

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zahradnictví



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Dekontaminace slámy obsahující aminopyralid
a pyroxsulam pomocí vybraných druhů hub**

Diplomová práce

Bc. Jana Březinová

Obor studia: Zahradnictví

Vedoucí práce: Ing. Ivan Jablonský, CSc.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Dekontaminace slámy obsahující aminopyralid a pyroxsulam pomocí vybraných druhů hub“ 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 14. 4. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce panu Ing. Ivanovi Jablonskému, CSc. za odborné konzultace, cenné rady a všestrannou pomoc, která mi byla poskytnuta při zpracovávání této diplomové práce. Velmi si vážím trpělivosti a lidského přístupu při konzultacích a při zakládání všech experimentů v průběhu celého roku. Dále bych chtěla poděkovat panu doc. Ing. Alešovi Hančovi, Ph.D. za odborné konzultace dílčího pokusu založeného v Červeném Újezdu. V neposlední řadě děkuji panu doc. Ing. Martinovi Koudelovi, Ph.D. za pomoc při zpracování statistických dat.

Na závěr bych chtěla vyjádřit velký dík mým rodičům, kteří mě podporovali během celého studia i při psaní této diplomové práce.

Dekontaminace slámy obsahující aminopyralid a pyroxsulam pomocí vybraných druhů hub

Souhrn

V konvenčním zemědělství jsou pro ošetření obilnin používány herbicidy Mustang Forte a Corello s účinnými látkami aminopyralid a pyroxsulam. Při aplikaci pojmou část herbicidů ošetřované plodiny nebo plevele. Zbývající část herbicidů se dostane do půdy, popřípadě se vyplaví do spodních vod. Rezidua těchto herbicidů mohou způsobovat problémy v následných plodinách pěstovaných na ošetřené ploše. Negativně ovlivněny mohou být i plodiny, které byly hnojeny, popřípadě mulčovány biomasou ošetřenou zmíněnými herbicidy. Mezi velmi citlivé plodiny na rezidua těchto herbicidů patří například rajčata, papriky, brambory a další. Na rizika spojená s rezidui upozorňují etikety a příbalové listy zmíněných herbicidů. Dále je v nich uvedeno, že sláma z porostů ošetřených přípravky Corello a Mustang Forte by se neměla užívat jako substrát k pěstování hub.

V rámci této diplomové práce bylo provedeno celkem 7 experimentů. Vybrané druhy hub byly kultivovány na agar-sládové půdě a na tekutých živných půdách s různými koncentracemi aminopyralidu. Dále byl testován vliv aminopyralidu a pyroxsulamu na růst mycelia vybraných druhů hub na slaměném substrátu a tvorbu plodnic hlívy ústřičné *Pleurotus ostreatus*. Poslední pokus byl zaměřen na vermikompostování vyplozeného substrátu hlívy ústřičné pomocí žížal *Eisenia andrei*.

Při kultivaci vybraných druhů hub na tekutých půdách se ukázal jako nejperspektivnější druh *Cladosporium herbarum*. Tento druh vytvořil největší biomasu mycelia a toleruje vysoké koncentrace aminopyralidu. Mycelium *Pleurotus ostreatus* kmen 'Spoppo' se projevil také jako velmi perspektivní. Zde došlo k výraznému přírůstku biomasy mycelia na variantách obsahujících různé koncentrace aminopyralidu na rozdíl od kontrolní varianty, ve které se aminopyralid nenacházel. Dále bylo zjištěno, že účinné látky aminopyralid a pyroxsulam nemají vliv na růst mycelia ve slámě. Za to mají významný vliv na výnos plodnic hlívy ústřičné. Nejvyšší výnos plodnic byl sklizen z variant ošetřených herbicidem Corello s účinnou látkou pyroxsulam. Nejnižší výnos plodnic byl sklizen z kontrolní varianty. Slaměný substrát kontrolních variant nebyl ošetřen žádným herbicidem. Při vermikompostování se ukázalo, že varianta ošetřená herbicidem Corello obsahovala největší počet žížal i kokonů *Eisenia andrei*.

Klíčová slova: Houby, herbicidy, aminopyralid, pyroxsulam, vermikompostování

Decontamination of straw containing aminopyralid and pyroxsulam using species of fungi

Summary

In conventional farming, the herbicides Mustang Forte and Corello with the active ingredients aminopyralid and pyroxsulam are used to treat cereal crops. When applied, part of the herbicides is taken up by the treated crop or weeds and the remainder of the herbicides reach the soil. Alternatively, they are washed into groundwater. Residues of these herbicides can cause problems in subsequent crops grown in the treated area. Crops that have been fertilised or mulched with biomass treated with these herbicides may also be adversely affected. Examples of crops that are very sensitive to residues of these herbicides include tomatoes, peppers, potatoes and others. The labels and package leaflets of these herbicides warn of the risks associated with residues. They also state that straw from crops treated with Corello and Mustang Forte should not be used as a substrate for growing mushrooms.

A total of 7 experiments were conducted as part of this thesis. Selected fungal species were cultivated on agar-slade soil and liquid nutrient soils with different concentrations of aminopyralid. Furthermore, the effect of aminopyralid and pyroxsulam on mycelial growth of selected fungal species on straw substrate and fruiting body formation of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* was tested. The last experiment was focused on vermicomposting of flattened oyster mushroom substrate using *Eisenia andrei* earthworms.

Cladosporium herbarum proved to be the most promising species when cultivating selected fungal species on liquid soils. This species produced the largest mycelial biomass and tolerated high concentrations of aminopyralid. The mycelium of *Pleurotus ostreatus* strain 'Spoppo' was also very promising. Here, there was a significant increase in mycelial biomass on the variants containing different concentrations of aminopyralid in contrast to the control variant, which did not contain aminopyralid. It was also found that the active ingredients aminopyralid and pyroxsulam had no effect on mycelial growth in straw. However, they had a significant effect on the yield of oyster mushroom fruiting bodies. The highest yield of fruiting bodies was harvested from the variants treated with Corello herbicide with the active ingredient pyroxsulam. The lowest fruit yield was harvested from the control variant. The straw substrate of the control variants was not treated with any herbicide. Vermicomposting showed that the variant treated with Corello herbicide contained the highest number of earthworms and *Eisenia andrei* cocoons.

Keywords: Fungi, herbicides, aminopyralid, pyroxsulam, vermicomposting

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Biologická degradace herbicidů	10
3.1.1 Bioremediace	11
3.1.1.1 Mykoremediace.....	12
3.1.1.2 Mykoremediace pesticidů	13
3.2 Aminopyralid	14
3.2.1 Poškození necílových plodin aminopyralidem	15
3.2.1.1 Kontaminace aminopyralidem ve Spojeném království.....	15
3.2.2 Toxicita pro savce	16
3.2.3 Doba rozkladu aminopyralidu	17
3.3 Pyroxsulam	17
3.4 Mustang Forte	18
3.5 Corello	19
4 Metodika	20
4.1 Materiál	20
4.1.1 Použité druhy hub.....	20
4.1.2 Slaměný substrát	20
4.1.3 Použité technické vybavení	20
4.1.4 Použité herbicidní přípravky a účinné látky.....	20
5 Metody	21
5.1.1 Kultivace vybraných druhů hub na agar-sladové půdě obohacené různými koncentracemi aminopyralidu.	22
5.1.2 Vliv aminopyralidu a pyroxsulamu na růst mycelia vybraných druhů hub na slaměném substrátu ve zkumavkách	23
5.1.3 Izolace mikrobiální populace schopné rozkládat účinné látky herbicidů Mustang Forte a Corello.....	25
5.1.4 Vliv různých koncentrací aminopyralidu na tvorbu biomasy vybraných druhů hub kultivovaných na tekutých živných půdách.	26
5.1.5 Zjištění vlivu přípravků Corello a Mustang Forte na tvorbu plodnic rodu <i>Pleurotus ostreatus</i> pěstované na substrátu z pšeničné slámy	29
5.1.6 Vermikompostování vyplozeného substrátu hlívy ústřičné (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	31
6 Výsledky	33

6.1	Výsledky kultivace vybraných hub <i>Trametes versicolor</i>, <i>Ganoderma lucidum</i>, <i>Irpex lacteus</i> a <i>Phanerochaete chrysosporium</i> na agaršladové půdě obohacené různými koncentracemi aminopyralidu	33
6.1.1.1	Vyhodnocení v programu Statistica	34
6.2	Výsledky kultivace vybraných hub <i>Dipodascus geotrichum</i>, <i>Cladosporium herbarum</i> a <i>Pleurotus ostreatus</i> kmenů 'Ivory' a 'Spoppo' na agaršladovém a obohaceném různými koncentracemi aminopyralidu	35
6.2.1	Vyhodnocení v programu Statistica.....	36
6.3	Výsledky vlivu aminopyralidu a pyroxsulamu na růst mycelia vybraných druhů hub na slaměném substrátu ve zkumavkách	38
6.3.1	Vyhodnocení v programu Statistika.....	39
6.4	Výsledky vlivu různých koncentrací aminopyralidu na tvorbu biomasy kmenu <i>Pleurotus ostreatus</i> HK35 kultivovaného na tekutých půdách	41
6.4.1	Vyhodnocení v programu Statistica.....	42
6.5	Výsledky vlivu různých koncentrací aminopyralidu na tvorbu biomasy vybraných kmenů hub kultivovaných na tekutých živných půdách.....	43
6.5.1	Vyhodnocení v programu Statistica.....	47
6.6	Zjištění vlivu přípravků Corello a Mustang Forte na výnos plodnic <i>Pleurotus ostreatus</i> pěstované na substrátu z pšeničné slámy	50
6.6.1	Vyhodnocení v programu Statistica.....	52
6.7	Výsledky vermikompostování vyplozeného substrátu hlívy ústřičné (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	53
7	Diskuze.....	56
8	Závěr	60
9	Literatura	61
10	Samostatné přílohy.....	I

1 Úvod

„Člověk, který se přičinil, aby rostly dva klasy tam, kde dosud rostl jeden, vykonal více pro blaho pozemské, než všichni politikové a filozofové dohromady.“ Jonathan Swift

Zemědělská produkce potravin, krmiv a biomasy je nerozlučně svázána s používáním herbicidů, fungicidů a insekticidů. Celosvětově se každý rok spotřebuje 3,3 milionů tun pesticidů, z toho cca 420 tis. tun v Evropě (FAO, 2021) a 4,8 tis. tun v ČR. (ÚKZÚZ, 2021)

Názory v této oblasti bývají společností velmi polarizované. Používání pesticidů je oprávněně odůvodňováno potřebou zajistit uspokojivou kvantitu a kvalitu potravin a krmiv. Zároveň ale představuje jeden z největších vstupů potenciálně nebezpečných látek do půdy, vody, ovzduší a plodin. I když jsou pesticidy používány dle příslušných nařízení, jen malá část zasahuje cíle, zatímco převládající část aplikovaného množství se stává krátkodobým, či dlouhodobým kontaminantem životního prostředí s celou řadou možných negativních vlivů. (Hofman, 2018)

V zemědělství je zaměstnáno kolem 1 % obyvatelstva, tím pádem je interakce mezi zemědělcem a konečným spotřebitelem velice zřídka. Konečný spotřebitel si tak snadněji utvoří názor z mediálního prostoru než ze styku s reálným prostředím.

V ČR jsou nejrozšířenější skupinou pěstovaných plodin obilniny. Ty se zde pěstují na výměře zhruba 1,6 mil ha. Z čehož každoročně 1,3 mil. ha činí výměra pšenice a ječmene. (Eagri, 2022). Herbicidní ochrana je tak nedílnou součástí pěstitelských technologií a patří k jednomu z nejdůležitějších agrotechnických opatření sloužících k zajištění optimálního výnosu a kvalitní produkce. V současné době existuje na trhu celá řada kombinovaných nebo širokospektrálních herbicidů, které agronomům umožní komfortní zajištění ochrany proti širokému plevelnému spektru včetně problematických vytrvalých plevelů. Druhá strana mince jsou ovšem rezidua, která na problematických půdách mohou působit i několik let po aplikaci. Pro samotné zemědělce jsou nejvýznamnější ta rezidua herbicidů v půdě, která mohou omezovat klíčení a růst následných plodin. Zvláště citlivé jsou například luskoviny, řepka a celá řada zelenin, které v případě krátkého časového odstupu mohou být výrazně poškozeny. Tato práce se zabývá konkrétně dvěma herbicidy – Mustang Forte a Corello s účinnými látkami aminopyralid a pyroxsulam. Tyto látky brzdí růst některých rostlin na stejném principu jako auxiny. Jejich aplikace probíhá na jaře ve velmi nízkých koncentracích. Část účinných látek dopadne na kulturní plodiny a plevele a zbývající část herbicidů se dostává do půdy, případně do spodních vod. Právě zasažené plodiny (v našem případě pšenice a ječmen) bývají zdrojem reziduí nejčastěji a způsobují problémy v následných plodinách nebo v plodinách, kde je využíváno biomasy k hnojení nebo mulčování. Velmi citlivé plodiny k těmto látkám jsou například brambory, rajčata nebo papriky, které by neměly být hnojeny hnojem ani komposty, pro jejichž výrobu byly použity organické materiály ošetřené těmito herbicidy. Často je velmi obtížné dodržet doporučení na etiketě, neboť sláma je získávána od různých dodavatelů a není možné zajistit 100% jistotu nepřítomnosti těchto účinných látek. S tím se setkávají například pěstitelé jahod, kteří slámu užívají k mulčování jahodníku.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Současná konvenční zemědělská praxe se bez pesticidů neobejde. V celosvětovém měřítku se tak do půdy dostávají tuny pesticidů, jejichž rezidua způsobují problémy i několik let po aplikaci. Tato práce se zabývá dvěma konkrétními herbicidy Corello a Mustang Forte, které se používají v obilovinách v boji proti dvouděložným plevelným druhům.

Sláma z obilnin se využívá pro výrobu substrátu na pěstování hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*). V praxi není prakticky možné mít 100% jistotu, že sláma nebyla ošetřena těmito herbicidy, neboť ve valné většině sláma pochází právě od tuzemských konvenčních zemědělců. Na etiketách přípravků Corello a Mustang Forte je uvedeno, že slámu z porostů ošetřených těmito přípravky není vhodné používat pro pěstování hub, což evokuje otázku, jakým způsobem a s jakými dopady na výnos ovlivňuje aminopyralid a pyroxsulam růst a vývoj plodnic hub?

Hypotéza: Některé kultury hub jsou schopné urychlit rozklad aminopyralidu a pyroxsulamu ve slámě.

V rámci této diplomové práce bylo zpracováno několik pokusů, jejichž cílem bylo:

- Zjištění vlivu přípravků Corello a Mustang Forte na tvorbu plodnic rodu *Pleurotus ostreatus* pěstovaných na substrátu na bázi pšeničné slámy ošetřené těmito přípravky.
- Zjištění vlivu různých koncentrací aminopyralidu na růst mycelia hub, které byly kultivovány na agaršlakovém mediu na Petriho miskách.
- Zjištění vlivu různých koncentrací aminopyralidu na tvorbu biomasy určitých druhů hub, které byly kultivovány na tekutých půdách v Erleynmayerových baňkách.
- Zjištění vlivu přítomnosti účinných látek aminopyralidu a pyroxsulamu v substrátu na bázi pšeničné slámy na růst mycelia vybraných druhů hub ve zkumavkách.
- Poslední pokus byl zaměřen na vermikompostování, ve kterém hrály hlavní roli žížaly rodu *Eisenia andrei*. Zde bylo cílem zjistit, jaký vliv mají účinné látky aminopyralid a pyroxsulam na vývoj a počty žížal odebíraných ve vyplozeném substrátu na bázi pšeničné slámy. V tomto pokusu bylo více proměnných, než by bylo optimální, nicméně posledním cílem tohoto pokusu bylo zjistit, jak se mění obsah reziduí účinných látek aminopyralidu a pyroxsulamu v čase v průběhu vermikompostování.

3 Literární rešerše

3.1 Biologická degradace herbicidů

Na degradaci herbicidu po aplikaci má vliv mnoho faktorů. Rychlost degradace pesticidů v půdě je nejvíce závislá na půdní vlhkosti a teplotě. Pesticidy mohou být rozloženy jednoduchými chemickými procesy, jako například hydrolýzou. Ovšem daleko důležitější pro degradaci herbicidu v půdě jsou pochody řízené mikroorganismy. Degradální procesy v půdě jsou představovány transformací molekuly postupným odbouráváním nebo inaktivací fototoxických částí (toxoforů) molekuly. (Jursík a kol., 2018)

Perzistence je schopnost herbicidů zůstat v aktivní formě v půdním prostředí po dobu, která je zapotřebí k jejich rozkladu. V ideálním případě by měl herbicid aplikovaný do půdy nebo na její povrch setrvávat v půdě takovou dobu, jaká je zapotřebí jeho působení na plevel. Ale ne tak dlouho, aby jeho rezidua ovlivňovala následné plodiny.

Půdní mikroorganismy jsou pro degradaci herbicidů v půdě zcela zásadní. Biodegradace je dekompoziční jev řízený populacemi mikroorganismů (hlavně bakterie, aktinomycety, houby), které díky své aktivitě a diverzitě tvoří kompletní půdní mikroflóru. Aktivita těchto organismů je ovlivněna především půdní vlhkostí, půdní teplotou, obsahem organické hmoty, pH půdy obsahem kyslíku a zásobeností živinami. V suché, chladné a na živiny chudé půdě se mikrobiální aktivita organismů výrazně snižuje. Podobně jako při nedostatku kyslíku v půdě. Tím pádem na utužených půdách nebo po vytvoření půdního škraloupu bývá degradace herbicidů nejobtížnější a nejpomalejší. (Jursík a kol., 2018)

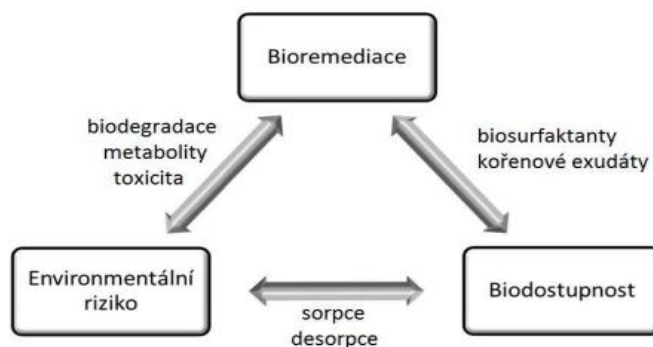
Mikroorganismy mají schopnost degradovat širokou škálu chemikálií. Počínaje od jednoduchých sacharidů, polysacharidů, aminokyselin, tuků a bílkovin, až po komplexní materiály, jakými jsou například rostlinná rezidua, vosky a gumy, přičemž jsou rovněž schopny degradovat syntetické sloučeniny, tedy i pesticidy. Mikroorganismy využívají účinnou látku jako energetický substrát nebo enzymaticky pozměňují její strukturu. Z toho je patrné, že mikrobiální aktivita půdy značně ovlivňuje rychlost degradace reziduí herbicidů. Na půdách s nízkou mikrobiální aktivitou je rozklad herbicidu pomalý a riziko poškození následné plodiny velmi vysoké. (Jursík a Soukup, 2022)

3.1.1 Bioremediace

Bioremediace je proces, který umožňuje působením vybraných druhů mikroorganismů (bakterií, hub, plísní a řas, či jejich enzymů) přeměňovat toxické, či rizikové látky z životního prostředí na netoxické a nerizikové. Do životního prostředí je každým rokem uvolňováno velké množství organických látek, které mohou být pro živé organismy velmi nebezpečné. Velký podíl na tom má také intenzivní zemědělství, které má za následek hromadění pesticidů v půdě. To dalo impuls k intenzivní studii rozkladu těchto látek a hledání cest, kterými by bylo možné tyto nebezpečné látky z půdy a prostředí odbourat. Kromě pesticidů se v půdě a prostředí vyskytuje celá řada průmyslově vyráběných sloučenin tzv. polutantů.

Odstranění polutantů z prostředí není vůbec snadné. Fyzikální a chemické metody jsou finančně nákladné, mnohdy nevhodné a technologicky často neproveditelné. V posledních letech se tak stále častěji využívají metody bioremediační. Nejsou tak finančně nákladné a často jsou ekologicky šetrnější. Nicméně časově jsou mnohem náročnější, mají rozdílnou účinnost a určité druhy polutantů nejsou schopné rozložit vůbec. (Borja a kol., 2005) Bioremediace může probíhat v půdě nebo spodní, či odpadní vodě. Houby bývají součástí aktivovaného kalu v ČOV, kde mimo jiné hrají rozhodující úlohu bakterie.

Úspěch bioremediace nelze vyhodnotit pouze na základě počáteční a koncové koncentrace polutantů. Je to komplikovaný proces, který závisí na mnoha faktorech. Ty by měly být kriticky zhodnoceny před, během i po remediačním zásahu. Bioremediace jsou založeny převážně na principu stimulace půdní mikroflóry. Pro degradaci vysoce perzistentních polutantů se hledají specifické organismy. Slibně se rozvíjející metodou, na které pracuje mnoho odborníků po celém světě, je mykoremediace pomocí dřevobytných ligninolytických hub. Tyto houby produkují extracelulární enzymy, jako například: lignin peroxidasu, mangan-dependentní peroxidasu a lakázu. Ty se mohou podílet na degradaci perzistentních polutantů. Z nejrůznějších experimentů vyplynulo, že jednotlivé ligninolytické houby mají různou degradační účinnost. Např. *Pleurotus ostreatus* efektivně rozkládal polychlorované bifenyly i chlorbenzoové kyseliny. Naopak fluorochinolonová antibiotika byla nejrychleji degradována houbami *Trametes versicolor* a *Irpex lacteus*. (Čvančarová, 2014)



Obrázek 1 Obecné faktory ovlivňující bioremediaci (zdroj: Čvančarová, 2014)

3.1.1.1 Mykoremediace

Jedním z organismů, které účinně degradují polutanty, jsou dřevobytné houby – respektive skupina hub bílé hniloby. Tyto organismy jsou někdy označovány jako ligninolytické houby a představují skupinu asi 2000 organismů charakterizovaných schopností účinně mineralizovat lignin pomocí extracelulárních enzymů. Patří mezi ně především bazidiomycety rodu *Pleurotus*, *Phanerochaete*, *Trametes*, *Stereum*, *Fomes*. (Gabriel a Novotný, 2014)

Rozklad organických polutantů může probíhat:

- Ex situ – Jedná se o modifikovanou fermentaci v bioreaktorech.
- In situ – Jedná se o inokulaci hub (nebo jejich enzymů z nich izolovaných) na konkrétní plochy. Nebo se využívají druhy přirozeně se vyskytující na tom místě. V zásadě se jedná o navození optimálních podmínek pro růst a metabolismus autochtonních druhů. Inokulum je vhodné přenést na pevném substrátu, který je zároveň zdrojem uhlíku a udrží alespoň po určitou dobu vlhkost. Také je důležité, aby tento substrát šel snadno promístit s „cílovou“ zeminou. Nejčastěji se používá sláma, piliny, štěpka a pro houby schopné růst na kůře také kůra. V ideálním případě je využíváno již vypleného substrátu od velkopěstitelů hub (commercial mushroom compost – CMC, případně spent mushroom compost – SMC). Tento „odpadní“ materiál je téměř zadarmo a zároveň už obsahuje mycelium použitelných hub. Například *Pleurotus ostreatus*. (Hrouda, 2017)

Názory, jakým způsobem vpravit inokulum do kontaminované půdy se velmi liší. V úvahu připadá půdy promíchat s inokulem, klást ve vrstvách nebo využít tzv. „mesh tubes“. Jedná se o trubky, které mají místo stěny pletivo z plastové sítě, takže mycelium z nich může volně prorůst do okolní půdy. Ovšem aplikovat tyto metody na rozsáhle zamořené plochy může být technicky velmi náročné.

Příklady druhů vhodných k mykoremediaci:

- *Pleurotus ostreatus* se osvědčila jako účinný druh vhodný k rozložení celé řady organických polutantů, které mají podobnou strukturu jako celulóza a lignin. Například ropné produkty nebo pesticidy. (Hrouda, 2017)
- *Phanerochaete chrysosporium* – Tento kornatec produkuje enzymy, díky nimž rozkládá aromatické a těžko odbouratelné heterocyklické uhlovodíky. Ty jsou obsaženy v řadě kosmetiky, barvivech v textilním a kožedělném průmyslu. (Hrouda, 2017)
- *Trametes versicolor* byl vyhodnocen jako nejslibnější kmen pro degradaci endokrinně disruptivních látek (hormony – testosteron, estrogen) v tekutých médiích i na pevném substrátu. (Křesinová, 2013)

- *Cladosporium sphaerospermum* je schopen rozkládat monocyklické aromatické uhlovodíky (benzen, toluen – rozpouštědla, tuky, oleje). (Weber a kol., 1995)

Biodegradační potenciál ligninolytických hub dosud není adekvátně využíván. Jedním z důvodů je potřeba podrobného poznání a optimalizace složitého degradačního procesu. Dalším krokem je vývoj vhodných technologických zařízení a v neposlední řadě výběr vhodných kmenů těchto hub. Vybrané kmeny musí být schopné rychle a účinně rozkládat polutanty, dobře kolonizovat materiály nosičů a vytvářet na nich trvanlivé a funkční biofilmy. Musí být také odolné k toxickému působení polutantů, kterých může být v půdě více typů organismů s různými vlastnostmi. Biodegradace ligninolytickými houbami mají velký remediační potenciál. Nicméně k vytvoření efektivní remediační techniky je zapotřebí dalšího komplexního výzkumu, který povede ke snížení enviromentálního rizika na kontaminovaných lokalitách. (Gabriel a Novotný 2014)

3.1.1.2 Mykoremediace pesticidů

Chemické látky přítomné v pesticidech jako glyfosát, endosulfan, aldrin a fipronil jsou hlášeny jako karcinogenní, neurotoxické a způsobující poškození jater a ledvin. Kvůli jejich škodlivým vedlejším účinkům je většina těchto chemikálií buď zakázána, nebo přísně omezena. Chemikálie, jako například DDT, aldrin nebo dieldrin, mohou díky své stabilitě přetrvávat v životním prostředí i několik let. Pesticidy tak mohou kontaminovat vodu nebo se hromadit v půdě, vstupovat do potravního řetězce a ovlivňovat mikroorganismy, rostliny i lidi. Pro degradaci těchto toxických sloučenin byly vyzkoušeny nejrůznější strategie od chemického zpracování až po spalování. Tyto metody mají však určitá omezení, díky kterým jsou v praxi prakticky nepoužitelné. Mykoremediace se tak jeví jako přijatelná a ekologická alternativa. (Cajthaml, 2018)

Různé studie prokázaly schopnost různých druhů hub akumulovat a odstraňovat herbicidy a insekticidy z prostředí. Tyto studie byly zaměřeny především na druhy přirozeně se vyskytující na kontaminovaných lokalitách.

Aspergillus tamarii a *Botryosphaeria laricina* jsou druhy izolovány z lokality kontaminované endosulfanem. (Insekticid používaný do 50. let 20. stol. je hormonálně aktivní, perzistentní a dnes již zakázaná látka.) Prokázalo se, že jsou schopny degradovat toxickou látku a její škodlivé metabolity tím, že je používají jako zdroj uhlíku a energie. (Silambarasan a Abraham, 2013)

Aspergillus glaucus je schopen degradovat fipronil a jeho metabolit fipronil sulfon. Fipronil je širokospektrální insekticid, který vykazuje u savců vysokou toxicitu při orálním požití. (Gajendiran a Abraham, 2017)

Enzymy z *Trametes maxima* a *Paecilomyces carneus* byly schopny degradovat 100 % atrazinu na jílovito-hlinitých půdách. Atrazin je herbicid určený k hubení dvouděložných

plevelů v porostech kukuřice. Pro člověka poměrně málo toxický, ovšem působí na hormonální systém. (Chan-Cupul a kol., 2016)

Penicillium spiculisporus, *Aspergillus flavus* a *Penicillium verruculosum* účinně degradují sloučeninu glyfosát. (Širokospektrální systémový herbicid a desikant.) (Akhtar a Mannan, 2020)

Pleurotus ostreatus je schopna degradovat aldrin a jeho hlavní metabolit dieldrin. Insekticid, který byl v 70. letech minulého století ve většině zemí zakázán. Vlivem bakterií a slunečního záření je rozkládán na dieldrin. Ve vodě je v podstatě nerozpustný a sedimentuje. V půdě je pevně vázán a může odtud přecházet do potravin. (Akhtar a Mannan, 2020)

3.2 Aminopyralid

Aminopyralid je selektivní herbicid na bázi pyridin-karboxylové kyseliny. Je netěkavý a snadno rozpustný ve vodě. Tato látka má systémový, postemergentní a širokospektrální účinek. Účinně hubí celou řadu klíčových jednoletých, dvouletých i vytrvalých druhů plevelů. Převážně však dvouděložných, včetně invazivních druhů. (Lewis a kol., 2016)

Poprvé byl registrován k použití v roce 2005 v USA pod obchodním názvem „Milestone“ společností Dow AgroSciences.

Aminopyralid se úspěšně používá k ošetření porostů obilovin, řepky, na pastvinách nebo při regulaci plevelů v trvalých travních porostech.

Aminopyralid působí jako syntetický auxin. Citlivé plevele krátce po aplikaci zastavují svůj růst. Dochází k deformaci a dekoloraci listů a lodyh plevelů. Zasažené citlivé plevele přestávají konkurovat obilnině a začínají postupně odumírat. První symptomy jsou viditelné za 2–6 dnů po aplikaci a během následujících 4–6 týdnů dochází k postupnému úhynu plevelů. Teplo a vyšší vzdušná vlhkost urychlují účinek přípravku. (Spáčilová, 2016)

V České republice jsou registrovány tyto přípravky obsahující aminopyralid: (Agromanuál, 2021)

1. Blast
2. Bonaxa
3. Galera Podzim
4. Hurricane
5. Kantor plus
6. Metazamix
7. Mustang Forte

3.2.1 Poškození necílových plodin aminopyralidem

Aminopyralid je látka inhibující růst některých necílových rostlin, mezi něž patří brambory, rajčata, jahody, hrách, fazole a jiné luštěniny, mrkev, pastinák, salát a další. Tyto plodiny deformuje a výrazně snižuje jejich výnosy.

Nejčastějším zdrojem reziduí bývají právě ošetřené porosty. Mohou způsobovat problémy v následných plodinách nebo v plodinách, ze kterých je využíváno organických materiálů ošetřených těmito herbicidy (sláma, travní biomasa). Nejcitlivější k těmto látkám je čeleď lilkovitých (brambory, rajčata, papriky). Ty by vůbec neměly být hnojeny hnojem ani komposty, pro jejichž výrobu byly použity organické materiály ošetřené těmito herbicidy. (Jursík a Soukup, 2022)

V případě zahraničního registrovaného přípravku „Milestone“, který se prodává v různých obměnách pod různými obchodními názvy, je možné aplikovat tuto látku také do trvalých travních porostů a na pastviny. Hospodářská zvířata pasoucí se na takto ošetřených porostech produkují výkaly, které obsahují rezidua aminopyralidu. Zmíněná látka projde trávicím traktem a prakticky v nezměněné podobě je vyloučena ven.

Na etiketách herbicidů obsahujících účinnou látku aminopyralid lze vyčíst varování, aby se nepoužívala chlévská mrva od hospodářských zvířat pasoucích se na ošetřených porostech tímto herbicidem. Hrozí zde totiž riziko poškození následných plodin v případě, že rostlinný materiál v chlévské mrvě nebude zcela rozložen.

Mezi typické příznaky poškození necílových plodin patří zdeformované listy baňkovitého vzhledu nebo listy zkroucené do podoby připomínající kapradí. Jakmile jednou dojde k poškození, je to nevratný proces a není možné tento proces nijak zvrátit. Mezi další náchylné plodiny patří také jeteloviny, které jsou citlivé na vyšší koncentraci aminopyralidu. Také se nedoporučuje mulčování jahodníku slámou, která byla takto ošetřena již zmíněným způsobem. (HSE, 2019)

Riziko poškození následných plodin rezidui herbicidů je do značné míry ovlivňováno podmínkami stanoviště, především půdními vlastnostmi a pro dané místo typickým klimatem. Pěstitelé si v těchto oblastech musí být vědomi vyššího rizika a věnovat více pozornosti výběru herbicidu, jeho dávky, sledům plodin a doprovodné agrotechnice. Znalost působení herbicidů v půdě, jejich vhodný výběr a dodržování pokynů z etiket ohledně zařazování následných plodin je stěžejní záležitostí. Rezidua v půdě nemusí vždy způsobovat jen nezejítí porostu, či jeho fatální poškození. Častější bývají subletální vlivy, které bývají příčinou jinak těžko vysvětlitelného nízkého výnosu oproti srovnatelnému okolí. Pokud pěstitel tyto problémy má, měl by kromě jiného zrevidovat i historii používání herbicidů v osevním postupu a zamyslet se nad případnými nedostatky. (Jursík a Soukup, 2022)

3.2.1.1 Kontaminace aminopyralidem ve Spojeném království

V roce 2008 se zelináři a farmáři ve Spojeném království potýkali s velkým problémem kontaminace plodin aminopyralidem. Ten pocházel z hnoje od místních farmářů, jejichž

dobytek se pásal na pastvinách ošetřených aminopyralidem. Kontaminace způsobila rozsáhlé škody jak u zahrádkářů, tak u velkých pěstitelů.

Látka se mohla do hnoje dostat dvěma způsoby:

1. Z podestýlky obsahující slámu, která byla na počátku svého růstu ošetřena herbicidem.
2. Z chlěvské mrvy, pocházející ze zvířat, která se pásala na pastvinách ošetřených herbicidem obsahujícím aminopyralid.

Po prvních zprávách o rozsáhlých škodách zahájilo Ředitelství pro regulaci chemikálií CRD (Chemicals Regulation Directorate) šetření. Vzorky hnoje, ošetřené půdy a zasažených rostlin byly odebrány a analyzovány. Ukázalo se, že vzorky plodin obsahovaly stopová množství aminopyralidu 0,02 miligramu na kilogram. Na základě tohoto šetření Společnost Dow AgroSciences okamžitě pozastavila prodej a používání herbicidu, nicméně nedostatečná informovanost široké veřejnosti o problematice této účinné látky již napáchala své škody. CRD vydalo zprávu, ve které veřejnost informuje o možném nežádoucím riziku hnojení citlivých plodin chlěvským hnojem obsahujícím rezidua aminopyralidu. Od té doby jsou na etiketách produktů obsahující aminopyralid varování, která doporučují nehnojit hnojem se zbytkovým obsahem aminopyralidu citlivé plodiny, dokud se rostlinný materiál zcela nerozloží. Pokud se hnůj aplikuje dříve, než se rostlinný materiál rozloží, může dojít k nežádoucímu poškození náchylných plodin. (HSE, 2011)

Aminopyralid byl ve Spojeném království znovu schválen jako účinná látka 6. října 2009. Znovuzavedení bylo schváleno s novými doporučeními a přísným programem dozoru, který byl navržen tak, aby za těchto podmínek nedocházelo k neúmyslnému přesunu hnoje obsahující aminopyralid z farem. Navrhovaná opatření by měla zabránit tomu, aby chlěvská mrva obsahující stopové množství aminopyralidu neopustila farmu, kde byla vyprodukována a nebyla distribuována do okolních farem. Rostlinný materiál podezřelý z kontaminace aminopyralidem nesmí být používán ke kompostování ani mulčování. (HSE, 2011)

3.2.2 Toxicita pro savce

Při testování toxicity aminopyralidu byly učiněny pokusy s potkany, kterým byla podávána tato účinná látka až 1000 mg/kg/den. Pozorování byli jak rodiče, tak jejich potomstvo. Z výsledků vyplývá, že ani takto vysoké dávky aminopyralidu nezpůsobují jakoukoli toxicitu pro rodiče, ani potomstvo.

Na pokusech s králíky bylo při podání velmi vysoké dávky pozorováno snížení tělesné hmotnosti a nekoordinovanost chůze. Aminopyralid byl taktéž negativní při studiích mutagenity.

Aminopyralid se ukázal jako prakticky netoxický pro ptáky, ryby, včely, žížaly a vodní bezobratlé. (Anonym, 2011)

Dle dokumentů EPA (United States Environmental Protection Agency) o akutní toxicitě má aminopyralid nízkou toxicitu při orálním, dermálním i inhalačním podání. Nicméně forma volné kyseliny aminopyralidu způsobuje silné podráždění očí. (EPA, 2021)

Aminopyralid nevykazuje žádnou toxicitu pro savce. CRD (Chemicals Regulation Directorate ředitelství pro regulaci chemikálií) ve své zprávě uvedlo, že i kdyby byla chlěvská mrva obsahující aminopyralid použita k hnojení zeleniny nebo jiných plodin, tak vypěstované produkty nemají žádné negativní účinky na lidské zdraví, ani zdraví zvířat. Za předpokladu, že chlěvská mrva pocházející ze zvířat, která byla krmena pouze takto ošetřeným krmivem (pastviny, seno, + sláma z podestýlky) a rostliny by absorbovaly veškerý přítomný aminopyralid, který by přes trávicí trakt přes výkaly putoval až do hnoje. A touto chlěvskou mrvou by byly hnojeny plodiny – zelenina atd. Ani nejvyšší rezidua by neměla vyvolávat obavy o zdraví a zelenina by mohla být bezpečně konzumována. (HSE, 2011)

3.2.3 Doba rozkladu aminopyralidu

Aminopyralid v půdách zůstává poměrně dlouho. Průměrná doba rozkladu je 103 dní. Definitivně se však rozloží do 533 dní. Aminopyralid je rozpustný ve vodě a má vysokou pohyblivost v půdě, přičemž může kontaminovat podzemní vody. Ve vodě je aminopyralid velmi stabilní, ovšem na světle je jeho odhadovaná doba rozkladu 14–15 hodin. V půdě se aminopyralid rozkládá velmi málo. Očekává se, že hlavním způsob degradace bude díky mikrobiální aktivitě. Ovšem jak je známo, mikrobiální aktivita je v některých půdách velmi pomalá nebo téměř žádná. Zejména v nižších vrstvách půdního profilu tato aktivita téměř ustává. Rozklad probíhá zejména za aerobních podmínek. Ve vodních ekosystémech může doba rozkladu přesahovat déle než rok. (Anonym, 2011)

3.3 Pyroxsulam

Pyroxsulam patří do třídy triazolopyrimidin sulfonamidů. Jedná se o selektivní, postemergentní herbicid používaný v pšenici, žitu a tritcale. Je nehořlavý, nekorozivní a netěkavý. Herbicid proniká do rostlin povrchem listů a lodyh a je rychle rozváděn floémem a xylemem do meristematických tkání. Pyroxsulam inhibuje produkci enzymu ALS (acetolaktátsyntázu), který je nezbytný pro syntézu aminokyselin. V důsledku inhibice produkce aminokyselin rostliny zastavují svůj růst. Po aplikaci herbicidu nemusí být účinek patrný ihned. Odumírání plevelů je obvykle patrné do 3 týdnů po aplikaci v závislosti na podmínkách růstu a citlivosti daného druhu plevelu. Dojde k deformaci, dekolraci a plevel přestává konkurovat obilnině a postupně odumírá. (Agrobase 2021)

Pyroxsulam má nízkou orální, dermální i inhalační toxicitu. Nedráždí oči ani pokožku. Pyroxsulam není mutagenní, ani karcinogenní. (EPA,2021)

3.4 Mustang Forte

Mustang Forte je herbicidní přípravek ve formě suspenzní emulze určený k postemergentnímu hubení širokého spektra dvouděložných plevelů v pšenici ozimé, ječmeni ozimém, tritikale ozimém, pšenici jarní, ječmeni jarním a ovsu setém. Přípravek je registrován společností Dow AgroSciences s.r.o. Přípravek obsahuje 3 účinné látky – aminopyralid náležící do skupiny pyridinkarboxylových kyselin, florasulam náležící do skupiny triazolopyrimidinů a 2,4-D náležící do skupiny fenoxycarboxylových kyselin. (Agromanuál, 2021)

Mezi citlivé plevele patří:

- heřmánkovec přímořský – *Tripleurospermum maritimum*
- kokoška pastuší tobolka – *Capsella bursa pastoris*
- penízek rolní – *Thlapsi arvense*
- ptačinec žabinec – *Alsinula media*
- pcháč oset – *Cirsium arvense*
- svízel přítula – *Galium aparine*
- violka trojbarevná – *Viola tricolor*
- violka rolní – *Viola arvensis*
- výdrol řepky – *Brassica napus subsp. Napus*
- merlík bílý – *Chenopodium album*
- pohanka svlačcovitá – *Fallopia convolvulus*
- rdesno červinec – *Persicaria maculosa*

Optimální fáze plevelů při aplikaci herbicidu by měla být 2–10 pravých listů, aby postřik plevele zničil. Violky a merlík bílý ideálně do 6 pravých listů, rdesno červinec a pohanka svlačcovitá do 4 pravých listů. Aplikace herbicidu by měla probíhat za optimálních podmínek. To znamená bezvětří, vyšší vzdušná vlhkost a teplota v rozmezí od 7 do 25 °C. (Agromanuál, 2021)

Po ošetření obilnin přípravkem Mustang Forte mohou zůstat v půdě rezidua. Účinná látka florasulam se v půdě rychle rozkládá vlivem činnosti mikroorganismů. Relativně slabě se adsorbuje na půdní částice. Díky rychlému rozkladu je tato účinná látka vyhodnocena jako bezpečná z hlediska pěstování následných plodin. (Hauerland, 1999) Mnohem více diskutován je ovšem aminopyralid, jehož rezidua zůstávají po sklizni jak ve slámě, tak v půdě. Aby bylo podpořeno odbourávání reziduí, je třeba slámu rozřezat a po sklizni ihned zapravit do půdy. Etiketa obsahuje varování a doporučení, kterými se musí zemědělec řídit, aby nedošlo ke kontaminaci. (E-agro, 2022)

- Nepěstovat citlivé plodiny na pozemcích ošetřených tímto přípravkem nebo na pozemcích, kde byl používán hnůj od zvířat krmných nebo podestýlaných slámou z takto ošetřených porostů.
- Nepoužívat slámu z porostů ošetřených tímto přípravkem ani hnůj od zvířat krmných touto slámou ke kompostování.
- Slámu z obilnin ošetřených přípravkem Mustang Forte nepoužívat pro pěstování jahod a hub.
- Přípravek nesmí zasáhnout okolní porosty ani pozemky. Obzvláště citlivá je vinná réva a chmel.

3.5 Corello

Corello je herbicidní přípravek registrovaný společností Dow AgroSciences s.r.o. obsahující účinnou látku pyroxsulam 75 g/kg (7,5 % hmot.)

Přípravek je určen pro porosty ozimé pšenice, ozimého žita a ozimého tritikale. Termín aplikace je postemergentní na podzim nebo na jaře od fáze třetího listu obilniny do fáze druhého kolénka. Optimální fáze plevelů je 2–10 pravých listů. Přípravek se aplikuje na aktivně rostoucí plevele za příznivých podmínek pro růst – teplo, vyšší vzdušná vlhkost. Herbicidní přípravek Corello proniká do rostlin převážně povrchem listů a lodyh a je rozváděn akropetálně i bazipetálně. V případě jarní aplikace musí plevele obnovit po zimním období svůj růst. (Kurent, 2022)

Mezi citlivé plevele patří:

- chundelka metlice – *Apera spica-venti*
- heřmánkovec přímořský – *Tripleurospermum maritimum*
- svízel přítula – *Galium aparine*
- výdrol řepky – *Brassica napus subsp. Napus*
- violka rolní – *Viola arvensis*
- kokoška pastuší tobolka – *Capsella bursa pastoris*
- penízek rolní – *Thlapsi arvense*
- ptačinec žabinec – *Alsinula media*
- rozrazil perský – *Veronica persica*
- sveřep jalový – *Bromus sterilis*

Doporučuje se aplikovat maximálně 1 postřik v plodině. Na etiketě je uvedeno, že slámu z porostů ošetřených přípravkem Corello není vhodné používat pro pěstování hub.

4 Metodika

4.1 Materiál

4.1.1 Použité druhy hub

Tabulka 1 Použité druhy hub a jejich původ

<i>Trametes versicolor</i>	KZ32
<i>Ganoderma lucidum</i>	KZ74
<i>Irpex lacteus</i>	CCBAS931
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	KZ27
<i>Dipodascus geotrichum</i>	E.E. Butler a L. J. Petersen - VURV – F 966
<i>Cladosporium herbarum</i>	Pers - VURV – F 968
<i>Pleurotus ostreatus</i> 'Soppo'	Sylvan - KZ54
<i>Pleurotus ostreatus</i> 'Ivory'	Sylvan - KZ72
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Sylvan - HK35

4.1.2 Slaměný substrát

V níže popsaných pokusech bylo pracováno se třemi variantami pšeničného slaměného substrátu. První varianta byla ošetřena herbicidem Corello s účinnou látkou pyroxsulam v dvojnásobné dávce a to 500 g/ha. Druhá varianta byla ošetřena herbicidem Mustang Forte s účinnou látkou aminopyralid také v dvojnásobné dávce 1,4 l/ha. Třetí varianta nebyla ošetřena žádným herbicidem. Aplikace herbicidů proběhla postemergentně na jaře roku 2021. Po sklizni byla sláma nařezána na řezačce a uskladněna.

4.1.3 Použité technické vybavení

- Třepačka IS-971RF, Lab. Companion, kde byly třepány kultury při teplotě 25 °C (130 RPM) po dobu 3 týdnů.
- Propařovací komora: komora je vyrobena ze 7 cm silných PUR panelů. Vnitřní prostor je obložen nerezovými plechy. Pro lepší manipulaci je celá propařovací komora usazena na kolečkách. Komora je plně uzavíratelná a celý prostor je parotěsně uzavřen. Pára je do komory přiváděna díky vyvíječi páry. Pro zajištění dostatečné teploty je zapotřebí zdroj o výkonu 12 KW.
- Centrifuga
- Büchnerova nálevka

4.1.4 Použité herbicidní přípravky a účinné látky

- Corello – účinná látka: pyroxsulam
- Mustang Forte – účinná látka: aminopyralid (V laboratorních pokusech bylo pracováno s čistým aminopyralidem.)

5 Metody

V rámci této diplomové práce bylo provedeno celkem 7 pokusů, přičemž ve dvou případech se jednalo o pokusy se shodnými postupy. Obměněna byla pouze koncentrace účinné látky a vybrány jiné kmeny hub. Takto shodné pokusy jsou zde sloučeny do jedné kapitoly.

Také je zde popsána izolace mikrobiální populace schopné rozkládat vybrané účinné látky herbicidů Mustang Forte a Corello. Tento experiment probíhal na Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT, kde se tyto metody izolace populací mikroorganismů rozkládajících mikropolutanty studují. Autorka předkládané Diplomové práce se na tomto pokusu nijak nepodílela, avšak výsledky tohoto pokusu jsou stěžejní pro navazující pokusy, které jsou popsány v praktické části této práce.

5.1.1 Kultivace vybraných druhů hub na agar-sladové půdě obohacené různými koncentracemi aminopyralidu

Cílem tohoto pokusu bylo zjištění vlivu různých koncentrací aminopyralidu na růst mycelia hub, které byly kultivovány na agar-sladovém mediu na Petriho miskách.

Pokus proběhl ve dvou termínech, přičemž byly navýšeny koncentrace aminopyralidu a vybrány jiné kultury hub. Postup experimentu byl v obou případech shodný. Byly vždy připraveny různé varianty roztoku s různou koncentrací aminopyralidu dle následujícího schématu.

100 ppm = 100 mg aminopyralidu do 1000 ml roztoku. Tzn. 100 ppm = 50 mg aminopyralidu do 500 ml roztoku

Tabulka 2 Varianty kultivačního media 2% sladiny s různými koncentracemi aminopyralidu a vybranými druhy hub

Varianty	Koncentrace aminopyralidu	Váha aminopyralidu	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (ks)	<i>Ganoderma lucidum</i> (ks)	<i>Irpex lacteus</i> (ks)	<i>Trametes versicolor</i> (ks)
1	Kontrola	0 mg	4	4	4	4
2	1 ppm	0,5 mg	4	4	4	4
3	10 ppm	5 mg	4	4	4	4
4	100 ppm	50 mg	4	4	4	4

Tabulka 3 Varianty kultivačního media 2% sladiny s různými koncentracemi aminopyralidu a vybranými druhy hub

Varianty	Koncentrace	Váha aminopyralidu	<i>Dipodascus geotrichum</i> (ks)	<i>Cladosporium herbarum</i> (ks)	<i>Pleurotus ostreatus</i> 'Spoppo' (ks)	<i>Pleurotus ostreatus</i> 'Ivory' (ks)
1	0 ppm	0 mg	5	5	5	5
2	100 ppm	50 mg	5	4	5	5
3	200 ppm	100 mg	6	5	5	5
4	300 ppm	150 mg	5	5	6	5
5	400 ppm	200 mg	5	5	5	5
6	500 ppm	250 mg	4	4	4	4

V 500ml nádobách byl za stálého míchání při 40 °C rozpuštěn aminopyralid příslušné koncentrace. Nádoby byly doplněny vodou do objemu 500 ml a bylo v nich rozpuštěno 10 g sladiny a 12 g agaru. Následně roztoky prošly sterilizací a byly nality na Petriho misky. Po ztuhnutí proběhlo naočkování vybranými kulturami hub. Petriho misky byly křížem rozděleny na čtvrtiny a přírůstky mycelia byly pravidelně zaznamenávány od středu směrem k okraji ve směru růstu na každém rameni kříže. Byly sledovány rozdíly jak mezi jednotlivými variantami (koncentracemi aminopyralidu), tak mezi jednotlivými druhy hub. Z každé misky jsme tak získali 4 hodnoty, které byly zaznamenávány do tabulky v excelu a dále vyhodnocovány.



Obrázek 2 Růst mycelia - *Irpex lacteus* při různých koncentracích aminopyralidu (Foto: Březinová Jana)

5.1.2 Vliv aminopyralidu a pyroxsulamu na růst mycelia vybraných druhů hub na slaměném substrátu ve zkumavkách

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zdali má přítomnost účinných látek aminopyralid a pyroxsulam vliv na růst mycelia vybraných druhů hub. Též jsou zkoumány případné úbytky těchto účinných látek ze substrátu na bázi pšeničné slámy kolonizované 2 druhy stopkovýtrosých hub – *Ganoderma lucidum* a *Irpex lacteus*.

Jako pěstební substrát byly připraveny 3 varianty slámy.

1. Sláma z porostu ozimé pšenice ošetřená herbicidem Mustang Forte obsahující účinnou látku aminopyralid.
2. Sláma z porostu ozimé pšenice ošetřená herbicidem Corello obsahující účinnou látku pyroxsulam.
3. Sláma kontrolní neobsahující žádné herbicidy.

Sláma všech 3 variant byla přes noc ponořena do vody a druhý den napěchována do 42 zkumavek o velikosti 40 mm x 250 mm. Objem zkumavky činí 314,2 cm³. Sláma dosahovala zhruba 2 cm pod okraj zkumavek. Zkumavky byly zajištěny ústřížkem Al fólie, popsány a vysterilizovány při 121 °C po dobu 3 hodin. Druhý den po vychladnutí proběhlo naočkování tenkou vrstvou sadby příslušným druhem hub na povrch substrátu dle následujícího schématu.

Tabulka 4 Schéma počtů zkumavek jednotlivých hub

Druh houby	Počet zkumavek od každé varianty		
	Mustang Forte	Corello	Kontrola
<i>Irpex lacteus</i>	9	9	3
<i>Ganoderma lucidum</i>	9	9	3

Průběh pokusu:

Celkem byly provedeny 3 měření přírůstků mycelia, které byly ihned zaznamenány. Zkumavky se po celou dobu nacházely ve stabilních teplotních podmínkách 21–23°C

Jakmile mycelium kolonizovalo celý slaměný substrát, byly odebrány vzorky od každé varianty. Dále potom 20. den, 40. den, 60. den a 80. den. Odebrané vzorky byly uloženy do mrazicího boxu, lyofilizovány, pomlety a poskytnuty k dalším analýzám do laboratoře.



Obrázek 3 Zkumavky s prorůstajícím myceliem - zleva: Kontrola- *Ganoderma lucidum*, Kontrola – *Irpex*, Mustang – *Ganoderma lucidum*, Corello – *Irpex lacteus*, Corello -*Ganoderma lucidum*, Corello – *Irpex lacteus* (Foto: Březinová Jana)



Obrázek 4 Prorůstající mycelium při 1. měření přírůstků – Kontrola – *Ganoderma lucidum* (Foto: Březinová Jana)

5.1.3 Izolace mikrobiální populace schopné rozkládat účinné látky herbicidů Mustang Forte a Corello

Na níže popisovaném pokusu jsem se nijak nepodílela. V této Diplomové práci je uváděn z toho důvodu, že výsledky tohoto experimentu jsou stěžejní pro následující pokusy, ve kterém byly použity kultury hub izolované v níže popisovaném experimentu.

V roce 2021 byla navázána spolupráce s Ústavem biochemie a mikrobiologie VŠCHT, kde se studují metody izolace populací mikroorganismů rozkládajících mikropolutanty. Tomuto výzkumnému pracovišti byl poskytnut čistý aminopyralid a půda obsahující aminopyralid z předchozích pokusů a v něm přítomný přirozený mikrobiom. Na tomto výzkumu bylo využito metody takzvaného „nabohacování“. Do tekutého živného media byl přidán aminopyralid, což byl jediný zdroj dusíku. Opakovaně byla prováděna kultivace hub na tekuté třepané půdě s 2% sladovým výtažkem. Kultivace probíhala při 3 různých teplotách: 12 °C, 20 °C a 37 °C. Během opakujících se kultivací byly 3 různé varianty koncentrací aminopyralidu: 0,5, 5 a 50 mmol/l.

Po aktivaci živného media přidáním kvasničného extraktu se podařilo získat zákal media indikující mikrobiální aktivitu. Výsledkem „nabohacování“ byly z kultivačního media izolovány 3 druhy vláknitých hub. Metodou PCR byly blíže specifikovány jako:

- *Dipodascus geotrichum* (syn. *Geotrichum candidum*) (MALDI)
- *Candida subhashii* – Bílá kvasinka – M. Groenew., Sigler & S.E. Richardson (MALDI + D. Savická)
- *Cladosporium herbarum* complex (D. Savická)

Později byly určeny i mikroorganismy jako *Raoultella terrigena*, která bude ještě blíže identifikována pomocí PCR. Jako další organismus byl metodou MS MALDI-TOF určen *Paenarthrobacter histidinolorans*, což je bakterie. Dvě z těchto izolovaných kultur hub byly porovnávány s kulturou *Pleurotus ostreatus*. Konkrétně *Dipodascus geotrichum* a *Cladosporium herbarum*. Houby byly kultivovány na Petriho miskách s agar-sladovou půdou při 24 °C a byly porovnávány přírůstky mycelia.



Obrázek 5 Nárůst bakterií a plísní na Petriho miskách při různých teplotách a koncentracích aminopyralidu

5.1.4 Vliv různých koncentrací aminopyralidu na tvorbu biomasy vybraných druhů hub kultivovaných na tekutých živných půdách

Cílem těchto pokusů bylo zjistit, zdali koncentrace aminopyralidu ovlivňuje růst biomasy mycelia, popřípadě zdali je houba schopná tuto účinnou látku rozkládat. Pokus proběhl ve dvou fázích, přičemž byly opět navýšeny koncentrace aminopyralidu a vybrány jiné kultury hub. Postup a průběh popisovaného experimentu byl v obou případech shodný. Pro níže popsany pokus byly zvoleny druhy – *Pleurotus ostreatus*, kmen HK 35, *Cladosporium herbarum*, *Dipodascus geotrichum* a *Pleurotus ostreatus* 'Spoppo', které byly kultivovány na tekutých půdách při zvyšující se koncentraci aminopyralidu dle následujícího schématu.

Tabulka 5 Varianty tekutých půd obohacenými různými koncentracemi aminopyralidu a vybraným kmenem *Pleurotus ostreatus* KZ 35

Varianty	Aminopyralid koncentrace	Aminopyralid (mg)	Počet baněk <i>Pleurotus ostreatus</i> HK 35
1.	Kontrola – 0 ppm	0 mg	6
2.	50 ppm	30 mg	6
3.	100 ppm	60 mg	6
4.	150 ppm	90 mg	6
5.	200 ppm	120 mg	6
6.	250 ppm	150 mg	6

Tabulka 6 Varianty tekuté půdy obohacenými různými koncentracemi aminopyralidu a vybranými druhy hub

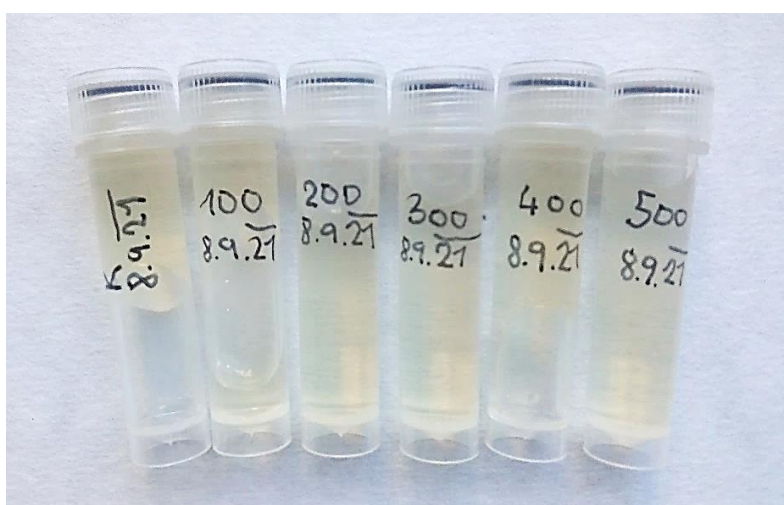
Varianty	Koncentrace aminopyralidu	Váha aminopyralidu	<i>Cladosporium herbarum</i> (ks)	<i>Dipodascus Geotrichum</i> (ks)	<i>Pleurotus ostreatus</i> 'Spoppo' (ks)
1.	0 ppm	0 mg	3	3	3
2.	100 ppm	60 mg	3	3	3
3.	200 ppm	120 mg	3	3	3
4.	300 ppm	180 mg	3	3	3
5.	400 ppm	240 mg	3	3	3
6.	500 ppm	300 mg	3	3	3

Postup:

Nejprve byl přepočítán obsah aminopyralidu z ppm na mg, který byl následně přesně rozvážen na analytické váze, přičemž kontrolní varianta neobsahovala žádný aminopyralid. Do demineralizované vody byly přidány 2% sladiny a dle koncentrace příslušná dávka aminopyralidu. Jednotlivé varianty musely být zlehka zahřívány na 45 °C, aby se v nich odvážené množství aminopyralidu co nejdůkladněji rozpustilo a nevznikaly v roztoku hrudky. Kultivace probíhala v Erlenmeyerových baňkách o objemu 100 ml, přičemž byly naplněny

do $\frac{3}{4}$, tzn. 75 ml. Každá baňka se ihned přikryla ALU fólií a označila. Baňky byly sterilizovány při 120 °C po dobu 20 minut. Po vychladnutí proběhlo ve flow boxu naočkování vybranými druhy hub. Všechny Erlenmeyerovy baňky byly uloženy do třepačky po dobu 3 týdnů a kultivovány při konstantní teplotě 25 °C a v temnu.

Pro kontrolní účely byly odebrány ihned po sterilizaci a vychladnutí vzorky kultivačních roztoků jednotlivých koncentrací. Každá koncentrace + kontrola = 1 vzorek. Uloženy byly do mrazícího boxu. Další vzorky (taktéž koncentrace + kontrola) byly odebrány do Erlenmeyerových baněk a uloženy do boxu. Zde byla pokojová teplota a temno. Cílem bylo ověřit, zda se aminopyralid neodbourává samovolně (bez přítomnosti hub.) Proto 1 varianta byla ihned zamražena a druhá ponechána 3 týdny a následně zamražena.



Obrázek 6 Odebrané vzorky koncentrací aminopyralidu pro kontrolní účely
(Foto: Březinová Jana)

Průběh pokusu

Po 3 týdnech kultivace byly Erlenmeyerovy baňky ze třepačky vyjmuty. Proces získávání mycelia byl odlišný pro průzračné baňky s peletami a zakalený obsah Erlenmeyerových baněk s absencí pelet. Z každé baňky obsahující průzračnou tekutinu a pelety byl odebrán vzorek do mikrozkuhavky typu Eppendorf. Zbylá tekutina s peletami se přefiltrovala přes Büchnerovu nálevku, do které byl vložen ústřížek síťoviny pro zachytávání mycelia. Po filtraci byla látka s myceliem vyjmuta a přenesena na savý papír, kde se vsákla přebytečná voda. Mycelium bylo vloženo do sáčku, popsáno a zamraženo. Následně lyofilizováno, zváženo a poskytnuto do laboratoře k dalším analýzám. Erlenmeyerovy baňky s absencí pelet a zakaleným kultivačním roztokem nebylo možné zpracovávat předchozím způsobem. Proto bylo mycelium od kultivační tekutiny odseparováno centrifugací. Na dně květy zůstalo mycelium šedé barvy a zbylý obsah v květy byla čirá tekutina žluté barvy. Opět byly odebrány vzorky čiré tekutiny do mikrozkuhavky typu Eppendorf a mycelium ze dna zkumavek vyjmuta úzkou lžičkou, dáno do uzavíratelného pytlíku, popsáno a zamraženo.



Obrázek 7 Průběh centrifugace (Foto: Březinová Jana)



Obrázek 8 Pelety *Cladosporium herbarum* (Foto: Březinová Jana)

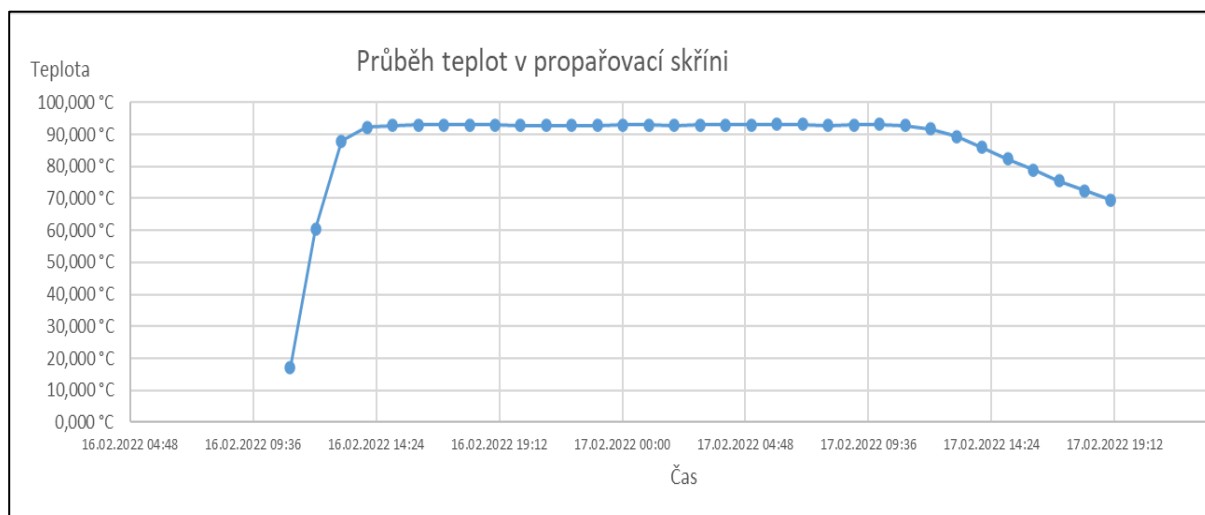


Obrázek 9 Kultivané mycelium – zleva: *Cladosporium*, *herbarum*, *Pleurotus ostreatus* a *Dipodascus geotrichum* (Foto: Březinová Jana)

5.1.5 Zjištění vlivu přípravků Corello a Mustang Forte na tvorbu plodnic rodu *Pleurotus ostreatus* pěstované na substrátu z pšeničné slámy

Cílem tohoto pokusu bylo zhodnotit vliv slámy ošetřené dvojnásobnými dávkami herbicidu na růst, vývoj a počty plodnic *Pleurotus ostreatus*, kmen 'Spoppo'.

Na tento pokus byly použity 3 varianty slámy. První varianta byla ošetřena přípravkem Mustang forte s účinnou látkou aminopyralid ve dvojnásobném množství. Sláma druhé varianty byla ošetřena přípravkem Corello s účinnou látkou pyroxsulam, taktéž v dvojnásobném množství. Třetí varianta byla kontrolní, tudíž neošetřená žádným herbicidem. Sláma byla namočena ve vodě po dobu 24 hodin. Následující den byla přebytečná voda odstraněna a substrát navážen od každé varianty do 12 sáčků tvořících 2,5kg bloky. Celkem bylo tedy naplněno 36 bloků. Substrát všech variant byl ošetřen v propařovací komoře po dobu 24 hodin při teplotě 90 °C. Třetí den od založení pokusu byl substrát naočkován zrnitou sadbou hlívy ústříčné – kmen 'Spoppo' a kolonizován po dobu 21 dní v pokusném boxu. Podhoubí prorůstalo substrátem po dobu 21 dnů při 24 °C. Boxy s kolonizovaným substrátem byly převezeny z Červeného Újezdu na ČZU, kde byly umístěny do pěstírny. Zde také probíhala za stálých podmínek sklizeň. V pěstírně byla relativní vlhkost vzduch 80–90 %, 17 °C a celodenní umělé světlo.



Graf 1 Průběh teplot v propařovací skříni při pasterizaci substrátu z pšeničné slámy

Průběh pokusu

Byly sledovány rozdíly v nasazování plodnic mezi jednotlivými variantami. Dále morfologie plodnic a výnos jednotlivých bloků. Jakmile mycelium kolonizovalo celý substrát a nehrozila kontaminace, byla odstraněna přebytečná část folie a horní část zůstala odkrytá. V místě, kde se mycelium začalo houstnout, byl igelit prořezán, a tím se uvolnilo místo pro nasazující plodničky. První sklizeň proběhla 31 dní po očkování. Sklizeny byly celé trsy v optimální zralosti. Sklizené plodnice byly spočítány, zváženy a výsledné hodnoty zapsány do tabulky. Celý pokus od naočkování po poslední sklizeň trval 53 dní. Celkem proběhlo 5 sběrů.



Obrázek 10 Police v pěstárně s umístěnými boxy (Foto: Březinová Jana)



Obrázek 11 Box s prorostlým myceliem (Foto: Březinová Jana)



Obrázek 12 Plodnice *Pleurotus ostreatus* (Foto: Březinová Jana)

5.1.6 Vermikompostování vyplozeného substrátu hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*)

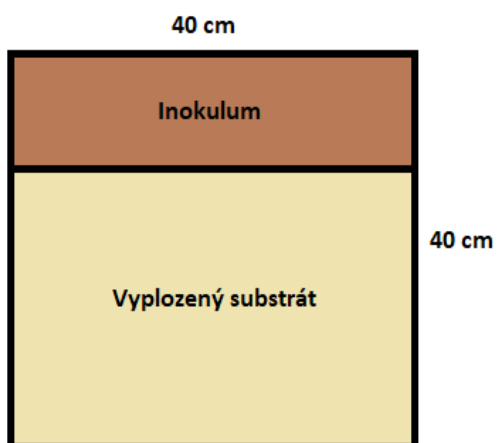
V pokusu byly použity 3 varianty vyplozeného substrátu rodu *Pleurotus ostreatus* z předchozího experimentu. Sláma z experimentálních variant pocházela z porostů pšenice ošetřených půdním herbicidem Mustang Forte s účinnou látkou Pyroxsulam a herbicidem Corello s účinnou látkou aminopyralid. Sláma na třetí variantu byla kontrolní a nebyla nijak ošetřena.

Substrát od každé varianty byl dobře promíchán, homogenizován a byla stanovena vlhkost. Následně bylo nutné doplnit vodu tak, aby výsledný substrát měl vlhkost 80 %.

Tabulka 7 Přídavek vody

	Váha	Vlhkost	Přídavek vody
Mustang	14,55 kg	70,70%	6,77 l
Corello	15,35 kg	71,40%	6,6 l
Kontrola	14,40 kg	73,70%	4,54 l

Na experiment byly použity pokusné nádoby o rozměru 40 cm x 40 cm a objemu 22 litrů. Od každé varianty (Mustang forte, Corello, Kontrola) bylo založeno 6 pokusných nádob. 3 nádoby s inokulem žížal a 3 nádoby kontrolní bez žížal.



Obrázek 13 Návrh pokusné nádoby

Tabulka 8 Schéma založení pokusu

	1	2	3	4	5	6
A	1A	2A	3A	4A	5A	6A
B	1B	2B	3B	4B	5B	6B
C	1C	2C	3C	4C	5C	6C
	Kontrolní varianta bez žížal					
	Varianta s inokulem žížal					
1	Kontrola					
2	Corello					
3	Mustang forte					
4	Kontrola					
5	Corello					
6	Mustang forte					
A/B/C	Varianty					

Do každé nádoby byl dán 1 litr inokula. Jedná se o sypký, rozložený organický materiál tmavé barvy a charakteristické vůně, ve kterém je velké množství kalifornských žížal *Eisenia andrei*. Dále byl do nádoby vložen vyplozený substrát o hmotnosti 2,5 kg.

Tabulka 9 Váha a počet žížal v půl litru inokula

	Počet žížal	Hmotnost před vyprázdněním (g)	Hmotnost po vyprázdnění (g)
1	47	8,1155	7,495
2	48	7,6535	7,394
3	50	8,5799	7,6053
Průměr	48,333333	8,1163	7,4981

Každá nádoba se skládá z krycího víka a misky. Krycí víko zabraňuje nadměrnému odpařování vody a zároveň udržuje celý substrát s inokulem v temnu. Samotná nádoba má dírkované dno, tudíž může přebytečná voda samovolně vykapávat. K zachytávání přebytečného výluhu slouží podmiska. Při zakládání pokusu byl na dno nádoby dán čtvercový ústřížek tylu. Tento tyl je jemně dírkovaný a zabraňuje žížalám vniknout do podmisky, kde by uhynuly. Též inokulum s žížalami je odděleno dírkovanou látkou. Ta má čistě praktické využití. Při vážení samotné slámy by bylo velmi obtížné odebírat sypké inokulum a následně ho vkládat zpět. Takto mohou žížaly samovolně vniknout do slámy, aniž by je tato látková kapsa omezovala.

Nádoby varianty B obsahují čidlo s teploměrem, které zaznamenává průběh teplot po celou dobu trvání pokusu. Ovšem nepředpokládá se, že by se teplota po dobu trvání pokusu výrazně měnila. V místnosti je nastavena konstantní teplota a každá teplotní změna by byla způsobena vnitřní aktivitou organismů a rozkladnými procesy uvnitř pokusných nádob.

Aby došlo k vyrovnání poměru mezi C:N, byl po 2 měsících od založení pokusu přidáván v pravidelných intervalech nitrifikovaný fugát. Tím došlo k urychlení rozkladu organické hmoty a vytvoření příznivějšího prostředí pro kalifornské žížaly (*Eisenia andrei*).

Průběh pokusu:

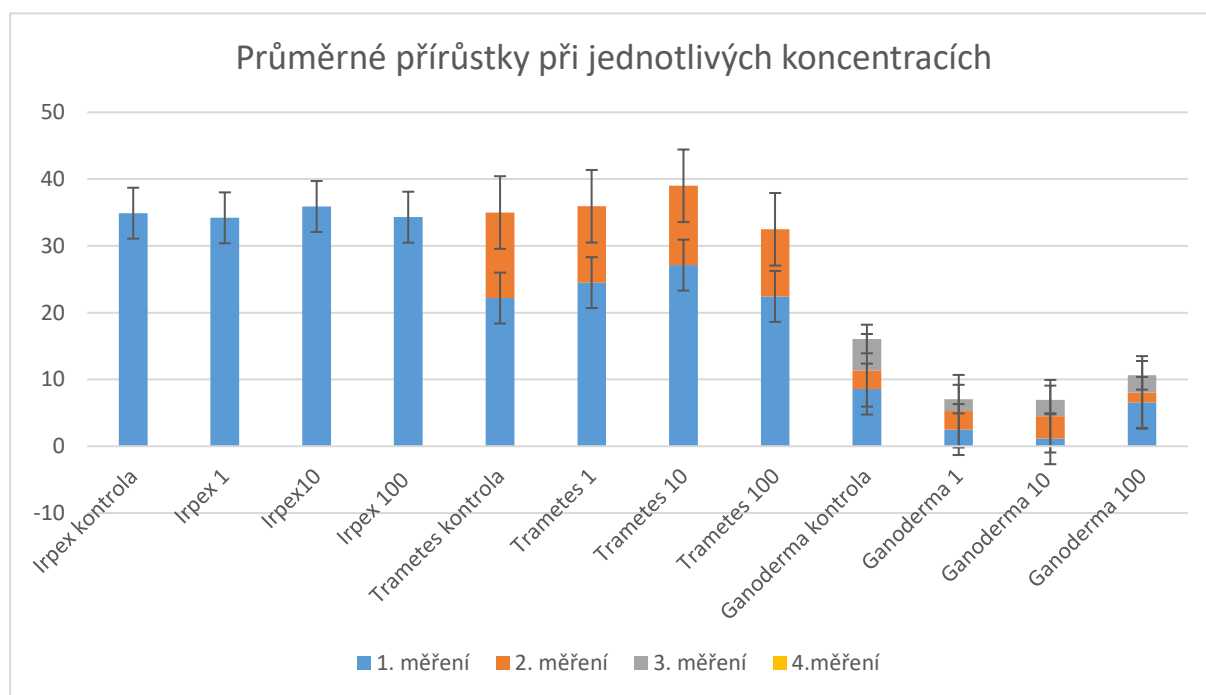
Měření proběhlo celkem 3x. Nejprve byla každá varianta zvážena. Do celkové hmotnosti nebyla započítána miska ani inokulum. Tudíž z každé varianty byla vyjmuta síťka s vyplozeným substrátem a následně zvážena. Síťka nám zajistila pohodlné vážení a bez většího nepořádku byl vyplozený substrát vrácen na původní místo. Z každé nádoby byl vždy odebrán vzorek 250 g substrátu. Odběr byl prováděn z 5 různých míst po 50 gramech, aby odebrané vzorky byly co nejobjektivnější. Následně byly spočítány veškeré žížaly včetně kokonů, které se nacházely v odebraných vzorcích. Při zakládání pokusu jsme v inokulu počítali pouze žížaly, které byly větší nebo rovny 1 cm. Bohužel v odebraných vzorcích se žížal nacházelo velmi málo a z toho důvodu se v průběhu pokusu počítaly všechny nalezené žížaly včetně menších jak 1 cm. Kokony se po přepočítání vrátily zpět do příslušných misek, odkud byly vyjmuty. Substrát prostý žížal byl dán do sáčku, popsán a umístěn do mrazáku. Po lyofilizaci byl substrát poskytnut do laboratoře k dalším analýzám. Žížaly z každé varianty byly zváženy a umístěny do Petriho misek, kde se nechaly vyhladovět do druhého dne na navlhčeném savém papíru. Petriho misky byly umístěny při pokojové teplotě v temnu, kde se do druhého dne žížaly vyprázdnily. Následně byly promyty pod vodou od výkalů, které by eventuelně mohly obsahovat zbytky účinných látek a znovu se zvážily. Následně se žížaly zamrazily, lyofilizovaly a byly poskytnuty laboratoři k dalším analýzám.

6 Výsledky

6.1 Výsledky kultivace vybraných hub *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Irpex lacteus* a *Phanerochaete chrysosporium* na agaršladové půdě obohacené různými koncentracemi aminopyralidu

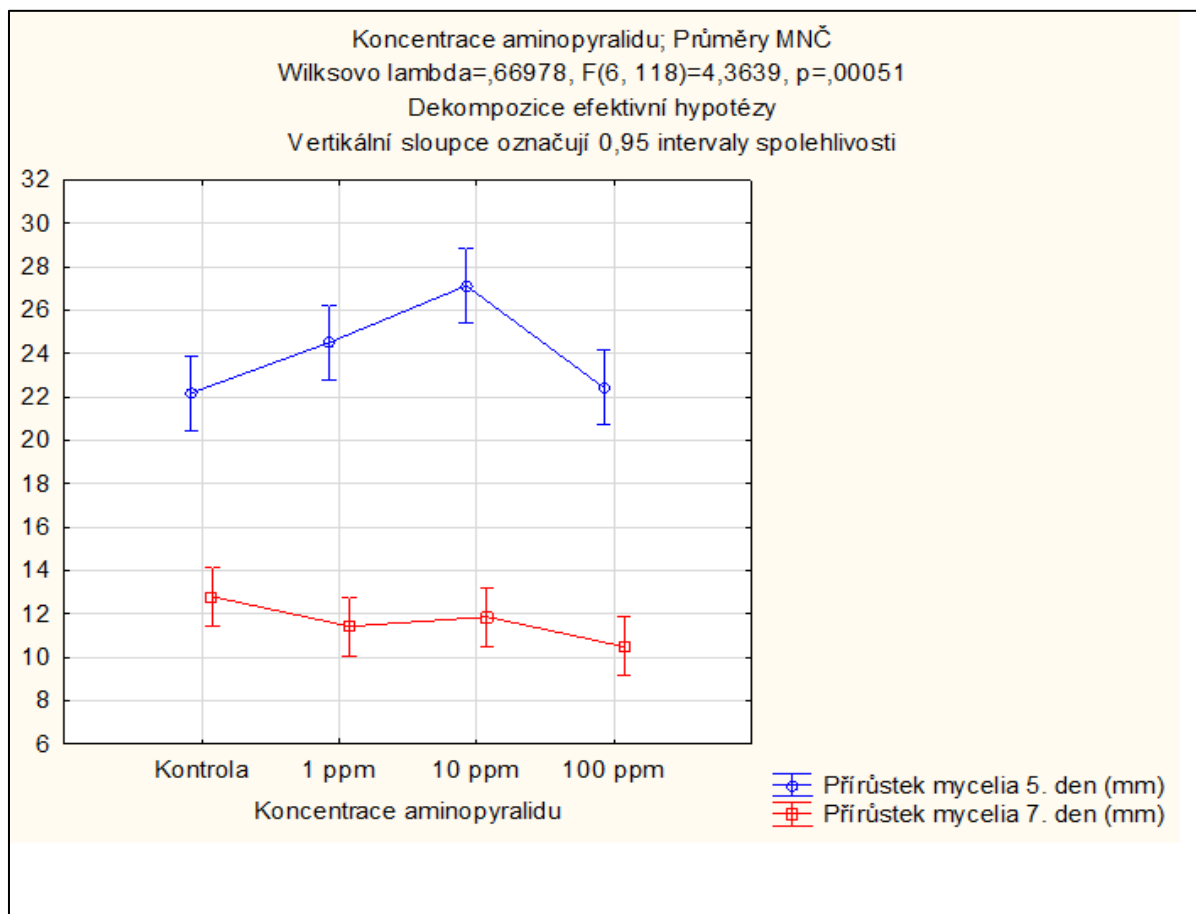
Měření přírůstků probíhalo čtvrtý, šestý, osmý a třináctý den po naočkování. *Phanerochaete chrysosporium* se ukázal jako nejrychleji rostoucí druh a již při 1. kontrole čtvrtý den od naočkování mycelium všech variant dosáhlo okraje misky. Z toho důvodu nemohl být tento druh hodnocen. Při druhé kontrole dosáhl okraje misek všech variant *Irpex lacteus*. Nejrychleji rostlo mycelium na miskách při koncentraci 10 ppm a nejpomalejší růst byl zaznamenán na miskách s koncentrací 1 ppm. Následující měření dosáhl okraje misek *Trametes versicolor*. Ani zde se nedá mluvit o prokazatelné inhibici růstu s rostoucí koncentrací aminopyralidu. U kontroly a koncentraci 1 ppm a 10 ppm je zaznamenán nárůst v rychlosti růstu mycelia a při koncentraci 100 ppm naopak prudký pokles v rychlosti růstu mycelia. Celkově nejpomalejší růst mycelia byl zaznamenán u lesklokorky. Zde nejlepšího růstu dosáhla kontrola s nulovou koncentrací aminopyralidu. Koncentrace 100 ppm v rychlosti růstu mycelia předčila koncentraci 1 ppm a 10 ppm.

Z výsledků vyplývá, že zvyšující se koncentrace aminopyralidu není přímo úměrná průměrným přírůstkům u jednotlivých druhů hub. Naopak zvyšující se koncentrace (viz *Trametes versicolor* 10 ppm, *Ganoderma lucidum* 100 ppm) vykazují větší průměrné denní přírůstky než předchozí nižší koncentrace.



Graf 2 Průměrné přírůstky kultivovaných druhů hub při jednotlivých koncentracích aminopyralidu

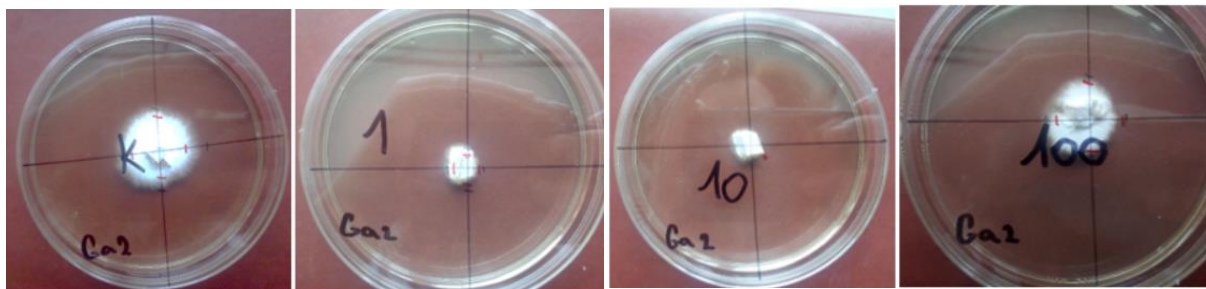
6.1.1.1 Vyhodnocení v programu Statistica



Graf 3 Přírůstky mycelia *Trametes versicolor* 5. a 7. den po naočkování

Výsledky byly vyhodnoceny metodou Analýzy rozptylu. (Analysis of variance – ANOVA)

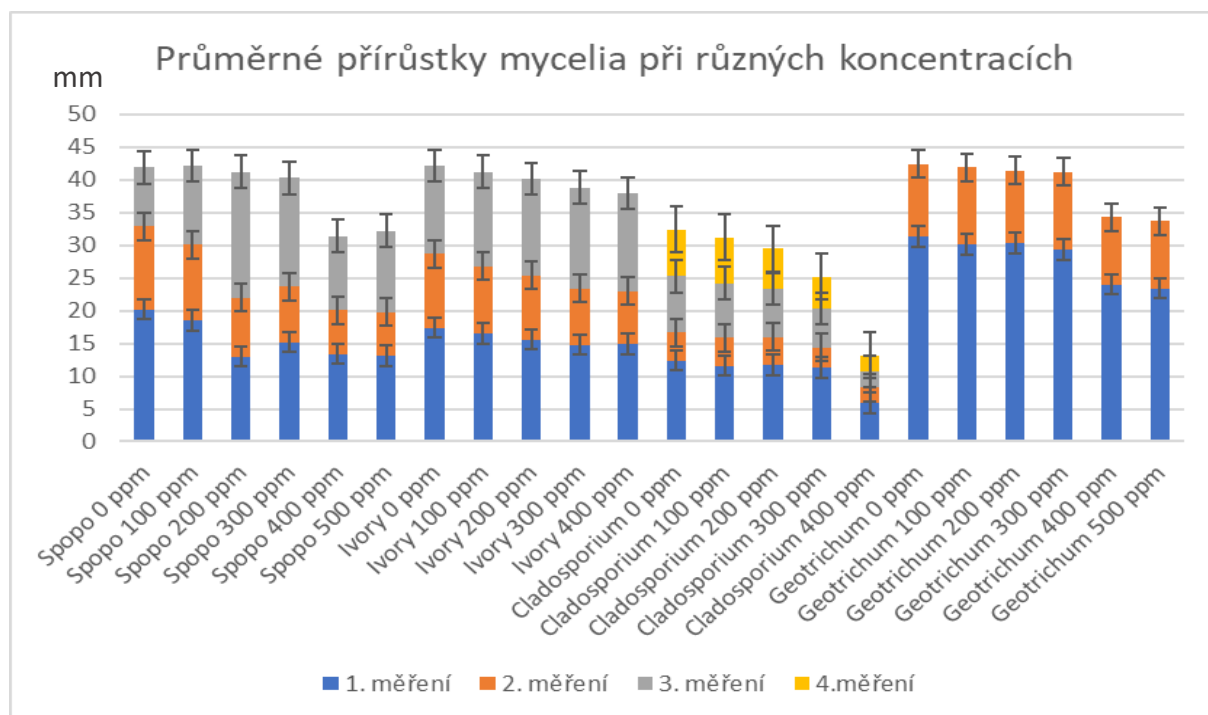
Graf č. 3 znázorňuje přírůstky mycelia 5. a 7. den po naočkování houbou *Trametes versicolor*. Pátý den dosáhlo nejdelších přírůstků *Trametes versicolor* při koncentraci 10 ppm. Sedmý den po naočkování je patrné, že růst mycelia je nepatrně inhibován s postupnou zvyšující se koncentrací aminopyralidu. Tyto rozdíly ovšem v tomto případě nejsou statisticky průkazné.



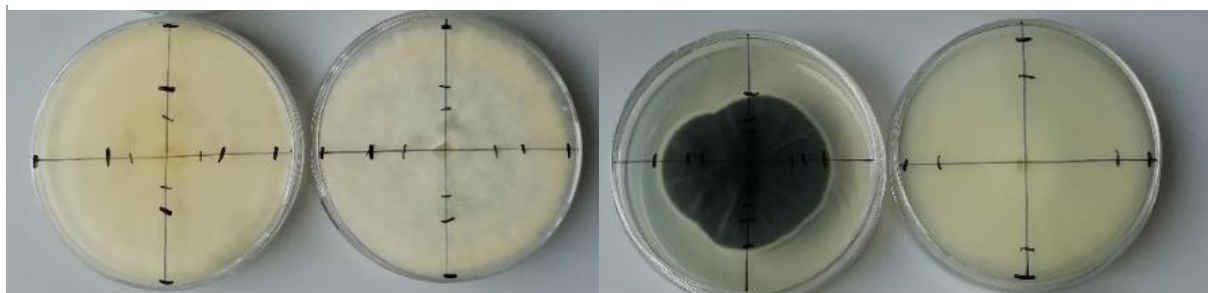
Obrázek 14 Mycelium lesklokorky kolonizující agaršlادové medium při různých koncentracích aminopyralidu (Foto: Březinová Jana)

6.2 Výsledky kultivace vybraných hub *Dipodascus geotrichum*, *Cladosporium herbarum* a *Pleurotus ostreatus* kmenů 'Ivory' a 'Spoppo' na agar-sladovém a obohaceném různými koncentracemi aminopyralidu

Nejrychlejší růst mycelia vykázalo *Dipodascus geotrichum*. Již při druhém měření bylo téměř při okraji misky. Kmenům 'Ivory' a 'Spoppo' bylo mycelium naměřeno 3x a nejdéle kolonizující druh houby je *Cladosporium herbarum*. S narůstající koncentrací aminopyralidu můžeme pozorovat velmi zajímavé výsledky. Zatímco v předchozím pokusu nebyla shledána téměř žádná paralela mezi průměrnými přírůstků mycelia a koncentrací aminopyralidu, zde můžeme konstatovat, že aminopyralid určitým způsobem inhibuje růst mycelia. Nejvíce patrné to je u druhu *Cladosporium herbarum*, kde je při koncentraci 400 ppm mycelium téměř o polovinu menší délky, než u předchozí koncentrace 300 ppm. U kmene 'Ivory' je inhibiční účinek aminopyralidu taktéž zaznamenán. Druh *Dipodascus geotrichum* a kmen 'Spoppo' mají největší rozdíly v průměrných přírůstcích mycelia mezi 300 ppm a 400 ppm.

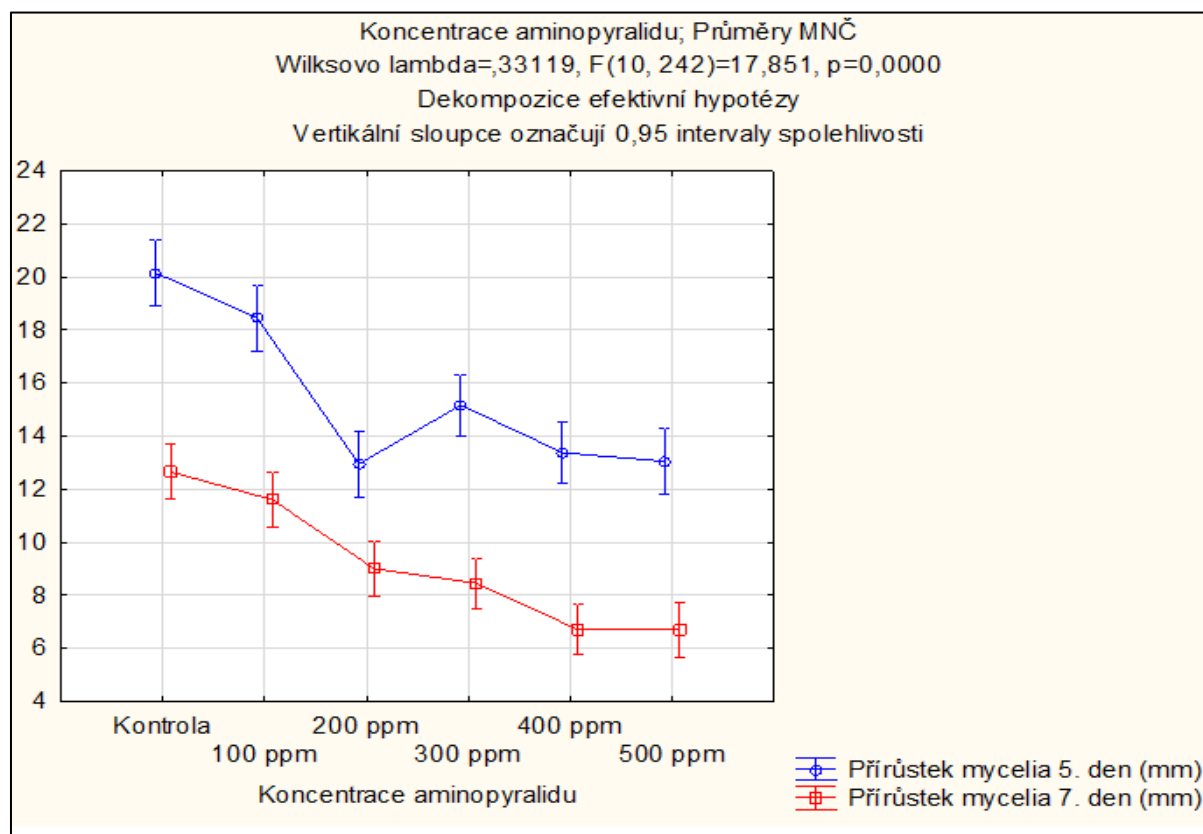


Graf 4 Průměrné přírůstky kultivovaných druhů hub při jednotlivých koncentracích aminopyralidu



Obrázek 15 Narostlé mycelium – zleva: *Pleurotus ostreatus*, kmene 'Ivory' a 'Spoppo'. Dále *Cladosporium herbarum* a *Dipodascus geotrichum* (Foto: Březinová Jana)

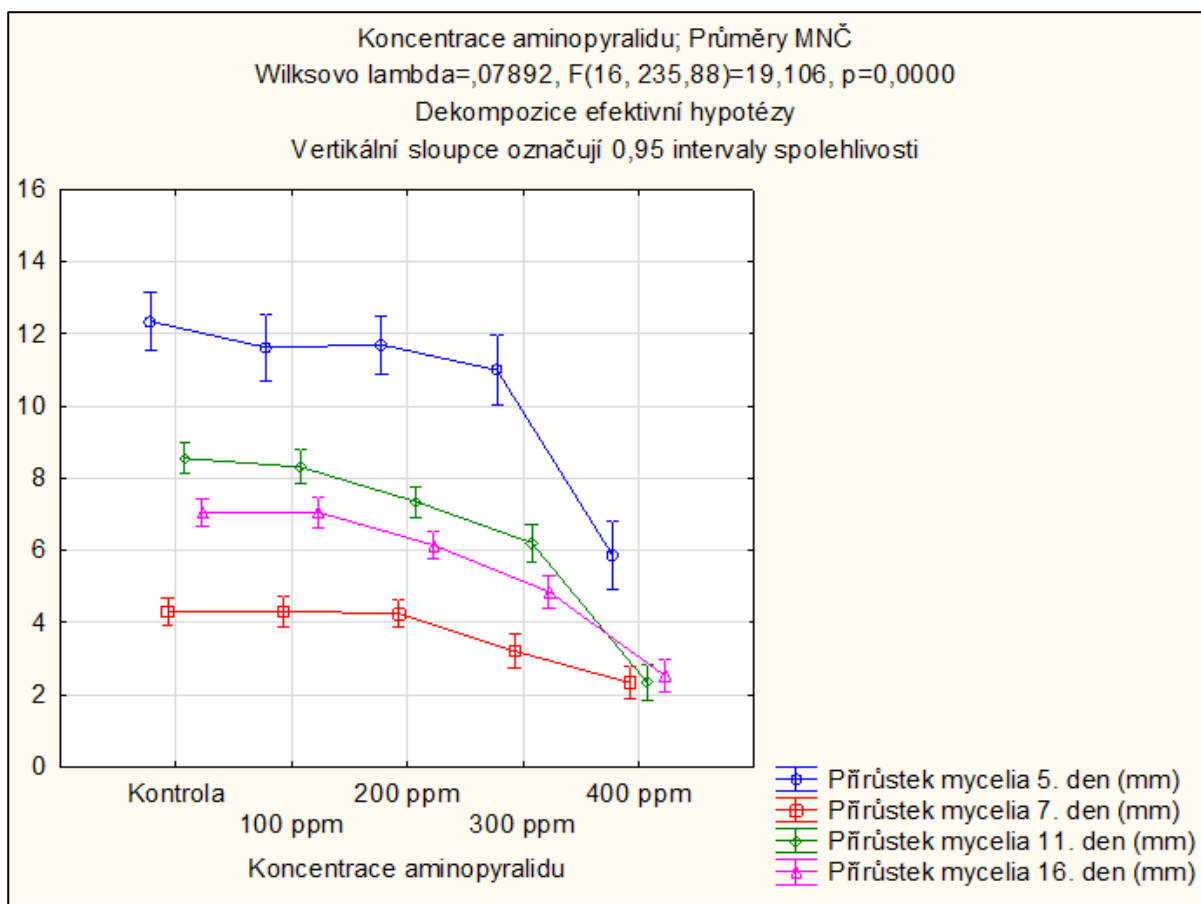
6.2.1 Vyhodnocení v programu Statistica



Graf 5 Přírůstky mycelia *Pleurotus ostreatus* 'Spoppo' 5. a 7. den po naočkování

Výsledky byly vyhodnoceny metodou Analýzy rozptylu. (Analysis of variance – ANOVA)

Graf č. 5 znázorňuje průměrné přírůstky mycelia *Pleurotus ostreatus* kmen 'Spoppo' pátý a sedmý den po naočkování. U obou měření se jedná o statisticky průkazné rozdíly, ve kterých je zřetelný inhibiční faktor s narůstající koncentrací aminopyralidu. Ve srovnání s kontrolní (neošetřenou) variantou jsou přírůstky mycelia u všech koncentrací nižší.



Graf 6 Přírůstky mycelia *Cladosporium herbarum* během 16 dnů

Výsledky byly vyhodnoceny metodou Analýzy rozptylu. (Analysis of variance – ANOVA)

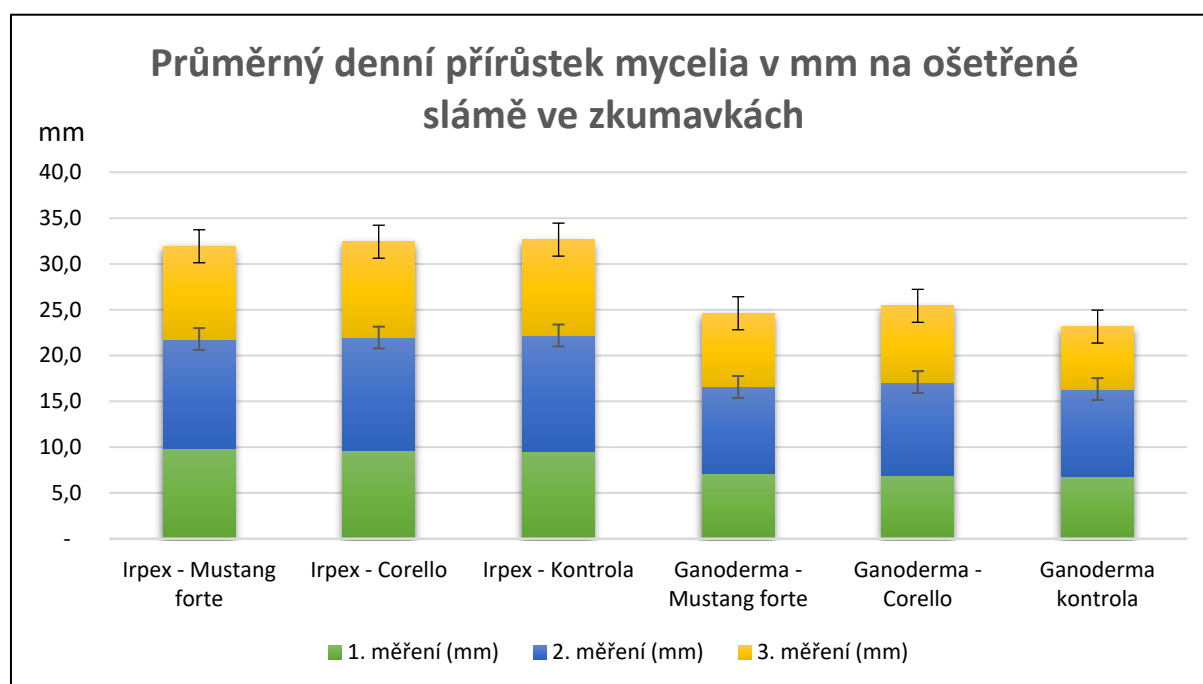
Graf č. 6 znázorňuje průměrné přírůstky mycelia *Cladosporium herbarum* 5., 7., 11. a 16. den po naočkování. Zde je jasně patrný vliv zvyšující se koncentrace aminopyralidu na růst mycelia. S postupnou zvyšující se koncentrací klesají průměrné přírůstky nejen oproti kontrolní (neošetřené) variantě, ale také oproti předchozím koncentracím. Inhibiční postup je do koncentrace 200 ppm statisticky neprůkazný. Statisticky průkazné rozdíly jsou zde až od koncentrace 300 ppm.

6.3 Výsledky vlivu aminopyralidu a pyroxsulamu na růst mycelia vybraných druhů hub na slaměném substrátu ve zkumavkách

Z průměrných hodnot naměřených v průběhu pokusu se ukázalo, že *Irpex lacteus* měl větší přírůstky než *Ganoderma lucidum*. Nejvyšších průměrných přírůstků u druhu *Irpex lacteus* dosáhla kontrolní varianta, která nebyla ošetřena žádným herbicidem. Průměrně o 3 mm menších přírůstků dosáhla varianta ošetřená herbicidem Corello s účinnou látkou pyroxsulam a nejnižší přírůstky byly naměřeny u varianty ošetřené přípravkem Mustang Forte s účinnou látkou aminopyralid. Zde byly naměřeny průměrně o 8 mm menší přírůstky než u kontrolní varianty.

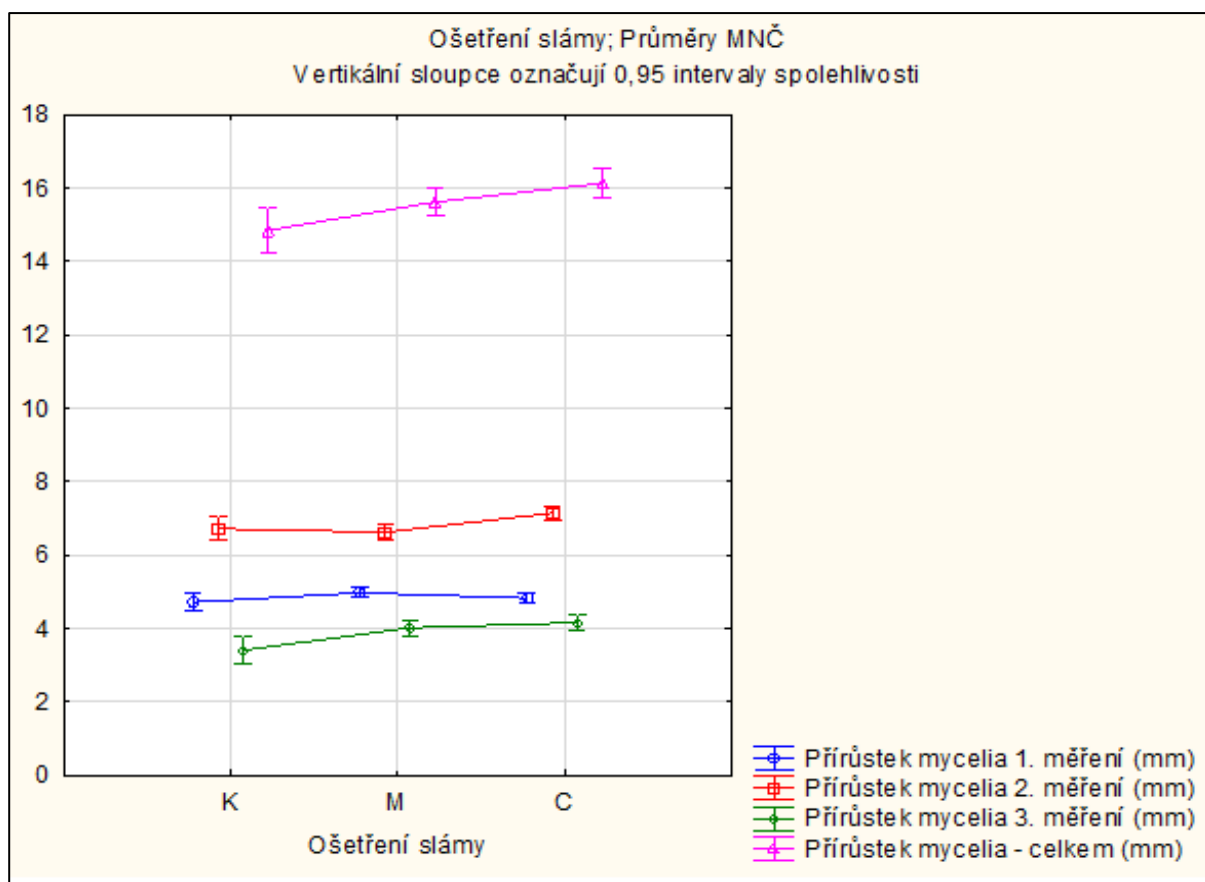
U substrátů kolonizovaných druhem *Ganoderma lucidum* byly naopak nejmenší přírůstky naměřeny u kontrolní, neošetřené varianty. O 14 mm větších průměrných přírůstků dosáhla varianta ošetřená přípravkem Mustang Forte. Varianta ošetřená přípravkem Corello měla největší průměrné přírůstky a to o 22 mm oproti neošetřené kontrolní variantě.

Přestože můžeme pozorovat drobné rozdíly mezi ošetřenými a neošetřenými variantami, nejedná se o rozdíly prokazatelné. V celkovém srovnání se rozdíly průměrných přírůstků v řádech několika jednotek milimetrů jeví jako zcela zanedbatelné v porovnání s celkovou délkou zkumavky 250 mm. Taktéž mezi porovnávanými účinnými látkami nebylo dosaženo jakýchkoli prokazatelných rozdílů.



Graf 7 Průměrné přírůstky na sterilizované slámě ve zkumavkách

6.3.1 Vyhodnocení v programu Statistika



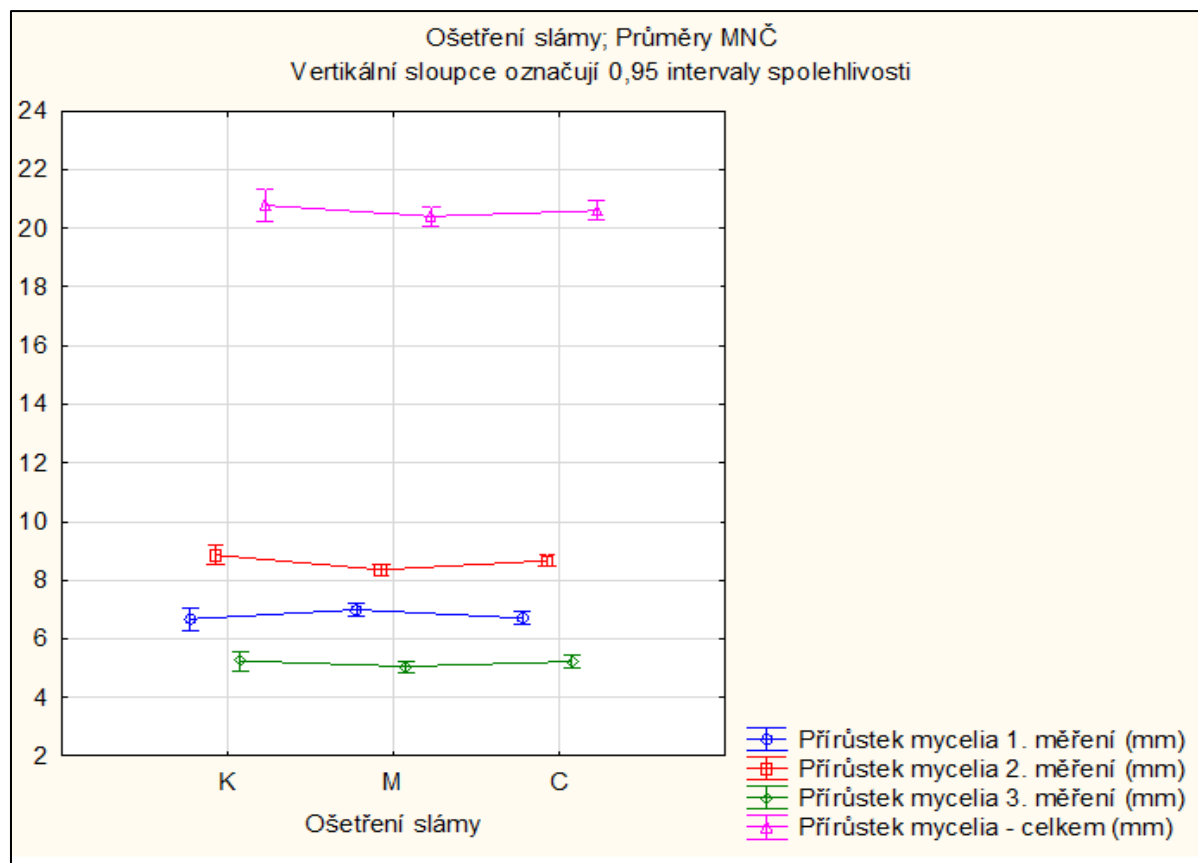
Graf 8 Průměrné přírůstky mycelia *Ganoderma lucidum* při jednotlivých měřeních, K – kontrola, M – Mustang forte, C – Corello

Výsledky byly vyhodnoceny metodou Analýzy rozptylu. (Analysis of variance – ANOVA)

Graf č. 8 zobrazuje průměrné přírůstky mycelia *Ganoderma lucidum* na ošetřené a neošetřené slámě při jednotlivých měřeních.

- K = Kontrolní/neošetřená varianta
- M = Varianta ošetřena přípravkem Mustang Forte
- C = Varianta ošetřená přípravkem Corello

Při 1. měření nevykazovaly dílčí varianty žádné statisticky významné rozdíly mezi průměrnými přírůstků mycelia. Při 2. měření dosáhla statisticky významného rozdílu varianta ošetřená herbicidem Corello, která dosáhla největšího průměrného přírůstku. Při posledním měření neošetřená varianta měla průkazně nejmenší přírůstky oproti ošetřeným variantám.



Graf 9 Přírůstky mycelia *Irpex lacteus* při jednotlivých měřeních – K – kontrola, M – Mustang forte, C – Corello

Výsledky byly vyhodnoceny metodou Analýzy rozptylu. (Analysis of variance – ANOVA)

Graf č. 9 zobrazuje průměrné přírůstky mycelia *Irpex lacteus* na ošetřené a neošetřené slámě při jednotlivých měřeních.

- K = Kontrolní/neošetřená varianta
- M = Varianta ošetřena přípravkem Mustang Forte
- C = Varianta ošetřená přípravkem Corello

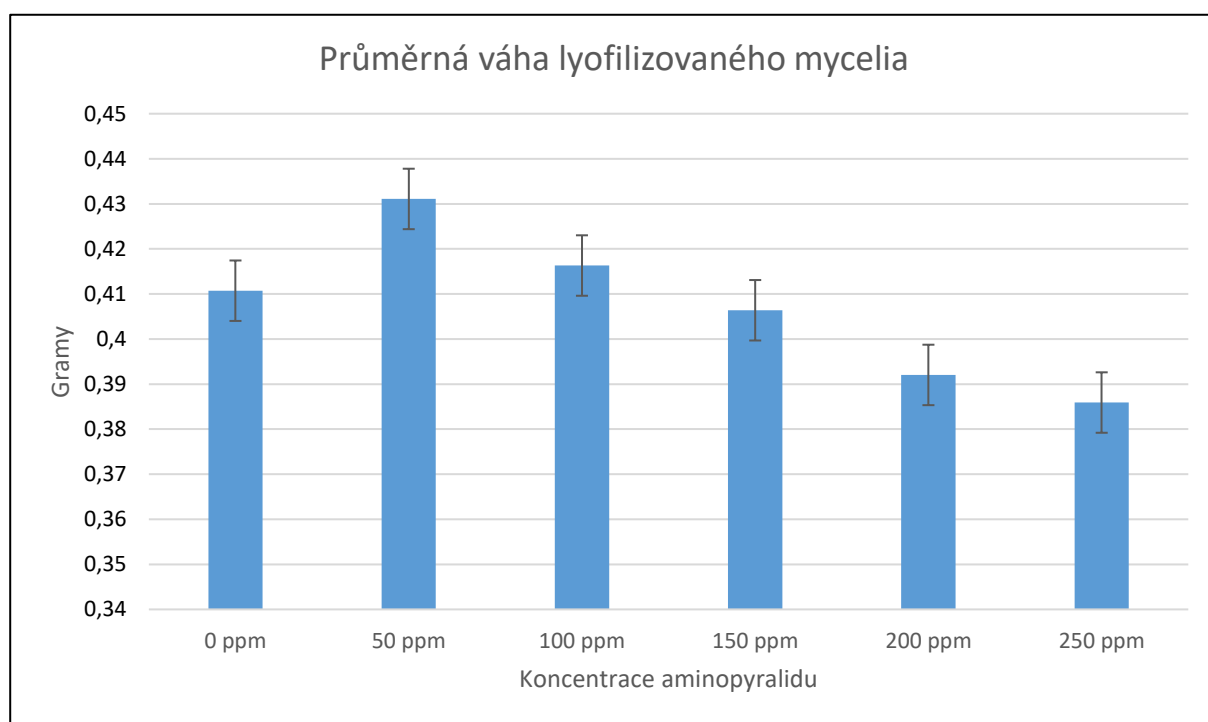
Mezi průměrnými přírůstků mycelia *Irpex lacteus* nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi ošetřenými a neošetřenými variantami.

6.4 Výsledky vlivu různých koncentrací aminopyralidu na tvorbu biomasy kmenu *Pleurotus ostreatus* HK35 kultivovaného na tekutých půdách

Po třech týdnech kultivace se vytvořilo mycelium ve tvaru pelet. Jednotlivé pelety měly bílou barvu a jejich velikost se pohybovala od 1 mm do 10 mm. Na první pohled nebyl zaznamenán zřejmý rozdíl mezi jednotlivými koncentracemi aminopyralidu. Odlišnosti nebyly pozorovány ani mezi odstínem tekutiny. Ta měla světle oranžovou, lehounce zakalenou barvu a nasládlou vůni.

Z grafu č. 10 je patrné, že zde existuje určitá korelace mezi průměrnou váhou lyofilizovaného mycelia a koncentrací aminopyralidu. Při koncentraci 50 ppm skokově vzrostla průměrná hmotnost narostlé biomasy oproti kontrole. S dalším zvyšováním koncentrace již můžeme pozorovat inhibiční účinek této účinné látky.

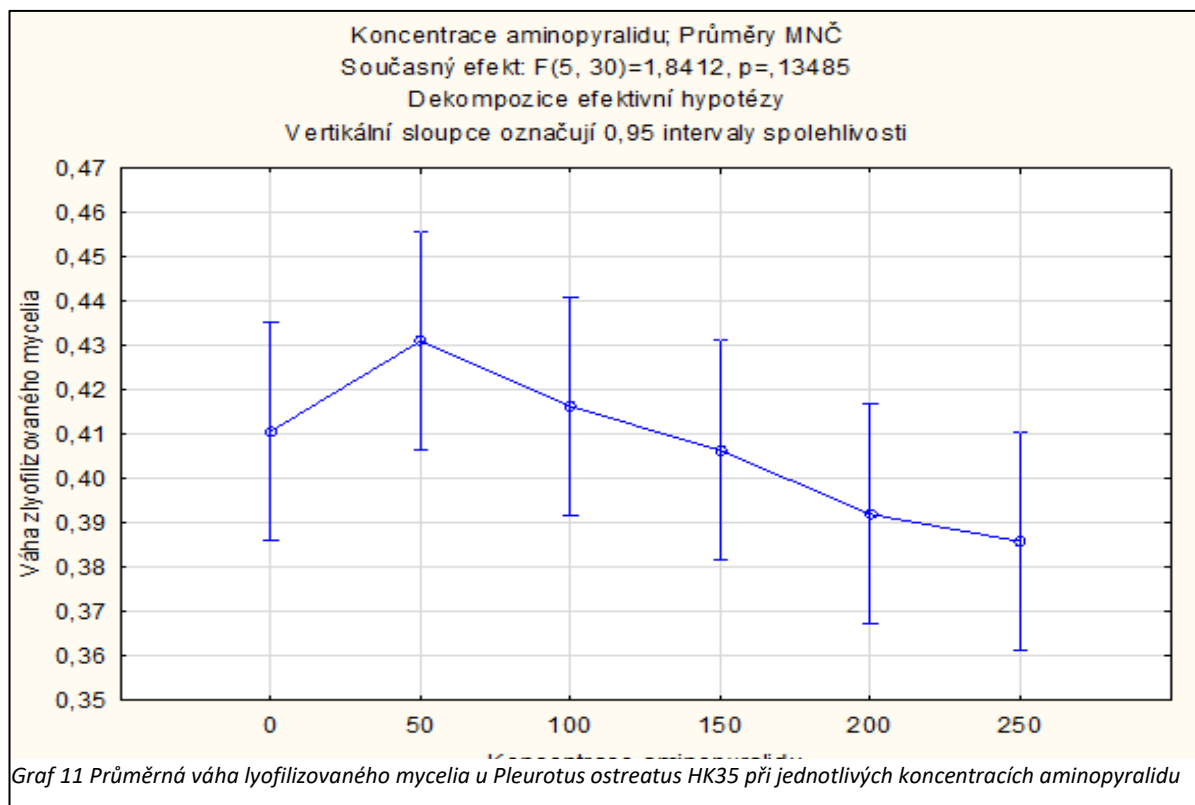
Je možné, že aminopyralid v nízkých koncentracích určitým způsobem pozitivně stimuluje růst biomasy mycelia. Se zvyšujícími se koncentracemi aminopyralid růst mycelia inhibuje. Tímto by se dalo vysvětlit grafické vyjádření závislosti rovnoměrného růstu biomasy na zvyšujících se koncentracích aminopyralidu. Zároveň je nutné konstatovat, že se jedná pouze o předběžnou hypotézu, kterou by bylo vhodné ověřit dalším experimentem. Ten ovšem není součástí předkládané diplomové práce.



Graf 10 Průměrná váha lyofilizovaného mycelia kultivovaného na tekutých půdách při různých koncentracích aminopyralidu

6.4.1 Vyhodnocení v programu Statistica

Výsledky byly vyhodnoceny metodou Analýzy rozptylu (Analysis of variance – ANOVA)



Graf č. 11 znázorňuje průměrnou váhu zlyofilizovaného mycelia u kmene *Pleurotus ostreatus* HK35. Od 50 ppm zde nastal postupný inhibiční efekt v reakci na zvyšující se koncentraci aminopyralidu.



Obrázek 16 Erlenmeyerovy baňky obsahující mycelium *Pleurotus ostreatus* kultivované na tekutých půdách při různých koncentracích aminopyralidu (Foto: Březinová Jana)

6.5 Výsledky vlivu různých koncentrací aminopyralidu na tvorbu biomasy vybraných kmenů hub kultivovaných na tekutých živných půdách

Po 3 týdnech byly Erlenmeyerovy baňky vyjmuty ze třepačky a byly pozorovány rozdíly v barvě, množství i velikosti mycelia nejen mezi jednotlivými kulturami, ale i v rámci kultur s různými koncentracemi aminopyralidu.

Popis jednotlivých kultur v Erlenmeyerových baňkách po 3 týdnech ve třepačce:

Dipodascus geotrichum: Všech 18 baňek obsahovalo nažloutlý zákal. Zde se nevytvořilo typické kulovité mycelium tzv. pelety. Mycelium zde bylo v podobě drobných částíček, které bylo pro lyofilizaci získáno pomocí centrifugace.



Obrázek 17 Kmen *Dipodascus geotrichum* kultivovaný na tekutých půdách při různých koncentracích
(Foto: Březinová Jana)

Cladosporium herbarum: Zde se vytvořily pravidelné, kulovité pelety černé barvy různých velikostí. Zatímco v některých Erlenmeyerových baňkách byla tekutina lehce do šeda zakalená, jiné baňky byly naprosto průzračné. Nicméně nebyla zde shledána žádná spojitost mezi koncentrací aminopyralidu a sytostí zákalu.

- Kontrola: Tekutina v baňkách má šedavý zákal a velikost pelet je od 1 do 10 mm
- 100 ppm – Zde se nacházely pelety velikosti od 1 mm do 12 mm. Všechny 3 kultivační roztoky měly lehce naředlý zákal.
- 200 ppm – Kultivační roztok o koncentraci 200 ppm obsahoval velké množství korálkovitých útvarů mycelia tzv. řetízky a také absenci velkých pelet.

- 300 ppm – Kombinace velkých i drobných pelet. Většina pelet měla rozměr od 3 mm do 5 mm a některé až 1 cm.
- 400 ppm – Při této koncentraci byl pozorován větší zákal než v ostatních koncentracích a nenajdeme zde pelety větších rozměrů. Drtivá většina měla průměr 2–3 mm.
- 500 ppm – Ve 2 baňkách byl roztok zakalený a v jedné průzračný. Většina útvarů mycelia je drobná, pravidelná přibližně 3 mm veliká a každá baňka obsahuje 1–2 pelety o průměru kolem 12 mm.

V jedné baňce o koncentraci 500 ppm došlo k obalení černých pelet bílým myceliem do hvězdicovitého útvaru. Tyto pelety měly šedivý nádech a naprosto atypický tvar.



Obrázek 18 *Cladosporium herbarum* kultivované na tekutých půdách v Erlenmeyerových baňkách při různých koncentracích aminopyralidu (Foto: Březinová Jana)

U kmene *Pleurotus ostreatus* 'Spoppo' se po skončení pokusu mycelium v jednotlivých baňkách lišilo v barvě mycelia, velikosti pelet a vyskytly se rozdíly i ve zbarvení kultivačního roztoku.

- Kontrola: Byla pozorována sytě oranžová barva s lehkým zákalem. Útvary nepravidelné, většinou kulovité.
- 100 ppm – Jedna baňka obsahovala mléčný zákal a zbylé dvě byly průzračné. Pelety měly nepravidelný, kulovitý tvar.

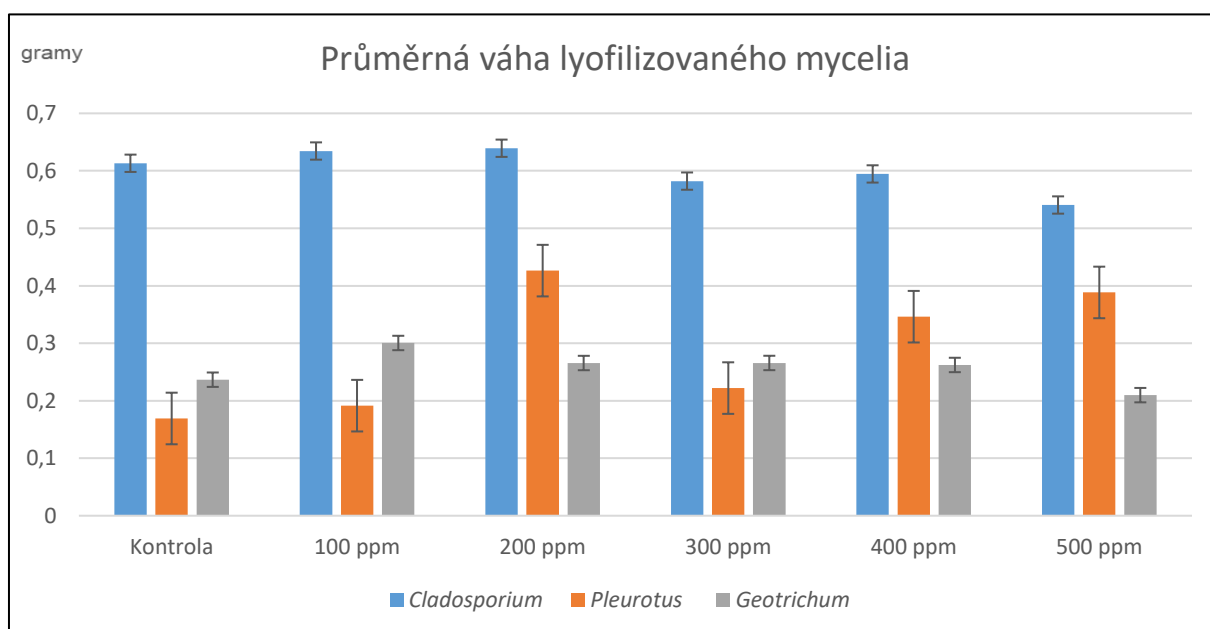
- 200 ppm – Obsah baňek o této koncentraci měl krémový zákal. Pelety byly opět nepravidelně kulovité a velikostně dosahovaly maximálního průměru 2 mm.
- 300 ppm – Stejně jako v předchozích koncentracích i zde byl pozorován lehký krémový zákal a směs pelet menších i větších velikostí.
- 400 ppm – Jedna Erlenmeyerova baňka byla krémově zakalená. Velikost pelet se pohybovala od 1 mm do 5 mm v průměru. Zbylé 2 baňky byly průzračné a bez zákalu. Zde můžeme pozorovat velmi pravidelnou směs pelet. Obsah tvoří pár velkých, dominantních kulovitých útvarů o průměru 15 mm, na kterých byl tenký film z velkého množství sotva viditelných pelet. Zbylé pelety měly běžný tvar a jejich velikost se pohybovala od 1 mm do 10 mm.
- 500 ppm – Ze 3 Erlenmeyerových baňek byla každá určitým způsobem odlišná. První baňka naprosto bez zákalu a na první pohled zde dominovaly 3 pelety o průměru 25–30 mm. Zbylé pelety byly velikosti od 0,5 mm do 1 mm. Druhá baňka měla lehce zakalenou, krémovou tekutinu a drobnější peletky. Třetí baňka byla bez zákalu, jasně oranžové barvy a obsahovala malé i velké útvary pelet.



Obrázek 19 *Pleurotus ostreatus* kultivovaný na tekutých půdách při koncentraci 500 ppm. (Foto: Březinová Jana)

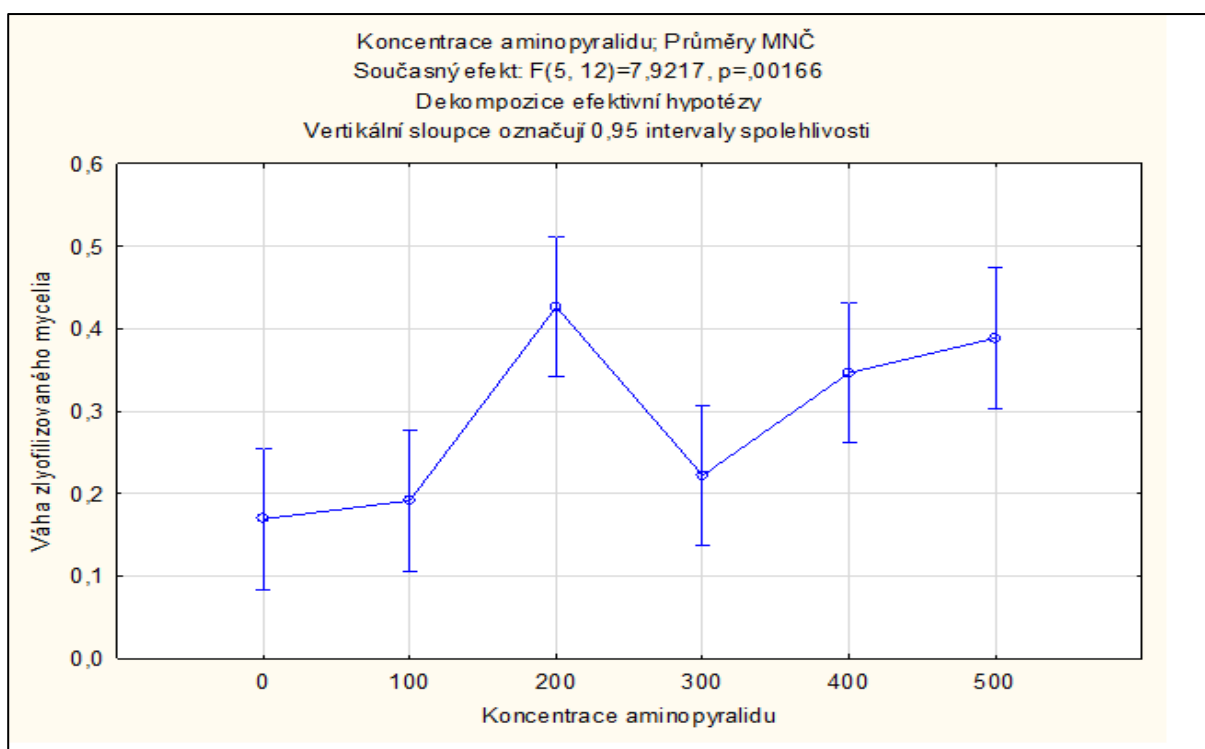
Dipodascus geotrichum a některé baňky obsahující mycelium *Pleurotus ostreatus* 'Spoppo' byly zakalené. Proto byl proveden ověřovací experiment, zdali se nejedná o kontaminaci. Byl odebrán od každého druhu houby 1 vzorek a následně přeočkován na agar-sladové medium. Ukázalo se, že zákal v kulturačním roztoku *Dipodascus geotrichum* a absence pelet je přirozený jev a nejedná se o kontaminaci. Jinak tomu bylo u rodu *Pleurotus*. Zde se jednalo o kontaminaci a kontaminované Erlenmeyerovy baňky nebyly dále hodnoceny.

Z grafu č. 12 vyplývá, že největší produkce mycelia byla vytvořena houbou *Cladosporium herbarum*. U koncentrace 100 ppm a 200 ppm nebyl prokázán inhibiční účinek oproti kontrole. Od koncentrace 300 ppm a výše již můžeme pozorovat pozvolný úbytek průměrné hmotnosti lyofilizovaného mycelia oproti kontrole. U hlívy ústříčné kmene 'Spoppo' se ukázalo, že velmi dobře toleruje vysokou koncentraci aminopyralidu a ve všech koncentracích vykázala průkazný nárůst mycelia vůči kontrole. *Dipodascus geotrichum* mělo nejmenší nárůst mycelia ve srovnání s *Pleurotus* a *Cladosporium herbarum*. Rozdíly v produkci mycelia mezi kontrolou a jednotlivými koncentracemi jsou velmi nízké. Z toho lze konstatovat, že u houby *Dipodascus geotrichum* zvyšující se koncentrace aminopyralidu nijak neovlivnila produkci biomasy.



Graf 12 Průměrné váhy lyofilizovaného mycelia vybraných druhů hub při různých koncentracích aminopyralidu

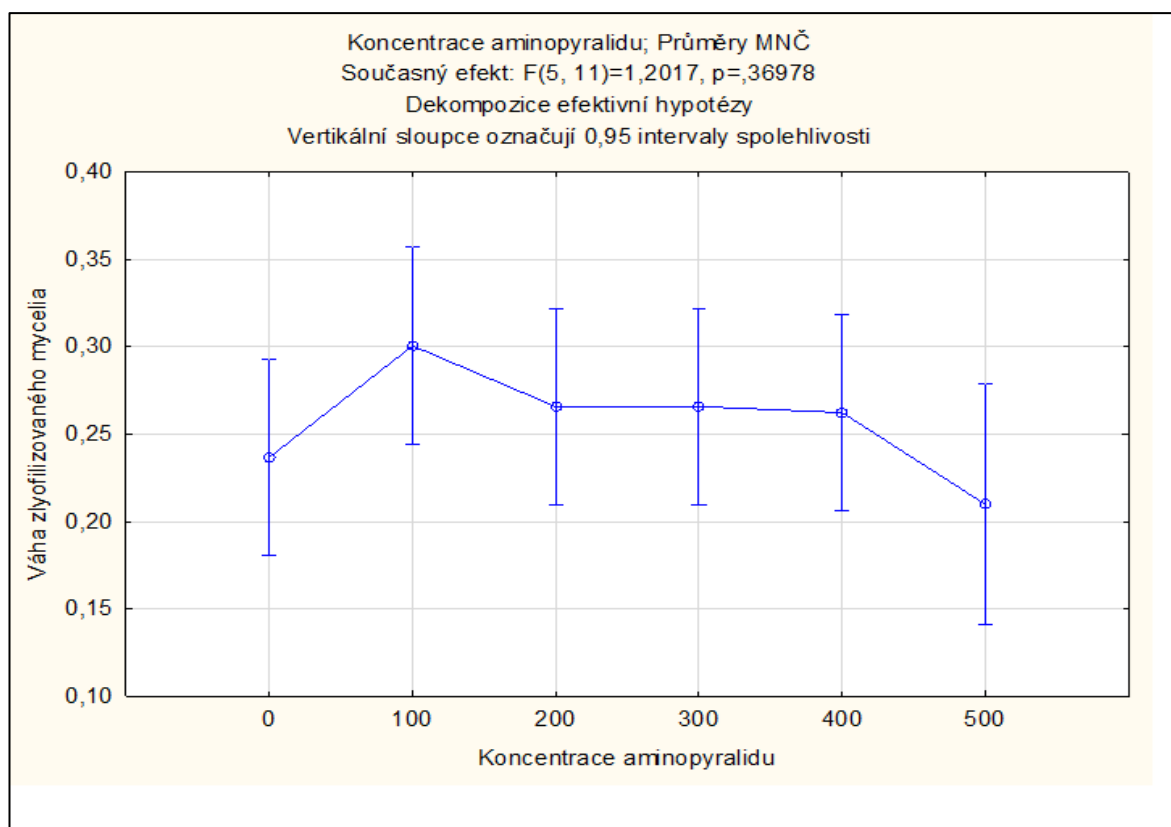
6.5.1 Vyhodnocení v programu Statistica



Graf 13 Průměrná váha lyofilizovaného mycelia u *Pleurotus ostreatus* 'Spoppo' při jednotlivých koncentracích aminopyralidu

Výsledky byly vyhodnoceny metodou Analýzy rozptylu. (Analysis of variance – ANOVA)

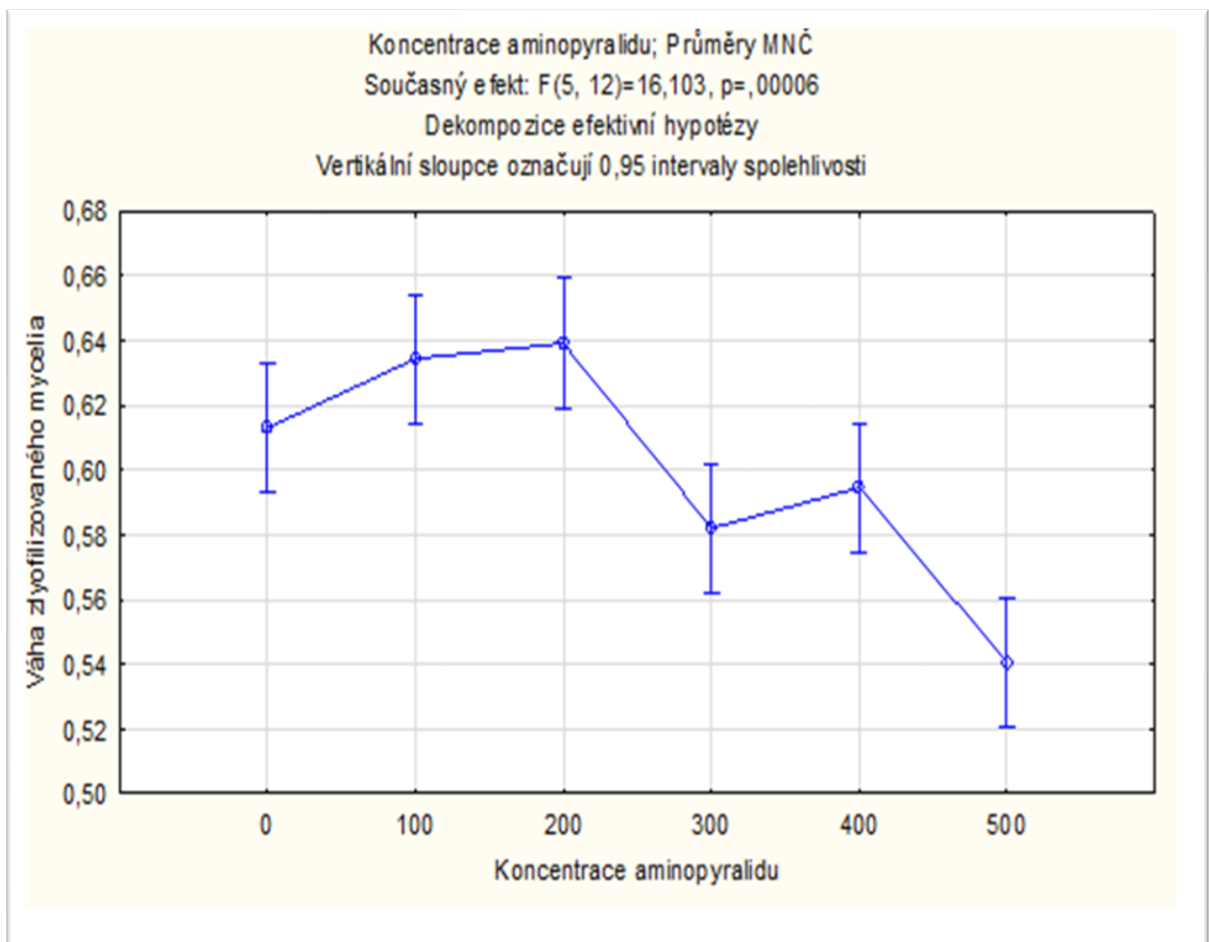
Graf č. 13 znázorňuje průměrnou váhu lyofilizovaného mycelia *Pleurotus ostreatus* kmenu 'Spoppo' při zvyšujících se koncentracích aminopyralidu. Z grafu je patrné, že kmen 'Spoppo' toleruje zvýšenou dávku aminopyralidu. U všech koncentrací došlo k nárůstu biomasy na rozdíl od kontrolní varianty. Ovšem statisticky významný nárůst biomasy je pouze u koncentrací 200 ppm, 400 ppm a 500 ppm.



Graf 14 Průměrná váha lyofilizovaného mycelia *Dipodascus geotrichum* při jednotlivých koncentracích

Výsledky byly vyhodnoceny metodou Analýzy rozptylu. (Analysis of variance – ANOVA)

Graf č. 14 vykresluje průměrnou váhu zlyofilizovaného mycelia *Dipodascus geotrichum* kultivovaného na tekutých živných půdách při různých koncentracích aminopyralidu. Rozdíly v nárůstu biomasy mycelia při jednotlivých koncentracích jsou velmi nízké. U koncentrace 500 ppm je patrná lehká inhibice oproti kontrole. Ovšem nejedná se o statisticky významné rozdíly. Lze tedy konstatovat, že zvyšující se koncentrace aminopyralidu nemají vliv na růst mycelia *Dipodascus geotrichum*.



Graf 15 Průměrná váha lyofilizovaného mycelia *Cladosporium herbarum* při jednotlivých koncentracích

Výsledky byly vyhodnoceny metodou Analýzy rozptylu. (Analysis of variance – ANOVA)

Graf č. 15 znázorňuje vztah mezi průměrnou váhou lyofilizovaného mycelia *Cladosporium herbarum* a zvyšující se koncentrací aminopyralidu. Statisticky významné rozdíly jsou pouze mezi koncentracemi 0, 300 a 500 ppm. Zde byl nárůst biomasy průkazně inhibován zvýšenou koncentrací aminopyralidu.

6.6 Zjištění vlivu přípravků Corello a Mustang Forte na výnos plodnic *Pleurotus ostreatus* pěstované na substrátu z pšeničné slámy

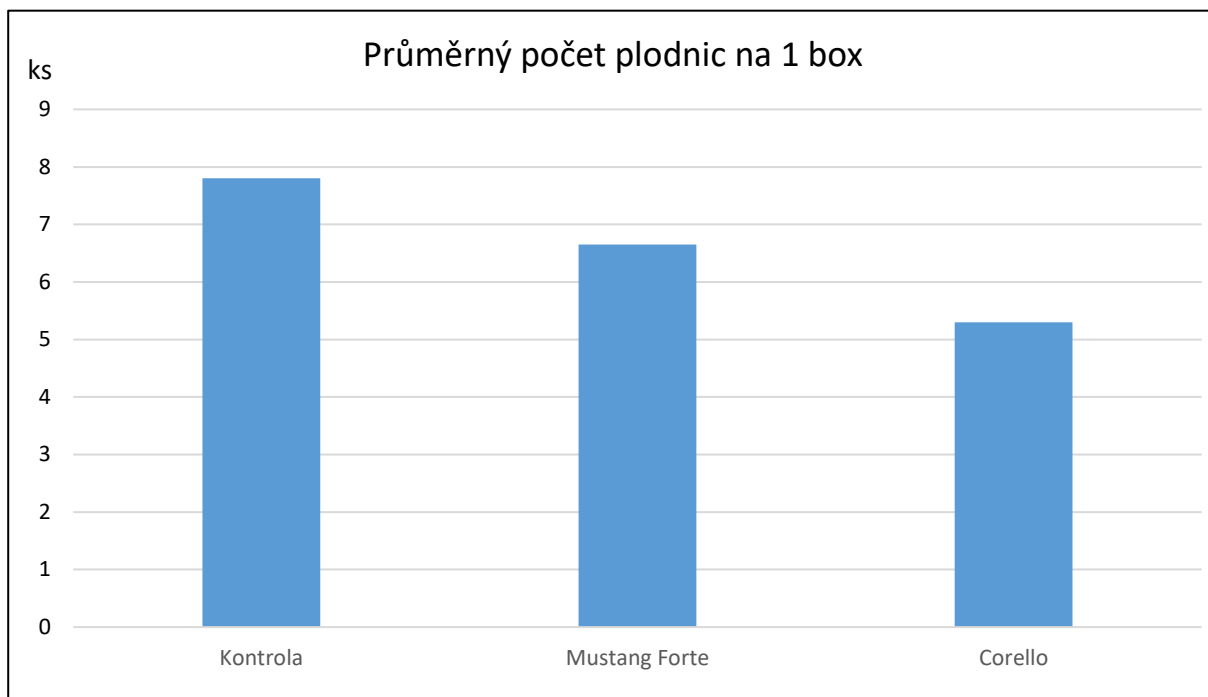
V průběhu sklizně nebyly pozorovány významné rozdíly v nasazování plodnic mezi jednotlivými variantami. Největší rozdíly jsme mohli pozorovat u bloků, které byly umístěny v nejvyšší polici. Zde byly třeně velmi vytáhlé, dlouhé a klobouk nažloutlý. Tyto abnormality ovšem nebyly způsobeny přítomností herbicidu, ale okolním prostředím. Nad nejvyšší polici byla umístěna klimatizace, která neustále vysoušela substrát. To způsobilo zasychání plodniček a celkové vysychání substrátu. Později byly boxy z těchto problematických míst přesunuty do nižších pater.

Z každého bloku byly plodnice po sklizni ihned zváženy a přepočítány. Sklizeň proběhla v pěti termínech. V prvním termínu byla sklizeň nejsilnější a následně ustávala.

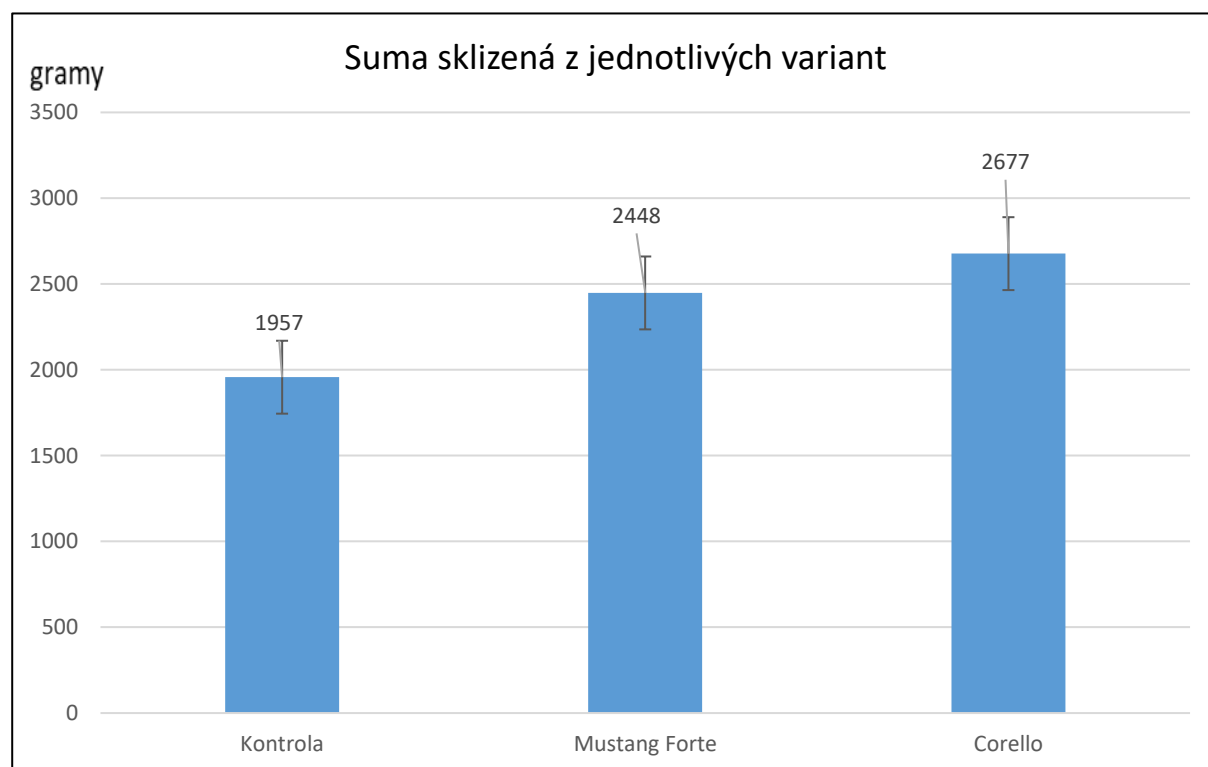
Z grafů č. 16 a 17 vyplývá, že varianta ošetřená herbicidem Corello vytvořila v průměru nejmenší počet kusů plodnic, ale z hlediska hmotnosti byly největší. Z této varianty jsme získali nejméně plodnic při dosažení nejvyššího výnosu. Mustang Forte s účinnou látkou aminopyralid taktéž pozitivně ovlivnil výnos ve srovnání s kontrolou. Na kontrolní variantě substrátu bylo dosaženo největšího počtu plodnic, ale na druhou stranu jejich průměrná hmotnost byla nejnižší. Kontrolní varianta nedosahuje takového výnosu, jako ošetřené varianty. Můžeme konstatovat, že účinné látky aminopyralid a pyroxsulam pozitivně ovlivnily celkový výnos.



Obrázek 20 První sklizeň *Pleurotus ostreatus*. Zleva Corello, kontrola (Foto: Březinová Jana)

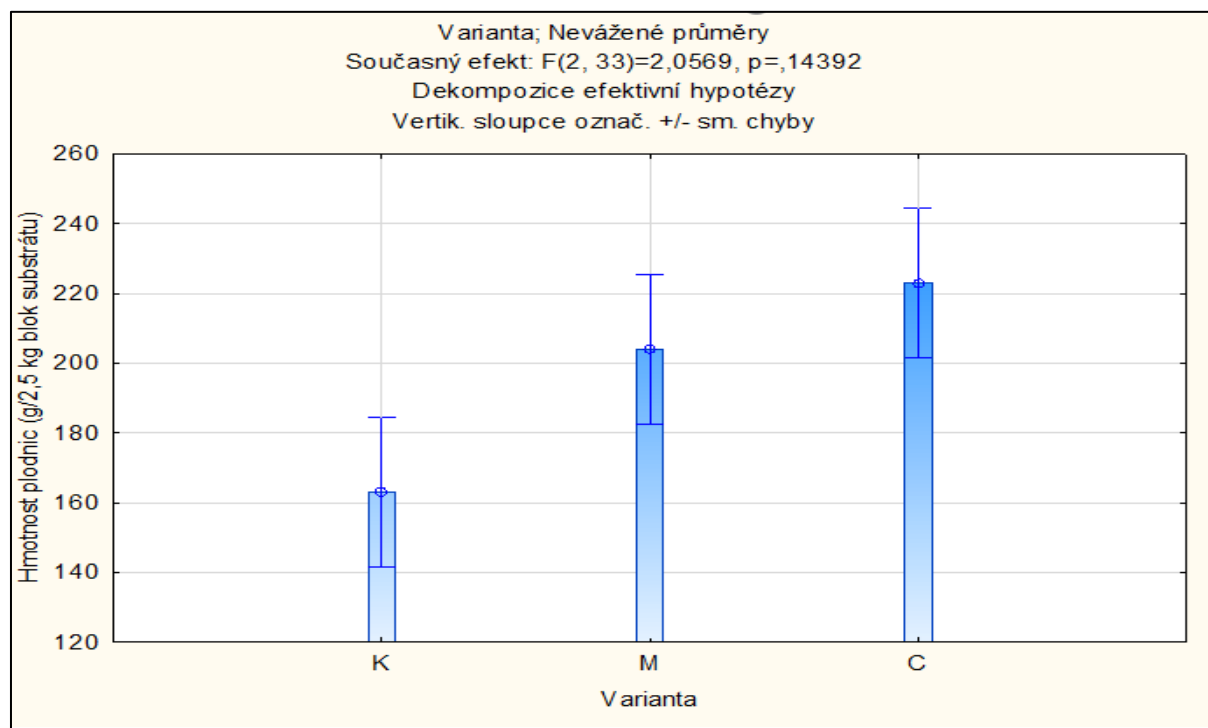


Graf 16 Průměrný počet sklizených plodnic *Pleurotus ostreatus* pěstovaných na ošetřených a kontrolním neošetřeném substrátu



Graf 17 Celkový výnos *Pleurotus ostreatus* z jednotlivých variant pěstovaných na ošetřených a kontrolním neošetřeném substrátu

6.6.1 Vyhodnocení v programu Statistica



Graf 18 Celkový výnos *Pleurotus ostreatus* z jednotlivých variant – K – Kontrola, M – Mustang Forte, C – Corello

Graf č. 18 znázorňuje výnos *Pleurotus ostreatus* pěstované na jednotlivých variantách substrátu

- K = Kontrolní/neošetřená varianta
- M = Varianta ošetřena přípravkem Mustang Forte
- C = Varianta ošetřena přípravkem Corello

Varianty ošetřené herbicidy Corello a Mustang Forte mají statisticky významný nárůst ve výnosu v porovnání s neošetřenou kontrolní variantou. Celkový nejvyšší výnos byl sklizen na variantě ošetřené herbicidem Corello.

6.7 Výsledky vermikompostování vyplozeného substrátu hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*)

Při prvním odběru vzorků nebyly pozorovány žádné změny ve struktuře slámy. Substrát byl vlhký, neměnný a prorostlý myceliem, které na pár místech vytvářelo drobné útvary. Nežádoucí drobné plodničky byly odstraněny. Ve variantách s žížalami jsme mohli pozorovat na povrchu substrátu, těsně pod krycím víkem, velké množství výkalů. Z toho lze soudit, že žížaly si cestu z inokula našly. Po jemném prohrábnutí substrátu bylo možné na pár místech spatřit klubička žížal. Žížaly jsou velmi drobné, světlé a tenké. Největší množství žížal se nacházelo v mateřském inokulu.

Dva měsíce od založení pokusu byl do slámy pravidelně přidáván nitrifikovaný fugát. Tím se výrazně změnil poměr C : N a urychlil rozklad organické hmoty. Již při druhém odběru vzorků jsme mohli pozorovat téměř rozložený, sypký substrát tmavé barvy. Ovšem stále jsou zde patrná slaměná stébla. Substrát v pokusných nádobách s žížalami se zdál být více rozložený než substrát s absencí žížal. Kalifornské žížaly se od první kontroly výrazně namnožily. Byla zde pozorována celá klubička tmavých žížal. Některé byly dlouhé a silné, jiné byly mladší, a tudíž i menší. Také zde bylo nalezeno větší množství kokonů. Lze soudit, že se žížalám daří velmi dobře, jsou vitální a substrát ošetřený nitrifikovaným fugátem jim svědčí.

Při třetí kontrole zde byly pozorovány významné rozdíly mezi jednotlivými pokusnými nádobami. Přestože všechny pokusné nádoby měly být zvlhčovány ve stejných intervalech a stejném množství vody, při poslední kontrole byl substrát některých nádob zcela vyschlý. Zde se pochopitelně žádné žížaly nenacházely. Substrát s optimální vlhkostí byl zcela rozložený, sypký a měl charakteristickou vůni. Nacházelo se zde velké množství žížal různého stáří včetně kokonů. Žížaly měly tmavou barvu a evidentně zde prospívaly.



Obrázek 21 Založená pokusná nádoba pro kultivaci Kalifornských žížal na vyplozeném slaměném substrátu (Foto: Březinová Jana)



Obrázek 22 Pokusná nádoba určená ke kultivaci Kalifornských žížal po aplikaci fugátu (Foto: Březinová Jana)



Obrázek 23 Téměř rozložený slaměný substrát při 3. kontrole (Foto: Březinová Jana)



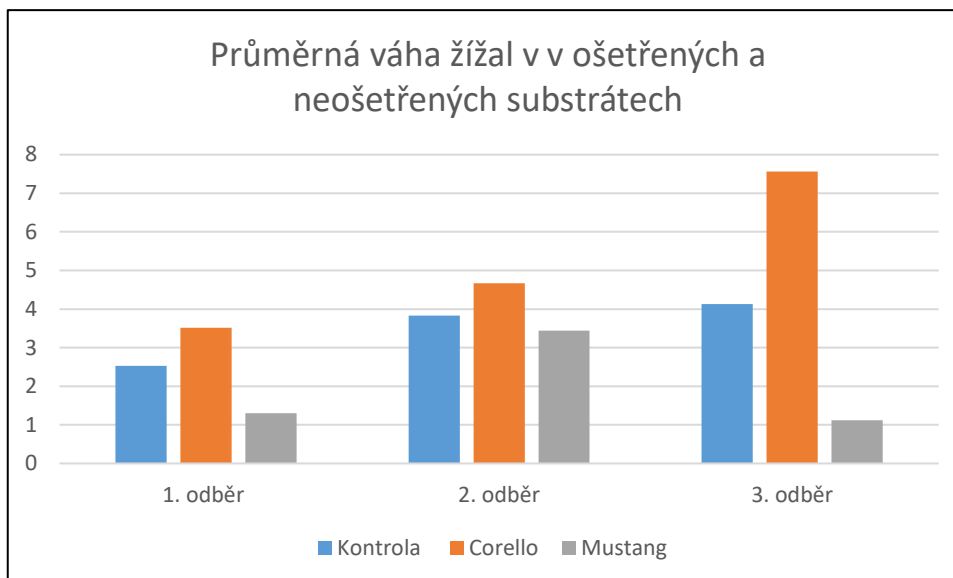
Obrázek 24 Kokon nalezený v substrátu s kultivovanými Kalifornskými žížalami (Foto: Březinová Jana)



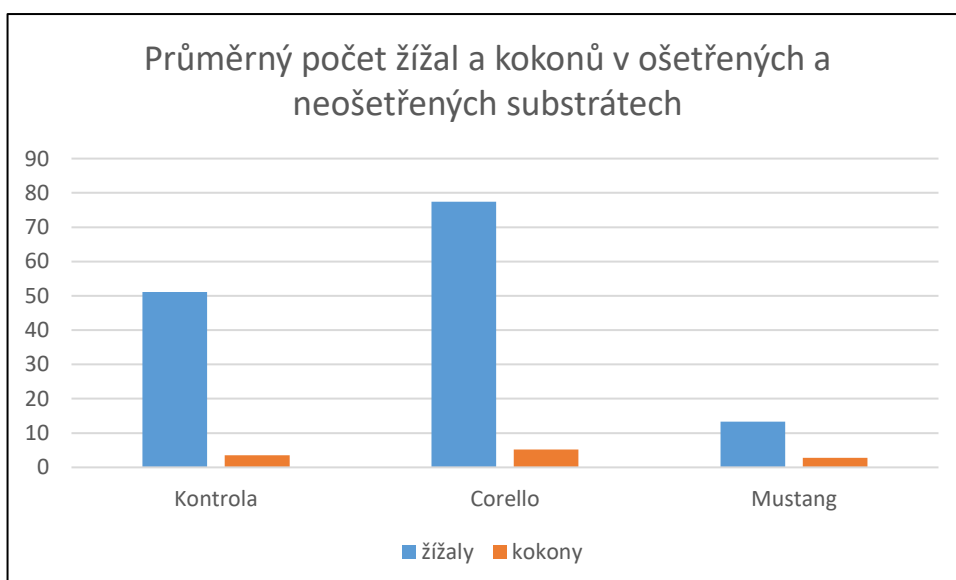
Obrázek 25 Kalifornské žížaly (*Eisenia andrei*) na Petriho misce určené k lyofylizaci (Foto: Březinová Jana)



Obrázek 26 Petriho miska se savým papírem sloužící k vyprázdnění a očištění žížal (Foto: Březinová Jana)



Graf 19 Průměrná váha žížal (*Eisenia andrei*) v ošetřených a neošetřených substrátech



Graf 20 Průměrný počet žížal a kokonů (*Eisenia andrei*) nacházejících se v jednotlivých substrátech

Z grafů č. 19 a 20 vyplývá, že největší počet žížal a kokonů se nacházel ve vyplozeném substrátu ošetřeném herbicidem Corello s účinnou látkou pyroxsulam. Zdá se ovšem, že herbicidy v ošetřené slámě měly až druhotný vliv na růst a vývoj Kalifornských žížal (*Eisenia andrei*). Mnohem větší roli zde hrály vlhkostní podmínky, které přímo ovlivňovaly nejen růst a vývoj žížal, ale také dobu rozkladu substrátu. V průběhu trvání pokusu nebylo možné každý den kontrolovat a zajišťovat potřebnou vlhkost substrátu, tudíž některé pokusné nádoby byly vystaveny velkým vlhkostním výkyvům. To žížalám neprospívalo a v nádobách se jich nacházelo výrazně méně.

7 Diskuze

Pro některé experimenty, blíže popsané v praktické části této diplomové práce, byly vybrány houby bílé hniloby jako potencionální rozkladači účinných látek obsažených v herbicidních přípravcích Corello a Mustang Forte. Houby byly vybrány na základě dostupné literatury, která uvádí, že využití hub bílé hniloby, zejména houby *Pleurotus ostreatus* případně houby rodů *Irpex*, *Trametes*, *Phanerochaete*, *Ganoderma* jsou velice perspektivní pro potencionální využití v mykoremediační praxi. (Tlustoš a kol., 2017) Houba *Phanerochaete chrysosporium* se ukázala jako velmi efektivní v biotransformaci atrazinu (selektivní herbicid). V experimentu byl prokázán 48% pokles počáteční koncentrace herbicidu již během prvních čtyř dnů kultivace na růstovém mediu. Výsledky jasně prokázaly mineralizaci ethylové skupiny herbicidu. (Mougin a kol., 1994) V experimentu (6.1.) jsme kultivovali *Phanerochaete chrysosporium* na agarladovém mediu obohaceným různými koncentracemi aminopyralidu. Ukázalo se, že tato houba je velmi rychle rostoucí bez ohledu na zvyšující se koncentraci 1–100 ppm a tyto vysoké dávky aminopyralidu velmi dobře toleruje. Ukázalo se tak, že některé dřevobytné houby tolerují vysoké koncentrace aminopyralidu.

Bastos a Magan (2009) uvádí, že houba *Trametes versicolor* je schopna metabolizovat širokou škálu organických sloučenin, díky produkci extracelulárních ligninolytických enzymů. Prokázalo se, že *Trametes versicolor* vykazuje velmi dobrou toleranci vůči podmínkám vodního stresu a také triazinovým pesticidům, což z něj dělá kandidáta na mykoremediaci atrazinu v půdě s nízkým obsahem vlhkosti a organické hmoty. Růstový habitus mycelia umožňuje rychlou kolonizaci substrátu a využití sloučenin, které jsou jinak hůře dostupné širšímu spektru mikroorganismů. V experimentu blíže popsáném v této práci byla houba *Trametes versicolor* kultivována na agarladové půdě obohacené různými koncentracemi aminopyralidu. (0,1, 10 a 100 ppm). Již 8. den od naočkování *Trametes versicolor* dosáhla okraje Petriho misky a potvrdil se tak velmi rychlý růst mycelia. Zvyšující se koncentrace aminopyralidu – 1ppm a 10 ppm určitým způsobem stimulují růst mycelia. Pozvolný inhibiční účinek se projevil až u koncentrace 100 ppm.

Bending a kol. (2002) uvádějí, že mezi houbami bílé hniloby jsou značné rozdíly ve schopnosti degradovat pesticidy v kapalném mediu. Nejlepší výsledky v degradaci herbicidu v jejich pokusech vykazaly houby *Coriolus versicolor* a *Stereum hirsutum*. Jako jediné byly schopny degradovat metalyxyl (systémový fungicid) ve významném množství (až 63 %). *Dichotomitus squalens*, *Phanerochaete velutina* a *Pleurotus ostreatus* byly schopny degradovat méně než 10 % pesticidu. Bending a kol. (2002) dále uvádí, že nebyl prokázán žádný vztah mezi ligninolytickou aktivitou a degradací kteréhokoli z použitých pesticidů. Nicméně existovaly jasné vztahy mezi schopnostmi hub degradovat různé třídy pesticidů. Např. triaziny, pyrethroidy, organofosfáty, organochlorové, fenoxalkanové pesticidy.

Pleurotus ostreatus je velmi transparentní houba schopná rozkládat a akumulovat velké množství polutantů, například těžké kovy, jako jsou olovo, chrom, zinek, měď nebo nikl, přítomné v odpadních vodách (Vaseema a kol., 2017). Hlíva ústříčná je také schopna absorbovat oxytetracyklin (antibiotikum) z tekutých kultivačních médií během dvou týdnů kultivace. Degradace oxytetracyklinu probíhala bez ligninolytického enzymu lakázy. (Miglioreaa kol., 2012) Z pesticidů je hlíva ústříčná schopna degradovat nebezpečný aldrin a jeho hlavní metabolit dieldrin. (Akhtar a Mannan, 2020).

Na základě těchto informací jsme při různých experimentech testovali odlišné kmeny *Pleurotus ostreatus*, které by eventuelně mohly rozkládat účinné látky aminopyralid a pyroxsulam. U kmenů *Pleurotus ostreatus* 'Ivory' a 'Spoppo' byly sledovány průměrné přírůstky mycelia na agar-sladovém mediu. Růst mycelia kmene 'Ivory' byl s rostoucí koncentrací od 0 ppm do 500 ppm mírně inhibován. Kmen 'Spoppo' měl největší rozdíl mezi průměrným růstem mycelia mezi 300 ppm – 400 ppm, kde naměřené hodnoty skokově klesly. Je zřejmé, že zde existuje jistá korelace mezi zvyšující se koncentrací aminopyralidu a průměrnými přírůstky mycelia. Další testované druhy hub byly *Trametes versicolor*, *Ganoderma lucidum*, *Irpex lacteus* a *Phanerochaete chrysosporium*. Zde růst mycelia se zvyšující se koncentrací nebyl nijak výrazně ovlivněn. U druhu *Dipodascus geotrichum* a *Cladosporium herbarum* byl opět zaznamenán významný inhibiční faktor, který je nejvíce patrný mezi koncentracemi 300 a 400 ppm. Pro případné zopakování těchto pokusů bych navrhovala mycelium kultivovat na agar-sladové médium terčíkovou metodou. Dále bych navrhovala měřit přírůstky mycelia každý den, popřípadě každý druhý den. Ideálně i stejný časový interval (například každý den 15:00). Je jasné, že pokusy budou časově a organizačně náročnější, nicméně výsledky by mohly mít větší vypovídající hodnotu o průběhu kolonizace agarových půd myceliem. Například mycelium *Phanerochaete chrysosporium* při 1. měření, které proběhlo čtvrtý den od očkování, již dosáhlo kraje misky. Pokud by měření probíhalo v kratších intervalech, mohli bychom udělat závěr i pro tento druh.

Při kultivaci mycelia vybraných druhů hub na slaměném substrátu ve zkumavkách nebylo dosaženo žádných statisticky významných rozdílů mezi herbicidy ošetřenými a neošetřenými variantami. Mycelium druhů *Irpex lacteus* a *Ganoderma lucidum* přirůstalo na ošetřených i neošetřených variantách stejně rychle. Účinné látky aminopyralid a pyroxsulam tedy na růst mycelia vliv nemají. Za to mají pozitivní vliv na výnos plodnic hlívy ústříčné. Experiment, který je blíže popsán v kapitole 6.6., byl zaměřen na vliv přípravků Corello a Mustang Forte na tvorbu plodnic *Pleurotus ostreatus* kmen 'Spoppo', které byly pěstovány na substrátu na bázi pšeničné slámy. Největší výnosy plodnic byly dosaženy na herbicidy ošetřených variantách. Ke stejnému závěru dospěla ve svých výsledcích i Baráková (2021). Účinné látky působí jako syntetický auxin, který na jednu stranu potlačuje vývoj některých rostlin, ale na druhé straně přispívá ke zvýšení růstu mycelia a hlavně výnosu plodnic hlívy. Proto hlíva na ošetřených variantách lépe prospívá. Auxiny pravděpodobně stimulují růst mycelia a pozitivně ovlivňují

výnos plodnic. V příbalovém letáku obou herbicidů je uvedeno, že slámu z porostů ošetřenou zmíněným přípravkem není vhodné používat pro pěstování hub.

Výrobce tuto informaci uvedl pravděpodobně s předběžnou opatrností. Později bylo zjištěno, že aminopyralid v nezměněné podobě projde trávícím traktem a nemá žádné škodlivé účinky na zdraví lidí ani zvířat. Stejně tak pyroxsulam není nijak nebezpečný a na zdraví lidí a zvířat nemá žádný vliv.

Izolace mikrobiální populace schopné rozkládat účinné látky herbicidů Mustang Forte a Corello, popsána v kapitole 5.1.3., byla prováděna v Ústavu biochemie a mikrobiologie VŠCHT. Metodou tzv. „nabohacování“ byly izolovány 3 druhy vláknitých hub. Metodou PCR byly určeny jako: *Dipodascus geotrichum*, *Candida subhashii* a *Cladosporium herbarum*. Jelikož se tyto organismy přirozeně vyskytovaly v půdě kontaminované aminopyralidem, odkud byly následně izolovány, existoval zde předpoklad, že by právě tyto organismy mohly být stěžejní v dekontaminaci aminopyralidu z různých pěstebních médií.

V kapitole 6.4. a 6.5. je popsán vliv různých koncentrací aminopyralidu na tvorbu biomasy vybraných kmenů hub kultivovaných na tekutých půdách. Zde byly mimo jiné použity druhy právě z předchozího experimentu *Dipodascus geotrichum* a *Cladosporium herbarum*. Zatímco při prvním pokusu kmen *Pleurotus ostreatus* HK35 vykázal inhibiční účinek na růst mycelia od koncentrace 50 ppm, průměrná váha mycelia kmenu 'Spoppo' při navýšených koncentracích aminopyralidu měla opačný trend. Na kontrolní variantě neobsahující aminopyralid vytvořil kmen 'Spoppo' nejmenší množství biomasy mycelia a se zvyšujícími se koncentracemi aminopyralidu se biomasa mycelia navyšuje oproti kontrole. To naznačuje, že účinná látka aminopyralid měla pozitivní stimulační efekt na růst mycelia hlívy ústříčné kmene 'Spoppo'. *Dipodascus geotrichum* nebyl nijak ovlivněn zvyšující se koncentrací. Mycelium *Cladosporium herbarum* vytvořilo největší množství biomasy a toleruje vysoké koncentrace aminopyralidu. Díky „nabohacovacímu“ experimentu jsme získali druh *Cladosporium herbarum*, který se ukázal jako velmi perspektivní pro mykoremediaci, jelikož dobře roste i vysokých koncentracích aminopyralidu. 'Spoppo' se též projevil jako velmi perspektivní kmen, neboť při zvyšující se koncentraci aminopyralidu došlo k výraznému přírůstku mycelia na rozdíl od kontroly.

Účelem vermikompostování vyplozeného substrátu hlívy ústříčné obsahujícího aminopyralid a pyroxsulam bylo zjistit, zdali se urychlí jejich rozklad působením žížal. Tento experiment již byl ukončen, nicméně výsledky z laboratoře, které by nám nastínily, jak se měnil obsah účinných látek v průběhu vermikompostování a po vermikompostování, ještě nejsou známy. Podobný experiment prováděl Lin a kol. (2016), kdy zkoumali úlohu a mechanismy působení žížal *Eisenia foetida* na rozklad pentachlorofenolu, (dále PCP – toxický pesticid) při vermikompostování. Ukázalo se, že synergické účinky žížal v kompostu přispěly k urychlení biodegradace PCP tím, že významně zlepšily mikrobiální aktivitu. Sekvenční analýza určila přítomné čeledi mikroorganismů, a to: *Pseudomonadaceae*, *Sphingobacteriaceae*,

Xanthomonadaceae a houbové čeledi *Trichocomaceae*, které byly zodpovědné za biodegradaci PCP stimulované vermikompostováním.

Vermikompostovat vyplozený slaměný substrát hlívy ústříčné je tedy možné. Při zopakování tohoto pokusu by bylo žádoucí použít slámu, která je jemnější frakce a již od začátku pokusu aplikovat nitrifikovaný fugát, který změni poměr C : N a výrazně uspiší rozklad organické hmoty. Celý substrát tak bude lépe přístupný pro kalifornské žížaly. Ve výsledcích jsou zpracovány průměrné počty a váha žížal z odebraných vzorků. Potíž nastala při odebírání vzorků. Kalifornské žížaly se shlukují v celá klubka a při odebírání objektivně reprezentativních vzorků by musel být celý substrát obsahující žížaly homogenizovaný. Tím by se ale narušila klubka a žížaly by postupně zahynuly. Stěžejní tak budou až laboratorní výsledky obsahů herbicidů v substrátu v průběhu a na konci vermikompostování.

8 Závěr

Cílem předkládané diplomové práce bylo na základě vypracovaných pokusů najít perspektivní druh houby, který by byl schopen urychlit rozklad aminopyralidu a pyroxsulam ve slámě. Dalším cílem bylo zjistit, jakým způsobem ovlivňují účinné látky aminopyralid a pyroxsulam růst a vývoj plodnic hub *Pleurotus ostreatus*. Poslední pokus se týkal vermikompostování substrátu hlívy ústříčné. Bylo zjišťováno, zdali se působením žížal (*Eisenia andrei*) urychlí rozklad aminopyralidu a pyroxsulam ve slámě.

Jako nejperspektivnější druh vhodný pro dekontaminaci aminopyralidu se na základě provedených pokusů jeví druh *Cladosporium herbarum*. Při kultivaci na tekutých půdách mycelium rostlo velmi dobře i při vysokých koncentracích aminopyralidu. Z toho lze usoudit, že by tento druh mohl být schopen potenciálně aminopyralid i rozkládat. Jako další perspektivní druh se jeví *Pleurotus ostreatus*, kmen 'Soppo'. Při kultivaci na tekutých půdách mycelium sice nevytvořilo takový objem biomasy jako *Cladosporium herbarum*, nicméně zde došlo k pozitivní stimulaci mycelia a nárůstu biomasy na variantách ošetřených aminopyralidem na rozdíl od kontrolní varianty s absencí aminopyralidu.

Neprokázalo se, že by účinné látky aminopyralid a pyroxsulam měly jakýkoli vliv na růst mycelia ve slámě. Za to byl prokázán významný pozitivní vliv na výnos plodnic hlívy ústříčné (*Pleurotus ostreatus*). Nejvyšší výnos plodnic byl zaznamenán u varianty, která byla ošetřena herbicidem Corello s účinnou látkou pyroxsulam. Naopak nejnižší výnos byl zaznamenán u kontrolní varianty s absencí herbicidů. Účinné látky aminopyralid a pyroxsulam působí jako syntetický auxin. Z toho důvodu hlíva na ošetřených variantách lépe roste a celkový výnos je vyšší než na neošetřeném substrátu s absencí herbicidu.

Prokázalo se, že vermikompostovat vyplozený substrát pomocí žížal *Eisenia andrei* je možné. Bohužel výsledky z laboratoře o změnách obsahu účinných látek v průběhu vermikompostování ještě nejsou známy. Vyhodnocovány tedy byly pouze počty a průměrná váha žížal z odebraných vzorků. Ukázalo se, že nejlépe prospívaly žížaly, které měly k dispozici vyplozený substrát ošetřený herbicidem Corello. Zde se také nacházel nejvyšší počet žížal i kokonů.

9 Literatura

AKHTARA, N. a MANNAN M.A. Mycoremediation: Expunging environmental pollutants. *Biotechnology Reports* [online]. 2020 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7322808/>

BASTOS, A.C. a MAGAN N. *Trametes versicolor: Potential for atrazine bioremediation in calcareous clay soil, under low water availability conditions* [online]. 2009, str. 389-394 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830508001960?casa_token=3ArDmQr1bIQAAAAA:iUi8nSkUa6KXIF5V68IO9_hC7zydja6x6vBuXyle4JOM3J34bxDC-kcX-8pt9u03BnbPL391pls

BENDING, G. D., FRILOUX M. a WALKER A. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *Microbiology Letters* [online]. 2002, str. 59-63 [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsle/article/212/1/59/450925?login=false>

BORJA, J., TALEON D.M., AURESENIA J. a GALLARDO S. Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process Biochemistry* [online]. 2005 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959204003620?via=ihub>

CAJTHAML, T. *Mechanismy biodegradace perzistentních organických polutantů a nově se objevujících mikropolutantů ligninolytickými houbami*. Praha, 2018. Disertační práce. Akademie věd České republiky.

ČVANČAROVÁ, M. *Studium hlavních aspektů mykoremediace – vliv biodostupnosti, biodegradace a toxicity organických polutantů*. Praha, 2014. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.

GABRIEL, J. a NOVOTNÝ Č. Dřevokazné houby pomáhají regenerovat životní prostředí. *Vesmír*. 2012, 222-223.

GAJENDIRAN, A. a ABRAHAM J. Biomineralisation of fipronil and its major metabolite, fipronil sulfone, by *Aspergillus glaucus* strain AJAG1 with enzymes studies and bioformulation. *Biotechnology Reports* [online]. 2017, [cit. 2022-03-24]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-017-0820-8#article-info>

HAUERLAND, M. *Metodická příručka pro ochranu rostlin: polní plodiny*. V Brně: Státní rostlinolékařská správa, odbor prostředků ochrany rostlin, 1999. ISBN 80-239-4231-X.

HOFMAN, J. *Rezidua pesticidů v orných půdách České republiky* [online]. České Budějovice: Kurent, 2022 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/ochrana-obecne/rezidua-pesticidu-v-ornych-pudach-ceske-republiky>

HROUDA, P. *Biotechnologie a praktické využití hub* [online]. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav botaniky a zoologie, 2017 [cit. 2022-03-20]. Dostupné z: <https://www.sci.muni.cz/botany/mycology/biotech.htm>

CHAN-CUPUL, W., HEREDIA-ABARCA G. a RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ R. *Atrazine degradation by fungal co-culture enzyme extracts under different soil conditions* [online]. 2016 [cit. 2022-03-25]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26830051/>

JURSÍK, M. a SOUKUP J. *Rezidua herbicidů v půdě a jejich vliv na následné plodiny* [online]. České Budějovice: Kurent, 2022 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/plevele/rezidua-herbicidu-v-pude-a-jejich-vliv-na-nasledne-plodiny>

JURSÍK, M, HOLEC J., HAMOUZ P. a SOUKUP J. *Biologie a regulace plevelů*. České Budějovice: Kurent, 2018. ISBN 978-80-8711-171-0.

JURSÍK, M., KOČÁREK M., KOLÁŘOVÁ M., HAMOUZ P. a ANDR J. *Optimalizace regulace plevelů v systému integrované produkce slunečnice: certifikovaná metodika*. V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2018. ISBN 978-80-213-2888-4.

KŘESINOVÁ, Z. *Fungální degradace organopolutantů s endokrinně disruptivní aktivitou* [online]. Praha, 2013 [cit. 2022-03-22]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/113657433-Univerzita-karlova-v-praze.html>. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.

KURHAN, S., KLOUČEK P., MARŠÍK P., JABLONSKÝ I. a KOUDELA M. *Stanovení reziduí pyroxulamu a aminopyralidu pomocí LC-MS/MS: uplatněná certifikovaná metodika*. V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2020. ISBN 978-80-213-3064-1.

LEWIS, K.A., TZILIVAKIS, J., WARNER, D. a GREEN, A. (2016) An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050-1064. DOI: 10.1080/10807039.2015.1133242

MIGLIOREA, L., FIORIB M., SPADONIA A. a GALLIC E. Biodegradation of oxytetracycline by *Pleurotus ostreatus* mycelium: a mycoremediation technique. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2012, 227-232 [cit. 2022-04-07]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389412002130>

MOUGIN, Ch., LAUGERO Ch., ASTHER M., DUBROCA J., FRASSE P. a ASTHER M. Biotransformation of the Herbicide Atrazine by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *ASM Journals* [online]. 1994, [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aem.60.2.705-708.1994>

PANDEY, Ch., PRABHA D. a NEGI Y.K. *Mycoremediation and Environmental Sustainability*. Switzerland: Springer, Cham, 2018. ISBN 978-3-319-77386-5.

RYAN, T. P. a BUMPUS J.A. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1989, 302-307 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in liquid culture and in soil by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*

SILAMBARASAN, S. a ABRAHAM J. Mycoremediation of Endosulfan and Its Metabolites in Aqueous Medium and Soil by *Botryosphaeria laricina* JAS6 and *Aspergillus tamaris* JAS9. *Plos One* [online]. 2013. [cit. 2022-03-24]. Dostupné také z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0077170>

SPÁČILOVÁ, V. *Herbicidní ochrana obilnin na jaře* [online]. České Budějovice: Kurent, 2016 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/plevele/herbicidni-ochrana-obilnin-na-jare>

SYLVESTRE, M. 1980. Isolation Method for Bacterial Isolates Capable of Growth on Chlorobiphenyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 1223-1224.

ŠAŠEK, V., GLASER J.A. a BAVEYE P. *The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions*. Kluwer Academic Publishers: NATO Science Series, 2003. ISBN 1-4020-1142-3.

TLUSTOŠ, P., JABLONSKÝ I., KOUDELA M., KOŠNÁŘ Z., KAPLAN L. a JELÍNEK F. *Mykoremediace vybraných perzistentních organických polutantů v půdě pomocí ligninolytických hub pěstovaných v substrátech založených na bázi lignocelulózních materiálů: certifikovaná metodika*. Česká zemědělská univerzita v Praze, 2017. ISBN 978-80-213-2764-1.

VASEEMA, H., SINGHB V.K. a SINGHA. M.P. Heavy metal pollution due to coal washery effluent and its decontamination using a macrofungus, *Pleurotus ostreatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2017, (145), 42-49 [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651317304141>

WEBER, J. F. a BONT C. Growth of the Fungus *Cladosporium sphaerospermum* with Toluene as the Sole Carbon and Energy Source. *Applied and environmental microbiology*. 1995, 3562-3565.

Internetové zdroje

Agrobase, 2021 [cit. 2022-03-26]. Dostupné z:
<https://agrobaseapp.com/canada/pesticide/pyroxsulam>

Corello [online]. Kurent, 2022 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z:
<https://www.agromanual.cz/cz/pripravky/herbicidy/herbicid/corello>

EPA, *Addresses Ecological Risks Posed by Aminopyralid* [online]. EPA, 2021 [cit. 2022-03-24]. Dostupné z:
<https://www.epa.gov/pesticides/epa-addresses-ecological-risks-posed-aminopyralid>

ChemicalWatch *Factsheet Aminopyralid: Pesticides and You* [online]. Beyond Pesticides, 2011 [cit. 2022-03-24]. Dostupné z:
<https://www.beyondpesticides.org/assets/media/documents/infoservices/pesticidesandyou/documents/aminopyralid.pdf>

Issues associated with the use of farm yard manure containing aminopyralid residues [online]. Cambridge: Health and Safety Executive, 2011 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z:
<https://www.hse.gov.uk/pesticides/using-pesticides/general/issues-associated-with-the-use-of-farm-yard-manure-containing.htm>

Mustang Forte [online]. E-agro, 2022 [cit. 2022-04-01]. Dostupné z: <https://www.e-agro.cz/mustang-forte-5-l/>

Pesticide Fact Sheet [online]. United States Office of Prevention, Pesticides Environmental Protection and Toxic Substances Agency, 2021 [cit. 2022-03-22]. Dostupné z:
https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-005100_10-Aug-05.pdf

Pesticides Use. *Food and Agriculture Organization of the United Nations* [online]. Řím: FAO, 2021 [cit. 2022-03-31]. Dostupné z: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>

Pyroxsulam [online].

Spotřeba (POR) v jednotlivých letech. ÚKZÚZ [online]. Brno: Ministerstvo zemědělství, 2021 [cit. 2022-03-18]. Dostupné z: <https://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/pripravky-na->

or/ucinne-latky-v-por-statistika-spotreba/spotreba-pripravku-na-or/spotreba-v-jednotlivych-letech

Účinné látky, Aminopyralid [online]. České Budějovice: Kurent, 2021 [cit. 2022-03-21]. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/pripravky/ucinne-latky/ucinna-latka/aminopyralid>

10 Samostatné přílohy

Průměrné přírůstky mycelia na sterilizované slámě ve zkumavkách v mm

	1. měření (mm)	2. měření (mm)	3. měření (mm)	Celkem (mm)
<i>Irpex</i> – Mustang forte	9,9	11,9	10,1	31,9
<i>Irpex</i> – Corello	9,6	12,4	10,5	32,4
<i>Irpex</i> – neošetřená kontrola	9,5	12,7	10,5	32,7
<i>Ganoderma</i> – Mustang forte	7,1	9,5	8,0	24,6
<i>Ganoderma</i> – Corello	6,9	10,2	8,3	25,4
<i>Ganoderma</i> – neošetřená kontrola	6,7	9,6	6,8	23,2

Váha lyofylizovaného mycelia u *Pleurotus ostreatus*, které bylo kultivováno na tekutých půdách při různých koncentracích aminopyralidu

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	Průměr	SD
Kontrola	0,43698	0,43427	0,43827	0,43095	0,43756	0,2863	0,410722	0,055697
50 ppm	0,4394	0,42205	0,42132	0,43695	0,44008	0,42672	0,431087	0,007963
100 ppm	0,40733	0,4025	0,40814	0,4172	0,43381	0,42887	0,416308	0,011568
150 ppm	0,41628	0,43989	0,36773	0,42406	0,40788	0,38245	0,406382	0,024502
200 ppm	0,39661	0,38771	0,41111	0,39138	0,37968	0,38569	0,39203	0,009974
250 ppm	0,3982	0,3856	0,42309	0,37317	0,36293	0,37242	0,385902	0,020024

Průměrné váhy lyofilizovaného mycelia vybraných druhů hub, které byly kultivovány na tekutých půdách při různých koncentracích aminopyralidu

	1.	2.	3.	Průměr	SD
K. CI	0,6157	0,6152	0,6085	0,613133	0,003283
CI 100	0,6118	0,6349	0,6567	0,634467	0,018333
CI 200	0,6312	0,6418	0,6448	0,639267	0,005834
CI 300	0,5692	0,5789	0,5982	0,5821	0,012053
CI 400	0,5898	0,5962	0,5978	0,5946	0,003456
CI 500	0,5482	0,5109	0,5625	0,540533	0,021752
K. PI	0,1364	0,2056	0,1655	0,169167	0,02837
PI 100	0,1985	0,0867	0,2892	0,191467	0,08282
PI 200	0,4651	0,3642	0,4499	0,4264	0,044418
PI 300	0,1118	0,2295	0,3249	0,222067	0,087156
PI 400	0,3789	0,3383	0,3215	0,346233	0,024096
PI 500	0,4102	0,3966	0,3585	0,388433	0,021882
K. Geo	0,2036	0,2385	0,2679	0,236667	0,026282
Geo 100	0,2478	0,2982	0,3555	0,3005	0,043998
Geo 200	0,3315	0,2718	0,1937	0,265667	0,056424
Geo 300	0,2569	0,2545	0,2858	0,265733	0,014223
Geo 400	0,2428	0,2342	0,3098	0,262267	0,033794
Geo 500	0,2182	0,2014	/	0,2098	0,0084