celkem</b>	7,299115	215				

V případě aktivity dehydrogenázy, kdy hodnota P (Sloupců) = 0,589, existuje střední korelace a trendy hodnot vybraných půd jsou si podobné.

## 5.2 Aktivita ureázy

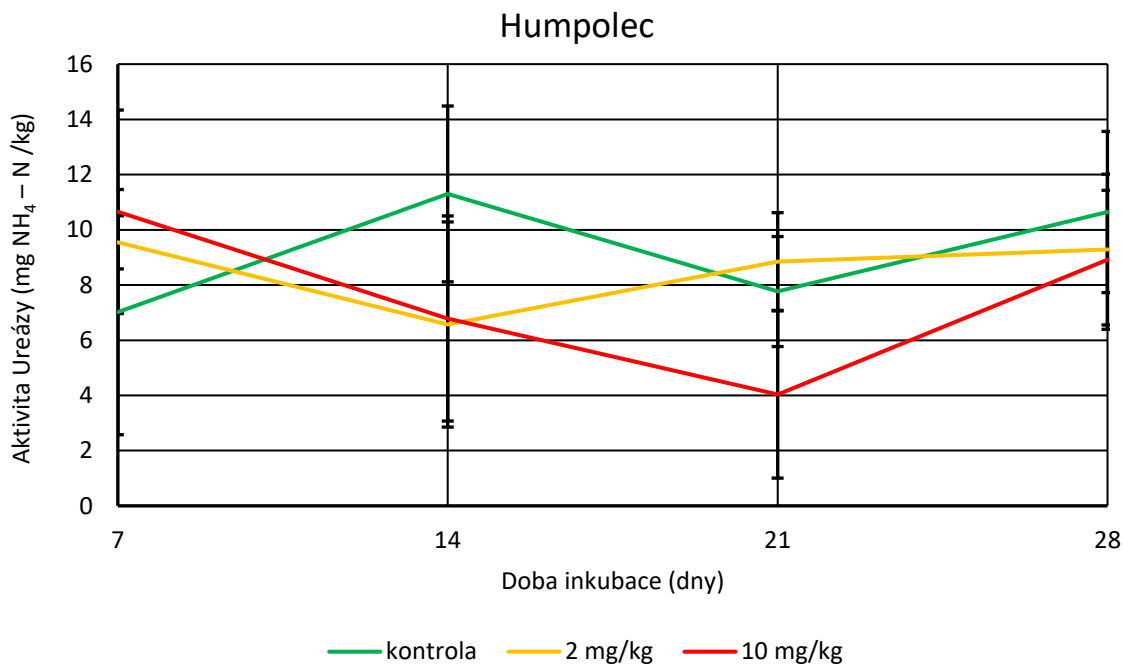
Jednotlivé půdní vzorky byly připraveny podle uvedené metody v kapitole 4.5. Po přefiltrování vzorků, jejich odpipetování 1 ml do kalibrovaných zkumavek a minimálně 30ti minutovém reakčním čase s přidanými reagensy (viz Tabulka 7) se podle množství přítomného amoniaku roztok zbarvil do zelena až zelenomodra. Absorbance roztoků pro takto připravené vzorky byly následně proměřeny pomocí UV/VIS spektrometru Lambda 25 při vlnové délce 690 nm. Dle vzorce byly přepočteny jednotlivé aktivity a z opakování byly vypočítány průměrné hodnoty aktivity ureázy. Pro každou z používaných půd byly sestrojeny (MS Excel 2016) grafy závislosti času inkubací na aktivitu ureázy pro jednotlivé koncentrace použitých roztoků penkonazolu.

Tabulka 7: Příprava vzorků pro spektrometrické stanovení ureázové aktivity

Enzym	Filtrát	Přídavek reagensů
Ureáza	1 ml	9 ml demineralizované vody 5 ml směsi roztoků 2 ml roztoku dichlorisokyanurátu sodného

### 5.2.1 Humpolec

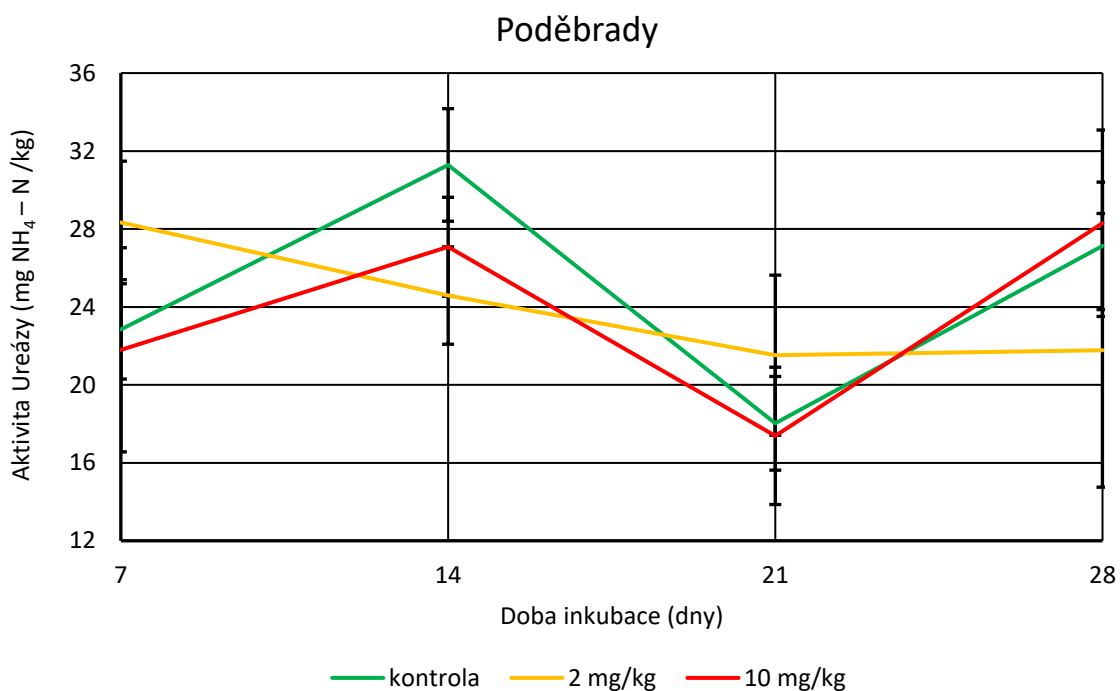
Půda stanoviště Humpolec vykazovala ze všech půd obecně nejnižší hodnoty aktivity půdní ureázy. Jak lze pozorovat v Grafu 4, u půdy s přidaným roztokem o koncentraci penkonazolu 2 mg/kg a 10 mg/kg je vidět během prvních 14 dní pokles aktivity. Po této době aktivita půdy s 20% roztokem penkonazolu začala vzrůstat a vyrovnávat se. Oproti tomu aktivita půd s nejvyšším obsahem přidaného fungicidu do 21. dne stále klesala a až poté začala narůstat. To může být způsobeno menším reziduálním množstvím xenobiotika z 20% přídavku, při srovnání s ostatními půdami je výraznější rozdíl dán lepší mobilitou díky nízkému pH a následně lepší biodegradací látky přítomnými mikroorganismy. U kontrol se projevil během 14 dnů nárůst aktivity půdního enzymu a poté byl zaznamenán nesignifikantní pokles, který se však nakonec vyrovnal.



*Graf 4: Aktivita ureázy v půdě Humpolec*

### 5.2.2 Poděbrady

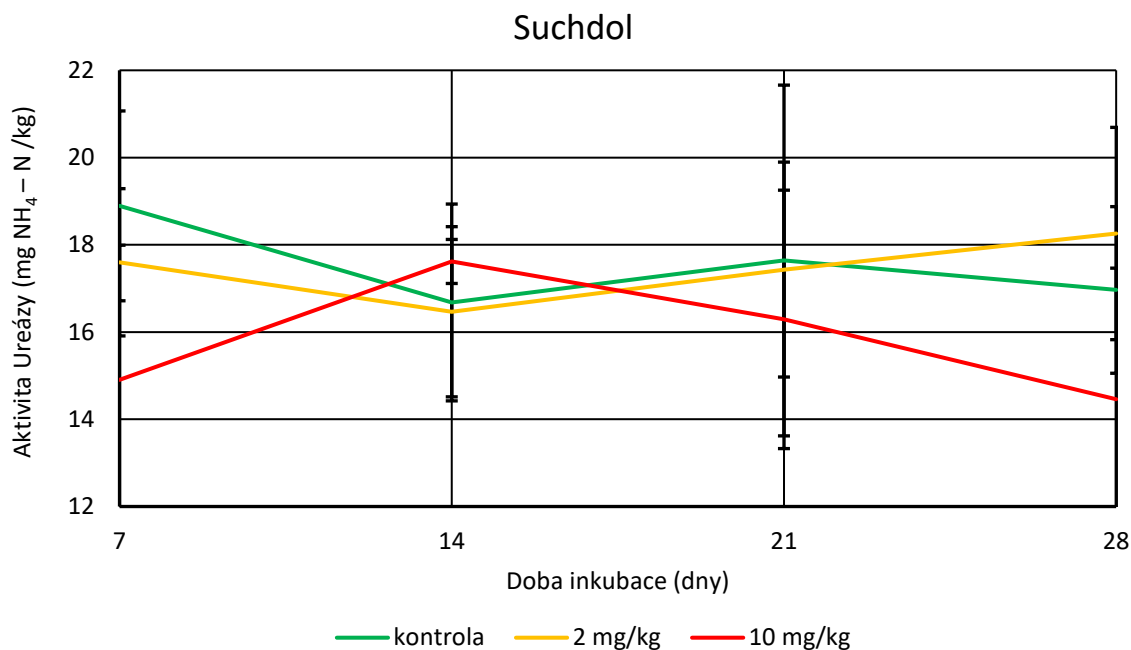
U půdy ze stanoviště Poděbrady byl na hodnotách Grafu 5 pozorován vzrůst aktivity sledovaného enzymu, a to samozřejmě u kontroly, ale také u nejvyšší koncentrace přidaného fungicidu. Tento jev může být ovšem způsoben rozptylem hodnot při stanovení aktivity po 7 dnech. Následující pokles u obou těchto koncentrací byl do 21. dne rychlý, avšak tento výkyv netrval dlouho a obě varianty vzorků svoji aktivitu navýšily na podobné hodnoty. Aktivita u vzorků s 20% roztokem penkonazolu pomalu klesala až do třetího týdne od počátku inkubace a od té doby s nepatrným vzrůstem stagnovala. Celkově měly Poděbrady nejvyšší hodnoty aktivity ureázy ve vzorcích.



*Graf 5: Aktivita ureázy v půdě Poděbrady*

### 5.2.3 Suchdol

Graf 6 nám zobrazuje aktivitu ureázy v půdě ze stanoviště Suchdol. V tomto případě aktivita během prvních dvou týdnů klesá jak u kontroly, tak i u nižší z koncentrací přidané fungicidní látky. V následujících týdnech se u přidaného fungicidu o koncentraci 2 mg/kg aktivita zvyšuje. U kontroly dochází během dalšího týdne ke zvýšení a následně aktivita znovu o trochu klesá. Naopak u nejvyšší koncentrace penkonazolu (10 mg/kg) se aktivita prvních 14 dní zvyšuje, což může být způsobeno vysokým podílem jílových částic v půdě a adsorpcí fungicidní látky na jejich povrch. Poté už pouze následuje významný pokles aktivity enzymu, což může znamenat nízkou biodegradaci tohoto xenobiotika v čase.



*Graf 6: Aktivita ureázy v půdě Suchdol*

#### 5.2.4 Korelace mezi půdami

Stejně jako u aktivity dehydrogenázy, i zde byl pro výpočet korelací mezi půdami použit program Microsoft Excel, ve kterém byla stejným způsobem sestavena dvoufaktorová analýza rozptylu s opakováním. I z těchto získaných hodnot je pro vyhodnocení nejdůležitější hodnota pravděpodobnosti P jednotlivých sloupců.

*Tabulka 8: Statistický výstup ANOVA Ureáza*

ANOVA						
Zdroj variability	SS	Rozdíl	MS	F	Hodnota P	F krit
Výběr	6388,983	11	580,8166	44,07513	7,17E-35	1,878388
Sloupce	60,60627	2	30,30314	2,299546	<b>0,105196</b>	3,080387
Interakce	454,5929	22	20,66331	1,568031	0,067771	1,641704
Dohromady	1423,211	108	13,17788			
<b>Celkem</b>	8327,392	143				

Z uvedené hodnoty P (Sloupce) = 0,105 v Tabulce 8 je patrné, že mezi vybranými půdami existuje nízká korelace a trendy jsou si velmi málo podobné.

## 6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo určení vztahu mezi účinkem penkonazolu na enzymatickou aktivitu v půdě a jeho přidaným množstvím. Dále se jednalo o zhodnocení vlivu délky inkubace na změny aktivity půdních enzymů, a nakonec o vyhodnocení vlivu odlišných vlastností půd různých stanovišť na změny enzymatické aktivity způsobené přítomností fungicidní látky.

Ze získaných výsledků provedených experimentů si lze udělat představu o tom, jak může přítomnost fungicidů ovlivňovat aktivitu vybraných enzymů půdního prostředí. U převážné většiny všech případů došlo po přidavku roztoku penkonazolu k inhibici aktivity enzymů v několika prvních týdnech, čímž se potvrdila hypotéza schopnosti penkonazolu negativně ovlivňovat půdní enzymatickou aktivitu.

Půdní inkubační experiment, jak už bylo popsáno, měl za úkol během 4 týdnů sledovat změny v enzymatické aktivitě po vystavení 3 koncentracím penkonazolu (0, 2 a 10 mg/kg). Metody používané pro stanovení aktivity dehydrogenázy a ureázy jsou uvedeny v kapitole 4.2 a 4.3 diplomové práce. Imfeld & Vuilleumier (2012) uvádí, že můžeme měřením několika relativně specifických enzymů dosáhnout přesnějších výsledků pro vystavení mikrobiálních společenstev pesticidním látkám. Podle Kumar et al. (2013) a dalších autorů je však námi použitá kolorimetrická metoda pro stanovení aktivity dehydrogenázy s použitím TTC označována za nevhodnou, kvůli svým špatně průkazným výsledkům. V současné době se jako metoda pro stanovení inhibice stále více uplatňuje analýza fosfolipidových mastných kyselin (PLFA), která je sice značně instrumentačně i časově náročná, ale reaktivně přesně mapuje výskyt mikrobiálních společenstev. Tuto metodu ve svém výzkumu použili např. Podio et al. (2008) a došli k závěru, že výraznější změny v půdní mikrobiální biomase byly průkazně pozorovány až při vyšších dávkách použitých fungicidů (carbedazimu a chlorothalonilu). Jako metodu monitoringu fungicidů v půdě použili Pose-Juan et al. (2010) filtraci přes různé materiály a další postupy pro stanovení zachycení a rozložení penkonazolu v různých složkách s detekcí vysokotlakou kapalinovou chromatografií. Díky tomu zjistili, že se na pevnou fázi půdní matrice sorbuje až 70 % z celkového obsahu penkonazolu v emulzi WOEP. Gondar et al. (2013) ve své práci popisuje

adsorpci penkonazolu na půdní organickou hmotu, která je zároveň ovlivněna půdní reakcí. Při pH menším než 5 byla posílena hydrofobní povaha organické hmoty a adsorpce pesticidů byla také zesílena. Pose-Juan et al. (2010) uvádí rozdíly v adsorpci penkonazolu technického a v komerční emulzi voda-olej (WOEP). Podle výsledků měla emulze WOEP nejvyšší afinitu na půdy s vysokým obsahem mědi a zároveň organické hmoty. Jako jeden z důležitých poznatků, který působí na mikroorganismy, přidává Sułowicz et al. (2016) také to, jak se s určitou půdou hospodaří. Ve své práci zaměřené na ovocné sady s mnoholetým aplikováním fungicidu (tetraconazol) poukazuje na sníženou diverzitu přítomných půdních společenstev a také na větší zranitelnost vůči nově používaným fungicidům v porovnání s loukami, kde pesticidy využívány nebyly.

Půda stanoviště Humpolec (viz Graf 1 a Graf 4) je typem hlinité kambizemě s nízkými hodnotami pH (kyselá půda), nejvyšším podílem prachových částic, ale nejnižším podílem částic jílu, sušiny a půdní organické hmoty. V takto kyselém prostředí, a především díky nízkému podílu jílových částic jako má půda ze stanoviště Humpolec lze vidět, že byl s největší pravděpodobností fungicid více mobilní a v důsledku toho tedy měl potenciálně vyšší toxicitu v prostředí. U nižších dávek použitého fungicidu pak pravděpodobně došlo k rychlejší degradaci a díky tomu se enzymatická aktivita mikroorganismů v půdě zlepšila. U některých kontaktních fungicidů, jak popisuje Cremlyn (1989), je kratší interval ochrany cílových rostlin především díky rychlejší degradaci některou z přírodních složek. Jak uvádí Angioni et al. (2003), tak byly především následkem fotodegradace snižovány hodnoty přítomných triazolů. V našem výzkumu prováděném za menšího přístupu světla byl u nejvyšší dávky penkonazolu následek viditelnější a ani po 3 týdnech nedošlo v půdě k úplné degradaci.

Stanoviště Poděbrady (viz Graf 2 a Graf 5) je půdním typem písčitohlinitá fluvisol se slabě kyselou hodnotou pH. Pozorovatelný je zde vyšší podíl částic písku, zároveň nejvyšší podíl sušiny ze všech uvedených půd, a proto velmi nízká vodozadržná kapacita. Její množství oxidovatelného uhlíku je považováno za malé, avšak není nejmenší ze sledovaných půd. Hodnoty kontroly u dehydrogenázy téměř kopírovaly křivky obou koncentrací fungicidní látky v půdě. Zde tedy nebyla inhibice rozeznatelná, ale jak uvádí Howell et al. (2014), tak můžeme u některých pesticidů i fungicidů sledovat vedlejší podporu růstu mikroorganismů,

avšak jiné druhy mohou mít při použití běžných normalizovaných hodnot tlumící nebo nulové účinky

U půdy stanoviště Suchdol (viz Graf 3 a Graf 6) byl v kapitole 4.1 stanoven typ jílovitohlinité černozemě, která má okolo 60 % jílovitých částic, což ji řadí mezi půdy těžké. Zároveň tato půda má ze všech nejnižší podíl částic písku a má téměř neutrální pH. Její kationtová výměnná kapacita, množství půdní organické hmoty a ze všech půd nejvyšší vodozadržná kapacita, může mít významný vliv na sorpci či degradaci xenobiotik v půdě a tím i na činnost mikroorganismů. Zřejmě kvůli svým vlastnostem, a především vysokému obsahu jílových částic byla inhibice u obou stanovovaných enzymů v této půdě zpočátku velmi nízká. Až po 3. týdnu inkubace a pravděpodobném postupném uvolnění penkonazolu z matrice se míra aktivity začala snižovat. Podobně Rodríguez-Cruz et al. (2008) ve své práci uvádí různé druhy upravených jílových částic, na kterých zkoušeli sorpci dvou fungicidů. Zvláště u penkonazolu popisovali zvýšenou adsorpci na jejich upravený jílový materiál a odkazovali na svoji druhou práci (Rodríguez-Cruz et al. 2006) s tím výsledkem, že by se některé z nich daly dokonce využít jako bariéry pro omezení mobility některých pesticidů.

Problematika využití pesticidních látek a jejich vlivu na mikrobiální či enzymatickou aktivitu v půdách je stále více zkoumána. Z tohoto důvodu je potřeba používat správné jednotné a standardizované metody, aby byly jednotlivé výzkumy dobře reprodukovatelné a omezilo se tak častým nedorozuměním a nestejným interpretacím pokusů mezi laboratořemi.



## 7 Závěr

Tato diplomová práce shrnuje vliv různých koncentrací penkonazolu a času na zvolené enzymatické aktivity skupin půdních mikroorganismů. Pro potřeby správného hodnocení aktivity enzymů dehydrogenázy a ureázy byly zpracovány v práci jednotlivé kapitoly s tím související.

Pro zhodnocení jednotlivých hypotéz byly vytvořeny a realizovány inkubační pokusy půd odlišných typů (Humpolec, Poděbrady a Suchdol) s přidavkem 3 různých koncentrací penkonazolu po dobu 7, 14, 21 a 28 dní. Příslušnými metodami byly stanoveny hodnoty aktivit dehydrogenázy a ureázy.

**Hypotéza č. 1** předpokládající, že zvýšením množství fungicidní látky (penkonazolu) se v půdě negativně ovlivní enzymatická aktivita byla **částečně potvrzena**, a to pouze u enzymu dehydrogenázy, protože hodnoty její aktivity oproti ureáze u všech tří půd v prvních týdnech klesaly, a to především u půd se sníženým pH. V ideálním případě by byl fungicid během této doby degradován a aktivita mikroorganismů by se vrátila do původních hodnot.

**Hypotéza č. 2**, která uváděla, že se vliv fungicidu na enzymatickou aktivitu bude mezi různými půdami lišit se **potvrdila**, kdy především u sorpce a mobility byl pozorován rozdíl.

**Hypotéza č. 3**, která předpokládala, že se bude enzymatická aktivita půdy měnit v čase, s ohledem na degradaci fungicidu byla také **potvrzena**, což je možné pozorovat na jednotlivých trendech každé z hodnocených aktivit enzymů.

Určité trendy byly u aktivity ureázy a dehydrogenázy pozorovány, avšak pro přesnější statistická vyhodnocení bych doporučil přidat více opakování jednotlivých variant ideálně alespoň 5 opakování celkem. Pro lepší aproximaci výsledků bych doporučil více odlišných půdních typů. Oboje ovšem představuje mnohem větší časovou (i finanční) zátěž, která by byla neúměrná tomuto pilotnímu výzkumu. Výzkum by bylo zároveň vhodné pro srovnání rozšířit o některou z metod stanovení jednotlivých kolonií půdních mikroorganismů, jako je stanovení mastných kyselin, řetězců nukleových kyselin apod. Toto však již představuje i značnou odbornost a nákladnou instrumentaci.

## 8 Literatura

- Angioni A, Aguilera Del Real A, Russo M, Melis M, Cabitza F, Cabras P. 2003. Triazole fungicide degradation in peaches in the field and in model systems. *Food Additives and Contaminants* **20**: 368–374. Available from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0265203021000060904>.
- Aromí G, Barrios LA, Roubeau O, Gamez P. 2011. Triazoles and tetrazoles: Prime ligands to generate remarkable coordination materials. *Coordination Chemistry Reviews* **255**:485–546. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010854510002286>.
- Baćmaga M, Kucharski J, Wyszowska J. 2015. Microbial and enzymatic activity of soil contaminated with azoxystrobin. *Environmental Monitoring and Assessment* **187**:615. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s10661-015-4827-5>.
- Baćmaga M, Wyszowska J, Kucharski J. 2018. The biochemical activity of soil contaminated with fungicides. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* **0**:1–11. Taylor & Francis. Available from <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1553908>.
- Badri D V., Vivanco JM. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment* **32**:666–681. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x>.
- Bennicelli RP, Wolińska A, Stępniewska Z, Bogudzińska M. 2009. Influence of pesticide ( glyphosate ) on dehydrogenase activity , pH , Eh and gases production in soil ( laboratory conditions ). *Carbon*:117–122.
- Blagodatskaya E, Kuzyakov Y. 2013. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. *Soil Biology and Biochemistry* **67**:192–211. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071713002988>.
- Briones MJ. 2014. Soil fauna and soil functions: a jigsaw puzzle. *Frontiers in Environmental Science* **2**. Available from <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fenvs.2014.00007/abstract>.
- Burns RG, Wallenstein MD, BurnsA RG, WallensteinB MD. 2010. Microbial extracellular enzymes and natural and synthetic polymer degradation in soil: current research and future prospects. Pages 67–69 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World. Available from <http://www.ldd.go.th/swcst/Report/soil/symposium/pdf/0549.pdf>.
- Camiña F, Trasar-Cepeda C, Gil-Sotres F, Leirós C. 1998. Measurement of dehydrogenase

- activity in acid soils rich in organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* **30**:1005–1011. Available from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071798000108>.
- Carlini CR, Polacco JC. 2008. Toxic Properties of Urease. *Crop Science* **48**:1665. Available from <https://www.crops.org/publications/cs/abstracts/48/5/1665>.
- Chaparro JM, Sheflin AM, Manter DK, Vivanco JM. 2012. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils* **48**:489–499. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s00374-012-0691-4>.
- Cremlyn, R. 1989. Pesticidy, SNTL. Praha: 1. vydání, 244 stran.
- Cui J, Holden NM. 2015. The relationship between soil microbial activity and microbial biomass, soil structure and grassland management. *Soil and Tillage Research* **146**:32–38. Elsevier. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167198714001317> (accessed February 24, 2019).
- Cycoń M, Piotrowska-seget Z. 2007. Response of soil microflora to pesticides introduced into soil - a review. *Response*:63–82.
- Fierer N. 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology* **15**:579–590. Available from <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro.2017.87>.
- Fontaine S, Mariotti A, Abbadie L. 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry* **35**:837–843. Available from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071703001238>.
- Gondar D, López R, Antelo J, Fiol S, Arce F. 2013. Effect of organic matter and pH on the adsorption of metalaxyl and penconazole by soils. *Journal of Hazardous Materials* **260**:627–633. Elsevier B.V. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.06.018>.
- Habig J, Swanepoel C. 2015. Effects of Conservation Agriculture and Fertilization on Soil Microbial Diversity and Activity. *Environments* **2**:358–384. Available from <http://www.mdpi.com/2076-3298/2/3/358>.
- Holb IJ, Schnabel G. 2007. Differential effect of triazoles on mycelial growth and disease measurements of *Monilinia fructicola* isolates with reduced sensitivity to DMI fungicides. *Crop Protection* **26**:753–759. Elsevier. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219406001955?via%3Dihub> (accessed March 16, 2019).
- Howard PH. 2017. Handbook of environmental fate and exposure data: For organic

- chemicals, volume iii pesticides. Page (Howard P, Michalenko E, Jarvis W, Basu D, Sage G, Meylan W, Beauman J, Anthony D, editors) Handbook of Environmental Fate and Exposure Data: For Organic Chemicals, Volume III Pesticides. CRC Press, CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742. Available from <https://www.taylorfrancis.com/books/9780203719305>.
- Howell CC, Hilton S, Semple KT, Bending GD. 2014. Resistance and resilience responses of a range of soil eukaryote and bacterial taxa to fungicide application. *Chemosphere* **112**:194–202. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.031>.
- Husak V V., 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 Part C: Toxicology & Pharmacology* **193**:1–8. Elsevier Inc. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.12.003>.
- 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. Elsevier Masson SAS. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1164556311001208> (accessed February 24, 2019).
- Jacobsen CS, Hjelmsø MH. 2014. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* **27**:15–20. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.003>.
- Jacobsen OS, Brusck W, Laier T, Hansen SU, Spliid NH, Helweg A. 1999. Transport and dating of pesticide residues from a 40 year old point source. Pages 355–362 *Human and Environmental Exposure to Xenobiotics*.
- Jacoby R, Peukert M, Succurro A, Koprivova A, Kopriva S. 2017. The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. *Frontiers in Plant Science* **8**:1–19. Available from <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.01617/full>.
- Jansson JK, Hofmockel KS. 2018. The soil microbiome — from metagenomics to metaproteomics. *Current Opinion in Microbiology* **43**:162–168. The Authors. Available from <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.01.013>.
- Jeske L, Placzek S, Schomburg I, Chang A, Schomburg D. 2019. BRENDA in 2019: a European ELIXIR core data resource. *Nucleic acids research*.

- Kameníčková, Ivana. 2013. Návody do cvičení (VHK) Hydropedologie, Studijní opory pro studijní programy s prezenční formou studia. VUT FAST v Brně.
- Kandeler E, Marschner P, Tscherko D, Singh Gahoonia T, Nielsen NE. 2002. Microbial community composition and functional diversity in the rhizosphere of maize. *Plant and Soil* **238**:301–312.
- Kandeler E, Poll C, Frankenberger WT, Tabatabai MA, Dick RP. 2013. Nitrogen Cycle Enzymes. Pages 211–245. Available from <https://dl.sciencesocieties.org/publications/books/abstracts/sssabookseries/methodsofsoil/en/211>.
- Karas PA et al. 2018. Assessment of the impact of three pesticides on microbial dynamics and functions in a lab-to-field experimental approach. *Science of the Total Environment* **637–638**:636–646. Elsevier. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896971831708X?via%3Dihub> (accessed March 28, 2019).
- Karolina G, Anna G, Jerzy K, Jarosław G, Magdalena F. 2017. Microbial community diversity and the interaction of soil under maize growth in different cultivation techniques. *Plant, Soil and Environment* **63**:264–270.
- Kilmer VJ, Hanson AA. 2018. Handbook of Soils and Climate in Agriculture. Page Handbook of Soils and Climate in Agriculture. CRC Press. Available from <https://www.taylorfrancis.com/books/9781351081528>.
- Kim IS, Beaudette LA, Han Shim J, Trevors JT, Tack Suh Y. 2002. Environmental fate of the triazole fungicide propiconazole in a rice-paddy-soil lysimeter. *Plant and Soil* **239**:321–331.
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* **58**:169–188. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701204000983>.
- Koch O, Tscherko D, Kandeler E. 2007. Temperature sensitivity of microbial respiration, nitrogen mineralization, and potential soil enzyme activities in organic alpine soils. *Global Biogeochemical Cycles* **21**:n/a-n/a. Available from <http://doi.wiley.com/10.1029/2007GB002983>.
- Komárek M, Čadková E, Chrástný V, Bordas F, Bollinger J-C. 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International* **36**:138–151. Available from

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412009002116>.
- Kotroczó Z, Veres Z, Fekete I, Krakomperger Z, Tóth JA, Lajtha K, Tóthmérész B. 2014. Soil enzyme activity in response to long-term organic matter manipulation. *Soil Biology and Biochemistry* **70**:237–243. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.028>.
- Kumar S, Chaudhuri S, Maiti SK. 2013. Soil Dehydrogenase Enzyme Activity in Natural and Mine Soil - A Review Department of Environmental Science & Engineering / Centre for Mining Environment , Department of Mining Engineering , Indian School of Mines ; Dhanbad -826004 India. *Middle-East Journal of Scientific Research* **13**:898–906.
- Kutílek, Miroslav. 1978. *Vodohospodářská pedologie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, n.p., ISBN 04-721-78.
- Lehmann J, Kleber M. 2015. The contentious nature of soil organic matter. *Nature*. Available from <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature16069>.
- Liu BR, Jia GM, Chen J, Wang G. 2006. A review of methods for studying microbial diversity in soils. *Pedosphere*.
- Lo C-C. 2010. Effect of pesticides on soil microbial community. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **45**:348–359. Available from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601231003799804>.
- Loeppmann S, Blagodatskaya E, Pausch J, Kuzyakov Y. 2016. Enzyme properties down the soil profile - A matter of substrate quality in rhizosphere and detritosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **103**:274–283. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071716302036>.
- Lv X, Pan L, Wang J, Lu L, Yan W, Zhu Y, Xu Y, Guo M, Zhuang S. 2017. Effects of triazole fungicides on androgenic disruption and CYP3A4 enzyme activity. *Environmental Pollution* **222**:504–512. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.051>.
- Lynch JM, Benedetti A, Insam H, Nuti MP, Smalla K, Torsvik V, Nannipieri P. 2004. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* **40**:363–385. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s00374-004-0784-9>.
- Margesin R, Zimmerbauer A, Schinner F. 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* **40**:339–46. Available from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653599002180>.

- 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. Available from <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrestox.6b00149>.
- Merino C, Nannipieri P, Matus F. 2015. Soil carbon controlled by plant, microorganism and mineralogy interactions. *Journal of soil science and plant nutrition*:0–0. Available from [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-95162015005000030&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-95162015005000030&lng=en&nrm=iso&tlng=en).
- Muñoz-Rojas M. 2018. Soil quality indicators: critical tools in ecosystem restoration. *Current Opinion in Environmental Science & Health* **5**:47–52. Elsevier Ltd. Available from <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.04.007>.
- Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* **54**:655–670. Available from <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x>.
- Nannipieri P, Trasar-Cepeda C, Dick RP. 2018. Soil enzyme activity: a brief history and biochemistry as a basis for appropriate interpretations and meta-analysis. *Biology and Fertility of Soils* **54**:11–19. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s00374-017-1245-6>.
- Němeček, J. et al. 2001. *Taxonomický klasifikační systém půd České republiky*. Praha: Česká zemědělská univerzita: Výzkumný ústav meliorací a ochrany půdy. 79 s. ISBN 80-238-8061-6.
- Nielsen M, Winding A. 2002. Microorganisms as indicators of soil health. Page Neri.
- Pereira P, Bogunovic I, Muñoz-Rojas M, Brevik EC. 2018. Soil ecosystem services, sustainability, valuation and management. *Current Opinion in Environmental Science & Health* **5**:7–13. Elsevier Ltd. Available from <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2017.12.003>.
- Podio NS, Guzmán CA, Meriles JM. 2008. Microbial community structure in a silty clay loam soil after fumigation with three broad spectrum fungicides. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **43**:333–340. Available from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601230801941675>.
- Pose-Juan E, Rial-Otero R, López-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. Elsevier B.V. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.05.142>.
- Prado AGS, Airoidi C. 2002. The toxic effect on soil microbial activity caused by the free or

- immobilized pesticide diuron. *Thermochimica Acta* **394**:155–162. Available from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040603102002654>.
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moëgne-Loccoz Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* **321**:341–361. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s11104-008-9568-6>.
- Riah W, Laval K, Laroche-Ajzenberg E, Mougin C, Latour X, Trinsoutrot-Gattin I. 2014. Effects of pesticides on soil enzymes: a review. *Environmental Chemistry Letters* **12**:257–273. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s10311-014-0458-2>.
- 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. Available from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389408003348>.
- Rodríguez-Cruz MS, Sánchez-Martín MJ, Andrades MS, Sánchez-Camazano M. 2006. Comparison of Pesticide Sorption by Physicochemically Modified Soils with Natural Soils as a Function of Soil Properties and Pesticide Hydrophobicity. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* **15**:401–415. Available from <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15320380600751769>.
- Savin MC. 2014. Soil: Fauna. Pages 454–459 *Encyclopedia of Natural Resources: Land*. CRC Press. Available from <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1081/E-ENRL-120047488>.
- 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. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165617301839>.
- Schwack W, Hartmann M. 1994. Fungicides and photochemistry: Photodegradation of the azole fungicide penconazole. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **198**:11–14. Available from <http://link.springer.com/10.1007/BF01195274>.
- Shen D. 1997. Microbial diversity and application of microbial products for agricultural purposes in China. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **62**:237–245. Available from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167880996011322>.
- Sims JR, Haby VA. 1971. SIMPLIFIED COLORIMETRIC DETERMINATION OF SOIL ORGANIC MATTER. *Soil Science* **112**:137–141. Available from <https://insights.ovid.com/crossref?an=00010694-197108000-00007>.
- Singh N, Dureja P. 2009. Effect of Biocompost-Amendment on Degradation of Triazoles



- Fungicides in Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **82**:120–123. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s00128-008-9536-0>.
- Sinsabaugh RL et al. 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecology Letters* **11**:1252–1264. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1461-0248.2008.01245.x>.
- 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. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s10646-016-1661-7>.
- Šálek, Jan. 1986. *Půdní hospodářství*. Brno: Rektorát Vysokého učení technického v Brně, ISBN 55-610-86.
- Šimek, Miloslav. 2003. *Základy nauky o půdě*. 1., Neživé složky půdy. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Biologická fakulta. ISBN 80-7040-629-1.
- Thenabadu RSD and MW. 1996. Urease activity in soils: A review. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka* **24**:159–195.
- Torsvik V, Øvreås L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* **5**:240–245. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527402003247?via%3Dihub>.
- Tscherko D, Kandeler E, Bárdossy A. 2007. Fuzzy classification of microbial biomass and enzyme activities in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* **39**:1799–1808. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071707000831>.
- Utobo EB, Tewari L. 2015. SOIL ENZYMES AS BIOINDICATORS OF SOIL ECOSYSTEM STATUS. *Applied Ecology and Environmental Research* **13**. Available from [http://www.aloki.hu/pdf/1301\\_147169.pdf](http://www.aloki.hu/pdf/1301_147169.pdf).
- Wang X, Qi P, Zhang H, Xu H, Wang X, Li Z, Wang Z, Wang Q. 2014. Enantioselective analysis and dissipation of triazole fungicide penconazole in vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Vodrážka Z. 1996. *Biochemie*. 2. opravené vydání, Academia, Praha, 511 s. ISBN 80-200-0600-1.
- Vrtišková E. (2013): *Vnější geologické děje*.
- Wołejko E, Wydro U, Łoboda T. 2016. The ways to increase efficiency of soil bioremediation. *Ecological Chemistry and Engineering S* **23**:155–174.

Zbírál J. 2001. Comparison of methods for soil pH determination. Rostlinná výroba, 47: 463–467

## **9 Seznam použitých internetových zdrojů**

AVČR. 2015. Výzkumný program Rozmanitost života a zdraví ekosystémů - Živá půda. Nakladatelství Academia, Praha. Dostupné na: <http://www.academia.cz/uploads/media/preview/0001/04/6fa58623029706e563bbda11d2dae0959dec7cc3.pdf>

CHMI. 2019. Pasport látky penkonazol. Hydrosoft Veveslavín. Praha. Dostupné na <http://hydro.chmi.cz/pasporty/pasport.php?seq=3287727&mf=10> (staženo March 2019).

UKZÚZ. 2018. Spotřeba účinných látek v roce 2017 (kg, l). Brno. Dostupné na [http://eagri.cz/public/web/file/587990/celek\\_2017\\_CZ.pdf](http://eagri.cz/public/web/file/587990/celek_2017_CZ.pdf) (staženo March 2019).

## 10 Seznam použitých zkratek a symbolů

C<sub>ox</sub> = oxidovatelný uhlík

CHMI = Český hydrometeorologický ústav

DHA = dehydrogenázová aktivita

DMI = demethylační inhibitory

PLFA = analýza fosfolipidových mastných kyselin

TTC = trifenyltetrazolium-chlorid

TPF = trifenylformazan

WHC = vodozadržná kapacita

WHO = Světová zdravotnická organizace

WOEP = emulze voda-olej