

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2024

Sára Lukášová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Evoluce cyanotoxinů u sinice *Microcoleus*

Bakalářská práce

Sára Lukášová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: doc. Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Sára LUKÁŠOVÁ**
Osobní číslo: **R20707**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Evoluce cyanotoxinů u sinice *Microcoleus***
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

Sinice produkují velké množství sekundárních metabolitů a mnoho z nich je prudce toxických. S produkcí toxinů jsou nejčastěji spojovány planktonní sinice. V posledních letech se ovšem stále častěji objevují příklady produkce toxinů také u nárostových sinic. V rámci této bakalářské práce budu zpracovávat celkem 200 genomů sinic *Microcoleus* a budu v nich identifikovat geny a genové klastry zodpovědné za produkci toxinu. Použiji k tomu analýzy *in silico* jako například program AntiSMASH. V dalším kroku pak zrekonstruji fylogenezi v rámci rodu *Microcoleus*, kde nyní rozeznáváme nejméně 40 druhů. Pomocí metod rekonstrukce ancestrálních stavů pak budu testovat, ve kterých druzích se produkce toxinů objevuje a také zda k získání této vlastnosti došlo jednou nebo vícekrát.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Dvořák, P., Hašler, P. & Pouličková, A. (2012). Phylogeography of the *Microcoleus vaginatus* (cyanobacteria) from three continents – a spatial and temporal characterization. *PLoS ONE* 7: e40153.

Dvořák, P., Pouličková, A., Hašler, P., Belli, M., Casamatta, D.A. & Papini, A. (2015b). Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. *Biodiversity and Conservation*, 24: 739-757.

Dvořák, P., Casamatta, D.A., Hašler, P., Jahodářová, E., Norwich, A.R. & Pouličková, A. 2017a. Diversity of the Cyanobacteria. In *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes*. Springer, Cham., pp. 3-46.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.**
Katedra botaniky

Datum zadání bakalářské práce: 28. března 2022
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 30. března 2022

Bibliografické údaje:

Jméno a příjmení autora:	Sára Lukášová
Název práce:	Evoluce cyanotoxinů u sinice <i>Microcoleus</i>
Typ práce:	bakalářská
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2024
Klíčová slova:	sinice, <i>Microcoleus</i> , anatoxin-a
Počet stran:	34
Počet příloh:	1
Jazyk:	Český

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá evolucí genů kódujících produkci sekundárních metabolitů sinic rodu *Microcoleus*. Teoretická část je zaměřena na popis sinic, jejich morfologii a taxonomii. Dále jsou popisovány sekundární metabolity z pohledu syntézy, působení na životní prostředí a člověka a jejich detekce. Praktická část je zaměřena na zjištění přítomnosti jednotlivých toxických i netoxických sekundárních metabolitů v rámci 202 kmenů sinice rodu *Microcoleus*. Dále se zaměřuje na studium transferu genů a genových klastrů daných sekundárních metabolitů a studium fylogeneze sinice rodu *Microcoleus* v závislosti na schopnosti produkovat anatoxin-a.

Bibliographical identification:

Author s name and surname:	Sára Lukášová
Title:	Evolution of cyanotoxins in cyanobacterium <i>Microcoleus</i>
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc
Supervisor:	doc. Mgr. Petr Dvořák, Ph.D.
The year of presentation:	2024
Key words:	cyanobacteria, <i>Microcoleus</i> , anatoxin-a
Number of pages:	34
Number of appendices:	1
Language:	Czech

SUMMARY

This bachelor's thesis deals with the evolution of genes encoding the production of secondary metabolites of cyanobacteria of the genus *Microcoleus*. The theoretical part is focused on the description of cyanobacteria, their morphology and taxonomy. Furthermore, secondary metabolites are described from the point of view of synthesis, effects on the environment and humans, and their detection. The practical part is focused on the detection of the presence of individual toxic and non-toxic secondary metabolites within 202 strains of cyanobacteria of the genus *Microcoleus*. It also focuses on the study of gene transfer and gene clusters of given secondary metabolites and the study of the phylogeny of the cyanobacteria *Microcoleus* depending on the ability to produce anatoxin-a.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Evoluce cyanotoxinů u sinice *Microcoleus* vypracovala samostatně s pomocí vedoucího práce a uvedla jsem všechny prameny, které jsem použila.

V Olomouci dne

.....

Lukášová Sára

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce doc. Mgr. Petru Dvořákovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, užitečné rady a také trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Grantové agentuře České republiky za podporu tohoto projektu.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	3
3.1	Buněčné uspořádání a genom sinic	3
3.2	Morfologie a taxonomie.....	4
3.3	<i>Microcoleus</i>	6
3.4	Sekundární metabolity	7
3.5	Geosmin	9
3.6	Cyanotoxiny	10
3.6.1	Saxitoxiny a mikrocystiny	11
3.6.2	Anatoxin-a	11
3.6.3	Další potenciálně toxické metabolity	13
3.6.4	Metody analýzy cyanotoxinů	14
4	MATERIÁL A METODY	16
4.1	Biologický materiál	16
4.2	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	16
4.2.1	Sekvenace genomů.....	16
4.2.2	Fylogenetická analýza.....	17
4.2.3	AntiSMASH analýza.....	17
4.2.4	Analýza toxinů ve vybraných kmenech.....	17
5	VÝSLEDKY	18
6	DISKUZE	24
7	ZÁVĚR	26
8	LITERATURA.....	27
9	PŘÍLOHY	35

SEZNAM ZKRATEK

ACP	acyl carrier protein
AChE	acetylcholinesterázu
AP	anabaenopeptins
ATX	anatoxin-a
C	cytosin
CPA	karboxypeptidáza A
CYP	cyanopeptolines
dhATX	dihydroanatoxin
G	guanin
HATX	homoanatoxin
HGT	horizontální genový transfer
ITS	internal transcribed spacer
Mbp	mega-base pairs
nAChR	nikotin acetylcholinový receptor
NRPs	non-ribosomal peptides
PCP	peptide carrier protein
PKS	polyketide syntáza
rRNA	ribozomální RNA

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Fylogenetický strom 202 kmenů rodu *Microcoleus* a přítomnost cyanotoxinů a geosminu u jednotlivých kmenů zrekonstruovaný na základě aminokyselinových sekvencí pomocí analýzy maximální věrohodnosti

Obrázek č. 2: Fylogenetický strom 43 kmenů rodu *Microcoleus*, u kterých je přítomen gen pro geosmin zrekonstruovaný na základě aminokyselinových sekvencí pomocí analýzy maximální věrohodnosti

Obrázek č. 3: Fylogenetický strom 202 kmenů rodu *Microcoleus* rozdělený na 13 monofyletických linií dle Skoupý *et al.* (2024) zrekonstruovaný na základě aminokyselinových sekvencí pomocí analýzy maximální věrohodnosti

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Seznam analyzovaných kmenů, jejich databázové číslo, výskyt ve světě a naleziště

Tabulka č. 2: Koncentrace anatoxinu-a, dihydroanatoxinu-a a homoanatoxinu-a změřené pomocí LC/MSMS

Tabulka č. 3: Výskyt genů pro jednotlivé sekundární metabolity u druhů *Microcoleus*.

1 ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá sekundárními metabolity sinic, zejména těmi toxickými. Nejčastěji v červnu a červenci tvoří sinice tzv. vodní květ, zelenou vrstvu na hladině vody, která je bohatá na sekundární metabolity, a právě i na cyanotoxiny. S produkcí cyanotoxinů jsou nejčastěji spojeny planktonní sinice, avšak v posledních letech se objevují příklady produkce toxinů také u půdních a nárostových sinic, jako je právě *Microcoleus*.

Anatoxin-a je akutně toxický cyanotoxin, spojovaný s úmrtími zvířat. Zejména psů, dobytka a ptáků v různých státech po celém světě. Kromě zvířat ohrožuje anatoxin-a i lidské zdraví. Je to neurotoxin, který se nevratně váže na nikotin-acetylcholinový receptor a způsobuje zvýšenou stimulaci svalů, což vede ke křečím, cyanóze a paralýze dýchacích svalů.

Rekonstrukce fylogeneze a prezenze či absence genů pro jednotlivé sekundární metabolity v jednotlivých druzích nám pomůže testovat evoluční historii těchto genů. Určit, kdy se v evoluci objevily, a jestli došlo k jejich horizontálnímu přenosu.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je identifikovat geny a genové klastry zodpovědné za produkci toxinu u sinice rodu *Microcoleus*. Následně rekonstruovat fylogenetické vztahy a popsat, zda se geny zodpovědné za tvorbu toxinu vyvinuly jen jednou nebo zda se vyvinuly několikrát a zda si geny pro tvorbu jednotlivých metabolitů předávaly anebo se ztratily. Posledním cílem je zjištění potenciálu produkovat toxiny u jednotlivých druhů a kmenů sinice rodu *Microcoleus*.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Buněčné uspořádání a genom sinic

Sinice jsou starobylé gramnegativní bakterie se schopností oxygenní fotosyntézy. Díky této schopnosti produkovaly sinice dostatečné množství kyslíku pro vývoj aerobních forem života. Jsou důležitou součástí koloběhu dusíku v přírodě, jelikož jsou významnými fixátory dusíku (Dvořák *et al.*, 2017). Díky jejich vlastnosti fixovat dusík a uhlík žijí často v symbiotickém vztahu s eukaryotními organismy. Představují rozmanitou skupinu žijící na mnoha různých stanovištích od sladké a slané vody až po poušť (Mazel *et al.*, 1990).

Sinice mohou být vláknité, koloniální či jednobuněčné se zbarvením zelené, šedé, nažloutlé, hnědozelené nebo tmavě hnědé. Jejich zelené zbarvení je dáno obsahem chlorofylu-*a*, nacházejícím se v tylakoidech. V tylakoidech jsou obsaženy také doplňkové pigmenty jako fykocyanin a fykoerythrin, díky kterým mají sinice různorodé barvy. Jejich buněčná stěna je stejně jako u gramnegativních bakterií tvořena peptidoglykanem mureinem. Nemají jádérko, mitochondrie, Golgiho aparát, endoplasmatické retikulum a vakuoly. Genetická informace sinic je uložena jedním kruhovým chromozomem v centru protoplastu (Hindák, 2008). Velikost genomu sinic je rozmanitá a pohybuje se od 1,5 do 15 Mbp. Stejně tak je rozmanitý i poměr bází GC, který je od 30 % do 68 % (Gugger *et al.*, 2023).

Sinice se rozmnožují nepohlavně, tzv binárním dělením. Tato asexuální reprodukce zahrnuje centripetální dělení, tedy zaškrcování od okraje ke středu (Hindák, 2008). Kromě převažujícího binárního dělení, kterým se rozmnožují kokální sinice se můžeme u vláknitých sinic setkat s rozmnožováním pomocí hormogonií. Hormogonie jsou krátká pohyblivá vlákna, která se mohou přemisťovat na krátké vzdálenosti (Rippka *et al.*, 1979).

U eukaryotických organismů probíhá rekombinace v rámci pohlavního rozmnožování, díky které jsou hranice mezi jednotlivými druhy definovány. Jak již bylo zmíněno, sinice se rozmnožují výhradně nepohlavně, tzv binárním dělením, a tak by se dalo předpokládat, že se bude jejich genetická variabilita průběžně snižovat, avšak díky četnému horizontálnímu transferu genů dochází k vyšší morfologické, genetické a fyziologické variabilitě, než se původně očekávalo (Barraclough *et al.*, 2012).

Za genovou variabilitu prokaryot je zodpovědný horizontální genový transfer (HGT). Cizorodá DNA musí nejprve projít přes membránu recipientní buňky, a to pomocí tří základních mechanismů, které jsou transdukce, konjugace a transformace (podrobně popsáno

v Dubnau, 1999). Jakmile je cizorodá DNA v buňce, dojde pomocí rekombinace k jejímu začlenění do genomu (Arnold *et al.*, 2022). HGT také hraje důležitou roli ve speciaci prokaryot. Nejčastěji k němu dochází v heterogenních oblastech, které se také nazývají genomické ostrovy a je častější mezi blízkými liniemi. S vyššími genetickými a geografickými rozdíly četnost HGT klesá. Homologní rekombinace, díky které se cizorodá DNA začleňuje do genomu vede ke vzniku polymorfismů, které mohou být v populaci fixovány selekcí nebo genetickým driftem (Dvořák *et al.*, 2023).

3.2 Morfologie a taxonomie

Přestože se jedná o organismy s velkou fenotypovou plasticitou, tak v porovnání s eukaryotickými řasami sinice vykazují nevelkou morfologickou variabilitu (Willis *et Woodhouse*, 2020). Oproti jiným prokaryotům však vykazují poměrně velký stupeň morfologické variability (Dvořák *et al.*, 2017).

Hlavní morfologické znaky sinic, mezi které patří velikost buněk, barva, tvar, typ větvení a obsah buňky podrobně popsali Komárek a Anagnostidis (2008). Sinice mohou být jednobuněčné, koloniální nebo vláknité. V rámci kolonií jednobuněčných sinic se počet buněk pohybuje od dvou do několika tisíc v jedné kolonii, přičemž jejich distribuce může být pravidelná nebo nepravidelná. U vláknitých sinic rozlišujeme dva typy větvení – pravé a nepravé (Dvořák *et al.*, 2017). Uspořádání thylakoidů v buňce může být radiální, parietální nebo nepravidelné a jejich poloha i uspořádání byly dříve klíčové pro taxonomii, avšak Mareš *et al.* (2019) studovali evoluční vzorce thylakoidů u sinic a zjistili, že uspořádání thylakoidů není dostatečně stabilní a je zatížené konvergencí, a tak nemůže být využito jako taxonomický znak oddělující řády ani další taxonomické jednotky.

V rámci morfologie vláknitých sinic se setkáváme s dvěma typy specializovaných buněk. První specializovanou buňkou je akineta. Jedná se o tlustostěnnou buňku až 10x větší, než je buňka vegetativní zvyšující odolnost sinice v nepříznivých podmínkách (Adams *et Duggan*, 1999). Schopnost akinety přežít chlad a vysychání je mnohem vyšší než u vegetativních buněk. Metabolické aktivity vegetativní buňky, jako je fixace dusíku a oxidu uhličitého, je v akinetě velmi nízká, v některých případech i žádná. Naproti tomu respirace je v akinetě zvýšená a se stářím se snižuje (shrnuto v Willis *et Woodhouse*, 2020). Faktorů zodpovědných za tvorbu akinety je více. Hlavním faktorem je nedostatek světla, nízká teplota, zvýšená

koncentrace síranů nebo nedostatek živin, například fosfátu (Wolk 1965, Adams *et* Duggan, 1999).

Druhým typem specializovaných buněk jsou heterocyty. Ty vytváří prostředí bez kyslíku, které je vhodné pro fixaci dusíku (Willis *et* Woodhouse, 2020). Sinice, které jsou schopny tvořit heterocyty, exprimují geny pro jejich vývoj pouze za podmínek, kdy dochází k omezení vhodného zdroje dusíku (Adams *et* Duggan, 1999). Za těchto podmínek se začnou například u druhů *Anabaena* a *Nostoc* po 6 až 12 hodinách tvořit proheterocyty, které jsou viditelné pod mikroskopem. Po 12 až 20 hodinách heterocyty dozrávají (gü, 2000).

V rámci taxonomie je přesné definování jednotlivých druhů sinic dlouhodobým problémem. Původně se druhy sinic charakterizovaly podle morfologie, fyziologie a ekologie, ale posledních 20 let se využívají i genetické metody. Díky velkému množství molekulárních dat se ukazuje, že popis druhu na základě morfologie je nespolehlivý, jelikož neodráží evoluční vztahy. Kombinovat ekofyziologii, morfologii a molekulární data pro soudržnou taxonomii je složité a vyžaduje další práci (Willis *et* Woodhouse, 2020).

Pro fylogenetické vztahy mezi sinicemi je důležité sekvenování DNA. Jako univerzální molekulární marker pro všechny bakterie se používá ribozomální RNA, konkrétně malá podjednotka 16S rRNA. Výhodou využití těchto genů je odolnost vůči horizontálnímu genovému transferu a evoluční neutralita (Gürtler *et* Stanisich, 1996). Pomocí fylogenetických analýz využívající ribozomální RNA byly objasněny některé taxonomické seskupení, avšak někteří výzkumníci považují ribozomální RNA nedostačující pro řešení evolučních vztahů (Skoupý *et al.* 2024, Stanojković *et al.* 2024). Zatím není jasné, zda seskupování organismů pomocí fylogenetiky poskytuje více informací o ekologii, fyziologii či zdravotním riziku (Willis *et* Woodhouse, 2020).

Na základě buněčné diferenciace, zahrnující specializované buňky jako jsou akinety a heterocyty, a buněčné komplexnosti, která se pohybuje od jednobuněčných vláken až po složitě větvená vlákna, jsou sinice rozděleny do 5 hlavních řádů, které jsou velmi užitečné pro snadnou identifikaci druhů za použití světelného mikroskopu (Rippka *et al.*, 1979). Jednobuněčné sinice jsou rozděleny na řády Chroococcales a Pleurocapsales. Chroococcales jsou jednobuněčné koky rozmnožující se pouze binárním dělením a Pleurocapsales jsou jednobuněčné koky rozmnožující se binárním a vícenásobným dělením. Do zbylých 3 řádů jsou rozděleny vláknité sinice, a to konkrétně na Oscillatoriales, jejichž vlákna jsou tvořena pouze vegetativními buňkami. Dále Nostocales, jejichž filamenta obsahují heterocysty

i akinety a nakonec Stigonematales, jejichž hlavním rozdílem od ostatních řádů je pravé větvení (Rippka *et al.*, 1979; Kultschar *et Llevellyn*, 2018; Moya *et al.*, 2020; Willis *et Woodhouse*, 2020).

3.3 *Microcoleus*

Jedná se o polyfyletický rod (Boyer *et al.*, 2002) sinic popsán roku 1892 M. Gomontem. Je jednou z dominantních sinic vyskytujících se v půdních krustách, avšak mnoho kmenů bylo nalezeno mimo jiné i v loužích, na skalách a betonu. Kromě společenství sinic se v krustách vyskytují i mechy, lišejníky, bakterie, zelené řasy a houby. Tyto půdní krusty mohou pokrývat až 40 % zemského povrchu. Přítomnost *Microcoleus vaginatus* v půdních krustách má za následek stabilizaci půdy a zadržování vlhkosti, díky jejich vláknům, a především slizovitým obalům (Belnap, 2001).

Morfologicky se *M. vaginatus* velmi podobá *Ph. autumnale*. Je velmi těžké je rozeznat kvůli stejné velikosti buněk či přítomnosti zužující se kalyptry ve zralých trichomech. Typické morfologické znaky pro *M. vaginatus*, díky kterým je lze odlišit od *Ph. autumnale* je přítomnost fascikulárních vláken, přítomnost granulí na příčných stěnách a širší trichomy (Hašler *et al.*, 2012).

Microcoleus vaginatus je většinou stále považován za jediný druh v ekologických studiích a studiích diverzity. Stajnoković *et al.* však v roce 2024 rozeznali na základě fylogenetické analýzy s využitím 16S rRNA a 16S-23S ITS genů 13 monofyletických linií (M1-M13) v rámci rodu *Microcoleus*. Předpokládá se, že diverzifikace těchto druhů začala před 29,6 miliony let. Rozdíly v jednotlivých liniích jsou zapříčiněny selekcí, prostředím a geografickou vzdáleností. Jednotlivé linie se lišily v počtu kmenů, které obsahovaly, přičemž nejrozmanitější linie (M5) obsahovala 81 kmenů a nejméně rozmanitá pouze jeden kmen. Většina kmenů se shlukovala podle preference stanoviště a rekonstrukcí stanovišť předků bylo zjištěno, že předchůdci linií pocházeli pravděpodobně z půdy. Co se týče výskytu, vzdáleně příbuzné linie se vyskytovaly společně, a naopak se příbuznější linie vyskytovaly od sebe dál.

Stajnoković *et al.* (2024) zjistili srovnáním 201 genomů rodu *Microcoleus*, že tento rod představuje globální kontinuum druhů. M1, M2, M3, M11 a M12 mohou být považovány za různé druhy, dle biologického konceptu druhů, jelikož mají různé evoluční trajektorie. Tyto výše uvedené kmeny mají dle UPCEL (umožňuje vymezení v jakékoli fázi speciace pomocí

pravděpodobnosti divergence) (Kollár *et al.*, 2022) více než 93% pravděpodobnost, že se stanou samostatnými oddělenými druhy. M4, M9 a M10 jsou dle UPCEL v tzv. šedé zóně, jelikož jejich procentuální pravděpodobnost stát se oddělenými druhy je okolo 85%. M5, M6, M7 a M8 nemohou být zatím považovány za oddělené kmeny, jelikož jsou teprve v brzké části speciace a pravděpodobnost, že se stanou samostatnými kmeny je pouze okolo 73 %.

Skoupý *et al.* (2024) také srovnali 201 genomů rodu *Microcoleus* s dalšími 102 genomy získanými z NCBI databáze a 8 genomickými sekvencemi z herbária. Výsledkem fylogenetické analýzy těchto 303 genomů bylo sloučení linií M5, M6 a M7 v jednu linii a 6 nových monofyletických linií (M14-M21), mezi které patří například již popsány *M. anatoxicus*, *M. terrestris* nebo *Phormidium subscufum*.

Conklin *et al.*, (2020) izolovali 3 kmeny rodu *Microcoleus*, které byly odebrány z Russian River. Byla u nich zjištěna schopnost produkovat anatoxiny a tyto 3 kmeny byly popsány jako *Microcoleus anatoxicus*, nový druh rodu *Microcoleus* se schopností produkce anatoxinů.

V roce 2021 Tee *et al.* srovnali 42 genomů sinice rodu *Microcoleus*, z toho 12 toxických a 30 netoxických. Jednalo se zřejmě o *M. anatoxicus*, ačkoliv to nebylo specifikováno podle označení zkoumaných kmenů. Výsledky ukázaly, že toxické druhy měly ve srovnání s netoxickými druhy průměrně o 6,3 Mbp menší genom a o 44,5 % nižší koncentraci GC párů. Tyto rozdíly ve velikosti genomu mohou napomáhat ekologické adaptaci. Mezi velikostí genomu a frakcí/zlomkem paralogních genů nebyla nalezena souvislost. Dále bylo zjištěno, že toxické kmeny rodu *Microcoleus* mají na rozdíl od netoxických kmenů průměrně o 7,3 hodin delší minimální dobu replikace. Takto zkrácená doba replikace ukazuje na možný kompromis mezi růstem a produkcí toxinu.

3.4 Sekundární metabolity

Sekundární metabolity klasifikujeme jako látky přírodního původu, které se odlišují svou chemickou strukturou a jsou pro určité organismy specifické. Sekundární metabolity jsou produkovány organismy jen za určitých podmínek prostředí. Sinice produkují sekundární metabolity na základě biotického či abiotického stresu, aby jim byla poskytnuta ochrana nebo i výhoda v přežití vůči ostatním kmenům (Kultschar *et Llevellyn*, 2018).

Reakcí sinic na abiotický stres je změna fyziologie, molekulárního metabolismu a biochemie, aby snížily škodlivé účinky a zvýšily množství energie. Abiotické faktory jako kvalita světla,

teplotní stres, osmotický šok, oxidační stres či omezení živin může vést také ke změně morfologie sinic (Singh *et* Montgomery, 2011).

Z chemického hlediska se jedná nejčastěji o peptidy, polyketidy, alkaloidy a terpenoidy. Tyto látky fungují jako chemosenzory, ochrana proti predátorům a hrají například fotoprotekční a antioxidační roli a mimo jiné mají i antivirové a antibakteriální vlastnosti (Kultschar *et* Llevellyn, 2018).

Přítomnost vodního květu ve vodách je detegována více způsoby. Jedním z nich je měření koncentrace primárního fotosyntetického pigmentu chlorofylu a pomocí *in situ* senzorů v terénu nebo lze odebrat vzorky pro následnou laboratorní analýzu. Nedostatkem této detekce je nemožnost rozlišení množství sinic od množství řas ve vodním květu (Merel *et al.*, 2013). Optimalizací této metody je kromě chlorofylu-a měření také koncentrace fykocyaninu, specifického pigmentu sinic (Brient *et al.*, 2008).

Většina přirozeně se vyskytujících sekundárních metabolitů sinic je tvořena neribozomálními peptidy (NRPs), polyketidy nebo hybridními peptid-polyketidovými složkami (Wenzel *et* Muller, 2005; Simm *et al.*, 2017). Neribozomální peptidy jsou tvořeny sekvencí proteinogenních a neproteinogenních aminokyselin. Jsou syntetizovány multifunkčním enzymovým komplexem zvaným „nonribosomal peptide synthetase“ (NRPS). Tento komplex je složen z více podjednotek, které se podílejí na specifických enzymatických reakcích. Každá jednotka enzymu NRPS se skládá z adenylační domény, která je zodpovědná za výběr substrátu a aktivaci PCP (peptide carrier protein). PCP váže substrát k enzymatickému komplexu prostřednictvím thioesterové vazby. Další podjednotkou je kondenzační doména, která katalyzuje tvorbu peptidu a jeho prodloužení pomocí vazby C-N (Stachelhaus *et* Walsh, 2000). Další domény jednotky enzymu NRPS jsou zodpovědné například za metylaci nebo epimerizaci, kdy dochází ke změně L-aminokyselin na D formu (Donatio *et al.*, 2007, Nikolouli *et* Mossialos, 2012).

Prvním krokem syntézy neribozomálních peptidů je aktivace dvou specifických aminokyselin pomocí adenylační domény a transport k PCP. Kondenzační doména poté katalyzuje tvorbu peptidové vazby za použití dvou molekul aminoacyl-PCP s funkcí substrátů. Tyto reakce se opakují, dokud není vytvořen výsledný produkt (peptid), který je uvolněn thioesterázovou doménou. Výsledný produkt může být následně modifikován N-methyltransferázou a epimerázou (Simm *et al.*, 2017).

Polyketidy jsou sekundární metabolity přírodního původu, vznikající v houbách, bakteriích a rostlinách. Polyketidy mají uhlíkovou kostru a řadíme zde polyethery, polyfenoly, polyeny a makrolidy. Enzym syntetizující polyketidy nese název polyketid syntáza (PKS), který pro syntézu polyketidů využívá jako výchozí produkt acetyl-CoA a malonyl-CoA (Hertweck, 2009; Simm *et al.*, 2017). Polyketid syntáza řídí připojení počáteční molekuly řetězce a také ovlivňuje jeho výslednou délku, čímž tvoří molekulární diverzitu. Enzym PKS je stejně jako enzym NRPS složen více funkčních domén. Jednou z nich je acyltransferázová doména, která je zodpovědná za výběr vhodného monomeru, nejčastěji se jedná o malonyl-CoA nebo methylmalonyl-CoA. Dále je zde přítomen ACP (acyl carrier protein), který váže monomer k enzymatickému komplexu prostřednictvím thioesterové vazby, a nakonec ketosynthasová doména, která prodlužuje polyketidový řetězec pomocí vazby C-C (Weissman J. K., 2009).

Prvním krokem syntézy polyketidů je výběr vhodné molekuly acyl-CoA acyltransferázovou doménou a transport k ACP. Ketosynthasová doména β -keto skupina může být modifikována β -ketoreduktázovou doménou. Uvolnění výsledného produktu je realizováno thioesterázovou doménou (Simm *et al.*, 2017).

Role polyketidů v organismech není ve všech případech známa, ale předpokládá se, že jsou to faktory virulence, pigmenty, infochemikálie (feromony) nebo že přispívají k ochraně daného organismu. Polyketidy mají své využití ve farmakologii, jelikož mohou být zdrojem nových léčiv. Již nyní se využívají jako antibiotika, antiparazitika, imunosupresiva a léky snižující hladinu cholesterolu (Hertweck, 2009).

3.5 Geosmin

Jedná se o přírodní sekundární metabolit, chemicky se jedná o cyklický seskviterpen, který je zodpovědný za specifický pach vody a ryb. Je produkován velkým množstvím mikroorganismů, včetně sinic a hub. Sinice se však považují za hlavního producenta geosminu a to jak v jezech, tak i v tekoucích vodách a nádržích (Juttner *et Watson*, 2007). Kromě sinic je produkován také vláknitými bakteriemi *Streptomyces* a *Nocardia*. Je detekován ve velmi nízkých koncentracích až $30 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ (Shin *et al.*, 2022).

Geosmin zastává ekologicky významnou roli v ovlivnění hmyzu. Ovlivňuje chování *Drosophila melanogaster* a *Aedes aegypti*, působením na jediný glomerulus. Odpuzuje například rod *Drosophila melanogaster*, kdy důvodem by mohlo být zabránění kladení vajíček

na nevhodném, např. plesnivém, ovoci. Specifický pach geosminu naopak přitahuje *Aedes aegypti*, a to zřejmě proto, že signalizuje přítomnost vlhké půdy, která je vhodná pro kladení vajíček (Scarano *et al.*, 2023).

Zaroubi *et al.* v roce 2022 studovali vliv geosminu na chování háďátek. Při studii nebyl prokázán vliv na jejich zdraví, avšak se ukázalo, že ovlivňuje jejich pohyb. Přítomnost geosminu byla spojena s se změnami jako jsou linearita dráhy, peristaltická rychlost a periodita pohybu hlavy.

3.6 Cyanotoxiny

Důvodem, proč jsou některé sinice toxické je biosyntéza škodlivých sekundárních metabolitů (cyanotoxinů). Jejich produkce je spojována s tvorbou tzv. vodních květů. Ty jsou tvořeny vrstvou přemnožených řas a sinic u hladiny. Jejich vznik je podmíněn teplotou, pH vody, obsahem kyslíku, dusíku a fosforu a dalšími faktory. Vznikají při vyšších teplotách, zejména v létě a také v eutrofických vodách (Osswald *et al.*, 2007). Výskyt vodního květu však nemusí vždy souviset s toxicitou sinic, jelikož ne všechny kmeny cyanotoxiny produkují a ve vodním květu spolu koexistují kmeny produkující i neprodukující cyanotoxiny. Navíc některé kmeny se schopností cyanotoxiny produkovat mohou geny zodpovědné za jejich produkci na základě různých podmínek prostředí vypínat a zapínat (Merel *et al.*, 2013).

Cyanotoxiny rozdělujeme dle chemické struktury na alkaloidy, cyklické peptidy a lipopolysacharidy. Dále je můžeme rozdělit podle druhů sinic, kterými jsou produkovány nebo podle mechanismu toxicity a zasaženého orgánu, a to na neurotoxiny, kam patří například alkaloidy anatoxin-a a homoanatoxin-a. Hepatotoxiny, kam řadíme microcystiny a nodulariny (Falconer 1998), cytotoxiny, mezi které patří cylindrospermopsin (Humpage *et al.*, 2000) gastrointestinální toxiny a dermatotoxiny dráždící kůži (Merel *et al.*, 2013). Některé cyanotoxiny jako například saxitoxiny, jsou produkovány i jinými organismy než sinicemi, kdežto mikroscystiny a anatoxiny jsou výlučně produkty sinic (Metcalf *et Codd*, 2012).

Sinice negativně ovlivňují vodní ekosystém, jelikož kolonizují širokou škálu ník ve vodním i suchozemském prostředí. Cyanotoxiny mají vliv na chemické a fyzikální vlastnosti vody a při požití ohrožují zdraví člověka a ostatních organismů. Lidé mohou být vystaveni cyanotoxinům prostřednictvím přímého požití při pití kontaminované vody nebo konzumováním kontaminovaných mořských plodů, například ryb nebo slávek jedlých.

Uvažuje se také o možném vystavení toxinů prostřednictvím kontaminované vody používané k zavlažování zemědělských plodin (Abdallah *et al.*, 2021) a posledním způsobem intoxikace je kontakt s kůží a inhalace (Merel *et al.*, 2013).

V roce 1996 došlo v Caruaru v Brazílii k významnému případu vystavení člověka cyanotoxinům. Na klinice došlo k intravenózní aplikaci sinicemi kontaminované vody, v důsledku toho zemřelo na hemodialyzační klinice 100 lidí a dalších 52 potvrdilo vystavení hepatotoxickým mikrocystinům a pozdější analýza potvrdila přítomnost také cytotoxických cylindrospermopsinů. Mezi projevy intoxikace těchto pacientů patřily závratě, problémy se zrakem či šelest v uších (Metcalf *et al.*, 2021).

3.6.1 Saxitoxiny a mikrocystiny

Schantz *et al.* v roce 1957 poprvé popsali saxitoxin u *Saxidomus giganteus*. Saxitoxiny jsou skupinou 57 neurotoxických alkaloidů. Přestože byly saxitoxiny studovány převážně v mořských vodách, již bylo identifikováno 20 analogů v kmenech pocházejících ze sladké vody. Mechanismus jejich působení spočívá v blokaci sodných kanálů, protože se reverzibilně vážou na specifické oblasti saxifilinového proteinu. Reverzibilní vazba zabraňuje vzniku akčního potenciálu v nervech a svalových vláknech, což může vést k paralýze a zástavě dechu (Metcalf *et Codd*, 2012).

Mikrocystiny jsou cyklické peptidy složené ze 7 aminokyselin. Dnes je díky substitucím a modifikacím jejich struktury známo přes 240 různě toxických variant (Spoof *et al.*, 2016). Z hlediska zasaženého orgánu se řadí mezi hepatotoxiny, avšak jsou známy případy, kdy měli lidé při expozici mikrocystiny i neurologické příznaky. Důvodem těchto příznaků je molekulární mechanismus mikrocystinů, který spočívá v inhibici proteinových a fosfoproteinových fosfatáz (Codd, 1995). Ty se nacházejí v centrální nervové soustavě a jejich inhibice může vést k rozvoji neurodegenerativních onemocnění (Metcalf *et al.*, 2021).

3.6.2 Anatoxin-a

Anatoxin-a je neurotoxin produkovaný několika kmeny sinic, a to ve sladké i slané vodě a jejich přítomnost byla potvrzena v 10 evropských zemích, Asii, Africe, Severní a Jižní Americe, Novém Zélandu a Nové Kaledonii (Bruno *et al.*, 2016). Přesto, že není celosvětově

často se vyskytujícím toxinem, považuje se za zdravotní riziko pro vodní a suchozemské organismy kvůli jeho vysoké toxicitě (Osswald *et al.*, 2007).

Francis (1878) poprvé popsal smrtelné účinky vodních květů sinic na chovná zvířata v Austrálii. Když došlo k velké proliferaci nárostových sinic, které produkují anatoxin-a anebo homoanatoxin-a poblíž břehů řek a jezer, došlo k hlášení úmrtí divokých i domácích zvířat např. v Kanadě (Carmichael *et Gorham* 1978), k úmrtí psů ve Skotsku (Edwards *et al.*, 1992) a Francii (Gugger *et al.*, 2005). Je zaznamenáno mnoho hlášení otrav zvířat anatoxinem-a a mikrocystinem, která má více než 80 variant s různými stupni toxicity (Hotto *et al.* 2007), zejména u psů, ptáků a dobytka. Otrava se projevuje křečemi, zvracením a zástavou dechu (Merel *et al.*, 2013). Předpokládá se, že otravy psů jsou způsobeny dvěma faktory. Některé kmeny sinic produkují geosmin, což je sekundární metabolit mající specifickou chuť a produkující specifický pach, které psi atrahují. Nejčastěji psi toxiny pozřou olizováním své srsti po plavání, kdy sinice ulpívají na jejich srsti. Otravy se vyskytují například také u Plameňáků malých (*Phoeniconaias minor*), kteří běžně konzumují sinice ve své potravě. Byla prokázána přítomnost anatoxinu-a a mykrocystinu v peří i ve tkáních plameňáka malého (Bruno *et al.*, 2016). Kromě živočichů negativně ovlivňuje také fotosyntézu vodních rostlin v závislosti na jeho koncentraci. Pokud je koncentrace anatoxinu-a nižší než $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, pak je fotosyntetická aktivita stimulována, při vyšších koncentracích je naopak inhibována (Zhang *et al.*, 2022).

Devlin *et al.* poprvé popsali anatoxin-a v roce 1977. Označuje se jako „very fast dead factor“. Má hmotnost 165 Da (Merel *et al.*, 2013) s LD_{50} 0,25 mg/kg. (Devlin *et al.*, 1977) Z hlediska chemické struktury se jedná o derivát homotropanového alkaloidu. Váže nevratně na nikotin acetylcholinové receptory (nAChR) a je tedy možným cholinergním agonistou. Anatoxin-a vykazuje vyšší afinitu k nAChR než acetylcholin. Intoxikace anatoxinem se projevuje křečemi, svalovými fascikulacemi, cyanózou a může vést i ke smrti v důsledku paralýzy dýchacích svalů, jelikož vyvolává nadměrnou stimulaci svalů (Carmichael *et al.*, 1979; Abdallah *et al.*, 2021).

Po navázání anatoxinu-a na nAChR se otevře sodný kanál a dojde k otevření iontového kanálu a k přílivu Na^{2+} iontů do buňky a odtoku K^{+} iontů ven z buňky. Tok iontů způsobí depolarizaci neuronu, která vede ke vzniku nervového impulzu. Za normální situace, kdy se na nAChR váže acetylcholin, je ihned po vyvolání impulsu hydrolyzován enzymem acetylcholinesterázou, aby se zabránilo opětovnému navázání na receptor, a tedy i repolarizaci. Anatoxin-a však není žádným způsobem degradován, a tak dochází

k nepřetržitému šíření neuronálních impulsů, a tedy k nadměrné stimulaci svalů, spojené mimo jiné například se zástavami dechu (Carmichael *et al.*, 1979; Osswald *et al.*, 2007; Metcalf *et Codd*, 2012). nAChR hrají také důležitou roli v uvolňování katecholaminu dopaminu, a bylo zjištěno, že anatoxin-a ovlivňuje uvolňování dopaminu v závislosti na jeho koncentraci (Bruno *et al.*, 2016).

Anatoxin-a je v přírodě nestabilní a se snadno rozkládá, např. vlivem vyššího pH. Je nestabilní při pH vyšší než 10 (Van Apeldoorn *et al.*, 2007). Dále je rozkládán působením slunečního záření (fotodegradace) nebo je oxidován ozonem na méně toxické či netoxické produkty, jako jsou dihydroanatoxin-a a epoxyanatoxin-a (Osswald *et al.*, 2007, Bruno *et al.*, 2016). Předpokládá se, že dihydroanatoxin si zachovává 10 % toxicity anatoxinu-a (Bruno *et al.*, 2016). Puddick *et al.* (2021) však srovnali toxicitu ATX a dhATX z *Microcoleus autumnalis* na základě odlišného způsobu požití a zjistili, že dhATX je 3x méně toxický než ATX podaný injekcí, avšak při orálním užití je dhATX 4x více toxický než ATX. Další cesta degradace může být za použití bakterií. Gramnegativní bakterie rodu *Pseudomonas* jsou schopny degradovat 2 až 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ anatoxinu-a za den (Osswald *et al.*, 2007).

Jedním z analogů anatoxinu-a je homoanatoxin-a. Vzniká metylací uhlíku poslední ketonové funkční skupiny anatoxinu-a (Van Apeldoorn *et al.*, 2007). Jeho toxicita je stejná jako u anatoxinu-a (Metcalf *et Codd*, 2012). Nedávno nově objeveným derivátem homoanatoxinu-a je 4-hydroxyhomoanatoxin-a, produkován sinicí *Raphidiopsis mediterranea* (Bruno *et al.*, 2016). Dalším analogem anatoxinu-a je anatoxin-a(S) nebo také guanitoxin. Jedná se o organofosfát, konkrétně N-hydroxyguanidin methyl fosfát ester. Spolu s DNA, RNA a ATP tvoří jediné přírodní organofosfáty. Negativně ovlivňuje svalová spojení, jelikož nevratně inhibuje acetylcholinesterázu (AChE), čímž blokuje hydrolýzu tohoto neurotransmiteru. V důsledku toho dojde k akumulaci acetylcholinu, což vede k nervové hyperexcitabilitě (Mahmood *et Carmichael*, 1986).

3.6.3 Další potenciálně toxické metabolity

Sinice také produkují sekundární metabolity, konkrétně cyklické neribozomální oligopeptidy, které působí jako inhibitory proteas, konkrétně trypsinu, chymotrypsinu či elastázy a proteinových fosfatáz (Lenz *et al.*, 2019). Mezi takové sekundární metabolity patří cyanopeptoliny, a anabaenopeptiny. Cyanopeptoliny jsou produkovány například kmeny *Nostoc*, *Microcystis* a *Anabaena* (Mazur-Marzec *et al.*, 2018). Většina z nich neinhibuje

endopeptidasy, ale exopeptidasy, konkrétně enzym karboxypeptidázu A (CPA), který hraje významnou roli v regulaci fibrinolýzy (Chlipala *et al.*, 2011). V roce 2018 Lenz *et al.* studovali tři varianty anabaenopeptinů (AP-A, AP-B, AP-F) a cyanopeptolinů (CYP-1007, CYP-1020, CYP-1041) na modelovém organismu *Caenorhabditis elegans*. Výsledkem této studie bylo zjištění, že za použití AP a CYP o koncentraci $10\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, což je hodnota 100x nižší než jejich běžná koncentrace v přírodě, vykazovaly anabaenopeptiny nejvyšší toxicitu. Následovaly cyanopeptoliny, které vykazovaly toxicitu srovnatelnou s microcystiny a nejméně toxický byl Microginin 690. Toxické efekty zahrnovaly snížení reprodukce, růstu, zpoždění líhnutí či snížení životnosti. Fakt, že APs vykazovaly vyšší toxicitu než microcystiny, které jsou považovány za jedny z nejvíce toxických cyanotoxinů, je ukazatelem, že je působení těchto cyanopeptidů na životní prostředí a zdraví člověka potřeba dále studovat.

3.6.4 Metody analýzy cyanotoxinů

Toxiny lze jednoduše a rychle detekovat metodou ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Přítomnost toxinů je potvrzena barevnou reakcí, přičemž intenzita zbarvení je nepřímo úměrná množství toxinu. Nedostatkem této metody je nemožnost identifikace jednotlivých tříd toxinů. Výsledkem je vždy celková koncentrace určité třídy toxinů např. mikrocytinů. Pro každou třídu toxinů je třeba použít jinou sadu a případně upravit pH vzorku, aby odpovídalo požadavkům daného testu (Lawton *et al.*, 2021). ELISA je používána často jen jako screeningová metoda a je nutné potvrdit přítomnost toxinu a zkontrolovat falešné negativní výsledky pomocí instrumentálních metod jako HPLC nebo LC/MS (Gaget *et al.*, 2017).

Nejpoužívanější fyzikálně-chemickou metodou pro detekci anatoxinu-a je vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC) s UV detekcí nebo fotodiodovým polem (PDA), které poskytuje absorpční spektrum v rozmezí 200 až 600 nm (Lawton *et al.*, 2021). Tato metoda je vhodná pro stanovení saxitoxinů, anatoxinu-a, mikrocytinů, nodularinů a cylindrospermopsinu (Metcalf *et Codd*, 2012). Pro lepší separaci analytů je aplikována gradientová eluce, díky které se v průběhu chromatografie mění podíl rozpouštědla. Provedení chromatografie je pro HPLC-PDA a LC-MS/MS stejné. Důležitý je však výběr vhodné kolony, jelikož se spolu s anatoxinem-a vyskytuje ve vzorku i fenylalanin, který má obdobný retenční čas a hmotnost jako anatoxin-a. Vzorky jsou na vhodné koloně (např. UPLC C18)

separovány při teplotě 40° C. Jako mobilní fáze se používá voda nebo acetonitril, okyselené 0,1% kyselinou mravenčí. Podíl organického rozpouštědla se v průběhu chromatografie za použití UPLC zvyšuje z 2 % až na 35 % během 5 minut. Absorpční maximum anatoxinu-a je při 227 nm. Dále je pro detekci anatoxinu-a vhodná již zmíněná metoda ELISA, díky které známe výsledek za méně než 2 hodiny v rozsahu koncentrace 0,15 až 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Lawton *et al.*, 2021). Srovnání jednotlivých metod pro další specifické cyanotoxiny je popsáno v Gaget *et al.* (2017).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Z celkem 202 vzorků kmenů *Microcoleus*, jejichž genomy byly sekvenovány a následně použity pro analýzu přítomnosti genů a genových klastrů pro syntézu sekundárních metabolitů pocházelo 40 z České republiky, 30 z Polska, 29 ze Švédska, 23 z Floridy (USA), 21 z Řecka, 12 z Antarktidy, 11 z Mauricia, 8 z Norska, 7 z Arizony (USA), 5 ze Špicberků, 5 z Chorvatska, 4 z Montany (USA), 4 z Austrálie a 3 z Ladakh (Indie). Vzorky byly odebrány z půdy, louže a mechu. Seznam jednotlivých kmenů s místem výskytu, nalezištěm a číslem je uveden v Tabulce č. 1 v příloze. Osm vzorků bylo získáno z herbáře Natural History Museum (Londýn, Spojené Království). Ty byly extrahovány dle protokolu Kistler (2012) a umístěny ve zkumavce pro následné analýzy.

4.2 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.2.1 Sekvence genomů

Sekvence celých genomů, které byly analyzovány v této práci byly generovány v publikaci Stanojković *et al.* (2024), kde je podrobně vysvětlena strategie sekvenování. Ve zkratce bylo pro sekvenaci genomu použito 100 mg čerstvé biomasy. Extrakce genomické DNA byla provedena pomocí UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MOBIO, Carlsbad, CA, USA). 1,5% agarózový gel obarvený ethidium bromidem byl využit spolu s NanoDrop 1,000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) pro zjištění kvality a koncentrace DNA. Velikost jednotlivých fragmentů DNA byla analyzována za použití Agilent 5,400 fragment analyzer systém (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States). Sekvenační knihovny byly připraveny pomocí Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Vzorky byly komerčně sekvenovány pomocí Illumina NovaSeq 6000 platformě (Novogene, Spojené království) jako párové uspořádání 2x150 párů bází. Do databáze NCBI pro BioProject PRJNA849373 bylo předloženo 9 celogenomových sekvencí a krátké nezpracované fragmenty byly filtrovány a oříznuty pomocí Trimmomatic v0.39 (Bolger *et al.*, 2014) s parametry ILLUMINACLIP:2:30:10, LEADING:3, TRAILING:3, SLIDINGWINDOW:4:15 a MINLEN:50. Jednotlivé genomy byly sestaveny pomocí SPAdes genomic assembler v3.13.1 (Bankevich *et al.*, 2012). Následně byly odstraněny kontaminace pomocí MaxBin v2.2.4 (Wu *et al.*, 2016). Pomocí softwaru CheckM v1.14.5 (Seemann, 2014) byla hodnocena úroveň kontaminace výsledné sekvence genomu každému kmenu.

4.2.2 Fylogenetická analýza

Pro fylogenomickou analýzu bylo použito 202 celogenomových sekvencí. Seznam jednotlivých kmenů je v příloze. Pro odvození matice sekvencí a pro zkoumání evoluční historie sinic byl využit Orthofinder v2.3.1 (Emms and Kelly, 2019). Poté byla provedena ML fylogenetická rekonstrukce v IQ-TREE s použitím modelu JTT + F + I + G4. Kmen M2_D5 byl použit jako nevztažná skupina. Z Obrázku č. 1 a 2 byl však dodatečně smazán.

Proteinové sekvence genů pro geosmin byly extrahovány z antiSMASH pro jednotlivé genomy. LM strom byl zrekonstruován pomocí IQ-TREE na základě matice vytvořené pomocí algoritmu Muscle (Edgar 2004) a ModelFinder byl použit k získání nejvhodnějšího modelu (JTT + F + I + G4). Topologie byla testována s 2000 replikátů.

4.2.3 AntiSMASH analýza

Pro zjištění přítomnosti sekundárních metabolitů byla využita *in silico* analýza pomocí antiSMASH. AntiSMASH analyzuje nahraná genomická data zkoumaného organismu použitím algoritmů pro detekci genů a genových klastrů, které jsou spojeny se sekundárními metabolity. Biosyntetické genové klastry obvykle obsahují všechny geny pro biosyntézu přírodních produktů. Výsledky jsou zobrazeny pomocí webového rozhraní.

4.2.4 Analýza toxinů ve vybraných kmenech

Toxiny byly extrahovány ze sušených vláken přidáním 200 μ l 0,1% kyseliny octové. Následovaly dva cykly zmrazení a rozmrazení a následné působení ultrazvukem po dobu 10 minut (popsáno v Fastner *et al.*, 2023). Analýza anatoxinu byla provedena v Německu (Umwelt Bundesamt, Wörlitzer Platz 1) pomocí LC-MS/MS na HPLC systému Agilent 2900 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) spojeném s hmotnostním spektrometrem API 5500 QTrap (AB Sciex, Framingham, MA, USA) vybaveným turbo-iontovým sprejem.

5 VÝSLEDKY

Mezi sekundární metabolity, které se dle výsledků z antiSMASH analýzy nacházely u jednotlivých druhů, patřily kromě cyanotoxinů jako jsou anabaenopeptiny, anatoxin-a, cyanopeptiny a cyanopeptoliny také netoxické metabolity s antibiotickými či antimykotickými účinky. Těmito netoxickými sekundárními metabolity jsme vyjma geosminu v této práci dále nezabývali. U 9 kmenů sinice rodu *Microcoleus* byla pomocí antiSMASH analýzy zjištěna přítomnost anatoxinu-a. Konkrétně se jedná o kmeny AT13_A6, AT13_A5, F8D3, F8_D2, F8_D1, F8_C1, F8C3, S13_D1 a S13_C3. Kmen F8_D2 jsme již neměli k dispozici, ale zbylých 8 kmenů bylo posláno do Německa (Umwelt Bundesamt, Wörlitzer Platz 1) na změření přesné koncentrace anatoxinu-a a jeho derivátů (dihydroanatoxin-a a homoanatoxin-a) pomocí LC/MSMS. Anatoxin-a a jeho deriváty byly detekovány pouze u 4 z 8 analyzovaných kmenů, a to konkrétně u F8D3, F8_D1, F8_C1 a F8C3. Tyto vzorky pocházejí z Floridy a byly odebrány z půdy. U těchto 4 kmenů prokazatelně obsahujících anatoxin-a byla dle antiSMASH 40% pravděpodobnost výskytu genového klastru pro biosyntézu anatoxinu-a. U kmenů AT13_A6, AT13_A5, S13_D1 a S13_C3 byla tato hodnota pouze 20 %. Jednotlivé hodnoty koncentrací anatoxinu-a a jeho derivátů jsou uvedeny v Tabulce č. 2. U 52 kmenů sinice rodu *Microcoleus* byla zjištěna přítomnost genového klastru pro cyanopeptolin, u 62 přítomnost genového klastru pro cyanopeptin, u 76 přítomnost anabaenopeptinu a u 43 přítomnost geosminu. Sekundární metabolity se nenacházely vždy jen u jedné skupiny, ale i u mnoha nepříbuzných linií. Přestože by se mohlo předpokládat, že daný metabolit bude produkovat celý druh, je u sinic vidět, že se geny často buďto objeví nebo ztratí. Konkrétní druhy a přítomnost genů pro dané sekundární metabolity jsou znázorněny na Obrázku č. 1.

Topologie stromu byla testována ve Stanojković *et al.*, (2024). Tři metody pro získání konzistentní topologie stromu jsou na základě kódujících sekvencí (nukleotidové a proteinové sekvence ortologů, koalescenční metoda ASTRAL III) a druhé dva způsoby na základě všech polymorfismů v celém genomu včetně repetice (všechny polymorfismy a odfiltrování pozic s rekombinací). Všechny přístupy vygenerovaly konzistentní topologii.

Obrázek č. 1: Fylogenetický strom 202 kmenů rodu *Microcoleus* a přítomnost cyanotoxinů a geosminu u jednotlivých kmenů zrekonstruovaný na základě aminokyselinových sekvencí pomocí analýzy maximální pravděpodobnosti. Úsečka zobrazuje substituci na pozici. Hodnoty ultrafast bootstrap jsou $\geq 99\%$ jsou označeny *.



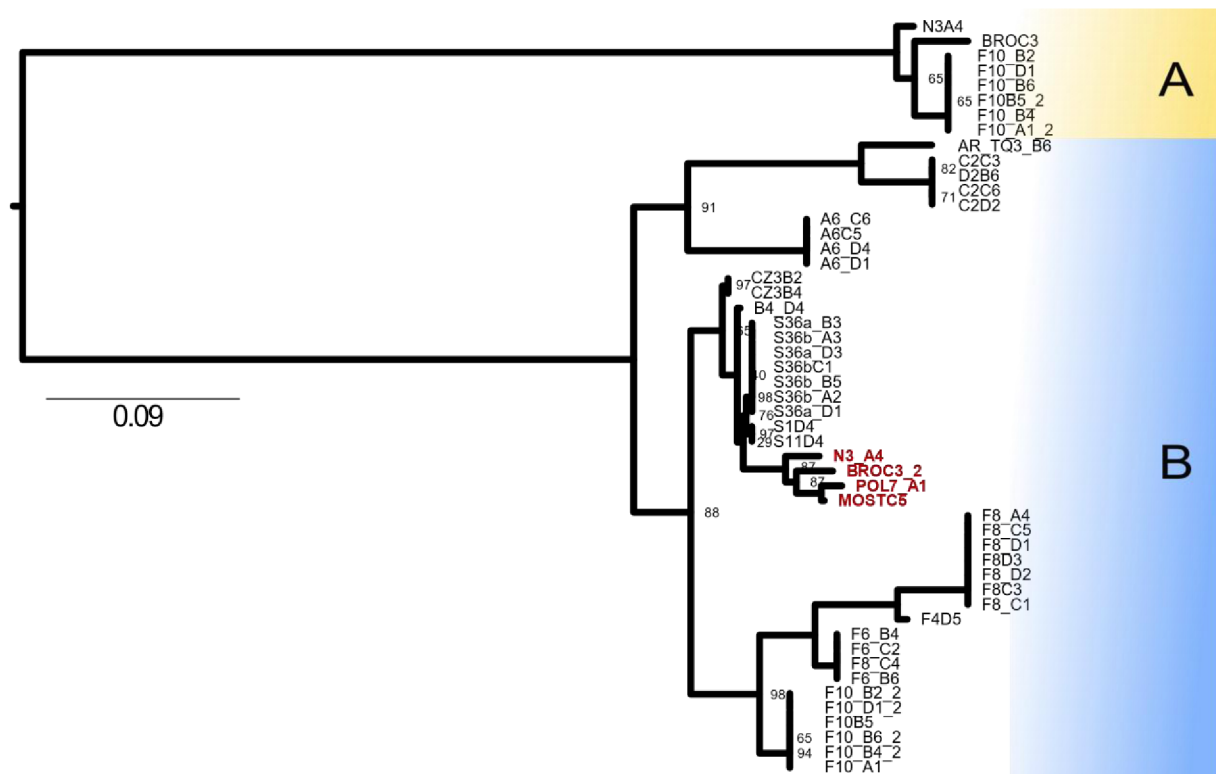
Tabulka č. 2: Koncentrace anatoxinu-a, dihydroanatoxinu-a a homoanatoxinu-a změřené pomocí LC-MS/MS

Vzorek	Název kmene	Anatoxin-a [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW]	Dihydroanatoxin-a [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW]	Homoanatoxin-a [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW]
1	AT13_A6	n.d.	n.d.	n.d.
2	AT13_A5	n.d.	n.d.	n.d.
3	F8D3	0,64	0,10	31,16
4	F8_D1	2,79	0,15	43,93
5	S13_D1	n.d.	n.d.	n.d.
6	F8C3	8,19	0,08	60,83
7	F8_C1	2,02	0,34	70,83
8	S13_C3	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. – nedetekováno

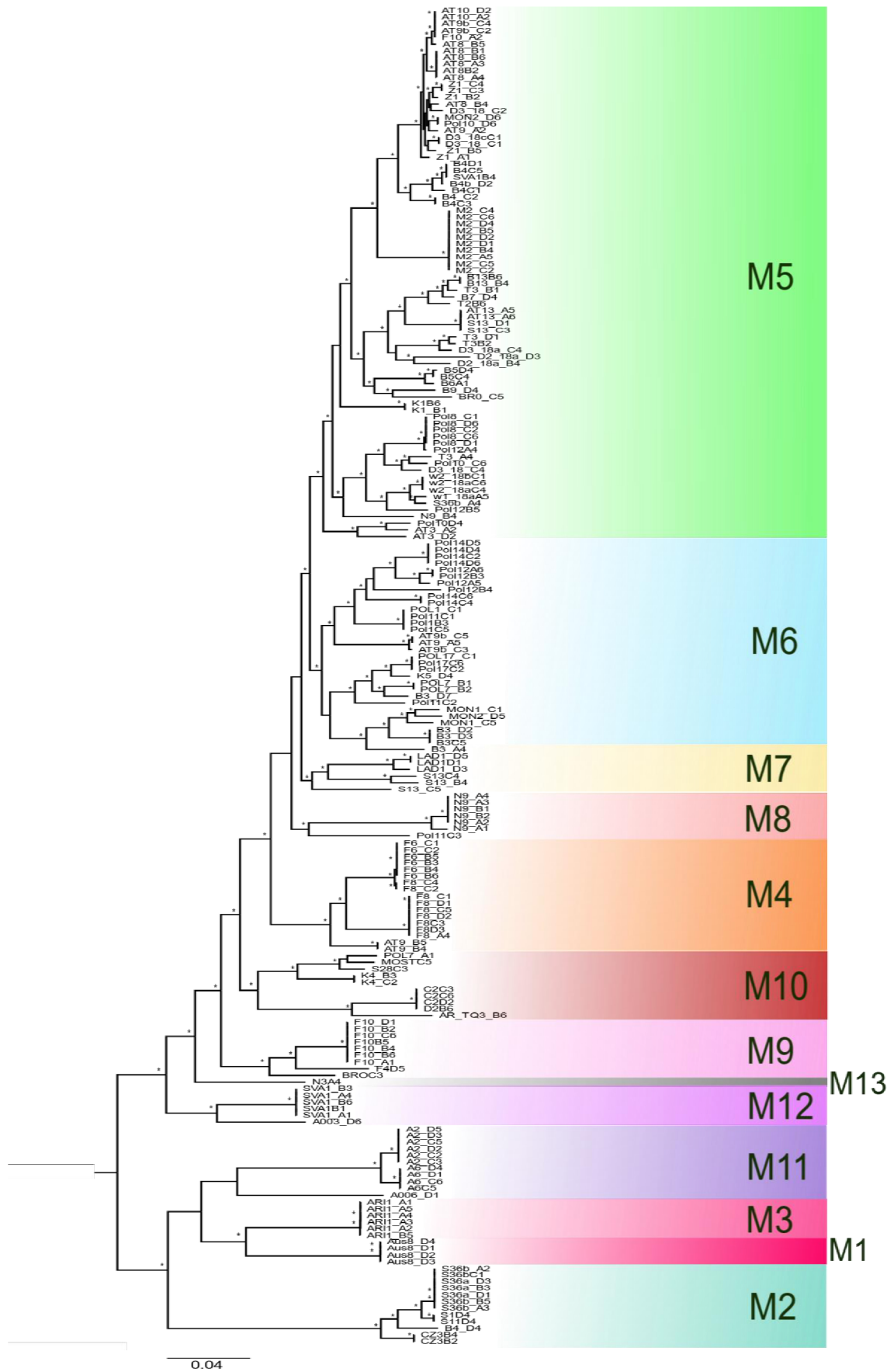
DW (dry weight) – sušená biomasa

Ze sekundárních metabolitů, kterými se tato práce zabývá, je geosmin tím nejprozkoumanějším. Proto jsem se rozhodla pozorovat evoluční cestu genu právě pro geosmin. Z výsledných dat z antiSMASH analýzy byl sestaven fylogenetický strom rodu *Microcoleus*, u kterých je gen pro geosmin přítomen. Byly nalezeny 2 varianty genu pro geosmin (A, B), přičemž některé kmeny obsahovaly oba paralogní geny. Konkrétně BROCC3, F10_A1, F10_B2, F10_B4, F10_B5, F10_B6, F10_D1 a N3_A4. Na Obrázku č. 2 můžeme vidět, že jeden paralogní gen (A) následuje větvení fylogenetického stromu na Obrázku č. 1. a kmeny obsahující tento paralog jsou dle Skoupý *et al.*, (2024) monofyletickou linií M9 (Obrázek č. 3). Výjimkou je kmen N3_A4, který tvoří samostatnou monofyletickou linii M13. Druhý, větší, paralogní gen (B) také následuje toto větvení vyjma 4 kmenů. Paralogní gen B se nachází u monofyletických M2, M4, M9. Avšak konkrétně kmeny N3_A4, BROCC3, POL7_A1 a MOSTC5 se v rámci fylogenetického stromu nacházejí vzdáleně. Kmen N3_A4 je jediným zástupcem linie M13, BROCC3 je jedním z kmenů linie M9 a POL7_A1 a MOSTC5 patří do linie M10.



Obrázek č. 2: Fylogenetický strom 43 kmenů *Microcoleus*, u kterých je přítomen gen pro geosmin, zrekonstruovaný na základě aminokyselinových sekvencí pomocí analýzy maximální pravděpodobnosti. Úsečka zobrazuje substituci na pozici. Hodnoty ultrafast bootstrap ≥ 99 % jsou označeny *. A a B zobrazují dva paralogní geny. Červeně zvýrazněné kmeny označují možný výskyt HGT.

V Tabulce č. 3 vidíme 13 monofyletických linií *Microcoleus* (M1-M13), rozdělených dle Stanojković *et al.* (2024) a u nich přítomné genové klastry pro jednotlivé sekundární metabolity. Počet kmenů v jednotlivých liniích se pohybuje od 1 do 81. V jedné linii ne všechny kmeny obsahují geny pro daný sekundární metabolit. Například linie M1 se skládá ze 4 kmenů a všechny obsahují geny pro anabaenopeptin a cyanopeptin. Naproti tomu se například linie M9 skládá z 9 kmenů, avšak gen pro geosmin má jen 8 kmenů, gen pro anabaenopeptin má jen 7 kmenů a gen pro cyanopeptin má jen 1 kmen. V Tabulce č. 3 lze také vidět, že některé linie obsahují genové klastry pro všechny námi vybrané metabolity (M4), naproti tomu linie M11 a M12 obsahují genové klastry pouze pro jeden vybraný metabolit.



Obrázek č. 3: Fylogenetický strom rodu *Microcoleus* rozděleného na 13 monofyletických linií (M1-M13) zrekonstruovaný na základě aminokyselinových sekvencí pomocí analýzy maximální pravděpodobnosti. Úsečka zobrazuje substituci na pozici. Hodnoty ultrafast bootstrap $\geq 99\%$ jsou označeny *.

Tabulka č. 3: Výskyt genů pro jednotlivé sekundární metabolity u rodu *Microcoleus*

Druh	Anatoxin-a	Geosmin	Cyanopeptol n	Anabaenopeptin	Cyanopepti n
M1	-	-	-	4/4	4/4
M2	-	12/12	-	8/12	2/12
M3	-	-	-	-	2/2
M4	5/17	11/17	8/17	9/17	6/17
M5	-	-	29/84	23/84	19/84
M6	-	-	7/31	15/31	13/31
M7	-	-	3/5	1/5	4/5
M8	-	-	3/7	7/7	4/7
M9	-	8/9	-	7/9	1/9
M10	-	7/8	2/8	1/8	6/8
M11	-	4/11	-	-	-
M12	-	-	-	1/6	-
M13	-	1/1	-	1/1	1/1

x/y – počet kmenů obsahujících geny pro dané metabolity/celkový počet kmenů dané linie

6 DISKUSE

Jedním z cílů mé bakalářské práce bylo zjistit, zda jsou kromě vodních druhů sinic schopné produkovat toxické sekundární metabolity (zejména anatoxin-a) i půdní druhy. V roce 2023 Bauer *et al.*, zkoumali 34 vzorků sinic z odebraných z Německých jezer. Bentické druhy sinic byly detekovány ve 12 vzorcích a převládaly zde Oscillatoriales a Nostocales. V těchto 34 vzorcích byly detekovány anatoxiny, microcystiny a saxitoxiny, přičemž anatoxiny byly detekovány nejčastěji právě v bentických vzorcích. Z 202 analyzovaných vzorků nárostové sinice rodu *Microcoleus* se mi podařilo potvrdit schopnost produkce anatoxinu-a celkem u 4 kmenů.

V USA v roce 2020 Conklin *et al.* popsali nový druh sinice rodu *Microcoleus*, který produkoval ATX a dhATX, zvaný *Microcoleus anatoxicus*. Předpokládalo se, že pouze tento druh bude ATX produkovat, avšak tato práce potvrdila přítomnost genového klastru pro ATX a produkci ATX i u dalších kmenů. Tyto 4 kmeny (F8D3, F8_D1, F8_C1 a F8C3) by dle Skoupý *et al.*, 2024 mohly tvořit spolu s dalšími 13 kmeny nový druh (zatím popsáný jako M4).

Nejvyšší námi naměřená koncentrace anatoxinu-a pomocí LS/MSMS byla $8,19 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a nejnižší koncentrace byla $0,64 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. V roce 2020 Conklin *et al.* měřili koncentraci ATX a dhATX u tří vzorků sinice *Microcoleus anatoxicus* odebraných z řeky v Severní Kalifornii, kdy nejvyšší hodnota koncentrace ATX byla $0,66 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a nejnižší $0,06 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ v závislosti na měsíci (březen a červenec) u stejného kmene. Námi nejvyšší naměřená koncentrace dhATX byla $0,34 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a nejnižší koncentrace byla $0,08 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Conklin *et al.* (2020) naměřili nejvyšší hodnotu koncentrace dhATX v závislosti na měsíci (březen a červenec) $879,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a nejnižší hodnotu koncentrace $331,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Jejich vzorky produkovaly výrazně více dhATX než naše vzorky, a naopak mnohem méně ATX ve srovnání s našimi kmeny.

Cyanopeptoliny jsou velkou skupinou NRPs. Jejich produkce je potvrzena u kmenů sinic *Microcystis* (Tooming-Klunderud *et al.*, 2007), *Planktothrix* (Rouge *et al.*, 2007) a *Anabaena* (Rouhiainen *et al.*, 2000). Dle našich výsledků, by mohly mít některé kmeny *Microcoleus* schopnost některou variantu cyanopeptolinů produkovat.

Anabaenoptyny jsou bioaktivními NRPs produkovány například *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Lyngbya* a *Planktothrix* (Monteiro *et al.*, 2021). Saeed *et al.* (2024) sekvenovali genom sinice *Microcoleus*, jehož izoláty pocházely z Iráku. Genomy byly analyzovány

pomocí AntiSMASH, stejně jako v této práci, a výsledkem analýzy byla zjištěna přítomnost 4 biosyntetických genových klastrů, přičemž jeden z nich byl právě pro anabaenopeptin.

Cyanopeptiny jsou zatím nejméně prozkoumanými sekundárními metabolity, kterými se tato bakalářská práce zabývá. Konkrétně u *Microcoleus* zatím nebyla popsána přítomnost genového klastru pro cyanopeptiny. Avšak u jiných druhů byla jejich přítomnost již dříve zmíněna. Brito *et al.* (2020) studovali mimo jiné i produkty biosyntetických genových klastrů pomocí AntiSMASH u sinice *Hyella patelloides*. Výsledkem byla přítomnost mnoho různých genových klastrů, včetně toho pro cyanopeptin. Avšak například McKindles *et al.* 2022 studovali izoláty *Planktothrix agardhii* a u všech 20 analyzovaných kmenů byla přítomna varianta genového klastru pro cyanopeptin. Mimo jiné obsahovalo 17 kmenů i genový klastr pro anabaenopeptin, ten byl však vysoce modifikován a rozpadl se na 6 odlišných variant.

V roce 2015 Wang *et al.* zkoumali produkci geosminu u rodu *Anabaena ucrainica*. Srovnáním topologií stromů pro gen pro syntézu geosminu a pro gen 16S rDNA zjistili, že se pravděpodobně geny pro syntézu geosminu nevyvíjely společně, ale mohlo dojít k HGT mezi různými skupinami, což naznačují i naše výsledky. Kmeny BROC3 a N3_A4 obsahují obě varianty genu pro geosmin, přičemž jednu z nich získaly pravděpodobně právě díky HGT a kmeny POL7_A1 a MOSTC5 tímto způsobem mohly získat jednu variantu genu pro geosmin.

7 ZÁVĚR

Byla potvrzena schopnost půdní sinice rodu *Microcoleus* produkovat vysoce toxický sekundární metabolit ATX a jeho varianty dhATX a HANTX, které mohou za čtená úmrtí zvířat po celém světě. Původně se myslelo, že pouze *M. anatoxicus* bude produkce anatoxinu schopný. Dále byla zjištěna pravděpodobnost produkce geosminu u 43 kmenů, a variant anabaenopeptinů u 76 kmenů, cyanopeptolinů u 52 kmenů a cyanopeptinů u 62 kmenů. Tyto biosyntetické genové klastry zkoumané pomocí AntiSMASH by mohly být potenciálním zdrojem pro nové biologicky aktivní sloučeniny produkované sinicí *Microcoleus*.

Byla sledována evoluce genu pro syntézu geosminu, při které lze z výsledného fylogenetického stromu teoreticky určit, že v minulosti došlo k horizontálnímu genovému transferu u 4 kmenů rodu *Microcoleus*, přičemž horizontálním transferem získaly 2 kmeny jednu variantu genu pro geosmin a získaly tím tedy schopnost jej produkovat a 2 kmeny získaly horizontálním transferem druhou variantu genu pro geosmin.

Posledním krokem bylo zjištění, které monofyletické linie sinice rodu *Microcoleus* dle Skoupý *et al.* (2022) obsahují vybrané geny pro sekundární metabolity. Kmeny monofyletické linie M4 obsahují geny pro všechny námi zkoumané metabolity, a jako jediné obsahují gen právě pro ATX. Naproti tomu kmen linie M13 obsahuje pouze geny pro anabaenopeptin.

8 LITERATURA

Adams D. G. (2000): Heterocyst formation in cyanobacteria. *Current opinion in microbiology* 3: 618–624.

Adams D., & Duggan P. (1999): Tansley Review No. 107. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *The New Phytologist* 114: 3–33.

Arnold, B.J., Huang, IT. & Hanage, W.P. (2022): Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. *Nature* 20: 206–218.

Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A. A., Dvorkin M, Kulikov S A., Lesin M. V., Nikolenko I. S., Pham S., Prjibelsky D. A., Pyshkin V. A., Sirotkin V. A., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev A. M., Pevzner A. P. (2012): SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology* 19: 455–477.

Barracough G. T., Balbi J. K., Ellis J. R. (2012): Evolving Concepts of Bacterial Species. *Evolutionary Biology* 39: 148–157.

Bauer F., Wolfschlaeger I., Geist J., Fastner J., Schmalz C. W., Raeder U. (2023): Occurrence, Distribution and Toxins of Benthic Cyanobacteria in German Lakes. *Toxicon* 11: 643.

Belnap J., Lange O. L. (2001): Structure and Functioning of Biological Soil Crusts: A Synthesis. In: Belnap J., Lange O. L. (eds.) *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*, pp. 471–479, Springer, Berlin.

Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. (2014): Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114–2120.

Boyer S.L., Johansen J. R., Howard G. L. (2002): Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S-23S ITS region. *Journal of Phycology* 38: 1222–1225.

Brient L., Lengronne M., Bertrand E., Rolland D., Sipel A., Steinmann D., Baudin I., Legeas M., Rouzic L. B., Bormans M. (2008): A phycocyanin probe as a tool for monitoring cyanobacteria in freshwater bodies. *Journal of Environmental Monitoring* 10: 248–255.

Bruno M., Ploux O., Metcalf S. J., Mejean A., Pawlik-Skowronska B., Furey A. (2017): Anatoxin-a, Homoanatoxon-a and Natural Analogues. In: Meriluoto J., Spoof L., Codd G. A.

(eds) Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis, pp. 138–147, John Wiley & Sons, United Kingdom.

Carmichael W. (2001): Health Effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs“. Human and Ecological Risk Assessment 7: 1393–1407.

Carmichael W. W., Biggs F. D., Peterson M. A. (1979): Pharmacology of anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. Toxicon 17: 229–236.

Carmichael W. W., Gorham P. R. (1978): Anatoxins from clones of *Anabaena flos-aquae* isolated from lakes of western Canada. Internationale Vereinigung für theoretische und Angewandte Limnologie: Mitteilungen 21: 285–295.

Codd G. (2005): Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. Water Science and Technology 32: 149–156.

Codd G. A. (1995): Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. Water Science and Technology 32: 149–156.

Conklin Y. K., Stancheva R., Otten G. T., Fadness R., Boyer L. G., Read B., Zhang X., Sheath G. R. (2020): Molecular and morphological characterization of a novel dihydroanatoxin-a producing *Microcoleus* species (cyanobacteria) from the Russian River, California, USA. Harmful Algae 93: 101767.

Devlin J. P., Edwards O. E., Gorham P. R., Hunter N. R., Pike R. K., Stavric B. (1977): Anatoxin-a, a toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. Canadian Journal of Chemistry 55: 1367–1371.

Donatio S., Monciardini P., Sosio M. (2007): Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. Natural Product Reports 24: 1073–1109.

Dubnau D. (1999): DNA Uptake in Bacteria. Annual Review of Microbiology 53: 217–244.

Dvořák P., Casamatta D. A., Hašler P., Jahodářová E., Norwich R. A., Pouličková A. (2017): Diversity of the cyanobacteria In: Hallenbeck P. (eds) Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes, pp. , Springer, Switzerland.

- Dvořák P., Jahodářová E., Stanojković A., Skoupý S., Casamatta A., D. (2023): Population genomics meets the taxonomy of cyanobacteria, *Algal Research* 72: 103128.
- Edgar C. R. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
- Edwards C., Beattie K. A., Scrimgeour C. M., Codd G. A. (1992): Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisoning at Loch Insh, Scotland. *Toxicon* 30: 1165–1175.
- Falconer I. R. (1998): Algal toxins and human health, In: Hrubec, J. (eds) *Quality and Treatment of Drinking Water II. The Handbook of Environmental Chemistry*, pp. 53–82, Springer, Berlin.
- Fastner J., Teikari J., Hoffman A., Köhler A., Hoppe S., Dittmann E., Welker M. (2023): Cyanotoxins associated with macrophytes in Berlin (Germany) water bodies – Occurrence and risk assessment. *Science of The Total Environment* 858: 159433.
- Francis G. (1878): Poisonous Australian lake. *Nature* 18: 11–12.
- Gaget V., Lau M., Sendall B., Froscio S., Humpage R. A. (2017): Cyanotoxins: Which detection technique for an optimum risk assessment? *Water Research* 118: 227–238.
- Gomont M. (1892): Monographie des Oscillariées (Nostocacées homocystées). *Annales des Science Naturelles, Botanique* 15: 263–368.
- Gugger M., Boullié A., Laurent T. (2023): Cyanotoxins and Other Bioactive Compounds from the Pasteur Cultures of Cyanobacteria (PCC). *Toxins* 15: 388.
- Gugger M., Lenoir S., Berger C., Ledreux A., Druart J. C., Humbert J. F., Guette C., Bernard C. (2005): First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon* 45: 919–928.
- Gürtler V., Stanisich V. A. (1996): New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142: 3–16.
- Hašler P., Dvořák P., Johansen R. J., Kitner M., Ondřej V., Pouličková A. (2012): Morphological and molecular study of epipellic filamentous genera *Phormidium*, *Microcoleus* and *Geitlerinema* (Oscillatoriales, Cyanophyta/Cyanobacteria). *Fottea* 12: 341–356.

- Hertweck Ch. (2009): The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie International edition* 48: 4688–4716.
- Hindák F. (2008): *Colour Atlas of Cyanophytes*, Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, Czecho-Slovakia: VEDA, Bratislava.
- Hotto A. M., Satchwell M. F., Boyer G. L. (2007): Molecular characterization of potential microcystin-producing cyanobacteria in Lake Ontario embayments and nearshore waters. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4570–4578.
- Humpage A. R., Fenech M., Thomas P., Falconer I. R. (2000): Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cell indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 472: 155–164.
- Chlipala E. (2011): Chemodiversity in Freshwater and Terrestrial Cyanobacteria – A Source for Drug Discovery. *Current Drug Targets* 12: 1654–1673.
- Jüttner F., Watson B. S. (2007): Biochemical and Ecological Control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4395–4406.
- Jüttner F., Watson B. S. (2007): Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4395–4406.
- Kistler L. (2012): Ancient DNA Extraction from Plants. In: Shapiro B., Hofreiter M. (eds) *Ancient DNA: Methods in Molecular Biology*, pp. 71–79, Humana Press
- Kollár J., Pouličková A., Dvořák P. (2022): On the relativity of species, or the probabilistic to the species problem. *Molecular Ecology* 31: 411–418.
- Komárek J., Anagnostidis K. C. (2008): Part 1: Chroococcales In: Ettl H., Gerloff J., Heynig H., Mollenhauer D. (eds.) *Süwasserflora von Mitteleuropa*. pp. 1–556, Berlin.
- Kultschar B., Llewellyn C. (2018): Secondary Metabolites in Cyanobacteria. In: Vijayakumar R., Raja S. S. S. (eds.) *Secondary Metabolites: Sources and Application*. pp 23–26, Intech.
- Lawton L., Metcalf J., Zegura B., Junek R., Welker M., Torokné A., Bláha L. (2021): Laboratory analysis of cyanobacterial toxins and bioassays. 745–800.

- Lenz K. A., Miller T. R., Ma H. (2019): Anabaenopeptins and cyanopeptolins induce systemic toxicity effects in a model organism the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere* 214: 60–69.
- Mahmood N. A., Carmichael W. W. (1986): The pharmacology of anatoxin-a(s), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Toxicon* 24: pp. 425–434.
- Mareš J., Strunecký O., Bučinská L., Wiedermannová J. (2019): Evolutionary Patterns of Thylakoid Architecture in Cyanobacteria. *Frontiers in Microbiology* 10: 277.
- Mazel D., Houmard J., Castets M. A., Tandeau N. (1990): Highly Repetitive DNA Sequences in Cyanobacterial Genomes. *Journal of Bacteriology* 172: 2755–2761.
- Mazur-Marzec H, Fidor A, Cegłowska M, Wieczerek E, Kropidłowska M, Goua M, Macaskill J, Edwards C. (2018): Cyanopeptolins with Trypsin and Chymotrypsin Inhibitory Activity from the Cyanobacterium *Nostoc edaphicum* CCNP1411. *Mar Drugs* 16: 220.
- McKindles K. M., McKay R. M., Bullerjahn G. S. (2022): Genomic comparison of *Planktothrix agardhii* isolates from a Lake Erie embayment. *Plos One* 17: e0273454.
- Merel S., Walker D., Chicana R., Snyder S., Baurès E., Thomas O. (2013): State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International* 59: 303–327.
- Metcalf J. S., Codd G. A. (2012): Cyanotoxins. In: Whitton B. (eds) *Ecology of Cyanobacteria II*, pp. 651–675, Springer, Dordrecht.
- Monteiro P. R., Amaral S. C., Siqueira A. S., Xavier L. P., Santos A. V. (2021): Anabaenopeptins: What we know so far. *Toxins* 13: 522.
- Moya A., Oliver L. J., Verdú M., Delaye L., Arnau V., Bernaola-Galván P., Fuente R., Díaz W., Gómez-Martín C., González M F., Latorre A., Lebrón R., Román-Roldán R. (2020): Driven progressive evolution of genome sequence complexity in Cyanobacteria. *Scientific Reports* 10: 19073.
- Nikolouli K., Mossialos D. (2012): Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. *Biotechnology letters* 34: 1393–1403.

- Osswald J., Rellán S., Gago A., Vasconcelos V. (2007): Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin-a. *Environment International* 33: 1070–1089.
- Puddick J., Ginkel R., Page D. C., Murray S. J., Greenhough E. H., Bawater J., Selwood I. A., Wood A. S., Prinsep R. M., Truman P., Munday R., Finch C. S. (2021): Acute toxicity of dihydroanatoxin-a from *Microcoleus autumnalis* in comparison to anatoxin-a. *Chemosphere* 263: 127937.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M., Stainer R. Y. (1979): Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111: 1–61.
- Rouhiainen L., Paulin L., Suomalainen S., Hyytiäinen H., Buikema W., Haselkorn R., Sivonen K. (2002): Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Molecular Biology* 37: 156–167.
- Rounge T. B., Rohrlack T., Tooming-Klunderud A., Kristensen T., Jakobsen K. S. (2007): Comparison of Cyanopeptolin Genes in *Planktothrix*, *Microcystis*, and *Anabaena* Strains: Evidence for Independent Evolution within Each Genus. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7322–7330.
- Saeed H. K., Alsamak E. G., Haddad M. F. (2024): Draft Genome Sequencing of *Microcoleus* sp. HI-ES Isolated from Freshwater in Iraq: Cyanobacterial Strain. *Biomedical and Biotechnology Research Journal* 8: 129–134.
- Scarano F., Suresh D. M., Tiraboschi E., Cabirol A., Nouvian M., Nowotny T., Haase A. (2023): Geosmin suppresses defensive behaviour and elicits unusual neural responses in honey bees. *Scientific Reports* 13: 3851.
- Seemann T. (2014): Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30: 2068–2069.
- Shin J., Park Y., Kin N., Hwang S. (2022): Downstream Transport of Geosmin Based of Harmful Cyanobacterial Outbreak Upstream in a Reservoir Cascade. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19: 9294.
- Schantz E. J., Mold J. D., Stanger D. W., Shavel J., Riel F. J., Bowden J. P., Lynch J. M., Wyler R. S., Riegel B., Sommer H. (1957): Paralytic shellfish poison. VI. A procedure for the

isolation and purification of the poison from toxic clam and musel tissues. *Journal of the American Chemical Society* 79: 5230–5235.

Simm S., Schleiff E., Pernil R. (2017): The Cyanobacterial Core Genome: Global and Specific Features with a Focus on Secondary Metabolites. In: Los A. D. (eds) *Cyanobacteria: Omics and Manipulation*. Caister Academic Press, pp. 1–34, Moscow.

Singh P. S., Montgomery L. B. (2011): Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and morphology. *Trends in Microbiology* 19: 278–285.

Skoupý S., Stanojković A., Casamatta A. D., McGovern C., Martinović A., Jaskowiec J., Konderlová M., Dodoková V., Mikesková P., Jahodářová E., Jungblut D. A., Schalkwyk van H., Dvořák P. (2024): Population genomics and morphological data bridge the centuries of cyanobacterial taxonomy along the continuum of *Microcoleus* species. *iScience* 27: 109444.

Spoof L., Catherine A. (2016): Appendix 3: Tables of microcystins and nodularins. In Meriluoto J., Spoof L., Codd G. A. (eds) *Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin analysis*, pp. 526-537, UK.

Stachelhaus T., Walsh C. T. (2000): Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *Biochemistry* 39: 5775–5787.

Stanojković A., Skoupý S., Johannesson H., Dvořák P. (2024): The global speciation continuum of the cyanobacterium *Microcoleus*. *Nature Communications* 15: 2122.

Stanojković A., Skoupý S., Škaloud P., Dvořák P. (2022): High genomic differentiation and limited gene flow indicate recent cryptic speciation within the genus *Laspinema* (cyanobacteria). *Frontiers in Microbiology* 13: 977454.

Stanojković A., Skoupý S., Hašler P., Pouličková A., Dvořák P. (2022): Geography and climate drive the distribution and diversification of the cosmopolitan cyanobacterium *Microcoleus* (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *European Journal of Phycology* 57: 396–405.

Tee H., Wood S., Bouma-Gregson K., Lear G., Handley K. (2021): Genome Streamlining, Plasticity, and Metabolic Versatility Distinguish Co-occurring Toxic and Nontoxic Cyanobacterial Strains of *Microcoleus*. *mBio* 12: e0223521.

Tooming-Klunderud A., Rohrlack T., Kamran Shalchian-Tabrizi, Kristensen T., Jakobsen S. K. (2007): Structural analysis of a non-ribosomal halogenated cyclic peptide and its putative operon from *Microcystis*: implications for evolution of cyanopeptolins. *Microbiology* 153: 1382–1393.

Van Apeldoorn M. E., Van Egmond H. P., Speijers G. J. A., Bakker G. J. I. (2007): Toxins of cyanobacteria. *Molecular, Nutrition and Food Research* 51: 7–60.

Wang Z., Shao J., Xu Y., Yan B., Li R. (2015): Genetic Basis for Geosmin Production by the Water Bloom-Forming Cyanobacterium, *Anabaena ucrainica*. *Water* 7: 175–187.

Weise M., D'agostino M. P., Mihali K. T., Moffitt C. M., Neilan A. B. (2010): Neurotoxic Alkaloids: Saxitoxin and Its Analogs. *Marine Drugs* 8: 2185–2211.

Weissman J. K. (2009): Chapter 1 Introduction to Polyketide Biosynthesis. *Methods in Enzymology* 459: 3–16.

Wenzel C. S., Müller R. (2005): Formation of novel secondary metabolites by bacterial multimodular assembly lines: deviations from textbook biosynthetic logic. *Current Opinion in Chemical Biology* 9: 447–458.

Whitton A. B., Potts M. (2012): Introduction to the Cyanobacteria. In: Whitton B. (eds) *Ecology of Cyanobacteria II*, pp. 1–13, Springer, Dordrecht.

Willis A., Woodhouse N. J. (2020): Defining Cyanobacterial Species: Diversity and Description Through Genomics. *Critical Reviews in Plant Sciences* 39: 101–124.

Wolk C. P. (1965): Control of sporulation in a blue-green alga. *Developmental Biology*. 12: 15–35.

Wu Y. W., Simmons B. A., Singer S. W. (2016): MaxBin 2.0: an automated binning algorithm to recover genomes from multiple metagenomic datasets. *Bioinformatics* 32: 605–607.

Zaroubi L., Ozugergin I., Mastronardi K., Imfelt A., Law Ch., Gélinas Y., Piekny A., Findlay L. B. (2022): The Ubiquitous Soil Terpene Geosmin Acts as a warning Chemical. *Applied and Environmental Microbiology* 88: e00093–22.

Zhang Y., Duy S., Munoz G., Sauvé S. (2022): Phytotoxic effects of microcystins, anatoxin-a and cylindrospermopsin to aquatic plants: A meta-analysis, *Science of the total environment*. 810.

9 PŘÍLOHY

Tabulka 1: Seznam analyzovaných kmenů, jejich číslo, výskyt ve světě a naleziště

Kmen	Databázové číslo	Země původu	Habitat
A003_D6	JAUBWA000000000	Antarktida	půda
A006_D1	JAUBVZ000000000	Antarktida	mech
A2_C2	JAUBVY000000000	Antarktida	mech
A2_C3	JAUBVX000000000	Antarktida	mech
A2_C5	JAUBVW000000000	Antarktida	mech
A2_D2	JAUBVV000000000	Antarktida	mech
A2_D3	JAUBVU000000000	Antarktida	mech
A2_D5	JAUBVT000000000	Antarktida	mech
A6_C5	JAUBVS000000000	Antarktida	mech
A6_C6	JAUBVR000000000	Antarktida	mech
A6_D1	JAUBVQ000000000	Antarktida	mech
A6_D4	JAUBVP000000000	Antarktida	mech
AR_TQ3_B6	JAUBVJ000000000	Arizona (USA)	půda
ARI1_A1	JAUBVO000000000	Arizona (USA)	půda
ARI1_A2	JAUPTI000000000	Arizona (USA)	půda
ARI1_A3	JAUBVN000000000	Arizona (USA)	půda
ARI1_A4	JAUBVM000000000	Arizona (USA)	půda
ARI1_A5	JAUBVL000000000	Arizona (USA)	půda
ARI1_B5	JAUBVK000000000	Arizona (USA)	půda
AT10_A2	JAUBVI000000000	Řecko	půda
AT10_D2	JAUPTH000000000	Řecko	půda
AT13_A5	JAUBVH000000000	Řecko	půda
AT13A6	JAUBVG000000000	Řecko	půda
AT3_A2	JAUBVF000000000	Řecko	půda
AT3_D2	JAUBVE000000000	Řecko	půda
AT8_A3	JAUBVD000000000	Řecko	půda
AT8_A4	JAUBVC000000000	Řecko	půda
AT8_B1	JAUBVB000000000	Řecko	půda
AT8_B2	JAUBVA000000000	Řecko	půda
AT8_B4	JAUBUZ000000000	Řecko	půda

AT8_B5	JAUBUY000000000	Řecko	půda
AT8_B6	JAUBUX000000000	Řecko	půda
AT9_A2	JAUBUW000000000	Řecko	půda
AT9_A5	JAUBUV000000000	Řecko	půda
AT9_B4	JAUBUU000000000	Řecko	půda
AT9_B5	JAUBUT000000000	Řecko	půda
AT9b_C2	JAUBUS000000000	Řecko	půda
AT9b_C3	JAUBUR000000000	Řecko	půda
AT9b_C4	JAUBUQ000000000	Řecko	půda
AT9b_C5	JAUBUP000000000	Řecko	půda
Aus8_D1	JAUBUO00000000	Austrálie	půda
Aus8_D2	JAUBUN000000000	Austrálie	půda
Aus8_D3	JAUBUM000000000	Austrálie	půda
Aus8_D4	JAUBUL000000000	Austrálie	půda
B13_B4	JAUBUK000000000	Česká republika	louže
B13_B6	JAUBUJ000000000	Česká republika	louže
B3_A4	JAUBUI000000000	Česká republika	louže
B3_C5	JAUBUH000000000	Česká republika	louže
B3_D2	JAUBUG000000000	Česká republika	louže
B3_D3	JAUBUF000000000	Česká republika	louže
B3_D7*	JAUBUE000000000	Česká republika	louže
B4_C1	JAUBUC000000000	Česká republika	louže
B4_C2	JAUBUB000000000	Česká republika	louže
B4_C3	JAUBUA000000000	Česká republika	louže
B4_C5	JAUBTZ000000000	Česká republika	louže
B4_D4	JAUBTX000000000	Česká republika	půda
B4b_D2	JAUBUD000000000	Česká republika	louže
B4-D1	JAUBTY000000000	Česká republika	louže
B5_C4	JAUBTW000000000	Česká republika	louže
B5_D4	JAUBTV000000000	Česká republika	louže
B6_A1	JAUBTU000000000	Česká republika	louže
B7_D4	JAUBTT000000000	Česká republika	louže
B9_D4	JAUBTS000000000	Česká republika	louže
BR0_C5	JAUBTR000000000	Česká republika	louže

BRO_C3	JAUBTQ000000000	Česká republika	půda
C2_C3	JAUBTG000000000	Česká republika	půda
C2_C6	JAUBTP000000000	Česká republika	půda
C2_D2	JAUBTO000000000	Česká republika	půda
CZ3_B2	JAUBTN000000000	Česká republika	půda
CZ3_B4	JAUBTM000000000	Česká republika	půda
D2_18a_B4	JAUBTL000000000	Švédsko	louže
D2_18a_D3	JAUBTK000000000	Švédsko	louže
D2_B6	JAUBTJ000000000	Česká republika	louže
D3_18_C1	JAUBTH000000000	Švédsko	louže
D3_18_C4	JAUBTF000000000	Švédsko	louže
D3_18a_C4	JAUBTI000000000	Švédsko	louže
D3_18C2	JAUBTG000000000	Švédsko	louže
D3_18cC1	JAUBTE000000000	Švédsko	louže
F10_A1	JAUBTD000000000	Florida (USA)	půda
F10_A2	JAUBTC000000000	Florida (USA)	půda
F10_B2	JAUBTB000000000	Florida (USA)	půda
F10_B4	JAUBTA000000000	Florida (USA)	půda
F10_B5	JAUBDY000000000	Florida (USA)	půda
F10_B6	JAUBSZ000000000	Florida (USA)	půda
F10_C6	JAUBSY000000000	Florida (USA)	půda
F10_D1	JAUBTF000000000	Florida (USA)	půda
F4_D5	JAUBSX000000000	Florida (USA)	půda
F6_B3	JAUBSW000000000	Florida (USA)	půda
F6_B4	JAUBSV000000000	Florida (USA)	půda
F6_B5	JAUBSU000000000	Florida (USA)	půda
F6_B6	JAUBST000000000	Florida (USA)	půda
F6_C1	JAUBSS000000000	Florida (USA)	půda
F6_C2	JAUBSR000000000	Florida (USA)	půda
F8_A4	JAUBSQ000000000	Florida (USA)	půda
F8_C1	JAUBSP000000000	Florida (USA)	půda
F8_C2	JAUBSO000000000	Florida (USA)	půda
F8_C3	JAUBSN000000000	Florida (USA)	půda
F8_C4	JAUBSM000000000	Florida (USA)	půda

F8_C5	JAUBSL000000000	Florida (USA)	půda
F8_D1	JAUBSK000000000	Florida (USA)	půda
F8_D2	JAUBSJ000000000	Florida (USA)	půda
F8_D3	JAUBSI000000000	Florida (USA)	půda
K1_B1	JAUBSH000000000	Česká republika	půda
K1_B6	JAUBSG000000000	Česká republika	půda
K4_B3	JAUBSF000000000	Česká republika	půda
K4_C2	JAUBSE000000000	Česká republika	půda
K5_D4	JAUBSD000000000	Česká republika	půda
LAD1_D1	JAUBSC000000000	Ladakh (India)	půda
LAD1_D3	JAUBSB000000000	Ladakh (India)	půda
LAD1_D5	JAUBSA000000000	Ladakh (India)	půda
M2_A5	JAUBRZ000000000	Mauricius	louže
M2_B4	JAUBRY000000000	Mauricius	louže
M2_B5	JAUBRX000000000	Mauricius	louže
M2_C2	JAUBRW000000000	Mauricius	louže
M2_C4	JAUBRV000000000	Mauricius	louže
M2_C5	JAUBRU000000000	Mauricius	louže
M2_C6	JAUBRT000000000	Mauricius	louže
M2_D1	JAUBRS000000000	Mauricius	louže
M2_D2	JAUBRR000000000	Mauricius	louže
M2_D4	JAUBRQ000000000	Mauricius	louže
M2_D5	JAUBRP000000000	Mauricius	louže
MON1_C1	JAUBRO000000000	Montana (USA)	půda
MON1_C5	JAUBRN000000000	Montana (USA)	půda
MON1_D5	JAUBRM000000000	Montana (USA)	půda
MON2_D6	JAUBRL000000000	Montana (USA)	půda
MOST_C5	JAUBRK000000000	Česká republika	louže
N3_A4	JAUBRJ000000000	Norsko	půda
N9_A1	JAUBRI000000000	Norsko	louže
N9_A2	JAUBRH000000000	Norsko	louže
N9_A3	JAUBRG000000000	Norsko	louže
N9_A4	JAUBRF000000000	Norsko	louže
N9_B1	JAUBRE000000000	Norsko	louže

N9_B2	JAVBRD000000000	Norsko	louže
N9_B4	JAVBRC000000000	Norsko	louže
Pol1_B3	JAVBQG000000000	Polsko	půda
POL1_C1	JAVBQF000000000	Polsko	půda
Pol1_C5	JAVBQE000000000	Polsko	půda
Pol10_C6	JAVBRB000000000	Polsko	půda
Pol10_D4	JAVBRA000000000	Polsko	půda
Pol10_D6	JAVBQZ000000000	Polsko	půda
Pol11_C1	JAVBQY000000000	Polsko	půda
Pol11C2	JAVBQX000000000	Polsko	půda
Pol11C3	JAVBQW000000000	Česká republika	půda
Pol12_A4	JAVBQV000000000	Polsko	půda
Pol12_A5	JAVBQU000000000	Polsko	půda
Pol12_A6	JAVBQT000000000	Polsko	půda
Pol12_B3	JAVBQS000000000	Polsko	půda
Pol12_B4	JAVBQR000000000	Polsko	půda
Pol12_B5	JAVBQQ000000000	Polsko	půda
Pol14_C2	JAVBQP000000000	Polsko	půda
Pol14_C4	JAVBQO000000000	Polsko	půda
Pol14_C6	JAVBQN000000000	Polsko	půda
Pol14_D4	JAVBQM000000000	Polsko	půda
Pol14_D5	JAVBQL000000000	Polsko	půda
Pol14_D6	JAVBQK000000000	Polsko	půda
POL17_C1	JAVBQJ000000000	Polsko	půda
Pol17_C2	JAVBQI000000000	Polsko	půda
Pol17_C6	JAVBQH000000000	Polsko	půda
POL17_A1	JAVBQD000000000	Česká republika	louže
POL17_B1	JAVBQC000000000	Polsko	půda
POL17_B2	JAVBQB000000000	Polsko	půda
Pol18_C1	JAVBQA000000000	Polsko	půda
Pol18_C2	JAVBPZ000000000	Polsko	půda
Pol18_C6	JAVBPY000000000	Polsko	půda
Pol18_D1	JAVBPX000000000	Polsko	půda
Pol18_D6	JAVBPW000000000	Polsko	půda

S1_D4	JAUBPP000000000	Švédsko	půda
S11_D4	JAUBPV000000000	Švédsko	půda
S13_B4	JAUBPU000000000	Švédsko	půda
S13_C3	JAUBPT000000000	Švédsko	půda
S13_C4	JAUBPS000000000	Švédsko	půda
S13_C5	JAUBPR000000000	Švédsko	půda
S13_D1	JAUBPQ000000000	Švédsko	půda
S28_C3	JAUBPO000000000	Švédsko	louže
S36a_B3	JAUBPN000000000	Švédsko	půda
S36a_D1	JAUBPM000000000	Švédsko	půda
S36a_D3	JAUBPL000000000	Švédsko	půda
S36b_A2	JAUBPK000000000	Švédsko	půda
S36b_A3	JAUBPJ000000000	Švédsko	půda
S36b_A4	JAUBPI000000000	Švédsko	půda
S36b_B5	JAUBPH000000000	Švédsko	půda
S36bC1	JAUBPG000000000	Švédsko	půda
SVA1_A1	JAUBPF000000000	Špicberky	půda
SVA1_A4	JAUBPE000000000	Špicberky	půda
SVA1_B1	JAUBPD000000000	Špicberky	půda
SVA1_B3	JAUBPC000000000	Špicberky	půda
SVA1_B4	JAUBPB000000000	Švédsko	půda
SVA1_B6	JAUBPA000000000	Špicberky	půda
T2_B6	JAUBOZ000000000	Česká republika	louže
T3_A4	JAUBOY000000000	Česká republika	louže
T3_B1	JAUBOX000000000	Česká republika	louže
T3_B2	JAUBOW000000000	Česká republika	louže
T3_D1	JAUBOV000000000	Česká republika	louže
w1_18aA5	JAUPTE000000000	Švédsko	půda
w2_18aC4	JAUBOU000000000	Švédsko	půda
w2_18aC6	JAUBOT000000000	Švédsko	půda
w2_18bC1	JAUBOS000000000	Švédsko	půda
Z1_A1	JAUBOR000000000	Chorvatsko	louže
Z1_B2	JAUBOQ000000000	Chorvatsko	louže
Z1_B5	JAUBOP000000000	Chorvatsko	louže

Z1_C3	JAUBOO000000000	Chorvatsko	louže
Z1_C4	JAUBON000000000	Chorvatsko	louže
