

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Stanovení reziduí herbicidů v různých zemědělských
produktech**

Diplomová práce

Bc. Anna Přibáňová

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

doc. Ing. Pavel Klouček, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Stanovení reziduí herbicidů v různých zemědělských produktech " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 07. 04. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu práce doc. Ing. Pavlu Kloučkovi, Ph.D. a Ing. Sebnem Kurhan, Ph.D. za odborné vedení, cenné připomínky, rady a podněty, kterými přispěli k vypracování této diplomové práce.

Stanovení reziduí herbicidů v různých zemědělských produktech

Souhrn

Diplomová práce je zaměřena na schopnost mikroorganismů rozkládat herbicidní látku aminopyralid z tekutého média, které bylo připraveno v několika koncentracích.

Literární rešerše pojednává o herbicidních látkách, jejich rozdělení a problematice použití. Podrobněji je popsána látka aminopyralid spolu s herbicidním prostředkem, ve kterém je tato látka použita spolu s dalšími složkami. Dále je nastíněno použití jednotlivých mikroorganismů pro rozklad různých pesticidních látek. Pro praktickou část byly vybrány tři mikroorganismy, u kterých je popsána již zjištěná rozkladná činnost. V závěru rešeršní části je popsána vybraná metoda pro určení aminopyralidu ze vzorků – LC-MS, u které je možné dle potřebné citlivosti volit mezi jednotlivými ionizátory a analyzátory. Pro přípravu vzorku před samotnou analýzou byla použita metoda QuEChERS, která je zde také rozebrána.

Praktická část diplomové práce byla zaměřena na zjištění schopnosti použitých organismů (*Pleurotus spp.*, *Cladosporium spp.* a *Geotrichum spp.*) rozkládat látku aminopyralid z tekutého média. Měření probíhalo na přístroji LC-MS.

Ze získaných výsledků nebyl vyhodnocen ani jeden mikroorganismus jako vhodný, pro podporu rozkladu aminopyralidu. Statisticky průkazné podpoření rozkladu bylo pouze u koncentrace 100 ppm u vzorků s použitým zástupcem rodu *Cladosporium*. Pro vzorky s použitým zástupce rodu *Geotrichum* by bylo vhodné pokus zopakovat, z důvodů velkého rozptylu výsledků a nevysvětlitelného nárůstu u koncentrace 100 ppm. U vzorků se zástupcem rodu *Pleurotus* nebyla ani v jednom případě shledána schopnost podpořit rozklad aminopyralidu, naopak tento mikroorganismus zabraňoval rozkladu.

Klíčová slova: aminopyralid, hlíva, residua, extrakce, LC-MS

Determination of herbicide residues in various agricultural products

Summary

The diploma thesis is focused on the ability of microorganisms to decompose the herbicide aminopyralid from a liquid medium, which was prepared in several concentrations.

The literature recherche deals with herbicides, their division and use issues. The substance aminopyralid is described in more detail together with a herbicidal agent in which this substance is used together with other ingredients. Furthermore, the use of individual microorganisms for the decomposition of various pesticides is outlined. Three microorganisms were selected for the practical part, for which the already determined decomposition activity is described. At the end of the research part, a selected method for the determination of aminopyralid from samples - LC-MS is described, in which it is possible to choose between individual ionizers and analyzers according to sensitivity. The QuEChERS method was used to prepare the sample before the analysis itself, which is also discussed here.

The practical part of the diploma thesis was focused on determining the ability of used organisms, *Pleurotus spp.*, *Cladosporium spp.* and *Geotrichum spp.*, to decompose aminopyralid from a liquid medium. The measurement was performed on an LC-MS device.

From the obtained results, not a single microorganism was evaluated as suitable for promoting the decomposition of aminopyralid. There was only statistically significant support for degradation at a concentration of 100 ppm in samples with the *Cladosporium* representative used. For samples with a representative of the genus *Geotrichum*, it would be appropriate to repeat the experiment, due to the large scatter of the results and the unexplained increase at a concentration of 100 ppm. The ability to promote the decomposition of aminopyralid was not found in any of the samples with a representative of the genus *Pleurotus*, on the contrary, this microorganism prevented the decomposition.

Keywords: aminopyralid, *Pleurotus spp.*, residua, extraction, LC-MS

Obsah

1 Úvod.....	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce.....	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Herbicidy	10
3.1.1 Rozdělení herbicidů	11
3.1.2 Problematika herbicidů	11
3.1.3 Aminopyralid.....	13
3.1.3.1 Fyzikálně chemické vlastnosti.....	14
3.1.3.2 Vliv teploty.....	15
3.1.3.3 Legislativa	15
3.1.3.4 Toxicita:.....	16
3.2 Degradace pomocí mikroorganismů	17
3.2.1 <i>Pleurotus spp.</i>	18
3.2.2 <i>Geotrichum spp.</i>	19
3.2.3 <i>Cladosporium spp.</i>	20
3.3 Metody stanovení reziduí herbicidů	22
3.3.1 Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	22
4 Metodika	28
4.1 Příprava tekutého média.....	28
4.2 Příprava vzorku k analýze.....	28
4.3 Experimentální chemikálie a činidla	29
4.4 Kritéria validace pro extrakční metodu.....	29
4.5 Kalibrační křivka	29
4.6 Analytické podmínky	30
5 Výsledky	31
5.1 Validace metody	32
5.2 Změna koncentrací	32
5.2.1 Koncentrace aminopyralidu 100 ppm	34
5.2.2 Koncentrace aminopyralidu 200 ppm	35
5.2.3 Koncentrace aminopyralidu 300 ppm	36
5.2.4 Koncentrace aminopyralidu 400 ppm	38
5.2.5 Koncentrace aminopyralidu 500 ppm	39
6 Diskuze.....	41
6.1 Vliv teploty	41

6.2	Toxicita	41
6.3	Degradace mikroorganismy	41
6.4	Design experimentu	42
7	Závěr	44
8	Literatura.....	45
9	Samostatné přílohy	50

1 Úvod

Používání herbicidních prostředků v zemědělství, pro čím dál vyšší produkci potravin, v posledních letech vzrůstá. Při posledním průzkumu bylo zjištěno, že pro produkci každého jídla pro 1 osobu na den je zapotřebí 0,3 g pesticidů. A toto číslo se se snižující plochou pro pěstování bude zvyšovat (Malla et al. 2022).

Látka aminopyralid účinkuje na bázi auxinového herbicidu. Je používána jako aktivní složka v herbicidních přípravcích, například v Mustang forte (Epp et al. 2016).

Slouží k účinnému odstraňování plevelů buďto již vyrostlého, anebo ještě v procesu klíčení. Látka se používá k hubení širokolistých plevelů nejen na zemědělské půdě, ale i na pastvinách (Li et al. 2018). Výrobci herbicidního přípravku Mustang forte varují před používáním slámy, na kterou byl přípravek aplikován, ke kompostování nebo k pěstování hub či jahod, pro které by látka měla být škodlivá (Dow AgroSciences 2018).

Aminopyralid je také považován za látku s nízkou toxicitou. Pro savce byla stanovena letální dávka vyšší než 5 g na 1 kg hmotnosti (Walsh et al. 2012). V posledních letech však bylo poukázáno na nebezpečí vlivu aminopyralidu na lidské zdraví. Konkrétně by mohlo docházet k poškození ledvin (He et al. 2019).

Teprve v posledních letech dochází k častějším zkoumáním, při kterých se vědci zabývají způsoby přirozeného rozkladu zbytků nejen herbicidů, ale všech druhů pesticidů (Malla et al. 2022).

Vývoj analýz herbicidů ze substrátů se v průběhu let posunul k tomu, že se metody staly citlivější, přesnější, rychlejší a v neposlední řadě cenově dostupnější (Li et al. 2021). Vývojem různých typů ionizátorů a analyzátorů lze sestavit přístroj, který bude vysoce citlivý k analýze vybrané látky (Harvey 2019). Pro látku aminopyralid byla již dříve zjištěno jako nejcitlivější propojení elektrosprejové ionizace s trojitým kvadrupólem.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem diplomové práce je řešení současného problému v zemědělské praxi, který se týká obsahu reziduí účinné herbicidní látky aminopyralidu ve slámě z obilovin ošetřených těmito přípravky, jejichž sláma se používá k výrobě substrátu pro pěstování hub nebo při mulčování jahodníku.

Hlavním cílem práce je zjistit funkci tří kmenů hub (*Pleurotus spp.*, *Cladosporium spp.*, *Geothrichum spp.*) a jejich schopnost odstranit aminopyralid z tekutého substrátu při submerzní kultivaci vybraných kmenů.

Hypotéza: *Pleurotus spp.*, *Cladosporium spp.* a *Geothrichum spp.* jsou schopny odbourat rezidua aminopyralidu v in vitro experimentu.

3 Literární rešerše

3.1 Herbicidy

Herbicidy jsou látky sloužící k likvidaci nežádoucích rostlin, jako jsou plevelé nebo invazivní rostliny. Řadí se mezi pesticidy, které jsou popsány jako: „Jakákoliv látka nebo směs látek nebo mikroorganismů včetně virů, které slouží k odpuzování, ničení nebo hubení jakéhokoliv škůdce, včetně vektorů chorob lidí nebo zvířat, škodlivých škůdců, nežádoucí druhy rostlin nebo zvířat, způsobující újmu během výroby, zpracování, skladování, přepravy či uvádění na trh potravin, zemědělských komodit a krmiv pro zvířata. Kromě herbicidů se mezi pesticidy řadí dále insekticidy, fungicidy, bakteriocidy, zoocidy a další.“ (Stanganelli et al. 2020).

Tím, že populace neustále roste (předpokládaný počet obyvatel do roku 2050 je 10 miliard), je vyvíjen neustále se zvyšující tlak pro neustálé a bezpečné dodávky potravin. Globální produkce potravin se bude muset zvýšit o 50 %, aby se vyřešila současná potravinová krize. K takovému nárůstu produkce potravin však bude muset dojít na omezeném území a lze jej dosáhnout pouze zintenzivněním produkce, prostřednictvím ekologické intenzifikace, vylepšené genetiky rostlin, používání chemických hnojiv a pesticidů (Malla et al. 2022).

Plevel drastickým způsobem snižuje produkci hlavních plodin. Bylo zjištěno, že výnos je vlivem plevelu snížen až o 34 %. Z tohoto důvodu je nezbytné herbicidní přípravky používat, aby došlo k zabezpečení dostatečného množství potravin (Pan et al. 2022).

Celosvětové výdaje na používání přírodních a syntetických chemických pesticidů strmě vzrostly až na 56 miliard USD při roční spotřebě přibližně 3,5 miliardy kg aktivních složek. Alarmující je zjištění, že pro vyprodukování každého jídla, které člověk sní, je zapotřebí použít okolo 0,3 g pesticidů (Malla et al. 2022).

Herbicidy, kromě schopnosti selektivně nebo neselektivně zabít rostliny, vykazují i širokou škálu příznivých účinků. Zlepšují zdraví rostlin, udržují agroekosystém a v neposlední řadě mají významný vliv na vyšší produkci plodin, čímž dochází ke zlepšení v zásobování a přísunu potravin lidem. I přes zpochybňování používání herbicidů bylo prokázáno, že jejich racionální aplikace vede ke stálému a dostatečnému přísunu kvalitních potravinových výrobků. Použití herbicidů bývá nejčastěji v období před vzejitím plodiny, případně i po, přičemž je vždy ponechána dostatečně dlouhá doba pro rozklad většiny aktivních látek. Výsledná kvalita produktů je tak téměř totožná s kvalitou produktů, na kterých herbicidní prostředky nebyly použity (Cserhádi et al. 2004).

Aby nedocházelo k nadměrnému používání herbicidů, stanovila Evropská unie maximální limity reziduí (zkráceně MLR), které jsou přesně stanoveny v nařízeních. Pro stanovení všech pesticidů byla jako výchozí hodnota stanovena na 10 µg/ kg pro všechna rezidua, která v nařízení nejsou zahrnuta (Wang et al. 2022).

3.1.1 Rozdělení herbicidů

Rozdělení herbicidů je celá řada. Podle selektivity účinku na selektivní a neselektivní. Podle způsobu působení, zdali herbicid účinkuje na kořenech nebo listech. Podle mechanismu účinku, který je vyvolán v rostlině (Székács 2021).

Rozdělit herbicidy můžeme také podle doby aplikace na preemergentní a postemergentní. U preemergentních herbicidů dochází k aplikaci ještě před vyklíčením hospodářské plodiny. Při použití takovýchto herbicidů hraje významnou roli vlhkost povrchu půdy a změny počasí. Konkrétně jde o množství srážek, délku slunečního záření a celkovou vlhkost. Při zvolení postemergentních herbicidů dochází k aplikaci v době, kdy hospodářská rostlina již vzklíčila, nebo byla vysázena (Kaur et al. 2020). Ve srovnání s preemergentními herbicidy mají postemergentní herbicidy větší účinek na půdní mikroflóru díky vyšší míře perzistence v půdě (Panneerselvam et al. 2021).

Existují dva systémy klasifikace herbicidů. První systém byl vyvinut společností Weed Science Society of Amerika (dále jen WSSA). Druhý systém zpracovala Herbicide Resistance Action Committee (Walsh et al. 2012).

U klasifikace WSSA jsou použita čísla a zahrnuje celkem 200 aktivních složek a 145 chemických skupin. U druhého systému jsou použita místo čísel písmena a celkový počet aktivních složek je 291. Ty jsou seskupené do 58 chemických skupin.

Oba systémy třídění se však potýkají s problémy určování chemických skupin, které mají negativní důsledek na odplevelování. Na tyto problémy se lze dívat ze dvou pohledů:

1. existuje mnoho aktivních složek, které však mají neznámou chemickou skupinu
2. existují chyby v názvosloví chemických skupin

Chyby v názvosloví mohou mít za následek například špatný výběr vhodných herbicidních prostředků. Pokud se zvolí nevhodná kombinace látek, může to mít za následek vznik rychlejší rezistence plevelů vůči herbicidům (Forouzesh et al. 2015).

3.1.2 Problematika herbicidů

Tím, že jsou herbicidy aplikovány v různém čase a různým způsobem, dochází k nepřetržitému kontaminování okolního prostředí zbytky herbicidů. Vlivem úletu postřiku, stékáním či erozí se herbicidy dostávají do vodního prostředí, což vážně ohrožuje zdraví a bezpečnost lidí a vodního prostředí. Například amidové herbicidy jsou chemikálie, které narušují správnou funkci štítné žlázy a mohly by inhibovat její hormon u lidí (Zheng et al. 2022).

Velká část používaných herbicidů jsou chirální sloučeniny, ale z ekonomických důvodů jsou obvykle vyráběny a používány ve formě racemických sloučenin (směs chemických látek, která obsahuje levotočivý i pravotočivý enantiomer chirální sloučeniny) (Zheng et al. 2022).

Dalším velmi závažným problémem, který je spojen s používáním herbicidů, je rezistence plevelu. Plevelé odolávají herbicidům prostřednictvím dvou hlavních mechanismů

– odolnost vůči cílovému místu (TSR z anglického target site resistance) a odolnost vůči necílovému místu (NTSR z anglického non-target site resistance) (Pan et al. 2022).

TSR zahrnuje genové mutace nebo delece cílového místa nebo variace počtu kopií genu a poskytuje tak odolnost vůči herbicidům v rámci konkrétní chemické třídy. NTSR zahrnuje změny v translokaci a metabolismu příjmu herbicidů a může poskytnout všeobecnou rezistenci vůči herbicidům s různými způsoby účinku (Pan et al. 2022).

Rezistence však není jediný nežádoucí efekt. Kromě ní mohou herbicidy poškozovat i necílové skupiny mikroorganismů přímou interakcí s metabolismem hostitele a mechanismy oxidačního stresu. Je proto nutné určit udržitelné a účinné metody ke snížení nežádoucích dopadů (Pileggi et al. 2020).

V ideálním případě by herbicid aplikovaný na rostlinu měl na rostlině vydržet tak dlouho, jak je nutné k potlačení škodlivých organismů. Poté by se měl rozložit a ve sklizené plodině nezanechat žádná rezidua, nebo alespoň zanechat nižší hladiny reziduí než jsou zákonem stanovené pro konkrétní plodinu (Li et al. 2018).

Vzhledem k tomu, že střídání plodin je běžnou zemědělskou praxí, může dojít k neúmyslnému poškození přenášením herbicidních látek na nadcházející rostliny, které mohou být náchylné na výskyt herbicidů v půdě (Li et al. 2018).

Kromě střídání osevních postupů dochází k rozšiřování herbicidů i vlivem úletu při aplikaci pomocí letadel nebo pozemního postřiku za špatných povětrnostních podmínek. Částice herbicidů mohou být unášeny až několik kilometrů, než dopadnou na necílové listy rostlin v úrovních až 10 % polních aplikačních dávek. Takovéto koncentrace jsou obecně subletální a mohou vyvolat širokou škálu reakcí, které mění růst rostlin, jejich metabolismus a reprodukční schopnost (Ramos et al. 2021). Příznivým zjištěním bylo, že některé rostliny, i přes zásah herbicidu, mají schopnost se uzdravit (Follak & Hurle 2004).

Používání syntetických herbicidů začalo přibližně v padesátých letech minulého století. Jejich využití přispělo ke zvýšení celosvětového výnosu a zlepšení kvality plodin. Avšak jejich časté používání vedlo u mnoha druhů plevelů k vývoji rezistence vůči herbicidům. Technologie výroby se rychle vyvíjela s ohledem na účinnost, spektrum plevelů, bezpečnost pro plodinu, uživatele a životní prostředí. Dnes mají pěstitelé přístup k více než 200 herbicidním účinným látkám s 29 různými způsoby působení. U některých však stále není přesný účinek znám (Lu et al. 2020).

Obecně nadměrné používání pesticidů pro zvýšení produktivity zemědělství je vždy na úkor životního prostředí, biologické rozmanitosti a lidského zdraví. Vážně ohrožuje půdu, vodu a životní prostředí na celém světě. Půda akumuluje jednu třetinu celkové hmoty pesticidů, což je přibližně 1 kg/ ha/ rok reziduí celkových pesticidů (herbicid, fungicid, a dalších). Při používání pesticidů je zapotřebí zajistit degradaci látek, které znečišťují životní prostředí a mají negativní vliv na lidské zdraví (Malla et al. 2022).

Osoby, které jsou vystaveny zvýšeným koncentracím, nebo často přicházejí do styku s pesticidy, často trpí zdravotními problémy, jako jsou například: astma, alergie, autoimunitní onemocnění, migrény, kožní onemocnění a chronické onemocnění dutin (Kumar et al. 2021).

Pro ochranu prostředí, ale i lidského zdraví, je důležité porozumět a rozpoznat, co řídí enviromentální osud látek, a to zejména jejich degradaci (Malla et al. 2022).

3.1.3 Aminopyralid

Aminopyralid, s chemickou strukturou kyseliny 4-amino-3,6-dichlor pikolinové, je organochlorinový pesticid (**obrázek č. 1**).



Obrázek č 1 - Strukturální vzorec aminopyralidu, převzato z PubChem online

Jedná se o látku špinavě bílé barvy, která je bez zápachu. Látka má pH 2,31, jde tedy o kyselou herbicidní látku. Nejstabilnější je však při pH 5,7 nebo pH 9 při teplotě 20 °C (PubChem online).

Herbicidní účinky byly poprvé objeveny v roce 1998 (Walsh et al. 2012). Slouží jako regulátor růstu rostlin tím, že vytváří toxický hormon podobný tomu, který se běžně vyskytuje v rostlinách - takzvaný auxin (kyselina indol-3-octová) (Johnson et al. 2009).

Pokud se do rostlin dostane jen velmi malé množství nebo v nízké koncentraci, může auxinový herbicid působit jako přirozeně se vyskytující auxin (Kelley & Riechers 2007). Protože je však syntetický auxinový herbicid mnohem stabilnější než přírodní auxin, může dojít k nahromadění v rostlinách. Účinky způsobené nahromaděním nebo vysokou dávkou takovýchto herbicidů, způsobí v rostlině závažné následky (Epp et al. 2016).

Auxinové herbicidy byly detekovány v mnoha zemích v řekách, jezerech, podzemní ale také pitné vodě v koncentracích ng/L. Sloučenina s vysokou auxinovou aktivitou, ponechána ve vodním ekosystému, způsobuje poškození vodních rostlin (Fan et al. 2019).

Aminopyralid je do rostlin rychle absorbován kořenovým systémem nebo listy. Toxické auxiny se pak váží na proteinové receptory místo těch přirozeně se vyskytujících. Sloučenina se translokují a hromadí v meristematických buňkách, což způsobuje nerovnoměrné dělení a růst buněk. Následkem toho pak rostlina umírá (Walsh et al. 2012).

V celosvětovém měřítku je syntetický auxin na třetím místě hned za glyfosátem a inhibitory acetolaktátsyntázy (Todd et al. 2020).

Aminopyralid se používá k hubení širokolistých plevelů (Pfleeger et al. 2014). Převážně pro dvouděložné rostliny. Svým působením může poškodit semena tím, že zabraňuje využití kyslíku, a to i při velmi nízkých koncentracích (Wagner & Nelson 2014).

Aplikace aminopyralidu se provádí nejen na polích s plodinami, ale také na pastvinách. Jeho použití na místě, kde se pohybuje dobytek je stejné, jako na polích s plodinami, z důvodu výskytu plevelů. Tyto plevele mohou být velmi problematické, protože soutěží s prospěšnou vegetací o dostupné živiny a vláhu, což způsobuje podstatné snížení kvality a výnosu pastvy. Některé z nich jsou hospodářskými zvířaty brány za „nechutné“, takový plevel hospodářské zvíře nesežere. Jiné plevele mohou být pro zvířata dokonce škodlivé, což má pak dopad jak na využití píce, tak také na životní podmínky zvířat (Li et al. 2018).

Nedostatečný fytotoxický efekt u trav, které jsou hospodářskými zvířaty spásány, je přisuzován několika faktorům. Patří mezi ně rozdílnost v anatomii a dále schopnosti metabolizovat aplikovaný herbicid (Kelley & Riechers 2007).

V nové studii ze září roku 2021 M.J. Rinella et al., poukázali na vysokou selektivitu herbicidní látky proti exotickému plevelu zvanému medusahead (*Taeniatherum caput-medusae*). Byl proveden experiment, během kterého byla aplikována látka na malých pozemcích, určených pro pastvu. Bylo sledováno načasování aplikace. Po aplikaci aminopyralidu v prvním roce byl snížen výskyt medusaheadu ze 45 % na 20 %. Při druhé aplikaci následující rok došlo ke snížení ze 60 % na 20 %. Vlivem tohoto snížení došlo ke zvýšení výskytu krmné trávy. Načasování aplikace herbicidní látky je však zásadní. Pouze 12 dnů lze docílit efektivní aplikace. Konkrétně od fáze zavádění – v tento okamžik je aplikace nejméně efektivní, avšak stále prokazatelná. Nejvíce efektivní aplikace byla zjištěna ve fázi raného kvetení. Pozdější, nebo naopak dřívější aplikace vedla k velmi nízkému poklesu výskytu (Rinella et al. 2021).

Známky působení herbicidu jsou možné pozorovat již po několika hodinách, nebo pár dnech. Mezi známky účinku aminopyralidu se řadí zesílené, zakřivené či zkroucené stonky a listy, svraštění listů, praskání stonku, zvětšené kořeny a zrychlený růst. Nejcitlivější pro aplikaci aminopyralidu jsou jednoleté rostliny (Walsh et al. 2012).

Aminopyralid prokázal vysokou účinnost a reziduální aktivitu pro širokou škálu jednoletých a víceletých bylinných širokolistých plevelů. Malý, nebo žádný účinek vyvolává u trav. Vzhledem k jeho vynikajícím vlastnostem v boji proti plevelům jsou nyní vyvíjeny nové postřiky pro aplikaci také na řepce (Li et al. 2018).

3.1.3.1 Fyzikálně chemické vlastnosti

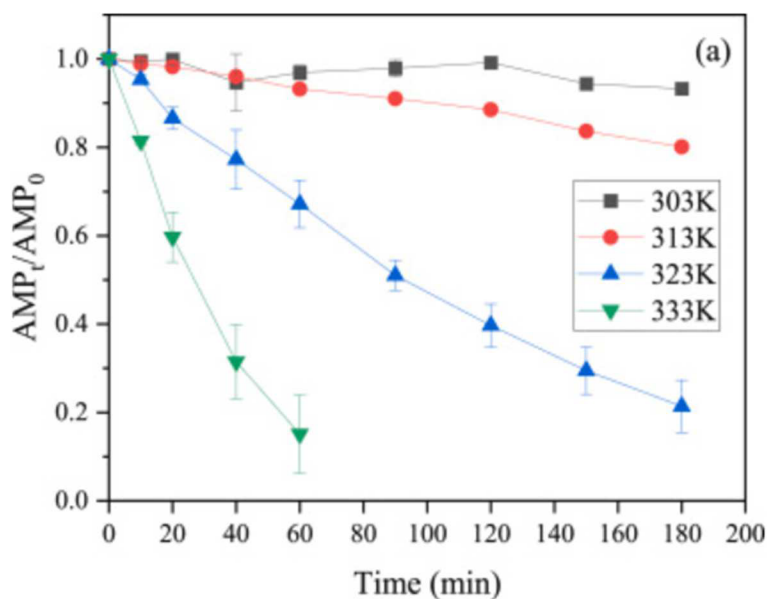
Látka aminopyralid je slabá kyselina, rozpustná ve vodě, a má střední perzistenci v půdě, proto představuje mírné riziko kontaminace pro podzemní vody. Molekulová hmotnost aminopyralidu je 207,0 g/mol (Li et al. 2018).

Fyzikálně-chemické vlastnosti byly také zkoumány skupinou vědců v Laboratoři fyzikálních vlastností (PProp) v DAS v roce 2018. Mezi sledovanými znaky těchto vlastností byly například: rozpustnost ve vodě, lipofilita, fotolýza, nebo hydrolytická stabilita. Pro zjištění rozpustnosti byl použit termodynamický součin rozpustnosti. Vědci v laboratoři

PProp zjistili, že rozpustnost aminopyralidu v průběhu studie byla 977 ppm. To však neodpovídá uváděným informacím z jiných zdrojů, ve kterých se uvádí, že rozpustnost dosahuje i více než 20 000 ppm. Nejvyšší rozpustnost byla zjištěna ve vodě (pH 7). Lipofilita byla stanovována pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie, za použití indexu chromatografické hydrofobicity (zkráceně CHI). Uváděná lipofilita měla hodnotu -2,4. Tyto dvě hodnoty odpovídají vztahu lipofility a rozpustnosti. Jsou navzájem v negativní korelaci. UV stabilita látky aminopyralid byla hodnocena jako stabilní (Zhang et al. 2018). Poločas rozpadu aminopyralidu je 34,5 dne (Fast et al. 2011).

3.1.3.2 Vliv teploty

Vliv teploty hraje velkou roli pro degradaci aminopyralidu. Trendy rozkladu aminopyralidu při různých teplotách byly zkoumány a popsány autory studie z roku 2021 Yang et al.. Při aktivací teplotě 303 K a 313 K (tedy 29,85 °C a 39,85 °C) byl pokles koncentrace látky velmi nízký. Při zvýšení teploty o dalších 10 a 20 K (tedy na 49,85 °C a 59,85 °C), došlo k výrazně vyšší degradaci látky. Průběh degradace ve vztahu k teplotě je možno vidět na následujícím **obrázku č. 2** (Yang et al. 2021).



Obrázek č. 2 - Vliv teploty na degradaci aminopyralidu převzato z Yang et al. 2021

3.1.3.3 Legislativa

Pro Evropskou unii bylo používání látky aminopyralid schváleno dne 1.1. 2015 prostřednictvím nařízení Evropské komise (EU) č. 891/2014 v rámci nařízení (ES) č. 1107/2009 ve znění prováděcích nařízení Komise (EU) č. 540/2011 a 541/2011 (Anastassiadou et al. 2020). Avšak v Americe byla tato látka registrována již v roce 2005. Povolené množství v EU pro hubení jednorokých i víceletých širokolistých plevelů na pastvinách, trvalých travních pastvinách a na plochách nesloužících k pěstování plodin, je v rozmezí 0,05-0,12 kg na 1 hektaru (Fast et al. 2011).

V roce 2018 podala společnost Dow Agrosiences Denmark u příslušného vnitrostátního orgánu ve Spojeném království žádost o úpravu stávajících maximálních limitů reziduí (zkráceně MLR) pro účinnou látku aminopyralid v některých obilovinách. A to v ječmeni, ovsu, žitu, prosu a čiroku. Hodnotící členský stát vypracoval zprávu, v souladu s článkem 8 nařízení (ES) č. 396/2005, která byla předložena Evropské komisi a předána Evropskému úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA). Žádost se týkala navýšení MLR pro ječmen, oves, žito a pšenici (včetně triticales a špaldy) ze stávajících 0,1 mg/ kg na 0,15 mg/ kg. Pro proso a čirok pak bylo požadováno zvýšení limitů z 0,01 mg/ kg na 0,05 mg/ kg. Výsledkem hodnocení úřadem EFSA bylo rozhodnutí, že zamýšlené navýšení maximálních limitů reziduí aminopyralidu na obilovinách nebude mít za následek překročení toxikologické referenční hodnoty pro spotřebitele. A nepředpokládá se, že by představovalo problém pro veřejné zdraví. Požadovanému zvýšení limitů bylo vyhověno (Abdourahime et al. 2019).

3.1.3.4 Toxicita:

Aminopyralid je považován za látku s nízkou toxicitou. Například pro ptačí druhy byla zjištěna smrtící koncentrace $LC_{(50)} > 5000$ mg / kg živé hmotnosti. Prakticky netoxický je považován pro ryby a bezobratlé vodní živočichy. Sladkovodní živočichové mají efektivní koncentraci $EC_{(50)} > 98,6$ mg / l, zatímco u mořských bezobratlých živočichů byla zjištěna letální koncentrace $LC_{(50)} > 89$ mg / l. Tato koncentrace je již považována za mírně toxickou (Walsh et al. 2012).

Prakticky netoxický je považován pro savce. Při zkoumání toxicity orálním podáním byla zjištěna letální dávka $LD_{(50)} > 5000$ mg / kg živé hmotnosti u psů, potkanů, myši a králíků (Walsh et al. 2012).

V roce 2013 byl proveden výzkum, během kterého se zkoumala toxicita látky aminopyralid na potkanech. Pro výzkum bylo použito 344 potkanů (samců i samic), kterým byl nalačno podán aminopyralid o čistotě 94,5 % v dávce 5 000 mg / kg živé hmotnosti. Látka byla podána žaludeční sondou ve dvou dávkách po 2 500 mg / kg v hodinovém intervalu v podobě 50% směsi v 0,5% vodné methylcelulóze. Sledovaná byla mortalita, klinické příznaky a vývoj tělesné hmotnosti během 14 dnů po podání. Během pokusu zemřel pouze jeden samec (třetí den). Při pitvě bylo odhaleno, že samec měl v zažívacím traktu plyny a problém s rozkladem červených krvinek. V době ukončení tohoto výzkumu se všechna zbylá zvířata uzdravila. V průběhu 14 dnů byla pozorována, a to pouze u 4 jedinců, ztráta hmotnosti. Zbylá zvířata na váze přibírala. Bylo u nich pozorováno snížené napětí svalů, kombinace perineálního, periorálního a perinasálního znečištění a zvýšená agresivita při manipulaci s nimi. Žádné závažné patologické změny se však neprojevíly (European Food Safety Authority 2013).

Yang et al. (2021) ve své studii poukazuje na skutečnost, že pokud budou hospodářská zvířata krmena rostlinami, na které byly aplikovány přípravky s účinnou látkou aminopyralid, a následně budou zvířata konzumována, hrozí nevratné poškození ledvin konzumentů.

Riziko pro lidské zdraví, konkrétně tedy pro ledviny, uvádí další autoři, kteří tvrdí, že látka působí jako exogenní antinutriční faktor potravin živočišného původu (He et al. 2019).

Velmi významným herbicidním prostředkem, který obsahuje aminopyralid spolu s florasulamem a kyselinou 2,4-dichlorfenoxyoctovou, je Mustang forte, který je aplikován jako postemergentní k hubení dvouděložných plevelů. Právě u tohoto přípravku výrobci varují před používáním slámy k hnojení nebo jako pěstebné prostředí pro pěstování hub (Dow AgroSciences 2018).

3.2 Degradace pomocí mikroorganismů

Půda je důležitou složkou životního prostředí. Ve srovnání s jinými složkami, jako je voda nebo vzduch, je půda nejstabilnějším a nejstálejším prvkem. Všechny chemické sloučeniny, vstupující do půdy, v ní tedy zůstávají poměrně dlouhou dobu, na rozdíl od vzduchu a vody. Půdy se vyznačují sorpčními vlastnostmi díky přítomnosti částic minerální, koloidní a organické hmoty, a také přítomností živých mikroorganismů. Osud herbicidů, aplikovaných přímo na půdu nebo rostliny, závisí na různých podmínkách, včetně typu půdy, pH, obsahu vlhkosti, proudění kapalin a vzduchu půdou (Łozowicka et al. 2021).

Pesticidy však podléhají mikrobiální biotransformaci. Dokonce i vysoce rezistentní pesticidy mohou být metabolizovány společenstvím mikroorganismů, které pesticidy využijí jako zdroj energie a živin, nebo společným metabolismem s jinými substráty pro jejich růst. Ko-metabolismus zahrnuje chemickou přeměnu a degradaci většiny nepoddajných sloučenin, které nejsou příznivé pro růst mikroorganismů. A právě tato schopnost může být dobře využita při degradaci pesticidů. Kompletní mineralizace, nebo biodegradace pesticidů či chemikálií, jsou ve společenství mikrobiálních populací účinnější a rychlejší, než když degradaci provádí pouze jeden mikroorganismus (Kumar et al. 2021).

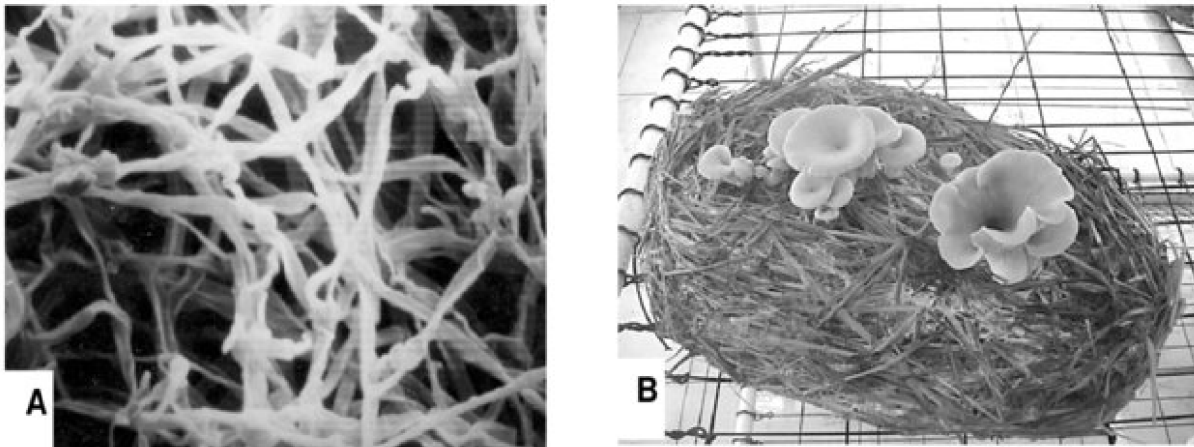
Mikrobiální společenstva, která jsou přítomna v půdě, působí jako jakýsi hotspot biologické rozmanitosti s dobrým potenciálem degradovat pesticidy. Jak již bylo řečeno, mikroorganismy je využívají k pokrývání svých nutričních a energetických potřeb. Hodnocení funkcí půdního mikrobiomu v kontaminovaném prostředí pomocí omických přístupů je zásadní pro zvýraznění významu inherentního mikrobiomu v procesu sanace. V posledních letech bylo publikováno několik článků, založených na různých aspektech omických přístupů, které zdůrazňovaly jeho závazek k bioremediaci. Avšak navzdory obrovskému potenciálu teprve začínáme zkoumat možnosti, ve kterých mohou být soubory mikroorganismů integrovány do obnovy životního prostředí (Malla et al. 2022).

Existuje celá řada mikroorganismů jako jsou *Actinobacteria*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria* a řada dalších, u kterých již bylo zjištěno, že jsou nejlepšími zdroji pro degradaci různých skupin pesticidů (Kumar et al. 2021).

V této diplomové práci byla zkoumána biodegradativní aktivita třech mikroorganismů. Konkrétně byly použity zástupci rodu *Pleurotus spp.*, *Geotrichum spp.* a *Cladosporium spp.*

3.2.1 *Pleurotus spp.*

Hlavním představitelem této skupiny je *Pleurotus ostreatus* Paul Kummer, 1871. Pokud se provádí vědecké studie, bývá nejčastěji použit právě tento zástupce, proto v nadcházející části bude použit pro přiblížení schopnosti degradovat biologický materiál. Mycelia a vzrostlou houbu je možno vidět na **obrázku č. 3**.



Obrázek č. 3 - *Pleurotus ostreatus* převzato z Daba et al. (2011)

Popis obrázku č.3: **A** - myceliální síť zobrazena pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu, **B** - plodnice hub *Pleurotus ostreatus* kultivované na rýžové slámě.

Hlíva ústříčná (*Pleurotus ostreatus*) patří do rodu *Pleurotus spp.*. Stejně jako většina hub tohoto rodu, je hlíva ústříčná jedlá a má vysokou komerční hodnotu. *Pleurotus spp.* je komplexní druh, zahrnující celou řadu odrůd, poddruhů a pěstovaných kmenů. Je považován za typický saprofytický organismus. (Wang et al. 2008).

Během životního cyklu se střídají dvě fáze. První je fáze vegetativní. Během této fáze dochází k růstu mycelií pod substrátem a uvnitř substrátu. Mycelia, takzvané kořeny, hrají velmi důležitou roli v procesu syntézy živin. Uvolňují enzymy, díky kterým dochází ke štěpení mrtvých organických materiálů až na nejmenší částice, které jsou následně absorbovány jako živiny. Druhá fáze životního cyklu je reprodukční a probíhá tehdy, pokud jsou dodrženy optimální podmínky pro pěstování, kterými jsou:

- mírná teplota – rozmezí mezi 20–25 °C,
- vyšší relativní vlhkost – 65-70 %,
- tok kyslíku,
- odpovídající intenzita světla – 8-12 hodin na den (Wan Mahari et al. 2020).

Během reprodukční fáze dochází ke tvorbě plodnic. Pokud dojde k opakování těchto dvou fází za příznivých podmínek prostředí, mohou být vyráběny ve velkém množství.

V přírodě roste hlíva ústříčná obvykle na odpadních materiálech. Kolonizují mrtvé organické materiály, jakým je například mrtvý dub, javor nebo i bavlník. Houba funguje jako primární rozkladač, který přeměňuje mrtvé organické tkáně na živiny, které jsou nezbytné pro její růst (Wan Mahari et al. 2020).

Aby byly živiny využitelné, mycelia musí nejprve vyprodukovat ligninocelulolytický enzym, který rozštěpí lignin-celulózu na menší částice. Enzym je schopen degradovat i různá průmyslová a zemědělská rezidua (Jin et al. 2020). Tím, že houba získává energii z mrtvých organických materiálů, rozkládá je a mění je nazpět na půdní živiny (Wan Mahari et al. 2020).

Schopnost hlívy je tedy biologická dekontaminace. Ta představuje výhody chemických procesů, protože je méně pravděpodobné, že výsledky procesu budou škodlivé pro životní prostředí. Mezi další výhody patří finanční náročnost, která je nízká. Metody, zahrnující použití hub, které vylučují neselektivní ligninolytické enzymy, patří mezi dosud nejstabilnější dekontaminační strategie (Jackson & Pryor 2017).

Obecně rod *Pluerotus spp.* má řadu vynikajících vlastností, jakými jsou například:

- 1) Pěstování na široké škále substrátu
- 2) Široké teplotní rozmezí
- 3) Velký potenciál v bioremediačních procesech (Picornell-Buendía et al. 2016)

A právě poslední vlastností by mohlo být docíleno odbourání reziduí aminopyralidu z pěstebního prostředí.

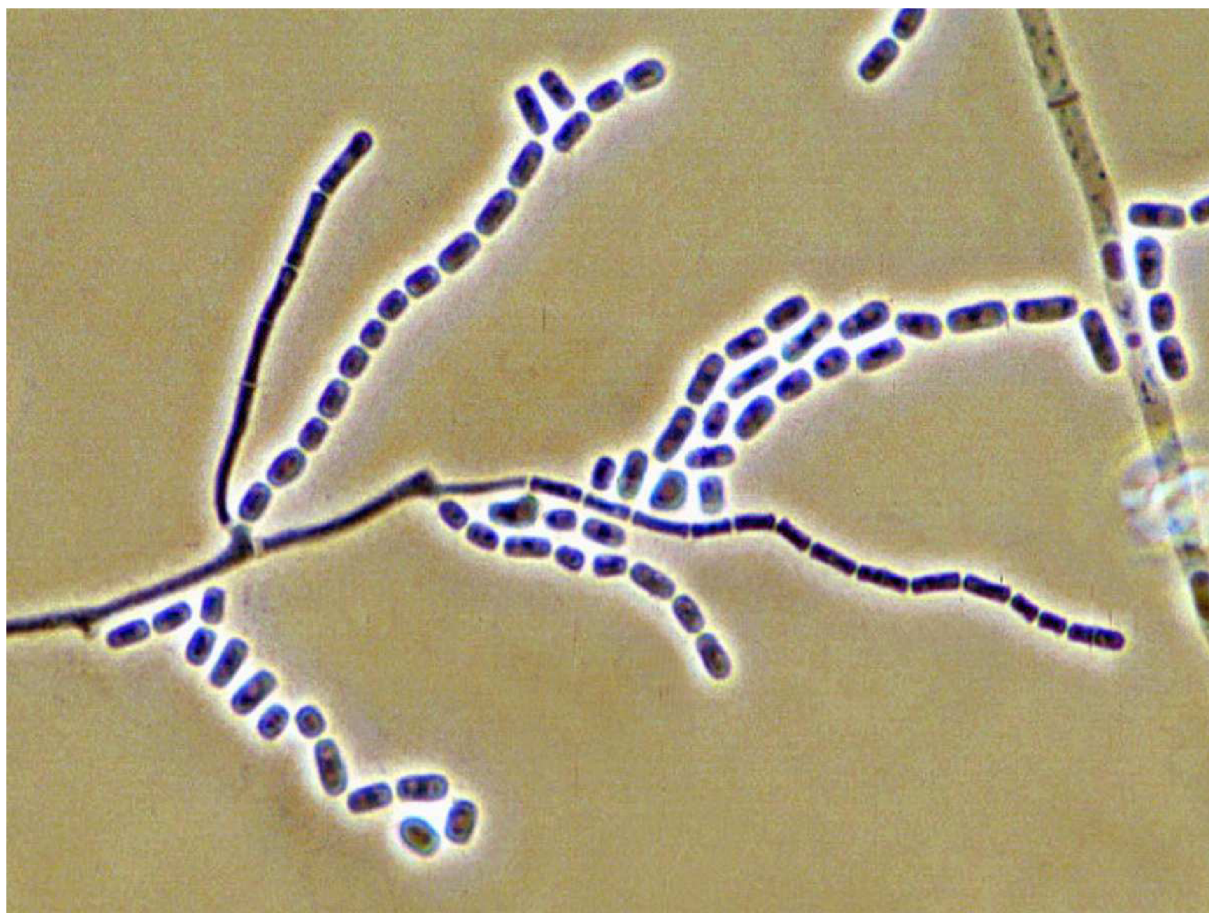
3.2.2 *Geotrichum spp.*

Rod *Geotrichum* zahrnuje 13 druhů vláknitých kvasinkových hub, které představují anamorfní stavy rodů *Dipodascus* a *Galactomyces*. Druhy rodu *Geotrichum* jsou celosvětově rozšířeny (Figueredo et al. 2011). V této diplomové práci byl použit mikroorganismus *Dipodascus geotrichum* E.E. Butler & L.J. Petersen (1977). *Dipodascus* je spolu s již zmíněným *Galactomyces* teleomorfem *Geotrichum spp.*. K vytvoření této formy dochází při sexuální rozmnožování. Tímto faktem je fylogeneze skupiny nestálá (Ahrazem et al. 2002).

Jedná se tedy o mikroskopické houby, které se v potravinách vyskytují buď jako jejich součást za normálního stavu, nebo je kontaminují. Běžně se vyskytují v syrovém mléce. Dále je tato houba prodávána ve formě mléčné kultury jako startér pro výrobu sýrů, díky proteolytickým aktivitám a organoleptickým vlastnostem (Jacques et al. 2017).

Kromě výskytu v mléce můžeme *Dipodascus geotrichum* najít také ve vodě, půdě, vzduchu, hnoji a ovoci. U lidí lze mikroorganismus izolovat především z trávicího traktu, někdy z dýchacích cest a nebo kůže (Lacroix & Feuilhade de Chauvin 2005).

Kolonie jsou rychle rostoucí, ploché, bílé až krémové bez reverzního pigmentu. Hyfy jsou hyalinní, přepážkové, rozvětvené a rozpadající se na řetězce hyalinních, hladkých, jednobuněčných, subkulovitých, až válcovitých artrokonidií, které jsou velké 6-12 × 3-6 μm a uvolňují se oddělením dvojité přepážky (Arendrup et al. 2014). Na následujícím **obrázku č. 4** je možno vidět *Dipodascus geotrichum*.



Obrázek č. 4 - *Dipodascus geotrichum* převzato z Arendrup et al. (2014)

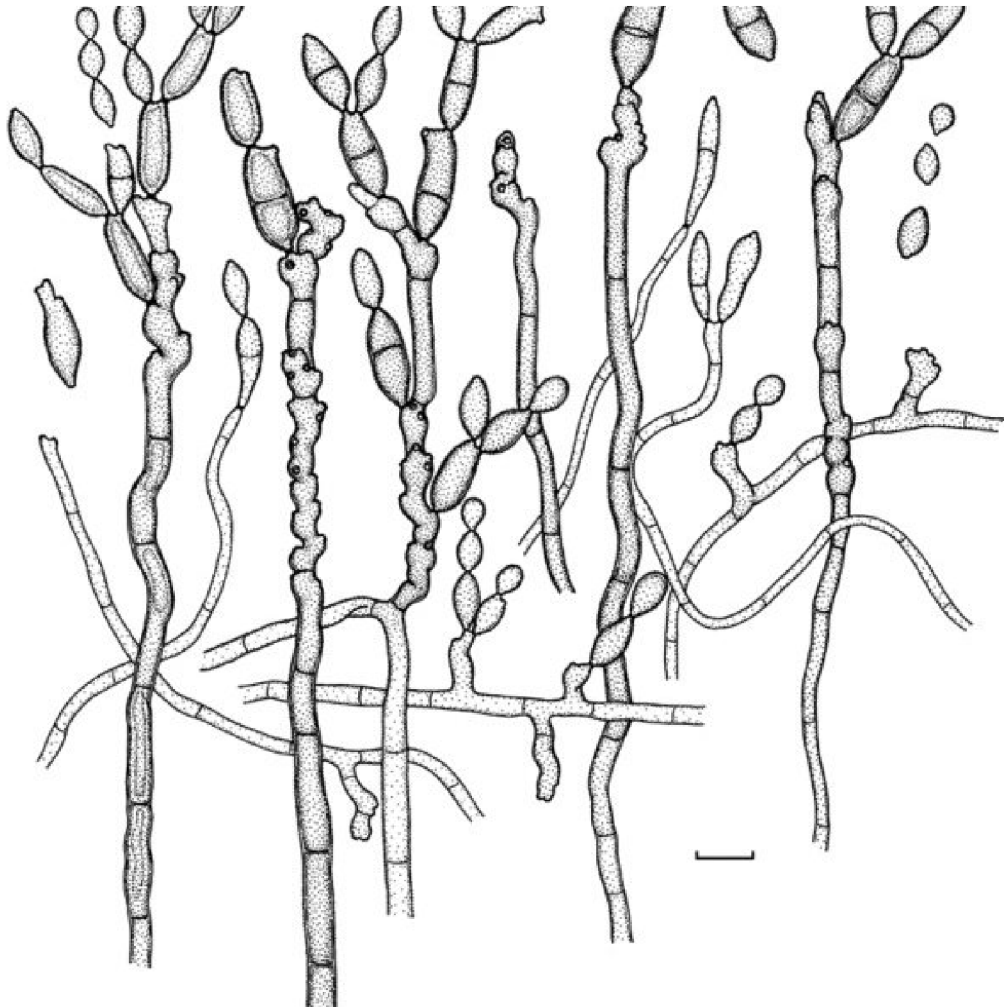
Podobně jako zástupci rodu *Pleurotus* mají i zástupci rodu *Geotrichum* schopnost provádět bioremediaci. Obecně jde o proces, při kterém původní nebo inokulované mikroorganismy (například houby, bakterie ale i další mikroby) degradují/ metabolizují organické kontaminanty, nacházející se v půdě a vodě, a přeměňují je na neškodné finální produkty (Jakovljević & Vrvic 2018).

Mnoho studií poukazuje na výskyt *Geotrichum candidum* společně s *Cladosporium cladosporioides* v odpadních a průmyslových odpadních vodách a zároveň také ve splaškových kalech (Jakovljević & Vrvic 2018). *G. candidum* má schopnost degradovat různé organické odpady, jako jsou fenoly (Dragicevic et al. 2010) a nitroglycerin. Má dále také schopnost odbourávat i různá azochinonová a antrachinonová barviva (Vijaykumar et al. 2006).

3.2.3 *Cladosporium* spp.

Zástupce rodu *Cladosporium*, které bylo v této diplomové práci použito, bylo *Cladosporium herbarum* Odzak (1815), což je možno vidět na **obrázku č. 5**. Jedná se o jednu z nejběžnějších environmentálních hub, které byly celosvětově izolovány. Hojně se vyskytují na uvadlých nebo odumřelých listech bylin a dřevin, jako sekundární parazité na nekroticky skvrnitých listech. Kromě nekrotických částí rostlin byl identifikován jeho výskyt i na povrchu

zelených a zdravých listů. Dále jsou často přítomny ve vzduchu, půdě a potravinách (Schubert et al. 2007).



Obrázek č. 5 - *Cladosporium herbarum*, převzato z Schubert et al. (2007)

Houby *Cladosporium spp.* se běžně vyskytují v prostředí a podílí se na přeměně komplexních organických látek, jako je lignin, pro který je typický rozkladač (Liu et al. 2019).

V roce 2018 vyšel odborný článek autorů W. G. Birolli et al., kteří zkoumali biodegradaci antracenu a několika dalších polycyklických aromatických uhlovodíků za účasti *Cladosporium sp.*. Pro zjištění účinnosti byla ve studii porovnávána biodegradační aktivita s dalšími druhy mikroskopických hub. Konkrétně se jednalo o *Penicilium citrinum*, *Aspergillus sydowii*, *Mucor racemosus* a *Trichoderma harzianum*. Pro biodegradaci antracenu byl vyhodnocen *Cladosporium spp.* jako nejúčinnější kmen. Proto byla tato houba dále ve studii použita pro hodnocení biodegradace v průběhu času (7, 14 a 21 dní). Po 21 dnech degradace bylo stanovené $14,5 \pm 2,6$ mg/l zbytkového antracenu z počáteční koncentrace 50 mg/l. Rozklad tedy činil 71 ± 5 % (Birolli et al. 2018).

V roce 2022 byla publikována studie, během které byl použit organismus *Cladosporium spp.*. Studie se zaměřila na schopnost rozkladu imazalilu. Jedná se o imidazolový fungicid, který se používá zejména k posklizňovému ošetření jádřovin a citrusových plodů. Během studie bylo zjištěno, že mikroorganismus se zvyšující se koncentrací ztrácí schopnost

degradovat aplikovaný fungicid. Použité koncentrace ve studii byly 0, 20, 50 a 100 mg/L (Papazlatani et al. 2022).

3.3 Metody stanovení reziduí herbicidů

Navzdory pozitivním účinkům herbicidů se v posledních letech zvyšují obavy ze zbytků pesticidů v potravinách a ekologická rizika způsobená nadměrným používáním herbicidů. To vedlo k tomu, že vznikla potřeba odhalit přítomnost herbicidů už při stopových hladinách nebo schopnost detekovat i jejich metabolity.

Vývoj analytických metod se proto posunul k rychlejším, citlivějším, přesnějším a v neposlední řadě nákladově efektivnějším metodám (Li et al. 2021).

Pro stanovení reziduí herbicidů se využívá mnoho metod. Současné separační metody využívají GC (z anglického - Gas chromatography, v češtině plynová chromatografie) nebo LC (z anglického - Liquid chromatography, v češtině kapalinová chromatografie) a různé citlivé detektory, kterými jsou: detekce elektronového záchytu, fotometrická detekce plamenem a MS (z anglického Mass spectrometry, v češtině hmotnostní spektrometrie).

Každá metoda má své jedinečné přednosti, ale i nevýhody.

- Metoda GC má sice vysokou selektivitu a citlivost, ale pracuje při velmi vysokých teplotách, až 300° C.
- Metoda LC vyžaduje vysoké množství organických rozpouštědel nebo chemikálií (Guo et al. 2015).

V průběhu let byly vyvinuty různé analytické metody pro stanovení reziduí ve vodě, půdě, ovoci a zelenině. Mezi používané metody se řadí například plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu (zkráceně ECD) a hmotnostně spektrometrickým detektorem. Dále je možno rezidua stanovit i vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (zkráceně HPLC) s UV detektorem a tandemovou hmotnostní spektrometrií. A mnoha jinými dalšími metodami. Pro tuto diplomovou práci byla použita kombinace kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

3.3.1 Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Tato analytická metoda využívá k oddělení složek směsi kapalinový chromatograf. Ten odděluje jednotlivé složky směsi, zatímco hmotnostní spektrometr zajišťuje analýzu struktur s vysokou specifitou a citlivostí. Metoda LC-MS se využívá k analýze biochemických, organických a anorganických látek, pocházejících ze vzorků z životního prostředí, nebo ze vzorků biologického původu. Tato metoda má velmi široké využití v mnoha oblastech, například v oblasti biotechnologie, zpracování potravin, výroby léčiv a hlavně v agrochemii (Chaimbault 2014).

Spojení hmotnostní spektrometrie s chromatografickými technikami bylo vždy velmi žádoucí kvůli své citlivosti a vysoké specifičnosti MS, ve srovnání s jinými chromatografickými detektory. Nejprve byla propojena plynová chromatografie s MS, a až následně se podařilo

propojit i LC s MS (Famiglini et al. 2021). Na **obrázku č. 6** je zobrazen školní přístroj LC-MS, na kterém bylo provedeno měření.



Obrázek č. 6 – Použitá sestava LC-MS, Sciex ExionLC-QTrap 6500+, zdroj vlastní

Před zahájením analýzy je potřeba vhodně zvolit ionizátor a analyzátor. Ionizační techniky se dají rozdělit dle několika kritérií:

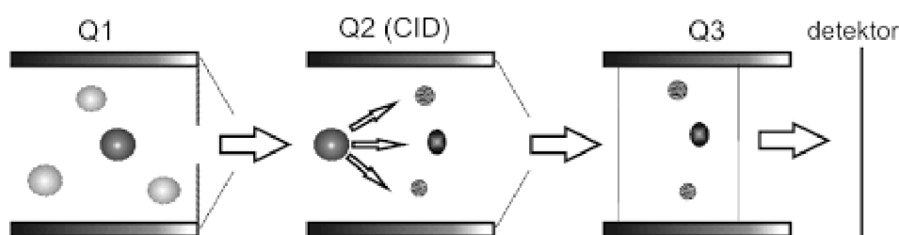
1. Dle způsobu aplikace vzorku:
 - se separací analytů,
 - bez separace analytů.
2. Dle spojení s danou separační technikou:
 - kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (zkráceně **LC-MS**),
 - plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (zkráceně **GC-MS**),
 - superkritická fluidní chromatografie s hmotnostní spektrometrií (zkráceně **SFC-MS**),
 - kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií (zkráceně **CE-MS**).
3. Dle typu ionizace:
 - tvrdé ionizační techniky – elektronová ionizace (EI) a chemická ionizace (CI),
 - měkké ionizační techniky za atmosférického tlaku – elektrosprejová ionizace (**ESI**),
 - desorpční ionizační techniky (MALDI),
 - ambientní ionizační techniky (Harvey 2019).

Největší zlom nastal právě s rozvojem elektrosprejové ionizace. ESI se velmi rychle stala jednou z nejpoužívanějších ionizačních technik v hmotnostní spektrometrii. Díky své všestrannosti, citlivosti a schopnosti ionizovat i vysokomolekulární, netěkavé a termolabilní

analyty, prostřednictvím tvorby vícenásobně nabitých iontů. ESI produkuje stabilní molekulární ionty přímo z kapalná fáze, dokonale kompatibilní s LC (Famiglini et al. 2021). ESI byla použita jako ionizační technika v této diplomové práci.

Typickými analyzátory jsou TOF (z anglického time of flight), elektrostatická orbitální past (orbitrap), kvadrupól, který lze použít buď to samostatně, nebo pro citlivější analýzu může být použit trojitý kvadrupól, který je možno vidět na **obrázku č. 7** (zkráceně značen také jako QqQ) (Friedecký & Lemr 2012).

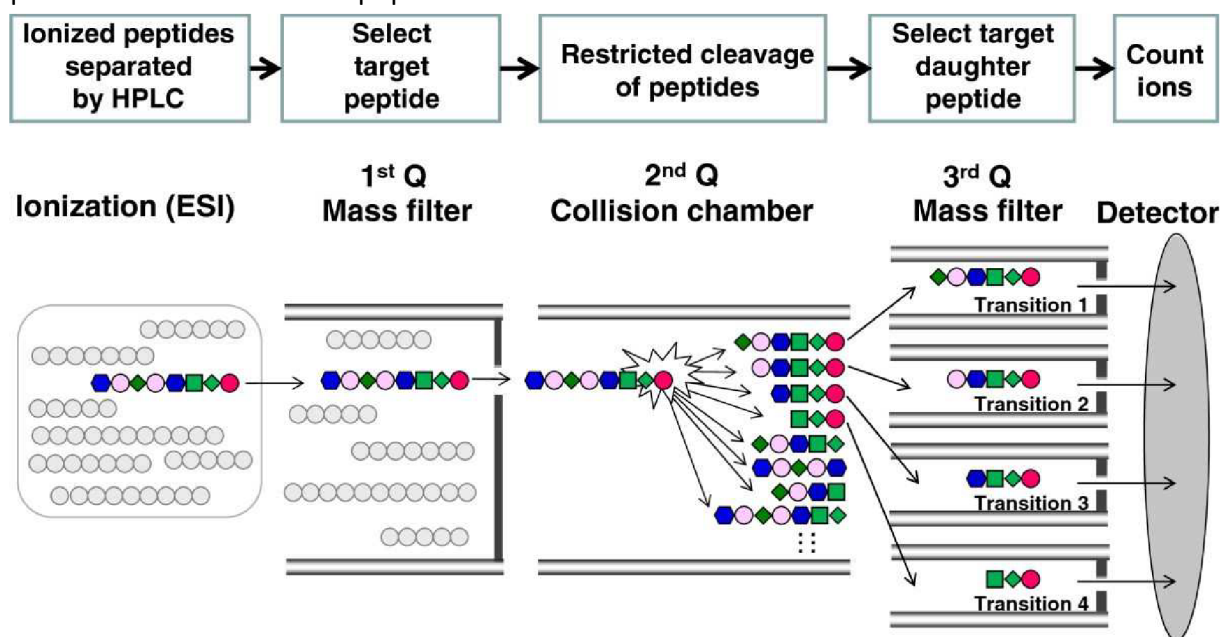
Tento analyzátor byl využit při analýze vzorků.



Obrázek č. 7 - Trojitý kvadrupól, převzato z Faktor et al. (2011)

Trojitý kvadrupól je velmi populárním analyzátozem díky cenové dostupnosti, robustnosti při analýze složitých matic a specifitě. Principem je umístění dvou kvadrupólů, mezi kterými je umístěna kolizní cela (ne vždy musí být na principu kvadrupólu). První kvadrupól (**Q1**) propouští ionty pouze s definovanou m/z . Následně dochází k fragmentaci v kolizní cele (**Q2** nebo také **q2**). Na závěr fragmentované ionty přichází do třetího kvadrupólu (**Q3**), který pracuje ve skenovacím režimu o určitém rozsahu m/z . Tímto způsobem je dosaženo vysoké citlivosti při analýze (Friedecký & Lemr 2012). Přístroj, použitý pro měření vzorků ve školní laboratoři, má ve třetím kvadrupólu zakomponovanou iontovou past. Tím je docíleno širší možnosti použití.

Nadcházející **obrázek č. 8** blíže ukazuje, jak lze propojení ESI s QqQ použít například pro identifikaci hledaného peptidového řetězce.



Obrázek č. 8 - Princip selekce MRM za použití trojitého kvadrupólu, převzato z Uchida et al. (2013)

Technologie, založené na kombinaci hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií, však prochází neustálým vývojem. Tím je docíleno zlepšující se úrovně a přesnosti analýzy, což výrazně napomáhá k detekci a identifikaci jednotlivých metabolitů a iontů (Allwood & Goodacre 2010).

I přes stále posouvající se a vyvíjející se metodu nelze říci, že spojení LC-MS je univerzální. Ty, které jsou na trhu, mají výrazné specifikace a oblasti použití (Famiglini et al. 2021).

Kapalinová chromatografie

Chromatografie je jeden z fyzikálních způsobů separace složek. K separaci dochází pomocí dvou fází. První fáze je nehybná – stacionární, zatímco druhá fáze je pohyblivá - mobilní, která se pohybuje v určitém směru. Mobilní fází může být kapalina, plyn nebo superkritická tekutina. Stacionární fází může být pouze pevná látka, gel nebo kapalina. Pokud by byla stacionární fází kapalina, může být distribuována na pevnou látku, která může, ale také nemusí přispět k separačnímu procesu (Ardrey 2003).

Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometry fungují tak, že převádí molekuly analytu do nabitého, takzvaného ionizovaného, stavu. Následuje analýza iontů a případných fragmentových iontů, které vznikají během ionizačního procesu na základě poměru jejich hmotnosti k náboji (značeno m/z). Pro ionizační, ale i iontovou analýzu je k dispozici několik různých technologií. Tím se vytváří velké množství různých typů hmotnostních spektrometrů (Pitt 2009).

Použití metody QuEChERS

Od roku 2003 je zavedena metoda (pro předúpravu vzorku pro analýzy) QuEChERS – Reprezentativního extrakčního procesu. Název metody je odvozen od slov: **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged a Safe** (rychlé, snadné, levné, efektivní, robustní a bezpečné). Tato metoda byla vyvinuta a publikována institutem US Department of Agriculture Eastern Regional Research Center ve Windmooru (Li et al. 2021).

Tato metoda těžila ze své jednoduchosti. Při použití QuEChERS je však nevyhnutelná centrifugace k izolaci adsorbentu z extrakčního roztoku, což je trochu problematické (Wang et al. 2022). I přes tento fakt si metoda díky výhodám snížených nákladů na experimentální zařízení a zlepšeného odstraňování nežádoucích částí vzorku, našel QuEChERS širokou škálu aplikací při určování pesticidů v různých matricích. Při kvantifikaci se jako účinná technika pro detekci stopového množství pesticidů osvědčilo spojení LC s MS/MS. Kapalinová chromatografie, v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií, byla v posledních letech úspěšně použita pro detekci nejen reziduí pesticidů, ale i dalších potravinových kontaminantů (Li et al. 2021).

Původně byla metoda QuEChERS vyvinuta pro extrakci kyselých a zásaditých pesticidů z potravin. Kromě těchto dvou forem však bylo zjištěno, že se metoda může použít

i k extrakci neutrálních a amfifilních analytů (Townsend et al. 2020). Dále se využívá v potravinových maticích s vysokým obsahem tuku (Sulaiman et al. 2022).

Metoda vede k extrakci v mikroměřítku za použití acetonitrilu pro extrakci analytu a následnému čištění extrakčního činidla. Tato metoda je velmi flexibilní a lze ji upravovat v závislosti na povaze analytu. Technika QuEChERS snižuje velikost vzorku, dobu experimentu a spotřebu chemikálií. Pokud je použita tato metoda, eliminuje se počet chyb, protože při přípravě vzorku se neprovádí kroky jako jsou filtrace, kondenzace nebo například výměna rozpouštědla (Sulaiman et al. 2022).

Touto metodou jsou ze vzorku odstraněny následující složky: sacharidy, lipidy, organické kyseliny, steroly, proteiny, barviva a voda. Je možno si přípravek koupit v několika variantách. Existují centrifugační zkumavky (dostupné od 2 do 15 ml), nebo připravené sáčky s namíchanou směsí chemických látek (Koesukwiwat et al. 2010).

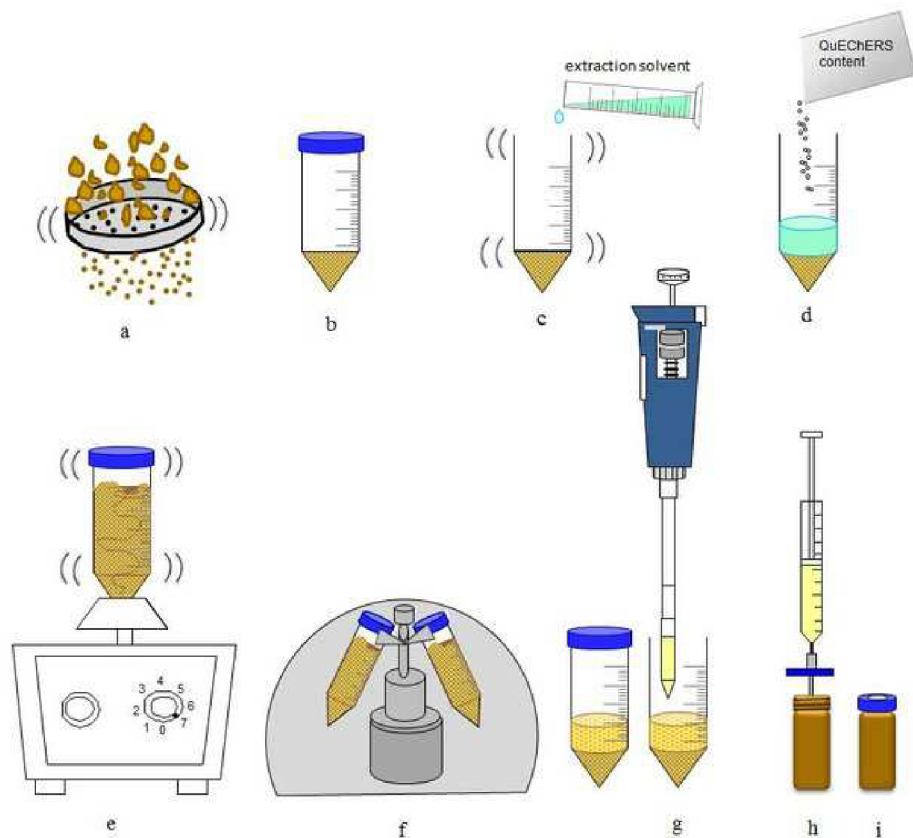
Způsob předúpravy vzorku má však nevýhodu v podobě nízké selektivity a absorpční kapacity, což vede k neschopnosti odhalit stopová množství cílových analytů z komplexnějších matic (He et al. 2019).

Směsi solí pro konkrétní vzorky si mohou analytici buď sami předpřipravit, anebo je možnost si zakoupit komerční pytlíčky, kyty nebo kyvety, které jsou již připravené s konkrétně definovaným množstvím a složením (Hrynko et al. 2021).

Mezi nejčastěji používané komponenty jsou:

- bezvodný **MgSO₄** – k odstranění přebytečné vody,
- **PSA** – k odstranění cukrů, mastných kyselin, organických kyselin a antokyanových pigmentů,
- **C18** – k odstranění nepolárních interferencí,
- **PGC** – k odstranění pigmentů, sterolů a nepolárních interferencí,
- **NaCl**, citrát sodný, octan sodný a další (Izcarra et al. 2022).

Princip použité metody QuEChERS je ukázán na **obrázku č. 9**.



Obrázek č. 9 - Princip použití přípravku QuEChERS, převzato z Paíga et al. 2015

Popis obrázku č. 9: A–příprava matrice k analýze; B–připravený vzorek v centrifugační zkumavce; C–přidání extrakčního rozpouštědla; D–přidání obsahu sáčku QuEChERS; E–zamíchání vzorku pomocí přístroje vortex; F–centrifugace vzorků; G–odpipetování supernantu; H–převedení supernantu do vialky; I–uzavřená vialka se supernantem

4 Metodika

Použité chemikálie:

- Acetonitril pro kapalinovou chromatografii (Honeywell, Fluka, Německo)
- Analytický standard aminopyralidu (Honeywell, Fluka, Německo)
- Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich s.r.o., Česká republika)
- N₂
- QuEChERS (4 g MgSO₄ + 1 g NaCl) (Agilent Technologies, USA-CA)
- Sladinový extrakt (VWR Chemicals, Belgie)

Použité mikroorganismy:

- *Pleurotus ostreatus*, kmen HK34 komerční kmen (Sylvan)

Následující kmeny byly identifikovány a zařazeny do sbírky Výzkumného ústavu rostlinné výroby (zkráceně VÚRV) Praha-Ruzyně:

- *Dipodascus geotrichum* VURV-F 966 - kmen byl izolován ze substrátu ošetřeného aminopyralidem
- *Cladosporium herbarum* VURV-F 968 - kmen byl izolován ze substrátu ošetřeného aminopyralidem

4.1 Příprava tekutého média

Pro přípravu tekutého média byl použit sladinový extrakt (VWR Chemicals, Belgie) 20 g/l. Pro každý sledovaný mikroorganismus bylo připraveno celkem 5 koncentrací (100, 200, 300, 400 a 500 ppm) ve třech opakováních. Kromě vzorků s přídavkem aminopyralidu byly připravené také tři vzorky, které aminopyralid neobsahovaly. Sloužily jako blank. Dále byly připraveny také ke každé koncentraci kontrolní vzorky, které neobsahovaly mikroorganismus, ale aminopyralid ano.

Následoval proces sterilizace za podmínek 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci a vychladnutí média následovalo přidání příslušných mikroorganismů a vzorky se nechaly inkubovat po dobu 28 dnů.

4.2 Příprava vzorku k analýze

Při přípravě vzorků na analýzu byl vždy odebrán 1 ml z media, který byl přepipetován do 50 ml centrifugační zkumavky. Následně bylo přidáno 10 ml připraveného roztoku (1% roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu). Připravená směs kapalin byla vortexována 30 vteřin ve dvou opakováních.

Následně byla co nejrychleji přidána směs QuEChERS (4 g MgSO₄ + 1 g NaCl) a zkumavka se vzorkem byla centrifugována 10 minut za podmínek 4 °C a 11000 otáček za minutu. Z centrifugovaného vzorku bylo odebráno 5 ml supernatantu a převedeno do tmavé 15 ml zkumavky. Následoval odběr 1 ml supernatantu do plastové mikrozkušavky a vzorek se nechal vysušit proudem N₂.

K vysušenému vzorku byl přidán 1 ml 1% roztok kyseliny mravenčí s methanolem a mikrozkuhavka se nechala 2 minuty vortexovat. Následovalo desítkové ředění na finální koncentraci 10^{-4} . Tímto způsobem byly připravené všechny vzorky kromě blanků, u kterých nebylo provedeno ředění.

4.3 Experimentální chemikálie a činidla

Analytický standard aminopyralidu (č. CAS:150114-71-9) byl získán od společnosti Honeywell (Fluka, Německo). Primární zásobní roztok aminopyralidu byl připraven v acetonitrilu pro kapalinovou chromatografii (LC) (Honeywell, Fluka, Německo) a skladován při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pracovní roztok aminopyralidu byl připraven zředěním primárního zásobního roztoku na koncentraci $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ v 5 ml acetonitrilu a převeden do 1 ml LC vialek a udržován při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby provedení analýzy, která se používá pro validaci a kalibrační standardy.

4.4 Kritéria validace pro extrakční metodu

Metoda extrakce aminopyralidu byla validována na základě pokynů SANTE/12682/2019. Linearita (citlivost) byla kontrolována z osmi úrovní kalibračních standardů (1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 a 100,0 ng/ml).

- Pravdivost (výtěžnost %) byla vypočtena na základě poměru reálné koncentrace obohaceného slepého vzorku k teoretické koncentraci a měla by být v rozmezí 70-120 %.
- Přesnost (opakovatelnost) byla vypočtena jako % relativní směrodatná odchylka (RSD %) vzorků se stejnou úrovní s přidavkem.

Nejnižší úroveň přidavku byla stanovena jako limit kvantifikace (LOQ), když pravdivost (70-120 %) a RSD% ($<20\%$) splňovaly kritéria přijatelnosti. Posun retenčního času byl kratší než $\pm 0,1$ minuty (Pihlström et al. 2017).

4.5 Kalibrační křivka

Počáteční koncentrace aminopyralidu ve vzorcích byla nad rozsahem měření LC-QQQ. Vzorky byly poté zředěny až $\times 10^6$, aby se zabránilo saturaci detektoru, a aby byla upravena koncentrace v rozsahu lineárních kalibračních standardů. Díky tomu byl matricový efekt média a metabolitů eliminován vyšším ředěním. Pro výpočet zbytkové koncentrace aminopyralidu byly použity pouze externí kalibrační standardy, připravené v 1% kyselině mravenčí v methanolu. Plocha píku aminopyralidu při každé úrovni koncentrace byla použita pro kalibrační křivku s $1/x$ vážením. Korelační koeficient (R^2) byl vyšší nebo roven 0,99 ($R^2=0,9996$).

4.6 Analytické podmínky

Analýza aminopyralidu byla provedena pomocí systému AB Sciex LC QTRAP 6500+ MS/MS, se zdrojem TurboV (Framingham, MA). Separace probíhala na připojeném HPLC Shimadzu Exion (Kjóto, Japonsko), za použití MRM (z anglického multiple reaction monitoring) a ionizace ESI⁺. Napětí iontového zdroje bylo 4500 V. Teplota zdroje byla 550°C. Průtok plynu pro nebulizátory 1 a 2 bylo 50 psi. Přejímové parametry MS jsou uvedeny v **tabulce č. 1**.

Tabulka č. 1 - MS přejímové parametry

Sloučenina	Q1 (Da) ^a	Q3 (Da) ^b	DP ^c (V)	EP ^d (V)	CE ^e (V)	CXP ^f (V)
Aminopyralid	206.943	160.9	21	10	29	18
Kvantifikace						
Aminopyralid	206.943	133.9	21	10	43	14
Kvalifikace						

^aQ1: Prekurzorový iont, ^bQ3: Produktový iont, ^cDP: Deklastrační potenciál, ^dEP: Vstupní potenciál, ^eCE: Kolizní energie, ^fCXP: Kolizní výstupní potenciál

Aminopyralid byl separován při 30 °C na koloně Ace Excel 2 Super C18 (100 x 2,1 mm, 3µm, 90Å) s gradientovou elucí mobilních fází MiliQ vody s 0,1% kyselinou mravenčí (A) a methanolem (B). Gradientový program 50:50 (v:v) A:B po dobu 0,5 minuty a lineárně se na 100 % B za 6 minut, z 6. minut na 6,5 minuty se gradientová eluce vrátila do počátečních podmínek 50:50 a systém byl ekvilibrován s počátečními podmínkami po dobu 3,5 minuty. Průtok byl stanoven na 300 µl/min a objem měřeného vzorku byl 2 µl.

Zpracování dat

Data hmotnostních spekter, získaná z analýzy, byla zpracována pomocí Analyst 1.7.1 (AB Sciex, Singapur).

5 Výsledky

Před vyhodnocením jednotlivých koncentrací byla provedena základní statistika, při které byla zjištěna data: aritmetický průměr, směrodatná odchylka, směrodatná chyba a relativní směrodatná odchylka v % (zkráceně RSD%). Zjištěné hodnoty je možno vidět v **tabulce č. 2**.

Tabulka č. 2 - Vliv obsahu aminopyralidu v mediu na schopnost rozkladu

Koncentrace/ vzorek	Průměr AP ($\mu\text{g/mL}$)	Směrodatná odchylka	Směrodatná chyba	RSD%	
100ppm	Kontrola 1	61.400	0.00	0.00	0
	Kontrola 2	67.900	0.00	0.00	0
	<i>Geotrichum</i>	110.933	31.86	18.40	29
	<i>Cladosporium</i>	18.933	7.98	4.61	42
	<i>Pleurotus</i>	56.100	12.93	7.47	23
200ppm	Kontrola 1	129.000	0.00	0.00	0
	Kontrola 2	63.200	0.00	0.00	0
	<i>Geotrichum</i>	110.767	52.81	30.49	48
	<i>Cladosporium</i>	59.600	15.55	8.98	26
	<i>Pleurotus</i>	129.333	13.43	7.75	10
300ppm	Kontrola 1	218.000	0.00	0.00	0
	Kontrola 2	101.000	0.00	0.00	0
	<i>Geotrichum</i>	243.667	81.82	47.24	34
	<i>Cladosporium</i>	60.467	49.89	28.80	83
	<i>Pleurotus</i>	186.333	13.58	7.84	7
400ppm	Kontrola 1	270.000	0.00	0.00	0
	Kontrola 2	140.000	0.00	0.00	0
	<i>Geotrichum</i>	96.500	51.98	30.01	54
	<i>Cladosporium</i>	154.333	81.09	46.82	66
	<i>Pleurotus</i>	259.667	16.17	9.33	6
500ppm	Kontrola 1	302.000	0.00	0.00	0
	Kontrola 2	209.000	0.00	0.00	0
	<i>Geotrichum</i>	222.333	107.40	62.01	48
	<i>Cladosporium</i>	182.667	64.63	37.32	35
	<i>Pleurotus</i>	325.333	21.22	12.25	7

Opakovatelnost, která je vyjádřena pomocí RSD%, by měla být pod 20 %. Tato podmínka byla splněna pouze u vzorků s použitým zástupcem rodu *Pleurotus*, a to v koncentracích 200–500 ppm. Vzhledem k nízkému počtu opakování a vysoké relativní směrodatné odchylce by bylo vhodné měření zopakovat s vyšším počtem vzorků pro umožnění přesnějšího výkladu výsledků. Kontrolní vzorky měly pouze jedno opakování, proto není zjištěna směrodatná odchylka, chyba a RSD %.

5.1 Validace metody

V průběhu validace metody byly sledovány následující pracovní charakteristiky, které jsou uvedeny v **tabulce č 3**.

Tabulka č. 3 – Validace

Validační vzorek aminopyralidu	Aktuální koncentrace (ng/mL)	Výtěžnost (%)	RSD%	LOQ	Lineární rozsah	Koeficient determinace
Spike 5 ng/g	15,4	308	11	1 ng/mL	1-100 ng/ml	0,9996
Spike 10 ng/g	10,49	105	7	1 ng/mL	1-100 ng/ml	0,9996
SPike50 ng/g	47,5	95	11	1 ng/mL	1-100 ng/ml	0,9996

Pro koncentrace 5 ng/g byla výtěžnost mimo vyhovující rozmezí (70 – 120 %), což mohlo být způsobeno matricovým efektem. Pro zbytek koncentračních hladin jsou hodnoty výtěžnosti a opakovatelnosti v požadovaném rozmezí.

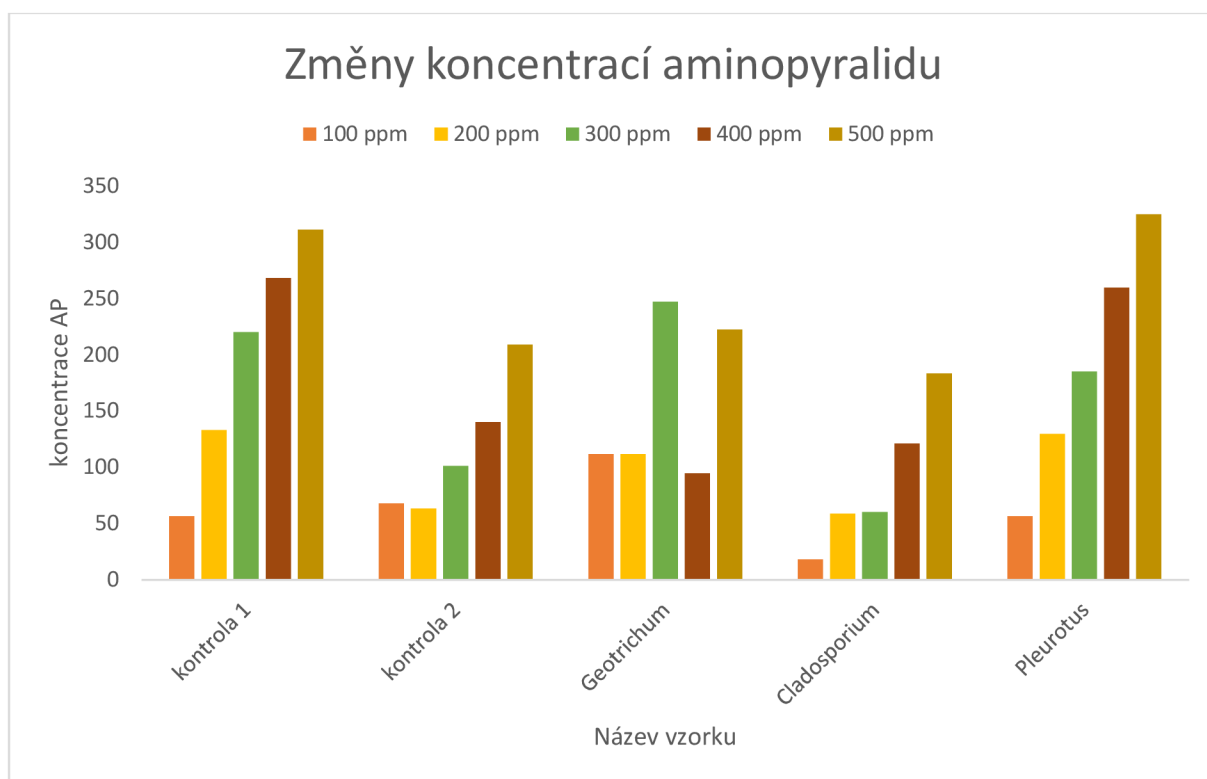
Zjištění, že změřená koncentrace převyšovala skutečnou, mohlo být způsobeno například matricovým efektem, při kterém dochází ke změně účinnosti ionizace, způsobené přítomností látek, vycházejících z kolony spolu s analyzovanou látkou. Matricové efekty jsou výsledkem soupeření mezi netěkavými látkami matrice a analytu.

Validační vzorek, který byl vyhodnocen ve vyhovujícím rozmezí, byl 10 ng/g a 50 ng/g. Oba tyto vzorky měly o pouhých 5 % rozdílnou výtěžnost. Jako použitý validační vzorek byl zvolen spike 10 ng/g.

5.2 Změna koncentrací

Na základě validace metody lze říct, že daná metoda je vhodná pro stanovení sledované látky aminopyralidu v tekutém médiu. Při vyhodnocování získaných dat byly jednotlivé koncentrace vyhodnocovány samostatně. Na **grafu č. 1** je znázorněn souhrn všech zjištěných dat ze dvou kontrolních měření a měření vzorků za použití mikroorganismů. Data z kontroly 2 slouží k porovnání změn koncentrací v průběhu inkubace bez použití mikroorganismů.

Kontrola 1 je vždy ze dne 8.9. 2021. Kontrola 2 je vždy ze dne 30.9. 2021. Kontroly byly provedeny v na začátku a po skončení inkubace.



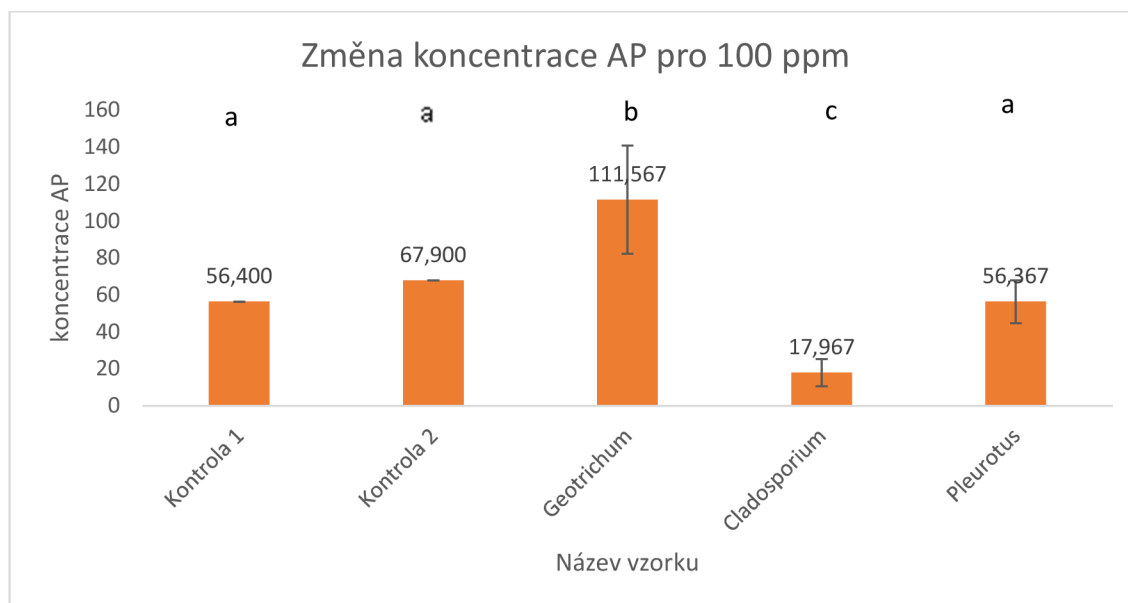
Graf č. 10 - Změny koncentrací aminopyralidu,

Pro kontrolní vzorky je z grafu možno vyčíst, že, až na koncentraci 100 ppm, došlo ve všech ostatních případech ke snížení aminopyralidu mezi kontrolou 1 a 2. Tento fakt lze vysvětlit tím, že látka je citlivá na světlo a při špatné manipulaci se vzorky dochází k degradaci, stejně jako v životním prostředí. Proto by bylo vhodné provést opakování pokusu, aby byla vyloučena náhodnost měření.

V následující části budou jednotlivé koncentrace samostatně hodnoceny a bude zjišťována rozdílnost mezi kontrolními vzorky a vzorky s použitými mikroorganismy.

5.2.1 Koncentrace aminopyralidu 100 ppm

Na **grafu č. 2** je možno vidět změny z počáteční koncentrace 100 ppm.



Graf č. 2- Změna koncentrace při koncentraci aminopyralidu 100 ppm

V grafu jsou pomocí úseček znázorněné směrodatné odchylky. U kontrolních vzorků bylo provedeno pouze jedno měření, proto jsou zde směrodatné odchylky nulové. Na základě statistického šetření byly vzorky rozděleny do homogenních skupin pomocí písmen nad jednotlivými sloupci v grafu.

Z **grafu č. 2** je patrné, že kontrolní vzorky, které byly připraveny stejným způsobem jako vzorky s použitými mikroorganismy, nesou známku degradace aminopyralidu. Jak již bylo zmíněno, pouze u této koncentrace nedošlo k poklesu koncentrace mezi kontrolním měřením 1 a 2 v průběhu času bez použitého mikroorganismu. Důvodem, proč byla naměřena u kontroly 2 vyšší koncentrace aminopyralidu, může být to, že mohlo dojít k odpaření vody z tekutého média, čímž se zvýšila koncentrace látky ve vzorku. Nebo mohlo dojít ke kontaminaci média.

Pokud porovnáme naměřené výsledky kontrolního vzorku kontroly 1 se vzorky, u kterých byl použit zástupce rodu *Pleurotus*, můžeme říci, že nedošlo k výraznějšímu rozkladu. Vzhledem k nízkému počtu opakování se průměrná hodnota, naměřená u těchto vzorků, téměř neliší od vzorků kontroly 1.

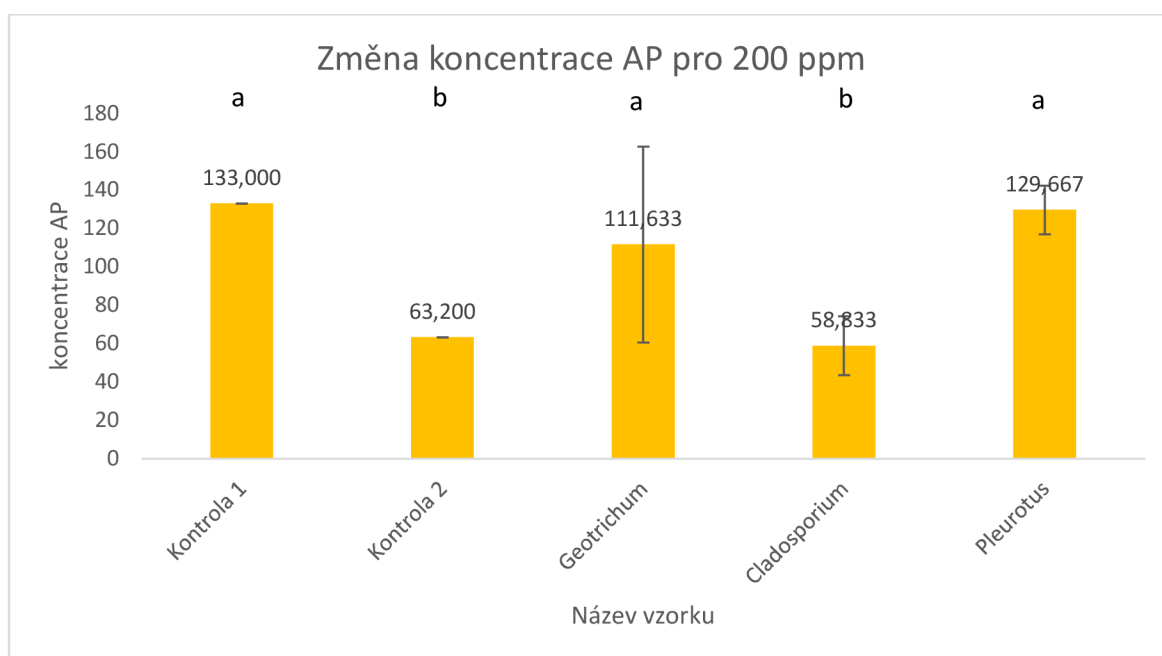
Zatímco při použití zástupce rodu *Cladosporium* došlo ke zřetelnému poklesu výskytu aminopyralidu, u vzorků, které obsahovaly sledovaného zástupce rodu *Geotrichum*, došlo k nečekanému navýšení počáteční koncentrace. Tento fakt nedovedeme vysvětlit. Proto by bylo vhodné, aby došlo k zopakování pokusu s takto nízkou koncentrací, tedy 100 ppm, abychom lépe porozuměli výsledkům.

Pro zjištění statistické rozdílnosti mezi jednotlivými vzorky bylo použito statistické šetření ANOVA homogenních skupin (Duncanův test), s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. Výstup je možno vidět v přílohách v **obrázku č. 10**. Na základě výstupu z programu STATISTICA byla do **grafu č. 2** zaznamenána písmena, která představují homogenní skupiny.

Podle tohoto označení můžeme říci, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$, mají vzorky s použitým zástupcem rodu *Pleurotus*, kontrola 1 a kontrola 2, průměry naměřených dat stejné. Rozdílné průměry, a tedy statisticky signifikantní rozdíly, mají data se zástupci rodů *Cladosporium* i *Geotrichum* od předchozích vzorků. Pouze u této koncentrace byl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi naměřenými hodnotami u kontroly 2 a zástupcem rodu *Cladosporium*.

5.2.2 Koncentrace aminopyralidu 200 ppm

Na nadcházejícím **graf č. 3** je znázorněna změna koncentrace z počátečních 200 ppm.



Graf č. 3- Změna koncentrace při koncentraci aminopyralidu 200 ppm

V grafu jsou pomocí úseček znázorněné směrodatné odchylky. U kontrolních vzorků bylo provedeno pouze jedno měření, proto jsou zde směrodatné odchylky nulové. Na základě statistického šetření byly vzorky rozděleny do homogenních skupin pomocí písmen nad jednotlivými sloupci v grafu.

U kontrolních vzorků je možno vidět pokles koncentrace, který byl odůvodněn výše. Zástupce rodu *Cladosporium* dovedl nejefektivněji rozložit přítomný aminopyralid ze vzorku. Oproti koncentraci 100 ppm, u které rozložil přibližně 82 %, z koncentrace 200 ppm byl rozklad přibližně 70 % z počáteční koncentrace. Pokud však porovnáme výsledky poklesu s kontrolou 2, nedošlo k tak výraznému poklesu. Vzhledem k pouze jednomu opakování u kontrolních vzorků nedovedeme přesně říci, zda mikroorganismus podpořil rozklad.

U vzorků s použitým zástupcem rodu *Geotrichum* již došlo k poklesu koncentrace oproti kontrole 1. V porovnání však s kontrolou 2, pravděpodobně mikroorganismus potlačil přirozený rozklad, stejně jako u vzorků se zástupcem rodu *Pleurotus*.

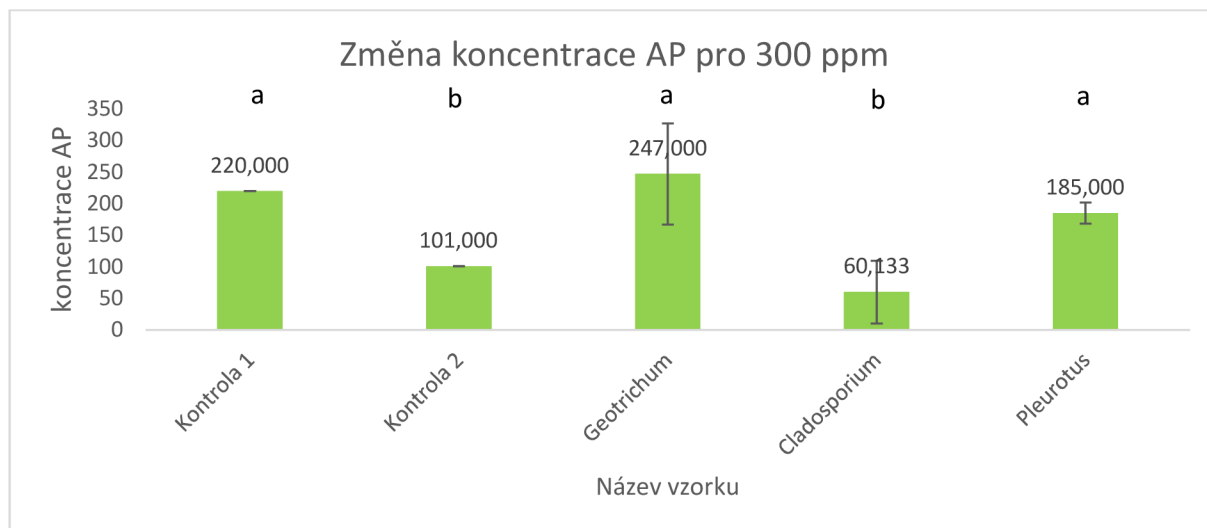
Při porovnání kontrolních vzorků s použitým zástupcem rodu *Pleurotus*, můžeme na grafu pozorovat, že mikroorganismus zabránil rozkladu v průběhu času. Rozklad aminopyralidu ve vzorku byl téměř srovnatelný s kontrolou 1.

Pro zjištění statistické rozdílnosti mezi jednotlivými vzorky bylo použito statistické šetření ANOVA homogenních skupin (Duncanův test), s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. Výstup je možno vidět v přílohách na **obrázku č. 11**. Na základě tohoto šetření, byly vzorky rozděleny do homogenních skupin, jak již bylo zmíněno a naznačeno ve sloupcovém grafu.

Podle výstupu byly skupiny tentokrát rozděleny pouze do dvou homogenních skupin. Do jedné skupiny byly zařazeny vzorky zástupce rodu *Cladosporium* a kontrola 2. Podpora rozkladu oproti kontrole 2 však nebyla shledána. Do druhé skupiny byly zařazeny ostatní vzorky. Můžeme tedy říct, že na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ jsou průměry vzorků se zástupcem rodu *Cladosporium* a kontroly 2 statisticky signifikantní v porovnání s druhou homogenní skupinou.

5.2.3 Koncentrace aminopyralidu 300 ppm

Na nadcházejícím **graf č. 4** je znázorněna změna z počáteční koncentrace 300 ppm.



Graf č. 4- Změna koncentrace při koncentraci aminopyralidu 300 ppm

V grafu jsou pomocí úseček znázorněné směrodatné odchylky. U kontrolních vzorků bylo provedeno pouze jedno měření, proto jsou zde směrodatné odchylky nulové. Na základě statistického šetření byly vzorky rozděleny do homogenních skupin pomocí písmen nad jednotlivými sloupci v grafu.

Z **grafu č. 4** lze vyčíst, že i při koncentraci 300 ppm je stále nejúčinnější rozkladač aminopyralidu z tekuté matrice zástupce rodu *Cladosporium*. Při této hladině byl schopen rozložit přibližně 80 % z počáteční koncentrace. Jeho rozkladná schopnost tedy oproti

koncentraci 200 ppm lehce vzrostla. Stejně jako u předchozí koncentrace, by bylo potřeba provést zopakování pokusu s vyšším počtem kontrolních vzorků, aby bylo potvrzeno, zda je mikroorganismus schopen podpořit rozklad aminopyralidu ze vzorků. Podle našeho měření snížil zástupce rodu *Cladosporium* obsah aminopyralidu ve vzorku.

U zástupce rodu *Geotrichum* v předchozí koncentraci 200 ppm byl sledován rozklad o necelých 56 % z počáteční koncentrace. V tomto případě se jeho schopnost rozkládat látku snížila na necelých 18 % z počátečních 300 ppm. Při porovnání s oběma kontrolními vzorky přítomnost mikroorganismu pravděpodobně zabránila rozkladu aminopyralidu ve vzorcích. Vlivem nízkého počtu opakování bych doporučila opakovat měření, aby byla potvrzena teorie o potlačení.

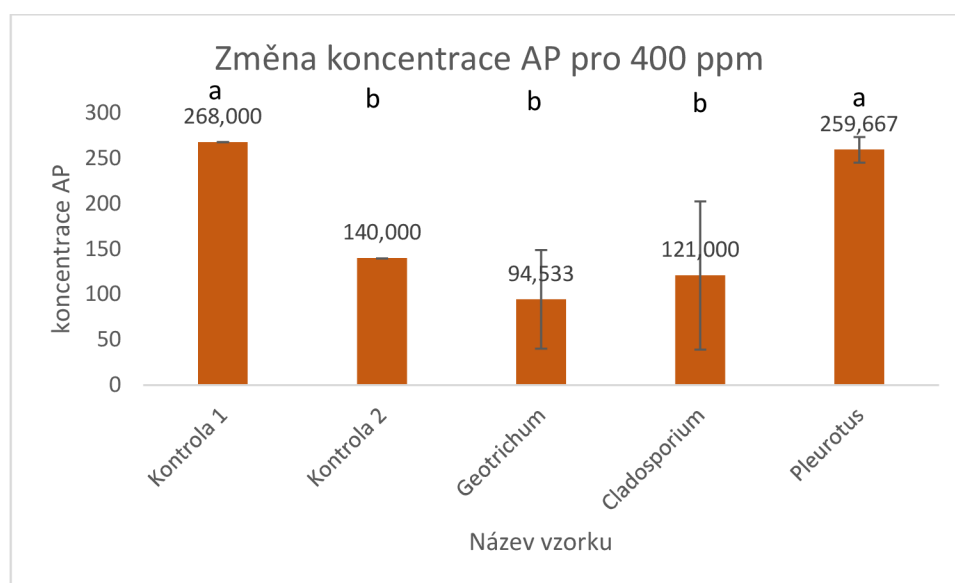
Vzorky se zástupcem rodu *Pleurotus* již v porovnání s kontrolou 1 vykazují menší pokles. V porovnání s kontrolou 2 je však opět zřetelné, že mikroorganismus zabraňuje rozkládat aminopyralid.

Pro zjištění statistické rozdílnosti mezi jednotlivými vzorky bylo použito statistické šetření ANOVA homogenních skupin (Duncanův test), s hladinou významnosti $\alpha=0,05$. Výstup je možno vidět v přílohách na **obrázku č. 12**. Na základě statistického šetření byly výsledky rozděleny do dvou homogenních skupin, které jsou vyznačené ve sloupcovém grafu.

Stejně jako u předchozí koncentrace byly i u koncentrace 300 ppm vzorky rozděleny do 2 homogenních skupin. A stejně jako u předchozího šetření, i zde do jedné homogenní skupiny za základě průměrných hodnot patří zástupce rodu *Cladosporium* spolu s kontrolou 2. Do druhé homogenní skupiny patří zbylé vzorky. Pokud by bylo provedeno větší množství opakování, pravděpodobně by u této koncentrace došlo ke statisticky významnému rozdílu i mezi kontrolou 2 a vzorky s použitým zástupcem rodu *Cladosporium*. Na hladině významnosti $\alpha=0,05$ můžeme tedy tvrdit, že tento zástupce a kontrola 2 mají statisticky významně nižší průměrné výsledky rozkladu než vzorky druhé homogenní skupiny.

5.2.4 Koncentrace aminopyralidu 400 ppm

Na nadcházejícím **graf č. 5** je znázorněna změna z počáteční koncentrace AP 400 ppm.



Graf č. 511 - Změna koncentrace při koncentraci aminopyralidu 400 ppm

V grafu jsou pomocí úseček znázorněné směrodatné odchylky. U kontrolních vzorků bylo provedeno pouze jedno měření, proto zde směrodatné odchylky chybí. Na základě statistického šetření byly vzorky rozděleny do homogenních skupin pomocí písmen nad jednotlivými sloupci v grafu.

Z **grafu č. 5** je patrné, že při porovnání této a předchozí koncentrace 300 ppm, došlo k razantnímu poklesu aminopyralidu v případě vzorků s použitým zástupcem rodu *Geotrichum*. Přesněji byl schopen podpořit rozklad, který činil 76 % z počáteční koncentrace. U této koncentrace byl poprvé naměřen pokles oproti kontrole 2.

Pokud porovnáme schopnost zástupce rodu *Cladoporium* rozkládat látku aminopyralid ze vzorků 300 ppm a 400 ppm, dochází k lehkému poklesu. Při koncentraci 400 ppm podpořil rozklad o 70 % z počáteční koncentrace. Což může být ovlivněno malým počtem opakování, nebo také tím, že látka začíná být pro mikroorganismus toxická. Stále byl však naměřen pokles i oproti kontrole 2.

Pokud se zaměříme na zástupce rodu *Pleurotus*, můžeme opět vidět, že pokles koncentrace aminopyralidu ve vzorcích byl téměř totožný se změnou koncentrace u kontroly 1. A opět je zřetelné zabránění rozkladu látky.

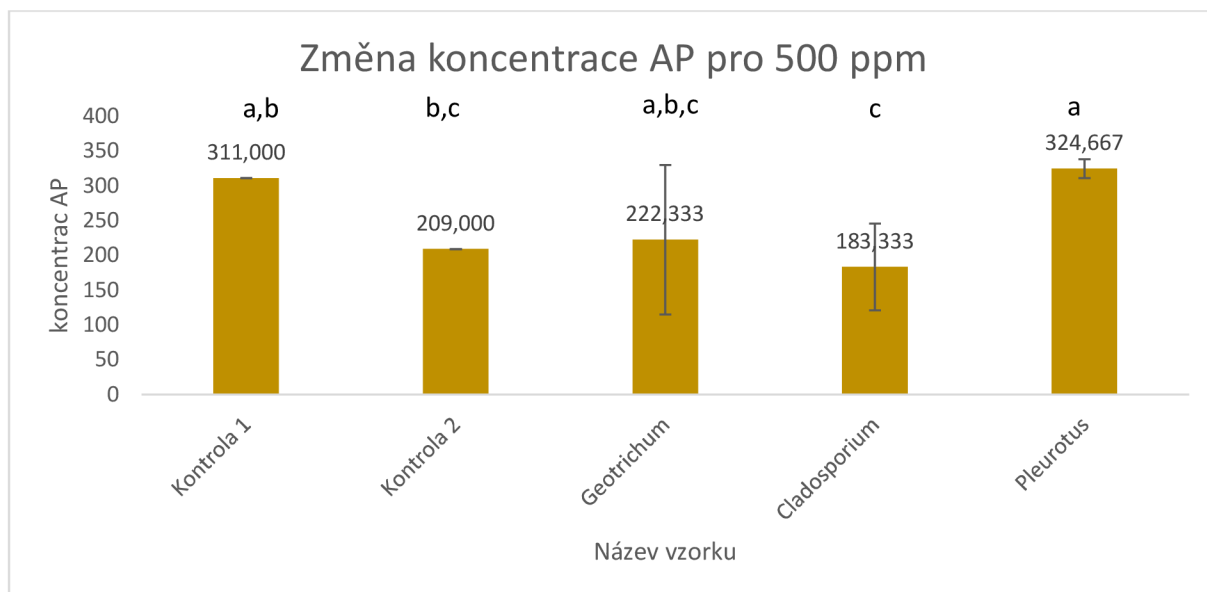
Pro zjištění statistické rozdílnosti mezi jednotlivými vzorky bylo použito statistické šetření ANOVA homogenních skupin (Duncanův test), s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. Výstup je možno vidět v přílohách na **obrázku č. 13**. Na základě výstupu z programu STATISTICA byly vzorky rozděleny do homogenních skupin, které jsou vyznačeny ve sloupcovém grafu.

Podle tohoto rozdělení je možno říci, že statisticky významný rozdíl průměrů naměřených hodnot je mezi jednou homogenní skupinou, tvořenou kontrolou 1 a zástupce

rodu *Pleurotus* a druhou homogenní skupinou, tvořenou kontrolou 2 a zástupci rodů *Geotrichum* a *Cladosporium*. Ani zde nebyly vyhodnoceny statistické rozdíly naměřených hodnot mezi kontrolou 2 a ostatními vzorky s mikroorganismy. Pokud by bylo měřeno větší množství vzorků, pravděpodobně by zde mohla shledána statistická rozdílnost mezi kontrolou 2 a zástupcem rodu *Geotrichum*.

5.2.5 Koncentrace aminopyralidu 500 ppm

Na nadcházejícím **graf č. 6** je znázorněna změna koncentrace z počátečních 500 ppm.



Graf č. 6 - Změna koncentrace při koncentraci aminopyralidu 500 ppm

V grafu jsou pomocí úseček znázorněné směrodatné odchylky. U kontrolních vzorků bylo provedeno pouze jedno měření, proto zde směrodatné odchylky chybí. Na základě statistického šetření byly vzorky rozděleny do homogenních skupin pomocí písmen nad jednotlivými sloupci v grafu.

Z **grafu č. 6**, který představuje změnu koncentrace z počáteční hodnoty 500 ppm, je možno vyčíst, že opět, stejně jako u předchozích vzorků, zástupce rodu *Pleurotus* nepodpořil rozklad aminopyralidu z tekutého média. V průběhu inkubace bylo zabráněno rozkladu.

U vzorků s použitým zástupcem rodu *Cladosporium* došlo k rozkladu o přibližně 63 % z počáteční koncentrace. Tento pokles byl pro koncentrace 500 ppm největší ze všech vzorků. Schopnost podpořit rozklad tímto mikroorganismem se však se zvyšující se koncentrací od 300 ppm snižuje. Látka pravděpodobně působí na mikroorganismus toxicky.

U vzorků, u kterých byl použit zástupce rodu *Geotrichum*, byl zaznamenán pokles o necelých 56 % z počáteční koncentrace. Což je nižší pokles než u předchozí koncentrace. Opět se však může jednat o zkreslení výsledků vlivem nízkého počtu měření.

Pro zjištění statistické rozdílnosti mezi jednotlivými vzorky bylo použito statistické šetření ANOVA homogenních skupin (Duncanův test), s hladinou významnosti $\alpha=0,05$. Výstup

je možno vidět v přílohách na **obrázku č. 14**. Na základě tohoto šetření byly vytvořeny homogenní skupiny.

Podle rozdělení do homogenních skupin je patrné, že pro statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými vzorky byl sledován pouze mezi zástupci rodů *Cladosporium* a *Pleurotus*. U ostatních vzorků došlo k překryvu hodnot. Zástupce rodu *Geotrichum* tak je zařazen do homogenní skupiny spolu s Kontrolou 2 ale i ostatními vzorky. Rozptyl výsledků byl velký a neexistuje tak statistický rozdíl mezi vzorky obsahující zástupce rodu *Geotrichum* a ostatními vzorky.

6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo zjistit funkci tří kmenů hub (*Pleurotus spp.*, *Cladosporium spp.*, *Geotrichum spp.*) a jejich schopnost odstranit aminopyralid z tekutého substrátu při submerzní kultivaci vybraných kmenů.

Z přehledu literatury byly vyzdvíženy i další vlastnosti látky aminopyralidu, které by do budoucna mohly být předmětem zkoumání.

6.1 Vliv teploty

Yang et al. (2021) ve své práci uvedl vliv teplot na degradaci aminopyralidu. Došel k závěru, že čím vyšší teplota, tím rychlejší degradace látky. V diplomové práci byly vzorky připraveny za použití sladidového extraktu, do kterého byl aminopyralid přidán. Následovala sterilace média při 121 °C po dobu 15 minut. Tento krok by pravděpodobně mohl představovat potenciální zkreslení získaných výsledků a bylo by zapotřebí se této problematice věnovat dále a v dalším experimentu prozkoumat, zda sterilizace nemá významný vliv na rozklad aminopyralidu z média.

Vzorky před provedenou analýzou byly uskladněny v mrazáku. Vliv teplot okol -18 °C a následným rozmrazováním také ještě nebyly nikdy prozkoumány. Proto není známo, zda i tento proces nemohl mít vliv na rychlejší degradaci aminopyralidu z tekutého média.

6.2 Toxicita

Walsh et al. (2012) uvedl, že látka aminopyralid je považována za téměř netoxickou pro savce. Letální dávka byla stanovena na více než 5 g/ kg živé hmotnosti pro vybrané savce. Yang et al. (2021) však ve své studii poukazuje na skutečnost, že pokud budou hospodářská zvířata krmena rostlinami, na které byl dříve aplikován herbicid, obsahující právě látku aminopyralid, a zvířata následně budou sloužit jako zdroj masa pro lidi, mohlo by dojít k nevratnému poškození ledvin konzumentů.

Na riziku pro lidské zdraví se Yang et al. (2021) shoduje také s dalšími autory He et al. (2019). Rozdílnost názorů na toxicitu látky mezi Walsh et al. (2012) a těmito dvěma autory může být ten, že byly provedeny nové výzkumy a studie, které se zabývaly vlivy na lidské zdraví. Teprve v posledních letech jsou prováděny studie, které se zabývají toxicitou jednotlivých herbicidních látek.

6.3 Degradace mikroorganismy

Vzhledem ke zvyšujícím se potřebám navyšovat výnosy jsou pesticidy aplikovány v čím dál tím větším množství. Tím dochází k hromadění látek v životním prostředí. Mikroorganismy mají obrovský potenciál rozkládat různé druhy pesticidů. Schopnost jednotlivých mikroorganismů přirozeně rozkládat a odstraňovat z prostředí je zkoumána, a hlavně využívána, až v posledních letech. Na této skutečnosti se shodují autoři Kumar et al. (2021) a Malla et al. (2022).

Biodegradační schopnost mikroorganismů, které byly použity v této diplomové práci, byla dříve zkoumána u rodů *Geotrichum* a *Cladosporium*. Pro rod *Pleurotus* konkrétní rozkladné procesy pesticidů zatím podrobně prozkoumány nebyly. Jackson & Pryor (2017) potenciál druhů rodu *Pleurotus* pro biologickou dekontaminaci prostředí vysvětlují na schopnosti hub vylučovat neselektivní ligninolytické enzymy, které patří mezi nejstabilnější dekontaminační strategie. Potenciál využití rodu *Pleurotus* pro rozklad pesticidů uvádí také Picornell-Buendía et al. (2016).

Potenciál zástupce rodu *Pleurotus* v diplomové práci nebyl zjištěn. Naopak byla zjištěna schopnost mikroorganismu zabránit degradaci látky v průběhu inkubace. Neznamená to však, že by mikroorganismus nebyl schopen rozkládat jiné herbicidní látky.

Schopnost zástupců rodu *Geotrichum* provádět rozklad látek různé povahy byl zkoumán v několika studiích. Jakovljević & Vrvic (2018) uvádí využití mikroorganismu pro rozklad v odpadních a průmyslových vodách. Jednotlivé druhy mají schopnost degradovat jiné látky. O schopnosti rozkládat látky poukazují i Dragicevic et al. (2018) i starší článek od autorů Vijaykumar et al. (2006). Efektivní rozklad *Dipodascus geotrichum* byl v této diplomové práci zaznamenán pouze u koncentrace 400 ppm. Statistická rozdílnost však nebyla potvrzena ani v jednom případě. Pokud by byl proveden větší počet opakování, pravděpodobně by byl zaznamenán pokles u této koncentrace. Statistická významné snížení aminopyralidu však nebylo shledáno ani u jedné koncentrace.

Papazlatani et al. (2022), který se zabýval schopností rodu *Cladosporium* rozkládat fungicid imazalil, došel k závěru, že mikroorganismus podporuje rozklad pesticidu. Se zvyšující se koncentrací však jeho schopnost klesá. V této diplomové práci byl zjištěn statisticky prokazatelný pokles pouze u koncentrace 100 ppm. Pokud by byl proveden větší počet opakování, pravděpodobně bychom došli ke stejnému závěru jako Papazlatani et al. (2022).

V několika člancích, (Kumar et al 2021, Malla et al. 2022), se autoři shodují, že kombinace různých druhů mikroorganismů přispívá k lepší biodegradační schopnosti. Tato skutečnost by mohla přispět také k rozkladu aminopyralidu. Předmětem dalšího zkoumání by mohla být volba vhodných mikroorganismů, aby došlo k co nejúčinnějšímu odstranění reziduí ze substrátu.

6.4 Design experimentu

Design experimentu diplomové práce byl navržen tak, aby bylo možné porovnat schopnosti jednotlivých mikroorganismů rozkládat herbicidní látku aminopyralid. Navržený počet opakování pro jednotlivé koncentrace (100, 200, 300, 400 a 500 ppm) byl tři. Tento počet může nastínit chování mikroorganismů v přítomnosti látky, avšak pro přesnější interpretaci a přesnost výsledků, i vzhledem k vysokým rozptylům dat, by bylo potřeba provést větší počet opakování, aby nebyly výsledky ovlivněny náhodností. Dále by bylo vhodné i kontrolní vzorky mít ve stejném počtu opakování, jako byl počet opakování pro vzorky s mikroorganismy. V navrženém experimentu bylo bohužel pracováno pouze s jedním kontrolním vzorkem, což neodpovídalo námi navrženému designu.

Nízký počet opakování ovlivnil také výsledky RSD%. Opakovatelnost, vyjádřená právě RSD%, by měla mít hodnoty pod 20 %. K tomu došlo pouze u vzorků s použitým zástupcem rodu *Pleurotus*, a to ještě ne ve všech koncentracích. Můžeme říci, že pro tento mikroorganismus by opakování pokusu pravděpodobně potvrdilo již zjištěné hodnoty.

Pro ostatní mikroorganismy však rozptyl výsledků byl velký, a to zejména u vzorků s použitým zástupcem rodu *Geotrichum*. Pro tento mikroorganismus by bylo potřeba provést opakování pokusu, a to zejména koncentrace 100 ppm, u které nebyl shledán přirozený pokles, jako tomu bylo u kontrolních vzorků. Naopak naměřená hodnota ve dvou případech převyšovala počáteční koncentraci.

Z výsledků je zřejmé, že experiment podléhal různým zdrojům chyb, kterým se bohužel nelze vyhnout, ale dají se omezit. Pro ověření výsledků by bylo vhodné omezit chyby, kterými mohou být například:

- počet osob připravující médium a provádějící analýzu snížit na ideálně jednoho člověka,
- práce se vzorky musí probíhat za sníženého množství světla, protože je látka je citlivá na světlo,
- musí se pracovat se vzorky pokud možno co nejrychleji,
- nesmí se nechávat otevřené zkumavky se vzorky,
- a další.

Vzhledem k těmto možným chybám a vysokému rozptylu hodnot by bylo vhodné zopakovat pokus a omezit chyby.

7 Závěr

Stanovenou hypotézu, která říká, že *Pleurotus spp.*, *Cladosporium spp.* a *Geotrichum spp.* jsou schopny odbourat rezidua aminopyralidu v in vitro experimentu, je zapotřebí na základě zjištěných dat rozdělit na 3 dílčí části:

- *Pleurotus spp.* **není schopen** rozkládat aminopyralid z tekutého média v in vitro experimentu. Mikroorganismus **zabraňuje** přirozenému **rozkladu**
- *Cladosporium spp.* **není schopen** efektivně rozkládat aminopyralid z tekutého média, se zvyšující koncentrací však jeho schopnost klesá. Efektivní **rozklad byl sledán** pouze u koncentrace **100 ppm**.
- *Geotrichum spp.* **není schopen** rozkládat aminopyralid z tekutého média v in vitro experimentu. Naměřená data měla velký rozptyl.

Vzhledem k tomu, že používání herbicidů se se vzrůstající potřebou produkovat dostatek kvalitních potravin nedá zabránit, je téma degradace a odstraňování reziduí herbicidů čím dál častějším tématem mnoha studií po celém světě. Při sepsání této práce byly navrženy další předměty k budoucímu zkoumání.

8 Literatura

- Abdourahime H, et al. 2019. Modification of the existing maximum residue levels for aminopyralid in certain cereals. *EFSA Journal* **17**.
- Ahrazem O, Prieto A, Leal JA, Jiménez-Barbero J, Bernabé M. 2002. Fungal cell-wall galactomannans isolated from *Geotrichum* spp. and their teleomorphs, *Dipodascus* and *Galactomyces*. *Carbohydrate Research* **337**:2347-2351.
- Allwood JW, Goodacre R. 2010. An introduction to liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochemical Analysis* **21**:33-47.
- Anastassiadou M, et al. 2020. Review of the existing maximum residue levels for pyroxsulam according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA Journal* **18**.
- Ardrey RE 2003. *Liquid Chromatography*, Wiley Online Library.
- Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O, ECMM EEsga. 2014. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clinical Microbiology and Infection* **20**:76-98.
- Birilli WG, de A. Santos D, Alvarenga N, Garcia ACFS, Romão LPC, Porto ALM. 2018. Biodegradation of anthracene and several PAHs by the marine-derived fungus *Cladosporium* sp. CBMAI 1237. *Marine Pollution Bulletin* **129**:525-533.
- Chaimbault P. 2014. Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products. Page 482. Springer, Dordrecht.
- Cserháti T, Forgács E, Deyl Z, Miksik I, Eckhardt A. 2004. Chromatographic determination of herbicide residues in various matrices. *Biomedical Chromatography* **18**:350-359.
- Dow AgroSciences s. 2018. Bepečnostní list - Mustang forte, Available from https://www.agromanual.cz/download/pdf_bezpecnost/bl_mustang_forte.pdf.
- Dragicevic TL, Hren MZ, Gmajnic M, Pelko S, Kungulovski D, Kungulovski I, Cvek D, Frece J, Markov K, Delas F. 2010. Biodegradation of olive mill wastewater by *Trichosporon cutaneum* and *Geotrichum candidum*. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **61**:399.
- Epp JB, et al. 2016. The discovery of Arylex™ active and Rinskor™ active: Two novel auxin herbicides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **24**:362-371.
- European Food Safety Authority. 2013. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance aminopyralid. *EFSA Journal* **11**:3352.
- Faktor J, Struhárová I, Fučíková A, Hubálek M, Vojtěšek B, Bouchal P. 2011. Kvantifikace proteinových bio markerů pomocí hmotnostní spektrometrie pracující v režimu monitorování vybraných reakcí. *Chemické listy* **105**:846-850.
- Famiglini G, Palma P, Termopoli V, Cappiello A. 2021. The history of electron ionization in LC-MS, from the early days to modern technologies: A review. *Analytica Chimica Acta* **1167**:338350.
- Fan C, Yang J, Liang Y, Dong H, Zhang W, Tang G, Cao Y. 2019. Effective tuning guanidinium ionic liquid as greener solvent for fast and sensitive determination of auxin herbicides. *Microchemical Journal* **144**:73-82.
- Fast BJ, Ferrell JA, Macdonald GE, Sellers BA, Macrae AW, Krutz LJ, Kline WN. 2011. Aminopyralid soil residues affect rotational vegetable crops in Florida. *Pest Management Science* **67**:825-830.
- Figueredo LA, Cafarchia C, Otranto D. 2011. *Geotrichum candidum* as etiological agent of horse dermatomycosis. *Veterinary Microbiology* **148**:368-371.

- Follak S, Hurle K. 2004. Recovery of non-target plants affected by airborne bromoxynil-octanoate and metribuzin. *Weed Research* **44**:142-147.
- Forouzesh A, Zand E, Soufizadeh S, Samadi Foroushani S. 2015. Classification of herbicides according to chemical family for weed resistance management strategies - an update. *Weed Research* **55**:334-358.
- Friedecký D, Lemr K. 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* **20**:152-157.
- Guo W, Bian Z, Zhang D, Tang G, Liu W, Wang J, Li Z, Yang F. 2015. Simultaneous determination of herbicide residues in tobacco using ultraperformance convergence chromatography coupled with solid-phase extraction. *Journal of Separation Science* **38**:858-863.
- Harvey DJ. 2019. Mass Spectrometry | Ionization Methods Overview☆. Pages 398-410 in Worsfold P, Poole C, Townshend A, and Miró M, editors. *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*. Academic Press, Oxford.
- He Y, Tan S, Abd Ei-Aty AM, Hacımuftüoğlu A, She Y. 2019. Magnetic molecularly imprinted polymers for the detection of aminopyralid in milk using dispersive solid-phase extraction. *RSC Advances* **9**:29998-30006.
- Hrynko I, Kaczyński P, Łozowicka B. 2021. A global study of pesticides in bees: QuEChERS as a sample preparation methodology for their analysis – Critical review and perspective. *Science of The Total Environment* **792**:148385.
- Izcara S, Casado N, Morante-Zarcero S, Pérez-Quintanilla D, Sierra I. 2022. Miniaturized and modified QuEChERS method with mesostructured silica as clean-up sorbent for pyrrolizidine alkaloids determination in aromatic herbs. *Food Chemistry* **380**:132189.
- Jackson LW, Pryor BM. 2017. Degradation of aflatoxin B1 from naturally contaminated maize using the edible fungus *Pleurotus ostreatus*. *AMB Express* **7**.
- Jacques N, Mallet S, Laaghouti F, Tinsley CR, Casaregola S. 2017. Specific populations of the yeast *Geotrichum candidum* revealed by molecular typing. *Yeast* **34**:165-178.
- Jakovljević VD, Vrvic MM. 2018. Potential of pure and mixed cultures of *Cladosporium cladosporioides* and *Geotrichum candidum* for application in bioremediation and detergent industry. *Saudi Journal of Biological Sciences* **25**:529-536.
- Jin Z, Hou Q, Niu T. 2020. Effect of cultivating *Pleurotus ostreatus* on substrates supplemented with herb residues on yield characteristics, substrates degradation, and fruiting bodies' properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **100**:4901-4910.
- Johnson PL, Pearson NR, Schuster B, Cobb J. 2009. Synthesis of stable isotopes of auxinic herbicides 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid and 4-amino-3,6-dichloropicolinic acid. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* **52**:382-386.
- Kaur R, Das TK, Banerjee T, Raj R, Singh R, Sen S. 2020. Impacts of sequential herbicides and residue mulching on weeds and productivity and profitability of vegetable pea in North-western Indo-Gangetic Plains. *Scientia Horticulturae* **270**:109456.
- Kelley KB, Riechers DE. 2007. Recent developments in auxin biology and new opportunities for auxinic herbicide research. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **89**:1-11.
- Koesukwiwat U, Lehotay SJ, Mastovska K, Dorweiler KJ, Leepipatpiboon N. 2010. Extension of the QuEChERS method for pesticide residues in cereals to flaxseeds, peanuts, and doughs. *Journal of agricultural and food chemistry* **58**:5950-5958.

- Kumar M, Yadav AN, Saxena R, Paul D, Tomar RS. 2021. Biodiversity of pesticides degrading microbial communities and their environmental impact. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **31**:101883.
- Lacroix C, Feuilhade de Chauvin M. 2005. Infections dues à *Trichosporon* spp. et à *Geotrichum* spp. *EMC - Maladies Infectieuses* **2**:97-104.
- Li C, Chen Z, Qin D, Liu R, Li L, Li W, He Y, Yuan L. 2021. Simultaneous determination of the herbicide bixlozone and its metabolites in plant and animal samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **44**:822-832.
- Li W, Mao J, Dai X, Zhao X, Qiao C, Zhang X, Pu E. 2018. Residue determination of triclopyr and aminopyralid in pastures and soil by gas chromatography-electron capture detector: Dissipation pattern under open field conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **155**:17-25.
- Liu Y, Ma H, Huang J, Li Z, Pan Y, Du Y. 2019. Carbonaceous nanomaterials stimulate extracellular enzyme release by the fungus *Cladosporium* sp. and enhance extracellular electron transfer to facilitate lignin biodegradation. *Science of The Total Environment* **696**:134072.
- Lu H, Yu Q, Han H, Owen MJ, Powles SB. 2020. Evolution of resistance to HPPD-inhibiting herbicides in a wild radish population via enhanced herbicide metabolism. *Pest Management Science* **76**:1929-1937.
- Malla MA, Dubey A, Raj A, Kumar A, Upadhyay N, Yadav S. 2022. Emerging frontiers in microbe-mediated pesticide remediation: Unveiling role of omics and In silico approaches in engineered environment. *Environmental Pollution* **299**:118851.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 213012, Aminopyralid, Available from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Aminopyralid>. (accessed April 3 2022).
- Pan L, Guo Q, Wang J, Shi L, Yang X, Zhou Y, Yu Q, Bai L. 2022. CYP81A68 confers metabolic resistance to ALS and ACCase-inhibiting herbicides and its epigenetic regulation in *Echinochloa crus-galli*. *Journal of Hazardous Materials* **428**:128225.
- Panneerselvam P, Saha S, Senapati A, Nayak AK, Kumar U, Mitra D. 2021. New generation post-emergence herbicides and their impact on arbuscular mycorrhizae fungal association in rice. *Current Research in Microbial Sciences* **2**:100067.
- Papazlatani CV, Kolovou M, Gkounou EE, Azis K, Mavriou Z, Testembasis S, Karaoglanidis GS, Ntougias S, Karpouzas DG. 2022. Isolation, characterization and industrial application of a *Cladosporium herbarum* fungal strain able to degrade the fungicide imazalil. *Environmental Pollution* **301**:119030.
- Pfleeger T, Blakeley-Smith M, Lee EH, King G, Plocher M, Olszyk D. 2014. Effects of single and multiple applications of glyphosate or aminopyralid on simple constructed plant communities. *Environmental Toxicology and Chemistry* **33**:2368-2378.
- Picornell-Buendía MR, Pardo-Giménez A, De Juan-Valero JA. 2016. Agronomic Qualitative Viability of Spent *Pleurotus* Substrate and its Mixture with Wheat Bran and a Commercial Supplement. *Journal of Food Quality* **39**:533-544.
- Pihlström T, Fernández-Alba AR, Gamón M, Poulsen ME, Lippold R, Anastassiades M, Reynolds S, de Kok A, Stajnbaher D, Oregan F. 2017. Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues and Analysis in Food and Feed. *SANTE* **11813**:21-22.

- Pileggi M, Pileggi SAV, Sadowsky MJ. 2020. Herbicide bioremediation: from strains to bacterial communities. *Heliyon* **6**:e05767.
- Pitt JJ. 2009. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist. Reviews* **30**:19-34.
- Ramos SE, Rzodkiewicz LD, Turcotte MM, Ashman T-L. 2021. Damage and recovery from drift of synthetic-auxin herbicide dicamba depends on concentration and varies among floral, vegetative, and lifetime traits in rapid cycling *Brassica rapa*. *Science of The Total Environment* **801**:149732.
- Rinella MJ, Bellows SE, Davy JS, Forero LC, Hatler WL, James JJ. 2021. Pasture-Scale Evaluation of Postemergence Applications of Aminopyralid for Controlling Medusahead (*Taeniatherum caput-medusae*). *Rangeland Ecology & Management* **79**:201-207.
- Schubert K, Groenewald JZ, Braun U, Dijksterhuis J, Starink M, Hill CF, Zalar P, De Hoog GS, Crous PW. 2007. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology* **58**:105-156.
- Stanganelli I, et al. 2020. The association between pesticide use and cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **34**:691-708.
- Sulaiman U, Shah F, Khan RA. 2022. QuEChERS sample preparation integrated to dispersive liquid-liquid microextraction based on solidified floating organic droplet for spectrometric determination of sudan dyes: A synergistic approach. *Food and Chemical Toxicology* **159**:112742.
- Székács A. 2021. 3 - Herbicide mode of action. Pages 41-86 in Mesnage R, and Zaller JG, editors. *Herbicides*. Elsevier.
- Todd OE, Figueiredo MRA, Morran S, Soni N, Preston C, Kubeš MF, Napier R, Gaines TA. 2020. Synthetic auxin herbicides: finding the lock and key to weed resistance. *Plant Science* **300**:110631.
- Townsend R, Keulen G, Desbrow C, Godfrey AR. 2020. An investigation of the utility of QuEChERS for extracting acid, base, neutral and amphiphilic species from example environmental and clinical matrices. *Analytical Science Advances* **1**:152-160.
- Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, Hoshi Y, Tomioka Y, Ohtsuki S, Terasaki T. 2013. A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood–brain barrier in ddY, FVB, and. *Fluids and Barriers of the CNS* **10**:21.
- Vijaykumar MH, Veeranagouda Y, Neelakanteshwar K, Karegoudar TB. 2006. Decolorization of 1:2 metal complex dye Acid blue 193 by a newly isolated fungus, *Cladosporium cladosporioides*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **22**:157-162.
- Wagner V, Nelson CR. 2014. Herbicides Can Negatively Affect Seed Performance in Native Plants. *Restoration Ecology* **22**:288-291.
- Walsh T, Schmitzer PR, Mistři R, Le W, Gast R, Claus J, Finkelstein B. 2012. New Auxin Mimics and Herbicides. Pages 277-304, *Modern Crop Protection Compounds*.
- Wan Mahari WA, et al. 2020. A review on valorization of oyster mushroom and waste generated in the mushroom cultivation industry. *Journal of Hazardous Materials* **400**:123156.

- Wang M, Wang J, Wang K, Zhang L, Cao X, Guo C, Wang J, Wu B. 2022. Magnetic mesoporous material derived from MIL-88B modified by l-alanine as modified QuEChERS adsorbent for the determination of 6 pesticide residues in 4 vegetables by UPLC-MS/MS. *Food Chemistry* **384**:132325.
- Wang Y, Zeng F, Hon CC, Zhang Y, Leung FCC. 2008. The mitochondrial genome of the Basidiomycete fungus *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *FEMS Microbiology Letters* **280**:34-41.
- Yang X, Cao X, Zhang L, Wu Y, Zhou L, Xiu G, Ferronato C, Chovelon J-M. 2021. Sulfate radical-based oxidation of the aminopyralid and picloram herbicides: The role of amino group on pyridine ring. *Journal of Hazardous Materials* **405**:124181.
- Zhang Y, Lorsbach BA, Castetter S, Lambert WT, Kister J, Wang NX, Klittich CJR, Roth J, Sparks TC, Loso MR. 2018. Physicochemical property guidelines for modern agrochemicals. *Pest Management Science* **74**:1979-1991.
- Zheng Y, Zhang D, Sun Z, Yang Q, Liu Y, Cao T, Chen R, Dzakpasu M, Wang XC. 2022. Stereoselective degradation pathway of amide chiral herbicides and its impacts on plant and bacterial communities in integrated vertical flow constructed wetlands. *Bioresource Technology* **351**:126997.
- Łozowicka B, Wołejko E, Kaczyński P, Konecki R, Iwaniuk P, Drągowski W, Łozowicki J, Tujtebajeva G, Wydro U, Jabłońska-Trypuć A. 2021. Effect of microorganism on behaviour of two commonly used herbicides in wheat/soil system. *Applied Soil Ecology* **162**:103879.

9 Samostatné přílohy

Duncanův test; proměnná 100 ppm Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 249,22, sv = 10,000					
Č. buňky	typ	100 ppm Průměr	a	c	b
4	<i>Cladosporium</i>	18,9333		****	
5	<i>Pleurotus</i>	56,1000	****		
1	Kontrola 1	61,4000	****		
2	Kontrola 2	67,9000	****		
3	<i>Geotrichum</i>	110,9333			****

Obrázek č. 10- - Duncanův test homogenních skupin pro AP 100 ppm

Duncanův test; proměnná 200 ppm Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 642,21, sv = 10,000				
Č. buňky	typ	200 ppm Průměr	a	b
4	<i>Cladosporium</i>	59,6000		****
2	Kontrola 2	63,2000		****
3	<i>Geotrichum</i>	110,7667	****	
1	Kontrola 1	129,0000	****	
5	<i>Pleurotus</i>	129,3333	****	

Obrázek č. 11 - Duncanův test homogenních skupin pro AP 200 ppm

Duncanův test; proměnná 300 ppm Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 1873,5, sv = 10,000				
Č. buňky	typ	300 ppm Průměr	a	b
4	<i>Cladosporium</i>	60,4667		****
2	Kontrola 2	101,0000		****
5	<i>Pleurotus</i>	186,3333	****	
1	Kontrola 1	218,0000	****	
3	<i>Geotrichum</i>	243,6667	****	

Obrázek č. 12 - Duncanův test homogenních skupin pro AP 300 ppm

Duncanův test; proměnná 400 ppm Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 1908,0, sv = 10,000				
Č. buňky	typ	400 ppm Průměr	b	a
3	<i>Geotrichum</i>	96,5000	****	
2	Kontrola 2	140,0000	****	
4	<i>Cladosporium</i>	154,3333	****	
5	<i>Pleurotus</i>	259,6667		****
1	Kontrola 1	270,0000		****

Obrázek č. 13 - Duncanův test homogenních skupin pro AP 400 ppm

Duncanův test; proměnná 500 ppm Homogenní skupiny, alfa = ,05000 Chyba: meziskup. PČ = 3232,4, sv = 10,000					
Č. buňky	typ	500 ppm Průměr	c	b	a
4	<i>Cladosporium</i>	182,6667	****		
2	Kontrola 2	209,0000	****	****	
3	<i>Geotrichum</i>	222,3333	****	****	****
1	Kontrola 1	302,0000		****	****
5	<i>Pleurotus</i>	325,3333			****

Obrázek č. 14 - Duncanův test homogenních skupin pro AP 500 ppm