

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Ekologie
Studijní obor: Terestrická ekologie



Bc. Marie Bostlová

Vliv symbiotických bakterií na odolnost skladištního roztoče *Tyrophagus*
putrescentiae vůči biocidním látkám

The influence of microbiome to pesticide resistance of stored product mite
Tyrophagus putrescentiae

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. Jan Hubert, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat především kolegům z Výzkumného ústavu rostlinné výroby, v. v. i., v Praze 6 – Ruzyni, z týmu Biologicky aktivních látek v ochraně plodin. Zejména svému školiteli Doc. Mgr. Janu Hubertovi, PhD. za spolupráci a odborné připomínky při psaní této práce. Laborantce Ing. Martě Nesvorné za pomoc s metodikou a zaškolením v laboratoři a RNDr. Brunu Sopkovi, Ph.D. za pomoc se zpracováním statistických dat a modelů a Martinu Markovičovi za pomoc při tvorbě citací. Dále bych chtěla poděkovat rodině, která mě podporovala po celou dobu mého studia.

Tato práce byla podpořena projektem LTAUSA19012 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR a projektem č. 19-09998S Grantové agentury České republiky.

Abstrakt

Modelovým organismem této práce je zástupce skladištních roztočů *Tyrophagus putrescentiae*. Předpokládali jsme, že změny fyziologických vlastností vlivem mikroorganismů (především změny spojené s imunitním systémem) mohou mít za následek i změnu tolerance dané populace roztočů na přítomnost aktivních látek. Nejefektivnější způsob kontroly stavu roztočů je aplikace akaricidů.

V této práci byla porovnávána reakce dvou populací roztočů *T. putrescentiae*, (tj. symbiotická populace 5P, která hostila bakterie rodu *Wolbachia* a asymbiotické populace 5Pi) na přítomnost pesticidu. Za použití testů na filtračním papíře, růstových testů a následné analýzy mikrobiomu bylo vyzorováno, že všechny druhy testovaných pesticidů vykazují negativní vliv na přežívání roztočů i rychlost růstu.

Vysoké koncentrace pesticidů v dietě redukovaly zastoupení bakterií rodu *Wolbachia*, *Bartonella* a *Bacillus* u symbiotické populace *T. putrescentiae* 5P. U asymbiotické populace byl tento jev méně patrný. Střední koncentrace deltametrinu a primifos methyly zvýšily diverzitu v symbiotické populaci 5P, ale ne v asymbiotické populaci 5Pi. Výsledky ukázaly, že asymbiotická populace nemá významně odlišnou toleranci vůči pesticidům na rozdíl od asymbiotické populace. Ukázaly však, že přítomnost pesticidů ve stravě ovlivňuje následnou skladbu mikrobiomu roztočů a to zejména v symbiotické populaci.

Klíčová slova: pesticidy, mikrobiom, skladištní roztoči

Abstract

Model organism used in this study is stored product mite specifically *Tyrophagus putrescentiae*. Presence of microorganisms may cause physiological changes (especially changes of immune system) which can result in different pesticide tolerance of tested mite population. The most effective way how to control mite is by acaricide application.

We compare the reaction of two *T. putrescentiae* populations to pesticide treatment. The mite population differ in symbiont composition: symbiotic population 5P containing *Wolbachia* and asymbiotic population 5Pi with absence of *Wolbachia*. We observe negative effect of all tested treatments to mite reproduction rate. We used filter paper tests, growing tests and microbiome analyzes.

High concentrations of pesticides in the diet reduced the presence of *Wolbachia*, *Bartonella*, and *Bacillus* bacteria in the 5P symbiotic population. This phenomenon was less noticeable in the asymbiotic population. Medium concentration of deltamethrin and primifos methyl increased diversity in the symbiotic population but not in asymbiotic one. The results showed that the asymbiotic population did not have a significantly different tolerance to pesticides compared to the asymbiotic population. However, they showed that the presence of pesticides in the diet affects the composition of the mite microbiome, especially in symbiotic culture.

Key words: pesticide, microbiome, stored product mite

Obsah

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | Úvod..... | 1 |
| 2. | Literární přehled | 2 |
| 2.1 | Roztoči v prostředí člověka | 2 |
| 2.2 | Rizika výskytu roztočů | 2 |
| 2.3 | <i>Tyrophagus putrescentiae</i> | 4 |
| 2.4 | Kontrola výskytu roztočů | 5 |
| 2.4.1 | Fyzikální kontrola roztočů | 5 |
| 2.4.2 | Biologická kontrola roztočů | 6 |
| 2.4.3 | Chemická kontrola roztočů..... | 6 |
| 2.5 | Mikrobiom roztočů | 8 |
| 2.6 | Vliv mikrobiomu pro úspěšnou kontrolu roztočů | 11 |
| 2.7 | Role mikrobiomu v degradaci pesticidů | 12 |
| 3. | Metodika..... | 13 |
| 3.1 | Modelové druhy roztočů a jejich chov | 13 |
| 3.2 | Studované pesticidy | 14 |
| 3.3 | Experimentální design | 14 |
| 3.3.1 | Test na filtračním papíru | 14 |
| 3.3.2 | Růstové testy | 16 |
| 3.4 | Identifikace bakteriálního mikrobiomu pomocí barkodového sekvenování | 17 |
| 3.4.1 | Extrakce DNA | 17 |
| 3.4.2 | PCR reakce..... | 18 |
| 3.4.3 | Druhý krok PCR reakce | 20 |
| 3.4.4 | Vizualizace PCR produktu | 21 |
| 3.4.5 | Barkodové sekvenování | 21 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.4.6 | Identifikace sekvencí..... | 21 |
| 3.4.7 | Statistická analýza roztočů | 22 |
| 3.4.8 | Statistická analýza identifikovaných OTU..... | 23 |
| 4. | Výsledky..... | 24 |
| 4.1 | Test na filtračním papíru | 24 |
| 4.2 | Růstové testy | 27 |
| 4.3 | Identifikace bakteriálního mikrobiomu | 28 |
| 4.4 | Vliv pesticidu na mikrobiom roztočů | 30 |
| 4.4.1 | Vliv pesticidu pirimiphos-methyl na populaci roztoče 5P..... | 33 |
| 4.4.2 | Vliv pesticidu deltamethrin + PBO na populaci roztoče 5P..... | 33 |
| 4.4.3 | Vliv pesticidu deltamethrin na populace roztočů 5P..... | 34 |
| 4.4.4 | Vliv pesticidu pirimiphos-methyl na populace roztočů 5Pi..... | 35 |
| 4.4.5 | Vliv pesticidu deltamethrin + PBO na populace roztočů 5Pi..... | 36 |
| 4.4.6 | Vliv pesticidu deltamethrin na roztoče 5Pi | 36 |
| 5 | Diskuze | 43 |
| 6 | Závěr..... | 45 |
| 7 | Přehled literatury..... | 46 |
| 8 | Seznam obrázků..... | 55 |
| 9 | Seznam tabulek..... | 56 |
| 10 | Seznam zkratk..... | 57 |
| 11 | Přílohy | 58 |

1. Úvod

Roztoči jsou kosmopolitní organismy vyskytující se v blízkosti člověka. Lze je rozdělit do dvou skupin – skladištní roztoče vyskytující se především v potravinách (anglicky tzv. stored product mite) a prachové roztoče vázané na domácnost člověka (anglicky tzv. house dust mite). Přítomnost roztočů je spojena s několika negativními vlivy. Nejvýznamnější je ohrožení lidského zdraví skrze produkci alergenů. Proto je důležitá kontrola výskytu roztočů, která spočívá nejčastěji v přímé aplikaci akaricidů. V této studii jsme předpokládali, že aplikace těchto aktivních látek může vyvolat změny fyziologických vlastností roztočů (především změny spojené s imunitním systémem) a způsobit změnu tolerance dané populace roztočů na přítomnost pesticidů. Masivní používání těchto látek však vede u roztočů k vytvoření tolerance. Zaměřili jsme pozornost na výskyt bakterie rodu *Wolbachia*, jednoho z nejběžnějších endosymbiontů koryšů, hmyzu, nematod a v neposlední řadě roztočů.

V této práci byly porovnávány rozdíly tolerance dvou populací roztoče zhoubného (*Tyrophagus putrescentiae*) na přítomnost různě koncentrovaných pesticidů. Porovnávali jsme symbiotickou populaci, kde byla přítomna bakterie rodu *Wolbachia* a asymbiotickou populaci, u které *Wolbachia* přítomná nebyla. Roztoči byli vystaveni třem druhům pesticidů o různých koncentracích. Konkrétně se jednalo o aktivní látky deltamethrin, deltamethrin + piperonylbutoxid (PBO) a pirimiphos-methyl.

Cílem této práce bylo zjistit, zda mají tyto dvě studované populace rozdílnou toleranci na přítomnost pesticidů; zda ovlivňuje přítomnost pesticidu skladbu mikrobiomu roztočů. Dále bylo cílem zjistit, jestli je mikrobiom zodpovědný za rozdílnou toleranci roztočů vůči pesticidům a zda má rozdílná skladba mikrobiomu vliv na celkové fitness roztočů zjišťovanou jako populační růst.

2. Literární přehled

2.1 Roztoči v prostředí člověka

Roztoči se mohou v prostředí člověka vyskytovat dvěma způsoby. Někteří se mohou vázat na prach v domácnostech - tzv. prachoví roztoči (*house dust mite*). Mezi nejběžnější zástupce této skupiny roztočů řadíme například prachovka americká (*Dermatophagoides farinae* Hughes, 1961) a prachovka prachová (*Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart, 1897)). Ti se vyskytují nejčastěji v matracích, v prachu poblíž postelí, kde je udržována optimální teplota a vlhkost pro přežití roztočů, zároveň je zde dostatek potravy pro roztoče (Colloff 2009b). Druhou skupinou jsou pak roztoči, kteří jsou vázáni na lidské potraviny tzv. skladištní roztoči (*stored product mite*). Mezi nejznámější skladištní roztoče patří sýrohoub zhoubný (*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)), skladokaz moučný (*Acarus siro* Linnaeus, 1758) peříčkovec zhoubný (*Lepidoglyphus destructor* (Schrank, 1781)) (Hughes 1976). Zástupce skladištních roztočů *T. putrescentiae* je hlavním modelovým organismem této práce.

2.2 Rizika výskytu roztočů

Roztoči svou přítomností mohou lidskému zdraví způsobovat přímá rizika, kam spadají fyzikální rizika (kontaminace komodit), chemická rizika (produkce alergenů, mutagenů a karcinogenů do napadených produktů) a psychologické škody (disgust, úzkosti). Dále mohou roztoči svou přítomností způsobovat nepřímá rizika, mezi která řadíme ekonomické a biologické škody (Hubert et al. 2018). Tyto kategorie však nemají pevné hranice. Komplikace vyvolané přítomností roztočů se mohou vzájemně překrývat.

Největší riziko výskytu roztočů je spojeno s produkcí alergenů v kontaminovaných potravinách. Jako zdroj alergenů mohou působit i exkrementy, svlečky nebo mrtvá těla roztočů (Erban et al. 2016a). Dále pak roztoči mohou produkovat mutageny a karcinogeny do potravin (Hubert et al. 2018). Roztoči produkují 9 % všech dosud známých alergenů (WHO/IUIS 2021). Zdravému člověku by přítomnost roztočů neměla způsobovat žádné komplikace. V dnešní době však narůstá počet lidí, kteří jsou vůči těmto látkám citliví (tzv. hypersenzitivní). U takových jedinců alergeny aktivují buňky imunitního systému IgE, což

způsobuje řadu zdravotních komplikací (Green & Woolcock 1978). Nejčastěji se komplikace projevují v podobě kožních reakcí (ekzémů, dermatitid atd.) (Arlan et al. 1997; Jeong et al. 2008). V ojedinělých případech se pak mohou objevit i dýchací problémy, jako je astma nebo rhinitida (rýma) (Miller 2019). U některých tzv. hypersenzitivních lidí může kontakt s alergenem (jako je např. pozření kontaminované potraviny), způsobit až život ohrožující anafylaktický šok. Jedná se o nepřiměřenou reakci imunitního systému na přítomnost alergenu (Blanco et al. 1997). Přítomnost alergenů v prostředí není možné odstranit kontrolou výskytu roztočů, protože alergeny v prostředí přetrvávají i po usmrcení roztoče. Až 95 % veškerých alergenů spojených s výskytem roztočů je vázáno na výkaly roztočů (Tovey, Chapman & Platts-Mills 1981). Alergeny se mohou být uvolňovat i z mrtvých těl roztočů a svleček, které se v prostředí vyskytují i po usmrcení roztočů. Odstranění alergenů z prostředí lze docílit buď fyzickou likvidací (vysávání kontaminovaných prostor, čištění vzduchu atd.), nebo počkat, až alergeny samovolnou degradací přestanou být aktivní (Sidenius et al. 2002). Degradaci alergenů lze urychlit např. aplikací taninů, horké vody nebo používáním vodní páry (Colloff 2009b).

Psychologické škody patří mezi další přímé negativní efekty, které mohou roztoči (a jiní skladištní škůdci) způsobit. V dnešní době narůstá množství lidí, kteří trpí úzkostnými stavy nebo dokonce depresemi v důsledku představ zakoupení nebo pozření kontaminovaných potravin (Scandola et al. 2010). Chorobný strach z pozření škůdců může mít za následek tzv. disgust, tedy nechutenství vůči určitým typům potravy (Curtis & Biran 2001).

Druhou kategorií škod, které roztoči způsobují, jsou nepřímé škody. Sem spadají dvě kategorie: ekonomické a biologické škody.

Roztoči mohou způsobit ekonomické škody skrze porušení a snížení kvality napadené komodity (Colloff 2009b). Požerem skladovaných komodit roztoči způsobují hmotnostní škody, snižují klíčivost a kvalitu semen, což se může negativně projevit ve finančních ziscích prodejců. Roztoči mohou firmám způsobovat finanční náklady, které je nutné vydat za kontrolu výskytu roztočů a vyčištění veškerých prostor, aby se předešlo opětovné kontaminaci (Malik et al. 2018).

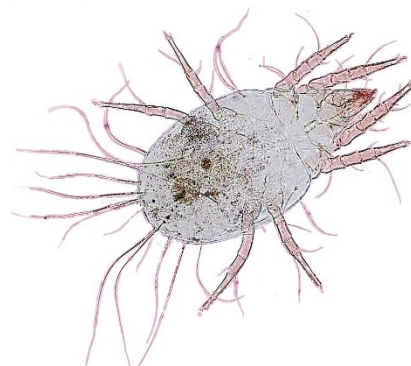
Poslední kategorií jsou biologické škody, kdy výskyt škůdců naruší podmínky, které napadená komodita vykazuje (nejčastěji teplotu a vlhkost), což může mít negativní vliv na trvanlivost potraviny a zároveň to může usnadnit kolonizaci komodity dalšími patogenními organismy (Hubert et al. 2018). Roztoči mohou dále hrát klíčovou roli jako vektor hub (Hubert et al. 2012) a bakterií (Hubert et al. 2017), které také produkují zdraví škodlivé látky, což může mít za následek mnohonásobně větší toxicitu napadeného produktu, s čímž jsou následně spojena větší zdravotní rizika v případě konzumace (Malik et al. 2018).

2.3 *Tyrophagus putrescentiae*

Jako modelový druh pro tuto studii byl zvolen zástupce skladištních roztočů – roztoč zhoubný, *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781). Taxonomicky ho řadíme do kmene Arthropoda, třídy Arachnida, řádu Astigmata, čeledi Acaridae (Hughes 1976).

Roztoči mají tělo členěné na hlavohrud' (cefalothorax) a zadeček (abdomen). Tělo je většinou bílé s různě rozloženými a dlouhými chloupky, což je významný taxonomický znak pro určování druhů roztočů. Roztoči se rozmnožují pomocí vajíček proměnnou nedokonalou, kdy larvy jsou podobné dospělcům a chybí stádium kukly. Dospělci se od larev liší pouze počtem končetin. Zatímco dospělci mají čtyři páry končetin, larvy jen tři páry (Bartoš & Werner 1979). Jednotlivá stádia vývoje jsou vajíčko, larva, protonymfa, deutonymfa, trytonymfa a dospělec. Roztoči umí vytvářet v nepříznivých podmínkách z deutonymfy dormantní stádium nazývaná hypopus, který se po přečkání nepříznivých podmínek vyvíjí v dospělce (Corente & Knülle 2003).

Roztoč zhoubný dorůstá do velikosti okolo 0,3 mm, kdy samice dorůstá větších velikostí než samec (Hagstrum, Phillips, & Cuperus 2012). *T. putrescentiae* má typické rozmístění chloupků na zadní části zadečku (obvykle 7 párů), jak je vidět na obrázku (Obrázek 1) (Bartoš & Werner 1979). Roztoč zhoubný má vysokou toleranci vůči výkyvům teploty. Rozmnožování probíhá i při teplotách nižších než 10 °C, je to však spojeno



Obrázek 1 Typické rozmístění chloupků na těle dospělého jedince *T. putrescentiae*

s prodloužením generační doby. Ideální teplota pro rozmnožování je 25–30 °C, kdy samice klade v jedné snůšce až 500 kusů vajíček a generační doba je v takových podmínkách okolo 100 dní (Bartoš & Werner 1979). Tento druh roztoče je velmi citlivý na kolísání vzdušné vlhkosti (limitující hodnota vlhkosti je 14 %) (Green & Woolcock 1978). Roztoč zhoubný škodí zejména na sýrech, sušených šunkách (Abbar et al. 2017), případně sušených zvířecích granulích (Nayak 2006). Dále se může vyskytovat v semenech, mouce a moučných výrobcích (Hughes 1976). *T. putrescentiae* produkuje 14 alergenů vůči kterým je člověk citlivý. Jedná se o alergeny šířené vzduchem. Konkrétně cystein proteázy (Tyr p 1), alergeny z rodiny NPC2 (Tyr p 2), trypsin (Tyr p 3), Bactericidal permeability increasing proteiny (Tyr p 7), glutathion S transferázy (Tyr p 8), tropomyosin (Tyr p 10), paramyosin (Tyr p 11), protein vázající mastné kyseliny (Tyr p 13), arginin kinázy (Tyr p 20), heat shock proteiny (Tyr p 28), pyrofosfát (Tyr p 32), troponin C (Tyr p 34), aldehyd dehydrogenázy (Tyr p 35) a profilin (Tyr p 36) (WHO/IUIS 2021).

2.4 Kontrola výskytu roztočů

Lidé se snaží kontrolovat výskyt skladištních roztočů ve svém okolí, aby předešli všem výše zmíněným komplikacím, které jsou s kontaminací potravin spojené. Stav roztočů se kontroluje třemi hlavními způsoby: fyzikální kontrolou, chemickou kontrolou a biologickou kontrolou stavu roztočů (Colloff 2009b).

2.4.1 Fyzikální kontrola roztočů

Problém kontaminace potravin je mnohonásobně vyšší v rozvojových zemích. Ve většině vyspělých států lze riziko kontaminace produktů eliminovat používáním obalových materiálů (Hubert et al. 2011). V takovém případě hraje klíčovou roli materiál a jeho tloušťka. Důležitou roli hraje i cena, která musí odpovídat ceně balené komodity. Výrobci levných produktů si nemohou dovolit nejvíce odolné obalové materiály, protože by tím cena výrobku mohla mnohonásobně stoupnout (Hagstrum, Phillips & Cuperus 2012).

Dalším způsobem fyzikální kontroly roztočů může být usmrcení roztočů skrze změny optimálních podmínek pro život škůdců (Hart 1998). Nejčastěji se používá změna teploty. Pro většinu skladištních roztočů je teplotní optimum mezi 25–30 °C. V takovém případě je růstová rychlost populace nejvyšší. Naopak limitující jsou teploty vyšší 45 °C a

teploty nižší než 5 °C (Fields 1992). Dále se může využívat pro kontrolu změna atmosféry, která může následně usmrtit roztoče. Jedná se o tzv. vykuřování. Nejčastěji se využívá fosfid hořečnatý (Campbell, Perez-Mendoza & Weier 2012). Důležitou roli ve vývoji roztočů má i relativní vlhkost prostředí. S poklesem vlhkosti prostředí narůstá délka generační doby a zároveň se snižuje plodnost roztočů (Sánchez-Ramos, Álvarez-Alfageme & Castañera 2007). Limitující vlhkost pro kontrolu roztočů je druhově specifická a obecně platí, že čím větší je tolerance roztočů vůči nízké vlhkosti, tím závažnější škůdci jsou (Bartoš & Werner 1979).

Obecně fyzikální ochrana není tak efektivní jako jiné typy kontrol a mnohdy nestačí na úplné a trvalé odstranění roztočů. Může se však využívat jako efektivní prevence. Někteří roztoči totiž umí v nepříznivých podmínkách vytvořit odolné dormantní stádium, které nazýváme hypopus (Bartoš & Werner 1979). Výskyt dormantních stádií výrazně ztěžuje kontrolu stavu roztočů v prostředí člověka, protože v příznivých podmínkách se hypopus vyvíjí v dospělce a kontaminace se může opakovat.

2.4.2 Biologická kontrola roztočů

Biologická kontrola je zaměřena na redukci výskytu škůdců skrze přirozené interakce s jinými organismy. Velká výhoda této metody je neznečišťování prostředí toxickými chemikáliemi (Perdikis, Kapaxidi & Papadoulis 2008). Pro eliminaci škůdců se mohou do prostředí vysazovat predátoři, paraziti, nebo parazitoidi, kteří způsobí usmrcení (nebo alespoň zpomalení reprodukční rychlosti) škůdců. Jako predátor skladištních roztočů může působit i jiný druh dravého roztoče. Například druh dravčík špižní (*Cheyletus eruditus* (Schrank, 1781)) zabíjí roztoče z čeledí Acaricidae a Glyciphagidae. Nejvýznamnější potravou jsou roztoči *A. siro*, *T. putrescentiae* a *L. destructor* (Žďárková & Horák 1990).

Druhá možnost je vyhubení symbiotických organismů, bez kterých by škůdci nepřežili. V případě roztočů se jedná především o symbiotické houby a bakterie (Hubert et al. 2020).

2.4.3 Chemická kontrola roztočů

Chemická kontrola je založena na aplikaci pesticidů, které lze použít pro usmrcení roztočů. Podle působení na roztoče rozlišujeme pesticidy přímé – tzv. akaricidy (cílené

přímo na roztoče) a nepřímé pesticidy – především fungicidy (způsobují usmrcení roztoče skrze zabití jiných organismů, bez kterých roztoči nepřežijí). Chemická kontrola je považována za nejefektivnější a neúčinnější typ kontroly stavu roztočů (Colloff 2009b). Přesto je zde riziko vytvoření tolerance vůči pesticidům v případě, že jsou roztoči vystaveni nízkým koncentracím aplikovaného pesticidu (tzv. hormoligóza) (Luckey 1968).

Komerčně používaných pesticidů je celá řada. V této práci se zabýváme třemi druhy pesticidů s různými aktivními látkami: Actellic 50EC s aktivní látkou pirimiphos-methyl; K-OBIOL EC 25 s aktivní látkou deltamethrin a K-Othrine s aktivní látkou piperonylbutoxid (Tabulka 3).

Actellic je insekticid, který se využívá pro hubení veškerých skladištních škůdců. Aplikuje se zředěný vodou postřikem přímo na napadené produkty. Hlavní aktivní složkou je pirimiphos-methyl, který působí jako dotykový, požerový a dýchací jed pro skladištní škůdce. Roztoči si mohou vytvořit na tuto látku toleranci (Szlendak et al. 2000). Proto by se aplikace tohoto insekticidu měla prokládat i jiným insekticidem, jehož aktivní látka není organofosfátového typu.

K-OBIOL EC a K-Othrine jsou kontaktní insekticidy, které se aplikují postřikem na napadené produkty. Přípravky obsahují aktivní látku [S]- α -cyano-3-phenoxybenzyl-(1R,3R)--3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylat, běžně označovaný jako deltamethrin. Má dlouhou reziduální účinnost. Pesticid může být aktivní až 3 měsíce po aplikaci, v závislosti na aplikované koncentraci (pesticid se ředí vodou). Hubí dospělce a jiná pohyblivá stádia hmyzích škůdců. Způsobuje jedincům oxidativní stres a poruchy metabolismu, které končí smrtí (Lu et al. 2019). K-OBIOL EC je oproti K-Othrine dále obohacen o piperonylbutoxid, který sám o sobě nemá funkci insekticidu, ale výrazně zvyšuje toxicitu insekticidních směsí.

Aplikace pesticidů může mít negativní vliv na životní prostředí (Kim, Kabir & Jahan 2017). Více jak 95 % používaných pesticidů usmrcuje i necílené skupiny vlivem znečištění prostředí (Simeonov, Macaev & Simeonova 2014). To má za následek pokles diverzity a celkové narušení ekosystému. Zároveň s množstvím pesticidu v krajině roste

pravděpodobnost selekce populací s vytvořenou tolerancí vůči danému pesticidu (Mahmood et al. 2016).

Pesticidy mohou mít negativní vliv i na lidské zdraví. Mezi hlavní komplikace spojené s kontaktem s pesticidy patří rakovina, diabetes, astma a další onemocnění dýchacích cest (Hernández, Parrón & Alarcón 2011). Dále mohou pesticidy způsobovat neurologické problémy spojené se snížením IQ a zhoršením funkce paměti (Baldi et al. 2011). Pesticidy mohou mít negativní vliv na plodnost lidí a správný vývoj dítěte během těhotenství (Wickerham et al. 2012). Člověk se může pesticidy infikovat čtyřmi hlavními způsoby: orální cestou; přes sliznice (hlavně oči); respirační (vdechnutím) nebo kontaminací skrz kůži. Infikace je nejčastěji spojena s nedodržíváním hygieny při a po aplikaci pesticidu (Kim et al. 2017). Velký problém toxicity pesticidů na člověka je jeho zneužívání k sebevraždám. Omezení prodeje pesticidů může výrazně snížit sebevražednost v dané oblasti (Vijayakumar & Satheesh-Babu 2009).

2.5 Mikrobiom roztočů

Mikrobiom je souborné označení pro mikroorganismy vyskytující se v daném organismu. Členovci (tedy i roztoči) hostí řadu mikroorganismů. Zejména se jedná o skupiny bakterií, hub, kvasinek a prvoků (Hubert et al. 2020). Tato studie byla zaměřena na bakteriální mikrobiom roztočů.

Mluvíme-li o mikroorganismech sídlících v těle roztočů, pak používáme nejčastěji označení endosymbiont. Endosymbionti pak mohou vůči svému hostiteli vykazovat mutualistickou, komenzální nebo parazitickou interakci. Mutualistické skupiny mikroorganismů přinášejí roztočům užitek nejčastěji prostřednictvím usnadněného trávení a rozklad – bakterie mohou pomáhat štěpit složité látky, jako např. proteiny, chitinové struktury atd. (Cohen 1993; Erban et al. 2016b). Zároveň symbionti mohou měnit fyziologické vlastnosti roztočů a tím poskytnout třeba vyšší odolnost vůči patogenům a nemocem (Zug & Hammerstein 2015). Komenzální skupiny většinou nemají pro své hostitele žádný pozitivní ani negativní význam. Parazitické skupiny pak svou přítomností hostitelům škodí. Věc však není tak úplně jednoduchá, řada skupin bakterií vykazují parazitickou a mutualistickou funkci zároveň. Příkladem jsou bakterie rodu *Wolbachia*,

kteřá dokáže stimulovat roztočům imunitní systém a tím zvyšovat jejich odolnost (Zug & Hammerstein 2015) na druhé straně má také roli pohlavního parazita, kdy způsobuje sníženou fekunditu neinfikovaných samců (Breeuwer & Werren 1990). Podobný případ lze pozorovat i u bakterií rodu *Bacillus*, který snižuje populační růst u infikovaných populací roztočů, ale na druhou stranu jim usnadňuje trávení těžko rozložitelných chitinových struktur (Erban et al. 2016b).

Endosymbiotické bakterie se mohou specificky vyskytovat v tělních dutinách, nejčastěji ve střevech, popřípadě jiných specializovaných strukturách zvaných mycetocyty, které se mohou shlukovat a vytvářet samostatný orgán zvaný mycetom, popř. bakteriom (Buchner 1965). Tyto struktury poskytují bakteriím lepší ochranu před imunitním systémem hostitele. Druhá skupina bakterií se vyskytuje zpravidla uvnitř buněk. V takovém případě hovoříme o intracelulárních endosymbiontech.

Mezi nejvýznamnější intracelulární symbionty roztočů patří *Cardinium* a *Wolbachia* (Hubert et al. 2020). *Wolbachia* je intracelulární endosymbiont roztočů, koryšů, nematod a hmyzu, který dokáže modifikovat reprodukční cyklus svého hostitele tak, aby dosáhli co nejefektivnější šíření hostitelskou populací. Jsou čtyři mechanismy, jak *Wolbachia* dokáže navyšovat svou schopnost šíření: (i) feminizace samců (infikovaní samci se vyvíjejí jako samice) (Werren, Baldo & Clark 2008) (ii) cytoplazmatická inkompatibilita, kdy infikovaní samci nejsou schopni úspěšného rozmnožení s neinfikovanou samicí, což snižuje reprodukční úspěch neinfikovaných samic (Breeuwer & Werren 1990). Molekulární mechanismy, kterým dokáže *Wolbachia* měnit samčí pohlavní chromosomy jsou však stále neznámé (iii) změna poměru pohlaví ve prospěch samic, které fungují jako přenašeč *Wolbachia* do další generace (Hurst et al. 1999) (iv) partenogeneze, kdy infikovaná samice pro své rozmnožení nepotřebuje samce. Pro různé taxonomické skupiny využívají *Wolbachia* jiné strategie. U roztočů se nejčastěji setkáváme s mechanismem partenogeneze (Werren, Baldo & Clark 2008).

Druhá skupina endosymbiotických mikroorganismů sídlí ve střevech roztočů, kde přežívají ve specializovaných strukturách - mycetocytech. Střevo lze rozdělit na tři části: předžaludek (tzv. foregut), kam spadá hltan a jícen, střední střevo (tzv. midgut), který se

dále dělí na ventriculus, caeca, tlusté střevo, intercolon, postcolonic, diverticula postcolon a zadní střevo tvořeno análním atriem (Šobotník et al. 2008). Z hlediska výskytu symbiotických bakterií je klíčová oblast postcolonic diverticula, kde sídlí řada vláknitých bakterií, které pravděpodobně mají exoenzymatickou aktivitu (Kopecký, Nesvorná & Hubert 2014).

Mezi nejvýznamnější bakterie řadíme bakterie rodu *Solitalea*, *Bartonella* a *Sodalis* (Hubert et al. 2020). Tyto bakterie se vyskytují nejen ve střevech roztočů, ale i ve výkalech a pohlavní soustavě. Bakterie rodu *Bartonella* jsou známé jako patogeny velkých savců, které napadají erythrocyty a jsou přenášeny krevsajícím hmyzem (Kopecký, Nesvorná & Hubert 2014). Spadají sem tři hlavní druhy: *Bartonella quintana* (Schmincke, 1917), *Bartonella bacilliformis* (Strong et al., 1913) a *Bartonella henselae* (Regnery et al., 1992). Výjimku tvoří nově objevený druh *Bartonella apis* (Kešnerová et al., 2016), což je symbiotická bakterie včely medonosné (Kešnerová, Moritz & Engel 2016). O vztahu *Bartonella* s roztoči se toho ví jen málo (Kopecký, Nesvorná & Hubert 2014).

Bakterie rodu *Solitalea* jsou u roztoče *T. putrescentiae* běžně se vyskytující druh a předpokládá se, že se jedná o parazita nebo symbionta daného roztoče. Vyskytuje se nejen v dospělých, ale i ve vajíčkách (Erban et al. 2016a). Takové bakterie mohou roztoči získat vertikálním přenosem, většinou přes maternální linii a pro další přenos není nutné jejich usídlení ve střevě (Ferrari & Vavre 2011).

S výkaly jsou pak asociované bakterie rodu *Bacillus*, *Staphylococcus*, popřípadě *Kocuria* (Hubert et al. 2012). *Bacillus* syntetizuje do střeva roztočů látky (exoproteázy a exochitinázy), které dokáží štěpit proteiny a struktury tvořené chitinem (Erban et al. 2016b). Díky tomu se urychluje rozklad mrtvých roztočů, svleček a výkalů (Cohen 1993). Zároveň se reguluje výskyt hub v prostředí, což je pro roztoče výhodné. *Bacillus* však snižuje růstovou rychlost roztočů, přesto je výskyt této bakterie pro roztoče nezbytný (Erban et al. 2016b).

Pro tuto studii byly vybrány dvě populace roztoče *T. putrescentiae*. Porovnávali jsme symbiotickou populaci, která hostila bakterie rodu *Wolbachia* a asymbiotickou populaci, u které *Wolbachia* přítomná nebyla. U obou těchto populací byly detekovány bakterie rodu

Bacillus a *Bartonella* (Hubert et al. 2020). Odlišný mikrobiom jednotlivých populací sledovaného druhu roztoče byl způsoben jiným místem odběru a původu dané populace. V rámci populace je pak daný mikrobiom celkem stabilní. Přítomné mikroorganismy často konkurují jiným skupinám mikroorganismů, kterým znemožňují vstup do těla hostitele. Pozornost jsme zaměřili právě na rod bakterii *Wolbachia*, protože je o ní známo, že dokáže významně měnit fyziologické vlastnosti svého hostitele (Zug & Hammerstein 2015). Předpokládali jsme tedy, že dokáže způsobovat změny i na úrovni imunitního systému, což by mohlo mít za následek odlišnou odpověď na přítomnost pesticidu oproti asymbiotickým populacím.

2.6 Vliv mikrobiomu pro úspěšnou kontrolu roztočů

Skladba mikrobiomu může být klíčová pro úspěšnou kontrolu roztočů. Dodnes je to však podceňované téma a je málo studií, které by se této problematice věnovalo (Hubert et al. 2018). Některé bakterie mohou roztoči získat vertikálním přenosem, většinou přes maternální linii (Ferrari & Vavre 2011). V takovém případě jsou bakterie obsažené již ve vajíčku roztočů (Erban et al. 2016a). Většinu bakterií přijímají roztoči z prostředí v podobě potravy (Smrž 2003). Roztoči mají bakteriolytické enzymy, umí tedy využívat bakterie jako zdroj potravy. Přesto je řada bakterií, které roztoči netráví, a naopak je využívají jako své endosymbionty (Erban & Hubert 2008). Jednotlivé bakterie mohou ovlivňovat řadu fyziologických vlastností daného jedince. Konkrétně mohou být zodpovědné za změny v populačním růstu roztočů, usnadňují trávení roztočů, což ovlivňuje celkovou koncentraci sacharidů, glykogenu a lipidů v těle roztočů (Hubert et al. 2020). Dále endosymbionti zprostředkovávají ochranu roztočů před patogeny a parazity (Ferrari & Vavre 2011). V neposlední řadě pak může změna mikrobiomu způsobovat i různou toleranci, nebo náchylnost roztočů na přítomnost pesticidů v prostředí (Gressel 2018). Řada bakterií dokáže degradovat pesticidy, což může snižovat efektivitu ochranných opatření náchylných komodit (Erban et al. 2017). V takových případech může být užitečnější použití nepřímých pesticidů, které necílí přímo na roztoče, ale na organismy, kteří jsou s roztoči úzce spjaté (např. jejich endosymbionty). Příkladem mohou být pesticidy, které fungují na principu snížení produkce exochitináz v prostředí (Cohen 1993).

2.7 Role mikrobiomu v degradaci pesticidů

Nejnovější studie prokázaly, že některé skupiny mikroorganismů dokáží degradovat pesticidy a snižovat jejich toxickou účinnost. Kvůli tomu mohou být symbiotické populace škůdců více tolerantní vůči komerčně používaným pesticidům a insekticidům (Gressel 2018). Vliv mikrobiomu na degradaci a účinnost aplikovaných pesticidů u roztočů je málo studovaným tématem. Nejvíce studií bylo prováděno na komárech, konkrétně komáru tygrovaném (*Aedes albopictus* (Skuse, 1894)), *Anopheles coluzzii* (Coetzee & Wilkerson, 2013); komáru pisklavém (*Culex pipiens* (Linnaeus, 1758)) a na motýlu zápředníčkovi polnímu (*Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758)). Další studie byla prováděna na mšici bavlníkové (*Aphis gossypii* (Glover, 1877)), která se vyskytuje ve dvou morfách – letní, žlutá morfa, která vykazuje vyšší abundanci symbiotických bakterií rodu *Buchnera*. Druhá, zimní morfa, je zelená, vykazuje nižší abundanci symbiotické bakterie a zároveň nižší toleranci vůči testovanému insekticidu, konkrétně byl testován imidacloprid (Guo et al. 2020).

Tolerance roztočů vůči pesticidům je málo studované téma. Bylo prováděno pár studií, kdy byla pozorována tolerance roztoče *A. siro* vůči aplikaci pesticidu lindan, což je chlorovaný uhlovodík (Wilkin 1973) a na látku pirimiphos-methyl, což je organofosfát (Szlendak et al. 2000). Laboratorní testy prokázaly rozdílnou odolnost roztočů na aplikované pesticidy v závislosti na výskytu bakterií, které se vyskytují nejen v mikrobiomu roztočů, ale mohou se vyskytovat i ve výkalech, svlečkách, zbytcích potravy atd. (Erban et al. 2016a; Nesvorna et al. 2021). Na základě těchto studií jsme předpokládali rozdílnou toleranci symbiotické a asymbiotické populace roztočů vůči testovaným pesticidům.

3. Metodika

3.1 Modelové druhy roztočů a jejich chov

V této práci byly porovnávány dvě populace roztoče zhoubného (*T. putrescentiae*), které se liší místem získání (Hubert et al. 2020) (Tabulka 1) a skladbou jejich intracelulárních symbiontů (Tabulka 2) (Erban et al. 2016a). Všechny studované populace roztočů *T. putrescentiae* byly chovány v plastových komůrkách (IWAKI flasks; katalogové číslo 3100-025; Sterilin, Newport, Spojené království). Do těchto komůrek bylo vloženo 0,5 g chovné diety (označená jako SPMd), jedná se o směs pšeničných klíčků (30 g), krmiva pro psy (30 g), rybí potravy (10 g), sušeného droždí – mauripan (6 g) a 3 g želatiny. Do každé komůrky s 0,5 g diety bylo pak vloženo cca 5000 dospělých nesexovaných jedinců roztočů. Komůrky s chovnými populacemi byly uloženy v exsikátoru, který udržuje stálé teplotní (25 °C) a vlhkostní podmínky (relativní vlhkost 75 %, pomocí nasyceného roztoku NaCl). Obnovy chovů probíhaly vždy po měsíci, kdy bylo do nové komůrky odváženo 0,5 g čerstvé diety a ze starého chovu přeneseno cca 5000 jedinců roztočů.

| Populace | Nalezl | Rok nálezu | Místo nálezu | Chovná dieta |
|----------|----------------|------------|--|--------------|
| 5P | T. W. Phillips | 2014 | laboratorní síto, Manhattan, Kansas, USA | SPMd |
| 5Pi | M. Nesvorná | 2015 | kontaminované sušenky, Praha, Česko | SPMd |

Tabulka 1: Seznam testovaných populací *T. putrescentiae*, jejich původ a typ chovné diety SPMd označuje stored product mite diet, konkrétně se jedná o směs pšeničných klíčků (30 g), krmiva pro psy (30 g), rybí potravy (10 g), sušeného droždí – mauripan (6 g) a 3 g želatiny.

| Označení | Původ | <i>Wolbachia</i> | <i>Bacillus</i> | <i>Bartonella</i> |
|----------|--------------------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| 5P | T. W. Phillips, Kansas, USA | + | + | + |
| 5Pi | Praha, Česko | - | + | + |

Tabulka 2: Seznam studovaných populací *T. putrescentiae* a jejich mikrobiální symbionti. Obě dvě populace (5P i 5Pi) hostily bakterie rodu *Bacillus* a *Bartonella*. Rozdíl je v přítomnosti bakterie rodu *Wolbachia*. Zatímco populace 5P je symbiotická a *Wolbachia* je zde přítomna, u populace 5Pi není *Wolbachia* přítomna, a tak je tato populace označována jako asymbiotická.

3.2 Studované pesticidy

Celkem byly studovány tři druhy pesticidů pod obchodním názvem ACTELLIC 50 EC; K-Othrine 25 SC; K-Obiol EC25 s aktivními látkami: pirimiphos-methyl; deltamethrin a deltamethrin + piperonylbutoxid (Tabulka 3). Tyto pesticidy byly zředěny destilovanou vodou do šesti koncentrací (0,01; 10⁻³; 10⁻⁴; 10⁻⁵; 10⁻⁶ a 10⁻⁸ roztok pesticidu). Byly ředěny výchozí pesticidy a vycházelo se z koncentrací udaných na obalu každého výrobku.

Ředění probíhalo ve dvou krocích, nejprve se látky ředily destilovanou vodou do šesti různých koncentrací (Tabulka 4) a následovalo testování tolerance roztočů pomocí testu na filtračním papíru. Druhé ředění probíhalo při přípravě diet, které se následně využívaly u vybraných populací v růstovém testu.

| Č. Vzorku – Ozn. | Komerční označení | Dodavatel | Účinná látka |
|------------------|-------------------|----------------------------------|---|
| 2 – ACT | Actellic 50EC | Syngenta Limited | pirimiphos-methyl - 500 g |
| 3 – KOB | K-OBIOL EC 25 | Bayer CropScience GmbH. | deltamethrin – 25 g piperonylbutoxid - 250 g |
| 4 - KOT | K-Othrine SC 25 | Bayer EnvironmentalScience GmbH. | deltamethrin – 25 g |

Tabulka 3: Seznam studovaných pesticidů a účinné látky, které obsahují.

3.3 Experimentální design

3.3.1 Test na filtračním papíru

Cílem tohoto testu je zjistit minimální koncentraci pesticidu, která má letální vliv na určité procento (v tomto případě jsme měřili 50 % a 90 %) populace roztočů vystavené přítomnosti pesticidu. Během tohoto testu byly vystřiženy z filtračního papíru (Whatman qualitative filter paper, Grade 3) kolečka o průměru 22 mm, která byla po dvou kusech vložena na dno skleněné váženky o objemu 10 ml a průměru 25 mm (kat. číslo 2602 Vitrum, a. s., Praha, Česko) (Obrázek 2). Následně bylo na filtrační papír pomocí pipety aplikováno 50 µl pesticidu o různých koncentracích (Tabulka 4). Celkem byly testovány 4 druhy pesticidů o 6 různých koncentracích. Ke každé populaci roztočů byla zakládána kontrola. V takovém případě se na místo pesticidu aplikovalo na filtrační papír 50 µl destilované vody. Následně byly váženky ponechány otevřené po dobu 2 hodiny při pokojové teplotě, aby došlo k mírnému odpaření a předešlo se tak utopení roztočů. Po odpaření bylo do

váženky pomocí štětečku vloženo 60 dospělých jedinců roztočů z laboratorních chovů. Pokus byl proveden v 6 opakováních pro každou koncentraci sledovaného pesticidu a každou populaci roztoče. Takto připravené váženky byly transportovány do termostatu, kde byly udržovány stabilní teplotní (25 °C) a vlhkostní podmínky (75 % RH). Po 24 hodinách byly váženky z termostatu vyjmuty ke kontrole, během které bylo nutné váženky otevřít, vyndat filtrační papír na Petriho misky a následně pomocí binokulární lupy sledovat stav jednotlivých roztočů. Byl počítán poměr mezi živými a mrtvými jedinci roztočů. Mrtvý roztoč je oproti živým roztočům vyschlý a nepohybuje se ani po stimulaci preparační jehlou nebo štětečkem. Po ukončení testu byly váženky umyty ve směsi vody, jaru, sava a sušeny při teplotě 70 °C pro zamezení kontaminace jinými druhy pesticidů při dalším testování.

| ozn. Vzorku | Komerční název | Koncentrace roztoku (%) | Množství účinné látky v roztoku (µg/ml) | Množství účinné látky v dietě (µg/g) |
|-------------|------------------|-------------------------|---|--------------------------------------|
| Act1 | Actellic 50EC | 1 | 2500 | 1250 |
| Act2 | Actellic 50EC | 10 ⁻¹ | 250 | 125 |
| Act3 | Actellic 50EC | 10 ⁻² | 25 | 12,5 |
| Act4 | Actellic 50EC | 10 ⁻³ | 2,5 | 1,25 |
| Act5 | Actellic 50EC | 10 ⁻⁴ | 0,25 | 0,125 |
| Act6 | Actellic 50EC | 10 ⁻⁶ | 0,025 | 0,0125 |
| KOT1 | K-Othrine SC 25 | 1 | 250 | 125 |
| KOT2 | K-Othrine SC 25 | 10 ⁻¹ | 25 | 12,5 |
| KOT3 | K-Othrine SC 25 | 10 ⁻² | 2,5 | 1,25 |
| KOT4 | K-Othrine SC 25 | 10 ⁻³ | 0,25 | 0,125 |
| KOT5 | K-Othrine SC 25 | 10 ⁻⁴ | 0,025 | 0,0125 |
| KOT6 | K-Othrine SC 25 | 10 ⁻⁶ | 0,0025 | 0,00125 |
| KOB1 | K-OBIOL EC 25 | 1 | 250 | 125 |
| KOB2 | K-OBIOL EC 25 | 10 ⁻¹ | 25 | 12,5 |
| KOB3 | K-OBIOL EC 25 | 10 ⁻² | 2,5 | 1,25 |
| KOB4 | K-OBIOL EC 25 | 10 ⁻³ | 0,25 | 0,125 |
| KOB5 | K-OBIOL EC 25 | 10 ⁻⁴ | 0,025 | 0,0125 |
| KOB6 | K-OBIOL EC 25 | 10 ⁻⁶ | 0,0025 | 0,00125 |
| Kontrola | Destilovaná voda | 0 | 0 | 0 |

Tabulka 4: Seznam naředěných koncentrací pesticidu. Roztok s účinnou látkou byl využíván pro test na filtračním papíru, diety obohacené pesticidy byly použity při růstových testech.



Obrázek 2: Metodika testu na filtračním papíře.

3.3.2 Růstové testy

Růstové testy umožňují zjistit vliv pesticidu na reprodukční rychlost roztočů. V těchto testech je populace roztočů chována na chovné dietě s přidavkem různých koncentrací pesticidu a sleduje se jejich populační nárůst během 21 dnů.

Při růstovém testu jsme obohacovali SPMd různými koncentracemi pesticidu vytvořených pro test na filtračním papíře (Tabulka 4). Do zkumavky bylo naváženo 10 g chovné diety a následně bylo napipetováno 5 ml pesticidu o testované koncentraci. Následovalo protřepání a lyofilizace. Takto připravené diety pak byly skladovány v chladničce a využity pro vlastní experiment.

V samotném testování byly diety naváženy po $\pm 0,02$ g do plastových komůrek o objemu 70 ml (IWAKI flasks; katalogové číslo 3100-025; Sterilin, Newport, Spojené království), kam bylo následně vloženo 50 dospělých nesexovaných roztočů z laboratorních chovů. Test probíhal v exsikátoru (Laboratorní inkubátor 636/75 plus; Unimed) ve stejných teplotních a vlhkostních podmínkách, jako se využívají pro chov roztočů. Po 21 dnech byl test ukončen zalitím 20 ml roztokem 70% ethanolu a bezvodného glycerinu (roztok v poměru 20:1).

Po ukončení růstového testu byli roztoči spočtení pod binokulární lupou. Pomocí pipety byl z každé komůrky odpipetován 1 ml na Petriho misku a pomocí binokulární lupy se spočetl počet roztočů na tento objem. Počítání na 1 ml se opakovalo třikrát z každé

komůrky a následně se vypočetl aritmetický průměr těchto tří hodnot a vynásobil se celkovým objemem zalité komůrky (tedy 20x). Tím jsme získali odhadovaný počet roztočů na celou komůrku. Z celého obsahu komůrky následně proběhla izolace DNA. Vzorke před izolací byly uchovávány v chladničce.

3.4 Identifikace bakteriálního mikrobiomu pomocí barkodového sekvenování

3.4.1 Extrakce DNA

Izolace DNA byla prováděna ve sterilních podmínkách, a to z celé komůrky (živých i mrtvých roztočů, jejich svleček, výkalů a zbytků diety). Roztoči zalití Oudemansovým roztokem (Novák 1969) byli přeliti z komůrek do sterilních 50ml centrifugačních zkumavek, kde byli ponecháni v klidu přes noc, aby došlo k sedimentaci vzorku.

Prvním krokem byla povrchová sterilizace vzorku. Ze zkumavek byl odpipetován přebytečný roztok a sedimentovaní roztoči byli přepipetováni se zbytky ethanolu (cca 1,5ml) do 2ml eppendorfek. Takto připravené eppendorfky byly vloženy do centrifugy (Thermo Scientific CL31R Refrigerated Centrifuge; Marshall scientific) a točeny na 16 000 rpm po dobu 1 minuty. Následně byla odpipetována horní frakce vzorku a k peletě bylo přidáno 500 µl roztoku chlornanu sodného (Unilever, Praha, Česko) s destilovanou vodou v objemovém poměru 1:9. Směs byla promíchána na vortexu (Velp CLASSIC Vortex Mixer; P-LAB) po dobu 5 s. Po centrifugaci (16000 rpm po dobu 1 minuty) byl tento roztok nahrazen absolutním ethanolem pro zamezení kontaminace chlornanem sodným a zároveň došlo k povrchové sterilizaci roztočů. Centrifugace ethanolem byla opakována třikrát (vždy 16 000rpm po dobu 1 min).

Po dokončení sterilizace byla zahájena samotná izolace. Vzorek bylo potřeba nejprve zhomogenizovat. K peletě bylo připipetováno 300 µl extrakčního pufru z kitu (GT Buffer) (kat. č. A2365, Promega) a směs sterilních kuliček: 200 mg kuliček 0,3 mm (kat. č. 11079103 gar, BioSpec); 200 mg kuliček 1 mm (kat. č. 11079110gar, BioSpec); 1 ks kulička 3 mm (kat. č. R155761, BioSpec). Homogenizace probíhala 5 minut na přístroji mini-BeadBeater 16 (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA). Po dokončení homogenizace byly vzorky centrifugovány (10 000 rpm po dobu 2 minut). Centrifugace byla opakována

několikrát (zpravidla třikrát), dokud nedošlo k oddělení jednotlivých frakcí. Dále se postupovalo podle přiloženého protokolu v sadě Gene mini kit (kat. č. A2365, Promega).

Nejprve proběhla disociace vzorku. Vzniklý supernatant homogenátu byl převeden do nových eppendorfek s 20 μ l proteinasy K (20 mg/ml), promíchán a zahřát na 60°C po dobu 30 minut.

Následně bylo potřeba lyzovat vzorek pro uvolnění DNA pomocí 200 μ l GBT pufru; vzorek byl protřepán po dobu 5 s a následně inkubován při teplotě 60°C po dobu 20 minut. Vzorky mohly být po cca 5 minutách protřepávány.

Následovalo navázání DNA (DNA binding). Ke vzorkům bylo přidáno 200 μ l absolutního ethanolu a následovalo promíchání na vortexu po dobu 10 sekund. Vzniklý roztok byl přepipetován do GD kolony s filtrem a centrifugováno 14-1600 rpm po dobu 2 minut. Po centrifugaci byla kolona vložena do nových eppendorfek.

Následovalo přečištění. Do kolony bylo napipetováno 400 μ l W1 pufru, vzorek byl centrifugován 14 – 16000 rpm po dobu 30 s. Opět došlo k vložení kolony do nových sběrných eppendorfek a bylo připipetováno 600 μ l Wash pufru, vzorek byl centrifugován 14 – 16000 rpm po dobu 30 sekund. Z eppendorfky byl vylit jejich obsah a kolony byly vloženy zpátky a centrifugovány pro vysušení kolony po dobu 3 minut při stále stejném rpm (tj. 16000 rpm).

Posledním krokem extrakce DNA byla eluce DNA. Do přesušené kolony bylo napipetováno 100 μ l destilované vody a bylo ponecháno v klidu po dobu 5 minut. Následovala finální centrifugace 14-16000 rpm po dobu 30 s. Po dokončení izolace byla kontrolována kvantita a kvalita vyizolované DNA na nanodropu (kat. č. 13-400-518; fisher scientific).

3.4.2 PCR reakce

PCR reakce byla provedena za použití master mix EmeraldAmp (kat. č. RR310A, Takara Bio), který obsahoval polymerázu, dNTPs, reagenty a zelené barvivo umožňující vizualizaci výsledku reakce pomocí gelové elektroforézy. Dále se využívaly univerzální

amplifikační primery: 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Lane 1991), Ra (5'-TGG CACATTGGGTTTCATCTGTAGT-3'), Rb (5' -CTC CAA AAG AAG AGG ACC-3'); Rc (5'-CAGCTGAGAACATGAACAC-3').

Amplifikace probíhala v přístroji C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). PCR Reakce probíhala v objemu 20 μ l. Na 1 μ l vzorku bylo potřeba přidat 0,27 μ l primeru Ra (zředěného 10 μ M), Rb (zředěného 10 μ M), Rc (zředěného 10 μ M), 0,8 μ l primeru 27F (zředěného 10 μ M), 7,39 μ l destilované vody a 10 μ l premixu (kat. č. P440) (Tabulka 5). Negativní kontrola byla prováděna stejným postupem, jen místo 1 μ l vzorku byl aplikován 1 μ l destilované vody.

| PCR reakce | V (μ l) na 1 Vz |
|------------------------|----------------------|
| primer Ra (10 μ M) | 0,27 |
| primer Rb (10 μ M) | 0,27 |
| primer Rc (10 μ M) | 0,27 |
| 27F (10 μ M) | 0,8 |
| dH ₂ O | 7,39 |
| Premix | 10 |
| DNA vzorku | 1 |
| celkový V | 20 |

Tabulka 5: Složení master mixu pro průběh prvního kroku PCR reakce.

Podmínky pro správný průběh amplifikace byly následující: vzorky byly nejprve vystaveny teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Následovalo 28 cyklů, kdy docházelo ke střídání 95 °C po dobu 30 s, 55 °C po dobu 45 s, 72 °C po dobu 30 s, a konečným krokem bylo udržení teploty 72 °C po dobu 7 min (Tabulka 6).

| Cyklus | 1 | 2 | | | 3 | 4 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| Opakování | 1x | 28x | | | 1x | 1x |
| Teplota | 95 °C | 95 °C | 55 °C | 72 °C | 72 °C | 10 °C |
| Čas | 5 min | 30 s | 45 s | 30 s | 7 min | ∞ |

Tabulka 6: Podmínky pro amplifikaci vzorků DNA v přístroji Thermal cycler.

Tato PCR reakce probíhala ve třech opakováních a následně byly produkty sloučeny do jednoho vzorku, díky čemuž jsme získali větší objem produktu (konkrétně 60 μ l). Vzorky byly uchovány při teplotě -20 °C a následně využity k druhému kroku dvoukrokové PCR.

3.4.3 Druhý krok PCR reakce

V této reakci došlo k namnožení specifických barkodových oblastí, tedy V4 oblast 16S genomu získané v prvním kroku PCR. Byly použity zředěné (10 μ M) primery CS1_515F (5'-CACTGACGACATGGTTCTACAGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') a CS2_806R (5'-ACGGTAGCAGAGACTTGGTCTGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3). V tomto kroku byl použit ExTaq premix (kat. č. RR005A, Takara Bio). Tento mix obsahoval Takara Ex Taq polymerázu, reakční pufr a dNTPs. Vzorky byly ředěny do objemu 50 μ l. K 1 μ l vzorku bylo přidáno 2,25 μ l primerů F a R, 22,5 μ l PCR Ultra vody a 28,125 μ l výše zmíněného premixu (Tabulka 7). Negativní kontrola byla prováděna stejným postupem, jen místo 1 μ l vzorku byl aplikován 1 μ l destilované vody.

| PCR reakce | V (μ l) na 1 Vz |
|-------------------|----------------------|
| primer CS1_515F | 2,25 |
| CS2_806R | 2,25 |
| ExTaq premix | 28,125 |
| dH ₂ O | 22,5 |
| DNA | 1 |
| celkový V | 56,125 |

Tabulka 7: Složení Master mixu pro průběh druhého kroku PCR reakce.

Amplifikace probíhala v přístroji C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Nejprve byly vzorky uchovány po dobu 5 minut při teplotě 95 °C a následovalo 8 cyklů, kdy se střídaly tyto fáze: 95 °C po dobu 30 s, 60 °C po dobu 45 s, 72 °C po dobu 30 s. Finální krok bylo udržení teploty 72 °C po dobu 7 min (Tabulka 8).

| Cyklus | 1 | 2 | | | 3 | 4 |
|-----------|-------|------|------|------|-------|----------|
| Opakování | 1x | 8x | | | 1x | 1x |
| Teplota | 95°C | 95°C | 60°C | 72°C | 72°C | 10°C |
| Čas | 5 min | 30s | 45s | 30s | 7 min | ∞ |

Tabulka 8: Podmínky pro amplifikaci vzorků DNA v přístroji Thermal cycler.

3.4.4 Vizualizace PCR produktu

Produkty PCR reakce byly ověřeny gelovou elektroforézou. Byl vytvářen 1% gel (připravován z 1,5 g agarózy (Lonza SeaKem® LE agaróza 500 g (katalogové číslo 50004, Lonza, Spojené státy)) a 150 ml pufru (ROTIPHORESE® Pufr 50 x TAE, (katalogové číslo R.CL86.2, Carl Roth, Německo). Agaróza byla rozpuštěna za vyšší teploty v pufru. Roztok byl následně za stálého míchání vychlazen a bylo přidáno 8 µl zředěné SYBR® Safe DNA Gel Stain (katalogové číslo S33102, Invitrogen, Spojené státy). Ředilo se pomocí dimethyl sulfoxidu – DMSO (10 µl SYBR® Safe DNA Gel Stain a 90 µl DMS. Následně byl gel vylit do vany a ponechán po dobu 30 minut, aby zatuhl.

Po zatuhnutí gelu byly vytaženy hřebeny, gel byl ponořen do vany s pufrům a mohlo být pipetováno 6 µl vzorku. Prvním vzorkem byl vždy standardizovaný žebřík (Generuler 50bp; kat. č. SM0373; ThermoFisher scientific), který následně umožnil identifikovat PCR produkty. Následovalo zapnutí elektroforézy, která probíhala cca 20 minut při 100 V (zdroj: Thermo Scientific™). Gel byl následně vizualizován a vyfocen pomocí programu GeneSnap (Syngene InGenius LHR2 Gel Imaging Systém; kat. č. 316616; Surplus solutions). Zbytky vzorků byly uchovávány v mrazáku při teplotě -20 °C a následně využity k druhému kroku PCR reakce.

3.4.5 Barkodové sekvenování

Vzorky byly odeslány na vyhodnocení a bližší identifikaci do laboratoře The Genome Research Core Facility, Research Resources Center, University of Illinois (Chicago, IL, USA). Namnožené barkodové amplikony byly sekvenovány v zařízení Illumina MiniSeq. Získaná sekvenční data byla uložena v GenBanku (NCBI) pod přístupovým kódem PRJNA685317 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA685317>, Příloha 2).

3.4.6 Identifikace sekvencí

Získané výsledky byly analyzovány v programech MOTHUR (Schloss et al. 2009) a UPARSE (Edgar 2013) za použití MiSeq SOP pipeline (Kozich et al. 2013). Ze sekvencí byly při zpracování odstraněny chiméry, sekvence chloroplastů, mitochondrií a archea. Následně se pomocí programu Usearch identifikovaly operačně taxonomické jednotky – OTU, které

byly sloučeny na základě 97% podobnosti. V tomto programu byl stanoven počet readů pro jednotlivé OTU ve vzorcích.

Pomocí databáze RDP (Cole et al. 2007) byly taxonomicky identifikovány nejčtenější OTU. Pro přesnější srovnání byly reprezentativní sekvence blastovány se sekvencemi v GenBanku. Datový soubor byl standardizován na 5000 readů.

3.4.7 Statistická analýza roztočů

Data získaná testem na filtračním papíře byla analyzována v programu R (R Development Core Team, 2020) pomocí probitové analýzy. Data měla binomické rozdělení, tj. 1 – zemřel, 0 – přežil. Data byla převedena na počet živých, mrtvých a celkový počet jedinců pro každou koncentraci, pesticid, populaci roztoče (Příloha 1). Zároveň byla stanovena přirozená mortalita roztočů, tedy procento úhynu jedinců, kteří zemřeli na kontrolních vzorcích. Přirozená mortalita byla stanovena pro každou populaci roztoče zvlášť. Lineární modely (Obrázek 3) byly udělány na základě balíčků ecotox (Muhametsafina et al. 2019) a effects (Fox & Weisberg 2019; Fox 2003). Koncentrace pesticidu byla nezávislá veličina, která byla logaritmicky transformována. Následně byly spočteny parametry logitové regrese pro každý pesticid zvlášť. Na základě takto odhadnutých koncentrací LC_{50} (koncentrace, při které zemře 50 % testovaných jedinců) a LC_{90} (koncentrace, při které zemře 90 % testovaných jedinců) a jejich 95 % konfidenčních intervalů jsme vybrali, které typy pesticidů a v jakých koncentracích budou dále testovány v růstovém testu.

V růstových testech byla odhadnuta vnitřní rychlost růstu (r) na základě vzorce $N=N_0e^{rt}$, kde (N) označuje konečnou denzitu roztočů, (N_0) označuje počáteční denzitu roztočů, v našem testu tedy odpovídala hodnotě 50. Délku trvání daného růstového testu specifikovalo (t) (v našem testování $t=21$ dní). Byly použity zobecněné lineární modely v R (Obrázek 3) (Pekár & Brabec 2020). Vnitřní rychlost byla závislou proměnnou, zatímco typ pesticidu, populace roztočů a koncentrace pesticidu byly nezávislé proměnné.

3.4.8 Statistická analýza identifikovaných OTU

V programu R (R Development Core Team, 2020) pak byla provedena analýza četnosti výskytu jednotlivých OTUs ve vztahu k jednotlivým faktorům (koncentrace, pesticid, populace roztoče, počet roztočů a interakce těchto proměnných). Pomocí dbRDA v balíčku `vegan` package in R (Oksanen et al. 2019). Konkrétně pomocí PERMANOVY (funkce `adonis2`) (Anderson et al. 2001) a redundantní analýzy dbRDA. Jelikož veškeré enviromentální jednotky vykazovaly signifikantní vliv na mikrobiom, rozdělili jsme je do samostatných analýz pro testované populace roztočů. Získali jsme tedy dva modely, jeden založen na pesticidech a druhý na populaci roztočů. Pro vizualizaci výsledků byly použity modely triplotů a heatmapy. Rozdíly relativní četnosti jednotlivých OTU byly analyzovány v programu METASTATS (10 000 permutací) v MOTHURu (White et al. 2009).

4. Výsledky

4.1 Test na filtračním papíru

Byl pozorován negativní vliv všech pesticidů na přežití obou populací roztočů. Přítomnost a koncentrace pesticidu měla negativní vliv na obě populace roztočů. Populace roztočů neměla signifikantní vliv ani v jednom případě: deltamethrin: $df=10$, $z=-1,342$, $P=0,0179$; deltamethrin + piperonylbutoxid: $df=10$, $z=-1,273$, $P=0,20288$; pirimiphos-methyl $df=6$, $z=-1,427$, $P=0,1535$. Koncentrace aplikovaného pesticidu měla signifikantní vliv ve všech třech případech. Vyšší koncentrace pesticidu způsobila vyšší mortalitu jedinců na všech typech testovaných pesticidů u obou populací roztočů. Zároveň ve všech případech měla signifikantní vliv interakce populace a koncentrace pesticidu (Tabulka 9).

| Parametr | | Mortalita | |
|----------------------------|--------------------|---------------|------------------|
| | | Z hodnota | P hodnota |
| intercept | deltamethrin | -2,912 | 0,004 |
| populace | | 1,342 | 0,179 |
| LOG koncentrace | | 8,941 | <0,001 |
| LOG koncentrace x populace | | 3,16 | 0,002 |
| AIC | | 249,83 | |
| intercept | deltamethrin + PBO | -0,577 | 0,56383 |
| populace | | 1,273 | 0,20288 |
| LOG koncentrace | | 15,712 | <0,001 |
| LOG koncentrace x populace | | 2,231 | 0,02571 |
| AIC | | 447,44 | |
| intercept | pirimiphos-methyl | 4,507 | <0,001 |
| populace | | -1,427 | 0,153 |
| LOG koncentrace | | 15,484 | <0,001 |
| LOG koncentrace x populace | | -3,75 | <0,001 |
| AIC | | 177,43 | |

Tabulka 9: parametry GLIM modelu ukazující signifikantní faktory interakce mortality roztočů populace 5Pi a koncentrace pesticidu pro jednotlivé pesticidy. Tučně jsou zvýrazněné signifikantní hodnoty

Ukázalo se, že symbiotická populace roztoče (5P) je více citlivá na přítomnost všech tří testovaných typů pesticidů (stačí nižší koncentrace pesticidu pro úmrtí 50 % (popř. 95

%) populace, než jaké je potřeba aplikovat pro usmrcení stejné velikosti populace asymbiotické populace roztočů 5Pi) (Obrázek 3 a Tabulka 10).

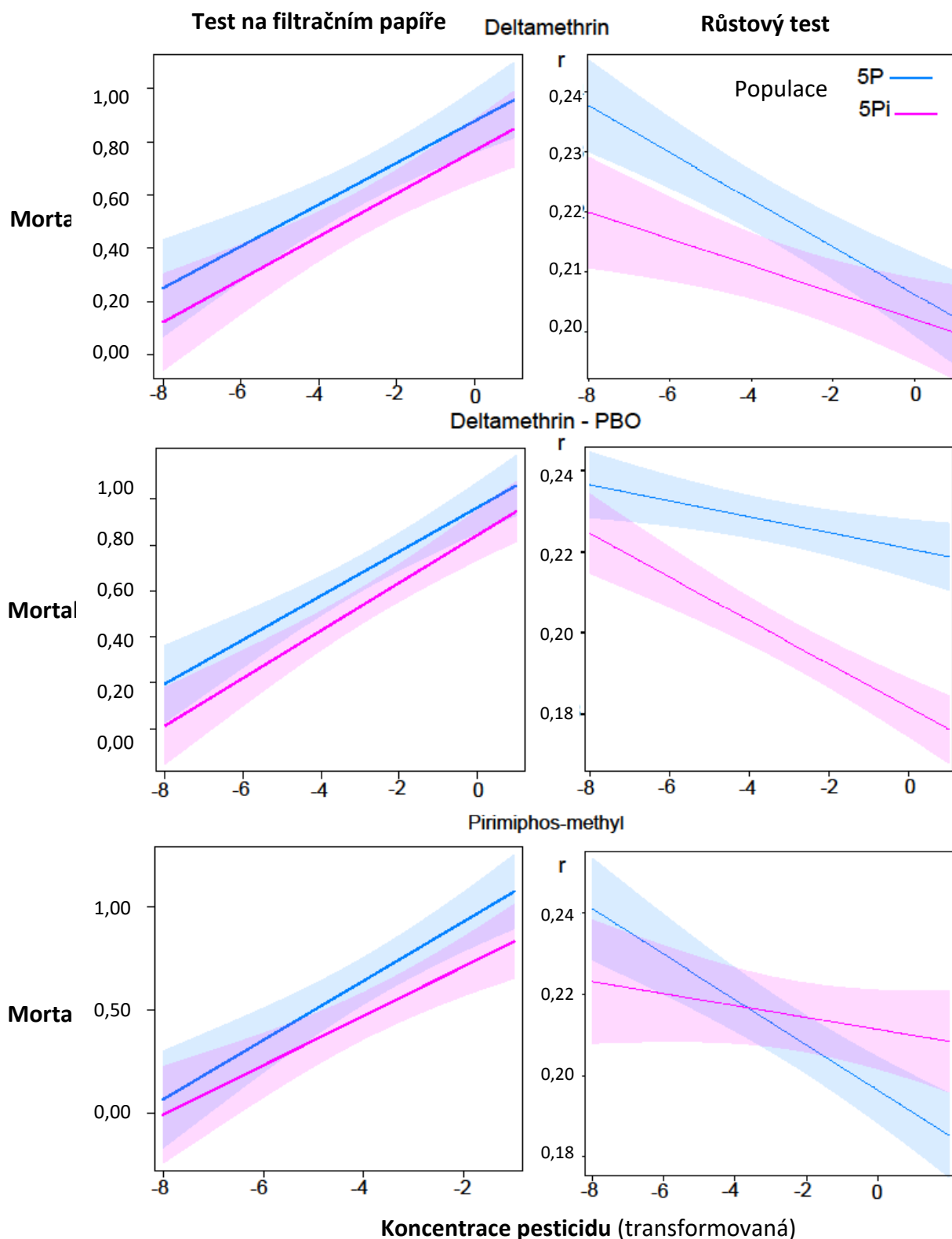
10A

| Pesticid | Populace roztoče | LC ₅₀ | | |
|-------------------|------------------|------------------|-----------|-----------|
| deltamethrin | 5P | 0,00001 | (0,000001 | 0,000048) |
| deltamethrin_PBO | 5P | 0,000007 | (0,000007 | 0,000073) |
| pirimiphos_methyl | 5P | 0,000009 | (0,000007 | 0,000012) |
| deltamethrin | 5Pi | 0,000432 | (0,000424 | 0,004208) |
| deltamethrin_PBO | 5Pi | 0,000938 | (0,000894 | 0,008668) |
| Pirimiphos methyl | 5Pi | 0,000162 | (0,000162 | 0,002406) |

10B

| Pesticid | Populace roztoče | LC ₉₀ | | |
|-------------------|------------------|------------------|---------|--------|
| deltamethrin | 5P | 72,31 | (71,77 | nr) |
| deltamethrin_PBO | 5P | 0,17 | (0,16 | 95,61) |
| pirimiphos_methyl | 5P | 0,001 | (0,0006 | 0,003) |
| deltamethrin | 5Pi | 2580 | (2567 | nr) |
| deltamethrin_PBO | 5Pi | 9,38 | (9,10 | nr) |
| Pirimiphos methyl | 5Pi | 0,15 | (0,14 | nr) |

Tabulka 10: Výsledky testů na filtračním papíře (**10A**) Hodnoty koncentrací tří druhů testovaných pesticidů pro usmrcení 50 % populace (LC₅₀) (**10B**) koncentrace pesticidu pro usmrcení 90 % populace (LC₉₀). Data v závorkách vykazují 95% konfidenční intervaly. Testováno na dvou populacích roztoče *T. putrescentiae* (symbiotická populace 5P a asymbiotická populace 5Pi). Hodnoty “nr” (nonreal) vykazují nereálnou koncentraci pesticidu, kterou nebylo možné testovat.



Obrázek 3: Vliv pesticidů deltamethrin, deltamethrin + PBO a pirimiphos-methyl na symbiotické (5P) a asymbiotické (5Pi) populace roztočů *T. putrescentiae*. Pesticidy byly testovány v testu s impregnovaným filtračním papírem (jednotky LOG (koncentrace+0,00001) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a růstovým testem (jednotky LOG (koncentrace+0,00001) $\mu\text{g}/\text{g}$). Jsou zobrazeny regresní linie a 95% intervaly spolehlivosti. Modrá znázorňuje symbiotickou populaci 5P, růžová asymbiotickou populaci 5Pi.

4.2 Růstové testy

Populace roztočů měla signifikantní vliv na populační růst roztočů v případě aplikace pesticidu deltamethrin + PBO ($T_{(1,86)}=7,697$; $P<0,001$) a v případě aplikace pesticidu pirimiphos-methyl ($T_{(1,86)}=2,35$ $P=0,021$). Při aplikaci pesticidu deltamethrin nevykazovala populace signifikantní vliv ($T_{(1,86)}=0.858$; $P=0,395$).

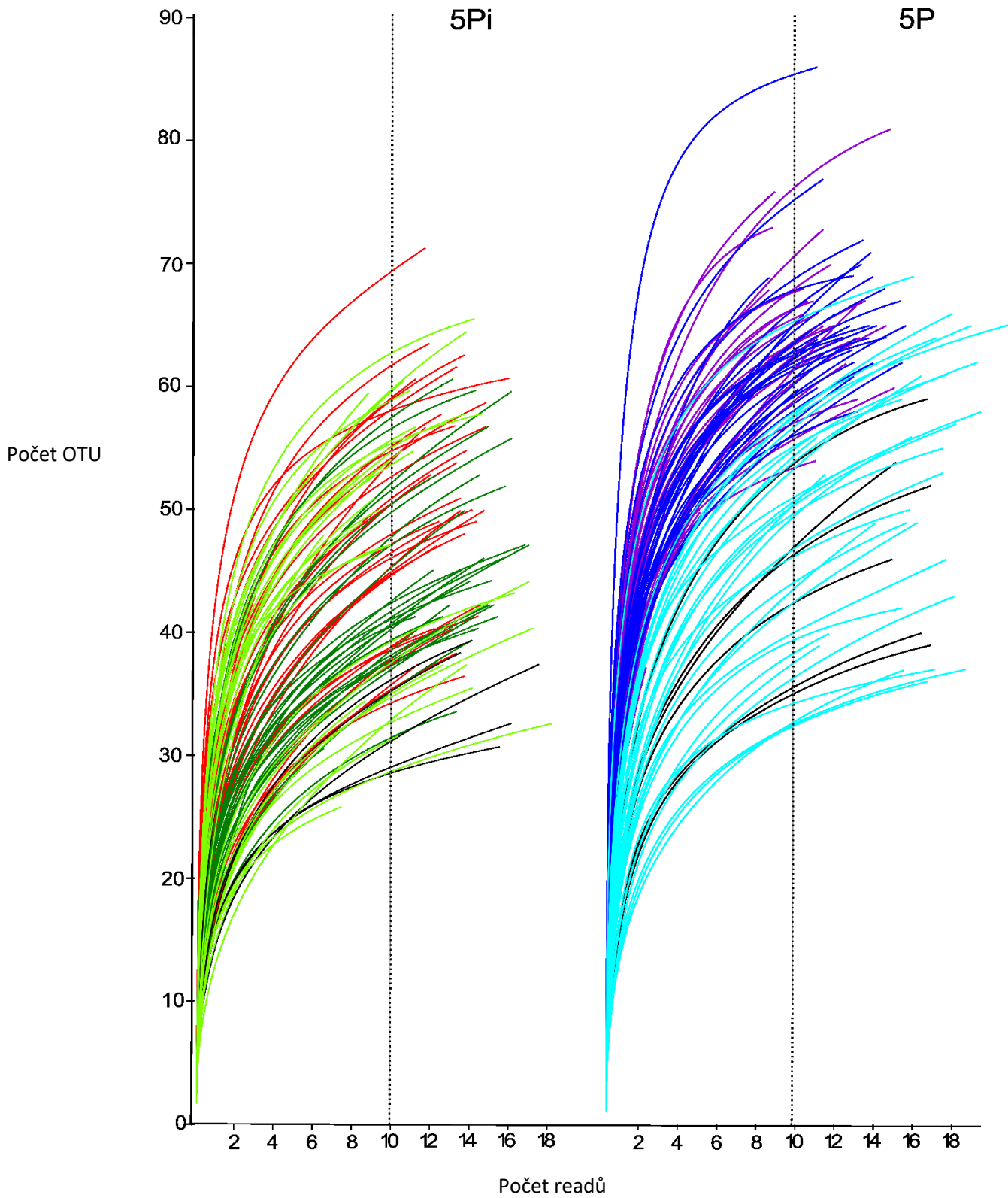
Byl zjištěn negativní vliv všech typů testovaných pesticidů a koncentrace aplikovaného pesticidu na reziduální rychlost růstu a velikost populací roztočů. Zajímavý je signifikantní vliv interakce pesticidu a populace roztoče, který ukazuje různé reakce populací roztočů na různé druhy pesticidů (Tabulka 11).

| Parametr | Pesticid | Růst | |
|----------------------------------|--------------------|---------------|------------------|
| | | T | P |
| intercept | deltamethrin | 60,553 | <0,001 |
| populace | | 0,858 | 0,3935 |
| koncentrace (LOG) | | 5,862 | <0,001 |
| interakce koncentrace x populace | | 1,69 | 0,0947 |
| AIC | | 474,26 | |
| intercept | deltamethrin + PBO | 61,367 | <0,001 |
| populace | | 7,697 | <0,001 |
| koncentrace (LOG) | | 2,78 | 0,004 |
| interakce koncentrace x populace | | 3,175 | 0,002 |
| AIC | | 464,38 | |
| intercept | pirimiphos-methyl | 48,328 | <0,001 |
| populace | | 2,35 | 0,021 |
| koncentrace (LOG) | | 6,174 | <0,001 |
| interakce koncentrace x populace | | 2,887 | 0,005 |
| AIC | | 438,8 | |

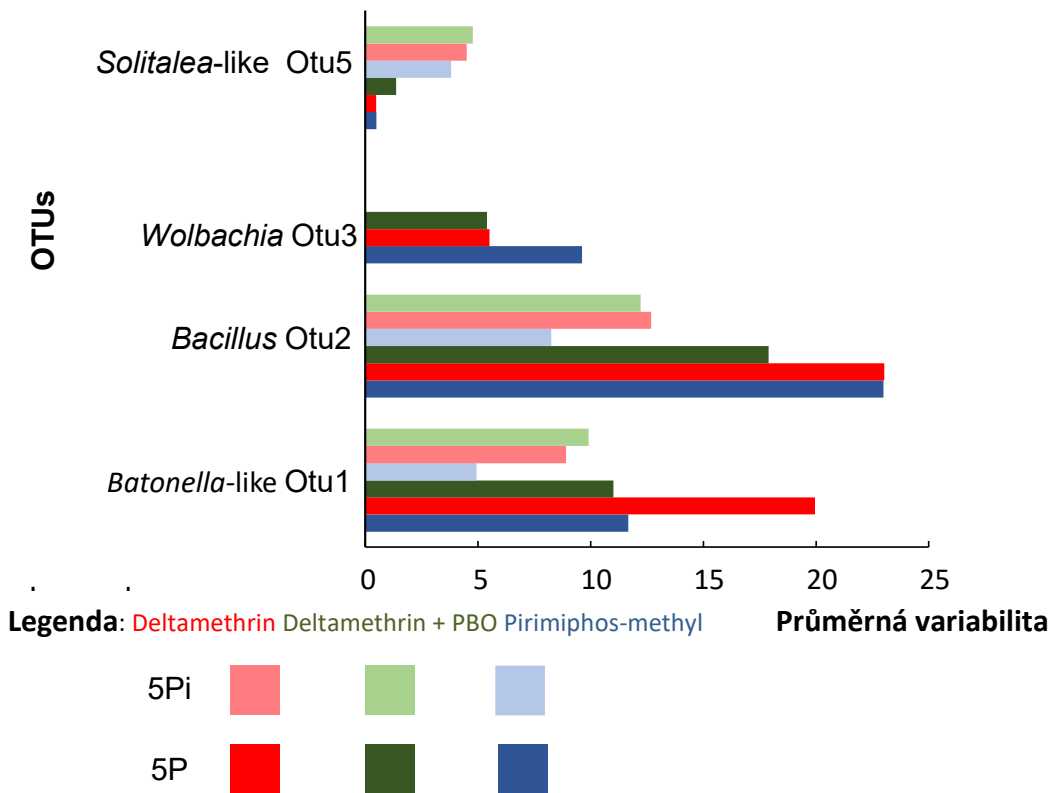
Tabulka 11: Parametry modelu GLIM pro jednotlivé pesticidy popisující vztah mortality roztoče a koncentrace pesticidu, populací roztoče a interakcí koncentrace a populace roztoče (5P a 5Pi). Signifikantní hodnoty byly zvýrazněny tučným písmem.

4.3 Identifikace bakteriálního mikrobiomu

V mikrobiomu roztočů bylo identifikováno celkem 137 OTU bakterií (operačně taxonomických jednotek, založeny na 97% podobnosti sekvencí). Byly identifikovány podle V4-16S rRNA oblasti. Standardizace probíhala po přepočtu na 5000 readů. Symbiotická populace vykazovala vyšší počet OTU₉₇ než asymbiotická populace 5Pi (Obrázek 4). V každém vzorku bylo ± 40 OTU. Seznam identifikovaných nejběžnějších OTU a jejich podobnost se sekvencemi uloženými v GenBanku zobrazuje Příloha 1. U symbiotických populací roztočů 5P vykazovali nejvyšší relativní abundanci 3 OTU: střevní symbionti *Bartonella* (OTU 1) a *Bacillus* (OTU 2) a intracelulární symbiont *Wolbachia* (OTU 3). Asymbiotická populace 5Pi charakteristická absencí *Wolbachia* (OTU 3) vykazovala nejvyšší relativní abundanci bakterií *Bartonella*-like (OTU 1), *Bacillus* (OTU 2) a *Solitalea*-like (OTU 5) (Obrázek 5). Identifikované hojné bakteriální OTU₉₇ z populace 5Pi jsou podobné těm, které jsme našli v předchozích analýzách populací těchto roztočů.



Obrázek 4: Rarefakce - rozložení jednotlivých readů v mikrobiomu obou populací *T. putrescentiae* (zeleně asymbiotická populace 5Pi, modře symbiotická populace 5P). Přerušovaná čára značí prahovou hodnotu pro standardizovaný soubor dat. Symbiotická populace vykazovala vyšší počet OTU₉₇ než asymbiotická populace 5Pi



Obrázek 5: Příspěvek abundantních OTU k odlišnosti srovnávaných mikrobiomů roztoče *Tyrophagus putrescentiae* mezi kontrolními vzorky a vzorky obsahující rezidua pesticidů. Rozdíly byly získány pomocí SIMPER analýzy

4.4 Vliv pesticidu na mikrobiom roztočů

Mikrobiom (rozumějme OTU profil sledované populace) roztočů byl ovlivněn všemi sledovanými faktory a jejich interakcemi. Konkrétně se jednalo o faktory: Typ pesticidu (zkratka pre), který umožňoval zjistit rozdíl mezi testovaným pesticidem a kontrolní dietou bez pesticidu. Dalším faktorem byla koncentrace pesticidu (zkratka con), populace roztočů (zkratka pop), počet roztočů a vzájemnou interakcí sledovaných faktorů: typ pesticidu x populace roztoče; typ pesticidu x koncentrace pesticidu; typ pesticidu x koncentrace pesticidu x populace roztoče. (adonis2: koncentrace pesticidu: $F_{(1,177)}=9,387$, $P<0,0001$; populace roztočů: $F_{(1,177)}=129,114$, $P<0,0001$; typ pesticidu: $F_{(3,177)}=25,819$, $P<0,0001$; počet roztočů: $F_{(1,177)}=23,264$, $P<0,0001$; interakce con x pre $F_{(2,177)}=7,331$, $P<0,0001$; interakce pop x pre $F_{(3,177)}=12,229$, $P<0,0001$; interakce con x pop $F_{(1,177)}=12,859$, $P<0,0001$; interakce con x pop x pre $F_{(2,177)}=3,088$, $P=0,011$). V modelu dbRDA tyto faktory vysvětlují cca 56% celkové variability v kompozici mikrobiomu (dbRDA: $F_{(9,182)}=15,049$, $P<0,001$,

R²=0.564). V následujících testech byly testovány populace roztočů a jednotlivé pesticidy samostatně (Tabulka 12).

| 12A | | | | | |
|-------------------|------------------|----------------|--------------|----|--------|
| Pesticid | | 5P | | | |
| | faktor | F | P | R2 | |
| pirimiphos-methyl | koncentrace | 18,642 | 0,001 | | 0,518 |
| | pesticid/kontrol | 16,83 | 0,001 | | |
| | | | | | |
| deltamethrin | koncentrace | 7,5296 | 0,001 | | 0,4917 |
| | pesticid/kontrol | 24,3918 | 0,001 | | |
| Deltamethrin+PBO | koncentrace | 1,7184 | 0,171 | | 0,1437 |
| | pesticid/kontrol | 3,8205 | 0,037 | | |
| 12B | | | | | |
| Pesticid | | 5Pi | | | |
| | faktor | F | P | R2 | |
| pirimiphos-methyl | koncentrace | 7,7027 | 0,001 | | 0,3504 |
| | pesticid/kontrol | 10,0971 | 0,001 | | |
| | | | | | |
| deltamethrin | koncentrace | 2,976 | 0,072 | | 0,3231 |
| | pesticid/kontrol | 2,5227 | 0,097 | | |
| Deltamethrin+PBO | koncentrace | 14,1433 | 0,001 | | 0,3819 |
| | pesticid/kontrol | 6,2484 | 0,001 | | |

Tabulka 12: Výsledky permutační analýzy vlivu environmentálních proměnných na distribuci OTU97 v mikrobiomu roztočů symbiotické populace 5P (**12A**) a asymbiotické populace 5Pi (**12B**) vystavených různým typům a koncentracím pesticidů. Tučné písmo označuje významný vliv faktorů na distribuci OTUs97. Data byla transformována na Bray-Curtis vzdálenosti a bylo použito 1000 permutací.

Přítomnost pesticidu měla vliv na alfa diverzitu mikrobiomu v případě symbiotické populace roztočů 5P došlo ke zvýšení indexů diverzity na středních dávkách deltamethrinu a pirimiphos-methylu ve srovnání s kontrolou. Žádné významné změny nebyly pozorovány u asymbiotické populace 5Pi vystavené přítomnosti deltamethrinu a deltamethrinu + PBO a u symbiotické populace 5P vystavené přítomnosti deltamethrin + PBO (Tabulka 13).

| Pesticid | Rozsah koncentrace | Populace roztoče | S | Simpson indd | Shannon ind. |
|-------------------|--------------------|------------------|--------------|--------------------|--------------------|
| deltamethrin | 12,5–0,00125 | 5Pi | 52b (44–59) | 0,54d (0,45–0,57) | 1,10d (0,94–1,33) |
| | 12,5 | 5P | 63a (61–65) | 0,54d (0,51–0,59) | 1,49c (1,34–1,61) |
| | 1,25–0,125 | 5P | 64a (62–68) | 0,64b (0,62–0,67) | 1,67b (1,60–1,77) |
| | 0,00125– | 5P | 66a (65–70) | 0,81a (0,77–0,86) | 2,15a (2,07–2,43) |
| | 0 | 5Pi | 36c (32–39) | 0,60c (0,59–0,61) | 1,16d (1,11–1,25) |
| | 0 | 5P | 49bc (42–54) | 0,64bc (0,57–0,69) | 1,32cd (1,16–1,43) |
| Kruskal–Wallis | | K | 46,99 | 44,74 | 44,83 |
| | | P | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| deltamethrin+PBO | 12,5 | 5Pi | 43a (42–45) | 0,56a (52–59) | 1,10ab (0,98–1,17) |
| | 1,25–0,00125 | 5Pi | 47a (43–54) | 0,49b (0,47–53) | 1,08b (1,00–1,17) |
| | 12,5–0,00125 | 5P | 54a (44–61) | 0,60a (0,51–65) | 1,30a (1,03–1,54) |
| | 0 | 5Pi | 36b (32–39) | 0,60a (0,59–0,61) | 1,16ab (1,11–1,25) |
| | 0 | 5P | 49a (42–54) | 0,64a (0,57–0,69) | 1,32a (1,16–1,44) |
| Kruskal–Wallis | | K | 17,33 | 18,35 | 9,504 |
| | | P | 0,001 | 0,001 | 0,050 |
| pirimiphos-methyl | 125 | 5P | 49bc (41–50) | 0,75ab (0,58–0,87) | 1,94a (1,60–2,57) |
| | 12,5–0,0125 | 5Pi | 67a (65–68) | 0,79a (0,75–0,83) | 2,14a (1,89–2,31) |
| | 125 | 5Pi | 40c (37–43) | 0,58bc (0,54–0,60) | 1,12b (1,03–1,18) |
| | 12,5–0,0125 | 5Pi | 56b (52–57) | 0,47c (0,47–0,51) | 1,33b (1,21–1,39) |
| | 0 | 5Pi | 36c (32–39) | 0,60bc (0,59–0,61) | 1,16b (1,11–1,25) |
| | 0 | 5Pi | 49bc (42–54) | 0,64b (0,57–0,69) | 1,32b (1,16–1,43) |
| Kruskal–Wallis | | K | 47,84 | 43,58 | 47,19 |
| | | P | 0,001 | 0,001 | 0,001 |

Tabulka 13: Vliv pesticidu na alfa diverzitu. Tabulka ukazuje mediány a v závorkách jsou uvedeny interkvartilové rozsahy pro počet bakteriálních taxonů (S) a indexy diverzity (inverzní Simpsonův a Shannonův index). Soubory dat byly porovnány Kruskalovým–Wallisovým testem (významné hodnoty jsou tučně). Mannův–Whitneyův párový test byl použit pro srovnání významných rozdílů ($P < 0,05$) mezi faktory, rozdíly jsou označeny různými písmeny.

4.4.1 Vliv pesticidu pirimiphos-methyl na populaci roztoče 5P

Mikrobiom v populaci 5P byl signifikantně ovlivněn působením pesticidu vůči kontrole (adonis2: $F_{(1,31)}=25,19$, $P<0,0001$), tak i jeho koncentrací (adonis2: $F_{(1,31)}=19,9997$, $P<0,0001$). Ostatní testované faktory neměly na mikrobiom roztočů vliv (tj.: adonis2: počet roztočů $F_{(1,31)}=1,238$, $P=0,2845$; interakce koncentrace pesticidu x počtu roztočů $F_{(1,31)}=2,722$, $P=0,054$).

Tyto výsledky potvrzuje db-RDA model (dbRDA: $R^2=0,518$; koncentrace pesticidu: $F_{(1,33)}=18,642$, $P<0,001$, typ pesticidu $F_{(1,33)}=16,830$, $P<0,001$). Výsledky jsou vizualizovány na obrázku 6A. Díky dostatečně vysoké variabilitě jsme byli schopni rozdělit vzorky mikrobiomu do tří skupin: Populace ovlivněna nejvyšší koncentrací pesticidu (tj. 125 $\mu\text{g/g}$); populace ovlivněná středními koncentracemi pesticidu (tzn. sloučení koncentrací 12,5 $\mu\text{g/g}$; 1,25 $\mu\text{g/g}$; 0,125 $\mu\text{g/g}$; 0,0125 $\mu\text{g/g}$) a kontrolní vzorek, který nebyl pesticidu vystaven. V tomto modelu osa X rozlišuje vzorky populací ovlivněných pesticidem a vzorky populací chované na kontrolní dietě. Osa Y od sebe odlišuje vzorky s různou koncentrací pirimiphos-methylu (Obrázek 6A).

V mikrobiomu roztočů byla nejvíce odlišná kompozice OTU v kontrolních vzorcích a ve vzorcích ovlivněných nejvyšší koncentrací pesticidu. Nejvyšší koncentrace pirimiphos-methylu signifikantně snížila relativní abundance těchto tří taxonů: *Bartonella* (OTU 1), *Bacillus* (OTU 2) a *Wolbachia* (OTU 3). Naopak na nejvyšší koncentrace pesticidu byl vázán *Lactobacillus* (OTU 19), který se na jiných vzorcích nevyskytoval. Ve vzorcích ovlivněných středními koncentracemi pesticidu pirimiphos-methyl došlo ke zvýšení četnosti *Aquabacterium* (OTU 6) a *Methylobacterium* (OTU 8) oproti kontrolním vzorkům. *Bartonella* (OTU1) a *Wolbachia* (OTU 3) se ve srovnání s kontrolou neměnili. Na kontrolní vzorky byl vázán *Bacillus* (OTU 2), který se ve vzorcích ovlivněných pesticidem téměř nevyskytoval (Obrázek 6B).

4.4.2 Vliv pesticidu deltamethrin + PBO na populaci roztoče 5P

Mikrobiom roztočů 5P byl signifikantně ovlivněn pouze přítomností pesticidu oproti kontrole (adonis2: $F_{(1,31)}=3,958$, $P=0,037$). Ostatní faktory nevykazovaly signifikantní vliv

(tj.: adonis2: koncentrace pesticidu $F_{(1,31)}=1,487$, $P=0,227$; počet roztočů $F_{(1,31)}=1,187$, $P=0,283$; interakce koncentrace pesticidu x počet roztočů $F_{(1,31)}=0,122$, $P=0,893$).

Tyto výsledky potvrzuje db-RDA model, ve kterém vychází signifikantní pouze typ pesticidu (tedy rozdíl mezi kontrolou a pesticidem) (dbRDA: $R^2=0,1437$; koncentrace pesticidu: $F_{(1,33)}=11718$, $P=0,171$, typ pesticidu $F_{(1,33)}=3,821$, $P=0,037$). V tomto modelu jsme kvůli nízké variabilitě OTU rozdělili jen populace vystavené přítomnosti pesticidu tzn. sloučení koncentrací 12,5 $\mu\text{g/g}$; 1,25 $\mu\text{g/g}$; 0,125 $\mu\text{g/g}$; 0,0125 $\mu\text{g/g}$; 0,00125 $\mu\text{g/g}$) a kontrolní populace chované na kontrolní dietě. Výsledky jsou vizualizovány na obrázku 7A. Osa X ani Y od sebe neodlišuje kontrolní vzorky se vzorky pesticidů. Populace chované na pesticidech zasahují do všech kvadrantů. Kontrola se vyskytuje jen na kladné části osy X (Obrázek 7A).

Přítomnost pesticidu snížila abundanci *Bacillus* (OTU 2) a *Wolbachia* (OTU 3) oproti kontrolním populacím. Populace ovlivněné pesticidem vykazovaly signifikantní nárůst *Bartonella* (OTU 1) (Obrázek 7B).

4.4.3 Vliv pesticidu deltamethrin na populace roztočů 5P

Mikrobiom roztočů 5P se signifikantně lišil mezi vzorky roztočů vystavené přítomnosti pesticidu v dietě a kontrolními vzorky (adonis2: $F_{(1,31)}=30,72$, $P<0,0001$). Dále měla signifikantní vliv koncentrace pesticidu (adonis2: $F_{(1,31)}=6,49$, $P=0,002$). Ostatní faktory nevykazovaly signifikantní vliv (tj.: adonis2: počet roztočů $F_{(1,31)}=2,122$, $P=0,1106$; interakce koncentrace pesticidu x počet roztočů $F_{(1,31)}=0,082$, $P=0,964$).

Tyto výsledky potvrzuje db-RDA model, ve kterém vychází signifikantní vliv typu i koncentrace pesticidu na mikrobiom roztočů (dbRDA: $R^2=0,4917$; koncentrace pesticidu: $F_{(1,33)}=7,5296$, $P=0,001$; typ pesticidu $F_{(1,33)}=24,392$, $P=0,001$). Díky vysoké variabilitě byly v modelu vzorky rozděleny do čtyř skupin podle koncentrace pesticidu. Konkrétně skupina ovlivněna nejvyššími koncentracemi pesticidu (koncentrace 12,5 $\mu\text{g/g}$), skupina ovlivněna středními koncentracemi pesticidu (sloučení koncentrací 0,125 $\mu\text{g/g}$ a 1,25 $\mu\text{g/g}$) a skupina ovlivněna nejnižšími koncentracemi pesticidu (sloučení koncentrací 0,00125 $\mu\text{g/g}$ a 0,0125 $\mu\text{g/g}$). Výsledky jsou vizualizovány na obrázku 8A. V tomto modelu osa X odděluje kontrolní

populace od populací ovlivněných pesticidem. Osa Y od sebe odděluje populace ovlivněné různými koncentracemi pesticidu (Obrázek 8A).

Kontrolní populace vykazovaly vyšší abundanci *Bacillus* (OTU 2). Populace ovlivněné pesticidy pak vykazovaly oproti kontrolním populacím vyšší abundanci *Bartonella* (OTU 1) a *Wolbachia* (OTU 3) a téměř absenci *Bacillus* (OTU 2). *Wolbachia* (OTU 3) vykazovala nejvyšší abundanci v populacích vystavených nejvyšším koncentracím pesticidu. *Bartonella* (OTU 1) se v populacích ovlivněných pesticidem vyskytovala v dvojnásobných abundancích ve srovnání s kontrolními populacemi. (Obrázek 8B).

4.4.4 Vliv pesticidu pirimiphos-methyl na populace roztočů 5Pi

Mikrobiom v populaci 5Pi byl signifikantně ovlivněn jak typem pesticidu (adonis2: $F_{(1,31)}=10,164$, $P=0,0004$), tak i jeho koncentrací (adonis2: $F_{(1,31)}=13,836$, $P<0,0001$). Dále pak má signifikantní vliv interakce koncentrace pesticidu x počet roztočů (adonis2: $F_{(1,31)}=4,769$, $P=0,0082$). Faktor počtu roztočů neměl na mikrobiom roztočů vliv (tj.: adonis2: $F_{(1,31)}=0,957$, $P=0,38$).

Tyto výsledky dokládá db-RDA model (dbRDA: $R^2=0,35$; koncentrace pesticidu: $F_{(1,33)}=10,097$, $P=0,001$, typ pesticidu $F_{(1,33)}=7,7027$, $P=0,001$). Podle variability jsme byli schopni rozdělit vzorky do tří skupin podle koncentrace pesticidu. Konkrétně byly sloučeny populace ovlivněné nízkými koncentracemi pesticidu (sloučení koncentrací 0,0125 $\mu\text{g/g}$; 0,125 $\mu\text{g/g}$; 1,25 $\mu\text{g/g}$ a 12,5 $\mu\text{g/g}$). Druhou skupinu pak tvořila populace ovlivněná nejvyšší koncentrací pesticidu (koncentrace 125 $\mu\text{g/g}$). Třetí (kontrolní) skupina nebyla vystavena přítomnosti pesticidu. Výsledky jsou vizualizovány na obrázku 6C. V tomto modelu osa X neodlišuje vzorky s různou koncentrací pesticidu. Kontrolní vzorky a vzorky testované na nejvyšší koncentraci pesticidu jsou umístěny na záporné části osy X. Osa Y rozlišuje populace chované na nejvyšších koncentracích pesticidu a populace chované na kontrolní dietě. (Obrázek 6C).

Situaci v db-RDA modelu potvrzují výsledky METASTATS analýzy, které ukazují, že není signifikantní rozdíl mezi kontrolou a pesticidem v profilech abundantních OTU.

4.4.5 Vliv pesticidu deltamethrin + PBO na populace roztočů 5Pi

Mikrobiom v populaci 5Pi byl signifikantně ovlivněn typem pesticidu (adonis2: $F_{(1,31)}=19,674$, $P<0,0001$), koncentrací pesticidu (adonis2: $F_{(1,31)}=8,533$, $P=0,0016$), interakcí koncentrace pesticidu x počet roztočů $F_{(1,31)}=7,6495$, $P=0,0022$). Počet roztočů neměl na mikrobiom roztočů vliv (adonis2: $F_{(1,31)}=2,384$, $P=0,0958$).

Tyto výsledky zobrazuje db-RDA model (dbRDA: $R^2=0,392$; koncentrace pesticidu: $F_{(1,33)}=6,248$, $P=0,008$, typ pesticidu $F_{(1,33)}=14,143$, $P=0,001$). Podle variability byly vzorky rozděleny do tří skupin. Konkrétně byly sloučeny populace ovlivněné nízkými koncentracemi pesticidu (sloučení koncentrací 0,00125 $\mu\text{g/g}$; 0,0125 $\mu\text{g/g}$; 0,125 $\mu\text{g/g}$ a 1,25 $\mu\text{g/g}$). Druhou skupinu pak tvořila populace ovlivněná nejvyšší koncentrací pesticidu (koncentrace 12,5 $\mu\text{g/g}$). Třetí (kontrolní) skupina nebyla vystavena přítomnosti pesticidu. Výsledky jsou vizualizovány na obrázku 7C. Kontrolní vzorky dosahují záporných hodnot na ose X. Osa Y rozlišuje populace roztočů ovlivněných nejvyšší koncentrací pesticidu od populací chovaných na kontrolní dietě a populací ovlivněných nižšími koncentracemi pesticidu (Obrázek 7C).

V populacích ovlivněných pesticidem profil *Bartonella* (OTU 1) a *Solitalea* (OTU5) klesá a je nahrazen nárůstem *Bacillus* (OTU 2). Kontrolní populace vykazují vyšší abundance *Bartonella* (OTU 1) a *Solitalea* (OTU5) (Obrázek 7D).

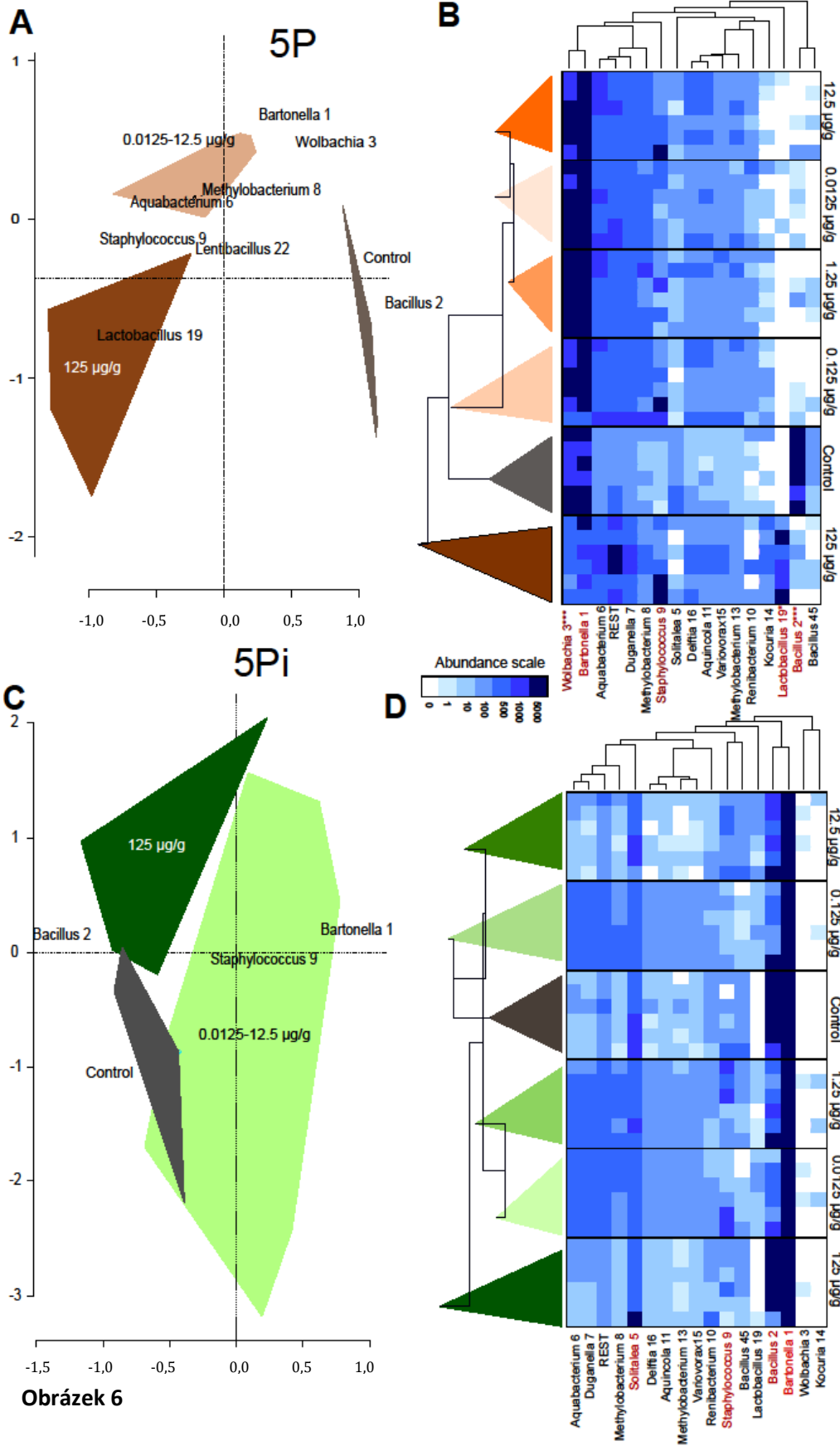
4.4.6 Vliv pesticidu deltamethrin na roztoče 5Pi

Mikrobiom roztočů 5Pi byl signifikantně ovlivněn koncentrací pesticidu (adonis2: $F_{(1,31)}=3,978$, $P=0,0388$), počtem jedinců (adonis2: $F_{(1,31)}=3,912$, $P=0,0419$). Ostatní testované faktory neměly na mikrobiom roztočů vliv (tj.: adonis2: typ pesticidu $F_{(1,31)}=2,516$, $P=0,099$; interakce koncentrace pesticidu x počet roztočů $F_{(1,31)}=2,588$, $P=0,096$).

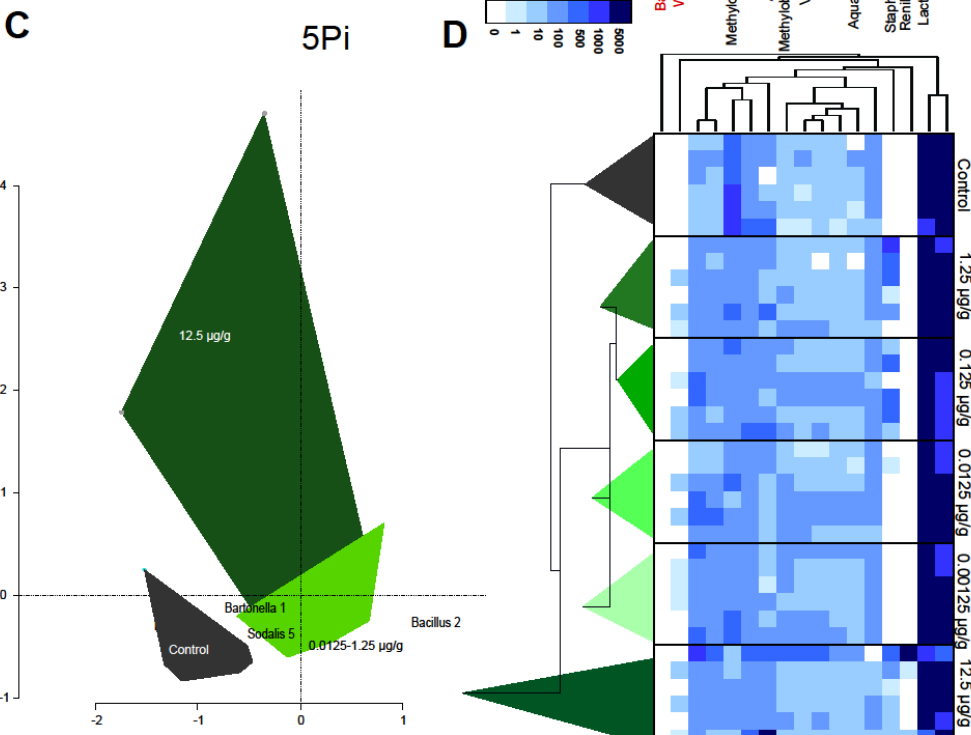
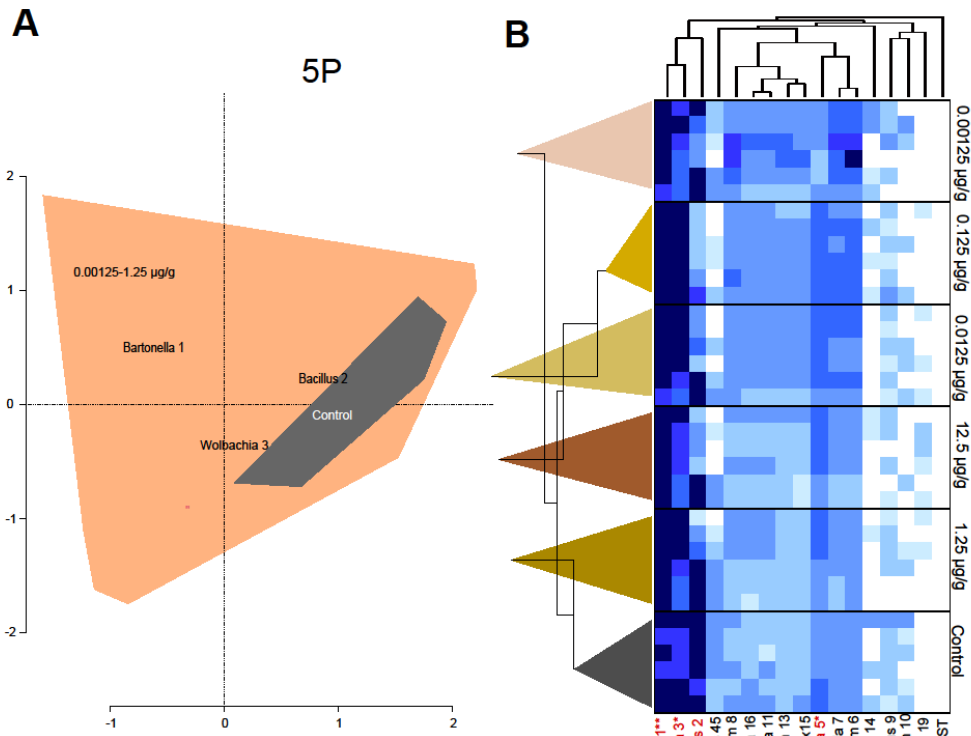
Tyto výsledky potvrzuje db-RDA model (dbRDA: $R^2=0,323$; koncentrace pesticidu: $F_{(1,33)}=2,976$, $P=0,072$; typ pesticidu $F_{(1,33)}=2,523$, $P=0,097$). Variabilita jednotlivých populací byla příliš nízká. V tomto modelu byly srovnávány populace vystavené jakékoli koncentraci pesticidu (tj. sloučení koncentrací 0,00125 $\mu\text{g/g}$; 0,0125 $\mu\text{g/g}$; 0,125 $\mu\text{g/g}$; 1,25

$\mu\text{g/g}$ a $12,5 \mu\text{g/g}$) vůči kontrolním populacím, které nebyly vystaveny přítomnosti pesticidu. Výsledky jsou vizualizovány na obrázku 8C. V tomto modelu osa X udržuje kontrolní populace v záporné části osy, ale nijak nerozděluje od populací chovaných na pesticidu. Osa Y má podobné vlastnosti. Udržuje kontrolní populace v záporné části osy, ale populace chované na pesticidech zasahují jak do kladné, tak do záporné části osy (Obrázek 8C).

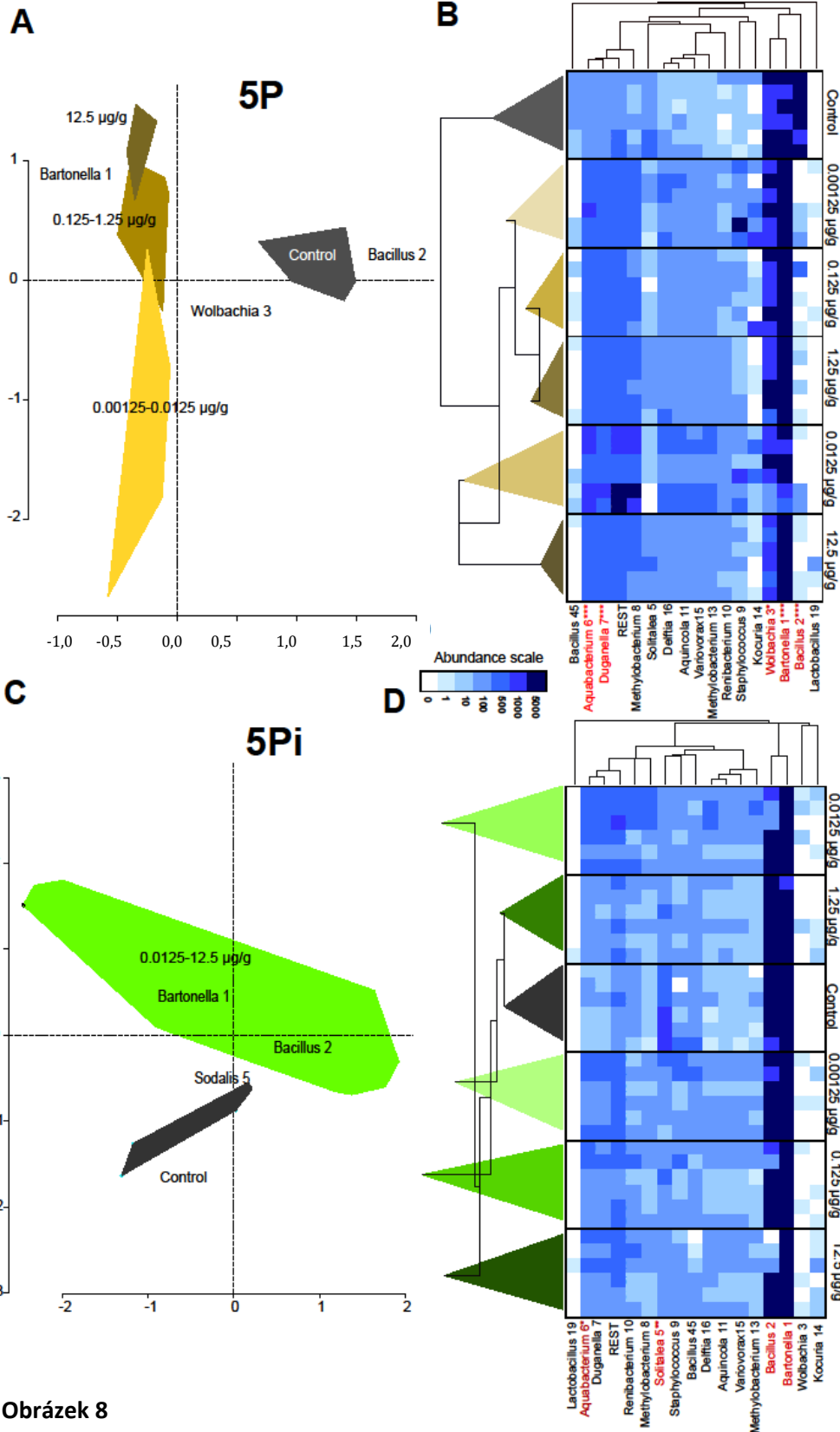
Situaci v db-RDA modelu potvrzují výsledky METASTATS analýzy, které ukazují, že není signifikantní rozdíl mezi kontrolou a pesticidem v profilech abundančních OTU (Obrázek 8D).



Obrázek 6



Obrázek 7



Obrázek 8

Obrázek 6: Vliv pirimiphos methyly na mikrobiom. Mikrobiom byl analyzován mezi vzorky reziduí pesticidů pomocí db-RDA (**A** a **C**). Pomocí heat map pak byly vizualizovány standardizované relativní četnosti bakterií ve vzorcích (**B** a **D**) pro symbiotickou populaci 5P (**A** a **B**) a asymbiotickou populaci 5Pi (**C** a **D**). Délka trojúhelníků v teplotní mapě ukazuje variabilitu uvnitř vzorků v rámci jedné diety a byly konstruovány pomocí metody UPGMA Bray–Curtis. Červená barva v OTU označuje nejvyšší odlišnost mezi kontrolou a nejvyšší koncentrací pesticidu v SIMPER textu a označuje sygnifikantní rozdíly z METASTATS analýzy. METASTATS je test pro dvě promenné v tomto případě jsme srovnávali rozdíly kontroly a nejvyšší koncentrace pesticidu.

Obrázek 7: Účinek deltametrinu + PBO na mikrobiom roztočů. Mikrobiom byl analyzován mezi jednotlivými dietami pomocí dbRDA (**A** a **C**). Pomocí heat map pak byly vizualizovány standardizované relativní četnosti bakterií ve vzorcích (**B** a **D**) pro symbiotickou populaci 5P (**A** a **B**) a asymbiotickou populaci 5Pi (**C** a **D**). Délka trojúhelníků v teplotní mapě ukazuje variabilitu uvnitř vzorků v rámci jedné diety a byly konstruovány pomocí metody UPGMA Bray–Curtis. Červená barva v OTU označuje nejvyšší odlišnost mezi kontrolou a nejvyšší koncentrací pesticidu v SIMPER textu a označuje sygnifikantní rozdíly z METASTATS analýzy. METASTATS je test pro dvě proměnné, v tomto případě jsme srovnávali rozdíly kontroly a nejvyšší koncentrace pesticidu.

Obrázek 8: Účinek deltamethrinu na mikrobiom. Mikrobiom byl analyzován mezi vzorky reziduí pesticidů pomocí db-RDA (**A** a **C**) a vizualizován jako heat mapa standardizované relativní četnosti bakterií ve vzorcích (**B** a **D**) pro symbiotickou populaci 5P (**A** a **B**) a asymbiotickou populaci 5Pi (**C** a **D**). Délka trojúhelníků v teplotní mapě ukazuje variabilitu uvnitř vzorků v rámci jedné diety. Byly konstruovány pomocí metody UPGMA Bray–Curtis. Červená barva v OTU označuje nejvyšší odlišnost mezi kontrolou a nejvyšší koncentrací pesticidu v SIMPER textu a označuje sygnifikantní rozdíly z METASTATS analýzy. METASTATS je test pro dvě promenné v tomto případě jsme srovnávali rozdíly kontroly a nejvyšší koncentrace pesticidu.

Testované populace roztočů vykazovaly odlišnou reakci ve změnách mikrobiomu na přítomnost pesticidu v dietě. Přítomnost pesticidu pirimiphos-methyl měla signifikantní vliv na skladbu mikrobiomu v obou populacích (Obrázek 6). Přítomnost pesticidu deltamethrin měla signifikantní vliv na skladbu mikrobiomu pouze u symbiotické populace 5P. U asymbiotické populace 5Pi přítomnost deltamethrinu nevyvolala signifikantní změny ve skladbě OTU₉₇. (Obrázek 8). V případě aplikace deltamethrin + PBO byly pozorovány změny ve skladbě mikrobiomu u symbiotické populace roztoče *T. putrescentiae*. Důležitou roli zde hrála i koncentrace pesticidu, kdy různé koncentrace pesticidu měly za následek různou skladbu mikrobiomu (Obrázek 7).

Za variabilitu ve skladbě OTU₉₇ po vystavení přítomnosti pesticidu byly v obou populacích roztočů nejvíce zodpovědné bakterie *Bacillus* (OTU2) a *Bartonella* (OTU1) (Obrázek 5). Korelační sítě byly různé pro OTU₉₇ v symbiotických a asymbiotických populacích. V symbiotické populaci 5P *Bacillus* (OTU2) vykazoval negativní korelace s *Duganella* (OTU7), *Aquicolla* (OTU11), *Deftia* (OTU16) a *Aquabacterium* (OTU6), zatímco pozitivní korelace byly mezi dvěma druhy bakterií rodu *Methylobacterium* (OTU 8 a 13). U asymbiotické populace 5Pi vykazoval *Bacillus* (OTU2) negativní korelaci s *Bartonella* (OTU1) a *Lactobacillus* (OTU19). Pozitivní korelace byly mezi *Aquabacterium* (OTU6), *Deftia* (OTU16) a *Duganella* (OTU7).

5 Diskuze

Na základě proběhlých testů na filtračním papíře a reziduálních testů jsme zjistili toxický efekt všech testovaných pesticidů. S vyšší koncentrací roste toxicita aplikovaných pesticidů ve všech případech. Nejsilnější toxické účinky jsme pozorovali v případě aplikace pesticidu pirimiphos-methyl. Toxicitu pesticidu pirimiphos-methyl pro roztoče potvrzují i Stables & Wilkin (1981) a Wilkin & Stables (1985), nebo novější studie, která upozorňuje na možnost vytvoření si tolerance roztočů vůči dlouhodobé aplikaci tohoto typu pesticidu díky zvýšené funkci esteráz. V praxi je proto dobré obměňovat typy používaných pesticidů (Szlendak et al. 2000). Nejslabší toxicitu naopak vykazoval pesticid deltamethrin. Vyšší toxicitu než deltamethrin vykazoval deltamethrin + PBO. Tento výsledek potvrzuje celá řada studií, které potvrzují posilující toxický účinek látky piperonylbutoxid na většinu pyrethroidů, jako je třeba právě deltamethrin (Fazolin et al. 2016).

Symbiotické a asymbiotické populace roztočů *T. putrescentiae* nevykazovaly různou míru úmrtnosti v testech s filtračním papírem. V obou případech způsobovala vyšší koncentrace pesticidu vyšší mortalitu. V případě reziduálního testu však již byly pozorovány rozdíly mezi jednotlivými populacemi, což potvrzuje dřívější výsledky z naší laboratoře, že *T. putrescentiae* vykazuje rozdílnou toleranci vůči pesticidům (Stara, Nesvorna & Hubert 2014). V růstových testech také platilo, že vyšší koncentrace pesticidu mají vyšší inhibiční efekt a způsobují nižší populační růst roztočů v obou populacích. Byla však zaznamenána výjimka v případě nízkých koncentrací pesticidu deltamethrin u symbiotické populace 5P. Zde byl pozorován nárůst reprodukční rychlosti oproti kontrole. Jedná se zřejmě o reakci roztočů na stresové (ale ne letální) podmínky, které je stimulují k rychlejší reprodukci. Tento efekt se nazývá hormoligóza (Luckey 1968).

V této studii jsme se pokusili najít rozdíly v reakci dvou populací roztočů na přítomnost pesticidů a tyto případné rozdílné odpovědi vysvětlit prostřednictvím skladby mikroflóry. Dřívější studie ukázaly, že pro studium vlivu mikroorganismů je efektivnější studovat mikrobiální složení roztočů z celé komůrky, kdy se izolují mikroorganismy nejen z těl roztočů, ale i jejich potravy, svleček a výkalů (Nesvorna et al. 2021). Dieta má nízký přínos k mikrobiomu, protože dochází k její pasterizaci, při které zahyne většina

mikroorganismů, co se v potravě nachází (Hubert et al. 2021). Proto byly v této studii porovnávány dvě populace roztočů s rozdílným mikrobiomem. Tedy symbiotickou populaci 5P, která hostí *Wolbachia* a asymbiotickou populaci 5Pi, kde *Wolbachia* není přítomna.

Přestože populace roztočů vykazovaly rozdíly v jejich citlivosti na deltamethrin + PBO a pirimiphos-methyl, neexistuje v těchto populacích žádná přímá souvislost s asociovanými bakteriálními OTU₉₇. Byly pozorovány rozdílné korelace mezi jednotlivými OTU u symbiotické a asymbiotické populace. Lze tedy říci, že tyto změny nebyly způsobené intracelulárním symbiontem *Wolbachia*. Za největší podíl variability skladby OTU mezi roztoči krmenými kontrolní dietou a roztoči vystavenými přítomnosti pesticidu zodpovídaly nejabundantnější OTU₉₇. Konkrétně se jedná o *Bartonella* OTU1, *Bacillus* OTU2, *Wolbachia* OTU3 a *Solitalea* OTU5. Předchozí experimenty ukázaly, že zvýšení *Bacillus* v potravě *T. putrescentiae* mělo inhibiční účinek na růst populace roztočů (Erban et al. 2016b). Podobný účinek byl popsán u roztočů domácího prachu *Dermatophagoides* (Saleh, Kelada & Shaker 1991). Střední koncentrace deltamethrinu a pirimiphos-methylu zvýšily bakteriální diverzitu v symbiotické populaci 5P, ale ne v asymbiotické populaci 5Pi. Jedním ze závěrů je, že dominantní bakterie byly redukovány a málo početné bakterie se mohou v profilu zvětšit jako artefakt redukce dominantního bakteriálního taxonu (tj. bez absolutního nárůstu).

6 Závěr

Naměřili jsme toxicitu všech vybraných testovaných pesticidů jak ve filtračním testu, tak růstovém testu pro roztoče *T. putrescentiae*. Nejvíce toxický se jevil pirimiphos-methyl, dále deltamethrin + PBO a nejslabší účinky vykazoval samotný deltamethrin.

Testované populace roztočů vykazovaly odlišnou reakci ve změnách mikrobiomu na přítomnost pesticidu v dietě. Za změny ve skladbě OTU byly zodpovědné především abundantní druhy bakterií. Především byl pozorován pokles početnosti bakterií *Bartonella* (OTU1), *Bacillus* (OTU2) i *Wolbachia* u symbiotické populace na vyšších koncentracích pesticidu pirimiphos-methylu. Aplikace pesticidu může mít za následek zvýšení diverzity mikrobiální skladby roztočů. Konkrétně jsme tento jev pozorovali na středních koncentracích deltamethrinu a pirimiphos-methylu u symbiotické populace. U asymbiotické populace tyto trendy nebyly pozorovány.

7 Přehled literatury

- Abbar, S., M. W. Schilling, R. J. Whitworth & T. W. Phillips. 2017. Efficacy of selected pesticides against *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank): influences of applied concentration, application substrate, and residual activity over time. *Journal of Pest Science* **90**(1):379–387.
- Anderson, M. J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* **26**(1):32–46.
- Arlan, L. G., D. L. Vyszenski-Moher, S. G. O. Johansson & Marianne van Hage-Hamsten. 1997. Allergenic characterization of *Tyrophagus putrescentiae* using sera from occupationally exposed farmers. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* **79**(6):525–529.
- Baldi, I., A. Gruber, V. Rondeau, P. Lebailly, P. Brochard & C. Fabrigoule. 2011. Neurobehavioral effects of long-term exposure to pesticides: Results from the 4-year follow-up of the PHYTONER study. *Occupational and Environmental Medicine* **68**(2):108–115.
- Bartoš J. & P. H. Werner. 1979. *Ochrana proti skladištním škůdcům a chorobám*. Praha: SZN.
- Blanco, C., J. Quiralte, R. Castillo, J. Delgado, C. Arteaga, D. Barber & T. Carrillo. 1997. Anaphylaxis after ingestion of wheat flour contaminated with mites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **99**(3):308–313.
- Breeuwer, J. A. J & J. H. Werren. 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* **346**(6284):558–560.
- Buchner, P. 1965. *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. New York, NY: Interscience Publishers.
- Campbell, J. F., J. Perez-Mendoza & J. Weier. 2012. Insect pest management decisions in food processing facilities. In: Hagstrum, D. W., T. W. Phillips & G. Cuperus (eds.) *Stored Product Protection*. Manhattan, KS: Kansas State University, pp. 219–233.

- Cohen, E. 1993. Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **22**(1-2):245–261.
- Cole, J. R., B. Chai, R. J. Farris, Q. Wang, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, A. M. Bandela, E. Cardenas, G. M. Garrity & J. M. Tiedje. 2007. The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Research* **35**(Suppl_1), D169–D172.
- Colloff M. J. 2009a. Allergy and epidemiology. In: Colloff M. J. (ed.) *Dust Mites*. Dordrecht: Springer, pp. 329–371.
- Colloff M. J. 2009b. Control of dust mites and allergen avoidance. In: Colloff M. J. (ed.) *Dust Mites*. Dordrecht: Springer, pp. 372–401.
- Corente, C. & W. Knülle. 2003. Trophic determinants of hypopus induction in the stored-product mite *Lepidoglyphus destructor* (Acari: Astigmata). *Experimental and Applied Acarology* **29**(1-2):89–107.
- Curtis, V. & A. Biran. 2001. Dirt, disgust, and disease. Is hygiene in our genes? **44**(1):17–31.
- Edgar, R. C. 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods* **10**(10):996–998.
- Erban, T. & J. Hubert. 2008. Digestive function of lysozyme in synanthropic acaridid mites enables utilization of bacteria as a food source. *Experimental and Applied Acarology* **44**(3):199–212.
- Erban, T., P. B. Klimov, J. Smrz, T. W. Phillips, M. Nesvorna, J. Kopecky & J. Hubert. 2016a. Populations of stored product mite *Tyrophagus putrescentiae* differ in their bacterial communities. *Frontiers in Microbiology* **7**:1046.
- Erban, T., O. Ledvinka, M. Nesvorna & J. Hubert. 2017. Experimental manipulation shows a greater influence of population than dietary perturbation on the microbiome of *Tyrophagus putrescentiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **83**(9):e00128-17.
- Erban, T., D. Rybanska, K. Harant, B. Hortova & J. Hubert. 2016b. Feces derived allergens of

- Tyrophagus putrescentiae* reared on dried dog food and evidence of the strong nutritional interaction between the mite and *Bacillus cereus* producing protease bacillolysins and exo-chitinases. *Frontiers in Physiology* **7**:53.
- Fazolin, M., J. L. V. Estrela, A. F. M. Medeiros, I. M. da Silva, L. P. Gomes & Silva, M. S. d. F. 2016. Synergistic potential of dillapiole-rich essential oil with synthetic pyrethroid insecticides against fall armyworm. *Ciência Rural* **46**:(3)382–388.
- Ferrari, J. & F. Vavre. 2011. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **366**(1569):1389–1400.
- Fields, P. G. 1992. The control of stored-product insects and mites with extreme temperatures. *Journal of Stored Products Research* **28**(2):89–118.
- Fox, J. & S. Weisberg. 2019. *An R Companion to Applied Regression, 3rd edn*. Thousand Oaks, CA: SAGE Publications.
- Fox J. 2003. Effect displays in R for generalised linear models. *Journal of Statistical Software* **8**:15:1–27.
- Green, W. F. & A. J. Woolcock. 1978. *Tyrophagus putrescentiae*: an allergenically important mite. *Clinical & Experimental Allergy* **8**(2):135–144.
- Gressel, J. 2018. Microbiome facilitated pest resistance: potential problems and uses. *Pest Management Science* **74**(3):511–515.
- Guo, S.-K., Y.-J. Gong, J.-C. Chen, P. Shi, L.-J. Cao, Q. Yang, A. A. Hoffmann & S.-J. Wei. 2020. Increased density of endosymbiotic *Buchnera* related to pesticide resistance in yellow morph of melon aphid. *Journal of Pest Science* **93**(4):1281–1294.
- Hagstrum, D. W., T. W. Phillips & G. Cuperus. 2012. *Stored Product Protection*. Manhattan, KS: Kansas State University. <https://bookstore.ksre.ksu.edu/pubs/s156.pdf> [4 March 2021].
- Hammer, Ø., D. A. T. Harper & P. D. Ryan. 2001. PAST: paleontological statistics software

- package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**(1):4. https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm [4 March 2021].
- Hart, B. J. 1998. Life cycle and reproduction of house-dust mites: environmental factors influencing mite populations. *Allergy* **53**(s48):13–17.
- Hernández, A. F., T. Parrón & R. Alarcón. 2011. Pesticides and asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **11**(2):90–96.
- Hubert, J., T. Erban, J. Kopecky, B. Sopko, M. Nesvorna, M. Lichovnikova, S. Schicht, C. Strube & O. Sparagano. 2017. Comparison of microbiomes between red poultry mite populations (*Dermanyssus gallinae*): predominance of *Bartonella*-like bacteria. *Microbial Ecology* **74**(4):947–960.
- Hubert, J., T. Erban, M. Nesvorna & V. Stejskal. 2011. Emerging risk of infestation and contamination of dried fruits by mites in the Czech Republic. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* **28**(9):1129–1135.
- Hubert, J., M. Nesvorna, S. J. Green & P. B. Klimov. 2020. Microbial communities of stored product mites: variation by species and population. *Microbial Ecology* **81**(2):506–522.
- Hubert, J., M. Nesvorná, M. Ságová-Marečková & J. Kopecký. 2012. Shift of bacterial community in synanthropic mite *Tyrophagus putrescentiae* induced by *Fusarium* fungal diet. *PLoS One* **7**(10): e48429.
- Hubert, J., V. Stejskal, C. G. Athanassiou & J. E. Throne. 2018. Health hazards associated with arthropod infestation of stored products. *Annual Review of Entomology* **63**:553–573.
- Hubert, J., M. Nesvorna, S. J. Green, & P. B. Klimov 2021. Microbial communities of stored product mites: variation by species and population. *Microbial Ecology* **81**(2), 506–522.
- Hughes, A. M. 1976. *The Mites of Stored Food and Houses: Technical Bulletin 9 of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food*. London: Her Majesty's Stationery Office.
- Hurst, G. D. D., F. M. Jiggins, J. H. G. von der Schulenburg, D. Bertrand, S. A. West, I. I.

- Goriacheva, I. A. Zakharov, J. H. Werren, R. Stouthamer & M. E. N. Majerus. 1999. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **266**(1420):735–740.
- Jeong, S. K., H. J. Kim, J.-K. Youm, S. K. Ahn, E. H. Choi, M. H. Sohn, K.-E. Kim, J. H. Hong, D. M. Shin & S. H. Lee. 2008. Mite and cockroach allergens activate protease-activated receptor 2 and delay epidermal permeability barrier recovery. *Journal of Investigative Dermatology* **128**(8):1930–1939.
- Kešnerová, L., R. Moritz & P. Engel. 2016. *Bartonella apis* sp. nov., a honey bee gut symbiont of the class Alphaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **66**(1):414–421.
- Kim, K.-H., E. Kabir & S. A. Jahan. 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment* **575**:525–535.
- Kopecký, J., M. Nesvorná & J. Hubert. 2014. *Bartonella*-like bacteria carried by domestic mite species. *Experimental and Applied Acarology* **64**(1):21–32.
- Kozich, J. J., S. L. Westcott, N. T. Baxter, S. K. Highlander & P. D. Schloss. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology* **79**(17):5112–5120.
- Lane, D. 1. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E. & M. Goodfellow (eds). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester / New York, NY: John Wiley and Sons, pp. 115–175.
- Lu, Q., Y. Sun, I. Ares, A. Anadón, M. Martínez, M.-R. Martínez-Larrañaga, Z. Yuan, X. Wang & M.-A. Martínez. 2019. Deltamethrin toxicity: a review of oxidative stress and metabolism. *Environmental Research* **170**:260–281.
- Luckey, T. D. 1968. Insecticide hormoligosis. *Journal of Economic Entomology* **61**(1):7–12.
- Mahmood, I., S. R. Imadi, K. Shazadi, A. Gul & K. R. Hakeem. 2016. Effects of pesticides on

- environment. In: Hakeem, K. R., M. S. Akhtar & S. N. A. Abdullah (eds.) *Plant, Soil and Microbes, Volume 1: Implications in Crop Science*. Dordrecht: Springer International Publishing, pp. 253–269.
- Malik, A., R. Gulati, K. Duhan & A. Poonia. 2018. *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acari: Acaridae) as a pest of grains: a review. *Journal of Entomology and Zoology Studies* **6**(2):2543–2550.
- Miller, J. D. 2019. The role of dust mites in allergy. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* **57**(3):312–329.
- Muhametsafina, A., O. Birceanu, B. L. Hlina, L. R. Tessier & M. P. Wilkie. 2019. Warmer waters increase the larval sea lamprey's (*Petromyzon marinus*) tolerance to the lampricide 3-trifluoromethyl-4-nitrophenol (TFM). *Journal of Great Lakes Research* **45**(5):921–933.
- Nayak, M. K. 2006. Management of mould mite *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acarina: Acaridae): a case study in stored animal feed. *International Pest Control* **48**(3):128–130.
- Nesvorna, M., S. Pekar, E. Shcherbachenko, V. Molva, T. Erban & S. J. Green. 2021. Microbiome variation during culture growth of the European house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*. *FEMS Microbiology Ecology* **97**(4):fiab039.
- Novák, K. 1969. *Metody sběru a preparace hmyzu, 2. vyd.* Praha: Academia.
- Oksanen, J., F. G. Blanchet, M. Friendly, R. Kindt, P. Legendre, D. McGlinn, P. R. Minchin, R. B. O'Hara, G. L. Simpson, P. Solymos, M. H. H. Stevens, E. Szoecs, H. Wagner. 2019. *Package 'Vegan': Community Ecology Package, Version 2.5-6*. CRAN - The Comprehensive R Archive Network. Dostupné z: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf> [4 March 2020].
- Pekár, S. & M. Brabec. 2020. *Moderní analýza biologických dat. 1. díl, Zobecněné lineární modely v prostředí R, 2., přepracované vyd.* Brno: Masarykova univerzita.

- Perdikis, D., E. Kapaxidi & G. Papadoulis. 2008. Biological control of insect and mite pests in greenhouse solanaceous crops. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* 2(1):125–144.
- R Development Core Team. 2020. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Dostupné z: <https://www.R-project.org> [4 March 2021].
- Saleh, S. M., N. L. Kelada & N. Shaker. 1991. Control of European house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart) with *Bacillus* spp. *Acarologia* 32(3):257–260.
- Sánchez-Ramos, I., F. Álvarez-Alfageme & P. Castañera. 2007. Effects of relative humidity on development, fecundity and survival of three storage mites. *Experimental and Applied Acarology* 41(1–2):87–100.
- Scandola, M., A. Bastianelli, A. Spoto & G. Vidotto. 2010. The fear of cockroaches questionnaire (FCQ). *Review of Psychology* 17(2):1–8.
- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski & T. Ideker. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research* 13(11):2498–2504.
- Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn & C. F. Weber. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75(23):7537–7541.
- Simeonov, L. I., F. Z. Macaev & B. G. Simeonova. 2014. *Environmental Security Assessment and Management of Obsolete Pesticides in Southeast Europe*. Dordrecht: Springer.
- Sidenius, K. E., T. E. Hallas, J. Stenderup, L. K. Poulsen & H. Mosbech. 2002. Decay of house-dust mite allergen Der f 1 at indoor climatic conditions. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 89(1):34–37.

- Smrž, J. 2003. Microanatomical and biological aspects of bacterial associations in *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridida). *Experimental and Applied Acarology* **31**(1-2):105–113.
- Stables, L. M. & D. R. Wilkin. 1981. Resistance to pirimiphos-methyl in cheese mites. In: *Proceedings 1981 British Crop Protection Conference - Pests and Diseases, Volume 2*. Croydon: The British Crop Protection Council, pp. 617–624.
- Stara, J., M. Nesvorna & J. Hubert. 2014. Comparison of the effect of insecticides on three strains of *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Astigmata) using an impregnated filter paper test and a growth test. *Pest Management Science* **70**(7), 1138–1144.
- Szlendak, E., C. Conyers, J. Muggleton & B. B. Thind. 2000. Pirimiphos-methyl resistance in two stored product mites, *Acarus siro* and *Acarus farris*, as detected by impregnated paper bioassay and esterase activity assays. *Experimental and Applied Acarology* **24**(1):45–54.
- Šobotník, J., G. Alberti, F. Weyda & J. Hubert. 2008. Ultrastructure of the digestive tract in *Acarus siro* (Acari: Acaridida). *Journal of Morphology* **269**(1):54–71.
- Tovey, E. R., M. D. Chapman & T. A. E. Platts-Mills. 1981. Mite faeces are a major source of house dust allergens. *Nature* **289**(5798):592–593.
- Vijayakumar, L. & R. Satheesh-Babu. 2009. Does 'no pesticide' reduce suicides? *International Journal of Social Psychiatry* **55**(5):401–406.
- Werren, J. H., L. Baldo & M. E. Clark. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* **6**(10):741–751.
- White, J.R., Nagarajan, N. & Pop, M. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples. *PLoS Comput Biol* **5**, e1000352 (2009).
- WHO/IUIS. 2021. Allergen Nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee, Geneva: World Health Organization (WHO) / Berlin: International Union of Immunological Societies (IUIS). Dostupné z: <http://www.allergen.org> [4 March 2021].

- Wickerham, E. L., B. Lozoff, J. Shao, N. Kaciroti, Y. Xia & J. D. Meeker. 2012. Reduced birth weight in relation to pesticide mixtures detected in cord blood of full-term infants. *Environment International* **47**:80–85.
- Wilkin, D. R. 1973. Resistance to lindane in *Acarus siro* from an English cheese store. *Journal of Stored Products Research* **9**(2):101–104.
- Wilkin, D. R. & L. M. Stables. 1985. The effects of dusts containing etrimfos, methacrifos or pirimiphos-methyl on mites in the surface layers of stored barley. *Experimental & Applied Acarology* **1**(3):203–211.
- Zug, R. & P. Hammerstein. 2015. *Wolbachia* and the insect immune system: what reactive oxygen species can tell us about the mechanisms of *Wolbachia*–host interactions. *Frontiers in Microbiology* **6**:1201.
- Žďárková, E. & E. Horák. 1990. Preventive biological control of stored food mites in empty stores using *Cheyletus eruditus* (Schrank). *Crop Protection* **9**(5):378–382.

8 Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obrázek 1: Modelový roztoč - <i>Tyrophagus putrescentiae</i> | 4 |
| Obrázek 2: Metodika testu na filtračním papíře..... | 16 |
| Obrázek 3: Vliv pesticidů na testované populace roztočů <i>T. putrescentiae</i> v testu na filtračním papíře a růstovém testu..... | 26 |
| Obrázek 4: Rarefakce - rozložení jednotlivých readů v mikrobiomu obou populací <i>T. putrescentiae</i> | 29 |
| Obrázek 5: Příspěvek abundantních OTU k odlišnosti srovnávaných mikrobiomů roztoče <i>Tyrophagus putrescentiae</i> mezi kontrolními vzorky a vzorky obsahující rezidua pesticidů | 30 |
| Obrázek 6: Vliv pesticidu pririmphos methyl na mikrobiom roztočů <i>Tyrophagus putrescentiae</i> | 38 |
| Obrázek 7: Vliv pesticidu deltametrin + PBO na mikrobiom roztočů <i>Tyrophagus putrescentiae</i> | 39 |
| Obrázek 8: Vliv pesticidu deltamethrin na mikrobiom roztočů <i>Tyrophagus putrescentiae</i> | 40 |

9 Seznam tabulek

| | |
|---|----|
| Tabulka 1: Seznam testovaných populací <i>T. putrescentiae</i> | 13 |
| Tabulka 2: Seznam studovaných populací <i>T. putrescentiae</i> a jejich mikrobiální symbionti. | 13 |
| Tabulka 3: Seznam studovaných pesticidů..... | 14 |
| Tabulka 4: Seznam naředěných koncentrací pesticidu..... | 15 |
| Tabulka 5: Složení master mixu pro průběh prvního kroku PCR reakce..... | 19 |
| Tabulka 6: Podmínky pro amplifikaci vzorků DNA v přístroji Thermal cycler..... | 19 |
| Tabulka 7: Složení Master mixu pro průběh druhého kroku PCR reakce..... | 20 |
| Tabulka 8: Podmínky pro amplifikaci vzorků DNA v přístroji Thermal cycler..... | 20 |
| Tabulka 9: parametry GLIM modelu pro test na filtračním papíře..... | 24 |
| Tabulka 10: Výsledky testů na filtračním papíře | 25 |
| Tabulka 11: Parametry modelu GLIM pro růstový test..... | 27 |
| Tabulka 12: Výsledky permutační analýzy vlivu environmentálních proměnných na distribuci OTU97 v mikrobiomu roztočů vystavených různým typům a koncentracím pesticidů..... | 31 |
| Tabulka 13: Vliv pesticidu na alfa diverzitu..... | 32 |

10 Seznam zkratek

- 5P.....symbiotická populace *Tyrophagus putrescentiae* s přítomností *Wolbachia*
- 5Pi.....asymbiotická populace *Tyrophagus putrescentiae*, kde *Wolbachia* není přítomna
- ACT.....Actellic 50 EC
- KOB.....K-OBIOL EC 25
- KOT.....K-Othrine SC 25
- PBO.....piperonylbutoxid
- PCR.....polymerázová řetězová reakce; anglicky polymerase chain reaction
- Tyr-put.....*Tyrophagus putrescentiae*
- OTU.....operačně taxonomická jednotka; anglicky operational taxonomic unit
- SPMd.....chovná dieta pro skladištní roztoče; anglicky stored product mite diet

11 Přílohy

Příloha 1: Souhrn výsledků testu na filtračním papíře, data před vyhodnocením v programu XLSATA

| Pesticid | Populace | Koncentrace | živý | mrtvý | celkový počet |
|-------------------|-----------------|--------------------|-------------|--------------|----------------------|
| deltamethrin | 5P | 0 | 56 | 4 | 60 |
| deltamethrin | 5P | 0.00001 | 139 | 230 | 369 |
| deltamethrin | 5P | 0.0001 | 110 | 231 | 341 |
| deltamethrin | 5P | 0.001 | 120 | 236 | 356 |
| deltamethrin | 5P | 0.01 | 98 | 263 | 361 |
| deltamethrin | 5P | 0.1 | 42 | 315 | 357 |
| deltamethrin | 5Pi | 0 | 54 | 6 | 60 |
| deltamethrin | 5Pi | 0.00001 | 365 | 309 | 674 |
| deltamethrin | 5Pi | 0.0001 | 370 | 299 | 669 |
| deltamethrin | 5Pi | 0.001 | 362 | 307 | 669 |
| deltamethrin | 5Pi | 0.01 | 333 | 358 | 691 |
| deltamethrin | 5Pi | 0.1 | 212 | 487 | 699 |
| deltamethrin_PBO | 5P | 0 | 56 | 4 | 60 |
| deltamethrin_PBO | 5P | 0.00001 | 139 | 230 | 369 |
| deltamethrin_PBO | 5P | 0.0001 | 110 | 231 | 341 |
| deltamethrin_PBO | 5P | 0.001 | 120 | 236 | 356 |
| deltamethrin_PBO | 5P | 0.01 | 98 | 263 | 361 |
| deltamethrin_PBO | 5P | 0.01 | 42 | 315 | 357 |
| deltamethrin_PBO | 5Pi | 0 | 54 | 6 | 60 |
| deltamethrin_PBO | 5Pi | 0.00001 | 423 | 254 | 677 |
| deltamethrin_PBO | 5Pi | 0.0001 | 424 | 251 | 675 |
| deltamethrin_PBO | 5Pi | 0.001 | 405 | 256 | 661 |
| deltamethrin_PBO | 5Pi | 0.01 | 326 | 354 | 680 |
| deltamethrin_PBO | 5Pi | 0.01 | 185 | 511 | 696 |
| pirimiphos-methyl | 5P | 0 | 56 | 4 | 60 |
| pirimiphos-methyl | 5P | 0.00001 | 183 | 170 | 353 |
| pirimiphos-methyl | 5P | 0.0001 | 70 | 290 | 360 |
| pirimiphos-methyl | 5P | 0.001 | 48 | 298 | 346 |
| pirimiphos-methyl | 5P | 0.01 | 11 | 319 | 330 |
| pirimiphos-methyl | 5P | 0.1 | 3 | 348 | 351 |
| pirimiphos-methyl | 5Pi | 0 | 54 | 6 | 60 |
| pirimiphos-methyl | 5Pi | 0.00001 | 181 | 126 | 307 |
| pirimiphos-methyl | 5Pi | 0.0001 | 213 | 127 | 340 |
| pirimiphos-methyl | 5Pi | 0.001 | 155 | 136 | 291 |
| pirimiphos-methyl | 5Pi | 0.01 | 53 | 288 | 341 |
| pirimiphos-methyl | 5Pi | 0.1 | 15 | 317 | 332 |

Příloha 2: Seznam ID vzorků použitých ve studii, které byly uloženy v GenBank (PRJNA685317)

| č.Vz | ID vzorku | Pesticid | koncentrace | Populace | faktor | opakování |
|------|--------------|-------------------|-------------|----------|--------|-----------|
| 1 | SAMN17082559 | deltamethrin | 12,5 | 5Pi | 1 | 1 |
| 2 | SAMN17082560 | deltamethrin | 12,5 | 5Pi | 1 | 2 |
| 3 | SAMN17082561 | deltamethrin | 12,5 | 5Pi | 1 | 3 |
| 4 | SAMN17082562 | deltamethrin | 12,5 | 5Pi | 1 | 4 |
| 5 | SAMN17082563 | deltamethrin | 12,5 | 5Pi | 1 | 5 |
| 6 | SAMN17082564 | deltamethrin | 12,5 | 5Pi | 1 | 6 |
| 7 | SAMN17082565 | deltamethrin | 1,25 | 5Pi | 1 | 1 |
| 8 | SAMN17082566 | deltamethrin | 1,25 | 5Pi | 1 | 2 |
| 9 | SAMN17082567 | deltamethrin | 1,25 | 5Pi | 1 | 3 |
| 10 | SAMN17082568 | deltamethrin | 1,25 | 5Pi | 1 | 4 |
| 11 | SAMN17082569 | deltamethrin | 1,25 | 5Pi | 1 | 5 |
| 12 | SAMN17082570 | deltamethrin | 1,25 | 5Pi | 1 | 6 |
| 13 | SAMN17082571 | deltamethrin | 0,125 | 5Pi | 1 | 1 |
| 14 | SAMN17082572 | deltamethrin | 0,125 | 5Pi | 1 | 2 |
| 15 | SAMN17082573 | deltamethrin | 0,125 | 5Pi | 1 | 3 |
| 16 | SAMN17082574 | deltamethrin | 0,125 | 5Pi | 1 | 4 |
| 17 | SAMN17082575 | deltamethrin | 0,125 | 5Pi | 1 | 5 |
| 18 | SAMN17082576 | deltamethrin | 0,125 | 5Pi | 1 | 6 |
| 19 | SAMN17082577 | deltamethrin | 0,0125 | 5Pi | 1 | 1 |
| 20 | SAMN17082578 | deltamethrin | 0,0125 | 5Pi | 1 | 2 |
| 21 | SAMN17082579 | deltamethrin | 0,0125 | 5Pi | 1 | 3 |
| 22 | SAMN17082580 | deltamethrin | 0,0125 | 5Pi | 1 | 4 |
| 23 | SAMN17082581 | deltamethrin | 0,0125 | 5Pi | 1 | 5 |
| 24 | SAMN17082582 | deltamethrin | 0,0125 | 5Pi | 1 | 6 |
| 25 | SAMN17082583 | deltamethrin | 0,00125 | 5Pi | 1 | 1 |
| 26 | SAMN17082584 | deltamethrin | 0,00125 | 5Pi | 1 | 2 |
| 27 | SAMN17082585 | deltamethrin | 0,00125 | 5Pi | 1 | 3 |
| 28 | SAMN17082586 | deltamethrin | 0,00125 | 5Pi | 1 | 4 |
| 29 | SAMN17082587 | deltamethrin | 0,00125 | 5Pi | 1 | 5 |
| 30 | SAMN17082588 | deltamethrin | 0,00125 | 5Pi | 1 | 6 |
| 31 | SAMN17082589 | pirimiphos methyl | 125 | 5P | 6 | 1 |
| 32 | SAMN17082590 | pirimiphos methyl | 125 | 5P | 6 | 2 |
| 33 | SAMN17082591 | pirimiphos methyl | 125 | 5P | 6 | 3 |
| 34 | SAMN17082592 | pirimiphos methyl | 125 | 5P | 6 | 4 |
| 35 | SAMN17082593 | pirimiphos methyl | 125 | 5P | 6 | 5 |
| 36 | SAMN17082594 | pirimiphos methyl | 125 | 5P | 6 | 6 |
| 37 | SAMN17082595 | pirimiphos methyl | 12,5 | 5P | 33 | 1 |
| 38 | SAMN17082596 | pirimiphos methyl | 12,5 | 5P | 33 | 2 |

| č.Vz | ID vzorku | Pesticid | koncentrace (µg/g) | Populace | faktor | opakování |
|------|--------------|-------------------|-----------------------|----------|--------|-----------|
| 39 | SAMN17082597 | pirimiphos methyl | 12,5 | 5P | 33 | 3 |
| 40 | SAMN17082598 | pirimiphos methyl | 12,5 | 5P | 33 | 4 |
| 41 | SAMN17082599 | pirimiphos methyl | 12,5 | 5P | 33 | 5 |
| 42 | SAMN17082600 | pirimiphos methyl | 12,5 | 5P | 33 | 6 |
| 43 | SAMN17082601 | pirimiphos methyl | 1,25 | 5P | 33 | 1 |
| 44 | SAMN17082602 | pirimiphos methyl | 1,25 | 5P | 33 | 2 |
| 45 | SAMN17082603 | pirimiphos methyl | 1,25 | 5P | 33 | 3 |
| 46 | SAMN17082604 | pirimiphos methyl | 1,25 | 5P | 33 | 4 |
| 47 | SAMN17082605 | pirimiphos methyl | 1,25 | 5P | 33 | 5 |
| 48 | SAMN17082606 | pirimiphos methyl | 1,25 | 5P | 33 | 6 |
| 49 | SAMN17082607 | pirimiphos methyl | 0,125 | 5P | 33 | 1 |
| 50 | SAMN17082608 | pirimiphos methyl | 0,125 | 5P | 33 | 2 |
| 51 | SAMN17082609 | pirimiphos methyl | 0,125 | 5P | 33 | 3 |
| 52 | SAMN17082610 | pirimiphos methyl | 0,125 | 5P | 33 | 4 |
| 53 | SAMN17082611 | pirimiphos methyl | 0,125 | 5P | 33 | 5 |
| 54 | SAMN17082612 | pirimiphos methyl | 0,125 | 5P | 33 | 6 |
| 55 | SAMN17082613 | pirimiphos methyl | 0,0125 | 5P | 33 | 1 |
| 56 | SAMN17082614 | pirimiphos methyl | 0,0125 | 5P | 33 | 2 |
| 57 | SAMN17082615 | pirimiphos methyl | 0,0125 | 5P | 33 | 3 |
| 58 | SAMN17082616 | pirimiphos methyl | 0,0125 | 5P | 33 | 4 |
| 59 | SAMN17082617 | pirimiphos methyl | 0,0125 | 5P | 33 | 5 |
| 60 | SAMN17082618 | pirimiphos methyl | 0,0125 | 5P | 33 | 6 |
| 61 | SAMN17082619 | deltamethrin | 12,5 | 5P | 11 | 1 |
| 62 | SAMN17082620 | deltamethrin | 12,5 | 5P | 11 | 2 |
| 63 | SAMN17082621 | deltamethrin | 12,5 | 5P | 11 | 3 |
| 64 | SAMN17082622 | deltamethrin | 12,5 | 5P | 11 | 4 |
| 65 | SAMN17082623 | deltamethrin | 12,5 | 5P | 11 | 5 |
| 66 | SAMN17082624 | deltamethrin | 12,5 | 5P | 11 | 6 |
| 67 | SAMN17082625 | deltamethrin | 1,25 | 5P | 12 | 1 |
| 68 | SAMN17082626 | deltamethrin | 1,25 | 5P | 12 | 2 |
| 69 | SAMN17082627 | deltamethrin | 1,25 | 5P | 12 | 3 |
| 70 | SAMN17082628 | deltamethrin | 1,25 | 5P | 12 | 4 |
| 71 | SAMN17082629 | deltamethrin | 1,25 | 5P | 12 | 5 |
| 72 | SAMN17082630 | deltamethrin | 1,25 | 5P | 12 | 6 |
| 73 | SAMN17082631 | deltamethrin | 0,125 | 5P | 12 | 1 |
| 74 | SAMN17082632 | deltamethrin | 0,125 | 5P | 12 | 2 |
| 75 | SAMN17082633 | deltamethrin | 0,125 | 5P | 12 | 3 |
| 76 | SAMN17082634 | deltamethrin | 0,125 | 5P | 12 | 4 |
| 77 | SAMN17082635 | deltamethrin | 0,125 | 5P | 12 | 5 |
| 78 | SAMN17082636 | deltamethrin | 0,125 | 5P | 12 | 6 |

| č.Vz | ID vzorku | Pesticid | koncentrace (µg/g) | Populace | faktor | opakování |
|------|--------------|------------------|-----------------------|----------|--------|-----------|
| 79 | SAMN17082637 | deltamethrin | 0,0125 | 5P | 14 | 1 |
| 80 | SAMN17082638 | deltamethrin | 0,0125 | 5P | 14 | 2 |
| 81 | SAMN17082639 | deltamethrin | 0,0125 | 5P | 14 | 3 |
| 82 | SAMN17082640 | deltamethrin | 0,0125 | 5P | 14 | 4 |
| 83 | SAMN17082641 | deltamethrin | 0,0125 | 5P | 14 | 5 |
| 84 | SAMN17082642 | deltamethrin | 0,0125 | 5P | 14 | 6 |
| 85 | SAMN17082643 | deltamethrin | 0,00125 | 5P | 14 | 1 |
| 86 | SAMN17082644 | deltamethrin | 0,00125 | 5P | 14 | 2 |
| 87 | SAMN17082645 | deltamethrin | 0,00125 | 5P | 14 | 3 |
| 88 | SAMN17082646 | deltamethrin | 0,00125 | 5P | 14 | 4 |
| 89 | SAMN17082647 | deltamethrin | 0,00125 | 5P | 14 | 5 |
| 90 | SAMN17082648 | deltamethrin | 0,00125 | 5P | 14 | 6 |
| 91 | SAMN17082649 | deltamethrin+PBO | 12,5 | 5Pi | 16 | 1 |
| 92 | SAMN17082650 | deltamethrin+PBO | 12,5 | 5Pi | 16 | 2 |
| 93 | SAMN17082651 | deltamethrin+PBO | 12,5 | 5Pi | 16 | 3 |
| 94 | SAMN17082652 | deltamethrin+PBO | 12,5 | 5Pi | 16 | 4 |
| 95 | SAMN17082653 | deltamethrin+PBO | 12,5 | 5Pi | 16 | 5 |
| 96 | SAMN17082654 | deltamethrin+PBO | 12,5 | 5Pi | 16 | 6 |
| 97 | SAMN17082655 | deltamethrin+PBO | 1,25 | 5Pi | 17 | 1 |
| 98 | SAMN17082656 | deltamethrin+PBO | 1,25 | 5Pi | 17 | 2 |
| 99 | SAMN17082657 | deltamethrin+PBO | 1,25 | 5Pi | 17 | 3 |
| 100 | SAMN17082658 | deltamethrin+PBO | 1,25 | 5Pi | 17 | 4 |
| 101 | SAMN17082659 | deltamethrin+PBO | 1,25 | 5Pi | 17 | 5 |
| 102 | SAMN17082660 | deltamethrin+PBO | 1,25 | 5Pi | 17 | 6 |
| 103 | SAMN17082661 | deltamethrin+PBO | 0,125 | 5Pi | 17 | 1 |
| 104 | SAMN17082662 | deltamethrin+PBO | 0,125 | 5Pi | 17 | 2 |
| 105 | SAMN17082663 | deltamethrin+PBO | 0,125 | 5Pi | 17 | 3 |
| 106 | SAMN17082664 | deltamethrin+PBO | 0,125 | 5Pi | 17 | 4 |
| 107 | SAMN17082665 | deltamethrin+PBO | 0,125 | 5Pi | 17 | 5 |
| 108 | SAMN17082666 | deltamethrin+PBO | 0,125 | 5Pi | 17 | 6 |
| 109 | SAMN17082667 | deltamethrin+PBO | 0,0125 | 5Pi | 17 | 1 |
| 110 | SAMN17082668 | deltamethrin+PBO | 0,0125 | 5Pi | 17 | 2 |
| 111 | SAMN17082669 | deltamethrin+PBO | 0,0125 | 5Pi | 17 | 3 |
| 112 | SAMN17082670 | deltamethrin+PBO | 0,0125 | 5Pi | 17 | 4 |
| 113 | SAMN17082671 | deltamethrin+PBO | 0,0125 | 5Pi | 17 | 5 |
| 114 | SAMN17082672 | deltamethrin+PBO | 0,0125 | 5Pi | 17 | 6 |
| 115 | SAMN17082673 | deltamethrin+PBO | 0,00125 | 5Pi | 17 | 1 |
| 116 | SAMN17082674 | deltamethrin+PBO | 0,00125 | 5Pi | 17 | 2 |
| 117 | SAMN17082675 | deltamethrin+PBO | 0,00125 | 5Pi | 17 | 3 |
| 118 | SAMN17082676 | deltamethrin+PBO | 0,00125 | 5Pi | 17 | 4 |

| č.Vz | ID vzorku | Pesticid | koncentrace (µg/g) | Populace | faktor | opakování |
|------|--------------|-------------------|--------------------|----------|--------|-----------|
| 119 | SAMN17082677 | deltamethrin+PBO | 0,00125 | 5Pi | 17 | 5 |
| 120 | SAMN17082678 | deltamethrin+PBO | 0,00125 | 5Pi | 17 | 6 |
| 121 | SAMN17082679 | Control | 0 | 5Pi | 21 | 1 |
| 122 | SAMN17082680 | Control | 0 | 5Pi | 21 | 2 |
| 123 | SAMN17082681 | Control | 0 | 5Pi | 21 | 3 |
| 124 | SAMN17082682 | Control | 0 | 5Pi | 21 | 4 |
| 125 | SAMN17082683 | Control | 0 | 5Pi | 21 | 5 |
| 126 | SAMN17082684 | Control | 0 | 5Pi | 21 | 6 |
| 127 | SAMN17082685 | pirimiphos methyl | 125 | 5Pi | 22 | 1 |
| 128 | SAMN17082686 | pirimiphos methyl | 125 | 5Pi | 22 | 2 |
| 129 | SAMN17082687 | pirimiphos methyl | 125 | 5Pi | 22 | 3 |
| 130 | SAMN17082688 | pirimiphos methyl | 125 | 5Pi | 22 | 4 |
| 131 | SAMN17082689 | pirimiphos methyl | 125 | 5Pi | 22 | 5 |
| 132 | SAMN17082690 | pirimiphos methyl | 125 | 5Pi | 22 | 6 |
| 133 | SAMN17082691 | pirimiphos methyl | 12,5 | 5Pi | 23 | 1 |
| 134 | SAMN17082692 | pirimiphos methyl | 12,5 | 5Pi | 23 | 2 |
| 135 | SAMN17082693 | pirimiphos methyl | 12,5 | 5Pi | 23 | 3 |
| 136 | SAMN17082694 | pirimiphos methyl | 12,5 | 5Pi | 23 | 4 |
| 137 | SAMN17082695 | pirimiphos methyl | 12,5 | 5Pi | 23 | 5 |
| 138 | SAMN17082696 | pirimiphos methyl | 12,5 | 5Pi | 23 | 6 |
| 139 | SAMN17082697 | pirimiphos methyl | 1,25 | 5Pi | 23 | 1 |
| 140 | SAMN17082698 | pirimiphos methyl | 1,25 | 5Pi | 23 | 2 |
| 141 | SAMN17082699 | pirimiphos methyl | 1,25 | 5Pi | 23 | 3 |
| 142 | SAMN17082700 | pirimiphos methyl | 1,25 | 5Pi | 23 | 4 |
| 143 | SAMN17082701 | pirimiphos methyl | 1,25 | 5Pi | 23 | 5 |
| 144 | SAMN17082702 | pirimiphos methyl | 1,25 | 5Pi | 23 | 6 |
| 145 | SAMN17082703 | pirimiphos methyl | 0,125 | 5Pi | 23 | 1 |
| 146 | SAMN17082704 | pirimiphos methyl | 0,125 | 5Pi | 23 | 2 |
| 147 | SAMN17082705 | pirimiphos methyl | 0,125 | 5Pi | 23 | 3 |
| 148 | SAMN17082706 | pirimiphos methyl | 0,125 | 5Pi | 23 | 4 |
| 149 | SAMN17082707 | pirimiphos methyl | 0,125 | 5Pi | 23 | 5 |
| 150 | SAMN17082708 | pirimiphos methyl | 0,125 | 5Pi | 23 | 6 |
| 151 | SAMN17082709 | pirimiphos methyl | 0,0125 | 5Pi | 23 | 1 |
| 152 | SAMN17082710 | pirimiphos methyl | 0,0125 | 5Pi | 23 | 2 |
| 153 | SAMN17082711 | pirimiphos methyl | 0,0125 | 5Pi | 23 | 3 |
| 154 | SAMN17082712 | pirimiphos methyl | 0,0125 | 5Pi | 23 | 4 |
| 155 | SAMN17082713 | pirimiphos methyl | 0,0125 | 5Pi | 23 | 5 |
| 156 | SAMN17082714 | pirimiphos methyl | 0,0125 | 5Pi | 23 | 6 |
| 157 | SAMN17082715 | Control | 0 | 5P | 27 | 1 |
| 158 | SAMN17082716 | Control | 0 | 5P | 27 | 2 |

| č.Vz | ID vzorku | Pesticid | koncentrace (µg/g) | Populace | faktor | opakování |
|------|--------------|------------------|-----------------------|----------|--------|-----------|
| 159 | SAMN17082717 | Control | 0 | 5P | 27 | 3 |
| 160 | SAMN17082718 | Control | 0 | 5P | 27 | 4 |
| 161 | SAMN17082719 | Control | 0 | 5P | 27 | 5 |
| 162 | SAMN17082720 | Control | 0 | 5P | 27 | 6 |
| 163 | SAMN17082721 | deltamethrin+PBO | 12,5 | 5P | 34 | 1 |
| 164 | SAMN17082722 | deltamethrin+PBO | 12,5 | 5P | 34 | 2 |
| 165 | SAMN17082723 | deltamethrin+PBO | 12,5 | 5P | 34 | 3 |
| 166 | SAMN17082724 | deltamethrin+PBO | 12,5 | 5P | 34 | 4 |
| 167 | SAMN17082725 | deltamethrin+PBO | 12,5 | 5P | 34 | 5 |
| 168 | SAMN17082726 | deltamethrin+PBO | 12,5 | 5P | 34 | 6 |
| 169 | SAMN17082727 | deltamethrin+PBO | 1,25 | 5P | 34 | 1 |
| 170 | SAMN17082728 | deltamethrin+PBO | 1,25 | 5P | 34 | 2 |
| 171 | SAMN17082729 | deltamethrin+PBO | 1,25 | 5P | 34 | 3 |
| 172 | SAMN17082730 | deltamethrin+PBO | 1,25 | 5P | 34 | 4 |
| 173 | SAMN17082731 | deltamethrin+PBO | 1,25 | 5P | 34 | 5 |
| 174 | SAMN17082732 | deltamethrin+PBO | 1,25 | 5P | 34 | 6 |
| 175 | SAMN17082733 | deltamethrin+PBO | 0,125 | 5P | 34 | 1 |
| 176 | SAMN17082734 | deltamethrin+PBO | 0,125 | 5P | 34 | 2 |
| 177 | SAMN17082735 | deltamethrin+PBO | 0,125 | 5P | 34 | 3 |
| 178 | SAMN17082736 | deltamethrin+PBO | 0,125 | 5P | 34 | 4 |
| 179 | SAMN17082737 | deltamethrin+PBO | 0,125 | 5P | 34 | 5 |
| 180 | SAMN17082738 | deltamethrin+PBO | 0,125 | 5P | 34 | 6 |
| 181 | SAMN17082739 | deltamethrin+PBO | 0,0125 | 5P | 34 | 1 |
| 182 | SAMN17082740 | deltamethrin+PBO | 0,0125 | 5P | 34 | 2 |
| 183 | SAMN17082741 | deltamethrin+PBO | 0,0125 | 5P | 34 | 3 |
| 184 | SAMN17082742 | deltamethrin+PBO | 0,0125 | 5P | 34 | 4 |
| 185 | SAMN17082743 | deltamethrin+PBO | 0,0125 | 5P | 34 | 5 |
| 186 | SAMN17082744 | deltamethrin+PBO | 0,0125 | 5P | 34 | 6 |
| 187 | SAMN17082745 | deltamethrin+PBO | 0,00125 | 5P | 34 | 1 |
| 188 | SAMN17082746 | deltamethrin+PBO | 0,00125 | 5P | 34 | 2 |
| 189 | SAMN17082747 | deltamethrin+PBO | 0,00125 | 5P | 34 | 3 |
| 190 | SAMN17082748 | deltamethrin+PBO | 0,00125 | 5P | 34 | 4 |
| 191 | SAMN17082749 | deltamethrin+PBO | 0,00125 | 5P | 34 | 5 |
| 192 | SAMN17082750 | deltamethrin+PBO | 0,00125 | 5P | 34 | 6 |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

Příloha 3: Seznam nejčtetnějších OTU, jejich specifikace a podobnost s daty uloženými v GeneBank

| OTU | Nejblíže podobný druh | Přístupové číslo | Podobnost |
|------------|------------------------------|-------------------------|------------------|
| Otu1 | <i>Bartonella</i> -like | KX022322.1 | 98,7 |
| Otu2 | <i>Bacillus</i> | MT642947.1 | 99,66 |
| Otu3 | <i>Wolbachia</i> | KF135426.1 | 97,7 |
| Otu5 | <i>Solitalea</i> -like | EF072191.1 | 89,44 |
| Otu6 | <i>Aquabacterium</i> | MF377651.1 | 99,7 |
| Otu7 | <i>Duganella</i> | MN865811.2 | 99,7 |
| Otu8 | <i>Methylobacterium</i> | LC546546.1 | 99,7 |
| Otu9 | <i>Staphylococcus</i> | MH549498.1 | 100 |
| Otu10 | <i>Renibacterium</i> | MT023376.1 | 99 |
| Otu11 | <i>Aquincola</i> | KX260637.1 | 99,7 |
| Otu13 | <i>Methylobacterium</i> | MF378518.1 | 99,3 |
| Otu14 | <i>Kocuria</i> | MH493698.1 | 99,7 |
| Otu15 | <i>Variovorax</i> | MN749750.1 | 99,7 |
| Otu16 | <i>Delftia</i> | MH549515.1 | 99,7 |
| Otu17 | <i>Propionibacterium</i> | MF327011.1 | 99,3 |
| Otu18 | <i>Herbaspirillum</i> | MN268524.2 | 100 |
| Otu19 | <i>Lactobacillus</i> | CP040910.1 | 99 |
| Otu20 | <i>Rhodococcus</i> | CP050124.1 | 99,7 |
| Otu21 | <i>Bradyrhizobiaceae</i> | MG740925.1 | 99,7 |
| Otu22 | <i>Lentibacillus</i> | MT093730.1 | 96,9 |
| Otu23 | <i>Ralstonia pickettii</i> s | F438427.1 | 99 |
| Otu24 | <i>Leifsonia</i> | MT605422.1 | 99,7 |
| Otu25 | <i>Sphingomonas</i> | KX959675.1 | 98,6 |
| Otu26 | <i>Curvibacter</i> | MT322965.1 | 98,6 |
| Otu27 | <i>Methylobacterium</i> | MF796690.1 | 98,6 |
| Otu29 | <i>Janthinobacterium</i> | LC458633.1 | 99,3 |
| Otu30 | <i>Holosporaceae</i> | HM138368.1 | 98,6 |
| Otu31 | <i>Sediminibacterium</i> sp. | AJ295528.1 | 95,9 |
| Otu32 | <i>Lactococcus</i> | JX893545.1 | 100 |
| Otu33 | <i>Stenotrophomonas</i> | KF767282.1 | 99,3 |
| Otu35 | <i>Corynebacterium</i> | KY386180.1 | 99,3 |
| Otu36 | <i>Burkholderia</i> | GU472931.1 | 96,6 |
| Otu37 | <i>Duganella</i> | MN865811.2 | 95,5 |
| Otu38 | <i>Bradyrhizobiaceae</i> | MG801359.1 | 99,3 |
| Otu39 | <i>Duganella</i> | MN865811.2 | 95,53 |
| Otu40 | <i>Cardinium</i> | MH057615.1 | 99 |
| Otu41 | <i>Heliomonas</i> | NR_135701.1 | 99 |
| Otu42 | <i>Comamonas</i> | LC458641.1 | 99,7 |

| OTU | Nejblíže podobný druh | Přístupové číslo | Podobnost |
|------------|------------------------------|-------------------------|------------------|
| Otu43 | <i>Streptococcus</i> | CP030928.1 | 100 |
| Otu44 | <i>Kinnertetia</i> | MT322959.1 | 98,6 |
| Otu45 | <i>Bacillus</i> | LT841749.1 | 97,6 |
| Otu46 | <i>Paralliobacillus</i> | JN694379.1 | 98,6 |
| Otu47 | <i>Undibacterium</i> | MT225789.1 | 98,6 |
| Otu48 | <i>Caulobacter</i> | MN853573.1 | 99,7 |
| Otu49 | <i>Mitochondrie</i> | JX999996.1 | 95,5 |
| Otu50 | <i>Pseudomonas</i> | MH549518.1 | 99,3 |
| Otu51 | <i>Aquabacterium</i> | KX986839.1 | 97,2 |
| Otu52 | <i>Virgibacillus</i> | MT397009.1 | 96,9 |
| Otu53 | <i>Sphingomonas</i> | LR215188.1 | 99 |
| Otu54 | <i>Enterobacteriaceae</i> | MG800905.1 | 99 |
| Otu55 | <i>Rugamonas</i> | MK602572.1 | 96,6 |
| Otu56 | <i>Proteobacterium</i> | MH061190.1 | 97,3 |
| Otu57 | <i>Microbacterium</i> | MT279356.1 | 99,7 |
| Otu58 | <i>Aminobacter</i> | MT568546.1 | 99,3 |
| Otu59 | <i>Streptococcus</i> | KY393411.1 | 99 |
| Otu60 | <i>Legionella</i> | LR134178.1 | 98,6 |
| Otu61 | <i>Legionella</i> | GQ923768.1 | 97,3 |
| Otu62 | <i>Mucilaginibacter</i> | KR856376.1 | 99,7 |
| Otu63 | <i>Rhodococcus</i> | KC492883.1 | 99,3 |
| Otu64 | <i>Rhizobium</i> | MT023038.1 | 94,8 |
| Otu66 | <i>Acinobacter</i> | MG049555.1 | 100 |
| Otu68 | <i>Enhydrobacter</i> | MH549507.1 | 99,7 |
| Otu69 | <i>Exiguobacterium</i> | MF438795.1 | 99,7 |
| Otu72 | <i>Brevibacterium</i> | MN746146.1 | 99 |
| Otu73 | <i>Corynebacterium</i> | MT023389.1 | 99,32 |
| Otu74 | <i>Massilia</i> | KY010283.1 | 98,6 |
| Otu75 | <i>Delftia</i> | FN434403.1 | 97,9 |
| Otu76 | <i>Bacillus</i> | LT841749.1 | 97,6 |
| Otu77 | <i>Rhizobiales</i> | KJ635088.1 | 96,6 |
| Otu78 | <i>Prevotella</i> | KC999389.1 | 99,3 |
| Otu79 | <i>Leuconostoc</i> | CP046062.1 | 99 |
| Otu81 | <i>Micrococcus</i> | MH549456.1 | 99 |
| Otu82 | <i>Cloacibacterium</i> | MG801022.1 | 100 |
| Otu84 | <i>Spirosoma</i> | LC221823.1 | 97,9 |
| Otu85 | <i>Enterobacteriaceae</i> | MH549458.1 | 94,2 |
| Otu86 | <i>Burkholderia</i> | EU641120.1 | 97,3 |
| Otu87 | <i>Bacillus</i> | MK480188.1 | 97,3 |
| Otu88 | <i>Corynebacterium</i> | MT573863.1 | 99 |

| OTU | Nejblíže podobný druh | Přístupové číslo | Podobnost |
|------------|---------------------------------------|-------------------------|------------------|
| Otu89 | <i>Massilia</i> | LC546467.1 | 99,3 |
| Otu90 | <i>Lawsonella clevelandensis</i> | NR_151867 | 99 |
| Otu91 | <i>Rhizobiales</i> | KJ635088.1 | 97,6 |
| Otu92 | <i>Sphingomonas</i> | MT269587.1 | 99 |
| Otu93 | <i>Rhizobiales</i> | KJ635147.1 | 96,6 |
| Otu95 | <i>Pseudomonas</i> | MG846038.1 | 99,3 |
| Otu96 | <i>Achromobacter</i> | MT573190.1 | 99,7 |
| Otu97 | <i>Methylobacterium</i> | LR215173.1 | 99,7 |
| Otu99 | <i>Methylibium</i> | MG803330.1 | 95,5 |
| Otu100 | <i>Methylobacterium</i> | MG818293.1 | 96,2 |
| Otu101 | <i>Atopostipes</i> | HE575955.1 | 95,9 |
| Otu102 | <i>Acidovorax</i> | MT255158.1 | 98,6 |
| Otu104 | <i>Flavimaricola marinus</i> | NR_149784 | 91,4 |
| Otu105 | <i>Corynebacterium</i> | MN251472.1 | 100 |
| Otu106 | <i>Actinomycetes</i> | LN881591.1 | 95,2 |
| Otu107 | <i>Leifosonia rubra</i> | MH482237.1 | 99,3 |
| Otu108 | <i>Paenibacillus</i> | MT373612.1 | 98,6 |
| Otu110 | <i>Solirubrobacter</i> | KX035249.1 | 98,6 |
| Otu112 | <i>Pedobacter</i> | MT415190.1 | 99,7 |
| Otu114 | <i>Comamonas</i> | GQ249370.1 | 94,5 |
| Otu115 | <i>Moraxella</i> | KM462054.1 | 99 |
| Otu117 | <i>Hydrogenophilus thermoluteolus</i> | AP018558.1 | 99 |
| Otu118 | <i>Rhizobiales</i> | KJ635148.1 | 97,3 |
| Otu119 | <i>Klebsiella</i> | KT292275.1 | 99,7 |
| Otu120 | <i>Chryseobacterium</i> | MT197478.1 | 99,3 |
| Otu121 | <i>Carnobacterium</i> | LT697723.1 | 99,3 |
| Otu122 | <i>Thermus thermophilus</i> | CP002777.1 | 99,3 |
| Otu124 | <i>Mesorhizobium loti</i> | CP033368.1 | 98,6 |
| Otu125 | <i>Rhizobiales</i> | KJ635088.1 | 95,5 |
| Otu126 | <i>Rhizobiales</i> | KJ635130.1 | 97,3 |
| Otu127 | <i>Wolbachia</i> | KF135426.1 | 96,6 |
| Otu128 | <i>Rhizobiales</i> | KJ635088.1 | 95,2 |
| Otu129 | <i>Paenibacillus</i> | JX427466.1 | 99,3 |
| Otu130 | <i>Brachybacterium rhamnosum</i> | MT225683.1 | 99 |
| Otu131 | <i>Acinetobacter</i> | MT633121.1 | 99,7 |
| Otu132 | <i>Cnuella takakiae</i> | NR_133730.1 | 99,3 |
| Otu133 | <i>Pseudomonas</i> | MK033128.1 | 99,7 |
| Otu134 | <i>Rhizobiales</i> | KJ635088.1 | 99,6 |
| Otu135 | <i>Veillonella parvula</i> | MT498453.1 | 99 |
| Otu137 | <i>Rhodococcus</i> | CP015219.1 | 99,7 |

| OTU | Nejblíže podobný druh | Přístupové číslo | Podobnost |
|------------|-------------------------------------|-------------------------|------------------|
| Otu138 | <i>Bacillus</i> | MN383063.1 | 96,2 |
| Otu140 | <i>Comamonadaceae</i> | MG801934.1 | 97,2 |
| Otu141 | <i>Acidobacteria</i> | HQ144046.1 | 98,3 |
| Otu142 | <i>Exiguobacterium mexicanum</i> | CP040676.1 | 99,65 |
| Otu143 | <i>Pseudomonas</i> | LC458622.1 | 99,7 |
| Otu144 | <i>Actinomycetes</i> | MT549305.1 | 99,31 |
| Otu145 | <i>Rhizobiales</i> | KJ635135.1 | 92,1 |
| Otu147 | <i>Acinetobacter radioresistens</i> | MT367790.1 | 99,31 |
| Otu148 | <i>Cecembia calidifontis</i> | NR_108889.1 | 99,3 |
| Otu150 | <i>Bacillus</i> | KJ934982.1 | 99 |
| Otu151 | <i>Cellulomonadaceae</i> | JQ401465.1 | 96,96 |
| Otu152 | <i>Daejonia ginsenosidivorans</i> | NR_157727.1 | 96,9 |
| Otu153 | <i>Acidobacterium</i> | FM866290.1 | 98,6 |
| Otu154 | <i>Dietzia</i> | MH549465.1 | 97,9 |
| Otu155 | <i>Novosphingobium</i> | KT308845.1 | 92,1 |
| Otu156 | <i>Sphingobacterium</i> | MT586115.1 | 100 |