

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Ján Račko

Vliv triazolových fungicidů na parametry půdy

Effect of triazole fungicides on soil properties

Diplomová práce

Školitel: prof. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Konzultant: RNDr. Kateřina Bělonožníková, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky prof. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a konzultantky RNDr. Kateřiny Bělonožníkové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval. Dále prohlašuji, že tato diplomová práce nebyla využita k získání jiného či stejného titulu.“

V Praze dne

Podpis:
Bc. Ján Račko

Poděkování

Rád bych poděkoval paní prof. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za odborné a profesionální vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Kateřině Bělonožníkové, Ph.D. za veškerou pomoc při experimentální části, při vyhodnocení, interpretaci a kompletizaci výsledků. Rád bych ještě poděkoval panu Ing. Michalu Jaklovi, Ph.D. a paní RNDr., PhDr., Ing. Janě Jaklové-Dytrtové, Ph.D. za pěstování a poskytnutí experimentálních rostlin rajčat. V neposlední řadě děkuji své rodině za to, že vždy stojí při mně, a své přítelkyni a kolegyni Bc. Antoniane Žufíć.

Abstrakt

Ochrana rostlin stále závisí na používání pesticidů, často ve směsích, které představují potenciální hrozbu pro necílové organismy. Triazolové fungicidy (tebukonazol, penkonazol a další) jsou široce používány v zemědělství proti houbovým patogenům, ale mohou ovlivnit jak metabolismus samotných rostlin, tak složení půdních organismů.

Mezi biochemické indikátory zdraví a kvality půdy patří obsah mikroorganismů a aktivity enzymů z řad glykosidas, proteas a dehydrogenas.

V této práci bylo zkoumáno, jak ovlivňuje aplikace penkonazolu a tebukonazolu a jejich kombinace zálivkou do půdy a postřikem na listy rostlin rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L., cv. Cherrola) aktivity enzymů podílejících na metabolismu uhlíku a fosforu.

Bylo zjištěno, že endoglykosidasy podílející se na degradaci buněčných stěn rostlin a hub (celulasy, chitinasy) mají vlivem triazolů v půdě sníženou aktivitu, zatímco aktivita endo- β -1,3-glykanasy byla zvýšená ve skupině sPT. Aktivita exoglykosidas (β -glukosidasy, β -hexosaminidasy, β -galaktosidasy a α -manosidasy) v půdě byla zvýšena. Aktivita těchto enzymů byla stanovena také v kořenech rostlin rajčat, ze kterých může docházet k sekreci enzymů do půdy. Triazolové fungicidy zvyšovaly také aktivitu kyselé a alkalické fosfatasy v půdě. Celkově vyšší aktivity enzymů byly detekovány v půdě a kořenech rostlin ošetřených formou postřiku, který pro rostliny patrně představuje větší zátěž. Pomocí metody kvantitativní PCR bylo stanoveno celkové množství hub a množství bakterií v ošetřených půdách.

Klíčová slova

Půda, kořen, aktivita půdních enzymů, triazolové fungicidy, endoglykosidasy, exoglykosidasy

Abstract

Plant protection still depends on the use of pesticides, often in mixtures that pose a potential threat to non-target organisms. Triazole fungicides (tebuconazole, penconazole and others) are widely used in agriculture against fungal pathogens, but they can affect both the metabolism of the plants themselves and the composition of soil organisms.

Biochemical indicators of soil health and quality include the content of microorganisms and the activity of glycosidase, protease and dehydrogenase enzymes.

In this work, it was investigated how the application of penconazole and tebuconazole and their combination by watering the soil and spraying on the leaves of edible tomato plants (*Solanum lycopersicum* L., cv. Cherrola) affects the activities of enzymes involved in carbon and phosphorus metabolism.

Endoglycosidases involved in the degradation of plant and fungal cell walls (cellulases, chitinases) were found to have reduced activities in the soil contaminated with triazoles, while the activity of endo- β -1,3-glycanase was increased in the sPT group. The activity of exoglycosidases (β -glucosidases, β -hexosaminidases, β -galactosidases and α -mannosidases) in the soil was increased. The activity of these enzymes was also determined in the roots of tomato plants, from which enzymes can be secreted into the soil. Triazole fungicides also increased the activity of acid and alkaline phosphatase in the soil. Overall, higher enzyme activities were detected in the soil and roots of plants treated with the spray, which appears to be more stressful for the plants. Using the quantitative PCR method, the total amount of fungi and the amount of bacteria in the treated soils was determined.

Key words

Soil, roots, activity of soil enzymes, triazole fungicides, endoglycosidases, exoglycosidases

Obsah

1	Teoretický úvod	11
1.1	Půda	11
1.2	Charakterizace kvality půdy	11
1.2.1	Složení půdy a půdní typy	12
1.2.1.1	Textura půdy	12
1.2.2	Půdní mikroorganismy	13
1.2.2.1	Houby	13
1.2.2.2	Bakterie	14
1.2.2.3	Řasy	15
1.2.2.4	Prvoci	16
1.2.2.5	Aktinomycety	16
1.2.3	Půdní enzymy	17
1.2.3.1	β -Glukosidasa	17
1.2.3.2	Kyselá a alkalická fosfatasa	18
1.2.3.3	α -Manosidasa	19
1.2.3.4	β -Hexosaminidasa	19
1.2.3.5	β -Galaktosidasa	20
1.2.3.6	Endoglykosidasy	21
1.2.3.7	Proteasy	21
1.2.4	Vliv pH půdy na dostupnost živin	22
1.3	Kořenový systém	23
1.3.1	Vliv kořenového systému na půdní složení a mikroorganismy	24
1.4	Půdní kontaminanty	25
1.4.1	Antropogenní půdní kontaminanty	26
1.4.1.1	Triazolové fungicidy	27
2	Cíle práce	29
3	Materiál a metody	30
3.1	Přístroje a pomůcky	30
3.2	Chemikálie	31
3.2.1	Pufry	31
3.2.2	Substráty enzymů	31
3.2.3	Činidla	31

3.2.4	Ostatní chemikálie.....	32
3.3	Metodika práce.....	32
3.3.1	Struktura experimentu	32
3.3.2	Pěstování rostlin.....	33
3.3.3	Příprava extraktů z půdy.....	33
3.3.4	Příprava extraktů z kořenů.....	34
3.3.5	Stanovení aktivity exoglykosidas a fosfatas v půdě.....	34
3.3.6	Stanovení aktivity exoglykosidas a fosfatas v kořenech	35
3.3.7	Stanovení aktivity endoglykosidas v kořenech a v půdě.....	35
3.3.8	Stanovení množství hub a mikroorganismů v extraktech z půdy metodou RT-qPCR	36
3.3.9	Stanovení proteinů podle Lowryho.....	38
3.3.10	Statistické zpracování dat.....	38
4	Výsledky	39
4.1	Optimalizace extrakce exoglykosidas a fosfatas z půdy	39
4.2	Analýza půdy ošetřené triazolovými fungicidy	40
4.2.1	Stanovení koncentrace proteinů v extraktech z půdy.....	40
4.2.2	Stanovení aktivit endoglykosidas v půdě ošetřené triazolovými fungicidy.....	40
4.2.2.1	Aktivita chitinasy v půdě.....	41
4.2.2.2	Aktivita celulasý v půdě.....	41
4.2.2.3	Aktivita endo- β -1,3-glukanasy v půdě.....	42
4.2.3	Stanovení aktivity exoglykosidas v půdě ošetřené triazolovými fungicidy.....	43
4.2.3.1	Aktivita β -glukosidasý v půdě.....	43
4.2.3.2	Aktivita α -manosidasý v půdě.....	44
4.2.3.3	Aktivita β -galaktosidasý v půdě	45
4.2.3.4	Aktivita β -hexosaminidasý v půdě	45
4.2.4	Stanovení aktivity fosfatas v půdě ošetřené triazolovými fungicidy	46
4.2.4.1	Stanovení aktivity kyselý fosfatasý v půdě	46
4.2.4.2	Stanovení aktivity alkalický fosfatasý v půdě	47
4.3	Stanovení množství hub a bakterií v půdě ošetřené triazolovými fungicidy...	48
4.3.1	Stanovení hub	48
4.3.2	Stanovení bakterií	48
4.4	Analýza kořenů rostlin rajčat ošetřených triazolovými fungicidy	49

4.4.1	Stanovení koncentrace proteinů v kořenech ošetřených triazolovými fungicidy	49
4.4.2	Stanovení aktivity endoglykosidas v kořenech ošetřených triazolovými fungicidy	50
4.4.2.1	Aktivita chitinyasy v kořenech	50
4.4.2.2	Aktivita celulasy v kořenech	50
4.4.2.3	Aktivita endo- β -1,3-glukanasy v kořenech	51
4.4.3	Stanovení aktivity exoglykosidas v kořenech ošetřených triazolovými fungicidy	52
4.4.3.1	Aktivita β -glukosidasy v kořenech	52
4.4.3.2	Aktivita α -manosidasy v kořenech	53
4.4.3.3	Aktivita β -galaktosidasy v kořenech.....	53
4.4.3.4	Aktivita β -hexosaminidasy v kořenech.....	54
4.4.4	Stanovení aktivity fosfatasy v kořenech rostlin rajčat ošetřených triazolovými fungicidy	55
4.4.4.1	Stanovení aktivity kyselé fosfatasy v kořenech.....	55
4.4.4.2	Stanovení aktivity alkalické fosfatasy v kořenech.....	56
5	Diskuze	57
6	Souhrn.....	62
	Seznam literatury	63

Seznam zkratek

AcP	Kyselá fosfatasa (ang. Acidic Phosphatase)
AlP	Alkalická fosfatasa (ang. Alkaline Phosphatase)
ATP	Adenosintrifosfát
b16S	Primer nasedající na bakteriální ribozomální podjednotku 16S
dH₂O	Destilovaná voda
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (ang. DeoxyriboNucleicAcid)
DTT	Dithiothreitol
EC number	Klasifikační číslo pro enzymy (ang. Enzyme Commission)
EU	Europská Unie
fITS	Označení primerů na stanovení celkových hub (ang. Fungal Intergenic Spacer Region)
fP	Skupina rostlin ošetřených penkonazolem postřikem na listy
fPT	Skupina rostlin ošetřených kombinací penkonazolu a tebukonazolu postřikem na listy
fT	Skupina rostlin ošetřených tebukonazolem postřikem na listy
K	Kontrolní skupina rostlin
MBTH	3-metyl-2-benzothiazolinone-hydrazonehydrochlorid
MOPS	3-(N-morfolin)propansulfonová kyselina
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
oNPβGal	o-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid
pNβGlu	p-nitrofenyl-β-D-glukopyranosid
pNPαMan	p-nitrofenyl-α-D-manopyranosid
pNPβGlcNAc	p-nitrofenyl-N-Acetyl-β-D-glukosaminid

pNPP	p-nitrofenylfosfát
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RT-qPCR	Kvantitativní PCR (ang. RealTime-quantitative Polymerase Chain Reaction)
sP	Skupina rostlin ošetřených penkonazolem zálivkou do půdy
sPT	Skupina rostlin ošetřených kombinací penkonazolu a tebukonazolu zálivkou do půdy
sT	Skupina rostlin ošetřených tebukonazolem zálivkou do půdy

1 Teoretický úvod

1.1 Půda

Půda je sypký povrchový materiál, který pokrývá většinu pevniny. Skládá se z anorganických částic a organické hmoty. Půda poskytuje rostlinám strukturální podporu a je také jejich zdrojem vody a živin. Půdy se velmi liší svými chemickými a fyzikálními vlastnostmi. Procesy, jako je vyluhování různých látek, zvětrávání hornin a mikrobiální aktivita, vytvářejí celou řadu různých typů půd. Každý půdní typ má specifické vlastnosti. Dobrá struktura půdy umožňuje proudění vody a vzduchu do půdního profilu a skrz něj což přispívá ke zdraví a správnému růstu rostlin.^[1]

Zatímco některé půdy jsou přirozeně lépe strukturované než jiné, některé fyzikální vlastnosti půd lze dobrým hospodařením změnit. Pro pochopení stavu půdy je důležité sledovat fyzikální a chemické vlastnosti půdy. Je také důležité zajistit, aby postupy hospodaření nepřispívaly k úbytku zdravé a hospodářsky využitelné půdy.^[1]

Příkladem toho je nadměrné využívání postřiků, např. pesticidů, které mohou nepříznivě ovlivnit funkci půdních enzymů a tím změnit kvalitu půdy.^[1]

1.2 Charakterizace kvality půdy

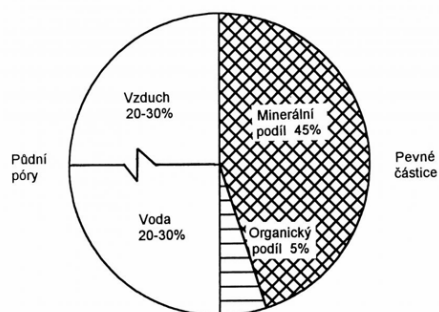
Kvalita půdy je definována jako její schopnost plnit ekologické funkce a poskytovat zázemí pro udržení biologické produktivity a kvality životního prostředí pro rostliny a živočichy.^[2]

Odolnost a rychlé zotavení vůči nepříznivým okolním vlivům (přirozeným nebo umělým) je charakteristickým znakem zdravé půdy. Přesnější a lepší hodnocení půdy lze zajistit integrací různých faktorů, jako je fyzikální, chemická, biologická a enzymatická aktivita. Přírodní kontaminanty (např. těžké kovy) a zemědělské postupy (např. obdělávání půdy a aplikace pesticidů a hnojiv) způsobují nerovnováhu ve fyzikálních a chemických parametrech půdy, jako je její textura, vlhkost, pH, salinita a množství mikroorganismů. Mikroorganismy (např. bakterie, houby, prvoci a řasy) jsou biologické indikátory, které slouží jako důležitý ukazatel pro určování zdraví půdy. Také enzymy z třídy amylas, celulas, chitinas, arylsulfatas, ureas, fosfatas a dehydrogenas jsou biochemické indikátory zdraví a kvality půdy.^[2]

1.2.1 Složení půdy a půdní typy

Půda představuje dynamický ekosystém. Vzhledem k tomu se v souvislosti s půdou hovoří o jejím zdraví, vitalitě a udržitelnosti.^[3]

Půda obsahuje vzduch, vodu a minerály, stejně jako rostlinný a živočišný materiál (Obr. č. 1). V první kategorii jsou biotické faktory t.j. všechny živé a kdysi živé složky v půdě, jako jsou rostliny, části rostlin, kořeny a mikroorganismy. Druhou kategorií tvoří abiotické složky, které zahrnují všechny neživé věci jako jsou minerály (ionty), vodu a vzduch.^[4]



Obr. č. 1: Průměrné zastoupení jednotlivých složek půdy. (převzato z ⁵)

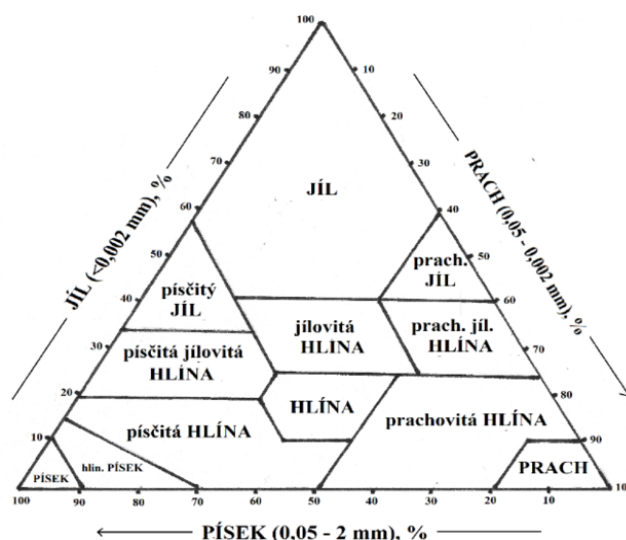
Organická složka půdy hraje důležitou roli při biologickém, chemickém a fyzikálním zlepšování kvality půdy. Půdní mikroorganismy rozkládají rostlinné a živočišné zbytky (proteiny, polysacharidy) na jednodušší organické látky a zajišťují koloběh jednotlivých prvků.^[6]

Některé půdní živiny, jako je dusík, fosfor, draslík, síra, hořčík a vápník, jsou klíčovými složkami proteinů a nukleových kyselin, nebo přispívají k udržení vnitřního buněčného pH a osmotického tlaku. Tyto prvky jsou souhrnně popisovány jako makroživiny. Mikroživiny jako molybden, železo a zinek jsou důležitými složkami enzymů.^[7]

1.2.1.1 Textura půdy

Textura půdy je charakterizována % podílem větších částic: kamenů a štěrků a menších pískových a prachových částic. Přestože částice >2 mm mohou ovlivnit fyzikální vlastnosti půdy, je důležitějším faktorem určujícím texturu půdy frakce částic menších než 2 mm. Velikost těchto malých částic se pohybuje v rozmezí od 2,0 - 0,002 mm v průměru (Obr. č. 2, str. 13). Pískové částice jsou velké 2,0 až 0,05 mm, a jsou viditelné pouhým okem. Poněkud menší prachové částice o velikosti 0,05 až 0,002 mm jsou mikroskopické a na dotek jsou hladké a kluzké, i když jsou mokré. Nejmenší jsou jílové částice o velikosti menší než 0,002 mm a lze je pozorovat pouze pomocí mikroskopu. Vlhké jílové částice tvoří lepkavou hmotu.^[8]

Poměry písku, prachu a jílu definují různé druhy půdních typů. Podle jednotlivých půdních typů je možné odvodit chování a vlastnosti půdy jako např. charakteristiky vody v půdě, zadržování živin anebo náchylnost k agregaci.^[8]



Obr. č. 2: Diagram rozdělení půdních typů na základě velikosti částic. Percentuální zastoupení částic o určité velikosti určuje typ půdy. (převzato z⁵⁾)

1.2.2 Půdní mikroorganismy

Půda je osídlena různými druhy mikroorganismů. Striktně anaerobní dokážou fixovat dusík, síru a jiné látky obsažené v půdě a fotosyntetizující mikroorganismy (sinice a řasy), produkují kyslík.^[9] Tyto vlastnosti některých mikroorganismů vedly k jejich evoluci v komplexnější struktury^[10], které jsou pro půdu důležitější, protože ovlivňují její úrodnost. V přírodních ekosystémech se živiny jako např. dusík, síra a fosfor vyskytují v podobě organických sloučenin, které jsou pro rostliny minimálně biologicky dostupné. Pro přístup k těmto živinám jsou rostliny závislé na půdních mikroorganismech, jako jsou bakterie a houby. Tyto mikroorganismy produkují enzymy schopné mineralizovat organické sloučeniny dusíku, fosforu a síry za vzniku amoniaku, fosfátů a síranů. V půdě jsou také zastoupeny mikroorganismy ze tříd: řas, prvoků a aktinomycet, přičemž každá z těchto skupin je definována charakteristickým chováním v půdě.^[11]

1.2.2.1 Houby

Houby neboli *fungi*, jsou v půdě hojně zastoupené (např. mykorhizální houby). Houby jsou v půdě důležité jako zdroje potravy pro jiné, větší organismy, tvoří prospěšné

symbiotické vztahy s rostlinami nebo jinými organismy a přispívají k zdraví půdy. Lze je rozdělit na druhy především podle velikosti, tvaru a barvy jejich reprodukčních spor. Většinu environmentálních faktorů, které ovlivňují růst a distribuci bakterií a aktinomycet, také ovlivňují houby. Kvalita i množství organické hmoty v půdě má přímou souvislost s růstem hub, protože většina hub organickou hmotu spotřebovává pro výživu. Ve srovnání s bakteriemi, houby relativně lépe snášejí život v kyselejších půdách, které jsou pro ně mnohdy i prospěšné.^[12]

Houby také dobře rostou v suchých půdách, protože jsou to aerobní organismy, tudíž organismy závislé na kyslíku, a čím vyšší je obsah vlhkosti v půdě, tím je substrát méně saturován kyslíkem.^[12]

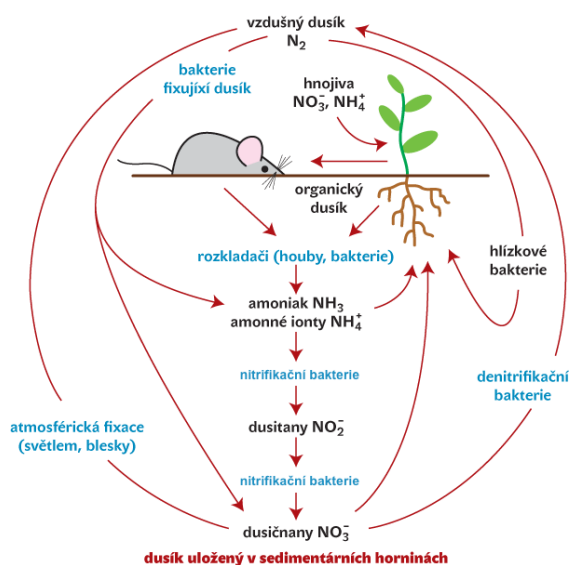
1.2.2.2 Bakterie

Bakterie a Archae, jsou nejmenší prokaryotické organismy v půdě. Jedná se o nejvíce zastoupené půdní mikroorganismy, které slouží mnoha důležitým účelům jako je rozklad organické hmoty a koloběh dusíku, síry a fosforu.^[13]

Některé bakterie mohou rozrušovat minerály, čímž pomáhají ovlivňovat zvětrávání a rozklad těchto hornin. Celkové složení a kvalitu půdy charakterizuje množství a druh bakterií obsažených v půdě. Vyšší výskyt minerálů v půdě může mít za následek vyšší množství bakterií. Tyto bakterie budou také tvořit agregáty, které zvyšují celkovou kvalitu a zdraví půdy.^[13]

Jedním z nejvýraznějších rysů bakterií je jejich druhová rozmanitost s čím souvisí i jejich biochemická všestrannost.^[14] Bakteriální rod zvaný *Pseudomonas* dokáže metabolizovat širokou škálu chemikálií a hnojiv. Naproti tomu jiný rod známý jako *Nitrobacter* může získávat svou energii pouze oxidací dusitanů na dusičnany. Rod *Clostridium* je příkladem bakteriální všestrannosti, protože na rozdíl od většiny druhů může růst bez přítomnosti kyslíku, tedy fungovat anaerobně. Několik druhů *Pseudomonas*, je schopno aerobní i anaerobní respirace, za využití dusičnanu jako terminálního akceptoru elektronů.^[15]

Dusík je často nejvíce limitní živinou v půdě a ve vodě. Bakterie (např. *Nitrobacter*) jsou zodpovědné za rozklad organické hmoty (za vzniku dusičnanů) a proces fixace dusíku, což je přeměna atmosférického dusíku na sloučeniny obsahující dusík (např. amoniak), které mohou rostliny dále využívat.^[16]



Obr. č. 3: Schéma koloběhu dusíku v přírodě.

Aby mohly rostliny využívat dusík, musí být dostupný ve formě dusitanů, dusičnanů, amonných iontů anebo amoniaku. (převzato a upraveno dle ^[18])

Aby mohl být dusík rostlinami využit, musí být dostupný v anorganické formě, jako např. ve formě amoniaku (NH_3), amonných kationtů (NH_4^+) nebo dusičnanů (NO_3^-).^[17]

Dusíkaté sloučeniny jsou do okolního prostředí uvolňovány metabolismem či rozkladem uhynulých částí (Obr. č. 3). Organicky vázaný dusík mineralizují chemotrofní bakterie na amoniak procesem amonifikace. Uvolněný amoniak dále využívají nitrifikační bakterie a řasy. Nitrifikace je oxidace amoniaku na dusitany bakteriemi rodu *Nitrosomonas* a dusitanů na dusičnany bakteriemi rodu *Nitrobacter*.

Opačným procesem je denitrifikace probíhající v anaerobním prostředí. Bakterie rodu *Pseudomonas* využívají dusičnany jako akceptor elektronů z metabolismu a redukují ho na plyný dusík. Z exkrementů živočichů se do vodního prostředí dostává amoniak, močovina a kyselina močová. Na koloběhu dusíku se podílejí další typy bakterií, které rozkládají dusíkaté látky, např. amonizační bakterie.^[19]

1.2.2.3 Řasy

Řasy jsou fotosyntetizující, autotrofní mikroorganismy. Fotosyntéza je přeměna světelné energie na chemickou, která se využívá pro syntézu živin. Aby řasy mohly růst, musí mít dostatek světla a vlhkosti, proto upřednostňují růst u vodních ploch. Řasy nemusejí být přímo vystaveny slunečnímu svitu, mohou žít i pod povrchem půdy za rovnoměrných teplotních a vlhkostních podmínek. Řasy jsou také schopny konvertovat pro rostlinu nedostupný molekulární dusík na dostupný amoniak.^[16]

Sinice neboli *Cyanophyceae* jsou prokaryotické organismy schopné fotosyntézy a jsou často nazývané i modrozelené řasy. *Cyanophyceae* obsahují karotenoidy, fykobiliny, fykoerythrin (kvůli kterým mají modrozelenou až fialovou barvu) a také chlorofyl. ^[16] Jsou zodpovědné za fixaci dusíku. Množství dusíku, které fixují, závisí spíše na fyziologických a environmentálních faktorech než na schopnostech organismu. Mezi tyto faktory patří intenzita slunečního záření, koncentrace anorganických a

organických zdrojů dusíku, okolní teplota a stabilita povětrnostních podmínek.^[20] Sinice do půdy sekretují množství dalších látek jako jsou např. polysacharidy, karboxylové kyseliny, peptidy, hormony a enzymy.^[21]

1.2.2.4 Prvoci

Prvoci anebo *protozoa* jsou eukaryotické organismy, které byly jedny z prvních mikroorganismů, které se rozmnožovaly pohlavně, což je významný evoluční krok. Mnoho mikroorganismů se narodil od prvoků rozmnožovalo duplikací spor. Prvoky lze rozdělit do tří kategorií: bičíkovce, améby a nálevníky.^[20]

Bičíkovci jsou nejmenšími členy skupiny prvoků a lze je dále dělit podle toho, zda mají možnost fotosyntézy. Bičíkovci žijící v půdě neobsahují chlorofyl a tedy nejsou schopni fotosyntézy. Zatímco bičíkovci, kteří obsahují chlorofyl, se obvykle vyskytují ve vodním prostředí.^[20]

Améby jsou větší než bičíkovci a pohybují se jiným způsobem. Améby lze odlišit od ostatních prvoků podle jejich pseudopodií. *Pseudopodium* nebo „falešná noha“ je dočasný výrůstek z těla améby, který jí dává možnost pohybu, nebo pomáhá při příjmu potravy (fagocytóze).^[20]

Prvoci hrají důležitou roli v půdním ekosystému jako bakteriální konzumenti a v menší míře jako konzumenti hub. Metabolizují organický půdní dusík na amoniak, který může být přijímán rostlinami.^[22]

1.2.2.5 Aktinomycety

Aktinomycety jsou typem bakterií, které sdílejí některé vlastnosti s houbami. S největší pravděpodobností jsou výsledkem konvergentní evoluce v důsledku společného místa výskytu a společného způsobu příjmu potravy a metabolismu živin. Jednou z jejich nejdůležitějších vlastností je tvorba a sekrece antibiotik jako jsou např. streptomycin (*Streptomyces griseus*), neomycin (*Streptomyces fradiae*), erytromycin (*Streptomyces erythraeus*) a tetracyklin (*Streptomyces aureofaciens*) do půdy.^[20]

1.2.3 Půdní enzymy

Půdní enzymy jsou velmi důležitým prvkem v ekosystémových procesech, protože katalyzují reakce, které mají biogeochemický význam. V půdě bylo charakterizováno více než 100 různých enzymů zejména z tříd oxidoreduktas, transferas a hydrolas (např. amylasy, celulasy, chitinasy, proteasy, ureasa a fosfatasy).^[23]

Mezi zdroje půdních enzymů patří živé i mrtvé mikroorganismy, kořeny a zbytky rostlin. Enzymy stabilizované v půdní matrici se akumulují, nebo tvoří komplexy s organickou hmotou (humus) nebo jílem, ale již nejsou spojeny s životaschopnými buňkami. Předpokládá se, že 40 až 60 % enzymové aktivity v půdě může pocházet ze stabilizovaných enzymů, takže jejich aktivita nemusí nutně vysoce korelovat s mikrobiální biomasou. Enzymová aktivita v půdě je tedy z větší míry způsobena kumulativním účinkem dlouhodobé mikrobiální aktivity a aktivity životaschopné populace při odběru vzorků. Nicméně, příkladem enzymů, které odráží pouze aktivitu životaschopných buněk, jsou dehydrogenasy, které se teoreticky nemůžou vyskytovat v neživotaschopných buňkách a ve stabilizovaných půdních komplexech.^{[24],[25]}

Studie půdních enzymů poskytuje pohled na biogeochemický koloběh uhlíku a dalších živin a na funkce mikrobiálního osídlení. Relativně malé množství téměř jakéhokoliv enzymu lze přímo extrahovat z půdy. Aktivita enzymů se mění časově (sezónně), což často odpovídá životnímu cyklu mikrobiálního společenstva na daném území. Mění se také vertikálně (v mikroměřítku klesající od povrchu, podle distribuce mikrobiálního společenstva), a také na úrovni krajiny, kde je hlavním činitelem půdní typ (zejména textura půdy a distribuce organické hmoty).^[23]

Testy půdních enzymů se využívají pro různé aplikace v oblasti managementu ekosystémů. Několik enzymů z tříd dehydrogenas, celulas a proteas prokázalo citlivost při odrážení časných změn (1–3 roky) v kvalitě půdy v důsledku špatného hospodaření s půdou již dlouho předtím, než dojde k měřitelným změnám v hladinách celkového organického uhlíku. Tento poznatek má velký význam jako vodítko pro řízení ekosystému pro dlouhodobou udržitelnost.^[23]

1.2.3.1 β -Glukosidasa

β -Glukosidasa (EC 3.2.1.21) je běžným enzymem vyskytujícím v půdách.^[26] Je pojmenovaná podle typu vazby, kterou hydrolyzuje. Tento enzym hraje důležitou roli,

protože katalyzuje hydrolýzu a biologický rozklad různých β -glukosidů přítomných v rostlinných zbytcích.^{[27],[28]} Konečným produktem aktivity β -glukosidasy v půdě je glukosa, což je pro rostlinu i pro půdní mikroorganismy důležitý zdroj energie a také uhlíku pro stavbu sloučenin.^[29]

β -Glukosidasa se v půdě účastní enzymatické degradace celulosy, hlavní složky rostlinných polysacharidů. Celulosa se skládá z jednotek spojených β -1,4 vazbou a její enzymová degradace je zahájena endo- β -1,4-glukanasou (EC 3.1.2.4), která štěpí celulosové řetězce na menší jednotky, a celobiohydrolasou (EC 3.1.2.91), která odštěpuje disacharid celobiosu (dvě jednotky glukosy spojené β -1,4 vazbou) z redukujících konců molekul. β -Glukosidasa dokončuje proces hydrolýzy tím, že katalyzuje štěpení celobiosy za uvolnění dvou molekul glukosy.^[30]

β -Glukosidasa se využívá se jako půdní indikátor minulých biologických a hospodářských činností.^{[24],[31]} Tento poznatek výrazně usnadnil testování kvality půdy.^[24] Obecně platí, že aktivity β -glukosidasy (měřené např. mikrobiologickými testy nebo enzymovou analýzou s využitím p-nitrofenyl- β -D-glukopyranosidu jako substrátu s následnou kolorimetrickou detekcí) mohou poskytnout pokročilé informace o změnách v koncentracích organického uhlíku s vysokou citlivostí.^{[32],[33],[34]}

Někteří autoři uvádějí, že aktivita β -glukosidasy může způsobovat i fytopatologický efekt.^{[35],[36],[37]} Například některé aglykony vzniklé aktivitou β -glukosidasy jsou známými prekurzory toxických látek, které způsobují snížení kvality půdy a tím i života rostlin.^[38]

β -Glukosidasa je velmi citlivá na změny pH (její aktivita pozitivně koreluje s půdním pH s korelačním koeficientem $r=0,87$).^{[24],[33],[39],[40]} Tato její vlastnost může být využita jako spolehlivý biochemický indikátor pro měření ekologické změny vyplývající z acidifikace půdy. Také je známo, že aktivita β -glukosidasy je inhibovaná těžkými kovy, jako je např. měď a několik dalších.^{[41],[42]}

1.2.3.2 Kyselá a alkalická fosfatasa

Fosfor je po dusíku druhým nejdůležitějším nutrientem pro vyšší rostliny.^[42] V přírodě je jeho hlavní zásobárnou apatit, ložiska guána a fosforečnanová hnojiva.^[43] Vyskytuje se také ve velké míře v podobě organických sloučenin (např. esterů kyseliny fosforečné). Organické fosfáty hrají roli v procesu fotosyntézy, respirace, v procesu

biosyntézy proteinů a také je složkou nukleových kyselin. Vyskytuje se také v důležitých sloučeninách jako jsou ATP a NADPH.^[44] V půdě se fosfor také ve velké míře vyskytuje v organické formě.^[45]

Vznik anorganického fosfátu je zprostředkován za pomoci alkalické (EC 3.1.3.1) a kyselé fosfatasy (EC 3.1.3.2).^[26] Bylo dokázáno, že fosfatasy se vyskytují ve zvýšené koncentraci v rhizosféře, kde se nachází vyšší množství živých mikroorganismů.^[46]

Aktivita kyselé fosfatasy (AcP) v půdě pochází z mnoha zdrojů jako např. z kořenů rostlin^[47], hub^[48], mykorhizních hub^[49] a bakterií^[50]. Alkalická fosfatasa (AlP) je také produkována půdními mikroorganismy a půdní faunou (např. půdní červi *Eisenia foetida*, *Dendrobaena veneta* a *Lumbricus rubellus*)^[51]

1.2.3.3 α -Manosidasa

V literatuře se neuvádí stanovení aktivity α -manosidasy v souvislosti s půdou.

N-glykosylace je důležitou posttranslační modifikací proteinů ve všech eukaryotických buňkách. Ovlivňuje mnoho důležitých biologických procesů, jako je enzymová aktivita^[52], skládání proteinů^[53], intracelulární transport^[54] a komunikace buňka-buňka^[55]. U eukaryot se α -manosidasy třídy I účastní časných reakcí zpracování N-glykanů a zpětné vazby závislé na N-glykanu v endoplazmatickém retikulu.^[56]

Lysozomální α -manosidasa (EC 3.2.1.24) je hlavní exoglykosidasou v dráze degradace glykoproteinů. Existuje mnoho forem α -manosidas s různou lokalizací v buňce. Na základě inhibičních studií s analogy pyranosy a furanosy byly α -manosidasy rozděleny do dvou skupin. Ty ve třídě I jsou (α -2)-specifické enzymy jako např. α -manosidasa I lokalizovaná v Golgiho aparátu, zatímco ty ve třídě II mohou hydrolyzovat (α -2), (α -3) a také (α -6)-manosylové vazby.^[57]

α -Manosidasa byla také nalezena v půdních mikroorganismech z třídy *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Xanthomonas* a jedincích *Clostridium perefingens*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus pyogenes* a *Thermotoga maritima*.^[58]

1.2.3.4 β -Hexosaminidasa

β -Hexosaminidasa (EC 3.2.1.52) neboli β -N-acetylhexosaminidasa je enzym, který odštěpuje terminální N-acetyl- β -glukosaminidové a N-acetyl- β -galaktosaminidové

zbytky.^[59] Je jedním ze tří enzymů patřících do skupiny chitinas. Enzymy rozkládající chitin jsou v přírodě široce distribuovány. Chitin jako hlavní strukturní polysacharid v buněčných stěnách hmyzu a hub je důležitou zásobárnou organického uhlíku a dusíku v půdě. Aktivita β -hexosaminidasy pozitivně koreluje s množstvím hub v půdě a její aktivita byla měřena v houbě *Trichoderma harzianum*. Také byla v půdě nalezena v bakterii *Stackebrandtia nassauensis*.^[60]

β -Hexosaminidasa a α -manosidasa (EC 3.2.1.24) jsou exoglykosidasy, o kterých se předpokládá, že hrají hlavní roli při měknutí plodů během zrání. Vzájemný vztah mezi těmito dvěma exoglykosidasami byl popsán v kontextu zrání ovoce, kde byly sledovány jejich aktivity, profil izoform atd. v různých fázích vývoje a zrání papriky. Aktivita β -hexosaminidasy u papriky se během vývoje plodů pouze mírně zvýšila, zatímco ve fázi zrání výrazně vzrostla. Na druhé straně aktivita α -manosidasy byla výrazná během vývoje ovoce ve srovnání s její aktivitou během zrání. Bylo také zjištěno, že enzymová aktivita β -hexosaminidasy je v paprice vždy vyšší než aktivita α -manosidasy. Zralé plody vykazovaly nejvyšší aktivitu β -hexosaminidasy v různých částech rostliny. Nejvyšší aktivita α -manosidasy byla pozorována ve špičce výhonu následované květem, listovou stopkou a zralým plodem. Proteinový profil plodu byl během vývojové fáze výrazně odlišný od fáze zrání. Všechny tyto údaje naznačovaly vzájemný vztah mezi enzymovou aktivitou β -hexosaminidasy a α -manosidasy.^[61]

1.2.3.5 β -Galaktosidasa

Enzym β -galaktosidasa (EC 3.2.1.23) je enzym vyskytující se v mikroorganismech, rostlinách a u živočichů a katalyzuje hydrolýzu $\beta(1-3)$ a $\beta(1-4)$ galaktosylových vazeb v oligosacharidech^[62] tudíž odstraňuje koncové β -D-galaktosylové zbytky z β -D-galaktosidů.^[63] V genomu rajčete je β -galaktosidasa kódována 17 geny.^[63]

β -Galaktosidasa je velmi citlivá na přítomnost kontaminantů (např. těžkých kovů) v půdě, díky čemu je možné měření aktivity β -galaktosidasy použít jako objektivní nástroj na zhodnocení kvality půdy.^[64]

Mezi glukosidasami jsou α - a β -glukosidasa, stejně jako α - a β -galaktosidasa hlavními enzymy široce distribuovanými v půdách a slouží jako cenné indikátory pro biologicky dostupný uhlík. β -glukosidasa a β -galaktosidasa mají širokou substrátovou specifitu.^[65]

1.2.3.6 Endoglykosidasy

Enzymy z třídy glykosidas jsou klasifikovány na exoglykosidasy a endoglykosidasy podle jejich substrátové specifity. Endoglykosidasy hydrolyzují postranní cukerné řetězce glykoproteinů a různých jiných glykanů. Jsou specifické na větší glykany.^[66]

Důležitými endoglykosidasami v půdě jsou enzymy ze třídy celulas. Celulasy jsou enzymy, které katalyzují degradaci celulosy. Produkty degradace celulosy jsou glukosa, celobiosa a oligosacharidy s vyšší molekulovou hmotností.^[67] Důležitým enzymem v půdě je endo $\beta(1,3)$ -glukanasa (EC 3.2.1.39), která katalyzuje hydrolýzu $\beta(1,3)$ -glukosidových vazeb v $\beta(1,3)$ -D-glukanu, který je hlavní složkou buněčných stěn hub.^{[68],[69]}

Chitin je lineární polymer, který se skládá z $\beta(1,4)$ -N-acetylglukosaminu, a je po celulóze druhým nejrozšířenějším biopolymerem na Zemi. Obsahuje vysoké procento dusíku až okolo 6,9 %. Chitin lze nalézt ve vnější buněčné stěně řas a ve vnější kostře krabů, krevet, hmyzu, hub a humrů. Také se vyskytuje ve vnitřních strukturách bezobratlých živočichů. Buněčné stěny hub jsou tvořeny z 22-44 % chitinem. Chitinasy (EC 3.2.1.14) jsou glykosylhydrolasy o velikosti v rozmezí od 20 kDa do přibližně 90 kDa. Chitinasy jsou různorodou skupinou enzymů, které vykazují rozdíly ve své molekulární struktuře, substrátové specifitě a katalytickém mechanismu. Obecně se podílí na koloběhu živin, mineralizaci chitinu v půdním a mořském prostředí a na ochraně rostlin.^[70]

1.2.3.7 Proteasy

Proteasy jsou v půdě hojně zastoupeny a podílejí se na hydrolýze proteinů na peptidy a aminokyseliny. Hydrolytická degradace proteinů je důležitým krokem v koloběhu dusíku v přírodě. V půdách ošetřených herbicidy a insekticidy byla pozorována snížená aktivita proteas a ureas.^[71]

V půdě jsou extracelulární proteasy uvolňovány mikroorganismy, rostlinami, a jsou vyluhovány ze zemědělských hnojiv, ačkoli mikroorganismy jsou považovány za jejich dominantní zdroj.^[72] Měření proteolytické aktivity se stále více využívá jako indikátor kvality půdy a životaschopnosti půdních mikroorganismů.^[73]

1.2.4 Vliv pH půdy na dostupnost živin

Půdní pH hraje důležitou roli v dostupnosti živin nezbytných pro růst rostlin. Obecně platí, že optimální dostupnost živin pro rostlinu je při pH půdy 6,0 až 7,0. Nízké pH má za následek nižší míru mineralizace dusíkatých látek, což je proces závislý na aktivních životaschopných mikrobiálních populacích v půdě. Akumulace amoniaku byla tedy prokázána při nízkém pH půdy.^[74]

pH půdy ovlivňuje rozpustnost, koncentraci, iontovou formu a mobilitu mikronutrientů v půdě a následné získávání těchto prvků rostlinami. Zpravidla se dostupnost mědi, železa, manganu a zinku obvykle zvyšuje a molybdenu klesá s klesajícím pH půdy.^[75]

Bór je jedinou mikroživinou, která existuje v roztoku v neionizované formě v rozmezí pH půdy vhodném pro růst většiny rostlin. Zvýšení pH půdy snižuje dostupnost bóru zvýšením jeho adsorpce na jíly. Nejvyšší dostupnost bóru byla zaznamenána při pH 5,5–7,5 a mimo toto rozmezí se snižovala. Snížená dostupnost bóru může být také způsobena jeho adsorpcí i na uhličitán vápenatý. Z tohoto důvodu mohou mít rostliny pěstované ve vápnitých zásaditých půdách nedostatek bóru.^[76]

Značná část půdní mědi se specificky adsorbuje při zvýšení pH. Například zvýšení pH ze 4 na 7 zvýšilo adsorpci Cu^{2+} na anorganické složky půdy.^[77] Zvýšení pH půdy $>6,0$ vyvolává hydrolýzu hydratovaných Cu^{2+} iontů, což může vést k jejich silnější adsorpci na jílové minerály a organickou hmotu. Nadměrně vápenaté, zásadité půdy mohou také způsobovat nedostatek Cu^{2+} iontů.^[75]

Rozpustnost železa se snižuje přibližně 1000krát na každou jednotku zvýšení pH půdy v rozmezí 4–9.^[78] Železo se v půdě vyskytuje v podobě Fe^0 (čistý kov), Fe^{2+} (železnaté ionty) a Fe^{3+} (železité ionty). Za kyselých podmínek Fe^0 snadno oxiduje na Fe^{2+} a když se pH zvýší nad hodnotu 5, Fe^{2+} oxiduje na Fe^{3+} . Nejmenší rozpustnost železa se vyskytuje mezi pH 7,5 a 8,5, což je rozmezí pH většiny vápenatých půd.^[79]

pH půdy ovlivňuje rozpustnost, adsorpci, desorpci a oxidaci manganu a redukci oxidů manganu v půdě. Jak pH klesá, mangan se mobilizuje z různých frakcí a zvyšuje se jeho koncentrace a dostupnost v půdním roztoku. V písčité půdě mělo vyšší pH za následek zvýšení podílu organických frakcí manganu.^[80] Redukce Mn^{4+} na Mn^{2+} je největší při nízkém pH půdy a kyselé půdní podmínky vedou k toxicitě manganu pro mnoho citlivých druhů rostlin.^[81]

Molybden je jediná mikroživina, jejíž dostupnost se zvyšuje se zvyšujícím se pH půdy. Aktivní formou Mo je za normálních podmínek MoO_4^{2-} , který má tendenci ve vodném roztoku polymerovat. Tento stav je umocněn acidifikací, která by mohla částečně vysvětlit nízkou dostupnost Mo v kyselých půdách.^[82] Rozpustnost CaMoO_4 a H_2MoO_4 (kyselina molybdenová) se zvyšuje se zvyšováním pH půdy. Adsorpce Mo na oxidech Fe a Al se snižuje se zvyšujícím se pH půdy a přidání vápna do půdy zvyšuje rozpustnost Mo a přijímání Mo rostlinami.^[83]

Zvýšení pH půdy obecně snižuje dostupnost Zn pro rostliny, a takové poklesy jsou obvykle způsobeny vyšší adsorpcí Zn.^[84] Když se pH půdy zvýší nad pH 5,5, je Zn adsorbován na oxidy Al, Fe a Mn.^[85] Míra, do jaké se Zn zadržuje na oxidech Fe a Al, je také ovlivněna povahou jílových minerálů, a jejími povrchovými podmínkami.^[86] Každým snížením pH půdy v rozmezí od pH 5-7, klesá dostupnost zinku až 30krát.^[87]

1.3 Kořenový systém

Kořeny jsou orgány vyšších rostlin, které se specializují na výživu rostlin. Kořenový systém se neustále obnovuje opakovanou tvorbou nových kořenů a jejich růstem do délky.^[88]

Kořenový systém má rozvětvenou strukturu a specializovanou anatomii, které umožňují regulaci příjmu a výdeje živin na základě složení půdy. Během klíčení se z embrya umístěného v semeni vyvinou první tzv. semenné kořeny. Později se v průběhu života rostliny z existujících kořenů nebo stonků vyvinou další tzv. postembryonální kořeny. Existují velké rozdíly v proporcích různých kořenových systémů, což naznačuje jejich velkou rozmanitost.^[88]

Lze však rozlišit dva hlavní typy kořenových systémů. Systém kulových kořenů, který se vyskytuje u dvouděložných krytosemenných rostlin (např. řepka nebo hrách) a nahosemenných rostlin (např. borovice), je nejčastěji charakterizován tvorbou postranních kořenů na hlavním semenném kořeni. Většina jednoděložných krytosemenných rostlin (např. pšenice nebo rýže) má rozvětvený kořenový systém charakterizovaný několika semennými kořeny a četnými tzv. korunkovými kořeny, které jsou relativně stejné velikosti a tvaru vyrůstající od základny stonků. Tyto kořeny samy o sobě nesou postranní kořeny.^[88]

Průzkum vnitřní struktury kořenů odhaluje různé typy pletiv organizovaných v soustředných vrstvách. Typická anatomická organizace mladého kořene obsahuje zvenčí:

pokožku (epidermis) a kořenové vlásky, endodermis a ve středu stélu, která obsahuje cévní svazky.^[89]

Specifické vlastnosti těchto různých kořenových pletiv umožňují kořenu modulovat své výměnné kapacity s půdou. Kořenové vlásky zejména výrazně zvětšují výměnný povrch kořene a usnadňují přijímání vody a živin. Víceméně nepropustné bariéry obklopující buňky ve vnějším kortexu a endodermis regulují tok vody a živin do vodivých cév.^[90]

1.3.1 Vliv kořenového systému na půdní složení a mikroorganismy

Půda v kontaktu s kořeny se nazývá rhizosféra.^[91] Tato zóna hraje zásadní roli pro výživu rostliny a její vlastnosti jsou aktivně ovlivňovány kořeny. Kořeny vylučují specifické exudáty do rhizosféry v procesu zvaném kořenová exudace. Tento jev může pro rostlinu představovat velmi důležitou energetickou investici: 17 - 40 % celkového uhlíku produkovaného fotosyntézou může rostlina „exportovat“ do půdy. Tyto exudované molekuly mohou v závislosti na své povaze měnit fyzikálně-chemické vlastnosti půdy a zlepšovat dostupnost a mobilitu určitých živin. Mohou také ovlivnit rozmanitost mikroorganismů schopných interagovat s rostlinou.^[88]

Některé živiny jsou v půdě přítomny v chemické formě, která je pro rostlinu nedostupná. Kořenová exudace přispívá k dostupnosti těchto živin pro rostlinu mechanismy acidifikace půdy, exudací protonů nebo fyto sideroforů, které podporují získávání železa z půdy.^[92]

Exudace je také proces závislý na prostředí, ve kterém se kořen vyvíjí. Některé rostliny rostoucí v půdě chudé na fosfor například tvoří krátké a husté kořenové shluky. Tyto kořeny vylučují velké množství organických kyselin schopných snižovat pH půdy, díky čemuž se fosforečnany stávají lépe dostupnými pro rostlinu. Navíc tato půda bohatá na exudáty představuje důležitý zdroj živin pro mikroorganismy, které jsou potenciálně schopné vytvořit příznivé interakce s rostlinou.^[88]

Rhizosféra je obecně mikrobiologicky velmi aktivní. Některé kořenové exudáty působí jako atraktanty pro mikroorganismy.^[93] Molekuly strigolaktonu vylučované rostlinou do rhizosféry stimulují klíčení spor arbuskulárních mykorhizních hub. Látky produkované houbou zase podporují iniciaci kořenových procesů. Během této symbiózy dochází k zásobování rostliny vodou, fosfáty a dalšími látkami z půdy za pomoci

houbových vláken. Na oplátku houba získává z rostliny organické látky vzniklé v procesu fotosyntézy.^[88]

Do půdy jsou kořeny vylučovány také flavonoidy, nízkomolekulární sekundární metabolity rostlin (deriváty 2-fenyl-benzyl- γ -pyronu), které kvůli své chemické podstatě mohou interagovat s okolními organismy (např. brání klíčení semen jiných rostlin). Také mohou působit jako repelent proti půdním škůdcům, kteří se živí rostlinami. Mezi nejčastěji studované flavonoidy patří quercetin, myricetin a kaempferol.^[94]

Flavonoidy mohou také působit v symbiotických vztazích mezi druhy, zejména rostlinou a symbiotickými bakteriemi. Nízká koncentrace dusíku v půdě vyvolává akumulaci flavonoidů, které působí jako atraktanty pro diazotrofy, které rostlině poskytují amonné ionty výměnou za produkty fotosyntézy.^[94]

1.4 Půdní kontaminanty

Kontaminanty, jako například těžké kovy z průmyslového odpadu znečišťují pitnou vodu, půdu a potraviny.^[95] Také velké množství odpadu vzniklého lidskou činností a intenzivní používání chemikálií (Tabulka. č. 1) v posledních desetiletích vedlo k značné kontaminaci míst po celé Evropě. Některé tyto látky mohou mít ekotoxické účinky, čím představují riziko pro suchozemské a vodní ekosystémy.^[96] Emise nebezpečných látek pocházejících z lidské činnosti může zhoršit také kvalitu půdy a podzemních vod. Vliv kontaminace půdy na lidské zdraví může být přímý (vdechování, kontakt s pokožkou a dermální absorpce) a nepřímý (požitím kontaminovaných potravin).^[97]

Tabulka č. 1: Hlavní prvky kontaminující půdu, jejich přírodní a antropogenní zdroje. Prvky, které nejsou esenciální pro rostlinu mohou být ekotoxické již v malých koncentracích, přičemž prvky esenciální mají tyto vlastnosti až při vyšších koncentracích. *(převzato a upraveno dle ⁹⁸)*

Prvek	Esenciální pro rostlinu	Přírodní zdroje	Antropogenní zdroje
Arsen	ne	Písečné bouře	Těžba a spracování kovů
		Vulkanická činnost	Těžba a spalování uhlí
		Geotermální aktivita	Pesticidy
		Lesní požáry	Pyrotechnika
		Minerály bohaté na arsen	Baterie
Kadmium	ne	Minerály obsahující fosfáty	Pigmenty a barviva
		Minerály obsahující zinek a olovo	Exhaláty z aut
			Hnojiva obsahující fosfáty
Chrom	ano	Minerály obsahující chrom	Galvanické pokovení
			Slitiny
			Antikorozivní povrchy
			Pesticidy a detergenty
Měď	ano	Sulfidy a oxidy mědi	Elektronika
			Pokovení
			Fungicidy
			Rostlinné zbytky ošetřeny fungicidy
			Nátěry na ošetření dřeva
Olovo	ne	Minerály obsahující olovo	Baterie
			Slitiny
			Insekticidy
Rtuť	ne	Vulkanická činnost	Elektronika
		Lesní požáry	Baterie
		Minerály bohaté na rtuť	Červené barvivo
Nikl	ano	Minerály obsahující nikl	Slitiny
			Baterie
			Elektronika
Zinek	ano	Minerály obsahující zinek	Baterie
			Slitiny
			Antikorozivní povrchy
			Pneumatiky
			Pesticidy
			Hnojiva obsahující fosfáty

1.4.1 Antropogenní půdní kontaminanty

Pesticidy jsou heterogenní chemikálie široce využívané v zemědělství. Využívají se také na soukromé účely (zahrady) ale také v některých průmyslových odvětvích k čištění vozovek od plevelu nebo k zabránění růstu řas ve vodních plochách. Jejich toxicita je podmínkou jejich funkčnosti.^[99]

Očekává se, že se využívání pesticidů na ochranu plodin bude zvyšovat na základě rostoucí světové populace a potřeby většího množství potravin. V roce 2014 byla celosvětová spotřeba pesticidů asi dva miliony tun ročně, z toho 45 % v Evropě, 25 % v USA a 30 % ve zbytku světa.^[100]

Existuje více než 1000 účinných látek v různých druzích celosvětově využívaných pesticidů.^[101] Neustále se vyvíjejí nové účinné látky pesticidů vzhledem k jejich nadměrné spotřebě a tím i rostoucí rezistencí škůdců. Má se za to, že více než 98 % rozprašovaných pesticidů se nedostane na místo určení, čím se stávají umělými kontaminanty znečišťujícími vzduch, vodu a půdu.^[99]

Přebytek fungicidů v půdě může představovat vážnou hrozbu pro půdní organismy. Fungicidy mohou snížit půdní mikrobiologickou a biologickou aktivitu. Půdy kontaminované fungicidy je nutné obnovovat, aby byla zachována optimální funkce půdních ekosystémů.^[102]

1.4.1.1 Triazolové fungicidy

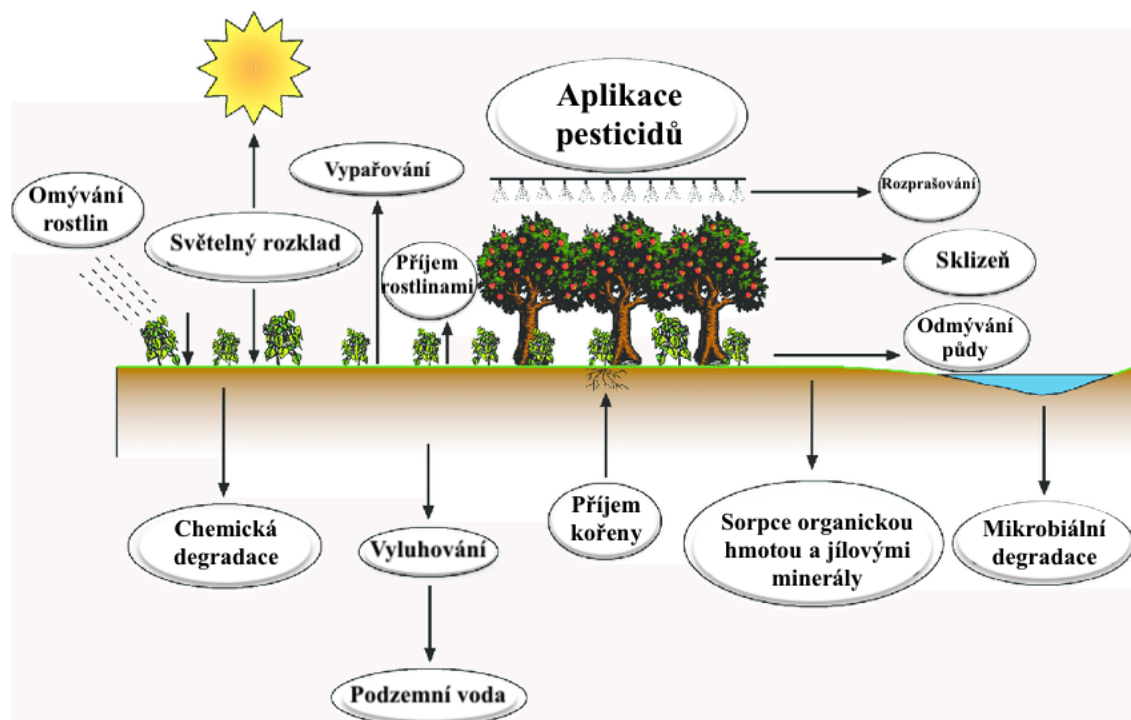
Triazoly jsou účinné, širokospektrální systémové fungicidy používané v zemědělství a medicíně. Redukují houbová onemocnění, která snižují produkci potravin a ohrožují lidské zdraví. Triazolové fungicidy jsou inhibitory 14- α -demethylasy (EC 1.14.14.154), enzymu produkovaného genem CYP51, čím zabraňují biosyntéze ergosterolu, který je nezbytný pro růst a reprodukci hub. Mezi běžně používané triazolové fungicidy patří tebukonazol a penkonazol.^[103]

Tebukonazol se běžně používá v zemědělství kvůli jeho účinnosti při inhibici cílových hub a jeho nízké ceně. Časté zemědělské používání tebukonazolu vedlo k jeho akumulaci v půdě a ve vodě po dobu až několika měsíců po přerušení expozice.^[103]

Tebukonazol má také toxické účinky na necílové organismy (Obr. č. 4, str. 28) a kvůli jeho častému používání a jeho specifickým interakcím způsobuje rezistenci u houbových patogenů. Ke zvýšení rezistence na triazoly u rostlinných houbových patogenů došlo u *Sphaerotheca fuliginea*, *Puccinia triticina*, *Zymoseptoria tritici* a *Penicillium digitatum*.^[103]

Dopady triazolových fungicidů na životní prostředí jsou četné. Je známo, že ovlivňují životaschopnost půdních mikroorganismů a také značně ovlivňují aktivitu půdních enzymů při 30 a víc násobném překročení doporučeného množství. Doporučené množství tebukonazolu je 5 mg/kg.^[104] Fungicidy mohou být pro půdní mikroorganismy vysoce toxické, protože pronikají do jejich buněk a narušují jejich metabolické funkce, což může vést k snížení mikrobiální populace citlivé na tyto látky.^[105] Tyto fungicidy omezují půdním mikroorganismům přístup k živinám. Mnohé změny biologické aktivity půdy jsou spojeny nejen s intenzitou použití fungicidů, ale také

se spektrem jejich působení a jejich stabilitou v půdním prostředí.^[106] Fungicidy pronikáním do půdního profilu zhoršují nejen proliferaci mikroorganismů, ale také ovlivňují produkci některých mikrobiálních enzymů (např. ureasy, proteas, fosfatas nebo β -glukosidasy). To následně vede k vyčerpání živin dostupných pro rostliny, a tím ke snížení úrodnosti a kvality půdy. Triazolové fungicidy pravděpodobně také interagují s aktivními centry enzymů z třídy cytochromů, což může vést k ovlivnění jejich katalytické aktivity.^[107]



Obr. č. 4: Aplikace pesticidů a jejich distribuce v ekosystému. Pesticidy (triazolové fungicidy) se prostřednictvím zemědělského používání (postřiků) dostávají do půdy a sorpcí i do podzemních vod. Z půdy se mohou vypařovat a v podobě dešťů se mohou dostávat na jiné rostliny. *(převzato a upraveno dle ¹⁰⁸)*

2 Cíle práce

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda triazolové fungicidy aplikované postřikem na rostliny rajčat nebo zálivkou ovlivňují parametry půdy.

1. Optimalizovat extrakci exoglykosidas a fosfatas z půdy.
2. Stanovení aktivity celulasy, endo- β (1,3)-glukanasy a chitinyasy v půdě ošetřené penkonazolem, tebukonazolem a jejich kombinací.
3. Stanovení aktivity β -glukosidasy, β -galaktosidasy, α -manosidasy a β -hexosaminidasy v půdě ošetřené penkonazolem, tebukonazolem a jejich kombinací.
4. Stanovení aktivity kyselá a alkalická fosfatasy v půdě ošetřené penkonazolem, tebukonazolem a jejich kombinací.
5. Stanovení celkového obsahu hub a celkového množství bakterií v půdě ošetřené penkonazolem, tebukonazolem a jejich kombinací.
6. Stanovení sledovaných enzymových aktivit v kořenech rostlin rajčat.

3 Materiál a metody

3.1 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy Sartorius ENTRIS
- Centrifuga Eppendorf Mini Spin
- Centrifuga Hettich UNIVERSAL 32 R s chlazením
- Centrifugační plastové zkumavky s víčkem o objemu 15,0 ml
- Inkubátor na mikrozukavky Major Science Elite
- Inkubátor s třesením VWR Thermal Shake lite
- Kádinky o různých objemech
- Lyofilizátor Finn-Aqua Lyovac GT2E
- Mikrotitrační destičky TPP, 96 jamkové
- Mikrozukavky Eppendorf o objemu 1,5 ml
- Multikanálová pipeta Nichyrio
- Odměrné válce o objemu 250,0 ml a 500,0 ml
- Pipety Biohit mLine
- Předvážky KERN 440-45
- Spektrofotometr DeNovix DS-11
- Spektrofotometr Tecan Sunrise
- Spektrofotometr Thermo SCIENTIFIC Multiskan GO
- Stojan na centrifugační zkumavky
- Stojan na mikrozukavky
- Špičky na pipety
- Termocykler Biorad CFX96 Connect real-time PCR
- Vaničky pro multikanálovou pipetu
- Vortex IKA 4 basic
- Zásobní láhve na pufry o objemu 500,0 ml

3.2 Chemikálie

3.2.1 Pufry

Byly připraveny následující pufry. Výrobce dané látky je uveden v závorce.

- 200 mM citrátový pufr o pH = 4,5, (VWR Life Science, USA)
- 200 mM citrátový pufr o pH = 6,0, (VWR Life Science, USA)
- 200 mM borátový pufr o pH = 9,0, (VWR Life Science, USA)
- 100 mM MOPS-NaOH pufr o pH = 5,0, (Sigma-Aldrich, USA)
- 100 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA s přídavkem 4 mg/ml PVP o pH 7,8, (Sigma-Aldrich, USA)

3.2.2 Substráty enzymů

Byly připraveny následující roztoky substrátů. Výrobce dané látky je uveden v závorce.

- 20 mM roztok p-nitrofenylfosfátu (Sigma-Aldrich, USA)
- 10 mM roztok p-nitrofenyl- β -D-glukopyranosidu (Sigma-Aldrich, USA)
- 2 mM roztok p-nitrofenyl-N-Acetyl- β -D-glukosaminidu (Sigma-Aldrich, USA)
- 20 mM roztok p-nitrofenyl- α -D-manopyranosidu (Sigma-Aldrich, USA)
- 10 mM roztok o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosidu (Sigma-Aldrich, USA)
- 1,6 mg/ml roztok laminarinu (Sigma-Aldrich, USA)
- 1,6 mg/ml roztok chitinu (Sigma-Aldrich, USA)
- 1,6 mg/ml roztok methylcelulosity (Sigma-Aldrich, USA)

3.2.3 Činidla

Byla připravena následující činidla. Výrobce dané látky je uveden v závorce.

- MBTH (3 mg/ml) s DTT (1 mg/ml) činidlo 1:1, (Sigma-Aldrich, USA)
- Fe^{3+} činidlo (0,5 % $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ + 0,5 % kyselina sulfanilová + 0,25 M HCl), (VWR Life Science, USA)- Roztok C pro stanovení dle Lowryho: 50,0 ml 2 % Na_2CO_3 v 0,1 M NaOH + 1,0 ml 0,5 % CuSO_4 v 1,0 % vinanu sodném (VWR Life Science, USA)
- Fenolové činidlo (ředěno 1:1 s destilovanou vodou, VWR Life Science, USA)

3.2.4 Ostatní chemikálie

- Souprava na izolaci DNA od firmy Favorgen Biotech Corp., FavorPrep™
(č. šarže CA522220617)

- SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad, USA

Primery pro stanovení celkových bakterií v půdě:^[109]

- Forward primer 5-3 TCCTACGGGAGGCAGCAGT (b16S)

- Reverse primer 5-3 GGA CTACCAGGGTATCTAATCCTGTT (b16S)

Primery pro stanovení celkových hub v půdě:^[110]

- Forward primer 5-3 TCCGTAGGTGAACCTGCGG (fITS)

- Reverse primer 5-3 CGCTGCGTTCTTCATCG (fITS)

- Destilovaná a RNase free voda

3.3 Metodika práce

3.3.1 Struktura experimentu

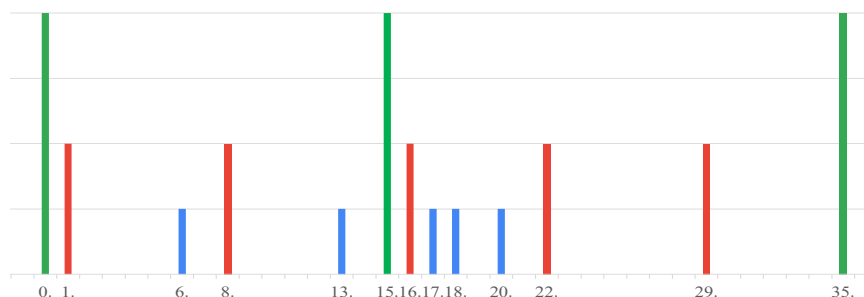
Rostliny rajčat (*Solanum lycopersicum*, cv. Cherrola) ošetřené triazolovými fungicidy byly pěstovány na České zemědělské univerzitě v Praze ve spolupráci s Ing. Michalem Jaklem, Ph.D. Pro ošetření byly zvoleny dva fungicidy penkonazol (P) a tebukonazol (T) a jejich kombinace (PT) v poměru 1:1. Zároveň aplikace probíhala dvěma způsoby, a to ve formě postřiku na listy (f) a zálivkou do půdy (s). Vždy bylo aplikováno $3,52 \cdot 10^{-6}$ mol fungicidu na rostlinu. Jednalo se tedy spolu s neošetřenými kontrolními rostlinami o 7 experimentálních skupin. Každá skupina se skládala z 6 rostlin rajčat (celkem 42 rostlin, Tabulka č. 2).

Tabulka č. 2: Struktura experimentu na zjištění vlivu triazolových fungicidů na rostliny rajčat. Na jednotlivé skupiny rajčat byly aplikovány roztoky triazolových fungicidů, penkonazolu a tebukonazolu (příp. jejich kombinace). Roztoky byly aplikovány zálivkou do půdy nebo postřikem na listy. Kontrolní skupina nebyla exponována triazolovým fungicidům, postřik nebo zálivka byla provedena destilovanou vodou.

Skupina č.	Typ ošetření	Rostliny č.
1	Postřik deionizovanou vodou (kontrola K)	1 -- 6
2	Zálivka penkonazolu do půdy (sP)	7 -- 12
3	Zálivka tebukonazolu do půdy (sT)	13 -- 18
4	Zálivka tebukonazolu a penkonazolu do půdy (sPT)	19 -- 24
5	Postřik penkonazolu na listy (fP)	25 -- 30
6	Postřik tebukonazolu na listy (fT)	31 -- 36
7	Postřik penkonazolu a tebukonazolu na listy (fPT)	37 -- 42

3.3.2 Pěstování rostlin

Všechny rostliny rajčete byly pěstovány v substrátu Agro® (pH = 5,0 - 7,0) s aktivním humusem a byly hnojeny hnojivem Kristalon® (Obr. č. 5). Pro experiment byly použity 6 týdenní rostliny, které byly během experimentu 5 x ošetřeny triazoly 5 x hnojeny a 3 x byla odebírána biomasa (0., 15., a poslední 35. den). Poslední den experimentu byly odebrány vzorky půdy a vzorky kořenů (Obr. č. 5). Kořeny byly řádně očištěny od zbytků půdy a jiných nečistot. Vzorky půdy byly lyofilizovány (Finn-Aqua Lyovac GT2E) a uskladněny v mrazicím boxu při -20°C a vzorky kořenů byly uskladněny v mrazicím boxu při -80°C.



Obr. č. 5: Schéma pěstování rajčat s označenými dny hnojení, postřiků a odebrání biomasy. Modrá barva představuje dny, kdy byla rostlina hnojena, zelená barva představuje sběr biomasy a červená barva značí den aplikace triazolových fungicidů. Pro experiment byly použity 6 týdenní rostliny.

3.3.3 Příprava extraktů z půdy

Tato metoda byla upravena dle ^[11]. Před extrakcí byly vzorky půdy temperovány na laboratorní teplotu. Z každého vzorku půdy byl navážen 1,0 g přímo do 15,0 ml centrifugační zkumavky. Ke každé navážce bylo přidáno 7,0 ml extrakčního pufru o pH experimentálně zjištěném při optimalizaci (Tabulka č. 3).

Tabulka č. 3: Jednotlivé extrakční pufrы pro přípravu extraktů pro stanovení enzymové aktivity. Pro každý enzym byl použit extrakční pufr o pH odpovídajícímu experimentálně zjištěnému pH optimu daného enzymu v půdě.

Enzym	Extrakční pufr	pH pufru
Kyselá fosfatasa	200 mM citrátový	4,5
Alkalická fosfatasa	200 mM borátový	9,0
α -Manosidasa	200 mM citrátový	6,0
β -Glukosidasa	200 mM citrátový	6,0
β -Galaktosidasa	200 mM citrátový	6,0
β -Hexosaminidasa	200 mM citrátový	6,0

Obsah zkumavky byl řádně promíchán a extrakce probíhala po dobu 60 minut za laboratorní teploty. Poté byly extrakty centrifugovány na centrifuze Hettich UNIVERSAL 32 R při 4°C po dobu 10 minut a 14000 x g. Po centrifugaci byl odpipetován 1,0 ml supernatantu z každého vzorku do příslušných 1,5 ml mikrozkuavek. Obsah mikrozkuavek byl poté ještě centrifugován na stolní centrifuze Mini-Spin (Eppendorf) po dobu 15 min při 11300 x g.

3.3.4 Příprava extraktů z kořenů

Tato metoda byla upravena dle ^[111]. Vzorky kořenů byly vytemperovány na laboratorní teplotu a homogenizovány ve třecí misce s kapalným dusíkem. Poté byl ke každému vzorku přidán extrakčního pufru o dvojnásobném objemu vůči hmotnosti kořenů. Pro stanovení exoglykosidas byly kořeny extrahovány v extrakčním pufru (100 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA o pH 7,8) a pro stanovení endoglykosidas byl použit 100 mM MOPS-NaOH pufr o pH = 5,0. Do směsi bylo také přidáno malé množství PVP (4 mg/ml) pro zachycení fenolických látek, které by mohly inhibovat enzymovou aktivitu. Extrakce probíhala 30 min za stálého míchání.

Poté byla směs převedena do 1,5 ml mikrozkuavek a byla centrifugována na centrifuze Hettich UNIVERSAL 32 R při 4°C po dobu 20 min a 16600 x g. Po centrifugaci byl supernatant pipetován do nových 1,5 ml mikrozkuavek.

3.3.5 Stanovení aktivity exoglykosidas a fosfatas v půdě

Tato metoda byla upravena dle ^[111]. Do jamek mikrotitrační destičky byla pipetována reakční směs: 10 µl reakčního pufru, 10 µl substrátu podle Tabulky č. 4.

Tabulka č. 4: Přehled reakčních pufrů a substrátů pro stanovení exoglykosidas v půdě. Pro každý enzym byl zvolen reakční pufr stejný jako extrakční pufr.

Enzym	Reakční pufr	Substrát
Kyselá fosfatasa	200 mM citrátový pH = 4,5	20 mM p-nitrofenylfosfát
Alkalická fosfatasa	200 mM borátový pH = 9,0	20 mM p-nitrofenylfosfát
α-Manosidasa	200 mM citrátový pH = 6,0	20 mM p-nitrofenyl-α-D-manopyranosid
β-Glukosidasa	200 mM citrátový pH = 6,0	10 mM p-nitrofenyl-β-D-glukopyranosid
β-Galaktosidasa	200 mM citrátový pH = 6,0	10 mM o-nitrofenyl-β-D-galaktopyranosid
β-Hexosaminidasa	200 mM citrátový pH = 6,0	2 mM p-nitrofenyl-N-Acetyl-β-D-glukosaminid

Reakce byla zahájena přidáním 20 μl extraktu a byla inkubována 24 hodin za laboratorní teploty. Po 24 hodinách byla reakce zastavena přidáním 160 μl 200 mM borátového pufru o $\text{pH} = 9,0$. Poté byla změřena absorbance při 405 nm. V případě blanku byla reakce ukončena před přidáním extraktu. Kalibrace byla vytvořena výměnou extraktu za roztoky p-nitrofenolu o výsledném látkovém množství: 1,2,3,4 a 5 μmol .

3.3.6 Stanovení aktivity exoglykosidas a fosfatas v kořenech

Tato metoda byla upravena dle ^[112]. Do jamek mikrotitrační destičky byla pipetována reakční směs: 10 μl reakčního pufru a 10 μl substrátu podle Tabulky č. 4, str. 34.

Reakce byla zahájena přidáním 20 μl extraktu z kořene. Poté byla měřena absorbance při 405 nm v čase $t = 0$ min (blank) a po 60 minutové inkubaci za laboratorní teploty.

3.3.7 Stanovení aktivity endoglykosidas v kořenech a v půdě

Tato metoda byla upravena dle ^[111]. Do 1,5 ml mikrotitračních zkumavek Eppendorf byla pipetována reakční směs: 20 μl 100 mM MOPS-NaOH pufru o $\text{pH} = 5,0$ spolu s 12 μl roztoku substrátu podle Tabulky č. 5.

Tabulka č. 5: Tabulka substrátů a reakčního pufru pro stanovení endoglykosidas v kořeni. Substráty pro stanovení enzymů byly vždy připraveny čerstvé.

Enzym	Reakční pufr	Substrát
Endo- β 1,3-glukanasa	100 mM MOPS-NaOH o $\text{pH} = 5,0$	laminarin (1,6 mg na 1 ml dH_2O)
Celulasa		methylcelulosa (1,6 mg na 1 ml dH_2O)
Chitinasa		chitin (1,6 mg na 1 ml dH_2O)

Reakce byla zahájena přidáním 8 μl extraktu a byla inkubována za stálého třepání při 37 °C po dobu 30 min pro extrakty z kořene a 60 min pro extrakty z půdy. Poté byla reakce zastavena přidáním 40 μl 0,5 M NaOH. Do směsi bylo přidáno 40 μl MBTH činidla s DTT a byla inkubována při 80 °C po dobu 15 min. Po inkubaci bylo do směsi přidáno 80 μl Fe^{3+} činidla. Blank byl vytvořen stejným způsobem, jenom byl extrakt inkubován 30 min při 80 °C spolu s 40 μl 0,5 M NaOH a poté byly přidány ostatní složky směsi. Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno v triplicátu 50 μl reakční směsi. Byla měřena absorbancí při 630 nm. Kalibrace byla vytvořena výměnou extraktu za roztoky glukosy o výsledném látkovém množství: 0,00; 0,02; 0,04 0,06; 0,08 μmol .

3.3.8 Stanovení množství hub a mikroorganismů v extraktech z půdy metodou RT-qPCR

Ze šesti vzorků půdy z jednotlivých skupin rostlin byl vytvořen směsný vzorek půdy, ze kterého byla izolována DNA (Tabulka č. 2, str. 32). Pro extrakci DNA z půdy byla použita komerčně dostupná souprava FavorPrep[™] (Favorgen Biotech, č. šarže CA522220617). Izolace DNA byla provedena bez odchylek podle návodu výrobce.

Návod na izolaci DNA podle soupravy FavorPrep[™] Pufry SDE1-4 použité v procesu izolace DNA byly součástí soupravy FavorPrep[™].

Proces izolace DNA z půdy probíhal následujícím způsobem:

1. Do 2,0 ml plastových vialek s víčkem bylo přidáno malé množství skleněných kuliček spolu s ~0,5 g půdy.
2. Do každé vialky bylo přidáno 600 µl SDE1 pufru a směs byla inkubována 10 minut při teplotě 70 °C. Po dobu inkubace byla směs 2x promíchána na vortexu.
3. Po inkubaci byly směsi centrifugovány 1 min na centrifuze Eppendorf Mini-spin.
4. Do směsí zchlazených na laboratorní teplotu bylo přidáno 200 µl SDE2 pufru. Poté byly řádně promíchány na vortexu a chlazeny na ledu.
5. Po zchlazení byly směsi centrifugovány na centrifuze Hettich UNIVERSAL 32 R po dobu 5 min při 18000 x g.
6. Supernatant byl opatrně přenesen do 1,5 ml mikrozkušavky a byl změřen jeho objem.
7. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno množství isopropylalkoholu v poměru 1:1 k objemu supernatantu. Směs byla promíchána na vortexu a poté centrifugována 10 min při 18000 x g.
8. Supernatant byl odstraněn překlopením mikrozkušavky na filtrační papír.
9. K peletě na dně mikrozkušavky bylo přidáno 200 µl elučního pufru, aby se peleta kompletně rozpustila.
10. Poté bylo přidáno 100 µl SDE3 pufru do každé mikrozkušavky a směsi byly inkubovány 3 min při laboratorní teplotě.
11. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 2 min při 18000 x g.
12. Supernatant byl opatrně přesunut do čisté 1,5 ml mikrozkušavky a byl změřen jeho objem.
13. Opakování kroku č. 3

14. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno množství SDE4 pufru adekvátní objemu supernatantu a stejným způsobem bylo přidáno adekvátní množství 96 % ethanolu.
15. Do 2,0 ml sběrných mikrozkušavek byly vloženy filtrační vložky s křemičitou membránou a byly do nich přesunuty směsi z kroku č. 14. Poté byly centrifugovány 1 min při 18000 x g. Po centrifugaci byly filtrační vložky přesunuty do čistých 2,0 ml sběrných mikrozkušavek.
16. Do každé filtrační vložky bylo pipetováno 750 µl promývacího pufru s 96 % ethanolu a byly centrifugovány 1 min při 18000 x g.
17. Opakování kroku č. 16
18. Pro osušení filtračních vložek byla vykonána ještě centrifugace po dobu 3 min při 18000 x g.
19. Filtrační vložky byly poté přesunuty do čistých 1,5 ml mikrozkušavek a bylo do nich přidáno 100 µl elučního pufru.
20. Pro eluci roztoku DNA byla vykonána centrifugace po dobu 1 min při 18000 x g.

Po izolaci DNA byla změřena koncentrace izolované DNA na spektrofotometru DeNovix DS-11. Na základě tohoto měření bylo zabezpečeno, aby v každé jamce mikrotitrační destičky bylo stejné množství DNA. Do každé jamky bylo pipetováno 5,0 µl Fast SYBR® green master mixu spolu, 0,3 µl forward primeru, 0,3 µl reverse primeru (kapitola 3.2.4, str. 32) a 2,4 µl RNase free vody. Do směsi bylo pipetováno 2,0 µl vhodně naředěného roztoku DNA. Do 2 jamek bylo pipetováno 2,0 µl RNase free vody (slepý vzorek). Mikrotitrační destička byla překryta PCR fólií a byla vložena do termocykleru (Bio-Rad CFX Connect) a byl nastaven program podle Tabulky č. 6.

Tabulka č. 6: Program RT-qPCR na stanovení celkového množství hub a bakterií v půdě. Reakce probíhala na termocykleru Biorad CFX96. Sekvence primerů b16S byla převzata z^[109] a sekvence primerů fITS byla převzata z^[110].

Prvotní denaturace	2 min - 50 °C
	2 min - 95 °C
Denaturace (40 x)	3 sek - 95 °C
Nasedání primerů a elongace (40 x)	30 sek - 60 °C
Konec PCR	15 sek - 95 °C
	1 min - 60 °C
	15 sek - 95 °C
	15 sek - 60 °C

3.3.9 Stanovení proteinů podle Lowryho

Metoda byla provedena dle ^[112]. Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 15 μ l extraktu. Do každé jamky bylo přidáno 165 μ l roztoku C (50,0 ml 2,0 % Na_2CO_3 v 0,1 M NaOH a 1,0 ml 0,5 % CuSO_4 v 1,0 % vinanu sodném) a směs byla inkubována za laboratorní teploty po dobu 10 min. Poté bylo přidáno 20 μ l fenolového činidla (ředěného 1:1 s dH_2O) a následovala 30 min inkubace. Poté byla změřena absorbance při 700 nm. Kalibrace byla vytvořena výměnou extraktu za standardní roztoky BSA o koncentraci: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 mg/ml.

3.3.10 Statistické zpracování dat

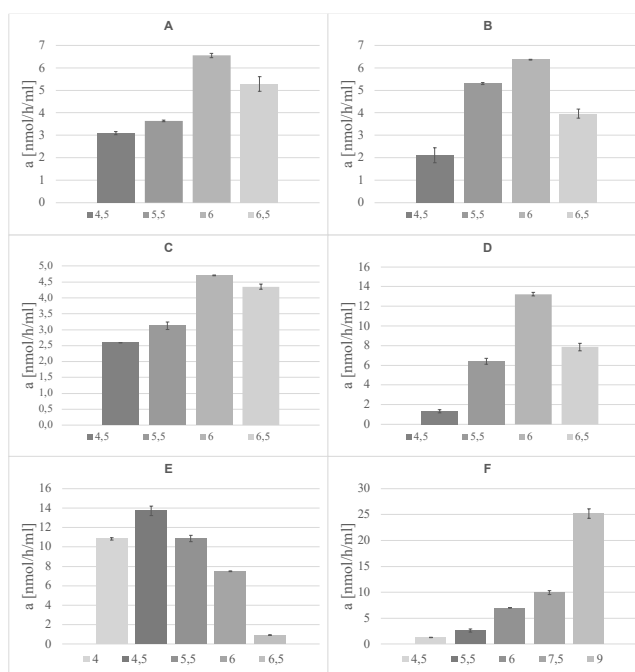
Statistické zpracování dat bylo provedeno metodou One way anova (Tukeyho metoda) v programu SigmaPlot v. 14.0. Statisticky významné změny byly považovány za signifikantní na hladině $p < 0,05$. V grafech výsledkové části jsou statisticky významné rozdíly vyjádřeny rozdílnými písmeny nad sloupci.

4 Výsledky

V této diplomové práci byla měřena aktivita vybraných exo- a endoglykosidas, alkalické a kyselé fosfatasy v půdě a kořenech skupin rostlin rajčat ošetřených triazolovými fungicidy. Bylo zkoumáno, jak aplikace penkonazolu, tebukonazolu a jejich kombinace zálivkou do půdy nebo postřikem na listy ovlivňuje aktivity těchto enzymů oproti kontrolní skupině. Také byly v extraktech půdy a kořenů změřeny koncentrace rozpustných proteinů podle Lowryho. Aktivita enzymů byla vztažena na gram lyofilizované půdy příp. čerstvou hmotnost kořenů (v grafech vždy část A) a na mg proteinů (specifická aktivita, vždy část B). V půdě bylo také detekováno celkové množství hub a bakterií metodou využívající qRT-PCR.

4.1 Optimalizace extrakce exoglykosidas a fosfatas z půdy

Při optimalizaci extrakce exoglykosidas a fosfatas z půdy bylo zjišťováno pH optimum daného enzymu v určitém pufru. Byly vyzkoušeny doby inkubace: 1, 6, 12 a 24 hodin. Pro měření enzymové aktivity exoglykosidas a fosfatas v půdě byl zvolen inkubační čas 24 hodin, protože aktivity exoglykosidas a fosfatas v půdě při inkubačním čase 1 a 6 byly pod limitem detekce a při inkubační čase 12 hodin byly měřeny velmi malé aktivity. Bylo zjišťováno pH pufrů: 4,5; 5,5; 6,0; 6,5 v případě exoglykosidas a v případě alkalické fosfatasy byly posuzovány i pufrы o pH 7,5 a 9,0. Bylo zjištěno, že optimální pH extrakčního a reakčního pufru pro stanovení aktivity vybraných exoglykosidas v půdě je 6,0. Také bylo zjištěno, že optimální pH pro stanovení aktivity kys. fosfatasy je 4,5 a alkalické fosfatasy je 9,0 (Obr. č. 6).



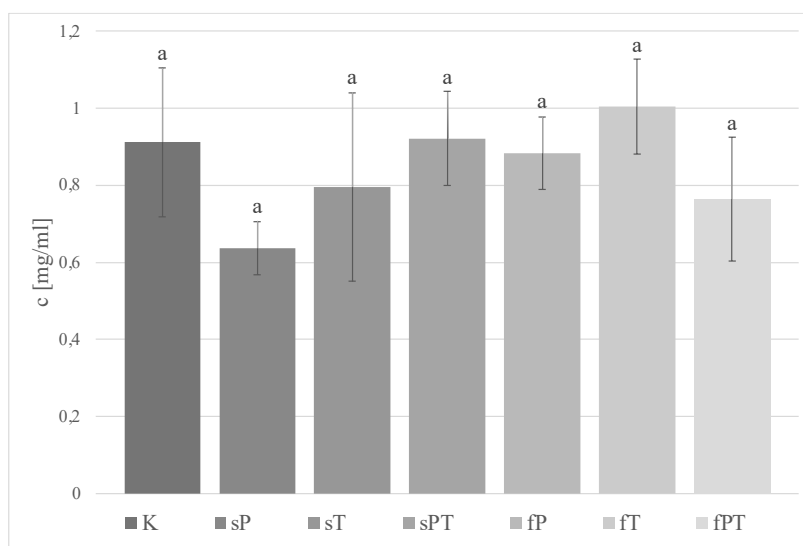
Obr. č. 6: Optimalizace pH optima exoglykosidas v půdě.

A značí β-glukosidasu, B značí α-manosidasu, C značí β-galaktosidasu, D značí β-hexosaminidasu, E značí kyselou fosfatasu a F značí alkalickou fosfatasu

4.2 Analýza půdy ošetřené triazolovými fungicidy

4.2.1 Stanovení koncentrace proteinů v extraktech z půdy

V extraktech z lyofilizované půdy byla stanovena koncentrace proteinů podle kapitoly 3.3.9, str. 38. (Obr. č. 7). K těmto hodnotám byly vztaženy aktivity endoglykosidas, exoglykosidas, kyselé a alkalické fosfatasy v půdě.



Obr. č. 7: Koncentrace proteinů v extraktech z půdy. Koncentrace proteinů v extraktech z půdy byla měřena Lowryho metodou. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny zálivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

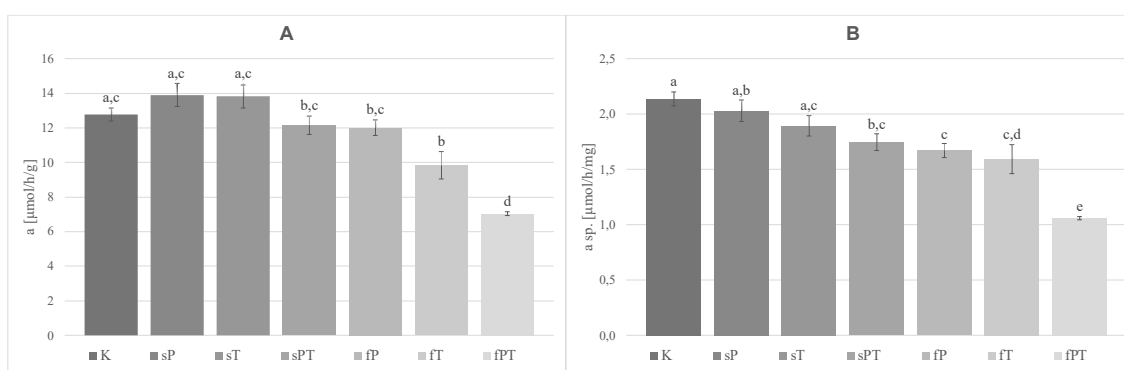
Nejvyšší koncentrace proteinů v extraktech z půdy byla naměřena ve skupině ošetřené postřikem tebukonazolu na listy (fT) a druhá nejvyšší byla naměřena v kontrolní skupině (K). Nejnižší koncentrace proteinů byla naměřena ve skupině ošetřené zálivkou penkonazolu do půdy (sP). Mezi jednotlivými skupinami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl.

4.2.2 Stanovení aktivit endoglykosidas v půdě ošetřené triazolovými fungicidy

V extraktech z půdy byly ve všech skupinách podle kapitoly 3.3.7, str. 35 detekovány aktivity vybraných enzymů z třídy endoglykosidas: chitinasy, celulasy a endo- β -1,3-glukanasy.

4.2.2.1 Aktivita chitiny v půdě

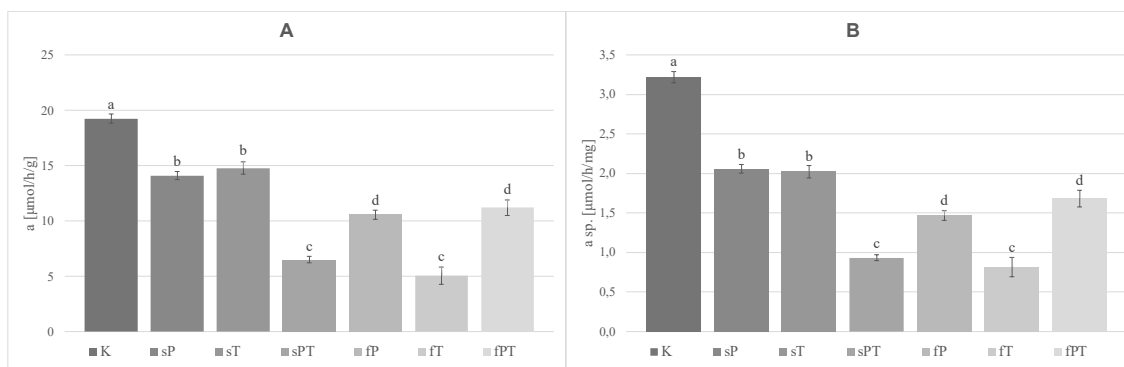
Aktivita chitiny vztažena na gram lyofilizované půdy (Obr. č. 8/A) sledovala trend specifické aktivity (Obr. č. 8/B). Nejvyšší aktivita chitiny v půdě vztažena na gram lyofilizované půdy byla naměřena ve skupině sP. Nejvyšší specifická aktivita chitiny byla naměřena v kontrolní skupině (K). Statisticky významný rozdíl aktivity vztažené na gram lyofilizované půdy oproti kontrolní skupině byl detekován ve skupinách fT (1,3-nás. snížení) a fPT (1,9-nás. snížení). Statisticky významný rozdíl specifické aktivity oproti kontrolní skupině byl detekován ve skupinách sPT (1,2-nás. snížení), fP (1,3-nás. snížení), fT (1,4-nás. snížení) a fPT (2,2-nás. snížení).



Obr. č. 8: Aktivita chitiny v půdě. V části obrázku označené jako A je aktivita chitiny vztažena na gram lyofilizované půdy. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita chitiny. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny zálivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.2.2.2 Aktivita celulasy v půdě

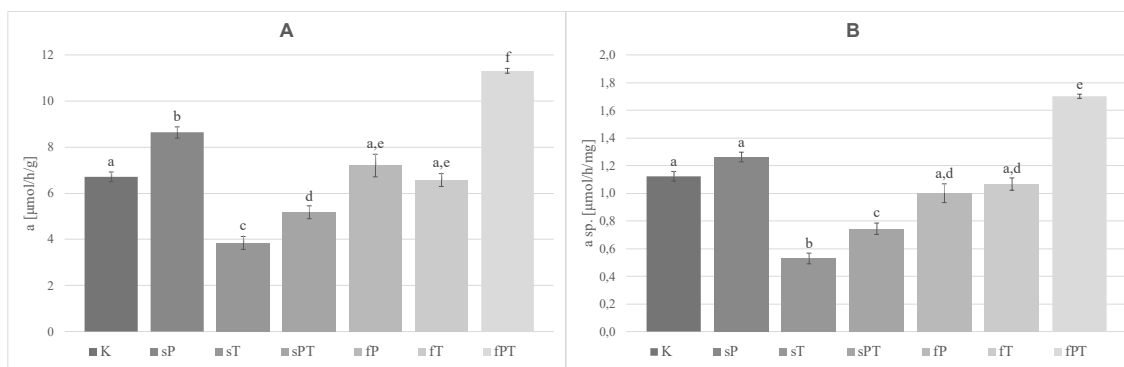
Aktivita celulasy vztažena na gram lyofilizované půdy (Obr. č. 9/A, str. 42) sledovala trend specifické aktivity (Obr. č. 9/B, str. 42). Nejvyšší aktivita celulasy v půdě vztažena na gram lyofilizované půdy byla naměřena v kontrolní skupině (K). Nejvyšší specifická aktivita celulasy byla také naměřena v kontrolní skupině (K). Statisticky významný rozdíl aktivity celulasy v půdě oproti kontrolní skupině byl detekován ve skupinách sP (1,4-nás. snížení), sT (1,3-nás. snížení), sPT (3,2-nás. snížení), fP (1,7-nás. snížení), fT (3,8-nás. snížení) a fPT (1,6-nás. snížení).



Obr. č. 9: Aktivita celulasy v půdě. V části obrázku označené jako A je aktivita celulasa vztažena na gram lyofilizované půdy. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita celulasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny zálivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.2.2.3 Aktivita endo- β -1,3-glukanasy v půdě

Aktivita endo- β -1,3-glukanasy vztažena na gram lyofilizované půdy (Obr. č. 10/A, str. 43) sledovala trend specifické aktivity (Obr. č. 10/B, str. 43). Nejvyšší aktivita endo- β -1,3-glukanasy v půdě, byla naměřena v skupině ošetřené postřikem penkonazolu a tebukonazolu na listy (fPT). Statisticky významný rozdíl aktivity endo- β -1,3-glukanasy vztažené na gram lyofilizované půdy oproti kontrolní skupině byl detekován ve skupinách sP (1,3-nás. zvýšení), sT (1,8-nás. snížení), sPT (1,3-nás. snížení) a fPT (1,6-nás. zvýšení). Statisticky významný rozdíl specifické aktivity endo- β -1,3-glukanasy v půdě oproti kontrolní skupině byl detekován ve skupinách sT (2,3-nás. snížení), sPT (1,5-nás. snížení) a fPT (1,5-nás. zvýšení).



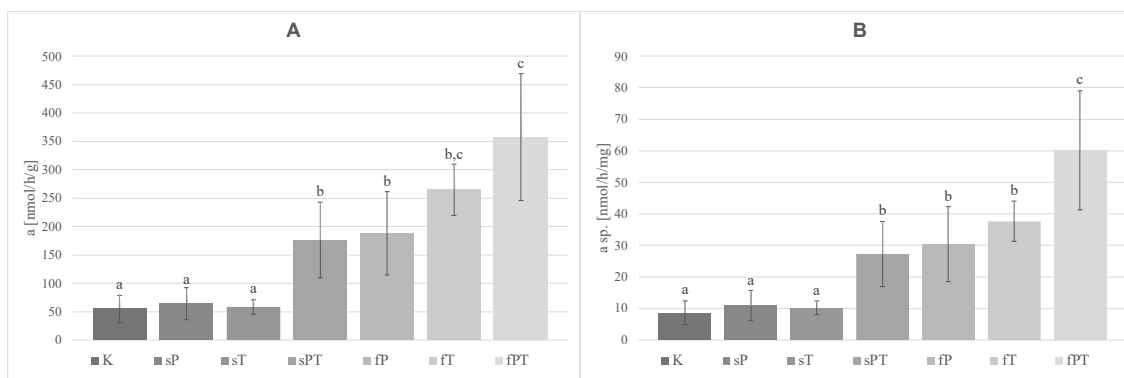
Obr. č. 10: Aktivita endo-β-1,3-glukanasy v půdě. V části obrázku označené jako A je aktivita endo-β-1,3-glukanasy vztažena na gram lyofilizované půdy. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita endo β-1,3-glukanasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny zálivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.2.3 Stanovení aktivity exoglykosidas v půdě ošetřené triazolovými fungicidy

V extraktech z půdy byly ve všech skupinách podle kapitoly 3.3.5, str. 34 zkoumány aktivity vybraných enzymů z třídy exoglykosidas: β-glukosidasy, α-manosidasy, β-galaktosidasy a β-hexosaminidasy.

4.2.3.1 Aktivita β-glukosidasy v půdě

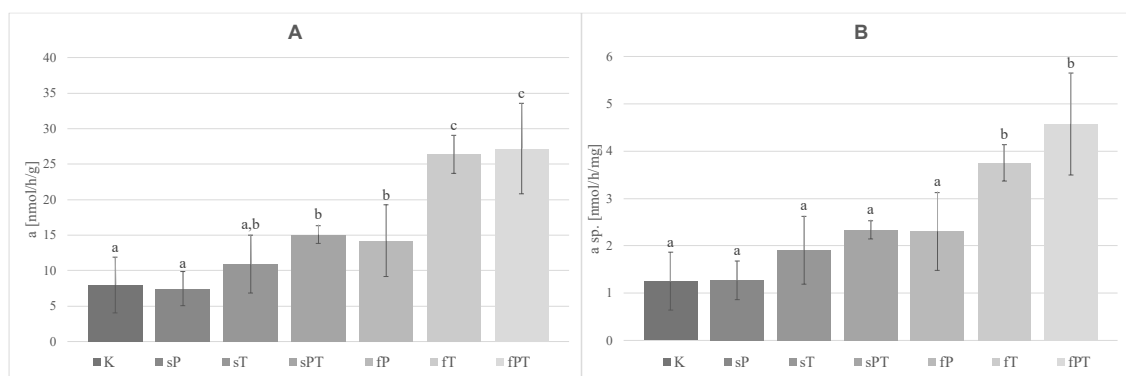
Aktivita β-glukosidasy v půdě vztažena na gram lyofilizované půdy (Obr. č. 11/A, str. 44) sledovala trend specifické aktivity (Obr. č. 11/B, str. 44). Její aktivita byla celkově nejvyšší ve skupině ošetřené postřikem penkonazolu a tebukonazolu na listy (fPT). Druhá nejvyšší aktivita β-glukosidasy vyšla ve skupině ošetřené postřikem tebukonazolu na listy (fT). Nejnižší aktivita byla naměřena v kontrolní skupině (K). Statisticky významný rozdíl aktivity β-glukosidasy v půdě oproti kontrolní skupině byl naměřen ve skupinách sPT (3,4-nás. zvýšení), fP (3,5-nás. zvýšení), fT (5,0-nás. zvýšení) a fPT (6,7-nás. zvýšení).



Obr. č. 11: Aktivita β -glukosidasy v půdě. V části obrázku označené jako A je aktivita β -glukosidasy vztažena na gram lyofilizované půdy. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita β -glukosidasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny zálivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.2.3.2 Aktivita α -manosidasy v půdě

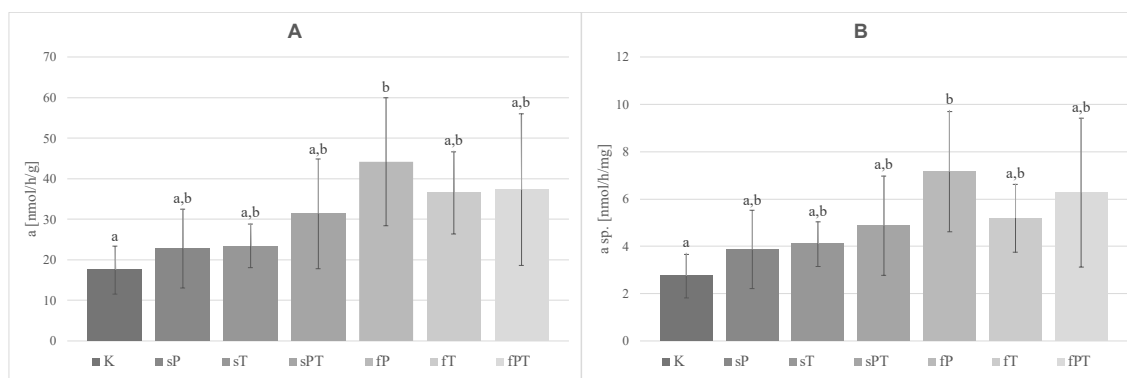
Aktivita α -manosidasy v půdě vztažena na gram lyofilizované půdy (Obr. č. 12/A) sledovala trend specifické aktivity (Obr. č. 12/B). Její aktivita byla nejvyšší ve skupině ošetřené postřikem penkonazolu a tebukonazolu na listy (fPT) a byla statisticky významně zvýšená oproti skupině kontrolní. Aktivita α -manosidasy vztažena na gram lyofilizované půdy byla statisticky významně zvýšená oproti kontrolní skupině ve skupinách sPT (1,9-nás. zvýšení), fP (1,8-nás. zvýšení), fT (3,3-nás. zvýšení) a fPT (3,4-nás. zvýšení). Specifická aktivita α -manosidasy byla statisticky významně zvýšená ve skupinách fT (3,5-nás. zvýšení) a fPT (4,2-nás. zvýšení).



Obr. č. 12: Aktivita α -manosidasy v půdě. V části obrázku označené jako A je aktivita α -manosidasy vztažena na gram lyofilizované půdy. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita α -manosidasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny zálivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.2.3.3 Aktivita β -galaktosidasy v půdě

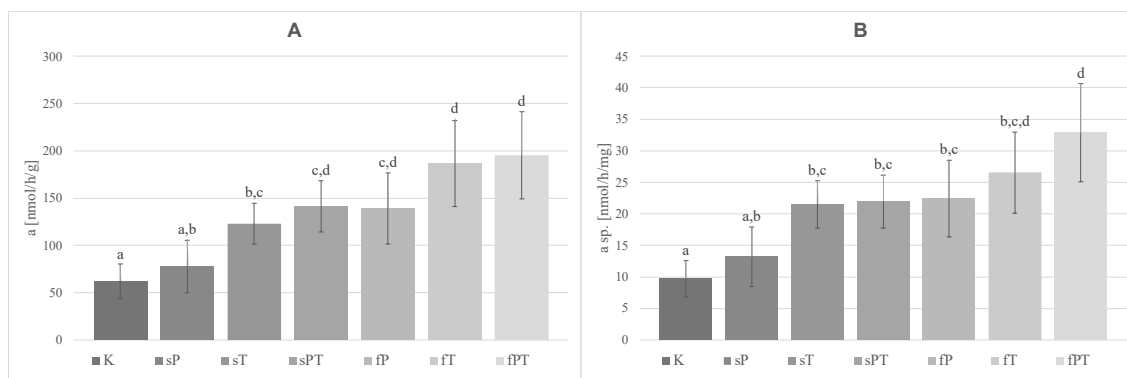
Aktivita β -galaktosidasy v půdě vztažena na gram lyofilizované půdy (Obr. č. 13/A) sledovala trend specifické aktivity (Obr. č. 13/B). Celkově nejvyšší aktivita β -galaktosidasy byla naměřena ve skupině ošetřené postřikem penkonazolu na listy (fP). Druhá nejvyšší aktivita byla naměřena ve skupině ošetřené postřikem penkonazolu a tebukonazolu na listy (fPT). Nejnižší aktivita β -galaktosidasy byla naměřena v kontrolní skupině (K). Statisticky významný rozdíl aktivity β -galaktosidasy oproti kontrolní skupině byl naměřen ve skupině fP (2,4-nás. zvýšení).



Obr. č. 13: Aktivita β -galaktosidasy v půdě. V části obrázku označené jako A je aktivita β -galaktosidasy vztažena na gram lyofilizované půdy. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita β -galaktosidasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny závlivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.2.3.4 Aktivita β -hexosaminidasy v půdě

Aktivita β -hexosaminidasy v půdě vztažena na gram lyofilizované půdy (Obr. č. 14/A, str. 46), sledovala trend specifické aktivity (Obr. č. 14/B, str. 46). Nejvyšší aktivita β -hexosaminidasy byla naměřena ve skupině ošetřené postřikem penkonazolu a tebukonazolu na listy (fPT). Nejnižší aktivita byla naměřena v kontrolní skupině (K). Statisticky významný rozdíl aktivity β -hexosaminidasy v půdě oproti kontrolní skupině byl naměřen ve skupinách sT (2,0-nás. zvýšení), sPT (2,3-nás. zvýšení), fP (2,3-nás. zvýšení), fT (3,0-nás. zvýšení) a fPT (3,2-nás. zvýšení).



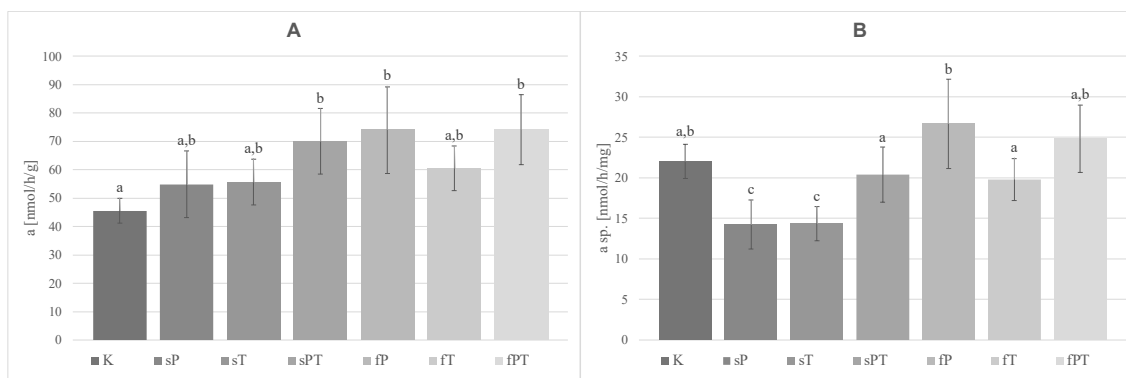
Obr. č. 14: Aktivita β -hexosaminidasy v půdě. V části obrázku označené jako A je aktivita β -hexosaminidasy vztažena na gram lyofilizované půdy. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita hexosaminidasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny zálivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.2.4 Stanovení aktivity fosfatasy v půdě ošetřené triazolovými fungicidy

V extraktech z půdy byly ve všech skupinách podle kapitoly 3.3.5, str. 34 stanoveny aktivity kyselé a alkalické fosfatasy.

4.2.4.1 Stanovení aktivity kyselé fosfatasy v půdě

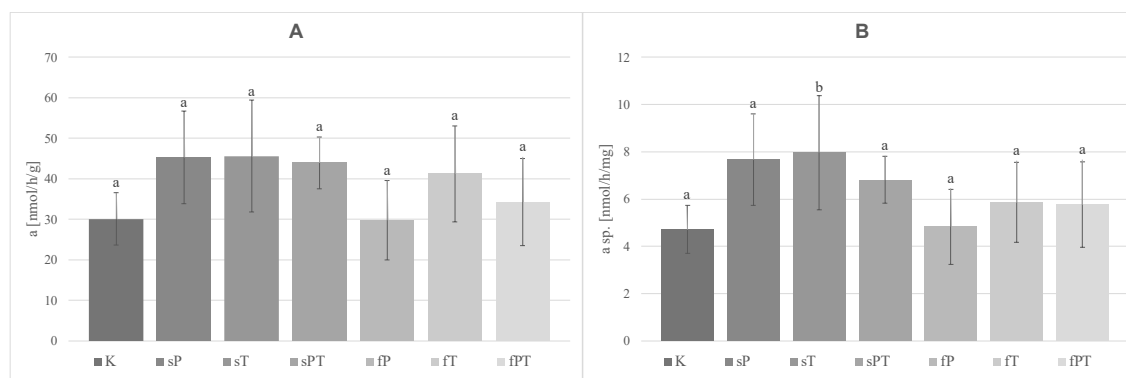
Trend aktivity kyselé fosfatasy v půdě vztažené na gram lyofilizované půdy (Obr. č. 15/A, str. 47) byl odlišný od aktivity vztažené na miligram proteinu (Obr. č. 15/B, str. 47) ve skupinách ošetřených zálivkou penkonazolu do půdy (sP), zálivkou tebukonazolu do půdy (sT) a v kontrolní skupině (K). Nejvyšší aktivita kyselé fosfatasy v půdě byla naměřena ve skupině ošetřené postřikem penkonazolu na listy (fP). Nejnižší naměřená aktivita vztažena na gram lyofilizované půdy byla v kontrolní skupině (K) a nejnižší aktivita vztažena na miligram proteinu byla ve skupině ošetřené zálivkou penkonazolu do půdy (sP). Statisticky významný rozdíl aktivity kyselé fosfatasy vztažené na gram lyofilizované půdy oproti kontrolní skupině byl naměřen ve skupinách sPT (1,6-nás. zvýšení), fP (1,6-nás. zvýšení) a fPT (1,6-nás. zvýšení). A statisticky významný rozdíl specifické aktivity kyselé fosfatasy v půdě oproti kontrolní skupině byl naměřen ve skupinách sP (1,6-nás. snížení) a sT (1,6-nás. snížení).



Obr. č. 15: Aktivita kyselé fosfatasy v půdě. V části obrázku označené jako A je aktivita kyselé fosfatasy vztažena na gram lyofilizované půdy. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita kyselé fosfatasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny zálivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.2.4.2 Stanovení aktivity alkalické fosfatasy v půdě

Aktivita alkalické fosfatasy v půdě vztažena na gram lyofilizované půdy (Obr. č. 16/A) sledovala trend specifické aktivity (Obr. č. 16/B). Nejvyšší aktivita byla naměřena ve skupině ošetřené zálivkou tebukonazolu do půdy (sT). Nejnižší aktivity byly naměřeny v: kontrolní skupině (K) a ve skupině ošetřené postřikem penkonazolu na listy (fP). Statisticky významný rozdíl specifické aktivity alkalické fosfatasy v půdě oproti kontrolní skupině byl naměřen ve skupině sT (1,6-nás. zvýšení).



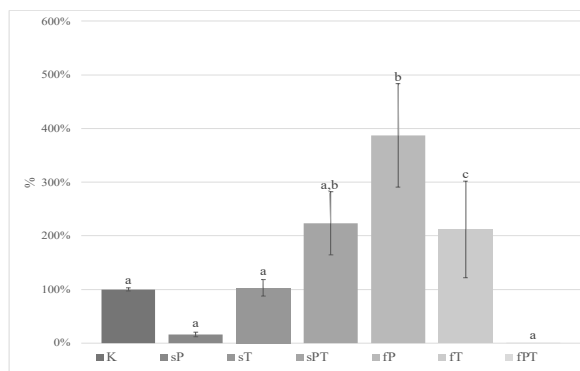
Obr. č. 16: Aktivita alkalické fosfatasy v půdě. V části obrázku označené jako A je aktivita alkalické fosfatasy vztažena na gram lyofilizované půdy. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita alkalické fosfatasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny zálivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.3 Stanovení množství hub a bakterií v půdě ošetřené triazolovými fungicidy

Metoda stanovení množství hub a bakterií, RT-qPCR, byla upravena dle [113]. Z půdy byla izolována DNA a v jednotlivých skupinách byl stanoven celkový obsah hub a bakterií metodou RT-qPCR podle kapitoly 3.3.8, str. 36. Výsledky RT-qPCR byly vyhodnoceny podle metody Livak-Schmittgen.[114]

4.3.1 Stanovení hub

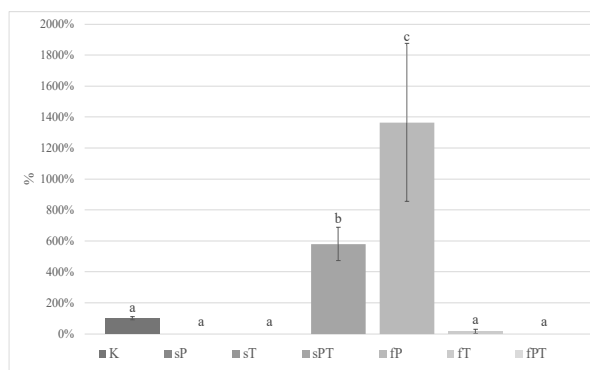
Nejvyšší množství hub bylo naměřeno ve skupině ošetřené postřikem penkonazolu na listy (fP) a nejnižší ve skupině ošetřené záhlvkou penkonazolu do půdy (sP). Ve skupině fPT nebylo nalezeno žádné množství hub. Statisticky významný rozdíl v množství hub oproti kontrole byl naměřen ve skupinách fP a fT. (Obr. č. 17)



Obr. č. 17: Množství hub v půdě v jednotlivých skupinách. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny záhlvkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.3.2 Stanovení bakterií

Nejvyšší množství bakterií bylo naměřeno ve skupině ošetřené postřikem penkonazolu na listy (fP). Ve skupinách skupinách sP, sT a fPT nebylo nalezeno žádné množství bakterií. Nejnižší množství bakterií bylo naměřeno ve skupině fT. Statisticky významný rozdíl v množství hub oproti kontrole byl naměřen ve skupinách sPT a fP. (Obr. č. 18).

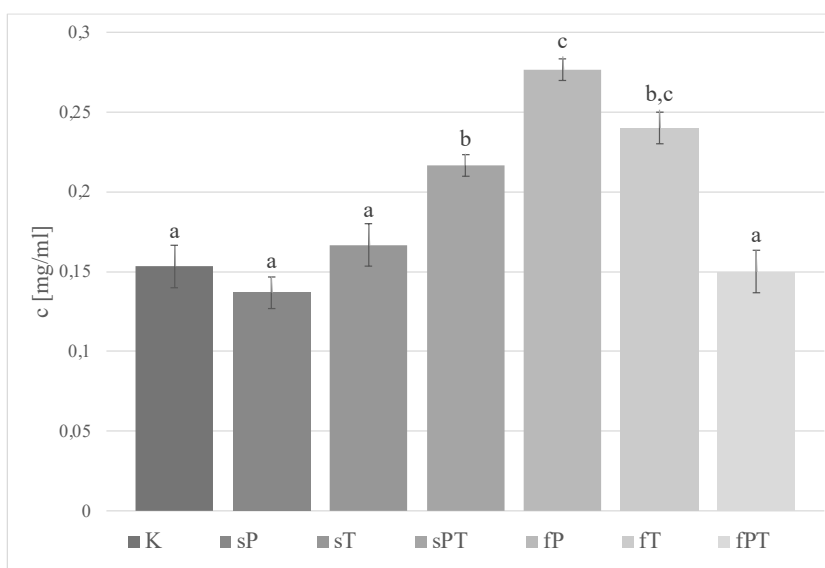


Obr. č. 18: Množství bakterií v půdě v jednotlivých skupinách. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny záhlvkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.4 Analýza kořenů rostlin rajčat ošetřených triazolovými fungicidy

4.4.1 Stanovení koncentrace proteinů v kořenech ošetřených triazolovými fungicidy

V extraktech z kořene byla stanovena koncentrace proteinů podle kapitoly 3.3.9, str. 38. (Obr. č. 19). K těmto hodnotám byly vztaženy aktivity endoglykosidas, exoglykosidas, kyselé a alkalické fosfatasy v kořenech.



Obr. č. 19: Koncentrace proteinů v extraktech z kořene. Koncentrace proteinů v extraktech z kořene byla měřena Lowryho metodou. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny závlivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

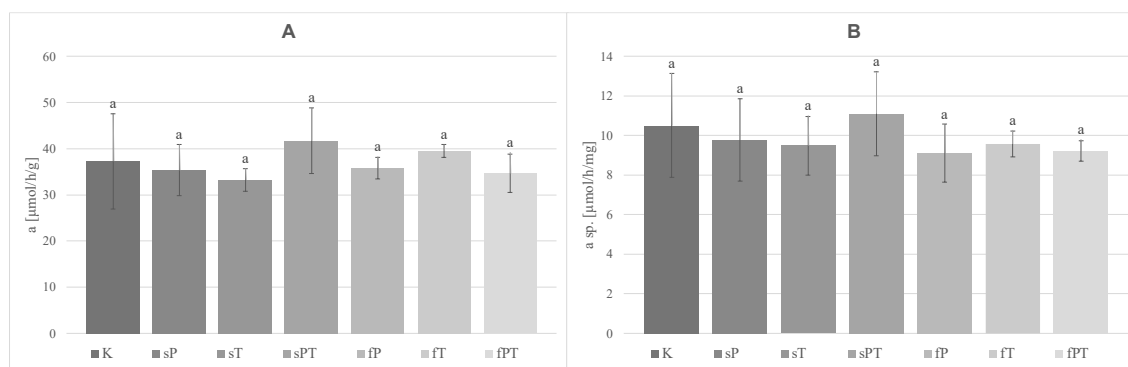
Nejvyšší koncentrace proteinů v kořeni byla naměřena ve skupině ošetřené postřikem penkonazolu na listy (fP). Druhá nejvyšší koncentrace proteinů byla naměřena ve skupině ošetřené postřikem tebukonazolu na listy (fT). Nejnižší byla naměřena ve skupině ošetřené závlivkou penkonazolu do půdy (sP). Statisticky významný rozdíl v koncentraci proteinů oproti kontrole byl naměřen ve skupinách sPT (1,4-nás. zvýšení), fP (1,8-nás. zvýšení) a fT (1,6-nás. zvýšení).

4.4.2 Stanovení aktivity endoglykosidas v kořenech ošetřených triazolovými fungicidy

V extraktech z kořene byly ve všech skupinách podle kapitoly 3.3.7, str. 35 detekovány aktivity vybraných enzymů z třídy endoglykosidas: chitinasy, celulasy a endo- β -1,3-glukanasy.

4.4.2.1 Aktivita chitinasy v kořenech

Aktivita chitinasy v kořenech vztažena na gram čerstvé hmotnosti (Obr. č. 20/A) sledovala trend specifické aktivity (Obr. č. 20/B) s výjimkou skupiny ošetřené zálivkou tebukonazolu do půdy (sT). Nejvyšší aktivita chitinasy v kořenech byla naměřena ve skupině ošetřené zálivkou penkonazolu a tebukonazolu do půdy (sPT). Jinak se aktivita chitinasy v kořenech mezi jednotlivými skupinami značně nelišila. Mezi aktivitami chitinasy v jednotlivých skupinách nebyl naměřen statisticky významný rozdíl (Obr. č. 20/A,B).

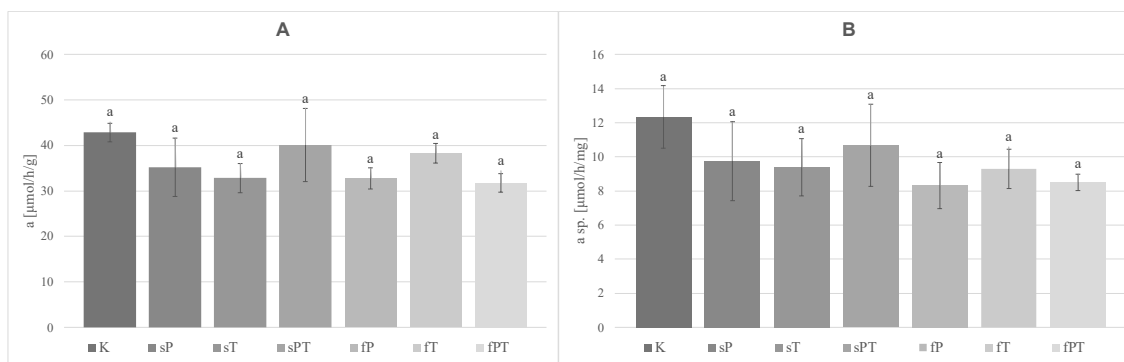


Obr. č. 20: Aktivita chitinasy v kořenech. V části obrázku označené jako A je aktivita chitinasy vztažena na gram čerstvé hmotnosti. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita chitinasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny zálivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.4.2.2 Aktivita celulasy v kořenech

Aktivita celulasy v kořenech vztažena na gram čerstvé hmotnosti (Obr. č. 21/A, str. 51) sledovala trend specifické aktivity (Obr. č. 21/B, str. 51). Nejvyšší aktivita celulasy byla naměřena v kontrolní skupině (K). Druhá nejvyšší aktivita byla naměřena

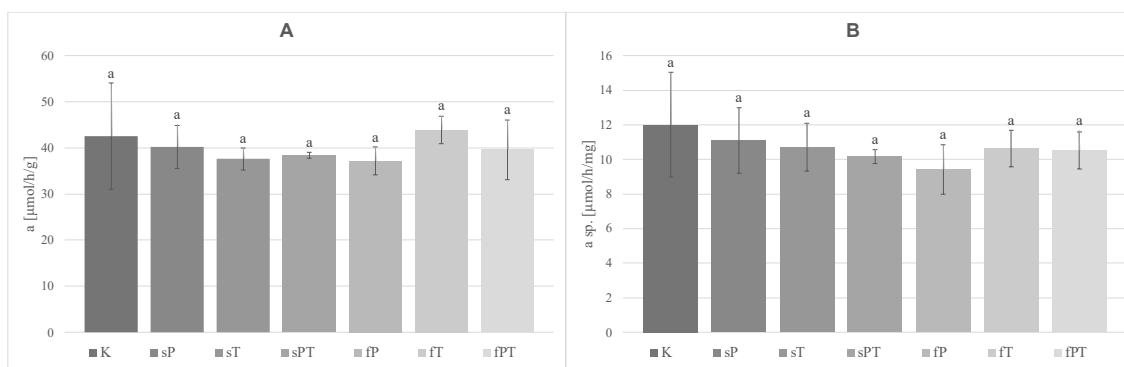
ve skupině ošetřené závlivkou penkonazolu a tebukonazolu do půdy (sPT). Její aktivita se v ostatních skupinách statisticky významně nelišila.



Obr. č. 21: Aktivita celulasy v kořenech. V části obrázku označené jako A je aktivita celulasy vztažena na gram čerstvé hmotnosti. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita celulasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny závlivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.4.2.3 Aktivita endo-β-1,3-glukanasy v kořenech

Aktivita endo-β-1,3-glukanasy v kořenech vztažena na gram čerstvé hmotnosti (Obr. č. 22/A) sledovala trend specifické aktivity (Obr. č. 22/B) s výjimkou skupiny Mezi aktivitami endo-β-1,3-glukanasy v kořenech v jednotlivých skupinách nebyl naměřen statisticky významný rozdíl.



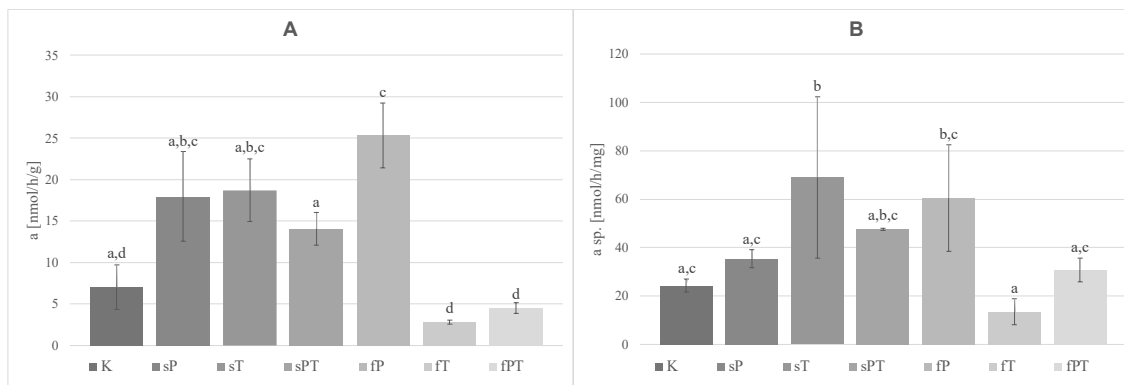
Obr. č. 22: Aktivita endo-β-1,3-glukanasy v kořenech. V části obrázku označené jako A je aktivita β-1,3-glukanasy vztažena na gram čerstvé hmotnosti. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita β-1,3-glukanasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny závlivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.4.3 Stanovení aktivity exoglykosidas v kořenech ošetřených triazolovými fungicidy

V extraktech z kořene byly ve všech skupinách podle kapitoly 3.3.6, str. 35 zkoumány aktivity vybraných enzymů z třídy exoglykosidas: β -glukosidasy, α -manosidasy, β -galaktosidasy a β -hexosaminidasy.

4.4.3.1 Aktivita β -glukosidasy v kořenech

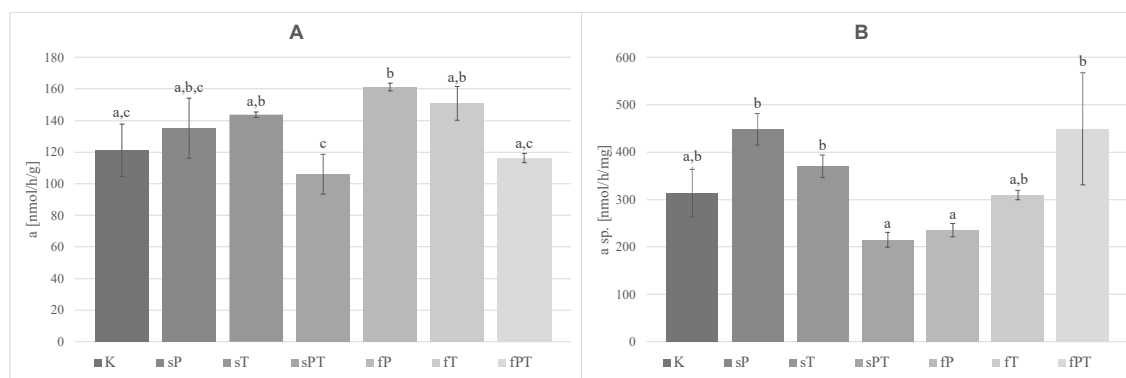
Aktivita β -glukosidasy v kořenech vztažena na gram čerstvé hmotnosti (Obr. č. 23/A) se značně lišila od specifické aktivity (Obr. č. 23/B). Největší aktivita byla naměřena ve skupině ošetřené postřikem penkonazolu na listy (fP) v případě vztažení aktivity na gram čerstvé hmotnosti (Obr. č. 23/A). Nejnížší aktivita β -glukosidasy v kořenech byla naměřena ve skupině ošetřené postřikem tebukonazolu na listy (fT). Statisticky významný rozdíl aktivity β -glukosidasy vztažené na gram čerstvé hmotnosti v kořenech oproti kontrole byl naměřen ve skupinách fP (3,6-nás. zvýšení), fT (2,8-nás. snížení) a fPT (1,8-nás. snížení). Statisticky významný rozdíl specifické aktivity β -glukosidasy v kořenech oproti kontrole byl naměřen ve skupině sT (2,7-nás. zvýšení).



Obr. č. 23: Aktivita β -glukosidasy v kořenech. V části obrázku označené jako A je aktivita β -glukosidasy vztažena na gram čerstvé hmotnosti. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita β -glukosidasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny závlivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.4.3.2 Aktivita α -manosidasy v kořenech

Aktivita α -manosidasy v kořenech vztažena na gram čerstvé hmotnosti (Obr. č. 24/A) se značně lišila od specifické aktivity (Obr. č. 24/B). Nejvyšší aktivita α -manosidasy v kořenech vztažená na gram čerstvé hmotnosti byla naměřena ve skupině ošetřené postřikem penkonazolu na listy (fP). Nejvyšší specifická aktivita α -manosidasy v kořenech byla naměřena ve skupině ošetřené postřikem penkonazolu a tebukonazolu na listy (fPT). Celkově nejnižší aktivita α -manosidasy v kořenech byla naměřena ve skupině ošetřené závlivkou penkonazolu a tebukonazolu do půdy (sPT). Statisticky významný rozdíl aktivity α -manosidasy vztažené na gram čerstvé hmotnosti v kořenech oproti kontrole byl naměřen ve skupině fP (1,3-nás. zvýšení). V případě specifické aktivity α -manosidasy nebyl naměřen statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině ani v jedné ze skupin.

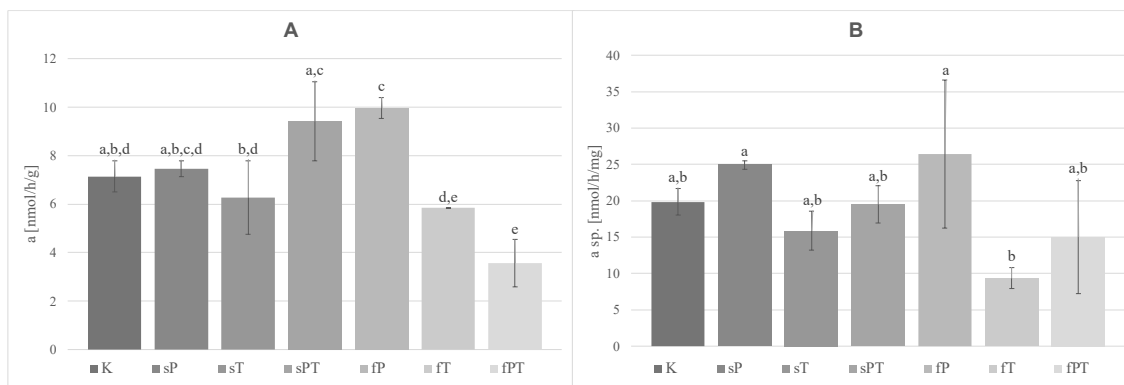


Obr. č. 24: Aktivita α -manosidasy v kořenech. V části obrázku označené jako A je aktivita α -manosidasy vztažena na gram čerstvé hmotnosti. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita α -manosidasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny závlivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.4.3.3 Aktivita β -galaktosidasy v kořenech

Aktivita β -galaktosidasy v kořeni vztažena na gram čerstvé hmotnosti (Obr. č. 25/A, str. 54) se značně lišila od specifické aktivity (Obr. č. 25/B, str. 54). Celkově nejvyšší aktivita β -galaktosidasy v kořenech byla naměřena ve skupině ošetřené postřikem penkonazolu na listy (fP). Nejnižší aktivita β -galaktosidasy v kořenech vztažená na gram čerstvé hmotnosti byla naměřena ve skupině ošetřené postřikem

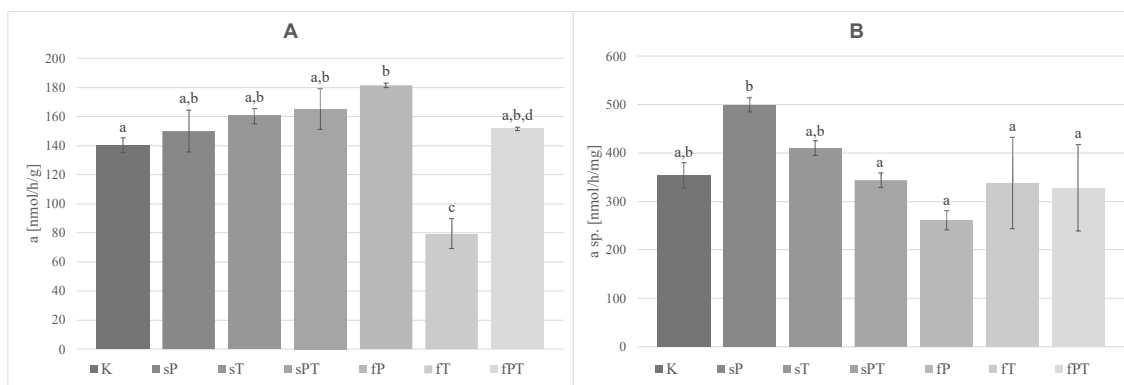
penkonazolu a tebukonazolu na listy (fPT). Nejnižší specifická aktivita β -galaktosidasy v kořenech byla naměřena ve skupině ošetřené postřikem tebukonazolu na listy (fT). Statisticky významný rozdíl aktivity β -galaktosidasy vztažené na gram čerstvé hmotnosti v kořenech oproti kontrole byl naměřen ve skupinách fP (1,3-nás. zvýšení), fT (1,2-nás. snížení) a fPT (1,8-nás. snížení). Statisticky významný rozdíl specifické aktivity β -galaktosidasy oproti kontrole byl naměřen ve skupině fT (2,2-nás. snížení).



Obr. č. 25: Aktivita β -galaktosidasy v kořenech. V části obrázku označené jako A je aktivita β -galaktosidasy vztažena na gram čerstvé hmotnosti. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita β -galaktosidasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny závlivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.4.3.4 Aktivita β -hexosaminidasy v kořenech

Aktivita β -hexosaminidasy v kořeni vztažena na gram čerstvé hmotnosti (Obr. č. 26/A, str. 55) se značně lišila od specifické aktivity (Obr. č. 26/B, str. 55). Nejvyšší aktivita β -hexosaminidasy v kořenech vztažená na gram čerstvé hmotnosti byla naměřena ve skupině ošetřené postřikem penkonazolu na listy (fP). Nejvyšší specifická aktivita β -hexosaminidasy v kořenech byla naměřena ve skupině ošetřené závlivkou penkonazolu do půdy (sP). Statisticky významný rozdíl aktivity β -hexosaminidasy vztažené na gram čerstvé hmotnosti v kořenech oproti kontrole byl naměřen ve skupinách fP (1,3-nás. zvýšení) a fT (1,8-nás. snížení). V případě specifické aktivity β -hexosaminidasy nebyl naměřen statisticky významný rozdíl.



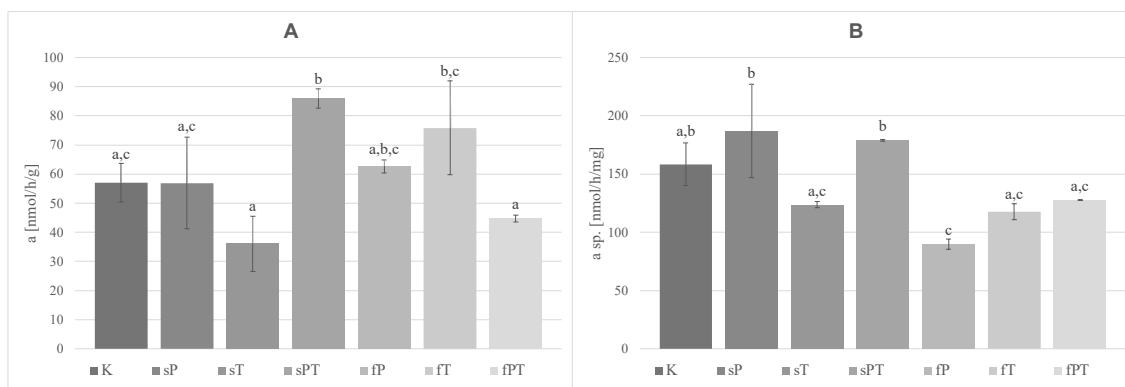
Obr. č. 26: Aktivita β -hexosaminidasy v kořenech. V části obrázku označené jako A je aktivita β -hexosaminidasy vztažena na gram čerstvé hmotnosti. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita β -hexosaminidasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny zálivkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.4.4 Stanovení aktivity fosfatasy v kořenech rostlin rajčat ošetřených triazolovými fungicidy

V extraktech z půdy byly ve všech skupinách podle kapitoly 3.3.6, str. 35 stanoveny aktivity kyselá a alkalická fosfatasy.

4.4.4.1 Stanovení aktivity kyselá fosfatasy v kořenech

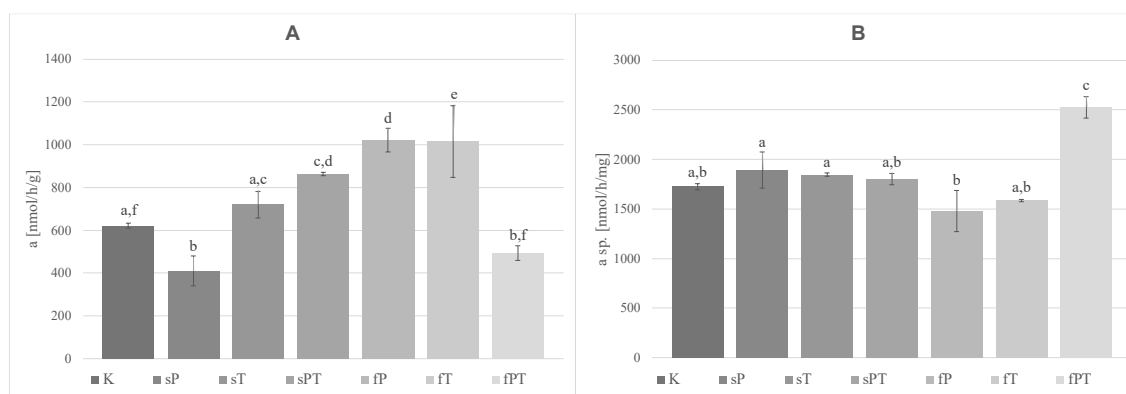
Aktivita kyselá fosfatasy v kořeni vztažena na gram čerstvé hmotnosti (Obr. č. 27/A, str. 56) se značně lišila od specifické aktivity (Obr. č. 27/B, str. 56). Nejvyšší aktivita kyselá fosfatasy v kořenech vztažená na gram čerstvé hmotnosti byla naměřena ve skupině ošetřené zálivkou penkonazolu a tebukonazolu do půdy (sPT). Nejvyšší specifická aktivita kyselá fosfatasy v kořenech byla naměřena ve skupině ošetřené zálivkou penkonazolu do půdy (sP). Statisticky významný rozdíl aktivity kyselá fosfatasy vztažené na gram čerstvé hmotnosti v kořenech oproti kontrole byl naměřen ve skupině sPT (1,5-nás. zvýšení). Statisticky významný rozdíl specifické aktivity kyselá fosfatasy v kořenech oproti kontrole byl naměřen ve skupině fP (1,8-nás. snížení).



Obr. č. 27: Aktivita kyselé fosfatasy v kořenech. V části obrázku označené jako A je aktivita kyselé fosfatasy vztažena na gram čerstvé hmotnosti. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita kyselé fosfatasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny záhlvkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

4.4.4.2 Stanovení aktivity alkalické fosfatasy v kořenech

Nejvyšší aktivita alkalické fosfatasy v kořenech vztažená na gram čerstvé hmotnosti byla naměřena ve fP (Obr. č. 28/A). Nejvyšší specifická aktivita alkalické fosfatasy v kořenech byla naměřena ve skupině fPT (Obr. č. 28/B). Statisticky významný rozdíl aktivity alkalické fosfatasy vztažené na gram čerstvé hmotnosti v kořenech oproti kontrole byl naměřen ve skupinách sP (1,5-nás. snížení), sPT (1,4-nás. zvýšení), fP (1,7-nás. zvýšení), fT (1,6-nás. zvýšení). Statisticky významný rozdíl specifické aktivity alkalické fosfatasy v kořenech oproti kontrole byl naměřen ve skupině fPT (1,4-nás. zvýšení).



Obr. č. 28: Aktivita alkalické fosfatasy v kořenech. V části obrázku označené jako A je aktivita alkalické fosfatasy vztažena na gram čerstvé hmotnosti. V části obrázku označené jako B je specifická aktivita alkalické fosfatasy. Skupiny označené jako "s" byly ošetřeny záhlvkou triazolového fungicidu do půdy, skupiny označené jako "f" byly ošetřeny postřikem triazolového fungicidu na listy a K značí kontrolní skupinu rostlin. P a T jsou zkratky pro triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol.

5 Diskuze

Pro zvyšující se počet obyvatel Země je důležité zajistit dostatek potravin. Lidstvo tedy stále hledá způsoby, jak zvýšit výnosy zemědělských plodin.^[100] Vedle průmyslových i organických hnojiv se hojně využívají pesticidy, které chrání rostliny před škůdci. K potlačení růstu fytopathogenních hub slouží fungicidy. Existuje řada skupin fungicidů, které se liší místem zásahu do metabolismu hub.^{[99],[100]} V této práci jsme se zabývali triazolovými fungicidy, které inhibují 14- α -demethylasu (EC 1.14.14.154), a zabráňují tak syntéze ergosterolu, důležité složky membrán hub.^[103] Fungicidy včetně triazolů však působí i na necílové organismy, to jsou rostliny, které aktivují detoxikační a antioxidační systém.^[104] Triazoly se mohou v rostlinách kumulovat a dostat se do potravního řetězce včetně člověka. Triazoly se ale mohou kumulovat v půdě, vyplavovat do vodních toků i spodních vod, což znamená další zátěž pro životní prostředí.^[102] O vlivu triazolových fungicidů na půdu, tedy její kvalitu a půdní mikroorganismy je v literatuře dosud málo informací. Je ale známo, že některé mikronutrienty obsaženy v půdě, jako např. Zn^{2+} , Cu^{2+} a $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, tvoří komplexy s triazoly, což má za následek ovlivnění dostupnosti těchto živin pro rostlinu.^[119] Podle^[120] bylo zjištěno, že pokles živin v půdě je ovlivněn přirozeným příjmem rostliny, avšak v případě rostlin ošetřených triazoly se značně snižuje. Pokles biologické dostupnosti živin pro rostlinu nebyl značný v případě živin hojně zastoupených v půdě (např. Mg^{2+} , Ca^{2+} a fosfátů).^[119] Stojí za povšimnutí, že aktivity fosfatas se v půdě ve skupinách ošetřených triazoly značně nemění oproti kontrolní skupině.

Triazolové fungicidy se aplikují postřikem na rostliny, a to několikrát v průběhu vegetačního období.^[103] Část postřiku se dostane do půdy, další podíl triazolových fungicidů se dostane do půdy oplachem listů, tedy deštěm nebo zálivkou (Obr. č. 4, str. 28). V našem experimentálním uspořádání jsme vedle skupiny rostlin, kde byly triazoly aplikovány klasicky postřikem, testovali také skupinu rostlin, kde bylo stejné množství fungicidu aplikováno přímo do půdy s rostlinami rajčat zálivkou (Tabulka č. 2, str. 32). Předpokládáme, že zálivkou se do půdy dostane větší množství triazolů, vliv na zkoumané půdní parametry bude výraznější než při aplikaci postřikem. Vedle dvou triazolů, které se v zemědělství hojně používají, penkonazolu a tebukonazolu, jsme testovali i jejich kombinaci, protože triazoly mohou rovněž vzájemně reagovat a jejich účinek se může lišit od jednotlivých sloučenin.

Pro kvalitu půdy^[2] jsou důležité půdní mikroorganismy, které využívají organickou hmotu v půdě, sekretují enzymy schopné štěpit makromolekuly organické hmoty a podílejí se na koloběhu živin v půdě.^[11] Pro stanovení celkového obsahu hub a celkového obsahu bakterií byla zvolena metoda kvantitativní PCR (upravena dle ^[113]) založené na sekvenci ribosomální RNA, která je konzervovaná v rámci skupiny hub a v rámci skupiny bakterií. Vycházeli jsme z hypotézy, že triazolové fungicidy sníží množství hub v půdě ošetřené fungicidy, oproti půdě neošetřené.^[103] Tento předpoklad se úplně nepotvrdil, snížení je patrné jen ve skupinách sP a fPT (Obr. 17, str. 48). Vysvětlením může být rezistence některých hub vůči určitým triazolovým fungicidům, kdy se rezistentní houby mohou více množit, protože se snižuje kompetice o živiny a prostor mezi jednotlivými druhy.^[103] Toto vysvětlení ale v našem případě pravděpodobně neplatí, protože penkonazol zálivkou do půdy způsobil snížení množství hub, zatímco při aplikaci postřikem způsobil významné zvýšení (Obr. č. 17, str. 48). Také kombinace obou triazolů zálivkou znamenala zvýšení množství hub, avšak při aplikaci postřikem snížení. Zvolená metoda nemusí postihnout všechny druhy hub, pro zvýšení spolehlivosti by bylo vhodné použít více primerů. V případě bakterií došlo k poklesu všech skupin půd ošetřených triazoly s výjimkou sPT a fP, kde bylo rovněž nalezeno zvýšené množství hub.

V literatuře se uvádí, že citlivější metodou, než sledování počtu mikroorganismů je sledování enzymových aktivit, které citlivěji reagují na mnohé půdní změny způsobené rostlinami, způsobem obdělávání, počasím nebo změnami klimatu.^[23] V této práci jsme se zaměřili na enzymy, které se podílejí na degradaci organické hmoty v půdě a přispívají ke koloběhu uhlíku a fosforu. Jedná se především o glykosidasy, které degradují polysacharidy buněčných stěn rostlin (celulasy^[67], β -glukosidasy^[30]) a buněčných stěn hub (chitinasy^[70], β -hexosaminidasy^[59], endo- β -1,3-glukanasy^[68]). Vedle těchto enzymů jsme testovali i aktivitu β -galaktosidasy^{[62],[63]}, která se může podílet na degradaci rostlinných hemicelulos nebo oligosacharidových řetězců glykoproteinů. Detekovali jsme také aktivitu α -manosidasy^[57], která dosud v půdě nebyla stanovena. Je to sice enzym často spojovaný pouze se syntézou N- vázaných oligosacharidů glykoproteinů z prekursoru s vysokým obsahem manosy nebo se zráním plodů.^{[52],[61]} α -Manosidasa se ale může podílet také na degradaci mananů v buněčné stěně kvasinek.^[57]

Podíváme-li se na enzymy degradující organickou hmotu pocházející z rostlin, vidíme pokles v aktivitě celulas ve všech skupinách ošetřených triazoly oproti kontrole, naproti tomu aktivita β -glukosidasy byla zvýšena vlivem triazolů a to více ve skupinách,

kde aplikace probíhala postřikem (Obr. č. 9, str. 42; Obr. č. 11, str. 44 a Tabulka č. 7 a 8, str. 61). Vysvětlením by mohla být sekrece β -glukosidasy z kořenů rostlin rajčat, protože tam dochází k navýšení aktivity tohoto enzymu a u skupin s nejvyšším zvýšením aktivity v půdě dochází ke snížení aktivity v kořenech (Obr. č. 23, str. 52 a Tabulka č. 7 a 8, str. 61). β -Glukosidasa plní v rostlinách řadu dalších funkcí vedle hydrolýzy celobiosy, jedná se o štěpení glukosidů, které mají často zajímavé biologické vlastnosti.^[30] Řada fytohormonů je skladována ve formě neaktivního glukosidu a v případě rychlé potřeby stačí hydrolyzovat glukosu a aktivní hormon je k dispozici.^[117] Totéž platí o dalších látkách ze skupiny flavonoidů, které mají mnoho užitečných vlastností od ochrany proti UV záření po baktericidní účinky.^[94] Je pravděpodobné, že aktivita β -glukosidasy se zvyšuje také po aplikaci triazolových fungicidů a dochází tak k aktivaci obranných sloučenin. Na rostlinu má pravděpodobně větší vliv postřik a dochází tak k vyšší sekreci tohoto enzymu do půdy. Aktivita celulasy však triazoly příliš ovlivněna nebyla, snížení aktivity tohoto enzymu v půdě může být způsobeno spíše mikrobiálním snížením. V půdě se β -glukosidasa stanovuje jako indikátor kvality půdy, protože reaguje na změny prostředí. V literatuře^{[41],[42]} se uvádí negativní korelace aktivity β -glukosidasy a kontaminantů (zejména těžkých kovů), přičemž v případě kontaminace triazolovými fungicidy se její aktivita zvyšovala. K problematice β -glukosidasy jako spolehlivého indikátoru kvality půdy^[24] by se mělo přistupovat s opatrností.

Podobný trend vidíme i u enzymů, které se podílejí na degradaci buněčných stěn hub, aktivita chitinasy klesá (a to především ve skupinách fT a fPT) zatímco aktivita β -hexosaminidasy stoupá, a to zase více ve skupinách s triazolou aplikovanými postřikem než zálivkou (Obr. č. 8, str. 41; Obr. č. 14, str. 46; Tabulka č. 7 a 8, str. 61). Tady není vysvětlení jednoduché, protože ani aktivita chitinasy, ani β -hexosaminidasy se v kořenech rostlin významně nemění s výjimkou skupiny fT v případě β -hexosaminidasy (Obr. č. 26, str. 55). Chitinasy jsou rostlinami produkovány jako obranné látky proti houbovým patogenům a řadí se tak mezi tzv. PR proteiny (pathogenesis related proteins).^[118] Funkce β -hexosaminidasy v rostlinách je méně jasná, podílí se na zrání plodů i na syntéze glykanových řetězců typických pro rostliny a některé bezobratlé živočichy a její aktivita se zvyšuje s virovou infekcí rostlin.^{[115],[116]} Endo- β -1,3-glukanasy štěpí β -1,3-glukany, které se nacházejí v buněčných stěnách hub, oomycet, ale také v kalose, kterou syntetizují rostliny jako odpověď na poranění nebo biotický stres.^{[68],[69]} Aktivita endo- β -1,3-glukanasy se v kořenech rostlin vlivem triazolů podobně jako dalších endoglykosidas příliš neměnila, v půdě bylo zjištěno snížení aktivity

chitinasy a celulasy, ale zvýšení aktivity endo- β -1,3-glukanasy ve skupinách sP a fPT (Tabulka č. 7 a 8, str. 61).

Zvýšená aktivita β -galaktosidasy byla jistěna v půdách kontaminovaných těžkými kovy^[64], také v případě triazolových fungicidů byla naměřena zvýšená aktivita oproti kontrolní skupině. Zvýšení je opět více patrné u aplikace postřikem než aplikace závlivkou (Obr. č. 13, str. 44 a Tabulka č. 7 a 8). Aktivita β -galaktosidasy se příliš neměnila vlivem triazolů v kořenech, ve skupině fPT naopak došlo ke snížení (Obr. č. 25, str. 54). Můžeme se tedy domnívat, že i v případě β -galaktosidasy dochází k sekreci tohoto enzymu z kořenů rostlin.

Podobný výsledek nám poskytla i α -manosidasa. Jedná se o enzym, který není v půdě rutinně stanovován, jeho aktivita byla nižší v porovnání s dalšími testovanými exoglykosidasami, přesto měřitelná (Obr. č. 12, str. 44). Vlivem postřiků triazoly došlo k významnému zvýšení její aktivity (Tabulka č. 7 a 8, str. 61). Je možné, že její aktivita také souvisí s enzymem sekretovaným kořeny^[88] rajčat, ale může pocházet i z mikrobiální aktivity, kde se podílí na rozkladu organické hmoty především pocházející z kvasinek.

Na metabolismu fosfátu se podílejí fosfatasy, které hydrolyticky štěpí estery kyseliny fosforečné.^[26] Rostliny při nedostatku fosfátu sekretují organické kyseliny, aby okyselily okolní prostředí a fosfáty byly více rozpustné a pro rostlinu dostupnější.^[88] Rostliny mohou sekretovat také přímo fosfatasy, které uvolňují organicky vázaný fosfát.^[45] V kořenech rostlin rajčat byla zjištěna vyšší aktivita alkalické fosfatasy než kyselé (Obr. č. 28, str. 56). Vlivem triazolů se specifická aktivita alkalické ani kyselé fosfatasy příliš nemění, ale aktivita vztažená na čerstvou hmotnost je v případě postřiku jednotlivými triazolů vyšší, avšak jejich kombinace aktivitu obou fosfatů snižuje. V půdě jsme zjistili vlivem triazolů zvýšenou aktivitu jak kyselé, tak alkalické fosfatasy (Obr. č. 15 a 16, str. 47; Tabulka č. 7 a 8, str. 61). Zase se můžeme domnívat, že aktivity fosfatů v půdě souvisí se sekretovanou enzymovou aktivitou, pravděpodobně bude rovněž záviset na dostupnosti fosfátu v pěstebním substrátu. Vzhledem k použití zahradnického substrátu, kde živiny byly postupně doplňovány, můžeme předpokládat, že při nedostatku fosfátu by byly aktivity fosfatů vyšší.

Závěrem lze shrnout, že triazolové fungicidy penkonazol a tebukonazol ovlivňují půdní enzymy podílející se na metabolismu uhlíku. Zatímco celulasy a chitinasy v půdě byly vlivem triazolů spíše sníženy, exoglykosidas v půdě byly zvýšeny. Tento vliv je více patrný u aplikace postřikem než přímo závlivkou. Zdá se tedy, že aplikace postřikem více ovlivní metabolismus rostliny rajčete a zvýšené aktivity exoglykosidas v půdě

souvisí se skretovanými enzymy z kořenů. Je pravděpodobné, že tyto procesy budou souviset s konkrétním rostlinným druhem a role exoglykosidas v rostlinách může být daleko větší než jen degradace sacharidů. Efekt je často výraznější v kombinaci penkonazolu a tebukonazolu, lze tedy předpokládat, že může docházet k vzájemnému ovlivnění. Fosfatasy podílející se na metabolismu fosfátů se rovněž zvyšují v půdě vlivem triazolových fungicidů.

Tabulka č. 7: Porovnání aktivit endoglykosidas, exoglykosidas a fosfatas v půdě a v kořenech vztažena na gram čerstvé hmotnosti (v případě kořenů) a na gram lyofilizované půdy. Jednotlivé procenta značí změnu aktivity oproti kontrolní skupině daného enzymu. Zvyšující se intenzita odstínu zelné barvy značí nárůst oproti kontrolní skupině. Zvyšující se intenzita odstínu oranžové barvy naznačuje snížení oproti kontrolní skupině. Šedá barva značí nevýznamný rozdíl od skupiny kontrolní.

Půda	sP	sT	sPT	fP	fT	fPT
Chitinasa	109%	108%	95%	94%	77%	55%
Celulasa	73%	77%	34%	55%	26%	58%
Endo-β-1,3-Glukanasa	129%	57%	77%	108%	98%	169%
β-Glukosidasa	116%	105%	320%	342%	482%	651%
α-Manosidasa	88%	138%	188%	175%	325%	338%
β-Galaktosidasa	135%	135%	182%	259%	218%	218%
β-Hexosaminidasa	126%	198%	227%	224%	302%	315%
Kyselá fosfatasa	122%	124%	156%	164%	133%	164%
Alkalická fosfatasa	150%	153%	147%	100%	137%	113%
Kořen	sP	sT	sPT	fP	fT	fPT
Chitinasa	95%	89%	112%	96%	106%	93%
Celulasa	82%	77%	93%	76%	89%	74%
Endo-β-1,3-Glukanasa	95%	88%	90%	87%	103%	93%
β-Glukosidasa	257%	271%	200%	357%	43%	71%
α-Manosidasa	112%	118%	88%	133%	124%	96%
β-Galaktosidasa	100%	86%	129%	143%	86%	57%
β-Hexosaminidasa	107%	114%	118%	129%	56%	108%
Kyselá fosfatasa	100%	63%	151%	111%	133%	79%
Alkalická fosfatasa	66%	116%	139%	165%	163%	79%

Legenda
400-700 %
200-400 %
150-200 %
120-150 %
80-120 %
60-80 %
40-60 %
20-40 %

Tabulka. č. 8: Porovnání specifických aktivit endoglykosidas, exoglykosidas a fosfatas v půdě a v kořenech. Jednotlivé procenta značí změnu aktivity oproti kontrolní skupině daného enzymu. Zvyšující se intenzita odstínu zelné barvy značí nárůst oproti kontrolní skupině. Zvyšující se intenzita odstínu oranžové barvy naznačuje snížení oproti kontrolní skupině. Šedá barva značí nevýznamný rozdíl od skupiny

Půda	sP	sT	sPT	fP	fT	fPT
Chitinasa	95%	88%	81%	78%	74%	50%
Celulasa	64%	63%	29%	46%	25%	52%
Endo-β-1,3-Glukanasa	113%	47%	66%	89%	96%	152%
β-Glukosidasa	122%	111%	300%	333%	422%	667%
α-Manosidasa	100%	200%	200%	200%	400%	500%
β-Galaktosidasa	133%	133%	167%	233%	167%	200%
β-Hexosaminidasa	130%	210%	220%	220%	270%	330%
Kyselá fosfatasa	64%	64%	91%	123%	91%	114%
Alkalická fosfatasa	160%	160%	140%	100%	120%	120%
Kořen	sP	sT	sPT	fP	fT	fPT
Chitinasa	93%	90%	106%	87%	91%	88%
Celulasa	79%	76%	86%	67%	75%	69%
Endo-β-1,3-Glukanasa	92%	89%	85%	79%	89%	88%
β-Glukosidasa	144%	276%	192%	240%	56%	124%
α-Manosidasa	143%	118%	68%	75%	99%	143%
β-Galaktosidasa	125%	80%	95%	130%	45%	75%
β-Hexosaminidasa	141%	116%	97%	74%	96%	93%
Kyselá fosfatasa	118%	78%	113%	57%	74%	81%
Alkalická fosfatasa	110%	107%	104%	86%	92%	146%

Legenda
500-700 %
250-500 %
150-250 %
120-150 %
80-120 %
60-80 %
40-60 %
20-40 %

6 Souhrn

1. Při optimalizaci extrakce exoglykosidas a fosfatas z půdy byla stanovena hodnota pH extrakčního a reakčního pufru 4,5 pro kyselou fosfatasu, 9,0 pro alkalickou fosfatasu a 6,0 pro β -glukosidasu, β -galaktosidasu, α -manosidasu a β -hexosaminidasu.

2. Na základě stanovení aktivity celulasy, endo- β (1,3)-glukanasy a chitiny v kořenech a v půdě rostlin ošetřených penkonazolem, tebukonazolem a jejich kombinací bylo zjištěno, že triazolové fungicidy značně neovlivňují jejich aktivity v kořenech. V půdě byl zjištěn pokles aktivity celulasy oproti kontrole ve všech skupinách. Pokles aktivity chitiny byl zaznamenán ve skupinách fP, fT a fPT a nárůst aktivity endo- β (1,3)-glukanasy byl ve skupině fPT.

3. Aktivity β -glukosidas, β -galaktosidas, α -manosidas a β -hexosaminidas v půdě rostlin ošetřených penkonazolem, tebukonazolem a jejich kombinací byly ovlivněny zejména ve skupině ošetřené postřikem triazolů na listy. Aktivity těchto enzymů v půdě byly značně zvýšeny oproti kontrole ve skupinách sPT, fP, fT a fPT. V kořenech byl zaznamenán jen nárůst aktivity β -glukosidas oproti kontrole ve skupinách sP, sT a fP.

4. Aktivity kyselé a alkalické fosfatasy v kořenech a v půdě rostlin ošetřených penkonazolem, tebukonazolem a jejich kombinací nebyly značně ovlivněny.

5. Bylo stanoveno celkové množství hub a bakterií v půdě. Byl zaznamenán značný pokles v množství hub a bakterií oproti kontrole ve skupinách sP, sT a fPT. Pokles v množství bakterií byl zaznamenán i ve skupině fT. Na druhou stranu ve skupinách sPT a fP byl zaznamenán nárůst množství hub a bakterií oproti kontrolní skupině. Nárůst v množství hub oproti kontrole byl také zaznamenán ve skupině fT.

Seznam literatury

- [1] Leeper G.W., Uren N.C.: (1993). *Soil Science: An Introduction*. 5th ed., Melbourne University Press. ISBN: 0522844642
- [2] Maurya S., Abraham J.S., Somasundaram S., Toteja R., Gupta R., Makhija S.: (2020). Indicators for assessment of soil quality: a mini-review. *Environ. Monit. Assess.* **192**:604
- [3] Sahu N., Vasu D., Sahu A., Lal N., Singh S.K.: (2017). Strength of microbes in nutrient cycling: a key to soil health. In: Meena, V., Mishra, P., Bisht, J., Pattanayak, A. (eds) *Agriculturally important microbes for sustainable agriculture*. Springer. ISBN: 9789811055898
- [4] Parks C.: (2022). *Soil composition*. National Geographic Society. Dostupné z URL: <<https://education.nationalgeographic.org/resource/soil-composition>> [cit. 20.06.2022]
- [5] Šimek M.: (2003). *Základy nauky o půdě. Neživé složky půdy*. Jihočeská univerzita, Biologická fakulta. ISBN: 8070406291.
- [6] Thai S., Pavlů L., Tejnecký V., Vokurková P., Shahin N., Borůvka L.: (2021). Comparison of soil organic matter composition under different land uses by DRIFT spectroscopy. *Plant Soil Environ.* **67**:255–263
- [7] Peoples B., Richardson A.E., Simpson R.J., Fillery I.R.P.: (2014). *Encyclopedia of agriculture and food systems*. Academic Press. str. 197-210. ISBN: 9780444525123
- [8] Paul E.A.: (2015). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. 4th ed. Elsevier academic press. str. 20-1. ISBN: 9780124159556
- [9] Farquhar J., Bao H., Thiemens M.: (2000). Atmospheric influence of Earth's earliest sulfur cycle. *Science*. **289**:756–8.
- [10] Falkowski P.: (2015). *Life's engines: how microbes made Earth habitable*. Princeton University Press. ISBN: 9781400865727

- [11] 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. *Front. Plant. Sci.* **8**:1617
- [12] Msimbira L.A., Smith D.L.: (2020). The roles of plant growth promoting microbes in enhancing plant tolerance to acidity and alkalinity stresses. *Front. Sustain. Food Syst.* **4**:106.
- [13] Vieira S., Sikorski J., Gebala A., Boeddinghaus R.S., Marhan S., Rennert T., Kandeler E., Overmann J.: (2019). Bacterial colonization of minerals in grassland soils is selective and highly dynamic. *Environ. Microbiol.* **22**:917–33.
- [14] Falkowski P.G., Fenchel T., Delong E.F.: (2008). The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science*. **320**:1034–9.
- [15] Wood M.: (1995). *Environmental soil biology*. 2nd ed. Chapman and Hall. ISBN: 9780751403435
- [16] Rao-Suba N.S.: (1999). *Soil microbiology*. 4th ed. Science Publishers. ISBN: 9781578080700
- [17] Widdison P.E., Burt T.P.: (2008). *Nitrogen cycle in encyclopedia of ecology*. Elsevier Science. ISBN: 9780080454054
- [18] Morford S. L., Houlton B. Z., Dahlgren R. A.: (2011). Increased forest ecosystem carbon and nitrogen storage from nitrogen rich bedrock. *Nature*. **477**:78–81
- [19] Říhová-Ambrožová J.: (2007). *Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník*. VŠCHT Praha. Dostupné z URL: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=K006> [cit. 08.08.2022]
- [20] Gentry T.J., Fuhrmann J.J., Zuberer D.A.: (2021). *Principles and applications of soil microbiology*. 3rd ed. Elsevier Science. ISBN: 9780323851404

- [21] Maršálek B.: (2002). Sinice jako producenti biologicky aktivních látek. *Živa*. **5**:198
- [22] Jayapalan CH.: (2017). Soil protozoa, a microbial indicator of soil health: a review. *Adv. Biotech. Micro*. **6**:555700
- [23] Dick R.P., Kandeler E. editor: Hillel D.: (2005). *Encyclopedia of soils in the enviroment*. Elsevier. str. 448-56. ISBN: 9780123485304
- [24] Bandick A.K., Dick R.P.: (1999). Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biol. Biochem*. **31**:1471-9.
- [25] Doran J.W., Parkin T.B.: (1994) Defining and assessing soil quality. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **3**:107-24.
- [26] Eivazi F., Tabatabai M.A.: (1977). Phosphates in soils. *Soil Biol. Biochem*. **9**:167-72.
- [27] Ajwa H.A., Tabatabai M.A.: (1994). Decomposition of different organic materials in soils. *Biol. Fert. Soils* **18**:175-82.
- [28] Martinez C.E., Tabatabai M.A.: (1997). Decomposition of biotechnology byproducts in soils. *J. Environ. Qual.* **26**:625-32.
- [29] Esen A.: (1993). β -glucosidases biochemistry and molecular biology. *J. Am. Chem. Soc.* **533**:9-17.
- [30] Turner B.L., Hopkins D.W., Haygarth P.M., Ostle N.: (2002). β -Glucosidase activity in pasture soils. *Appl. Soil Ecol.* **20**:157-62
- [31] Ndiaye E.L., Sandeno J.M., McGrath D., Dick R.P.: (2000). Integrative biological indicators for detecting change in soil quality. *Am. J. Altern. Agric.* **15**:26-36
- [32] Dick R.P., Sandor J.A., Eash N.S.: (1994). Soil enzyme activities after 1500 years of terrace agriculture in the Colca Valley, Peru. *Agric. Ecosyst. Environ.* **50**:123-31.

- [33] Dick R.P., Breakwell D.P., Turco R.F.: (1996). Methods for assessing soil quality. *Soil Sci. Soc. Am.* **9**:9-17
- [34] Wick B., Kühne R.F., Vlek P.L.G.: (1998). Soil microbiological parameters as indicators of soil quality under improved fallow management systems in southwestern Nigeria. *Plant Soil*. **202**:97-107
- [35] Sherrod L.L., Domsch K.H.: (1970). Amino acids in exudates of healthy and fungus affected pea roots. *Arch. Microbiol.* **70**:240-2.
- [36] Melouk H.A., Horner C.E.: (1973). β -glucosidase from *Phoma strasseri* and its possible role in a disease of peppermint. *Phytopathology*. **63**:973-5.
- [37] Davis D., Waggoner P.E., Dimond A.E.: (1953). Conjugated phenols in the Fusarium wilt syndrome. *Nature*. **172**:959-61.
- [38] Patrick Z.A.: (1955). Toxic substances from microbial decomposition products of peach root residues. *Can. J. Bot.* **33**:461-86
- [39] Acosta-Martínez V., Tabatabai M.A.: (2000). Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biol. Fert. Soils*. **31**:85-91.
- [40] Kuperman R.G., Carreiro M.M.: (1997). Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* **29**:179-90.
- [41] Haanstra L., Doelman P.: (1991). An ecological dose-response model approach to short and long-term effects of heavy metals on arylsulphatase activity in soil. *Biol. Fert. Soils*. **11**:18-23.
- [42] Deng S.P., Tabatabai M.A.: (1995). Cellulase activity of soils: effect of trace elements. *Soil Biol. Biochem.* **27**:977-9.

- [43] Říhová-Ambrožová J.: (2007). *Koloběh fosforu. Encyklopedie hydrobiologie*. VŠCHT Praha. Dostupné z URL: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=K007> [cit. 17.07.2022]
- [44] Stevenson F.J., Cole M.A.: (1999). *Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients*. 2nd ed. Wiley. str. 380. ISBN: 9780471320715
- [45] Joner E.J., Jakobsen I.: (1995). Growth and extracellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. *Soil. Biol. Biochem.* **27**:1153-9
- [46] Asmar F., Gahoonia T.S., Nielsen N.E.: (1995). Barley genotypes differ in activity of soluble extracellular phosphatase and depletion of organic phosphorus in the rhizosphere. *Plant. Soil.* **172**:117-22
- [47] Dinkelaker B., Marschner H.: (1992). *In vivo* demonstration of acid phosphatase in the rhizosphere of soil grown plants. *Plant. Soil.* **144**:199-205
- [48] Tarafdar J.C., Rao A.V., Bala K.: (1988). Production of phosphatase by fungi isolated from desert soils. *Folia. Microbiol.* **33**:452-7
- [49] Tarafdar J.C., Marschner H.: (1994). Phosphatase activity in the rhizosphere and hyposphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. *Soil. Biol. Biochem.* **26**:387-95
- [50] Tarafdar J.C., Claassen N.: (1988). Organic phosphorus compound as a phosphorus source through the activity of phosphatase produced by plant roots and microorganisms. *Biol. Fertil. Soil.* **5**:308-12
- [51] Satchell J.E., Martin K.: (1984). Phosphatase activity in earthworm faeces, *Soil Biol. Biochem.* **16**:191-4

- [52] Martina J.A., Daniotti J.L., Maccioni H.J.F.: (2000). GM1 synthase depends on N-glycosylation for enzyme activity and trafficking to the Golgi complex. *Neurochem. Res.* **25**:725–31.
- [53] Sitia R., Braakman I.: (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature.* **426**:891–4
- [54] Helenius A., Aebi M.: (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **73**:1019–49.
- [55] Varki A.: (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology.* **3**:97–130.
- [56] Liebminger E., Hüttner S., Vavra U., et. al.: (2009). Class I α -mannosidases are required for N-glycan processing and root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant cell.* **21**:3850-67
- [57] Ashida H., Kato T., Yamamoto K., editor: Kamerling H.: (2007). *Comprehensive glycoscience, from: chemistry to systems biology*. Elsevier Science. str. 151-70. ISBN: 9780444519672
- [58] Liu F.F., Kulinich A., Du Y.M., et al.: (2016). Sequential processing of mannose-containing glycans by two α -mannosidases from *Solitalea canadensis*. *Glycoconj. J.* **33**:159–68
- [59] Cabezas J.A.: (1989). Some comments on the type references of the official nomenclature (IUB) for β -N-acetylglucosaminidase, β -N-acetylhexosaminidase and β -N-acetylgalactosaminidase. *Biochem. J.* **261**:1059–60.
- [60] Parham J.A., Deng S.P.: (2000). Detection, quantification and characterization of β -glucosaminidase activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* **32**:1183-90

- [61] Jagadeesh B.H., Prabha T.N., Srinivasan K.: (2004). Activities of β -hexosaminidase and α -mannosidase during development and ripening of bell capsicum (*Capsicum annuum* var. *variata*). *Plant Science*. **167**:1263-71
- [62] Park A.R., Oh D.K.: (2010). Galacto-oligosaccharide production using microbial beta-galactosidase: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**:1279–86.
- [63] Chandrasekar B., van der Hoorn R.A.: (2016). Beta galactosidases in *Arabidopsis* and tomato-a mini review. *Biochem. Soc. Trans.* **44**:150-8.
- [64] Martínez-Iñigo M.J., Pérez-Sanz A., Ortiz I., Alonso J., Alarcón R., García P., Lobo M.C.: (2009). Bulk soil and rhizosphere bacterial community PCR–DGGE profiles and β -galactosidase activity as indicators of biological quality in soils contaminated by heavy metals and cultivated with *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *Chemosphere*. **75**:1376-81
- [65] Ovsepyan L., Kurganova I., Gerenyu V.L., Kuzyakov Y.: (2020). Conversion of cropland to natural vegetation boosts microbial and enzyme activities in soil. *Sci. Total Environ.* **743**:140829
- [66] Kobata A. (2013). Exo- and endoglycosidases revisited. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **89**:97-117.
- [67] Deng S.P., Tabatabai M.A.: (1994). Cellulase activity of soils. *Soil Biol. Biochem.* **26**:1347-54
- [68] Ramos O.S., Malcata F.X.: (2011). *Food-Grade Enzymes. Comprehensive Biotechnology*. Elsevier. str. 555-69. ISBN: 9780080885049
- [69] Jeng W.Y., Wang N.C., Lin C.T., Shyur L.F., Wang A.H.: (2011). Crystal structures of the laminarinase catalytic domain from *Thermotoga maritima* MSB8 in complex with inhibitors: essential residues for β -1,3 and β -1,4-glucan selection. *J. Biol. Chem.* **286**:45030-40.

- [70] Ekundayo F.O., Folorunsho A.E., Ibanmi T.A. et al.: (2022). Antifungal activity of chitinase produced by *Streptomyces* species isolated from grassland soils in Futa area, Akure. *Bull. Natl. Res. Cent.* **46**:95
- [71] Naga-Raju M., Golla N., Vengatampalli R.: (2017). *Soil enzymes*. Springer. str. 19-24. ISBN: 9783319426549
- [72] Greenfield L.M., Hill P.W., Paterson E., Baggs E.M., Jones D.L.: (2020). Do plants use root-derived proteases to promote the uptake of soil organic nitrogen? *Plant Soil*. **459**:355-67
- [73] Schloter M., Nannipieri P., Sørensen S.J., Elsas J.D.: (2018). Microbial indicators for soil quality. *Biol. Fertil. Soils*. **54**:1-10
- [74] Horrocks R.D., Vallentine J.F.: (1999). *Harvested forages*. Academic Press. str. 187-244. ISBN: 9780123562555
- [75] Fageria N.K.: (2014). *Mineral nutrition of rice*. CRC Press. ISBN: 9781138198869
- [76] Keren R., Bingham, F.T.: (1985). Boron in water, soils, and plants. *Adv. Soil. Sci.* **1**:226–76.
- [77] Cavallaro N., McBride M.B.: (1984). Zinc and copper status and fixation by an acid soil clay: effect of selective dissolutions. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* **48**:1050–4.
- [78] Lindsay W.L.: (1979). *Chemical equilibria in soils*. Wiley. ISBN: 9781930665118
- [79] Lindsay W.L.: (1991). Inorganic equilibria affecting micronutrients in soil. In: Mortvedt J.J., Cox F.R., Shuman L.M., Welch R.M.: Micronutrients in agriculture. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2**:89–112.

- [80] Shuman L.M.: (1991). Chemical forms of micronutrients. In: Mortvedt J.J., Fox F.R., Shuman L.M., Welch R.M. Micronutrients in agriculture. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2**:113–44.
- [81] Mortvedt J.J.: (2000). Bioavailability of micronutrients. In: Sumner M.E.: *Hand Book of Soil Science*. CRC Press. str. 71–88. ISBN: 9780849331367
- [82] Kabata-Pendias A.: (2000). *Trace elements in soils and plants*. 3rd ed. CRC Press. ISBN: 9780429191121
- [83] Williams C., Thornton I.: (1972). The effect of soil additives on the uptake of molybdenum and selenium from soils from different environments. *Plant Soil*. **36**:395–406.
- [84] Saeed M., Fox R.L.: (1977). Relations between suspension pH and zinc solubility in acid and calcareous soils. *Soil. Sci.* **124**:199–204.
- [85] Moraghan J.T., Mascagni Jr. H.J.: (1991). Environmental and soil factors affecting micro-nutrient deficiencies and toxicities. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2**:371–425.
- [86] Harter R.D.: (1991). Micronutrients adsorption–desorption reactions in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **2**:59–87.
- [87] McBride M.B., Blasiak J.J.: (1979). Zinc and copper solubility as a function of pH in an acid soil. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* **43**:866–70.
- [88] Grondin A., Guyomarc'h S., Laplace L.: (2022). *The root system of plants: from the shadows to the light*. Encyclopédie de l'environnement. Dostupné z URL: <<https://www.encyclopedie-environnement.org/en/life/root-system-plants/>> [cit. 07.08.2022]
- [89] Atkinson J.A., Rasmussen A., Traini R., Voss U., Sturrock C., Mooney S.J., Wells D.M., Bennett M.J.: (2014). Branching out in roots: uncovering form, function, and regulation. *Plant Physiol.* **166**:538-50

- [90] Doblas V.G., Geldner N., Barberon M.: (2017). The endodermis, a tightly controlled barrier for nutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* **39**:136-43
- [91] de la Fuente Cantó C., Simonin M., King E., Moulin L., Bennett M.J., Castrillo G., Laplace L.: (2020). An extended root phenotype: the rhizosphere, its formation and impacts on plant fitness. *Plant J.* **103**:951-64
- [92] Chen Y.T., Wang Y., Yeh K.C.: (2017). Role of root exudates in metal acquisition and tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **39**:66-72
- [93] Venturi V., Keel C.: (2016). Signaling in the rhizosphere. *Trends Plant Sci.* **11**:4265-81
- [94] Mierziak J., Kostyn K., Kulma A.: (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules.* **19**:16240-65.
- [95] Rajaganapathy V., Xavier F., Sreekumar D., Mandal P.K.: (2011). Heavy metal contamination in soil, water and fodder and their presence in livestock and products: a review. *J. Environ. Sci. Technol.* **4**:234–49
- [96] Fent K.: (2004). Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology.* **205**:223–40
- [97] Abrahams P.W.: (2002). Soils: their implications to human health. *Sci. Total Environ.* **291**:1–32
- [98] Rahman Z., Singh V.P.: (2019). The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environ. Monit. Assess.* **191**:419
- [99] Larramendy M. L., Soloneski S.: (2016). *Environmental health risk-hazardous factors to living species*. IntechOpen. ISBN: 9789535154358

- [100] De A., Bose R., Kumar A., Mozumdar S.: (2014). Worldwide pesticide use. In: *Targeted delivery of pesticides using biodegradable polymeric nanoparticles*. Springer. str. 5-6. ISBN: 9788132216896
- [101] Machado C., Martins I.: (2018). Risk assessment of occupational pesticide exposure: Use of endpoints and surrogates. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **98**:276–83.
- [102] Baćmaga M., Wyszowska J., Kucharski J.: (2019). The biochemical activity of soil contaminated with fungicides. *J. Environ. Sci. Health.* **54**:252-62
- [103] Cao D., Wu R., Dong S., Wang F., Ju CH., Yu S., Xu S., Fang H., Yu Y.: (2020). Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* in crop plant soil after tebuconazole applications. *Environ. Pollut.* **266**:115124
- [104] Baćmaga M., Wyszowska J., Kucharski J.: (2016). The effect of the Falcon 460 EC fungicide on soil microbial communities, enzyme activities and plant growth. *Ecotoxicology.* **25**:1575–87.
- [105] Rani A., Singh R., Kumar P., Shukla G.: (2017). Pros and cons of fungicides: an overview. *Intern. J. Engin. Sci. Res.*, **6**:405-4018
- [106] Arora S., Sahni D.: (2016). Pesticides effect on soil microbial ecology and enzyme activity-An overview. *J. App. Nat. Sci.* **8**:1126-32
- [107] Chauhan P.S., Nigam M., Kumar M.: (2017). *Pseudomonas putida* and *Bacillus amyloliquefaciens* alleviates the adverse effect of pesticides and poise soil enzymes activities in chickpea (*Cicer arietinum* L.) rhizosphere *Trop. Plant Res.* **4**:405-418
- [108] Sarmah A.K., Muller K., Ahmad R.: (2004). Fate and behaviour of pesticides in agroecosystem-a review with a New Zealand perspective. *Aust. J. Soil Res.* **42**:125-54

- [109] Zemb O., Achard C.S., Hamelin J., Almeida M.L.D., Gabinaud B., Cauquil L., Verschuren L.M.G., Godon J.J.: (2019). Absolute quantitation of microbes using 16S rRNA gene metabarcoding: A rapid normalization of relative abundances by quantitative PCR targeting a 16S rRNA gene spike-in standard. *MicrobiologyOpen*. **9**:977
- [110] Kendall J.M., Rygiewicz P.T.: (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol.* **5**:28
- [111] Bělonožníková K., Vaverová K., Vaněk T., Kolařík M., Hýsková V., Vaňková R., Dobrev P., Křížek T., Hodek O., Čokrtová K., Štípek A., Ryšlavá H.: (2020). Novel insights into the effect of *Pythium* strains on rapeseed metabolism. *Microorganisms*. **8**:1472
- [112] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-75
- [113] Azarbad H., Tremblay J., Bainard L.D., Yergeau E.: (2022). Relative and quantitative rhizosphere microbiome profiling results in distinct abundance patterns. *Front. Microbiol.* **12**:798023.
- [114] Livak K.J., Schmitgen T.D.: (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. **25**:402-8
- [115] Ryšlavá H., Valenta R., Hýsková V., Křížek T., Liberda J., Coufal P.: (2014). Purification and enzymatic characterization of tobacco leaf β -N acetylhexosaminidase, *Biochimie*. **107**:263-9
- [116] Hýsková V., Bělonožníková K., Doričová V., Kavan D., Gillarová S., Henke S., Synková H., Ryšlavá H., Čerovská N.: (2021). Effects of heat treatment on metabolism of tobacco plants infected with Potato virus Y. *Plant Biol.* **23**:131-41

- [117] Ershova A.N., Vinokurova N.: (2018). Effect of phytohormones of kinetin and epibrassinolide on content and intracellular localization of glucosides and free amino acids in pea plants cells (*Pisum sativum* L.). *Int. J. Second. Metab.* **5**:156-62
- [118] Ali S., Ganai B.A., Kamili A.N., Bhat A.A., et. al.: (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiol. Res.* **212**:29-37
- [119] Jakl M., Kovač I., Čavar-Zeljkočić S., Jaklová-Dytrtová J.: (2021). Triazole fungicides in soil affects the yield of fruit, green biomass, and phenolic production of *Solanum lycopersicum* L. *Food Chem.* **351**:129328
- [120] Jaklová-Dytrtová J., Bělonožníková K., Jakl M., Ryšlavá H.: (2020). Triazoles and aromatase: The impact of copper cocktails. *Environ. Pollut.* **266**:1-8