

Tomáš Erban a kol.

Metodika pro cílené získání mikrobiálních izolátů dekontaminujících prostředí zatížené perzistentními polutanty

CERTIFIKOVANÁ METODIKA



© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

2022



Metodika pro cílené získání mikrobiálních izolátů dekontaminujících prostředí zatížené perzistentními polutanty

Tomáš Erban a kolektiv

Autorský tým:

Tomáš Erban^{1,*}

Bruno Sopko¹

Martin Markovič¹

Martina Siglová²

Daniela Tomešová³

Marta Václavíková³

Tat'ána Halešová³

¹Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507/73, 161 06 Praha 6 – Ruzyně

²EPS biotechnology, s.r.o., V Pastouškách 205, 686 04 Kunovice

³ALS Czech Republic, s. r. o., Na Harfě 336/9, 190 00 Praha 9 – Vysočany

*RNDr. Tomáš Erban, Ph.D., ORCID: 0000-0003-1730-779X

arachnid@centrum.cz; erban@vurv.cz

Podíly autorů na realizaci metodiky: Tomáš Erban (40 %), Bruno Sopko (20 %), Martin Markovič (5 %), Martina Siglová (10 %), Daniela Tomešová (5 %), Marta Václavíková (5 %), Tat'ána Halešová (15 %)

Oponenti:

Mgr. Hana Kubátová-Hiršová, Ph.D. – specialista POR, Sekce zemědělských vstupů, Odbor přípravků na ochranu rostlin, Oddělení rizik a účinnosti POR, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Zemědělská 1752/1a, 61300 Brno

Doc. Mgr. Martin Šlachta, Ph.D. – Ústav výzkumu globální změny AV ČR, v. v. i., Lipová 1789/9, 370 05 České Budějovice

Vydal:

Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha, 2022

ISBN 978-80-7427-375-9

Obsah

1. Financování, certifikace, prohlášení, poděkování.....	- 1 -
2. Název a anotace česky	- 2 -
3. Název a anotace anglicky	- 3 -
4. Úvod.....	- 4 -
5. Cíl metodiky.....	- 4 -
6. Význam chloracetanilidových pesticidů a jejich metabolitů	- 4 -
7. Vlastní popis metodiky	- 6 -
7.1. Výběr pesticidu/metabolitu pro hodnocení	- 7 -
7.2. Získání kandidátních mikroorganismů kultivačním postupem ze zatížené matrice	- 8 -
7.2.1. Identifikace kontaminované lokality a vytipování matric pro izolace.....	- 8 -
7.2.2. Postup zisku mikrobiálních taxonů s biodegradačním potenciálem.....	- 12 -
7.2.3. Směsné konsorcium	- 14 -
7.3. Selektce mikroorganismů z kontrolovaného experimentu využitím sekvenování nové generace.....	- 15 -
7.3.1. Volba dávky modelového polutantu	- 16 -
7.3.2. Modelová půda	- 17 -
7.3.3. Provedení expozičního experimentu pesticidními látkami.....	- 17 -
7.3.4. Ověření degradace expozičních látek	- 19 -
7.3.5. Identifikace kandidátních mikroorganismů NGS technologií	- 23 -
8. Srovnání novosti metodiky	- 34 -
9. Uplatnění metodiky	- 34 -
10. Ekonomické přínosy metodiky	- 35 -
11. Publikace, které předcházely metodice	- 36 -
12. Přílohy	- 37 -
13. Seznam literatury	- 40 -

1. Financování, certifikace, prohlášení, poděkování

Financování:

Tato certifikovaná metodika je výsledkem projektu TA ČR č. TH03030118 s názvem „Metody dekontaminace a detekce perzistentních chloracetanilidových pesticidů a jejich metabolitů, které jsou legislativně sledované“ řešeného v období 2018–2021. Výstup byl podpořen také z institucionální podpory MZe RO0418.



Certifikace:

Metodice bylo uděleno osvědčení Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) UKZUZ 184368/2022.

O uplatnění metodiky byla uzavřena smlouva TH03030118/NMet, podle ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku. Smlouva byla uzavřena mezi účastníky projektu (VÚRV, ALS CR, EPS biotechnology) a Vodárenskou akciovou společností, a.s.

Podíly organizací na výsledku upravuje samostatná smlouva o využití výsledků dosažených v projektu výzkumu a vývoje č. TH03030118.

Oponentní posudky vypracovali: Mgr. Hana Kubátová, Ph.D., a Doc. Mgr. Martin Šlachta, Ph.D.

Prohlášení:

Předkladatel metodiky prohlašuje, že zpracovaná metodika nezasahuje do práv jiných osob z průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví.

Poděkování:

Autorský tým děkuje recenzentům metodiky za podnětné a cenné připomínky.

Autoři děkují Miroslavě Bodrinové, Julii Chalupníkové a *alumni* studentům Alžbětě Mikulové a Kateřině Bártové za technickou pomoc při expozičních experimentech.



2. Název a anotace česky

Název: Metodika pro cílené získání mikrobiálních izolátů dekontaminujících prostředí zatížené perzistentními polutanty

Anotace:

Fungování moderní společnosti s sebou přináší znečištění prostředí látkami, které se později mohou stát ekologickým problémem. Mezi takovéto látky se řadí chloracetanilidové pesticidy, z nichž alachlor a acetochlor jsou v EU zakázány. Přes zákaz se však v prostředí stále vyskytují a především jejich legislativně sledované metabolity ESA a OA kontaminují podzemní i povrchové vody. Cílem této metodiky bylo vyvinout postupy, které by umožnily identifikovat mikroorganismy využitelné pro degradaci chloracetanilidových pesticidů a jejich relevantních metabolitů. I když je metodika zaměřena na tyto konkrétní polutanty, tak postupy jsou principiálně aplikovatelné i na další pesticidy a prakticky libovolné polutanty. Metodika nabízí dva různé přístupy vedoucí k identifikaci kandidátních degradérů. Jeden postup je založený na klasických kultivačních metodách mikrobiologie, kde jsou kandidátní organismy hledány v historicky zatíženém prostředí a problematická látka slouží jako zdroj stavebních prvků při izolacích z vody či půdy. Druhý postup využívá vysokokapacitních sekvenačních technologií, které poskytují obraz o bakteriálním i eukaryotickém mikrobiomu a kontaminace je simulována laboratorně. Přirozeně se vyskytující mikroorganismy, které lze získat těmito metodickými postupy, mají potenciál pro využití v dekontaminačních technologiích. Metodika navíc díky příkladům provedení poskytuje nové informace o problematických chloracetanilidových pesticidech a jejich relevantních metabolitech. Bylo identifikováno riziko přechodu alachloru na acetochlor, což indikuje potenciál falešně pozitivních identifikací acetochloru jako mateřské látky. Metodika nově přináší hodnocení rizika a transformace těchto látek v prostředí nejen z pohledu osudu sledovaných analytů, ale také vlivu na půdní mikrobiom. Metodika zohledňuje jak prokaryotické (bakteriální), tak eukaryotické mikroorganismy, přičemž lze podtrhnout souhru bakterií a eukaryot v biotransformacích polutantů, což ukazují oba postupy. Data ukazující změny ve struktuře půdního mikrobiomu jsou důležitá také při hodnocení rizik pesticidů, kde má metodika také své uplatnění.



3. Název a anotace anglicky

Title: Methodology for targeted acquisition of microbial isolates decontaminating environments loaded with persistent pollutants

The functioning of modern society brings pollution of the environment by substances that can later become an environmental problem. Such substances include chloroacetanilide pesticides, of which alachlor and acetochlor are banned in the EU. Despite the ban, they are still present in the environment and their legally monitored metabolites ESA and OA contaminate groundwater and surface water. The aim of this methodology was to develop procedures to identify microorganisms useful for the degradation of chloracetanilide pesticides and their relevant metabolites. Although the methodology is focused on these specific pollutants, the procedures are in principle applicable to other pesticides and virtually any pollutant as well. The methodology offers two different approaches leading to the identification of candidate degraders. One approach is based on classical cultivation methods, where candidate microorganisms are sought in a historically contaminated sites and the substance of concern serves as a source of elements for growth in isolations from water or soil. The second approach uses high-throughput sequencing technologies that provide a picture of the bacterial and eukaryotic microbiome, and contamination is simulated in the laboratory. The naturally occurring microorganisms that can be recovered by these methodologies have potential for use in decontamination technologies. In addition, the methodology provides new information on problematic chloroacetanilide pesticides and their relevant metabolites through the examples of experimental execution. The risk of conversion of alachlor to acetochlor was identified, thereby indicating the potential for false positive identifications of acetochlor as parent compound. The methodology provides a novel assessment of the risk and transformation of these substances in the environment in terms of the fate of the analytes of interest and in terms of the impact on the soil microbiome. The methodology considers both prokaryotic (bacterial) and eukaryotic microorganisms. Both used approaches highlighted the interplay between the bacteria and eukaryotes in the biotransformation of pollutants. Data showing changes in the structure of the soil microbiome are also important in pesticide risk assessment, in which the methodology also has applications.

4. Úvod

Rezidua některých pesticidů se vyskytují v prostředí i dlouho po jejich zákazu. Mezi takové pesticidy patří alachlor a acetochlor, které mají systémový herbicidní účinek. Tyto dva pesticidy byly zakázány v Evropské unii (EU) v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin (POR) na trh. Ačkoliv byl alachlor zakázán od roku 2008 a acetochlor od roku 2013, objevují se jejich rezidua v prostředí dodnes. V případě těchto pesticidů však mají z hlediska nežádoucího výskytu v prostředí větší význam jejich metabolity. Za zvláště rizikové relevantní metabolity chloracetanilidových pesticidů jsou považovány ESA a OA, které jsou ve srovnání s mateřskými látkami vysoce stabilní. Protože představují jisté environmentální a zdravotní riziko, jsou legislativně sledovány společně s mateřskými látkami. Zvláštní riziko představuje potenciál kontaminace pitných vod, a to jak podzemních, tak povrchových. Významný je fakt, že tyto metabolity kontaminují vody dlouhodobě, protože se z půdního prostředí uvolňují postupně. Pro takto perzistentní a rizikové polutanty je potřeba mít k dispozici spolehlivé nástroje pro jejich monitoring, ale také hledat vhodné technologie pro jejich eliminaci ve vodním a půdním prostředí.

5. Cíl metodiky

Cílem této metodiky je předložit inovativní postupy využitelné pro cílené získání mikrobiálních izolátů účinných pro degradaci polutantů s konkrétním zaměřením na chloracetanilidové pesticidy a jejich relevantní metabolity. Cílem je získat metodiku, která bude mít obecnou platnost pro zájemce o získání mikrobiálních izolátů. Metodika má v principu nabízet dva přístupy, jeden založený na klasických kultivačních metodách mikrobiologie a druhý vycházející z vysokokapacitních technologií. Přirozeně se vyskytující mikroorganismy, které lze získat těmito metodickými postupy, se podílí na biotransformacích cílových látek. Proto je důležitým, ačkoliv vedlejším cílem metodiky, také sledování osudu mateřských látek a jejich metabolitů v prostředí.

6. Význam chloracetanilidových pesticidů a jejich metabolitů

Chloracetanilidové pesticidy jsou poměrně početnou skupinou pesticidů. Jsou používány jako herbicidy. Jejich použití je zejména k likvidaci plevelů a jednoletých trav. Mohou ovlivňovat syntézu alkylových řetězců delších než C18 mimo chloroplast a tím inhibovat elongaci mastných



kyselin s dlouhým řetězcem [1]. Dále mohou tyto herbicidy jejich deriváty např. blokovat syntézu prekurzorů gibberelinů [2] či flavonoidových metabolitů [3]. Protože existuje celá řada chloracetanilidových herbicidů, lze předpokládat také další mechanismy účinku [4].

Chloracetanilidové pesticidy zůstávají po aplikaci po určitou dobu v půdě. Za anaerobních podmínek jsou stabilnější než za aerobních podmínek, za kterých jsou vcelku rychle degradovány [5]. Mohou se uvolňovat vyluhováním nebo povrchovým odtokem a kontaminovat podzemní a povrchové vody [6]. Chloracetanilidové pesticidy jsou také často detekovány v podzemních a povrchových vodách, kde mohou představovat riziko pro řadu organismů [7]. I při nízkých koncentracích ve vodě i zemědělských produktech mohou představovat riziko pro veřejné zdraví a životní prostředí. Mateřské látky i relevantní metabolity mohou mít genotoxický účinek. Mohou zvyšovat oxidativní stres zvyšováním reaktivních forem kyslíku a spouštět apoptózu [8]. Studie navíc indikovaly jejich spojitost se vznikem rakoviny a Parkinsonovy choroby [9, 10]. Minimálně z těchto důvodů je potřeba předcházet zatížení životního prostředí a expozicím necílových organismů rezidui chloracetanilidových pesticidů a jejich relevantních metabolitů. V případech, kdy je již prostředí látkami kontaminováno, je potřeba věnovat pozornost perzistenci v prostředí, navrhnout a realizovat prostředky pro jejich eliminaci.

Pesticidy včetně chloracetanilidových mohou být v prostředí degradovány různými environmentálními faktory. Na zemědělských lokalitách i v sousedních ekosystémech, včetně vodních, existuje velké množství degradačních faktorů, které ovlivňují perzistenci pesticidů. Důležitými faktory jsou vyluhování z půdy, úroveň vlhkosti, intenzita světla, teplota, pH půdy a také UV záření. Nelze opomenout také klimatické vlivy. Dalším kritickým faktorem je přítomnost různých mikroorganismů, které mohou změnit chemické složení prostřednictvím degradace, mineralizace nebo konjugace [11–14]. V případě chloracetanilidových pesticidů představují z praktického hlediska větší problém v prostředí jejich relevantní metabolity, protože jsou podstatně hůře odbouratelné. Jedná se především o ESA a OA metabolity, na které jsou mateřské látky degradovány mikroorganismy. Tyto metabolity jsou sledované v prostředí obdobně jako jejich mateřské látky. Navíc podléhají také sledování ve vodách z hlediska legislativy [7, 15, 16]. Z hlediska legislativy v EU jsou při posuzování rizik pesticidních látek klíčová nařízení, která se vztahují ke kontaminacím podzemních a pitných vod. Při posuzování míry rizika pro pesticidy v podzemních vodách se v zásadě vychází ze směrnice Evropského parlamentu (EP) a Rady

2000/60/ES [17], kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky. Obdobná pravidla jsou stanovena pro pitnou vodu směrnicí 2020/2184 o jakosti vody určené k lidské spotřebě, která je přepracovanou verzí původní směrnice Rady 98/83/ES [18]. Zásadním a klíčovým předpisem je, že pro každý jednotlivý pesticid a jeho relevantní metabolity je povolený limit 0,1 µg/l, zatímco pro celkovou sumu pesticidních látek je limit 0,5 µg/l. Za relevantní metabolit se považuje pouze taková látka, jejíž přirozené vlastnosti jsou srovnatelné s vlastnostmi mateřské látky, a to pokud jde o účinek ve smyslu cílové aktivity původního pesticidu. Právě ESA a OA metabolity jsou relevantními metabolity, a proto jsou z hlediska legislativy monitorovány společně s jejich mateřskými látkami. Existují však výjimky, kdy je povolen mírnější limit, než výše uvedených 0,5 µg/l. Např. pro obec Křepčice v okrese Znojmo byla krajskou hygienickou stanicí povolena 20. února 2020 do 31. ledna 2023 vyšší povolená hodnota pro směsnou koncentraci acetochloru ESA a acetochloru OA, která byla pro tento konkrétní případ stanovena dočasně na 1,5 µg/l [19]. I přes toto konkrétní zmírnění limitu je patrný význam těchto relevantních metabolitů chloracetanilidových pesticidů.

Relevantní metabolity jsou ve srovnání s mateřskými látkami chloracetanilidových pesticidů problematicky degradovatelné, ale mohou být relativně dobře odstraněny např. technologiemi využívajícími aktivní uhlí [20]. Používání těchto technologií je však spojeno s nemalými náklady a je vhodné pouze pro některé úpravny vody. Vhodným nástrojem pro jejich odstranění ve vodách i v zatížené půdě by mohly být určité mikroorganismy. Pro tento účel však nejsou vhodné všechny mikroorganismy, protože nemusí disponovat potřebnou schopností vůbec nebo pouze v relativně malé míře [21, 22]. Na způsoby identifikace vhodných mikroorganismů použitelných při dekontaminaci chloracetanilidových metabolitů se právě zaměřuje tato metodika.

7. Vlastní popis metodiky

Vlastní metodika je založena na inovativním přístupu, jehož aplikací v praxi je možné získat cíleně izoláty použitelné v degradaci perzistentních pesticidů anebo jejich metabolitů. Metodika zahrnuje v podstatě dva principiální postupy, přičemž jeden je založen na tradičním kultivačním postupu a druhý na nejmodernějších state-of-the-art metodách. V případě prvního metodického postupu je v podstatě kritické identifikovat kontaminovanou lokalitu, ze které se odebere materiál, např. kontaminovaná podzemní voda, ze které jsou pak izolovány mikroorganismy. Pesticidní látka v zásadě slouží jako substrát pro mikroorganismus. V druhém postupu je pro laboratorní simulace



vybrána modelová zemina, která je kontaminovaná vybraným pesticidem a případně jeho relevantními metabolity. Po určitém časovém úseku jsou odebrány vzorky, ve kterých je ověřen zbytkový obsah mateřské látky a metabolitů. Navíc je provedena vysokokapacitní analýza na mikrobiom, s výhodou nejen na bakterie, ale také na eukaryota. Každý z těchto dvou principiálních postupů má své výhody a nevýhody. V případě prvního postupu je potenciálně získán kultivovatelný mikroorganismus, který dokáže využívat pesticid jako zdroj prvků (hlavně uhlíku). Až pak se mikroorganismus nebo jejich konsorcium testuje, jakým způsobem reaguje v systému, resp. prostředí. V druhém případě je získán celkový obraz o struktuře mikrobiomu a jeho změnách vlivem přítomnosti testovaných polutantů. Změny v mikrobiomu, zvláště pokud mikroorganismy zvyšují svoji abundanci, jsou indikativní z hlediska potenciálu metabolizovat sledované látky. Na základě takovýchto komplexních výsledků je pak možné potenciálně cílit izolace mikroorganismů.

7.1. Výběr pesticidu/metabolitu pro hodnocení

Při návrhu konkrétního metodického postupu je nutno brát v úvahu realistický výskyt a perzistenci pesticidu a jeho relevantních metabolitů v prostředí. Při výběru látek je důležité vycházet z aktuálních potřeb odpovědných orgánů a celospolečenského významu. Metodický postup v této metodice byl vyvinut na případech chloracetanilodových pesticidů a jejich relevantních metabolitů ESA a OA. Zvláštní zaměření bylo na alachlor a acetochlor, které jsou v EU zakázány. Alachlor se nesmí používat od roku 2008 nařízením č. 2006/966/ES [23] a používání acetochloru byl zakázáno nařízením 1372/2011 od roku 2013 [24]. Je na místě zdůraznit, že přísný přístup aplikovaný při regulaci pesticidů v EU však nemá většinou obdobu mimo EU. Řada pesticidů zakázaných v EU je tedy jinde ve světě dále používána. Významné je obecné zjištění, že Spojené státy (USA) jsou ve srovnání se státy EU, ale dokonce i jinými státy ve světě, pozadu v zakazování pesticidů, které byly v EU nebo jinde vyhodnoceny jako škodlivé a skutečně zakázány [25]. To dokumentuje, že ačkoliv v USA probíhá také velmi důkladné hodnocení rizik pesticidů, nepanuje shoda s EU i jinými zeměmi ve světě ohledně zakazování pesticidů. Může tedy dojít k případům, že některé pesticidy jsou v EU již zakázány, zatímco jinde ve světě jsou hojně používány. V zemích EU se to týká právě alachloru a acetochloru, které jsou již zakázány. Skriningové analýzy prostředí pak odhalují perzistenci těchto mateřských látek a také jejich relevantních metabolitů. V jiných zemích, kde jsou tyto látky stále povoleny, a tedy i používány, je situace jiná. V takovém případě je totiž již kontaminované prostředí obohacované používáním

přípravků. I když je spotřeba pro snížení rizik na prostředí a člověka omezena, jedná se o pokračující přísun těchto látek do prostředí. To je také případ alachloru a acetochloru nejen v USA [26–29].

7.2. Získání kandidátních mikroorganismů kultivačním postupem ze zatížené matrice

Cestu cíleného získání kandidátních mikroorganismů kultivačním postupem znázorňuje schéma na obr. 1.

Obrázek 1. Schématické znázornění postupu pro získání kandidátních mikroorganismů kultivačním postupem.



7.2.1. Identifikace kontaminované lokality a vytipování matric pro izolace

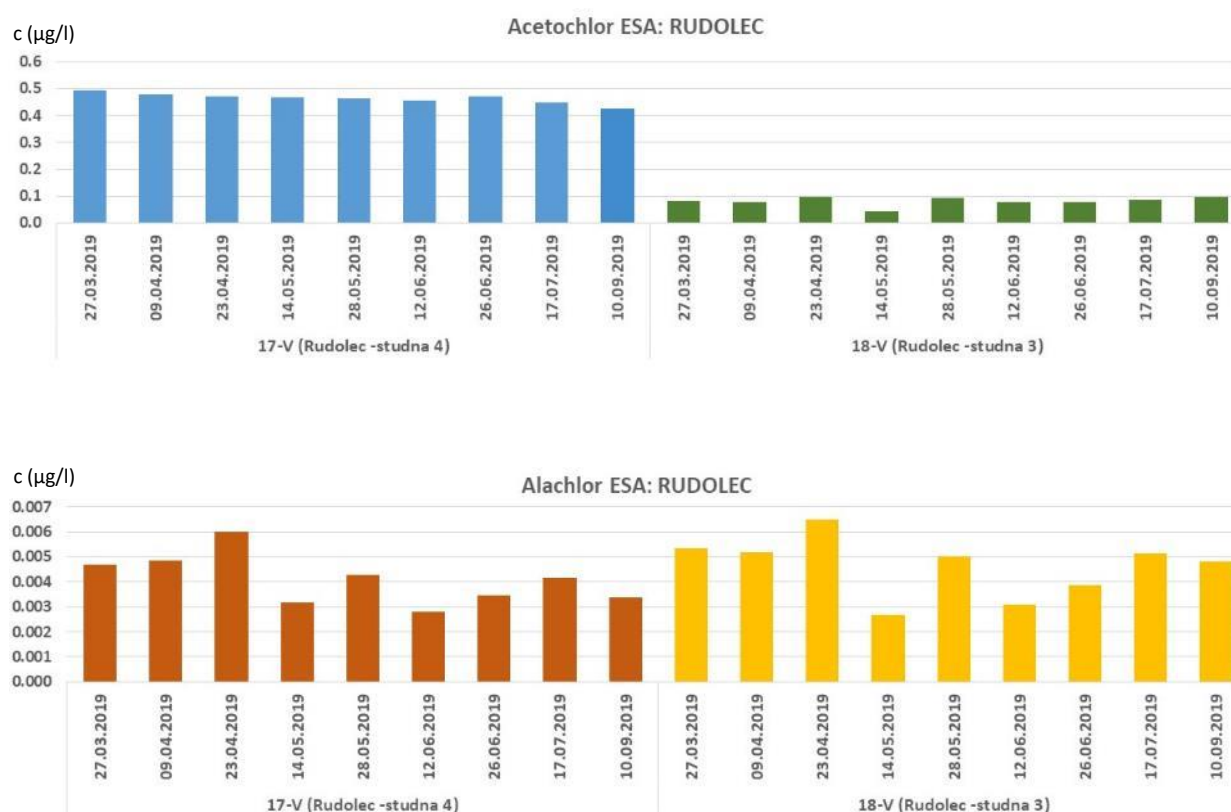
- Na základě zvoleného kontaminujícího pesticidu/metabolitu se provede vytipování lokality. Vhodná lokalita může být vytipovaná na základě historických záznamů o používání POR. Klíčové je však prokázání dlouhodobého výskytu přesahující legislativní limity pro pesticidy ve vodách.
- Jako zdroj klíčových informací poslouží multiresiduální skríníng na pesticidy a jejich metabolity. Je možné využít cílených analýz a vhodnou analytickou metodou je LC-MS/MS a GC-MS/MS.

Konkrétní výsledky skríníngů vody a zeminy:

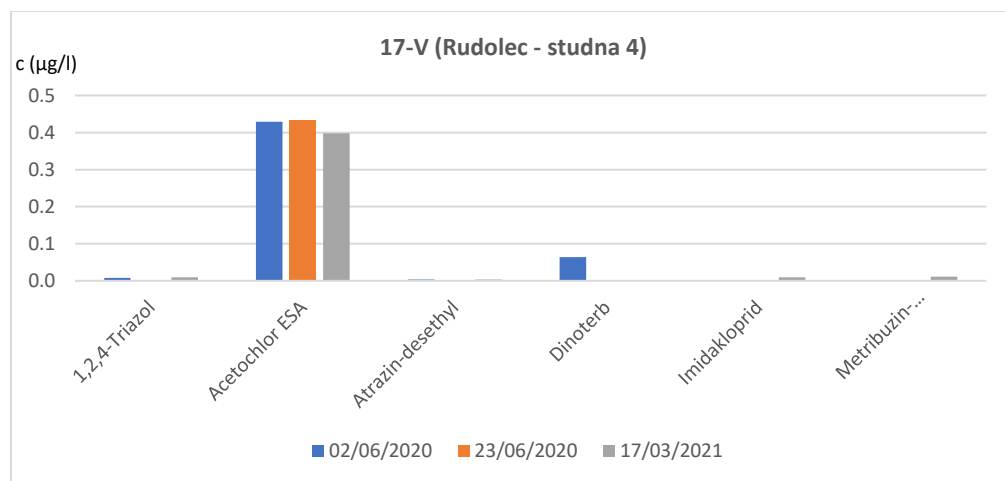
V našem případě byl na začátku proveden LC-MS/MS screening zdrojů vod, který zahrnoval studny, vrty, povrchové vody, ale také zeminy. Na základě úvodní skríníngové studie byly vybrány lokality pro izolace kultivačními postupy. Vzhledem k získaným izolátům jsou na grafech 1–6 uvedeny pro ilustraci především výsledky z lokalit, ze kterých byly získány.

a) Voda, Rudolec, studna 4 (získaný izolát: EPS 1067: *Microbacterium testaceum*)

Graf 1. Srovnání výskytu acetochloru ESA a alachloru ESA ve studnách 3 a 4 na lokalitě Rudolec. Výskyt acetochloru ESA je řádově 100× vyšší než alachloru ESA. Ze srovnání screeningu provedeného v roce 2019, je navíc patrné, že studna 4 je více kontaminovaná, a proto vhodnější pro izolaci kandidátních mikroorganismů. Hodnoty pro acetochlor ESA ve studni 4 přesahují legislativní limit pro jednotlivé pesticidní látky, a dokonce se blíží 0,5 µg/l, tedy legislativnímu limitu pro směšnou koncentraci.

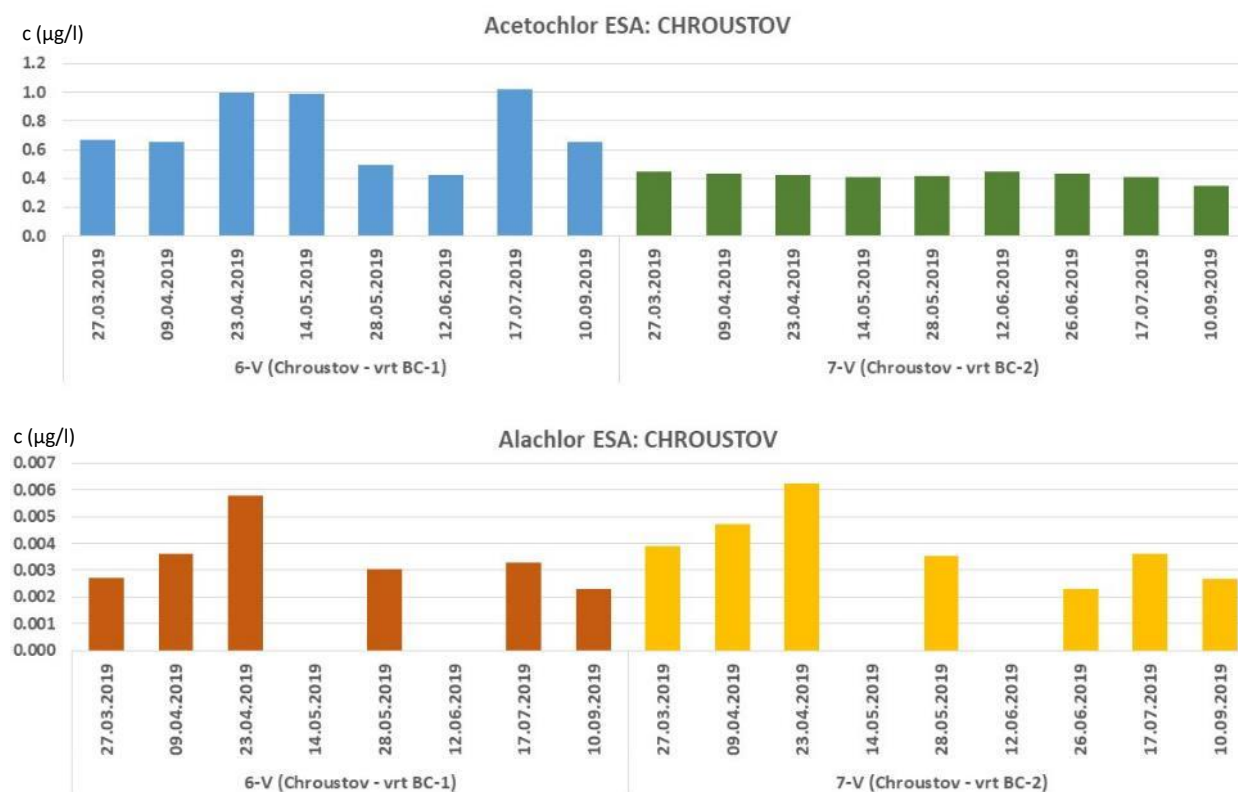


Graf 2. Měření v následujících letech 2020 a 2021 potvrdily, že studna 4 v Rudolci je dlouhodobě kontaminovaná acetochlorem ESA.

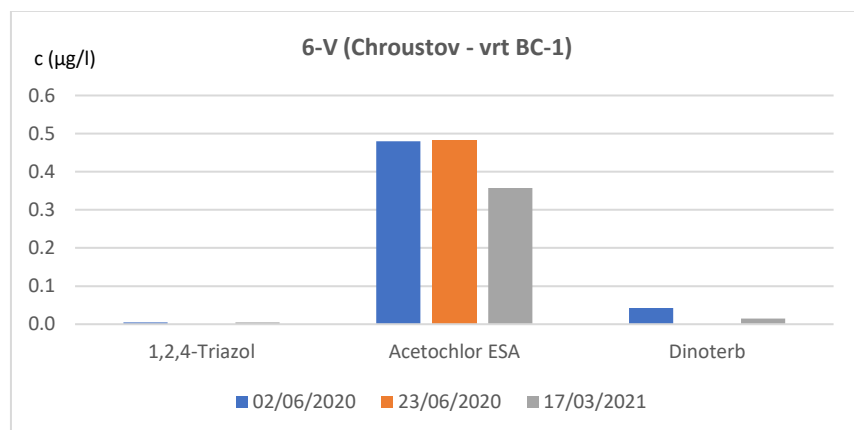


b) Voda, Chroustov, vrt BC 1 - směs (získaný izolát: EPS 1054 – *Brevundimonas diminuta*)

Graf 3. Srovnání výskytu acetochloru a alachloru ESA ve vrtech v Chroustově. Acetochlor ESA výrazně převládá nad alachlorem ESA a zejména ve vrtu BC-1 překračuje limity nejen pro jednotlivou pesticidní látku, ale i pro směšnou pesticidní koncentraci – 0,5 µg/l.

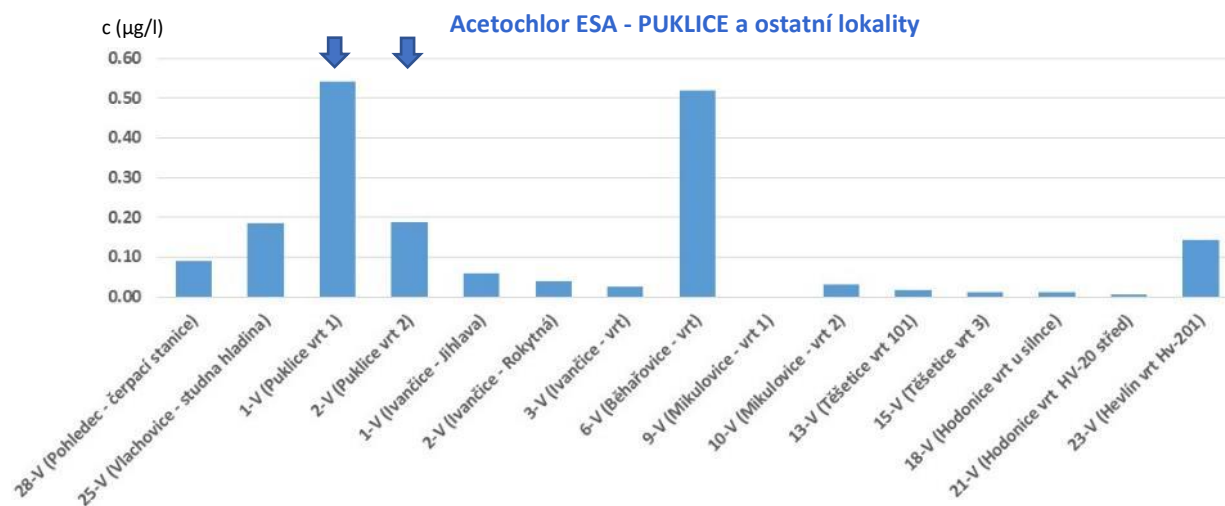


Graf 4. Měření v následujících letech 2020 a 2021 potvrdily, že vrt BC-1 v Chrostově je dlouhodobě významně kontaminovaná acetochlorem ESA.

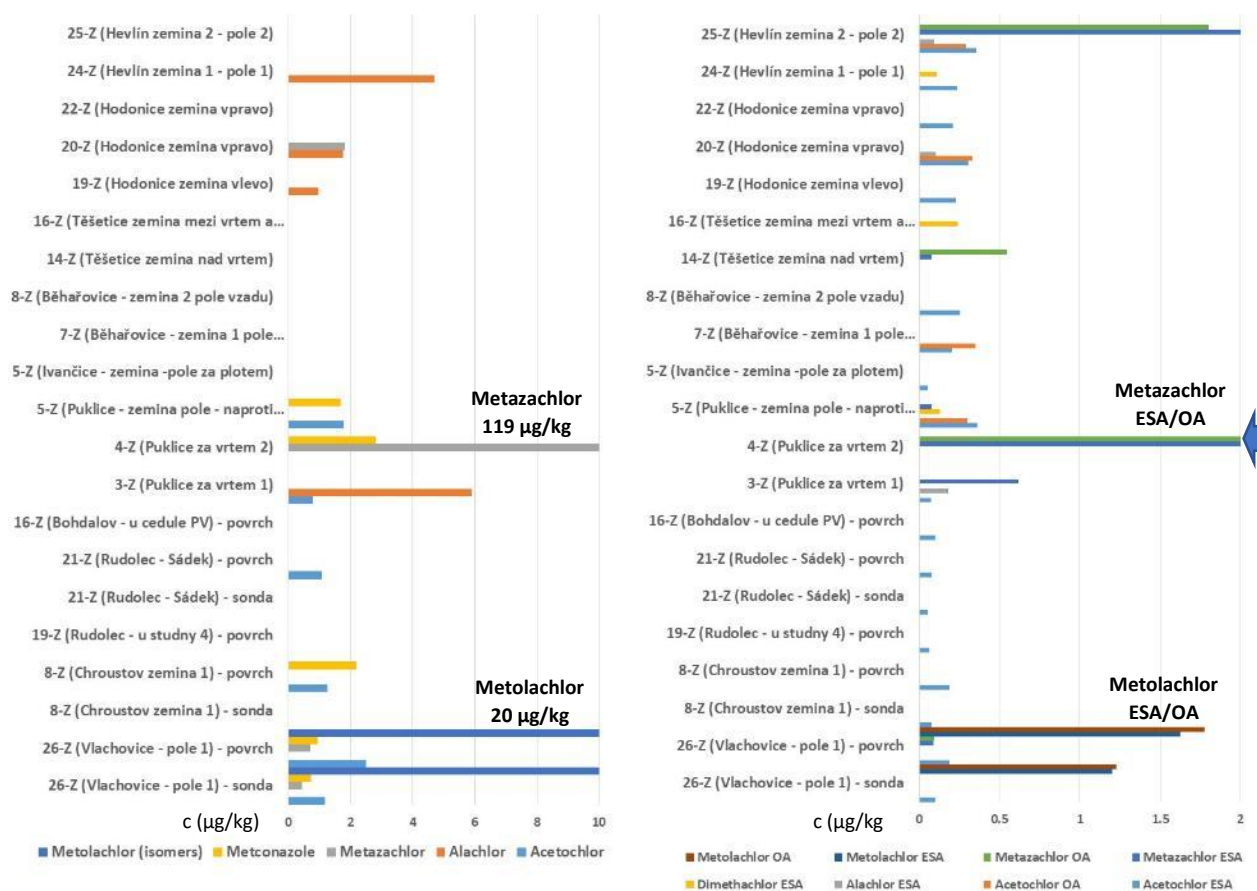


c, d) Zemina z lokality Puklice (získaný izolát: EPS 1048 – *Cyberlindnera suaveolens* - kvasinka); **Zemina z lokality Puklice** (získaný izolát: EPS 1049 – *Barnettozyma californica* - kvasinka)

Graf 5. Měření prokazující vysoký obsah acetochloru ESA ve vodách na lokalitě Puklice, která byla další zdrojovou lokalitou pro izolaci kandidátních degradérů. 2 kandidátní izoláty byly získány z lokality Puklice, ale ze zeminy (viz graf 6).



Graf 6. Výsledky měření prokazující vysoký obsah chloracetanilidových pesticidů a relevantních metabolitů v zeminách. Zemina odebraná z lokality Puklice posloužila jako zdroj pro selekci kandidátních mikroorganismů.



7.2.2. Postup zisku mikrobiálních taxonů s biodegradačním potenciálem

- Při izolacích kandidátních degradérů se vychází z principu, že všechny chemoorganotrofní bakterie vyžadují pro svůj růst uhlíkatý zdroj ve formě organických sloučenin. Některé mikroorganismy mají k dispozici specifický enzymový aparát pro rozklad (degradaci) látek méně běžných, jako jsou některé pesticidy či jejich metabolity. Může to být dáno buď strukturní podobností těchto syntetických látek s některými přírodními sloučeninami, nebo jde o rozklad na základě kometabolismu. Nelze vyloučit ani evoluci nových enzymů jako důsledek adaptace na výskyt určitých látek v prostředí.
- Kandidátní mikroorganismy schopné degradovat cílové analyty je možné vykultivovat z vhodných vzorků vody či půdy (případně sedimentů), které jsou kontaminovány mateřskými

látkami nebo jejich již vzniklými metabolity (viz grafy 1–6). Protože bude ve vzorku přítomno více druhů mikroorganismů, je potřeba provést selekci, která povede k izolaci kandidátních degradérů. Při izolaci se použijí definovaná minerální živná média obohacená o jedinou organickou sloučeninu, kterou představuje cílová cizorodá látka (pesticid nebo jeho metabolit).

V našem případě, kdy bylo zaměření na chloracetanilidové pesticidy, jsme využili jako modelové sloučeniny pesticidy alachlor a acetochlor. V takových živných prostředích mohou růst a množit se jediné ty buňky, které mají schopnost její utilizace. To je právě základní principiální vlastnost, které se využije pro selekci mikroorganismů v laboratorních nabohacovacích experimentech.

- Pro realizaci nabohacovacích experimentů, při kterých dochází k selekci mikroorganismů degradujících cílové analyty, se z každého vzorku kontaminované matrice odebere po 10 g suš. zeminy nebo 10 ml vody. Vzorek se umístí do sterilních Erlenmeyerových baněk společně s 90 ml minerálního média (BSM) s alachlorem nebo acetochlorem (alternativně jinou pesticidní látkou) o koncentraci 50–100 mg/l (separátně). Pesticidy jsou v experimentu jediným dostupným organickým zdrojem uhlíku a energie. Baňky jsou obaleny alobalem pro ochranu proti fotodegradaci pesticidů a poté jsou umístěny na třepačku. Po 1 týdnu od započetí experimentu se provede vyšetření na degradující a celkové heterotrofní, kultivovatelné mikroorganismy. Další odběr a mikrobiologické vyšetření pak proběhne po dalším týdnu, tedy po 14 dnech od počátku pokusu. Experimenty probíhají při běžné laboratorní teplotě, nebo v termostatu při konkrétní zvolené teplotě.

Pozn. V našem případě byly provedeny úpravy prostředí, aby byly odstraněny zejména primární nedostatky omezující nebo vylučující rozvoj degradační mikrobioty. Do vzorků vod nebo zeminových výluhů byly dodány základní minerální živiny ve formě solí (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$), tak aby bylo nutričně chudé prostředí dostatečně vybaveno nutrieny nezbytnými pro růst a degradační pochody přítomných mikroorganismů. V druhém případě pak byl k výše uvedeným vzorkům, kromě minerálních živin, přidán ještě alachlor nebo acetochlor (separátně v koncentraci 50–100 mg/l). Toto doplnění specifického C-zdroje ve formě „polutantu“ vytváří vhodný selekční tlak na mikroorganismy vybavené degradačními mechanismy vůči těmto látkám.

- Po nabohacení se izolují jednotlivé druhy mikroorganismů, aby bylo možné je sledovat samostatně. K získání čisté kultury (izolaci) se použije selektivní médium, které tvoří bakteriologický agar s obsahem příslušného pesticidu. Využije se metody křížového roztěru, který

je však často zapotřebí několikrát opakovat, než dojde k získání čisté kultury. Čistota izolované kultury se poté zkontroluje kultivačně a mikroskopicky. Navíc se provede identifikace izolovaného mikroorganismu pomocí molekulárních metod (PCR).

Pozn. Preferují se takové typy mikroorganismů, které se v ideálním případě vyskytují na selekčních agarech opakovaně a ve větším množství.

7.2.3. Směsné konsorcium

Mikroorganismy mohou být funkční samy o sobě nebo mohou fungovat lépe v konsorciu. V našem případě byla získána směsná mikrobiální populace, která je tvořena dvěma bakteriemi *Microbacterium testaceum* a *Brevundimonas diminuta* a dvěma kvasinkami *Cyberlindnera suaveolens* a *Barnettozyma californica* (viz tabulku 1). Toto konsorcium je popsáno ve funkčním vzorku [30] a navíc byla jeho funkčnost ověřena v dekontaminační technologii [31].

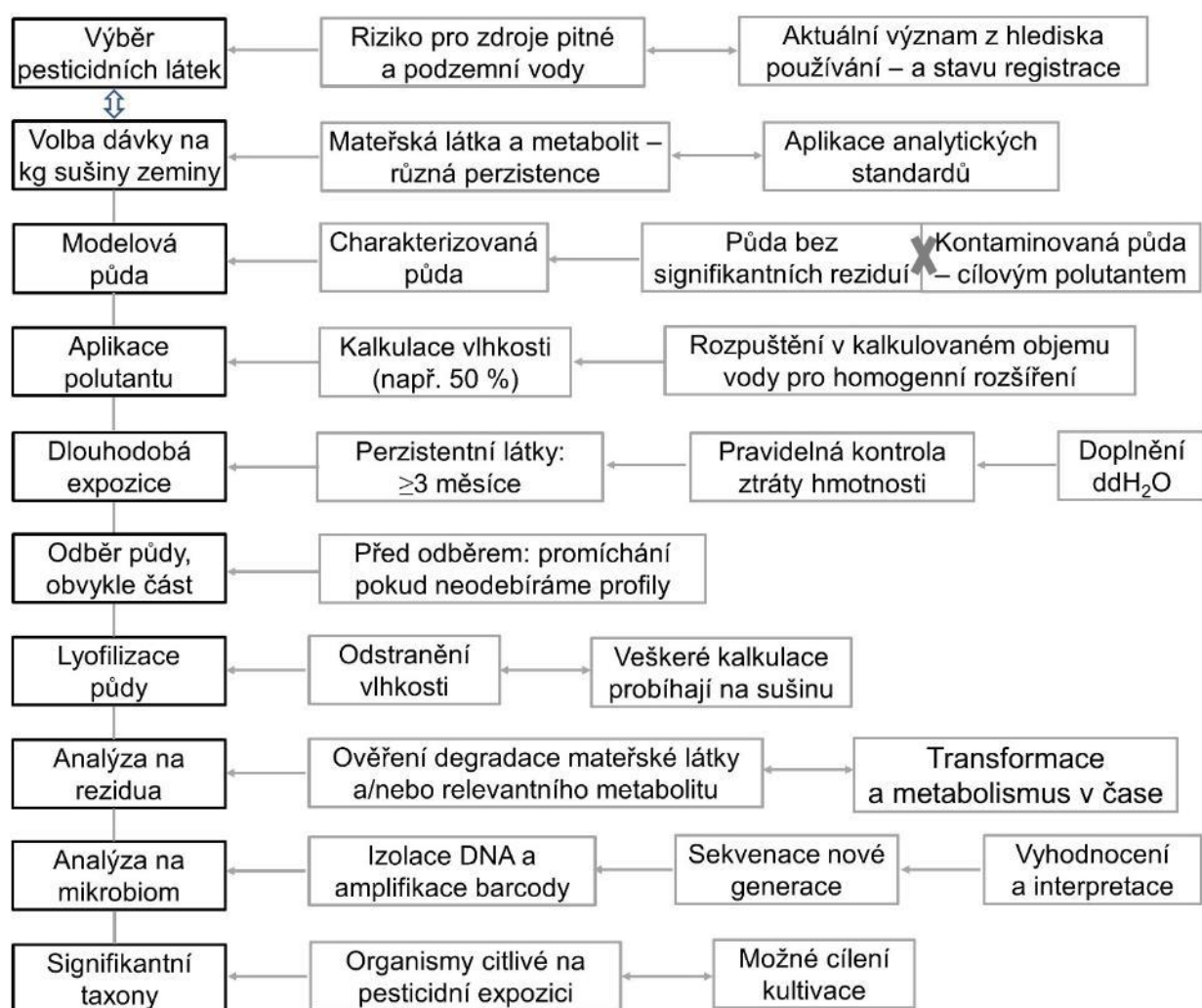
Tabulka 1. Směsný mikrobiální preparát a jeho složení.

Preparát	Název mikroorganismu	Označení ve firemní sbírce mikroorganismů	Forma skladování	Procentuální podíl ve výsledném konsorciu
1	<i>Microbacterium testaceum</i>	EPS 1067	lyofilizát	25 %
2	<i>Brevundimonas diminuta</i>	EPS 1054	lyofilizát	25 %
3	<i>Cyberlindnera suaveolens</i>	EPS 1048	lyofilizát	25 %
4	<i>Barnettozyma californica</i>	EPS 1049	lyofilizát	25 %

7.3. Selekce mikroorganismů z kontrolovaného experimentu využitím sekvenování nové generace

Cestu vedoucí k cílené identifikaci kandidátních mikroorganismů využitelných v dekontaminaci ukazuje schematické znázornění na obr. 2. Stejně jako u kultivačního postupu (viz kapitolu 7.2.) je v prvním kroku klíčový výběr pesticidní látky nebo látek (viz kapitolu 7.1.).

Obrázek 2. Schématické znázornění postupu pro získání kandidátních mikroorganismů kontrolovaným experimentem a aplikací vysokokapacitní metody sekvenování nové generace.





7.3.1. Volba dávky modelového polutantu

- Na základě zvoleného kontaminujícího pesticidu/metabolitu se zvolí odpovídající koncentrace pro expozici.
- Rozhodujícím kritériem pro volbu odpovídající dávky je realistický výskyt látky v prostředí a také povolené a doporučené aplikační dávky. Můžeme vycházet z vlastních skriningových analýz v prostředí (např. viz kapitolu 7.2.1). Pokud však nedisponujeme vlastními daty a nechystáme se je pořizovat, provedeme rešerši existující literatury.
- Může se zvažovat buď koncentrace jednotlivé látky nebo se může přihlídnout ke koncentracím v rámci dané skupiny pesticidních látek. Tato volba záleží na konkrétních látkách a jejich relevantního kvantitativního výskytu v prostředí.

Pozn. Pokud jsou pesticidy aplikované ve srovnatelných koncentracích, resp. spotřebách na hektar, je vhodné přistupovat k plánování dávkování pro experimenty v rámci pesticidní skupiny. Takovýmto případem jsou chloracetanilidové pesticidy, pro které jsou aplikační dávky aktivní látky řádově v jednotkách kg na ha [32–35]. Pokud je některý pesticid účinnější o řád nebo více než jeho alternativa v rámci pesticidní skupiny, je vhodnější zvažovat dávku pro experimenty v rámci jednotlivé mateřské látky. Ilustrativním příkladem je rozdílná účinnost, a tedy i aplikační dávka mezi různými neonikotinoidy. Např. dávku imidaklopridu bychom volili přibližně o řád vyšší než v případě acetamipridu, a ještě větší rozdíl by byl v případě thiaklopridu.

Konkrétní vybrané pesticidní látky v našem případě provedení:

V našem případě byly oblastí zájmu chloracetanilidové pesticidy. Jedná se o poměrně širokou skupinu látek s herbicidním účinkem. Vzhledem k tomu, že jsou v Česku jako členském státu EU dva zástupci skupiny (alachlor a acetochlor) zakázány, jeví se na základě recentního screeningu v našich podmínkách vhodnější zvažovat obsah v rámci skupiny pesticidů. Metolachlor společně s jeho ESA metabolitem jako povolená alternativa k alachloru a acetochloru je v Česku v současnosti nejčastěji nalézanou používanou pesticidní látkou v povrchových vodách a druhou nejčastěji nalézanou ve vodách podzemních [36].

Vezmeme-li v potaz reálná data z našeho screeningu v zeminách, která jsou uvedena v grafu 6, jeví se jako vhodná dávka 20 µg/kg pro mateřskou látku a pro metabolity ESA a OA o řád méně, tedy 2 µg/kg. Tyto dávky jsme tedy použili pro expoziční experiment s acetochlorem, alachlorem a jejich metabolity ESA a OA.

7.3.2. Modelová půda

- Vybere se modelová půda. Preferenčně volíme buď půdu, která pochází z lokality, kde se pesticidy dlouhodobě nepoužívají, nebo volíme půdu z historicky zatížené lokality. Odebereme dostatečné množství půdy, abychom mohli provést případná opakování pokusů. Půdu necháme vyschnout na vzduchu.
- V suché půdě se provede hodnocení kvality (zejména: pH H₂O; pH KCl; uhličitany; sorpční vlastnosti a výměnné kationty; Cox – obsah humusu; N_{tot} – celkový obsah dusíku; stanovení přístupných živin: Ca, Mg, K, P, Cu, Fe, Mn, Zn; zrnitost půdy), čímž získáme informace o charakteristikách půdy.

Pozn. Charakteristiku půdy je důležité archivovat pro interpretaci výsledků a jejich budoucí srovnání s výsledky provedenými na jiné půdě. Pokud ta samá nebo jiná laboratoř použije půdu s výrazně odlišnými charakteristikami a případně z jiné lokality, je množné, že výsledky z následných expozičních experimentů budou signifikantně odlišné.

Konkrétní modelová půda v našem případě provedení:

V našem případě jsme využili půdu ze starého sadu ve Výzkumném ústavu rostlinné výroby (VÚRV) v Praze 6 – Ruzyni. Ve „starém sadu“ se dlouhodobě (>20 let) nepoužívají pesticidy. Modelová půda byla charakterizovaná formou služby, přičemž zjištěné parametry jsou uvedeny v tabulce S1. Pro zjištění kvality byly odebrány čtyři reprezentativní vzorky. Protože jeden výsledek ze čtyř opakování vykazoval výrazně odlehlou hodnotu pro obsah humusu, byl vyřazen z prezentace. Půda byla navíc testovaná na rezidua pesticidů pomocí LC-MS/MS, čímž byl ověřen minimální vliv kontaminace jinými pesticidy na mikrobiom.

7.3.3. Provedení expozičního experimentu pesticidními látkami

- Pokusy se provádějí ve vhodných experimentálních nádobách, které nesmí být náchylné k adsorpci testovaných látek. Vhodné jsou např. plastové květníky (obr S1). Hliněné květníky však vhodné nejsou.
- V modelové půdě se před jejím umístěním do květníků provede analýza na obsah zbytkové vlhkosti. I když použijeme suchou půdu, tak i ta obsahuje určité procento vlhkosti. Tu stanovíme vysušováním. Nejšetrnější je lyofilizace půdy (vysušení mrazem za extrémně nízké teploty a tlaku),



ale běžněji používaným způsobem je vysušování při 105 °C. Zjištěnou zbytkovou vlhkost zahrneme do kalkulací pro navážku a následné cílové navlhčení půdy.

- Označené květníky se všemi zvolenými variantami, které zahrnují kontrolu a expoziční látky, jsou umístěny na ták (obr. S2), který slouží k jejich organizaci a usnadňuje manipulaci při založení experimentu i v jeho průběhu.
- Do květníků navážíme půdu s cílovou navážkou, která je kalkulovaná na sušinu. Při navážce tedy zohledníme zbytkovou vlhkost, kterou stanovujeme těsně před založením experimentu.
- Spočítá se dávkování pesticidních látek ve vodném roztoku. Kalkulace je prováděna tak, aby byl do květníku ve výsledku aplikován objem vodného roztoku pesticidní látky, kterým se po zalití najednou dosáhne požadované vlhkosti a zároveň požadovaného obsahu pesticidní látky. Při rozpouštění pesticidních látek se snažíme se vyhnout použití rozpouštědel. Proto ověříme rozpustnost látky ve vodě. Přesně kalkulovanou navážku pak rozpouštíme ve vodě za míchání na magnetické míchačce přes noc. Pokud by nebyla látka dobře rozpustná ve vodě, tak ji nejprve rozpustíme v malém objemu rozpouštědla, a pak aplikujeme do odpovídajícího objemu vody.

Pozn. Tímto postupem se zajistí homogenní rozložení testované látky v experimentální zemině. Kdybychom provedli nejprve navlhčení zeminy a až poté přidali koncentrovaný pesticid, nebyl by v zemině rozptýlen rovnoměrně. Obdobný problém by nastal při aplikaci látky v menším objemu a následném dolévání vody na finální vlhkost.

- Zaznamená se celková váha květníku s půdou navlhčenou na požadovanou vlhkost.

Pozn. Tento krok je důležitý pro kontrolu vlhkosti v experimentu – viz dále.

- Květníky, ve kterých je zemina, jsou přikryty bílou netkanou textilií, aby byla eliminována křížová kontaminace, ale aby byl umožněn přístup vzduchu (obr. S3). Alternativně se může expozice provádět bez přístupu vzduchu.
- Pro kultivaci se použijí klimaboxy s nucenou cirkulací a s precizně mikroprocesorem řízenou kontrolou teploty (obr. S4). Klimabox by měl být dostatečně velký, aby se do něj vešel celý experiment založený v experimentálních nádobách/květnících. Použijeme klimabox s přesností řízení vnitřní teploty alespoň $\pm 0,2$ °C a homogenitou $\pm 0,8$ °C. Důležitou součástí klimaboxu je také alarm, který upozorní (a zaznamená) na neočekávané výkyvy teplot, které by mohly ovlivnit výsledky experimentu.



- Po dobu kultivace se experiment alespoň jedenkrát týdně kontroluje. Kontroluje se celková váha a v případě potřeby se dolévá vypařená voda do původní hmotnosti, což zaručí stabilní vlhkost v průběhu experimentu.
- Na konci experimentu se odeberou vzorky půdy. Pokud neodebíráme profily, tak se na konci experimentu promíchá půda v květníku a následně se odeberou reprezentativní vzorky pro analýzy. Vzorky se odeberou do vzorkovnic, vhodné jsou sterilní 50 ml flakóny. Pro každou variantu je vhodné odebrat vzorky alespoň do 3 flakonů pro jednotlivé analýzy a případně jako rezervní vzorky. Vzorky se následně zmrazí a lyofilizují. Výhodou lyofilizované půdy na konci experimentu je, že se nemusí separátně stanovovat vlhkost v jiné části vzorku. Tento postup minimalizuje chyby.

Pozn. Po odběru vzorků v určitém časovém intervalu je možné pokračovat v expozici dále. V tom případě se květníky umístí zpět do termostatu a pokračuje se v experimentální expozici. Pro doplňování vlhkosti je pak potřeba počítat s hmotností odebraného vzorku, a o tuto hmotnost je pak kalkulována nižší celková hmotnost květníku se zeminou.

- V lyofilizované půdě se provedou potřebné analýzy. Zásadní jsou dva druhy analýz. Jednak je zásadní analýza na přítomnost mateřské látky a metabolitů v experimentu. Dále je to analýza na mikrobiom, která ukáže, které mikroorganismy se signifikantně mění expozicí konkrétními látkami.

7.3.4. Ověření degradace expozičních látek

- Na základě zvoleného kontaminujícího pesticidu/metabolitu se provede analýza, která ukáže obsah látky v době odběru vzorku neboli na konci experimentu.
- Jako zdroj klíčových informací poslouží výsledky screeningu na pesticidy a jejich metabolity. Principiálně je vhodnou analytickou metodou LC-MS/MS. V případě, že mateřská látka a sledovaný metabolit jsou známy, je vhodné použít cílenou analýzu.

Konkrétní výsledky ověřující stabilitu/biotransformaci látek v experimentu:

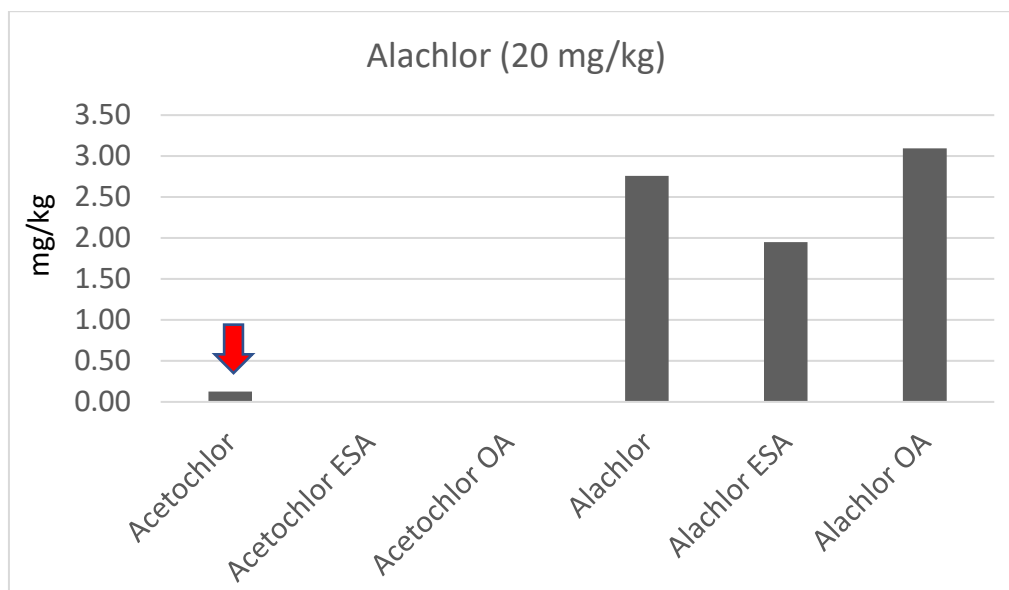
V našem případě jsme do modelové půdy aplikovali 20 mg/kg na sušinu mateřských látek, které představovaly alachlor a acetochlor. V dalších variantách jsme do půdy aplikovali jejich metabolity ESA a OA v dávkách 2 mg/kg na sušinu. Dávky byly odvozeny na základě námi provedených skriningových analýz (viz výše). Celkem bylo tedy 6 variant expozice pesticidní látkou a také byla použita kontrolní expozice bez přidané pesticidní látky.

Pesticidy a jejich relevantní metabolity byly aplikovány formou analytických standardů:

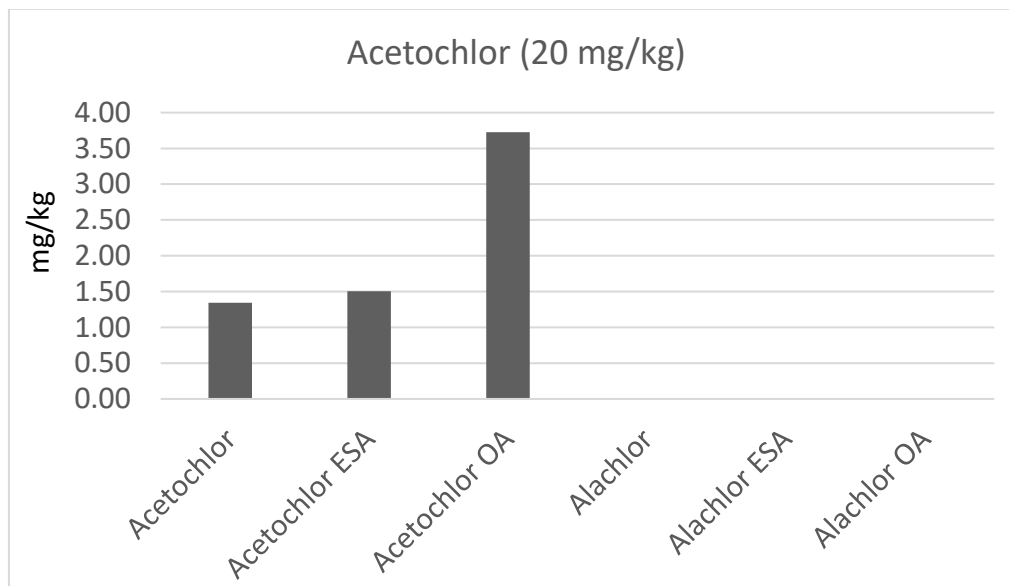
- a) Acetochlor: kat. č. 33379 (PESTANAL[®], Sigma-Aldrich)
- b) Alachlor: kat. č. 45316 (PESTANAL[®], Sigma-Aldrich)
- c) Acetochlor ESA: kat. č. 34145 (PESTANAL[®], Sigma-Aldrich)
- d) Alachlor ESA: kat. č. 34147 (PESTANAL[®], Sigma-Aldrich)
- e) Acetochlor OA: kat. č. 34144 (PESTANAL[®], Sigma-Aldrich)
- f) Alachlor OA: kat. č. 34146 (PESTANAL[®], Sigma-Aldrich)

Výsledky ověřující stabilitu/biotransformaci látek v půdním prostředí jsou uvedeny v grafech 7–12. Výsledky prezentované grafech představují průměrné hodnoty ze 6 biologických opakování po 3měsíční inkubaci v půdě při stabilní teplotě 18 °C a udržované 50% vlhkosti.

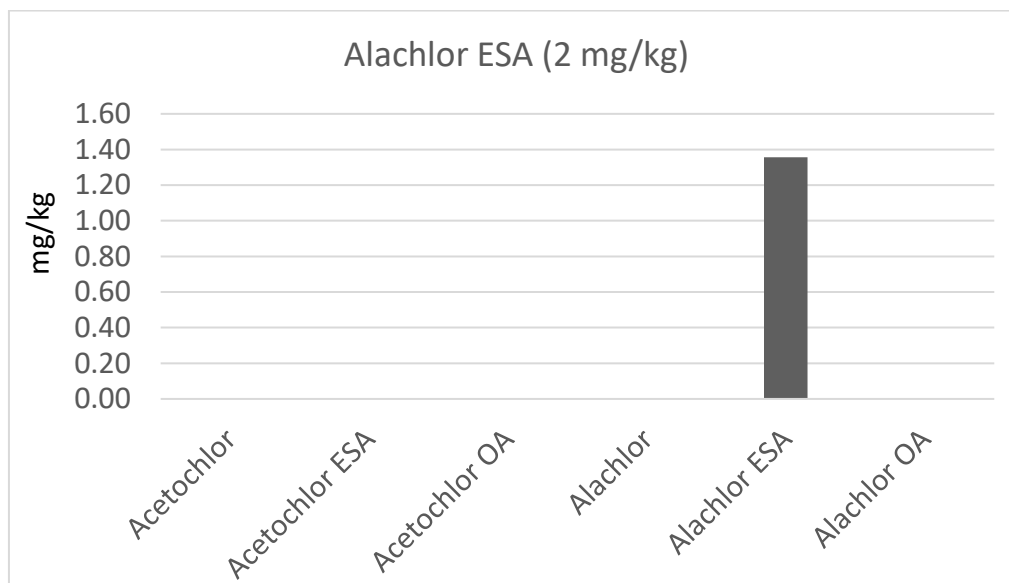
Graf 7. Srovnání perzistence alachloru a jeho biotransformace po 3 měsících při počáteční aplikační dávce 20 mg/kg. Výsledek ukazuje, že mateřská látka alachlor byla metabolizována na relevantní metabolity alachlor OA a v menší míře na alachlor ESA, ale parciálně také na acetochlor. Výsledek indikuje, že alachlor může být metabolizován na jiný pesticid, tedy acetochlor (označeno červenou šipkou).



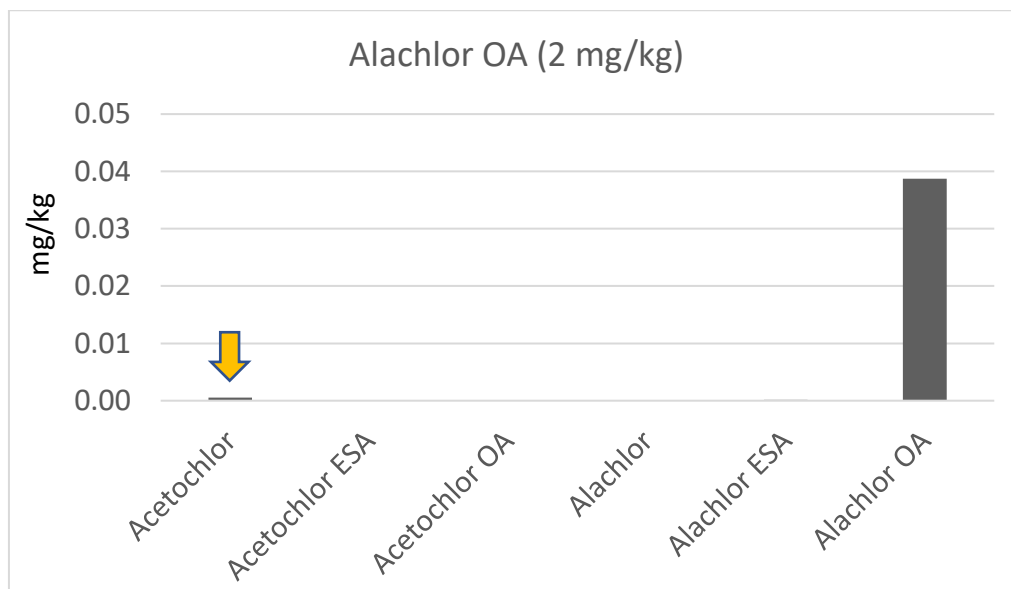
Graf 8. Srovnání perzistence acetochloru a jeho biotransformace po 3 měsících při počáteční aplikační dávce 20 mg/kg. Výsledek ukazuje, že mateřská látka acetochlor byla metabolizována především na relevantní metabolit acetochlor OA a v menší míře na acetochlor ESA.



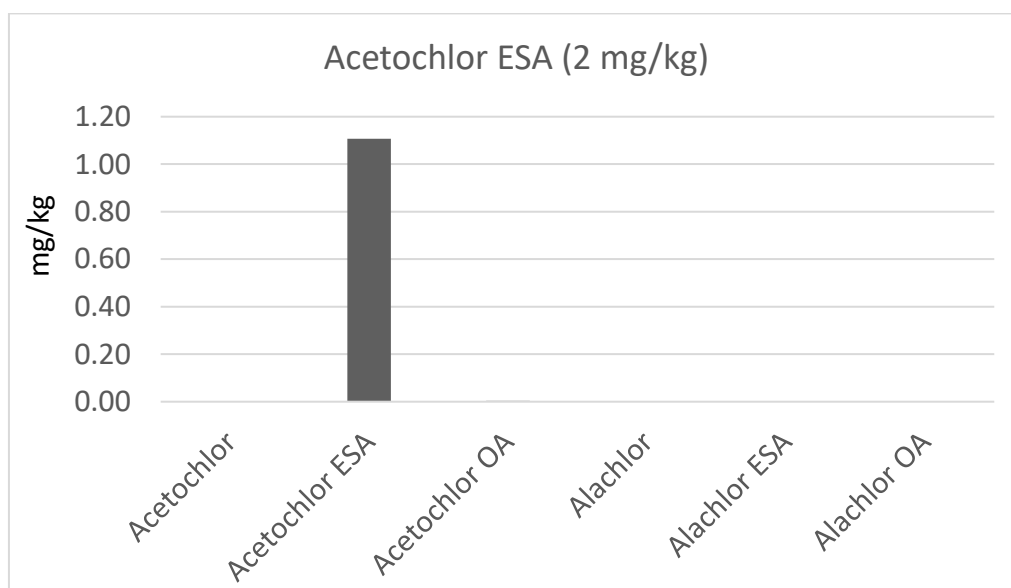
Graf 9. Srovnání perzistence alachloru ESA a jeho biotransformace po 3 měsících při počáteční aplikační dávce 2 mg/kg. Výsledek ukazuje, že alachlor ESA je velmi stabilní a neprobíhá transformace na další relevantní produkty.



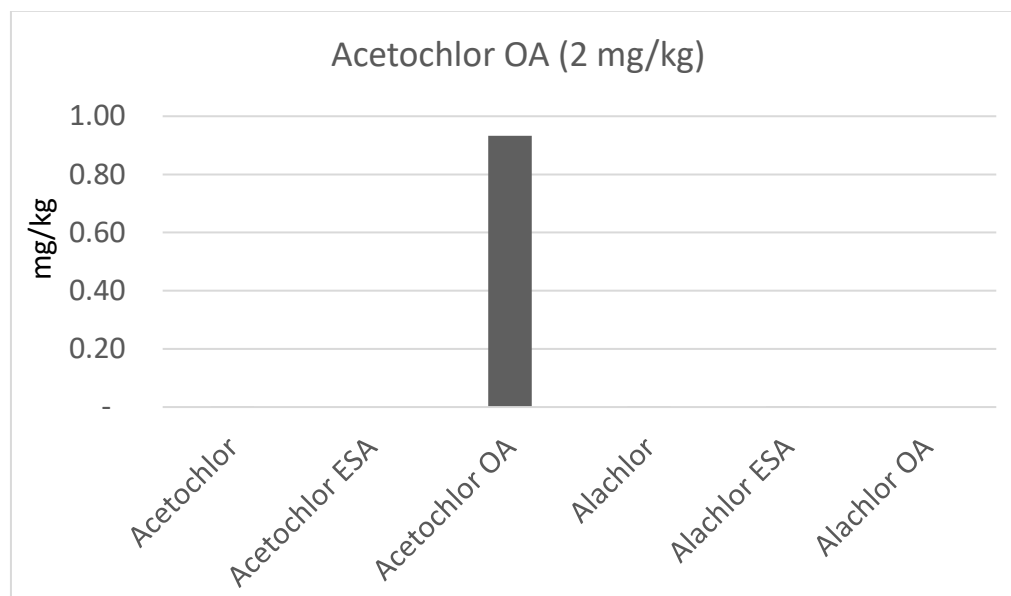
Graf 10. Srovnání perzistence alachloru OA a jeho biotransformace po 3 měsících při počáteční aplikační dávce 2 mg/kg. Výsledek ukazuje, že alachlor OA je dále degradován a neprobíhá transformace na ESA metabolit. Byl však zaznamenán výskyt acetochloru, což může znamenat potenciální parciální biotransformaci alachloru OA na acetochlor (označeno oranžovou šipkou), což vykazuje podobnost se zjištěním parciální transformace alachloru na acetochlor (viz graf 7).



Graf 11. Srovnání perzistence acetochloru ESA a jeho biotransformace po 3 měsících při počáteční aplikační dávce 2 mg/kg. Výsledek ukazuje, že acetochlor ESA je dále degradován a neprobíhá transformace na OA metabolit.



Graf 12. Srovnání v perzistence acetochloru OA a jeho biotransformace po 3 měsících při počáteční aplikační dávce 2 mg/kg. Výsledek ukazuje, že acetochlor OA je dále degradován a neprobíhá transformace na ESA metabolit.



7.3.5. Identifikace kandidátních mikroorganismů NGS technologií

Mikroorganismy mohou měnit své zastoupení působením řady vlivů. V principu může přítomnost určitého polutantu, pesticidu a jeho metabolitů, způsobit změnu abundance jednotlivých mikroorganismů, ale může dojít také k výrazné změně struktury celého mikrobiomu.

Prověření, zda dochází, nebo nedochází k ovlivnění mikrobiomu v půdě, je jedním z důležitých faktorů při posuzování rizik pesticidů a jejich relevantních metabolitů na prostředí. V minulosti bylo dle reportu EFSA riziko acetochloru pro necílové mikroorganismy vyhodnoceno jako malé [37]. Vliv alachloru na mikrobiální aktivitu půdy byl v minulosti také hodnocen, ale nebyl hodnocen jako výrazně rizikový [38]. Co je jasné, že na biodegradaci mateřských látek chloracetanilidových pesticidů se účastní mikroorganismy [39, 40]. V posledních letech vyvinuté vysokokapacitní přístupy mohou ukázat dříve neodhalený vliv na půdní mikrobiom, a to jak prokaryotický, tak eukaryotický.

- Vhodná metoda pro analýzu mikrobiomu je metabarkodování 16S a 18S s využitím vysokokapacitního sekvenování (např. využitím Illumina technologie, nebo jinou alternativou jako Nanopore, PacBio).
- Výsledky je možno zpracovat za pomoci různých vhodných programů (např. Mothur, UParse, DADA, R, atd.). Hodnocení dat vysokokapacitního sekvenování podléhá neustálému vývoji, a tak je vhodné použít v současnosti nejpokročilejších a nejpoužívanějších bioinformatických metod.

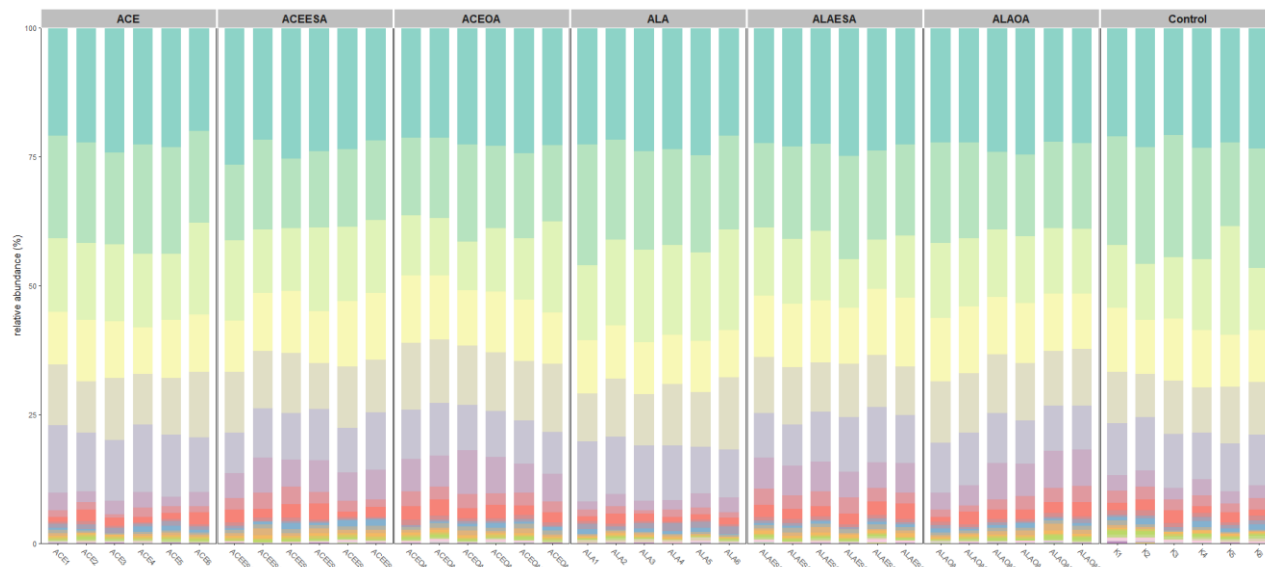
Konkrétní výsledky ukazující rozdíly v abundanci bakteriálních taxonů získaných vysokokapacitním sekvenováním:

V našem případě jsme zvolili metabarkodovou analýzu V4 fragmentu 16S rRNA genu. Produkty byly sekvenovány na platformě Illumina MiSeq v Research Resources Center University of Illinois at Chicago v USA. Data byla zpracována pomocí programu R (verze 4.2.0) [41] rozšířeného o následující balíčky:

- MicrobiotaProcess [42]
- phyloseq [43]
- ggplot2 [44, 45]
- tidyverse [46]
- vegan [47]
- coin [48, 49]
- reshape2 [50]
- ggnewscale [51]
- dada2 [52]

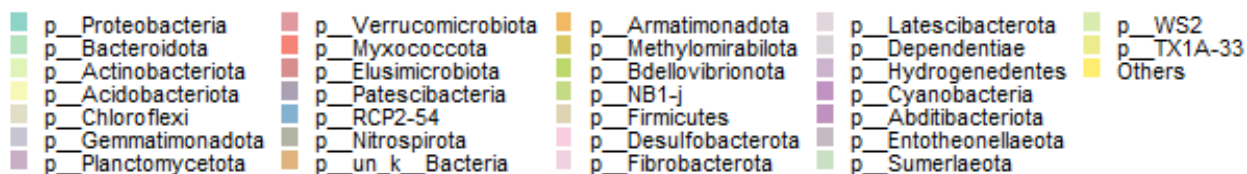
Výsledky prezentované v grafu 13 indikují, že jednotlivé varianty expozic ovlivnily strukturu bakteriálního mikrobiomu. Z tohoto znázornění však nelze exaktně indikovat bakteriální taxony.

Graf 13. Výsledky vyhodnocení relativní abundance bakteriálních kmenů v závislosti na přítomnosti mateřských pesticidních látek a jejich degradačních produktů (metabolitů), které byly přidány do půdy. Výsledky jsou vyobrazeny v jednotlivých 6 biologických opakováníh na pesticidní látku a kontrolu.



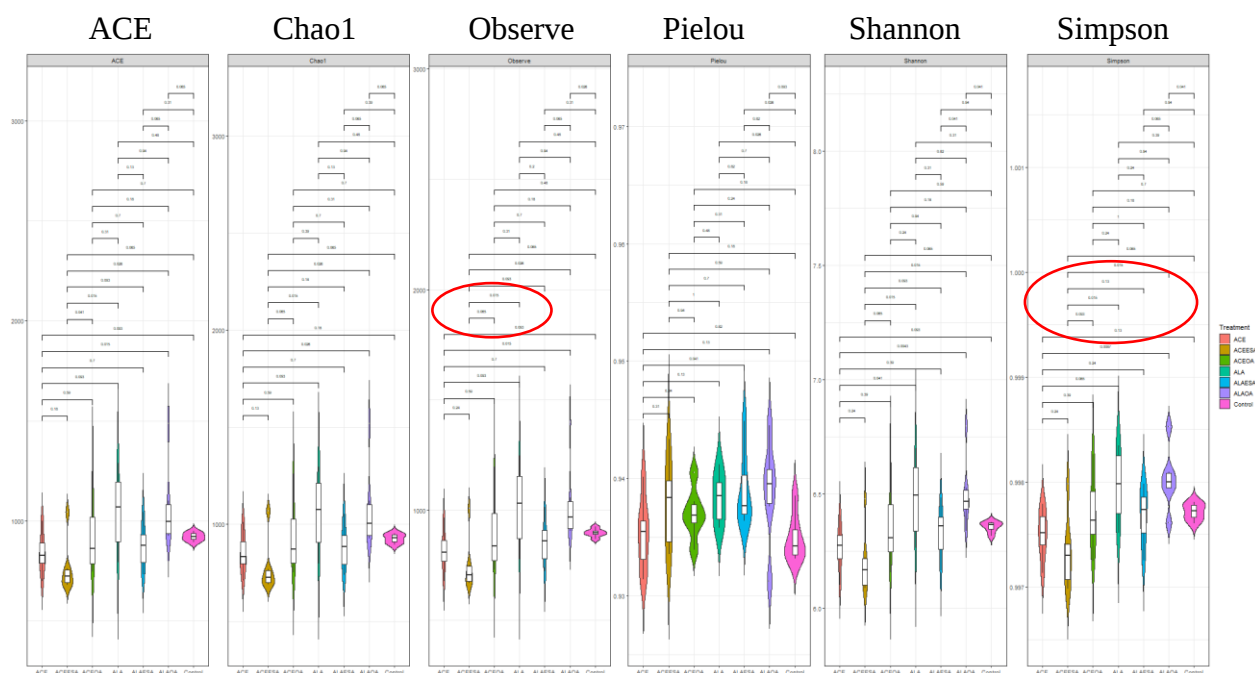
Legenda:

Identifikované bakteriální taxony (taxonomická úroveň kmen) zobrazené ve sloupcovém grafu:

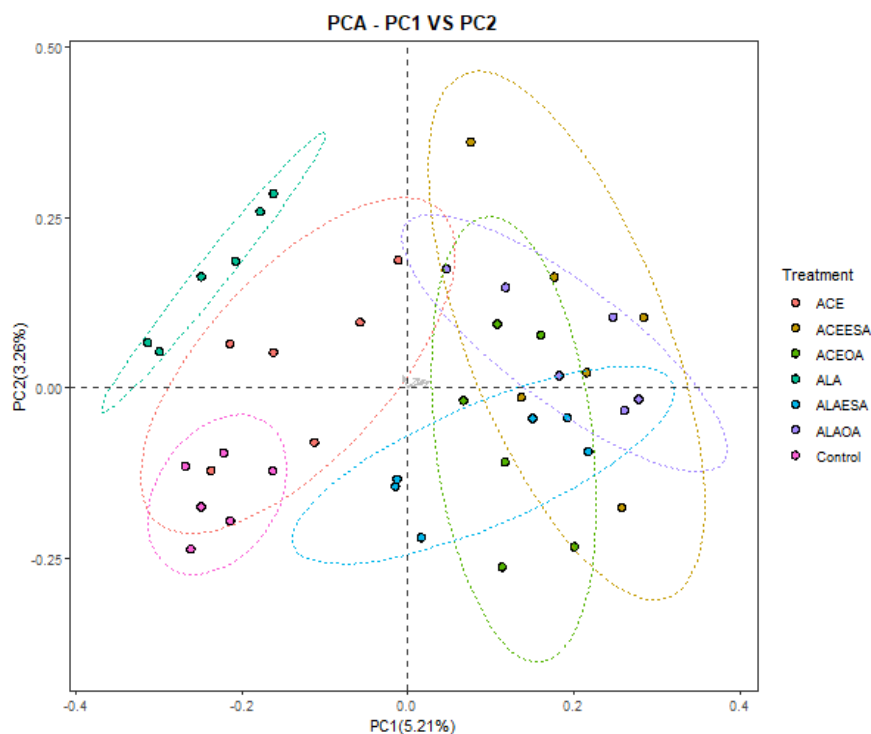


Varianty expozice: ACE – acetochlor; ACEESA – acetochlor ESA; ACEOA – acechlor OA; ALA – alachlor; ALAESA – alachlor ESA; ALAOA – alachlor OA; Control – kontrola.

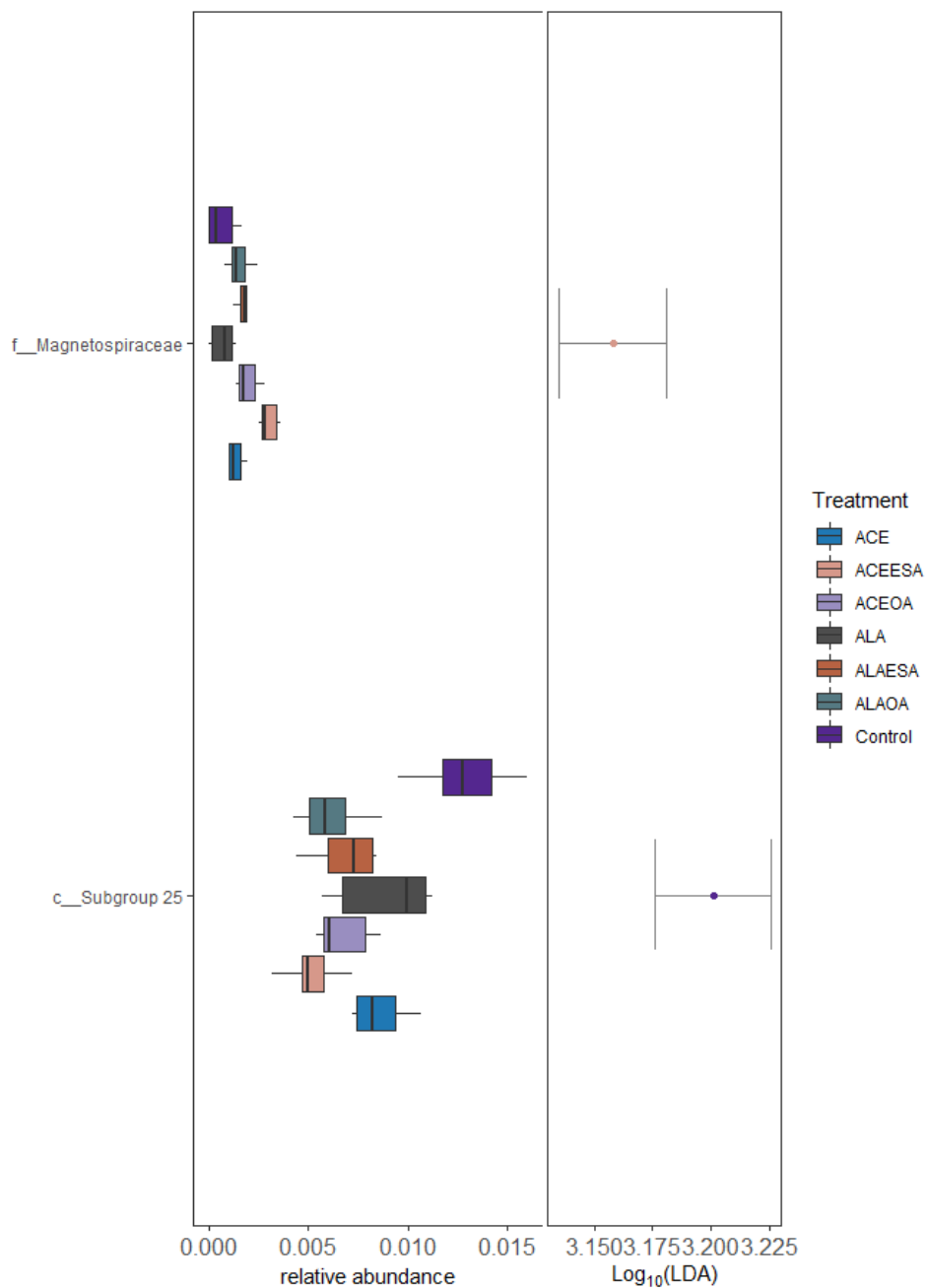
Graf 14. Změny v bakteriální α -diverzitě (celková míra rozmanitosti druhů) v závislosti na přítomnosti pesticidů a jejich degradačních produktů – 6 nejčastěji používaných způsobů výpočtu. Červeně zakroužkované výsledky značí signifikantní výsledky pro postoupení dalším analýzám.



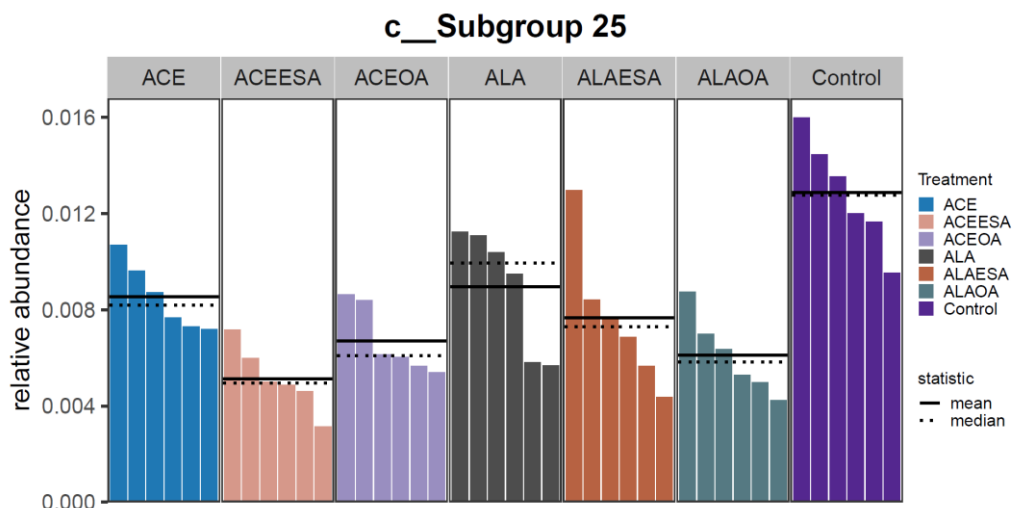
Graf 15. Redundantní diskriminační analýza (RDA – také β -diversita) pro bakterie. Obecné rozdíly v přítomnosti bakterií jsou vidět jako distribuce podle osy x. Rozdíly jsou mezi vzorky s přítomností ESA a OA.



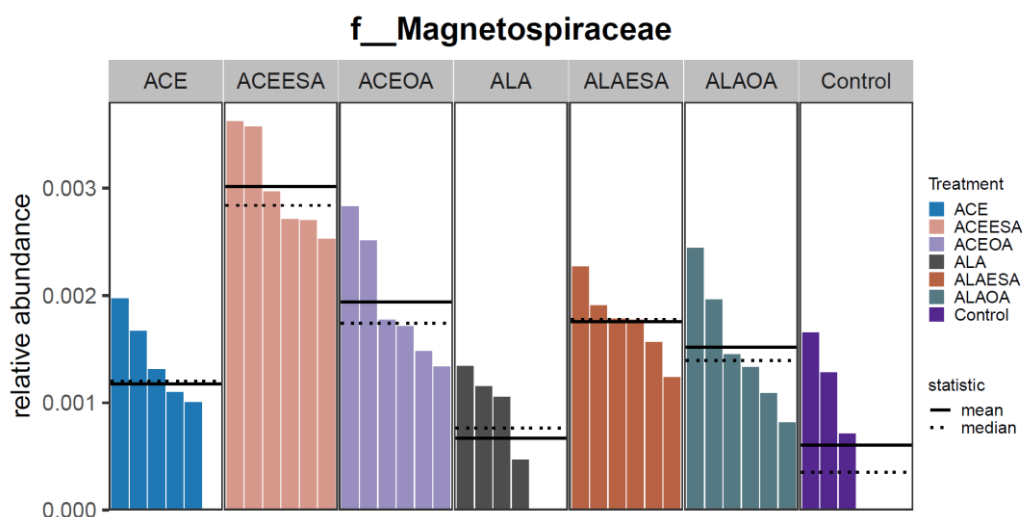
Graf 16. Identifikované reagující bakterie. Byla identifikovaná jedna zatím neznámá bakterie kmene Magnetospiraceae a druhá patřící do třídy Podskupina 25 kmene Acidobacteriota.



Graf 17. Výsledek odpovídající na otázku, zda identifikované bakterie reagují na přítomnost pesticidu pozitivně nebo negativně. Podle výstupu z analýzy je zastoupení třídy *Subgroup 25* (*Podskupina 25*) v přítomnosti pesticidu nebo jeho degradačního produktu nižší než v kontrolním vzorku. Tento bakteriální taxon reaguje na přítomnost pesticidu negativně.



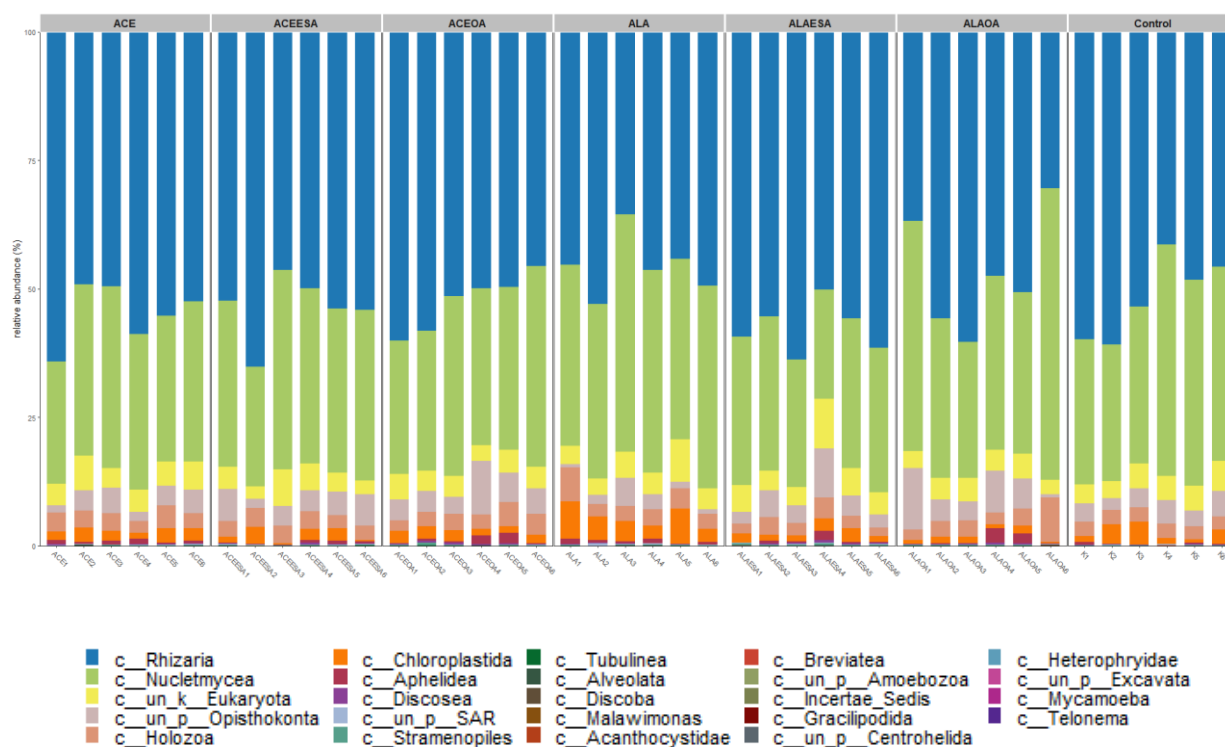
Graf 18. Výsledek odpovídající na otázku, zda identifikované bakterie reagují na přítomnost pesticidu pozitivně nebo negativně. Podle výstupu z analýzy je zastoupení taxonu kmene *Magnetospiraceae* v přítomnosti pesticidu nebo jeho degradačního produktu vyšší než v kontrolním vzorku. Tento bakteriální taxon reaguje na přítomnost pesticidu pozitivně.



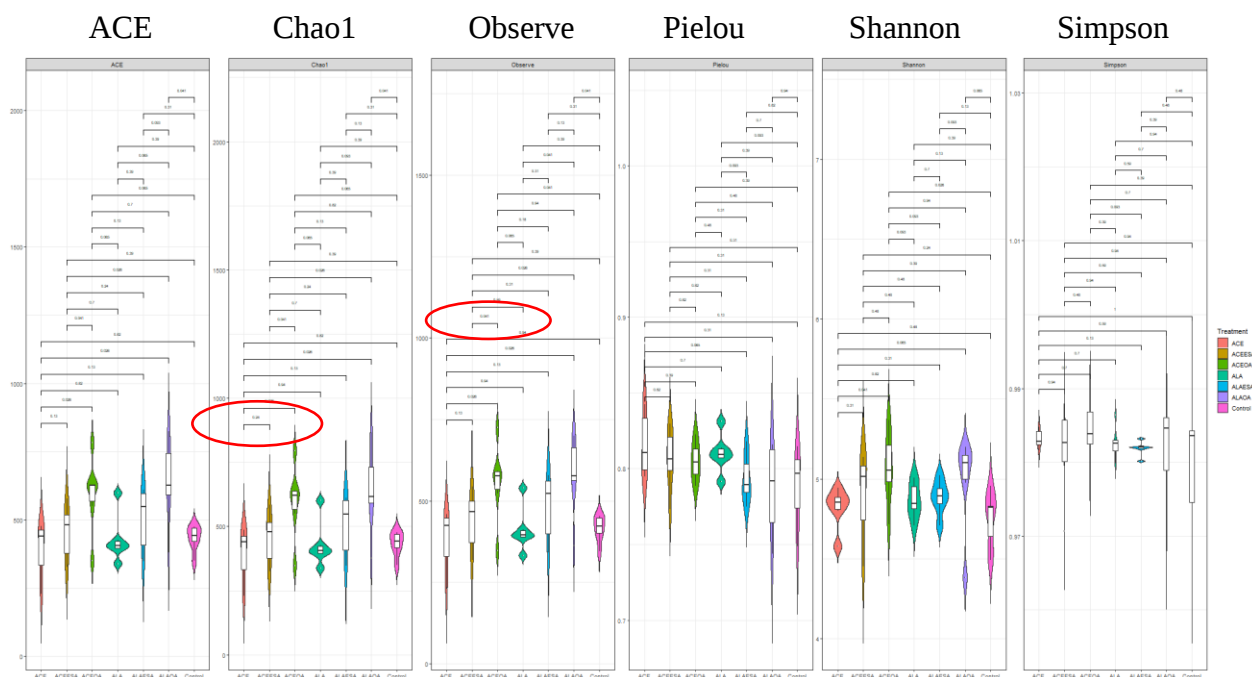
Podle výstupu z analýzy v grafu 18 je patrné, že bakteriální taxon *Magnetospiraceae* reaguje pozitivně (tj. zvýšenou abundancí), a proto je vhodný pro cílení postupu izolace kandidáta degradujícího pesticid/metabolit.

Na druhou stranu výstup z grafu 17 indikuje nevhodnost cílení izolace pro bakteriální taxon *Subgroup 25*, který reaguje na pesticidovou expozici sníženou abundancí.

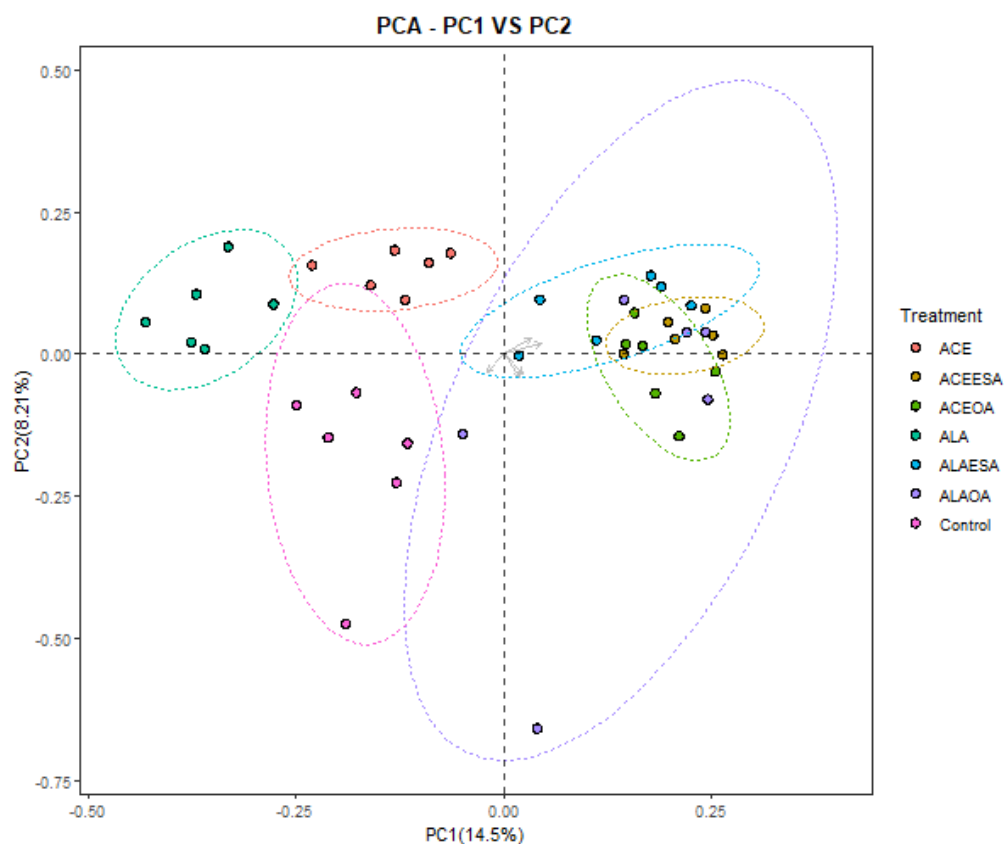
Graf 19. Obdobným způsobem jako pro bakterie jsme identifikovali rozdíly v abundanci eukaryotních taxonů (kvasinek, hub, plísní, prvoků, apod.) získaných vysokokapacitním sekvenováním oblasti 18S rRNA genu.



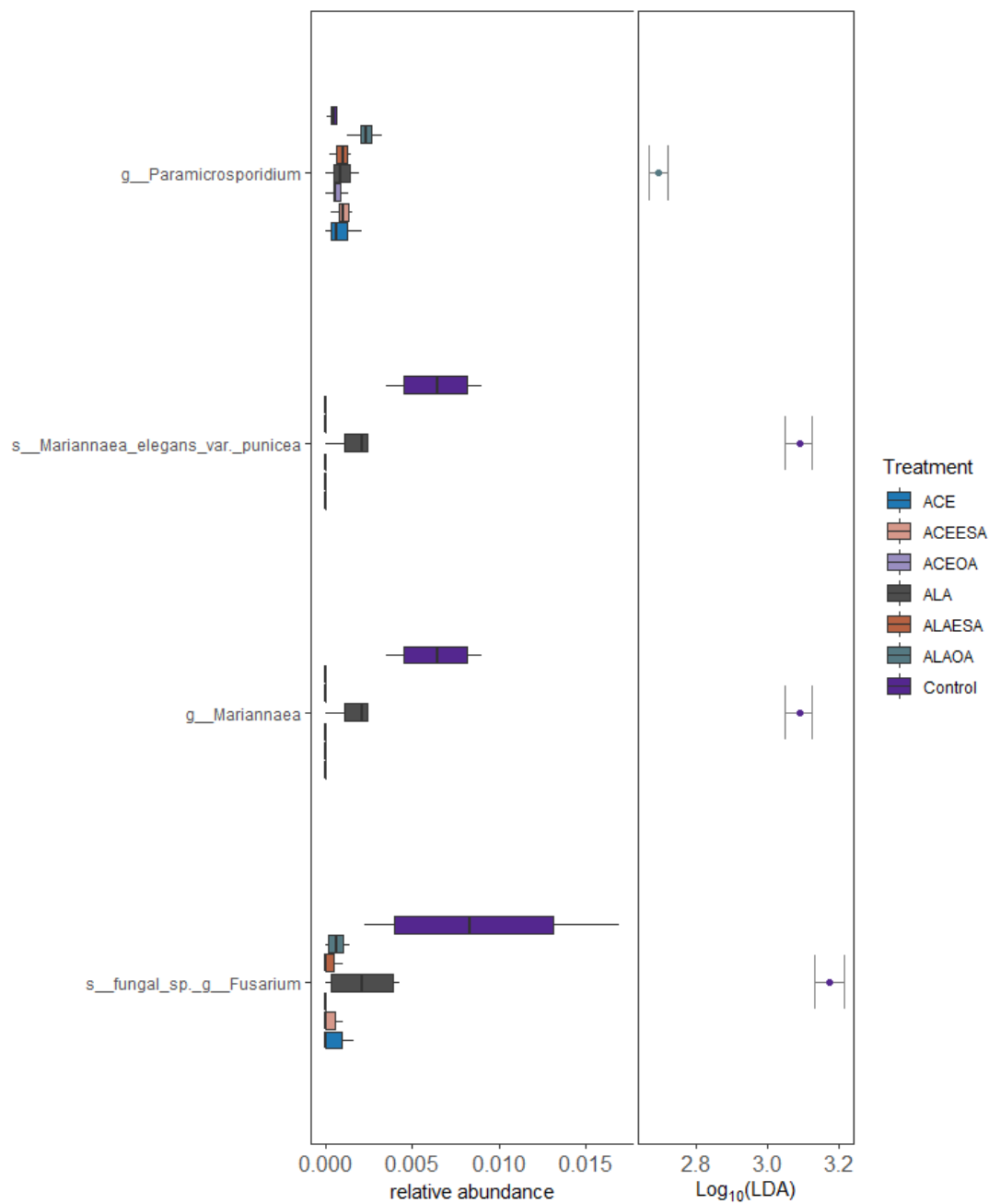
Graf 20. Změny α -diversitě (celková míra rozmanitosti druhů) eukaryotických organismů v závislosti na přítomnosti pesticidů a jejich degradačních produktů – 6 nejčastěji používaných způsobů výpočtu. Červeně zakroužkované výsledky značí signifikantní výsledky pro postoupení dalším analýzám.



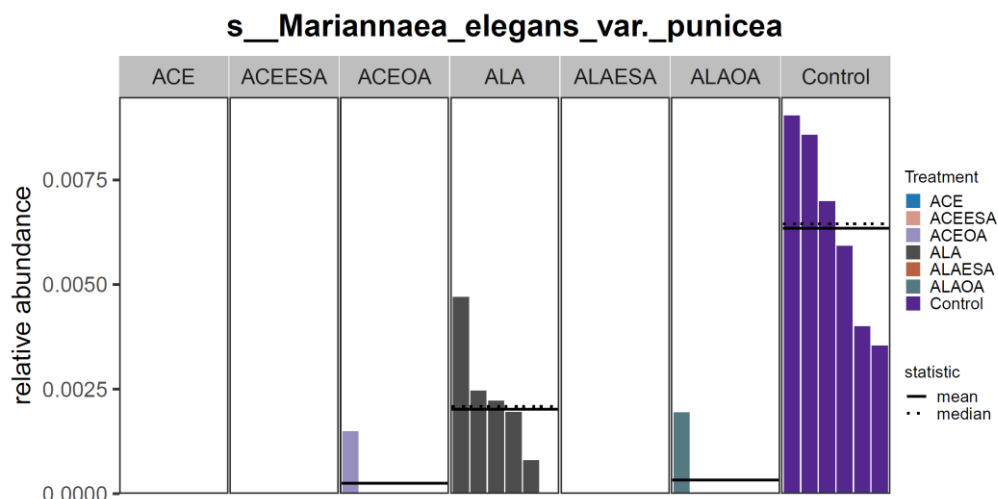
Graf 21. Redundantní diskriminační analýza (RDA – také β -diversita) pro eukaryota. Obecné rozdíly v přítomnosti eukaryot jsou vidět jako distribuce podle osy x. Rozdíly jsou mezi vzorky s přítomností ESA a OA.



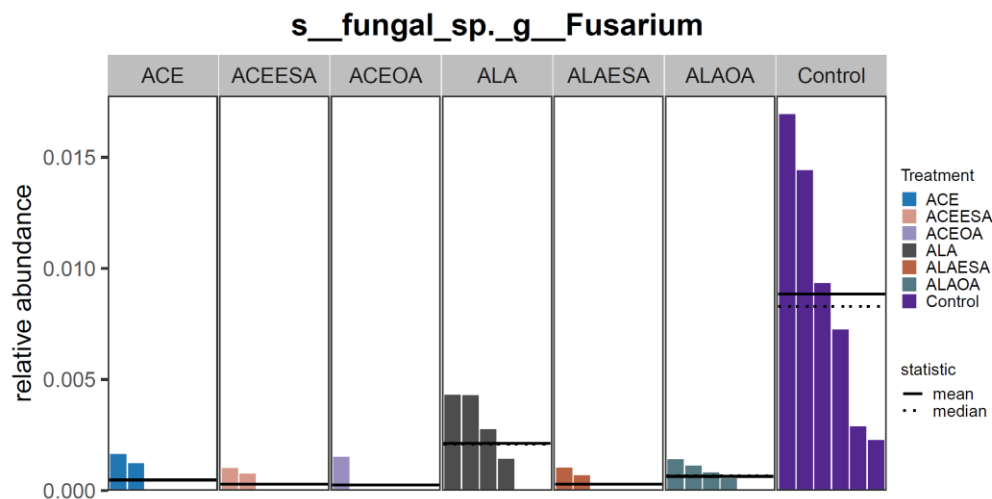
Graf 22. Identifikováno – *Mariannaea elegans* a další příbuzná mikroskopická houba, přesněji neurčené (parazitující) houby rodů *Paramicrosporidium* a *Fusarium*.



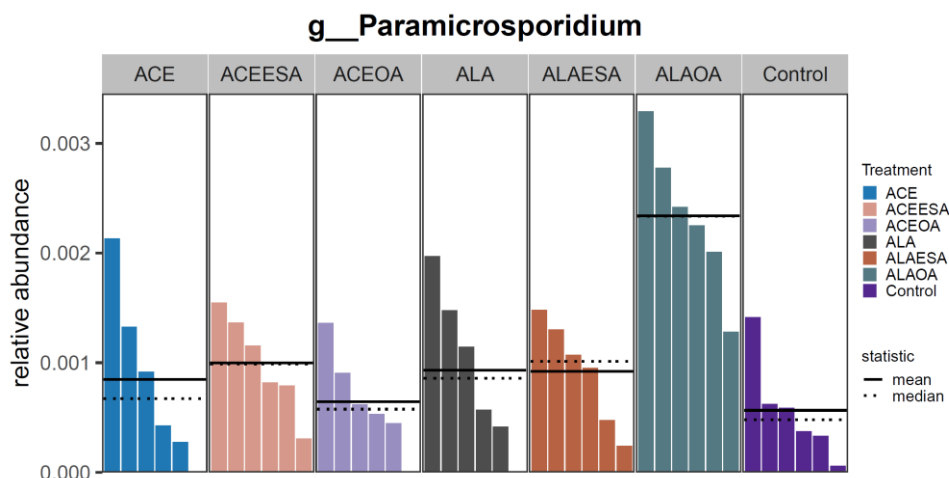
Graf 23. Výsledek odpovídající na otázku, zda identifikovaná eukaryota reagují na přítomnost pesticidu pozitivně nebo negativně. Podle výstupu z analýzy je zastoupení druhu *Mariannaea elegans* v přítomnosti pesticidu nebo jeho degradačního produktu nižší než v kontrolním vzorku. Tento eukaryotní taxon reaguje na přítomnost pesticidu negativně.



Graf 24. Výsledek odpovídající na otázku, zda identifikovaná eukaryota reagují na přítomnost pesticidu pozitivně nebo negativně. Podle výstupu z analýzy je zastoupení taxonu *Fusarium* v přítomnosti pesticidu nebo jeho degradačního produktu nižší než v kontrolním vzorku. Tento eukaryotní taxon reaguje na přítomnost pesticidu negativně.



Graf 25. Výsledek odpovídající na otázku, zda identifikovaná eukaryota reagují na přítomnost pesticidu pozitivně nebo negativně. Podle výstupu z analýzy je zastoupení taxonu rodu *Paramicrosporidium* v přítomnosti pesticidu nebo jeho degradačního produktu vyšší než v kontrolním vzorku. Tento eukaryotní taxon reaguje na přítomnost pesticidu pozitivně.



Podle výstupů z analýz v grafu 25 je patrné, že eukaryotní taxon rodu *Paramicrosporidium* reaguje pozitivně (tj. zvýšenou abundancí), a proto je vhodný pro cílení postupu izolace kandidáta degradujícího pesticid/metabolit.

Na druhou stranu výstupy z grafů 23 a 24 indikují nevhodnost cílení izolace pro eukaryotní taxony *Mariannaea elegans* a taxon rodu *Fusarium*, které reagují na pesticidovou expozici sníženou abundancí.

8. Srovnání novosti metodiky

Metodika přináší inovativní postupy, které jsou relevantní k hodnocení vlivu pesticidů (případně jiných polutantů) na prostředí a zejména mikroorganismy. Metodika nově přináší dva různé metodické postupy, kterými lze cílit na identifikaci a následné získání mikroorganismů, které by mohly být potenciálně využitelné v dekontaminačních technologiích. Jeden postup je založen na kultivačních metodách, při kterých je polutantu využíváno jako substrátu pro mikroorganismy, které se izolují z prostředí historicky zatíženého konkrétními pesticidy. V druhém postupu jsou aplikované vysokokapacitní sekvenační technologie, kterými lze identifikovat potenciální mikrobiální kandidáty reagující na konkrétní látky. Druhý postup lze aplikovat na různých půdách, je však v příkladě provedení optimalizován na pesticidy historicky nezatížené půdě, která je konkrétními pesticidními látkami zatížená uměle laboratorně. Novost metodiky je nejen v použitých metodických postupech, ale také ve faktu, že je použito jak mateřské látky, tak jejích relevantních metabolitů. Metodika navíc díky příkladům provedení poskytuje nové informace o konkrétních mateřských látkách a metabolitech problematických chloracetanilidových pesticidů alachloru a acetochloru. Metodika nově přináší hodnocení rizika a transformace těchto látek v prostředí nejen z pohledu osudu sledovaných analytů, ale také vlivu na půdní mikrobiom, který je klíčový pro jejich biotransformaci. Metodika zohledňuje jak prokaryotické (bakteriální), tak eukaryotické mikroorganismy, přičemž je z výsledků patrná možná souhra bakterií a eukaryot v biotransformacích polutantů, což ukazují oba postupy.

9. Uplatnění metodiky

Metodika má uplatnění ve více oborech najednou. I když je metodika zaměřena na pesticidy, tak její aplikovatelnost je principiálně i na jiné polutanty kontaminující vodu a půdu. Metodika má uplatnění jednak při vývoji nástrojů pro dekontaminaci životního prostředí zejména ve vztahu ke znečištění vod, které jsou založeny na funkčních mikrobiálních izolátech. Informace, které je možné metodikou získat o přirozených mikroorganismech a jejich reakci na přítomnost pesticidů, jsou potenciálně využitelné při bioremediacích. Metodika má dále uplatnění při hodnocení rizik pesticidů na životní prostředí a necílové organismy, kterými je půdní mikrobiom tvořící jak prokaryotické (bakterie), tak eukaryotické organismy. Prokázaný vliv látek na funkční mikrobiotu může mít důsledky pro celý ekosystém a ovlivnit tak i makroorganismy včetně člověka. Z tohoto

pohledu je metodika určena pro odborné pracovníky zaměřené na hodnocení rizik pesticidů na prostředí, přičemž se jedná zejména o perzistentní pesticidy.

Potenciálními uživateli v Česku i v zahraničí jsou společnosti a odborní pracovníci zabývající se vývojem dekontaminačních technologií, ale také společnosti zabývající se znečištěním prostředí pesticidy. Kritické je znečištění pesticidy pro pitnou vodu, a tak je metodika určena významnou měrou také provozovatelům úpraven vody, které musí udržovat v pitné vodě uzákoněné podlimitní hladiny pesticidních látek. Metodika se výrazně vztahuje k Národnímu akčnímu plánu k bezpečnému používání pesticidů (NAP) spadajícího do gesce Ministerstva zemědělství ČR (MZe ČR), které jej ve spolupráci s Ministerstvem životního prostředí ČR (MŽP ČR) a Ministerstvem zdravotnictví ČR (MZd ČR) vyhodnocuje a periodicky aktualizuje. Využití metodiky je tedy také pro orgány zabývající se používáním pesticidů zahrnující hlavně POR a hodnocením rizik spojených s jejich používáním.

10. Ekonomické přínosy metodiky

Znečištění prostředí pesticidy lze zařadit mezi hlavní globální hrozby. Na čištění vod a půd se každoročně vynakládají obrovské prostředky. Pro ilustraci, EU vyčlenila v rámci politiky soudržnosti a environmentálního podprogramu programu LIFE pro oblast životního prostředí a změny klimatu (2014–2020) 14,2 miliard eur na čištění vod a 2,4 miliard eur na dekontaminaci půdy [53]. Metodické postupy v metodice (zejména druhý postup) jsou založeny na nejmodernějších technologiích a sofistikovaném vyhodnocení dat, pro které je zapotřebí vysokokapacitních přístrojů, jejich pořizovací cena je i v desítkách milionů Kč. Navíc je zapotřebí pro vyhodnocení a interpretaci dat vysoce erudovaných pracovníků. Přesto je aplikací těchto nejmodernějších postupů možné dosáhnout výrazného ekonomického snížení nákladů oproti současnému stavu, protože dojde v konečném důsledku k urychlení navržení dekontaminačních strategií. Finanční úspory by se pak mohly pohybovat i ve stovkách milionů Kč na případ. Z globálního pohledu je potenciál i v miliardách eur a jen obtížně nacenitelný finanční přínos je v prevenci kontaminace, pokud by byla metodika aplikovaná při prevenci a pro správné hodnocení rizik polutantů. Pokud by byly metodikou získané konkrétní mikrobiální izoláty, které by se uplatnily při úpravě pitných vod nadlimitně zatížených perzistentními pesticidy, mohl by být přínos v řádech milionů Kč na jednotku. Technologie využívající biodegradačního potenciálu mikroorganismů v bioreaktoru jsou vhodné pro malé a střední úpravní vod, přičemž není potřeba



využít potenciálu technologií, kterých využívají velké úpravní vody a které by byly pro malé úpravní neekonomické.

11. Publikace, které předcházely metodice

Halešová T. (2018). Pesticidy, léčiva a jejich eliminace z ŽP. Odpadové fórum. URL: <http://www.odpadoveforum.cz/TVIP2018/prispevky/137.pdf>

Halešová T., Konečná J., Václavíková M., Karásek P., Nováková E. (2022). Výskyt pesticidních látek v řece Punkvě. VTEI 2022 (2): 29–33.

Halešová T., Kotyzová M. (2018). Výskyt pesticidních látek ve vybraných lokalitách CHKO Moravský kras s dopadem na skapové vody. Ochr. přír. 73 (1): 22–26.

Halešová T., Václavíková M., Tomešová D. (2020). Mikropolutanty s rozumem. In: Voda Zlín 2020: sborník přednášek z konference Voda Zlín 2020, 5.–6. 3. 2020. Moravská vodárenská, Olomouc, s. 109–109.

Mikulová A. (2019). Zhodnocení vlivu pesticidů na rostliny a necílové. Inženýrská diplomová práce. Katedra ochrany rostlin, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita, Praha, 83 s.

Seifrtová M., Halesová T., Sulcová K., Riddellova K., Erban T. (2017). Distributions of imidacloprid, imidacloprid-olefin and imidacloprid-urea in green plant tissues and roots of rapeseed (*Brassica napus*) from artificially contaminated potting soil. Pest. Manag. Sci. 73 (5): 1010–1016.

Siglová M., Beneš P. (2021). Dekontaminační technologie na odstraňování pesticidů z vod. Ověřená technologie. EPS biotechnology, Kunovice, 24 s.

Siglová M., Beneš P., Ježdík R., Sembořová E., Jagošová V., Panáčková V. (2020). Mikrobiální izoláty účinně degradující chloracetanilidové pesticidy. Dokumentace funkčního vzorku. EPS biotechnology, Kunovice, 14 s.

12. Přílohy

Obrázek S1. Plastové květníky použité v experimentech



<https://www.plastia.eu/kvetinac-narcis-bila-29305p>

Obrázek S2. Experimentální květníky umístěné na táč



Obrázek S3. Květníky, ve kterých je zemina, jsou přikryty bílou netkanou textilií, aby byla eliminována křížová kontaminace, ale aby byl umožněn přístup vzduchu





Obrázek S4. Experiment probíhá v klimaboxech s nucenou cirkulací**Tabulka S1.** Výsledky hodnocení kvality modelové půdy.

pH H ₂ O	pH KCl -KPP	uhlíčitany	Ntot	Cox	C/ N	humus	
		%	%	%		%	
6,93	6,20	<0,1	0,24	2,35	9,83	4,04	
6,89	6,24	<0,1	0,24	2,19	9,24	3,77	
6,90	6,20	<0,1	0,24	2,16	8,89	3,72	
Zrn <0,001 mm	Zrn < 0,01 mm	Zrn < 0,05 mm	Zrn 0,01–0,05	Zrn 0,06–0,25	Zrn 0,26–2,0		
%	%	%	%	%	%	%	
19,4	44,5	89,9	45,3	5,9	4,2		
22,6	42,6	86,3	43,7	9,7	4,0		
23,3	44,5	89,2	44,8	6,5	4,2		
Ca-Meh3 - ICP	K-Meh3 - ICP	Mg-Meh3 - ICP	P-Meh3 - ICP	Cu-Meh3 - ICP	Fe-Meh3 - ICP	Mn-Meh3 - ICP	Zn-Meh3 - ICP
mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
3990	225	261	42	7.20	221	131	11.40
3948	209	260	44	7.94	228	136	11.49
3922	209	259	42	7.76	215	129	11.44

13. Seznam literatury

1. Cobb A. H., Reade J. P. H. (2010). The inhibition of amino acid biosynthesis. In: Cobb A. H., Reade J. P. H. (eds.) *Herbicides and plant physiology*, 2. vyd. Wiley-Blackwell, Oxford, s. 176–199.
2. Wilkinson R. E. (1982). Alachlor influence on sorghum growth and gibberellin precursor synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 17 (2): 177–184.
3. Molin W. T., Anderson E. J., Porter C. A. (1986). Effects of alachlor on anthocyanin and lignin synthesis in etiolated sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) mesocotyls. *Pestic. Biochem. Physiol.* 25 (1): 105–111.
4. Kim H., Wang H., Ki J.-S. (2021). Chloroacetanilides inhibit photosynthesis and disrupt the thylakoid membranes of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* as revealed with metazachlor treatment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 211: 111928.
5. Gideon J., Mulligan J., Hui C., Cheng S.-Y. (2021). UV and temperature effects on chloroacetanilide and triazine herbicides degradation and cytotoxicity. *Heliyon* 7 (9): e08010.
6. Karier P., Kraus G., Kolber I. (2017). Metazachlor traces in the main drinking water reservoir in Luxembourg: a scientific and political discussion. *Environ. Sci. Eur.* 29: 25.
7. Chen Z., Chen Y., Vymazal J., Kule L., Kozeluh M. (2017). Dynamics of chloroacetanilide herbicides in various types of mesocosm wetlands. *Sci. Total Environ.* 577: 386–394.
8. Ma X., Zhang Y., Guan M., Zhang W., Tian H., Jiang C., Tan X., Kang W. (2021). Genotoxicity of chloroacetamide herbicides and their metabolites *in vitro* and *in vivo*. *Int. J. Mol. Med.* 47 (6): 103.
9. Coscollà C., López A., Yahyaoui A., Colin P., Robin C., Poinsignon Q., Yusà V. (2017). Human exposure and risk assessment to airborne pesticides in a rural French community. *Sci. Total Environ.* 584–585: 856–868.
10. Wan N., Lin G. (2016). Parkinson's disease and pesticides exposure: new findings from a comprehensive study in Nebraska, USA. *J. Rural Health* 32 (3): 303–313.
11. Kumar S., Mukerji K. G., Lal R. (1996). Molecular aspects of pesticide degradation by microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* 22 (1): 1–26.
12. Fenner K., Canonica S., Wackett L. P., Elsner M. (2013). Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities. *Science* 341 (6147): 752–758.
13. Matzrafi M. (2019). Climate change exacerbates pest damage through reduced pesticide efficacy. *Pest Manag. Sci.* 75 (1): 9–13.
14. Molnar Jazić J., Đurkić T., Bašić B., Watson M., Apostolović T., Tubić A., Agbaba J. (2020). Degradation of a chloroacetanilide herbicide in natural waters using UV activated hydrogen peroxide, persulfate and peroxymonosulfate processes. *Environ. Sci.: Water Res. Technol.* 6 (10): 2800–2815.
15. Phillips P. J., Eckhardt D. A., Rosenmann L. (2000). Pesticides and their metabolites in three small public water-supply reservoir systems, western New York, 1998–99: U.S. Geological Survey Water-Resources Investigations Report 1999–4278. U.S. Geological Survey (USGS), Troy, NY, 19 s. URL: <https://pubs.er.usgs.gov/publication/wri994278>
16. Shoemaker J. A., Bassett M. V. (2005). Method 535. Measurement of chloroacetanilide and other acetamide herbicide degradates in drinking water by solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS): EPA Document #: EPA/600/R-05/053. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 61 s. URL: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockkey=P10096IN.txt>
17. EP, Rada (ES). (2000). Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/60/ES ze dne 23. října 2000, kterou se stanoví rámec pro činnost Společenství v oblasti vodní politiky. Úř. věst. E. U. OJ L 327: 1–73. Dokument 32000L0060, 22. 12. 2000. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32000L0060>



- 18.EP, Rada (EU). (2020). Směrnice Evropského parlamentu a Rady (EU) 2020/2184 ze dne 16. prosince 2020 o jakosti vody určené k lidské spotřebě (přepřracované znění). Úř. věst. E. U. OJ L 435: 1–62. Dokument 32020L2184, 23. 12. 2020. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32020L2184>
- 19.KHS JmK. (2020). Křepice – limit acetochlor ESA a acetochlor OA. Krajská hygienická stanice Jihomoravského kraje (KHS JmK), Brno, 2 s. URL: <https://vodarenska.cz/download/krepice-limit-acetochlor-esa-a-acetochlor-oa/>
- 20.Gomis-Berenguer A., Sidoli P., Cagnon B. (2021). Adsorption of metolachlor and its transformation products, ESA and OXA, on activated carbons. Appl. Sci. 11 (16): 7342.
- 21.Gadagbui B., Maier A., Dourson M., Parker A., Willis A., Christopher J. P., Hicks L., Ramasamy S., Roberts S. M. (2010). Derived Reference Doses (RfDs) for the environmental degradates of the herbicides alachlor and acetochlor: results of an independent expert panel deliberation. Regul. Toxicol. Pharmacol. 57 (2–3): 220–234.
- 22.Elsayed O. F., Maillard E., Vuilleumier S., Millet M., Imfeld G. (2015). Degradation of chloroacetanilide herbicides and bacterial community composition in lab-scale wetlands. Sci. Total Environ. 520: 222–231.
- 23.EK. (2006). Rozhodnutí Komise ze dne 18. prosince 2006 o nezařazení alachloru do přílohy I směrnice Rady 91/414/EHS a o odnětí povolení pro přípravky na ochranu rostlin obsahující tuto účinnou látku (oznámeno pod číslem K(2006) 6567). Úř. věst. E. U. OJ L 397: 28–30. Dokument 32006D0966, 30. 12. 2006. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32006D0966>
- 24.EK. (2011). Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 1372/2011 ze dne 21. prosince 2011, kterým se v souladu s nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh neschvaluje účinná látka acetochlor a mění rozhodnutí Komise 2008/934/ES. Úř. věst. E. U. J L 341: 45–46. Dokument 32011R1372, 22. 12. 2011. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32011R1372>
- 25.Donley N. (2019). The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. Environ. Health 18 (1): 44.
- 26.Mendes K. F., Hall K. E., Spokas K. A., Koskinen W. C., Tornisiello V. L. (2017). Evaluating agricultural management effects on alachlor availability: tillage, green manure, and biochar. Agronomy 7 (4): 64.
- 27.Lerro C. C., Andreotti G., Koutros S., Lee W. J., Hofmann J. N., Sandler D. P., Parks C. G., Blair A., Lubin J. H., Beane Freeman L. E. (2018). Alachlor use and cancer incidence in the agricultural health study: an updated analysis. J. Natl. Cancer Inst. 110 (9): 950–958.
- 28.Kim M., An G., Lim W., Song G. (2022). Alachlor breaks down intracellular calcium homeostasis and leads to cell cycle arrest through JNK/MAPK and PI3K/AKT signaling mechanisms in bovine mammary gland epithelial cells. Pestic. Biochem. Physiol. 184: 105063.
- 29.Tirmenstein M. A., Mangipudy R. (2014). Alachlor. In: Wexler P., Abdollahi M. (eds.) Encyclopedia of toxicology, 3. vyd. Academic Press, Amsterdam, s. 107–109.
- 30.Siglová M., Beneš P., Ježdík R., Sembořová E., Jagošová V., Panáčková V. (2020). Mikrobiální izoláty účinně degradující chloracetanilidové pesticidy. Dokumentace funkčního vzorku. EPS biotechnology, Kunovice, 14 s.
- 31.Siglová M., Beneš P. (2021). Dekontaminační technologie na odstraňování pesticidů z vod. Ověřená technologie. EPS biotechnology, Kunovice, 24 s.
- 32.Rouchaud J., Metsue M., Van Himme M., Bulcke R., Gillet J., Vanparys L. (1992). Soil degradation of metazachlor in agronomic and vegetable crop fields. Weed Sci. 40 (1): 149–154.
- 33.European Food Safety Authority (EFSA), Brancato A., Brocca D., De Lentdecker C., Erdos Z., Ferreira L., Greco L., Jarrah S., Kardassi D., Leuschner R., Lythgo C., Medina P., Miron I., Molnar T., Nougadere A., Pedersen R., Reich H., Sacchi A., Santos M., Stanek A., Sturma J., Tarazona J., Theobald A.,



- Vagenende B., Verani A., Villamar-Bouza L. (2018) Modification of the existing maximum residue level for metazachlor in Chinese cabbage. *EFSA J.* 16 (1):e05127.
- 34.Landau C. A., Hager A. G., Tranel P. J., Davis A. S., Martin N. F., Williams M. M. (2021). Future efficacy of pre-emergence herbicides in corn (*Zea mays*) is threatened by more variable weather. *Pest Manag. Sci.* 77 (6): 2683–2689.
- 35.Vasilakoglou I. B., Eleftherohorinos I. G. (2003). Persistence, efficacy, and selectivity of amide herbicides in corn. *Weed Technol.* 17 (2): 381–388.
- 36.Kodeš V. (2020). Metazachlor a jeho vliv na kvalitu vod v ČR. *Agromanuál* 15 (11–12): 57–61. URL: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/management-a-legislativa/management/metazachlor-a-jeho-vliv-na-kvalitu-vod-v-cr>
- 37.European Food Safety Authority (EFSA). (2011). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance acetochlor. *EFSA J.* 9 (5): 2143.
- 38.Pozo C., Salmeron V., Rodelas B., Martinez-Toledo M. V., Gonzalez-Lopez J. (1994). Effects of the herbicide alachlor on soil microbial activities. *Ecotoxicology* 3 (1): 4–10.
- 39.Dehghani M., Nasser S., Zamanian Z. (2013). Biodegradation of alachlor in liquid and soil cultures under variable carbon and nitrogen sources by bacterial consortium isolated from corn field soil. *Iranian J. Environ. Health Sci. Eng.* 10 (1): 21.
- 40.Sun H. L., Sheets T. J., Corbin F. T. (1990). Transformation of alachlor by microbial communities. *Weed Sci.* 38 (4–5): 416–420.
- 41.R Development Core Team. (2022). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. URL: <http://www.R-project.org>
- 42.Xu S., Yu G. (2022). MicrobiotaProcess: a comprehensive R package for managing and analyzing microbiome and other ecological data within the tidy Framework, version 1.8.0. YuLab-SMU. URL: <https://github.com/YuLab-SMU/MicrobiotaProcess/>
- 43.McMurdie P. J., Holmes S. (2013). phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 8 (4) :e61217.
- 44.Wickham H. (2016). ggplot2: elegant graphics for data analysis, 2. vyd. Springer, New York, NY, 260 s.
- 45.Wickham H., Chang W., Henry L., Pedersen T. L., Takahashi K., Wilke C., Woo K., Yutani H., Dunnington D., RStudio. (2022). ggplot2. URL: <https://ggplot2.tidyverse.org>
- 46.Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L. D., François R., Golemund G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen T. L., Miller E., Bache S. M., Müller K., Ooms J., Robinson D., Seidel D. P., Spinu V., Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K., Yutani H. (2019). Welcome to the tidyverse. *J. Open Sour. Softw.* 4 (43): 1686.
- 47.Oksanen J., Simpson G. L., Blanchet F. G., Kindt R., Legendre P., Minchin P. R., O'Hara R. B., Solymos P., Stevens M. H. H., Szoecs E., Wagner H., Barbour M., Bedward M., Bolker B., Borcard D., Carvalho G., Chirico M., De Caceres M., Durand S., Evangelista H. B. A., FitzJohn R., Friendly M., Furneaux B., Hannigan G., Hill M. O., Lahti L., McGlinn D., Ouellette M.-H., Ribeiro Cunha E., Smith T., Stier A., Ter Braak C. J. F., Weedon J. (2022). Package 'vegan': community ecology package; version 2.6-2. CRAN - The Comprehensive R Archive Network. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- 48.Hothorn T., Hornik K., van de Wiel M. A., Zeileis A. (2006). A Lego system for conditional inference. *Am. Stat.* 60 (3): 257–263.
- 49.Hothorn T., Hornik K., van de Wiel M. A., Zeileis A. (2008). Implementing a class of permutation tests: the coin package. *J. Stat. Softw.* 28 (8): 1–23.
- 50.Wickham H. (2007). Reshaping data with the reshape package. *J. Stat. Softw.* 21 (12): 1–20.
- 51.Campitelli E. (2022). ggnewscale: multiple fill and colour scales in 'ggplot2', version 0.4.7. CRAN - The Comprehensive R Archive Network. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=ggnewscale>

52. Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J. A., Holmes S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13 (7): 581–583.
53. EÚD. (2021). Zvláštní zpráva 12/2021: Zásada „znečišťovatel platí“: její uplatňování v environmentálních politikách a opatřeních EU není jednotné. Evropský účetní dvůr (EÚD), Lucemburk. URL: <https://op.europa.eu/webpub/eca/special-reports/polluter-pays-principle-12-2021/cs/index.html>

T A

Č R

Technologická
agentura
České republiky



ISBN 978-80-7427-375-9



ISBN 978-80-7427-375-9