

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Hodnocení ekotoxicity biocidů pomocí vybraných ekotoxikologických testů

Bc. Patricie Černá

Diplomová práce

2019

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Patricie Černá**  
Osobní číslo: **C17459**  
Studijní program: **N2807 Chemické a procesní inženýrství**  
Studijní obor: **Ochrana životního prostředí**  
Název tématu: **Hodnocení ekotoxicity biocidů pomocí vybraných ekotoxikologických testů**  
Zadávající katedra: **Ústav environmentálního a chemického inženýrství**

## Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte literární rešerši pro oblast biocidů - definice, rozdělení, legislativa. Pro testování vyberte konkrétní biocid. Uveďte dostupné informace o biocidu.
2. Na vybraném biocidu proveďte ekotoxikologické testy: test akutní imobilizace dafnií, test inhibice růstu řas a test inhibice respirace aktivovaného kalu. Testy proveďte dle platných metod EU nebo OECD.
3. Výsledky experimentů vhodným způsobem zpracujte, vyhodnoťte toxické účinky a proveďte hodnocení biocidu z hlediska jeho ekotoxicity.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu" v platném znění.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Jaroslava Kořínková, Dr.**

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultant diplomové práce:

**Mgr. Monika Roupcová**


Výzkumný ústav organických syntéz, a.s .

Datum zadání diplomové práce:

**8. února 2019**

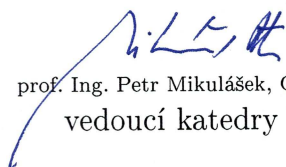
Termín odevzdání diplomové práce:

**10. května 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Petr Mikulášek, CSc.  
vedoucí katedry

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 10. 5. 2019

Bc. Patricie Černá

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí diplomové práce Ing. Jaroslavě Kořínkové, Dr. za odborné vedení práce, za cenné rady a trpělivost při jejím vytváření. Ráda bych také poděkovala Mgr. Monice Roupcové za velkou pomoc, trpělivost a čas strávený s experimentální částí práce. Závěrem poděkuji své rodině a kamarádům za podporu po celou dobu studia.

## **ANOTACE**

Práce se zabývá biocidy, jejich legislativou a testováním ekotoxicity glyfosátu a herbicidu Roundupu na aktivovaném kalu, dafniích a řasách. V práci jsou popsány základní vlastnosti testovaných látek, jejich použití a zhodnocení jejich toxicity.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

ekotoxikologické testy, dafnie, řasy, glyfosát, Roundup, biocidy

## **TITLE**

Evaluation of biocides ecotoxicity by selected ecotoxicological tests

## **ANNOTATION**

The thesis deals with biocides, their legislation and ecotoxicity testing of glyphosate and Roundup herbicide on activated sludge, daphnia and algae. Basic properties of tested substances, their use and their toxicity evaluation are described in this work.

## **KEYWORDS**

ecotoxicological tests, daphnia, algae, glyphosate, Roundup, biocides

# OBSAH

ÚVOD.....	14
1 Biocidy.....	15
1.1 Herbicidy.....	16
2 Legislativa biocidů.....	17
2.1 Nařízení Evropského parlamentu a rady (EU) č. 528/2012 o dodávání biocidních přípravků na trh a jejich používání.....	18
2.1.1 Definice a cíle .....	18
2.1.2 Povolování a schvalování .....	19
2.2 Zákon 324/2016 Sb., o podmínkách uvádění biocidních přípravků a účinných látek na trh .....	21
2.2.1 Definice zákona .....	21
2.2.2 Povinnosti .....	21
2.2.3 Povolování .....	21
2.2.4 Státní správa.....	22
2.3 Aktuální situace.....	23
3 Testované látky .....	24
3.1 Glyfosát.....	24
3.1.1 Historie.....	24
3.1.2 Fyzikální a chemické vlastnosti .....	24
3.1.3 Mechanismus účinku .....	26
3.1.4 Toxikologické vlastnosti.....	26
3.1.5 Výroba .....	27
3.1.6 Použití .....	30
3.1.7 Vliv na životní prostředí .....	31
3.2 Roundup KLASIK PRO.....	33
3.2.1 Fyzikální a chemické vlastnosti .....	33

3.2.2	Toxicita .....	33
3.2.3	Použití .....	34
3.2.4	„Roundup ready“ plodiny .....	34
4	Metodika testování.....	35
4.1	Zkouška inhibice dýchání aktivovaného kalu .....	35
4.1.1	Testovací organismus .....	35
4.1.2	Příprava testu .....	35
4.1.3	Průběh testu.....	37
4.1.4	Přístroje a zařízení .....	37
4.1.5	Zkušební podmínky .....	38
4.1.6	Výpočty.....	38
4.1.7	Platnost zkoušky .....	39
4.2	Zkouška akutní imobilizace dafnií (Daphnia sp.).....	40
4.2.1	Testovací organismus .....	40
4.2.2	Příprava testu .....	41
4.2.3	Průběh testu.....	42
4.2.4	Přístroje a zařízení .....	42
4.2.5	Zkušební podmínky .....	42
4.2.6	Platnost zkoušky .....	42
4.3	Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas a sinic.....	43
4.3.1	Testovací organismus .....	43
4.3.2	Přístrojové vybavení .....	44
4.3.3	Příprava testu .....	44
4.3.4	Průběh testu.....	45
4.3.5	Zkušební podmínky .....	46
4.3.6	Platnost zkoušky .....	46
4.3.7	Metodika výpočtu .....	46



5	Výsledky .....	49
5.1	Inhibice dýchání aktivovaného kalu.....	49
5.1.1	Roundup – předběžná zkouška .....	49
5.1.2	Roundup – úplná zkouška.....	51
5.2	Akutní imobilizace dafnií.....	53
5.2.1	Glyfosát – předběžný test .....	53
5.2.2	Glyfosát – limitní test .....	54
5.2.3	Roundup.....	55
5.3	Inhibice růstu sladkovodních řas.....	56
5.3.1	Glyfosát – předběžný test .....	56
5.3.2	Glyfosát – úplný test .....	57
5.3.3	Roundup – předběžný test.....	60
5.3.4	Roundup – úplný test .....	62
6	ZÁVĚR .....	65
7	POUŽITÁ LITERATURA .....	66

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1</b> - Struktura glyfosátu [11].....	25
<b>Obrázek 2</b> - Acidobazické formy glyfosátu [12] .....	25
<b>Obrázek 3</b> - Původní postup výroby glyfosátu [24] .....	27
<b>Obrázek 4</b> - Výroba kyseliny iminodioctové [25] .....	28
<b>Obrázek 5</b> - Syntéza glyfosátu z kyseliny iminodioctové [25].....	28
<b>Obrázek 6</b> - Syntéza glyfosátu z dimethylfosfitu [27] .....	29
<b>Obrázek 7</b> - Použití glyfosátu v USA v roce 2013 [28] .....	30
<b>Obrázek 8</b> - Použití glyfosátu v Evropě [29] .....	31
<b>Obrázek 9</b> - Degradace glyfosátu a AMPA [33].....	32
<b>Obrázek 10</b> - Testovací aparatura inhibice aktivovaného kalu [40] .....	37
<b>Obrázek 11</b> - Dospělá gravidní dafnie a mládě používané k testování [41].....	41
<b>Obrázek 12</b> - <i>Desmodesmus subspicatus</i> [42].....	43
<b>Obrázek 13</b> - Porovnání testovaného roztoku glyfosátu G a Roundupu R [40].....	62

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1</b> - Toxikologické hodnoty pro jednotlivé druhy živočichů [20], [21], [22].....	27
<b>Tabulka 2</b> - Ekotoxikologické hodnoty pro Roundup [39] .....	33
<b>Tabulka 3</b> - Složení syntetické odpadní vody .....	36
<b>Tabulka 4</b> - Hodnoty pro výpočet průměrné hmotnosti sušiny .....	36
<b>Tabulka 5</b> - Složení zředovací vody.....	41
<b>Tabulka 6</b> - Složení zkušebního média.....	45
<b>Tabulka 7</b> - Inhibice dýchání aktivovaného kalu – předběžná zkouška .....	49
<b>Tabulka 8</b> - Inhibice dýchání aktivovaného kalu – úplná zkouška .....	51
<b>Tabulka 9</b> - Glyfosát: Imobilizace dafnií – předběžný test.....	53
<b>Tabulka 10</b> - Glyfosát: Obsah kyslíku – předběžný test .....	54
<b>Tabulka 11</b> - Glyfosát: Hodnoty pH – předběžný test .....	54
<b>Tabulka 12</b> - Glyfosát: Imobilizace dafnií – limitní test.....	54
<b>Tabulka 13</b> - Glyfosát: Obsah kyslíku – limitní test .....	55
<b>Tabulka 14</b> - Glyfosát: Hodnoty pH – limitní test.....	55
<b>Tabulka 15</b> - Glyfosát: Průměrná hustota buněk – předběžný test .....	56
<b>Tabulka 16</b> - Glyfosát: Růstová rychlost a výtěžek – předběžný test.....	57
<b>Tabulka 17</b> - Glyfosát: Průměrná hustota buněk – úplný test .....	58
<b>Tabulka 18</b> - Glyfosát: Růstová rychlost a výtěžek – úplný test.....	59
<b>Tabulka 19</b> - Roundup: Průměrná hustota buněk – předběžný test.....	60
<b>Tabulka 20</b> - Roundup: Růstová rychlost a výtěžek – předběžný test.....	61
<b>Tabulka 21</b> - Roundup: Průměrná hustota buněk – úplný test.....	62
<b>Tabulka 22</b> - Roundup: Růstová rychlost a výtěžek – úplný test.....	63

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1</b> - Vývoj množství používaných biocidů [1] .....	15
<b>Graf 2</b> - Množství použitého glyfosátu [1] .....	15
<b>Graf 3</b> - Závislost spotřeby kyslíku na čase .....	50
<b>Graf 4</b> - Závislost spotřeby kyslíku na čase – úplná zkouška .....	52
<b>Graf 5</b> - Inhibice v závislosti na koncentraci .....	52
<b>Graf 6</b> - Glyfosát: Průměrná hustota buněk – předběžný test .....	56
<b>Graf 7</b> - Glyfosát: Průměrná hustota buněk – úplný test .....	58
<b>Graf 8</b> - Závislost redukce růstové rychlosti na koncentraci glyfosátu .....	59
<b>Graf 9</b> - Závislost inhibice výtěžku na koncentraci glyfosátu .....	60
<b>Graf 10</b> - Roundup: Průměrná hustota buněk – předběžný test .....	61
<b>Graf 11</b> - Závislost redukce růstové rychlosti na koncentraci Roundupu .....	63
<b>Graf 12</b> - Závislost inhibice výtěžku na koncentraci Roundupu .....	64

## SEZNAM ZKRATEK

AMPA – kyselina aminomethylfosfonová

AVČR – Akademie věd České republiky

BČOV – biologická čistírna odpadních vod

BPR – Biocidal Products Regulation

CLP – Nařízení (ES) č. 1272/2008 o klasifikaci a označování látek a směsí

ČIŽP – Česká inspekce životního prostředí

DDT – 1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan

EC<sub>50</sub> – koncentrace, která vyvolá účinek o velikosti 50 % maximálního účinku

ECHA – Evropská agentura pro chemické látky

EHS – Evropské hospodářské společenství

EPA – Agentura pro ochranu životního prostředí (Environmental Protection Agency)

EPSP – 5-enolpyruvylshikimát-3-fosfát

ES – Evropské společenství

GM – geneticky modifikované

CHLAP – Registr chemických látek a prostředků

IARC – Mezinárodní organizace pro výzkum rakoviny

KHS – Krajská hygienická stanice

LC<sub>50</sub> – letální (smrtná) koncentrace pro 50 % testovacích organismů

LD<sub>50</sub> – letální (smrtná) dávka pro 50 % testovacích organismů

OECD – Organizace pro hospodářskou spolupráci

POP – perzistentní organická látka

PTB – perzistentní bioakumulativní a toxické

vPvb – vysoce perzistentní a vysoce bioakumulativní

# ÚVOD

Biocid (z řečtiny bio = život a *cidó* = ničím) je látka, která se používá k hubení či omezování růstu škodlivých organismů ve všech oblastech lidské činnosti. Může být škodlivá pro zdraví zvířat nebo poškozovat materiály. Proto je nutné je regulovat. Biocidní přípravky jsou součástí každodenního života a patří mezi ně dezinfekční přípravky používané v domácnosti nebo v nemocnicích, jed na krysy, repelenty proti hmyzu, spreje a nátěry proti plísním, tablety k čištění vody a mnoho dalších přípravků. Asi nejznámějším příkladem závažnějších důsledků používání biocidů je insekticid DDT (1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan), který byl ve velkém množství používán v 50. a 60. letech v zemědělství a k potlačení malárie. Dalším typem biocidů jsou herbicidy, jejichž velice častou účinnou látkou je oblíbený glyfosát. Tato látka se čím dál častěji objevuje na místech, kde není úplně očekávána, například v medu, čokoládě, pivu či mateřském mléce. Glyfosát vyvolává velké diskuze z hlediska jeho účinků na necílové organismy.

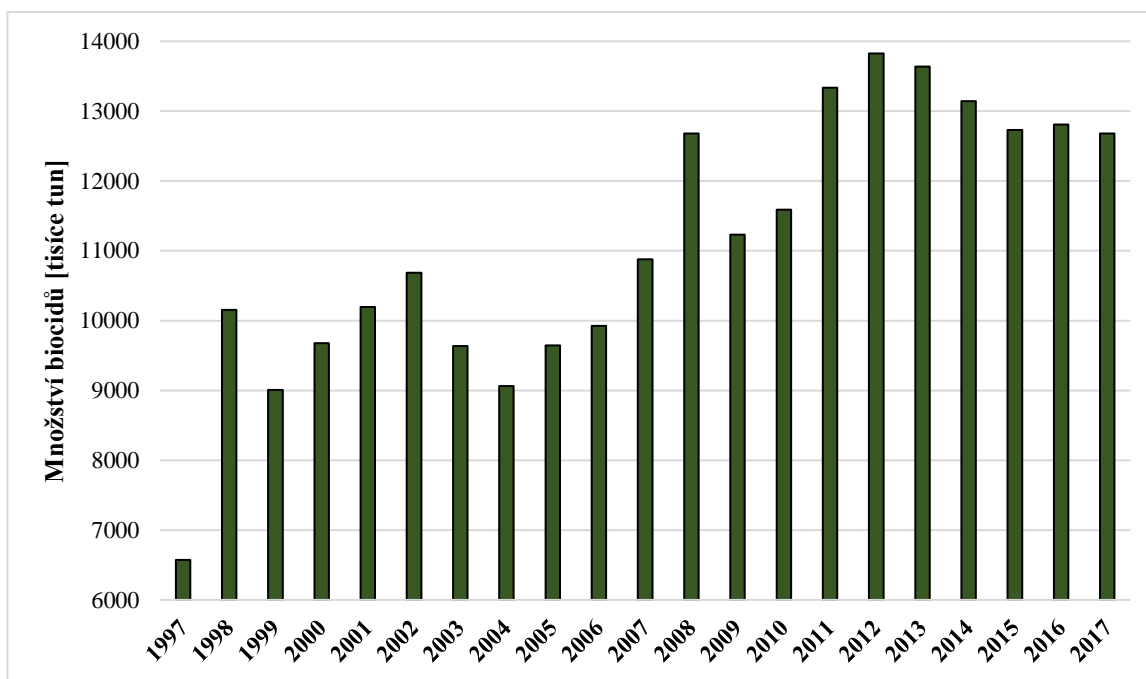
Cílem této diplomové práce je literární rešerše na téma biocidů a jejich legislativy. V experimentální části je pozornost zaměřena na ekotoxikologické testování glyfosátu a herbicidu Roundup pomocí testů platných v rámci Evropské unie a to konkrétně:

- Inhibice dýchání aktivovaného kalu
- Akutní imobilizace dafnií
- Inhibice růstu zelených řas a sinic

Na základě výsledků těchto testů budou stanoveny ekotoxikologické hodnoty. Tyto hodnoty umožní posouzení testovaných látek z hlediska nebezpečnosti pro životní prostředí.

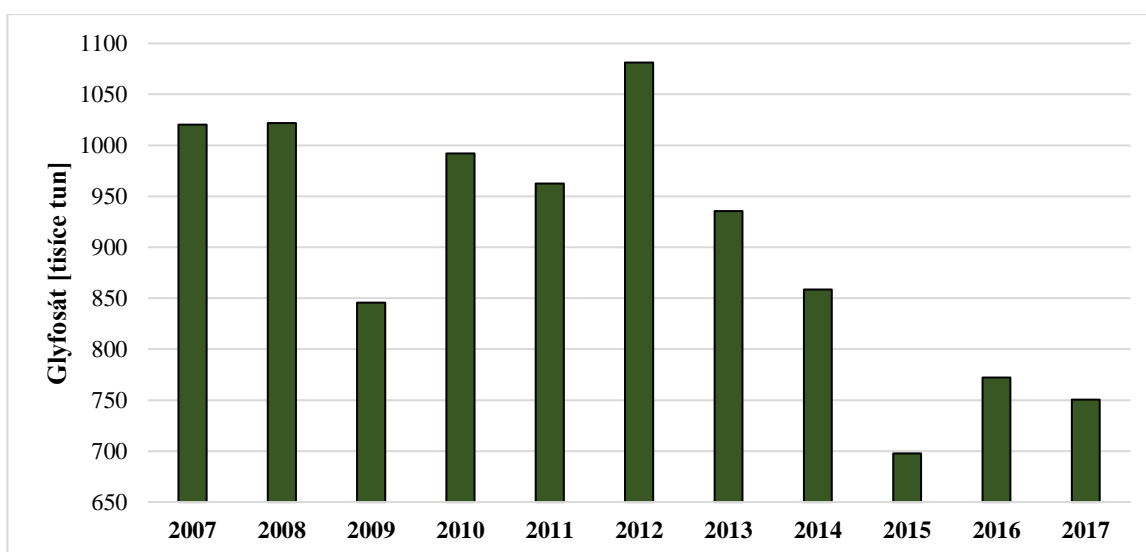
# 1 BIOCIDY

Biocid je chemická směs s biocidním účinkem neboli schopností usmrtit nebo odpudit nežádoucí organismy. Biocidní účinek přípravku zajišťuje účinná látka. Na grafu 1 je zachycen vývoj množství používaných biocidů v České republice mezi roky 1997 a 2017. Za posledních šest let se podařilo snížit používání pesticidů v ČR celkově o 7,1 %.



Graf 1 - Vývoj množství používaných biocidů [1]

Účinné látky glyfosát se v roce 2013 v ČR spotřebovalo 935 tisíc litrů, v roce 2017 750 tisíc litrů. V grafu 2 je znázorněn vývoj používání účinné látky glyfosátu v biocidních přípravcích.



Graf 2 - Množství použitého glyfosátu [1]

V příloze V nařízení Evropského parlamentu o dodávání biocidních přípravků na trh a jejich používání jsou biocidní přípravky rozděleny do čtyř hlavních oblastí:

1. Desinfekční prostředky – k těmto přípravkům nepatří čistící přípravky, u kterých se nepředpokládá biocidní účinek, včetně tekutých pracích prostředků, pracích prášků a podobných přípravků.
2. Konzervanty – není-li uvedeno jinak, zahrnuje tento typ přípravků pouze přípravky k prevenci vývoje mikrobů a řas.
3. Regulace živočišných škůdců.
4. Jiné biocidní přípravky.

Tyto oblasti jsou ještě podrobněji rozčleněny na 22 typů přípravků [2].

## 1.1 Herbicidy

Jejich účinkem je potlačení nežádoucích rostlinných druhů na hospodářské půdě. Podle selektivity je lze rozdělit na selektivní a neselektivní. Selektivní herbicidy působí pouze na některé druhy nebo skupiny rostlin. Herbicidy neselektivní ničí veškerou rostlinnou vegetaci. Sem patří tzv. totální herbicid Roundup.

Podle typu působení je můžeme rozdělit na kontaktní a systémové. Kontaktní herbicidy působí v místě kontaktu s rostlinou, nejčastěji na listech. Druhým typem jsou herbicidy, které působí systémově. Jsou rozvedeny po celé rostlině a jejich účinek záleží na typu přípravku, některý působí například pouze na kořeny [3].



## 2 LEGISLATIVA BIOCIDŮ

Základní právní předpisy týkající se legislativy biocidních přípravků lze rozdělit na právní předpisy Evropské unie a právní předpisy našeho státu.

### a) Právní předpisy EU

Základním dokumentem je nařízení Evropského parlamentu č. 528/2012 o dodávání biocidních přípravků na trh a jejich používání, zkráceně BPR (Biocidal Products Regulation). Nařízení bylo přijato dne 22. května 2012 s účinností od 1. září 2013. Nařízení ruší směrnici o biocidních přípravcích (směrnice 98/8/ES). Dalšími dokumenty jsou:

- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 334/2014, kterým se mění BPR, pokud jde o určité podmínky přístupu na trh
- Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008, o klasifikaci a označování látek a směsí (nařízení CLP)
- Nařízení komise (EU) č. 1062/2014 o pracovním programu systematického přezkumu všech stávajících účinných látek obsažených v biocidních přípravcích
- Prováděcí nařízení komise (EU) č. 414/2013, o postupu pro povolování stejných biocidních přípravků
- Prováděcí nařízení komise (EU) č. 354/2013, o změnách biocidních přípravků
- Nařízení komise (EU) č. 613/2013, kterým se mění nařízení (ES) č. 1451/2007, pokud jde o další účinné látky v biocidních přípravcích, které mají být zkoumány v rámci programu přezkoumání
- Prováděcí nařízení komise (EU) č. 564/2013, o poplatcích a platbách splatných ECHA
- Nařízení komise v přenesené pravomoci (EU) č. 736/2013, kterým se mění BPR, pokud jde o trvání pracovního programu přezkumu stávajících biocidních účinných látek
- Nařízení komise v přenesené pravomoci (EU) č. 837/2013, kterým se mění příloha III BPR, pokud jde o požadavky nezbytné k povolení biocidních přípravků
- Prováděcí nařízení komise v přenesené pravomoci (EU) č. 88/2014, kterým se stanoví postup pro změnu přílohy I BPR.

### b) Právní předpisy České republiky

V rámci české legislativy je stěžejní zákon č. 324/2016, o biocidních přípravcích a účinných látkách a o změně některých souvisejících zákonů neboli zákon o biocidech. Dalším zákonem, vztahujícím se na biocidy, je zákon č. 350/2011 Sb., o chemických látkách a chemických směsích. Tento zákon se na biocidní přípravky nevztahuje jako na chemické směsi, ale jako na

biocidy. Je povinnost oznámení biocidního přípravku do CHLAP (registr chemických látek a prostředků). Toto oznámení je zpoplatněno, 1500 Kč za jeden přípravek. Příkladá se protokol o účinnosti, bezpečnostní list, etiketa a návod k použití. Dále zákon č. 120/2002 Sb., o podmínkách uvádění biocidních přípravků a účinných látek na trh. V současné době je v platnosti část druhá o změně zákona o ochraně veřejného zdraví (§ 37), část třetí o změně veterinárního zákona (§ 38), část pátá o účinnosti (§ 40) a příloha definující typy biocidních přípravků.

## 2.1 Nařízení Evropského parlamentu a rady (EU) č. 528/2012 o dodávání biocidních přípravků na trh a jejich používání

### 2.1.1 Definice a cíle

Biocidní přípravek je zde definován jako jakákoli látka nebo směs, která se skládá z jedné či více účinných látek určených k ničení, odpuzování či zneškodňování nežádoucího organismu. Za biocidní přípravek se považuje i ošetřený předmět, který má primární biocidní funkci. Dále jsou definovány pojmy jako:

- **účinná látka** – látka nebo mikroorganismus, který působí na škodlivé organismy nebo proti škodlivým organismům
- **škodlivý organismus** – organismus, včetně patogenních činitelů, jehož přítomnost je nežádoucí nebo který má škodlivý účinek na člověka, jeho činnosti nebo předměty, které používá nebo vyrábí, nebo na zvířata či na životní prostředí
- **reziduum** – látka přítomná v produktech rostlinného nebo živočišného původu nebo na jejich povrchu, ve vodních zdrojích, pitné vodě, potravinách, krmivech anebo jinde v životním prostředí v důsledku používání biocidního přípravku, včetně metabolitů takové látky a produktů vznikajících při rozkladu nebo reakci
- **stávající účinná látka** – látka, která byla dostupná na trhu ke dni 14. května 2000 jako účinná látka biocidního přípravku pro jiné účely než pro účely vědeckého výzkumu a vývoje nebo výzkumu a vývoje zaměřeného na výrobky a postupy
- **nová účinná látka** – látka, která nebyla dostupná na trhu ke dni 14. května 2000 jako účinná látka biocidního přípravku pro jiné účely než pro účely vědeckého výzkumu a vývoje nebo výzkumu a vývoje zaměřeného na výrobky a postupy
- **látka vzbuzující obavy** – látka jiná než účinná látka, jež může mít díky svým vlastnostem bezprostředně nebo ve vzdálenější budoucnosti nepříznivý účinek na člověka, zvířata

či životní prostředí a je obsažena nebo vzniká v biocidním přípravku v takové koncentraci, aby představovala riziko tohoto účinku. Za takovou látku byla považována:

- látka klasifikovaná jako nebezpečná nebo splňující kritéria pro tuto klasifikaci podle směrnice Rady 67/548/EHS a přítomná v biocidním přípravku v koncentraci, na základě níž je daný přípravek považován za nebezpečný ve smyslu článků 5, 6 a 7 směrnice 1999/45/ES
- látka klasifikovaná jako nebezpečná nebo splňující kritéria pro tuto klasifikaci podle nařízení (ES) č. 1272/2008 a přítomná v biocidním přípravku v koncentraci, na základě níž je daný přípravek považován za nebezpečný ve smyslu uvedeného nařízení
- látka, která splňuje kritéria pro perzistentní organické znečišťující látky (POP) podle nařízení (ES) č. 850/2004 nebo která splňuje kritéria pro perzistentní bioakumulativní a toxické (PTB) nebo vysoce perzistentní a vysoce bioakumulativní (vPvB) látky podle přílohy XIII nařízení (ES) č. 1907/2006.

Hlavními cíli tohoto nařízení je zlepšení fungování trhu s biocidními přípravky v rámci Evropské unie, zjednodušení schvalování účinných látek a povolování biocidních přípravků. Zavádí lhůty pro hodnocení, vytváření stanovisek a rozhodování ze strany členských států. Nařízení také podporuje omezení zkoušek na zvířatech prostřednictvím povinného sdílení údajů a podpory používání alternativních zkušebních metod. V neposlední řadě také pomáhá zajišťovat vysokou úroveň ochrany obyvatelstva a životního prostředí [4], [5].

### 2.1.2 Povolování a schvalování

Všechny biocidní přípravky musí mít před uvedením na trh povolení a účinné látky, které biocidy obsahují musí být předem schváleny. Existují ovšem určité výjimky. Například účinné látky, které jsou zahrnuté v programu přezkoumání a biocidní přípravky obsahující tyto účinné látky lze uvést na trh, zatímco se očekává konečné rozhodnutí ohledně jejich schválení. Tyto výjimky jsou pokryty dočasným povolením.

Schvalování a povolování probíhá v rámci členských států. Účinné látky jsou posouzeny členským státem a výsledky jsou předány Výboru pro biocidní přípravky agentury ECHA, který vydá stanovisko do 270 dní. To slouží jako podklad pro rozhodnutí o schválení. Schválení je na dobu určitou, nejdéle na 10 let a lze ho obnovit. Může být uznáno dalšími státy.

K podávání žádostí, výměnu údajů a informací mezi žadatelem, agenturou ECHA, příslušnými orgány členských států a Evropskou komisí slouží registr biocidních přípravků R4BP 3. Dalším nástrojem je IUCLID 5, který se používá k přípravě žádostí.

Pokud účinná látka splňuje kritéria pro vyloučení z posuzování, nebude schválena. To zahrnuje:

- karcinogeny, mutageny, reprotoxické látky kategorie 1A nebo 1B dle nařízení CLP
- endokrinní disruptory
- perzistentní, bioakumulativní a toxické látky (PBT)
- velmi perzistentní a velmi bioakumulativní látky (vPvB)

Výjimkou je látka potřebná pro veřejné zdraví a zájem, pokud k ní neexistuje žádná alternativa.

V tomto případě se schvaluje na maximálně 5 let.

Během tohoto procesu schvalování jsou vytipovány látky důležité pro veřejné zdraví a životní prostředí. Je snahou zajistit vhodné alternativy. Kritéria pro vyhledávání těchto látek:

- splňuje alespoň jedno z kritérií vyloučení
- je to látka dráždící dýchací cesty
- výrazně nižší toxikologické referenční hodnoty než hodnoty u většiny schválených účinných látek pro stejný typ přípravku a stejné použití
- splňuje dvě z kritérií, která umožňují ji považovat za PBT
- vzbuzuje obavy z hlediska zdraví lidí nebo zvířat nebo z hlediska životního prostředí, a to i v případě velice přísných opatření ke zmírnění rizik
- obsahuje značné množství neaktivních izomerů nebo nečistot.

Tyto látky jsou schvalovány maximálně na 7 let, v případě splnění více kritérií pro vyloučení jen na 5 let [4], [6].

## 2.2 Zákon 324/2016 Sb., o podmínkách uvádění biocidních přípravků a účinných látek na trh

### 2.2.1 Definice zákona

Tento zákon upravuje předpisy Evropské unie, které zabývají dodáváním biocidních přípravků na trh a jejich používání. Dále upravuje povinnosti právnických a podnikajících fyzických osob při dodávání a používání biocidních přípravků a působnosti správních orgánů při výkonu státní správy v oblasti biocidů a sankce za porušení předpisů uvedených v předpisech Evropské unie a v tomto zákoně.

### 2.2.2 Povinnosti

Při dodávání biocidních přípravků musí subjekty na vyžádání Ministerstva zdravotnictví poskytnout model nebo návrh balení, označení nebo příbalové informace. Dále zajistit, aby biocidní přípravek byl označen v českém jazyce včetně příbalových informací a aby byl klasifikován a balen dle článku 69 nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 528/20124 (dále jen nařízení), nejedná-li se o biocidní přípravek v přechodném období.

### 2.2.3 Povolování

Režimy uvádění biocidních přípravků na trh v ČR je možné na základě:

- Oznámení (§35)
- Povolení (§7)
- Vzájemného uznání povolení (§10)
- Dočasného povolení (§9)

Subjekty, které předkládají ministerstvu žádost o povolení biocidního přípravku nebo žádost o vzájemné uznání vnitrostátního povolení biocidního přípravku, předloží:

- žádost o povolení
- dokumentaci a listiny, které jsou součástí dokumentace
- souhrn vlastností biocidního přípravku v českém jazyce
- překlad povolení biocidního přípravku uděleného referenčním členským státem v českém jazyce, jde-li o žádost o následné vzájemné uznání vnitrostátního povolení biocidního přípravku.

## 2.2.4 Státní správa

Státní správu týkající se dodávání a používání biocidních přípravků a dodávání ošetřených předmětů vykonávají:

- Ministerstvo zdravotnictví
- Ministerstvo životního prostředí
- Ministerstvo zemědělství
- krajské hygienické stanice
- Česká inspekce životního prostředí
- orgány Celní správy České republiky (dále jen „celní správa“)
- Ministerstvo obrany
- Ministerstvo vnitra

### **Ministerstvo zdravotnictví**

Ministerstvo zdravotnictví je hlavním orgánem státní správy v oblasti biocidních přípravků. Rozhoduje o dočasném či úplném povolení biocidního přípravku nebo jeho zrušení a o podmínkách používání jednotlivých biocidů. Dále přijímá oznámení o uvedení na trh, rozhoduje o přijetí, omezení či zrušení omezení nebo zákazu dodávání nebo používání biocidů. Může přijmout prozatímní opatření ohledně povoleného biocidního přípravku za účelem ochrany zdraví lidí, zejména zranitelných skupin jako jsou těhotné ženy a děti, zdraví zvířat nebo životního prostředí.

Má pravomoc rozhodnout, zda bude povolen výzkum nebo vývoj zahrnující nepovolený biocidní přípravek či neschválenou účinnou látku.

Ministerstvo zdravotnictví má i informační povinnost, a to jak ve vztahu k Evropské komisi, žadatelům, ale i k veřejnosti. Veřejnosti předkládá informace o výhodách a rizicích jednotlivých biocidních přípravků a způsoby minimalizace jejich používání. Evropské komisi předkládá žádost o rozhodnutí, zda je látka biocidní přípravek a také žádost o přezkoumání schválení účinné látky.

Mezinárodně zastupuje Českou republiku v koordinační skupině, ve Výboru pro biocidní přípravky a ve Stálém výboru pro biocidní přípravky zřízeným nařízením o biocidech.

## **Ministerstvo životního prostředí**

Na základě žádosti Ministerstva zdravotnictví vydává závazné stanovisko z hlediska ochrany životního prostředí. Podává podněty ke změně či zrušení povolení biocidu, posuzuje žádosti o jejich povolení a provádí posouzení souhrnu vlastností biocidního přípravku. To se vztahuje i pro účely vzájemného uznání vnitrostátního povolení.

## **Ministerstvo zemědělství**

Na základě žádosti Ministerstva zdravotnictví vydává závazné stanovisko z hlediska ochrany zdraví zvířat. Stejně jako Ministerstvo životního prostředí podává podněty ke změně či zrušení povolení biocidu, posuzuje žádosti o jejich povolení a provádí posouzení souhrnu vlastností biocidního přípravku. To se vztahuje i pro účely vzájemného uznání vnitrostátního povolení.

## **Kontrolní orgány**

### Krajská hygienická stanice (KHS)

Kontroluje dodavatele, zda dodržuje zákon a nařízení o biocidech a ukládá pokuty za porušení. Dále zpracovává zprávy o provedených kontrolách, které předkládá Ministerstvu zdravotnictví.

### Česká inspekce životního prostředí (ČIŽP)

Kontroluje právnické a podnikající fyzické osoby, zda dodržují zákon a nařízení o biocidech a ukládá pokuty za porušení. Jako KHS také zpracovává zprávy o provedených kontrolách, které předkládá Ministerstvu zdravotnictví.

Dalšími orgány kontroly jsou Ministerstvo vnitra a Ministerstvo obrany.

## **Celní správa**

Celní správa má na starosti evidenci dovezených biocidních přípravků. Tuto evidenci předkládá každoročně Ministerstvu zdravotnictví. Rozhoduje, zda bude biocid vpuštěn do volného oběhu [7].

## **2.3 Aktuální situace**

Evropská komise 12. prosince 2017 obnovila schválení účinné látky glyfosát na období 5 let. Konec platnosti je 15. prosince 2022, a to pro veškeré užití této účinné látky. V České republice platí od 1. ledna 2019 omezení používání účinné látky glyfosátu. Toto omezení se týká desikování plodin, a to pouze těch, které jsou potenciálně určeny pro potravinářské účely, tzn. obiloviny a řepku. Desikace je proces extrémního vysušení, používá se k urychlení dozrávání.

## 3 TESTOVANÉ LÁTKY

### 3.1 Glyfosát

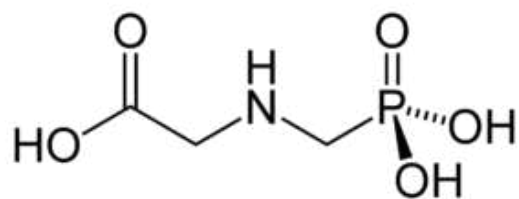
#### 3.1.1 Historie

Glyfosát byl objeven v roce 1950 švýcarským chemikem Henri Martinem ve farmaceutické společnosti Cilag. V roce 1964 si ho patentovala firma Stauffer Chemical jako chelatační činidlo, které je schopné vázat do komplexů prvky jako zinek, vápník, hořčík, měď či mangan. V tomto stádiu neměla látka žádný farmaceutický účinek, a to až do 70. let, kdy bylo zjištěno, že glyfosát má herbicidní účinek. Společnost Monsanto tehdy testovala různé sloučeniny jako potenciální změkčovadla vody, když zjistila, že dvě molekuly úzce spojené s glyfosátem měly určitou herbicidní účinnost proti vytrvalým plevelům. Chemik německého původu John E. Franz pak syntetizoval deriváty těchto dvou sloučenin a rychle zjistil, že glyfosát je silný herbicid, který byl následně patentován pod obchodním názvem "Roundup®" s patentovým číslem DE2152826, v americké variantě s patentovým číslem US3799758. Roundup® byl poprvé prodáván v Malajsii na ochranu kaučuku a ve Spojeném království na pšenici v roce 1974. První americký souhlas s průmyslovým použitím byl také v roce 1974. Po vypršení patentu v roce 2000 je glyfosát prodáván více než 40 společnostmi s různými obchodními názvy. Glyfosát je nyní registrován ve všech zemích Evropské unie, včetně Francie, Německa a Švédska. V roce 2010 byla v USA patentována směs glyfosátu a dikarboxylových kyselin jako prostředek proti výtrusovcům (Apicomplexa) [8].

#### 3.1.2 Fyzikální a chemické vlastnosti

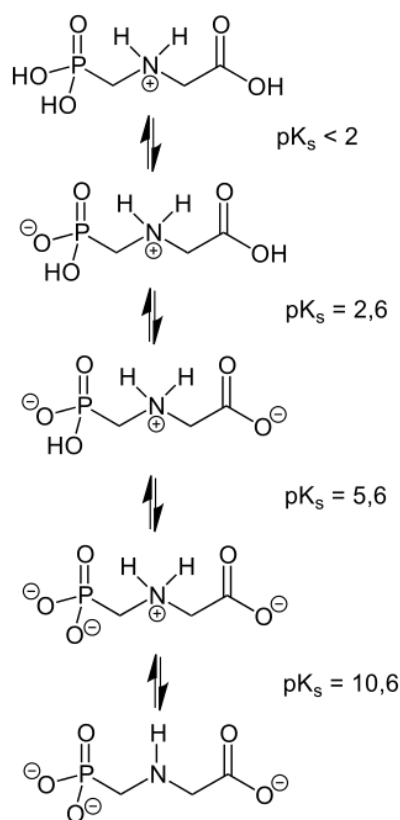
Glyfosát je krystalická bílá látka bez zápachu, jejímž základem je kyselina glyfosátová. To je organická kyselina, jejíž molekula se skládá z aminokyseliny glycinu a fosfonomethylové skupiny. Struktura glyfosátu je na obrázku 1. V přípravcích je přítomna ve formě solí, glyfosátů. Nejčastěji se jedná o sodné, amonné, isopropylaminové nebo trimethylsulfonové soli. Teplota tání glyfosátu je 184,5 °C [9], [10].





**Obrázek 1** - Struktura glyfosátu [11]

Glyfosát je aminofosfonový analog glycinů přírodních aminokyselin a stejně jako všechny aminokyseliny existuje v různých iontových stavech v závislosti na pH. Jak složky kyseliny fosforité, tak složky karboxylových kyselin mohou být ionizovány a aminová skupina může být protonována a látka existuje jako řada zwitterionů. Acidobazické formy a jejich pK jsou uvedeny na obrázku 2. V rozmezí pH 3 až 9 odolává hydrolyze a je relativně odolná vůči rozkladu na světlo. V přírodním prostředí se nehydrolyzuje a neoxiduje. Plamenem se rozkládá mj. za vzniku toxických oxidů fosforu a dusíku. Teplota rozkladu je 187 °C. Reaguje se železem a galvanizovanou ocelí a může vytvářet vysoce hořlavou nebo výbušnou směs plynů. Suchý prach rozptýlený ve vzduchu může být výbušný. Je to látka netěkavá. Glyfosát se dobře rozpouští ve vodě, v organických rozpouštědlech (aceton, ethanol, xylen atd.) je prakticky nerozpustný. Jeho rozpustnost ve vodě je 12 g/l při 25 °C. Hustota je 1,7 g/cm<sup>3</sup> [9], [10].



**Obrázek 2** - Acidobazické formy glyfosátu [12]

### 3.1.3 Mechanismus účinku

Glyfosát blokuje enzym 5-enolpyruvylshikimát-3-fosfát (EPSP) syntázu. Tento enzym je součástí shikimátové dráhy, pomocí níž vyšší rostliny, bakterie, houby a řasy syntetizují pro život nezbytné aminokyseliny tyrosin, fenylalanin a tryptofan. Tato metabolická dráha se nevyskytuje u živočichů. Vzhledem k této skutečnosti je akutní toxicita u živočichů nízká [13].

### 3.1.4 Toxikologické vlastnosti

Z hlediska klasifikace karcinogenity dle organizace EPA (Environmental Protection Agency), má glyfosát označení D – není klasifikovatelný, pokud jde o lidskou karcinogenitu. Základem jsou nedostatečné důkazy o karcinogenitě u zvířat. Původně byl v roce 1985 glyfosát klasifikován jako C – možný karcinogen; a to na základě zvýšeného výskytu nádorů ledvin u myši. Po přezkoumání v roce 1991 byla klasifikace změněna na D v důsledku nedostatku statistické významnosti a nejistoty ohledně účinku souvisejícím s onemocněním [14], [15].

Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) byl klasifikován jako pravděpodobně karcinogenní pro člověka (skupina 2A) [15]. Silně dráždí oči a dýchací cesty a lehce pokožku [16].

Hodnocení IARC je předmětem mnoha kontroverzí. Nyní existuje 16 studií genotoxicity na hlodavcích a pouze ve dvou případech vyšly pozitivně. Obě tyto studie byly prováděny mimo systém správné laboratorní praxe. Toxická látka byla podávána intraperitoneálně (injekčně do břicha) a obě využívaly nesmyslně vysoké koncentrace látky. Žádný genotoxický efekt se neprojevil u myši ani potkanů, jímž byla orálně podávána dávka glyfosátu až 2000 mg/kg (průměrný příjem glyfosátu z potravy u občanů EU je 0,05 mg/kg/den). V analýze z roku 2016 byla nalezena slabá, statisticky téměř nevýznamná souvislost mezi expozicí glyfosátem a rizikem vzniku non-Hodgkinova lymfomu, v případě ostatních typů nádorových onemocnění žádná asociace nalezena nebyla [17].

Bylo zjištěno, že směsi glyfosátu a surfaktantu TN-20 zhoršují poškození mitochondrií a indukují apoptózu a nekrózu. Během tohoto procesu se zdá, že TN-20 naruší integritu buněčné bariéry vůči vychytávání glyfosátu, což podporuje toxicitu zprostředkovanou glyfosátem. Komerční formulace byla více cytotoxická než samotná účinná složka, což podpořilo koncepci, že přísady v komerčních formulacích hrají roli v toxicitě připisované glyfosátovým herbicidům [18].

V tabulce 1 jsou uvedeny hodnoty letálních dávek (koncentrací) pro jednotlivé druhy živočichů a hodnota efektivní koncentrace pro dafnie.

**Tabulka 1** - Toxikologické hodnoty pro jednotlivé druhy živočichů [19], [20], [21], [22]

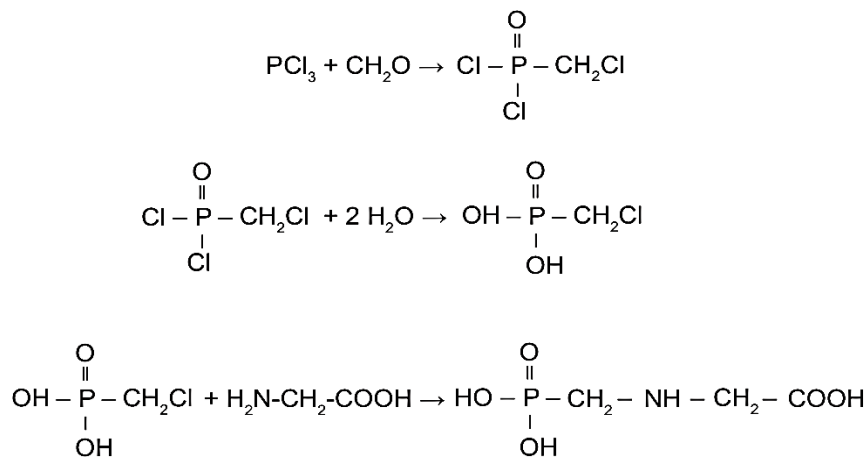
Druh zvířete – způsob podání	Hodnota LD <sub>50</sub> [mg/kg], LC <sub>50</sub> (EC <sub>50</sub> ) [mg/l]
Potkan – inhalačně	LC <sub>50</sub> > 4,98 (vzduchu; proudil 4 hodiny)
Koza – orálně	LD <sub>50</sub> = 3530
Myš – orálně	LD <sub>50</sub> = 1568
Králík – orálně	LD <sub>50</sub> = 3800
Daphnia magna	EC <sub>50</sub> = 134

Přepočítání letální dávky pro člověka by tedy vycházelo na 946 mg/kg pro člověka s hmotností 70 kg při použití koncentrace 360 g/l volného glyfosátu, což je koncentrace v herbicidu Roundup [23].

Dosavadní studie vlivu na zdraví člověka neprokázaly, že by glyfosát způsoboval akutní či chronickou toxicitu v koncentracích, které se nacházejí v konzumovaných potravinách či pitné vodě. Ovšem neznamená to, že nemohou být dalším výzkumem tyto vlivy objeveny.

### 3.1.5 Výroba

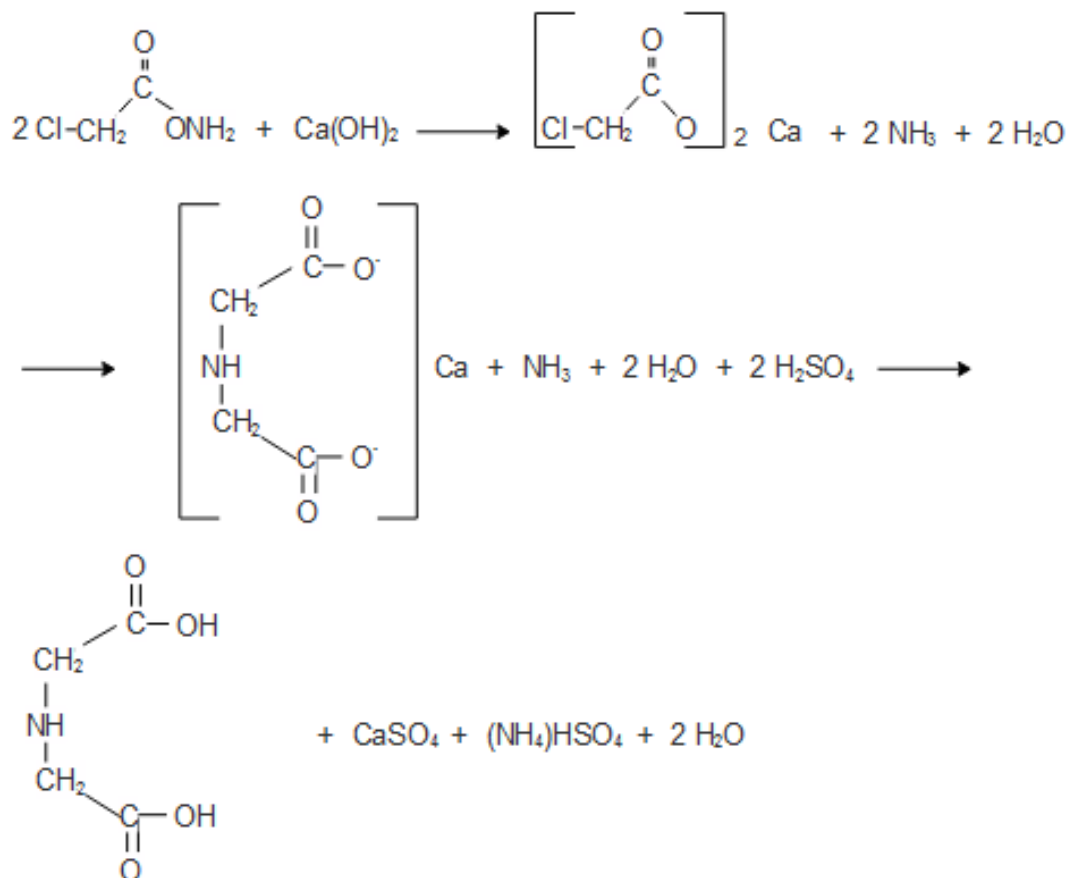
Původní postup výroby glyfosátu zahrnoval reakci chloridu fosforitého s formaldehydem a následnou hydrolýzou za vzniku fosfonátu. Glycin pak reaguje s tímto fosfonátem, čímž se získá glyfosát a jeho název je považován za kontrakci sloučenin používaných v této syntéze – **glycin a fosfonát**. Rovnice výroby jsou uvedeny na obrázku 3.



**Obrázek 3** - Původní postup výroby glyfosátu [24]

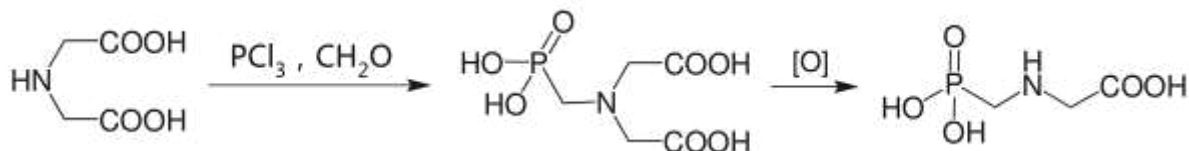
Pro průmyslovou syntézu glyfosátu jsou používány dva hlavní postupy.

V prvním postupu se nejprve připraví kyselina iminodioctová reakcí chloracetamidu s hydroxidem vápenatým a následně s amoniakem za vzniku iminodiacetátové soli vápníku a následného okyselování produktu (obrázek 4).



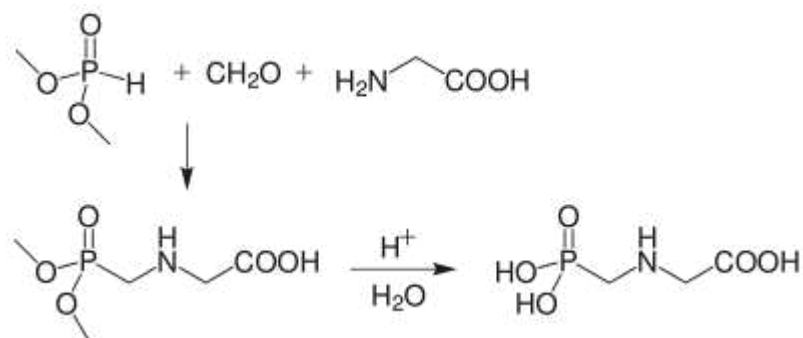
**Obrázek 4** - Výroba kyseliny iminodioctové [25]

Kyselina iminodioctová poté reaguje s kyselinou fosforitou a kyselinou chlorovodíkovou (někdy se vytváří in-situ přidáním chloridu fosforitého) modifikovanou Mannichovou reakcí. Oxidací pak vzniká glyfosát (obrázek 5) [26].



**Obrázek 5** - Syntéza glyfosátu z kyseliny iminodioctové [25]

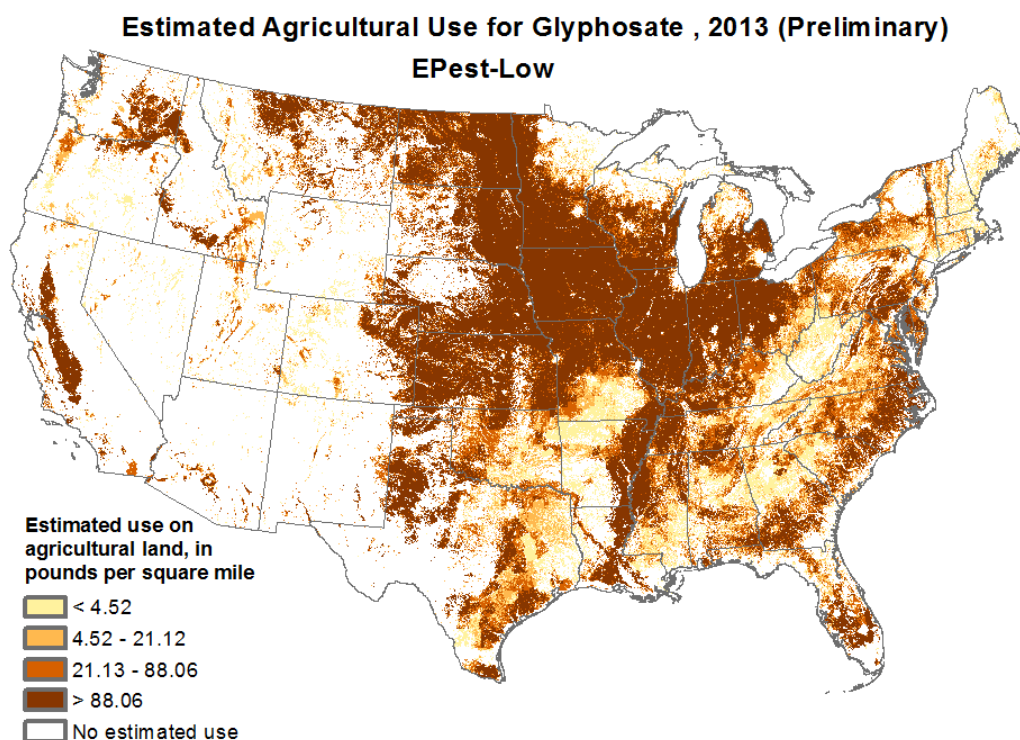
V druhém postupu reaguje dimethylfosfit s glycinem a paraformaldehydem ve vhodném organickém rozpouštědle (obvykle triethylamin a methanol) za vzniku N-hydroxymethylglyfosát-fosfodimethyl esteru, který okyselením kyselinou chlorovodíkovou poskytuje glyfosát. Tato reakce je popsána na obrázku 6. Tímto postupem se vyrábí podstatná část glyfosátu v Číně [26].



**Obrázek 6** - Syntéza glyfosátu z dimethylfosfitu [27]

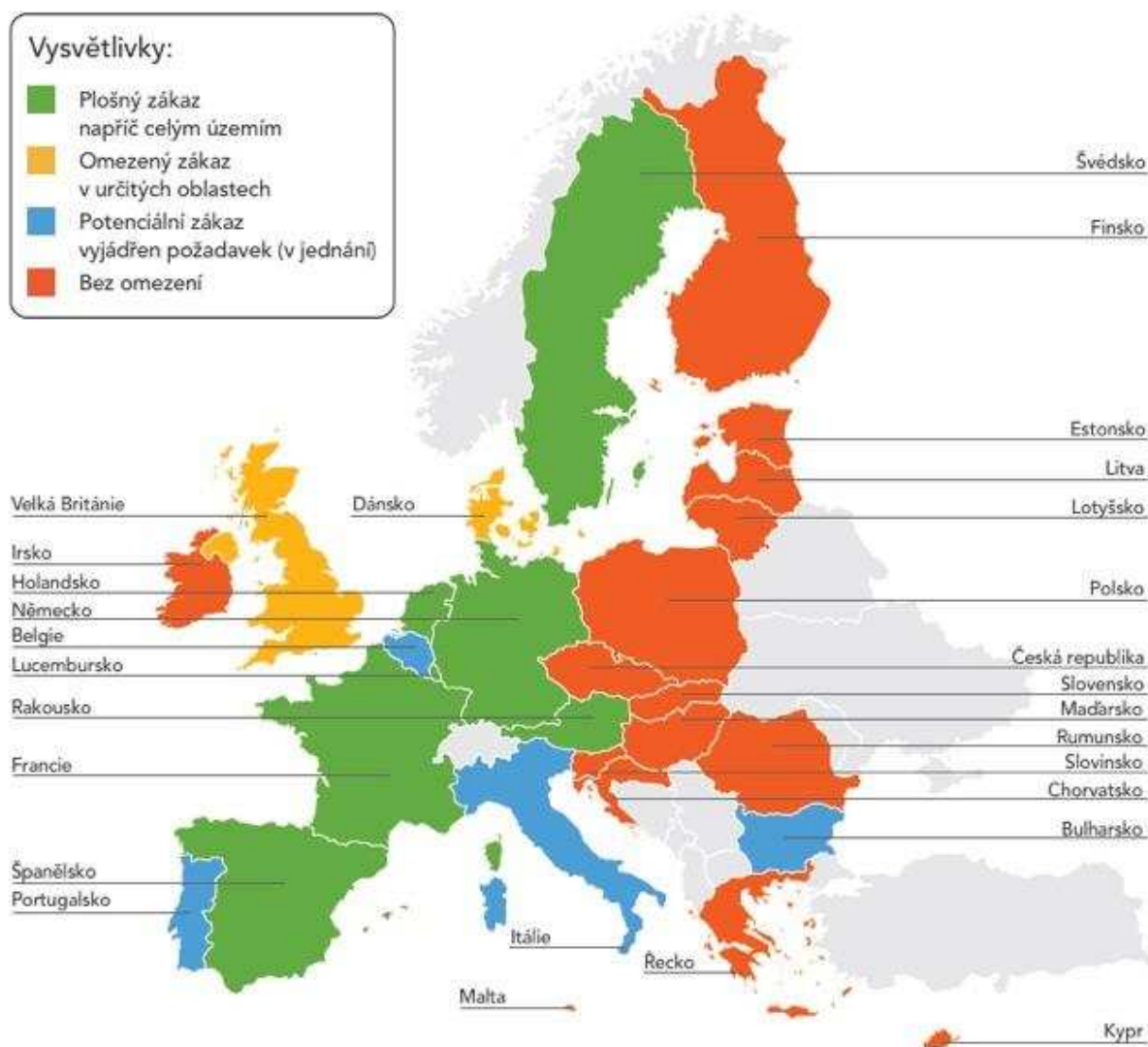
### 3.1.6 Použití

Glyfosát je účinnou látkou celé řady herbicidů, z nichž nejznámější je Roundup. Je používán k odstraňování nejen plevelů a travin, ale i keřů a jiných dřevin, které jsou nežádoucí. Má využití jak v zahradách, tak ve velkoobjemové zemědělské výrobě. V zemědělství se ovšem nepoužívá pouze k hubení plevelů, ale i na defoliaci, urychlení zrání a sušení. Účinek je pozorovatelný do 7 dní, kdy se sleduje vadnutí rostliny, odumírat může i dva týdny, záleží na okolní teplotě a přítomnosti vody. Ideální teplota se pohybuje mezi 10 a 25 °C, při dlouhodobém suchu se může herbicidní účinek zastavit a déšť do 6 hodin od aplikace přípravků smyje. Na obrázku 7 je zobrazena mapa užití herbicidů na bázi glyfosátu v USA v roce 2013. Nejvíce zastoupená tmavě hnědá barva vyjadřuje množství větší než 0,15 kg/ha. Pro srovnání bylo v České republice použito 935 000 l glyfosátu, což při rozloze zemědělské plochy odpovídá přibližně 0,08 kg/ha.



**Obrázek 7** - Použití glyfosátu v USA v roce 2013 [28]

Oproti tomu můžeme na obrázku 8 je mapa zemí Evropské unie, kde je použití glyfosátových herbicidů zakázáno.



**Obrázek 8** - Použití glyfosátu v Evropě [29]

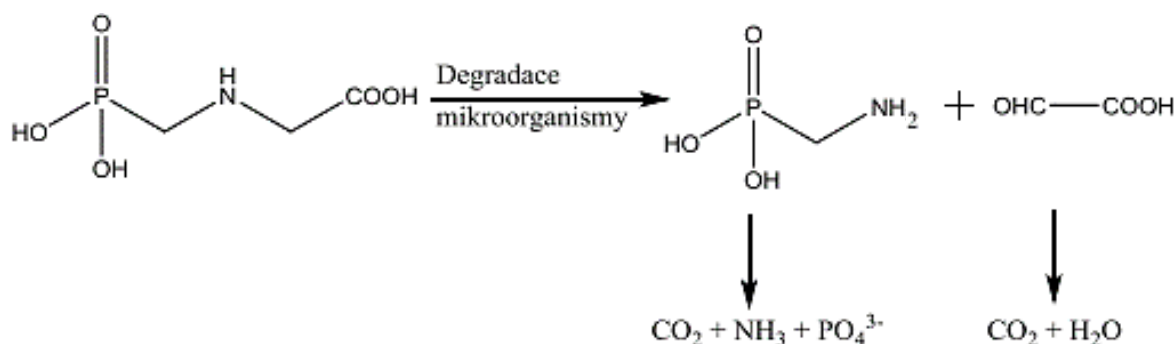
V České republice se používají přípravky s účinnou látkou glyfosátem pro desikaci. Desikant je látka která vyvolává vysušení nebo mu napomáhá. Používá se k urychlení dozrání plodin nebo k jejich dosušení před sklizní. Aplikuje se přibližně 2-3 týdny před sklizní. Využívá se na řepku, brambory, mák, slunečnici či hrách [30].

### 3.1.7 Vliv na životní prostředí

Glyfosát je obecně méně perzistentní ve vodním než v půdním prostředí, je silně vázán na půdu. Ve chvíli, kdy se dostane do kontaktu s půdou, není mobilní, ale je rychle navazován půdními hlinitými částicemi a inaktivován. V půdě je glyfosát rozkládán půdními organismy, přičemž

vstřebávání glyfosátu se liší mj. v závislosti na druhu půdy. Obvykle mají půdní rezidua této látky dobu rozkladu méně než 60 dní např. glyfosát v hlinitých půdách se za letních podmínek rozloží obvykle za 20-30 dní.

Rozklad glyfosátu probíhá především za aerobních podmínek, za anaerobních je rozklad pomalejší. Hlavním produktem rozkladu glyfosátu je kyselina aminomethylfosfonová (AMPA), která se nachází v životním prostředí ve větších koncentracích než glyfosát. Vzniká jeho degradací mikroorganismy v půdě nebo povrchových vodách. AMPA se dále rozkládá na  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$  a anorganické fosfáty. Dalším produktem degradace je glyoxalát, který podléhá dalšímu rozkladu na oxid uhličitý a vodu [31], [32]. Na obrázku 9 je rovnice rozkladu glyfosátu na AMPA a její další rozklad.



**Obrázek 9** - Degradace glyfosátu a AMPA [33]

Pokud se glyfosát dostane do vody, tak se opět silně adsorbuje na sedimenty a částice ve vodě. Může také tvořit nerozpustné komplexy s kovovými ionty a sraženinou. Po postřiku glyfosátem a prvním dešti vzrostly hodnoty po 27 hodinách po aplikaci a klesly pod mez detekce po 96 hodinách. Poločas rozpadu v rybnících je 1,5-2 dny, pod mezi detekce 38. den. Rybník, ve kterém glyfosát měl nejdelší poločas, měl o hodně vyšší koncentrace vápníku a hořčíku než ostatní rybníky [34].

Limit pro obsah glyfosátu v pitné vodě je 0,1  $\mu\text{g/l}$  a obsah všech pesticidů nesmí překročit 0,5  $\mu\text{g/l}$  [35].

AMPA se vyskytuje častěji v lidské moči, ale glyfosát najdeme nejčastěji v mateřském mléce a ve tkáních zvířat. Studie, prováděná organizací Friends of Earth Europe analyzovala 182 dobrovolníků v rámci 18 zemí Evropské unie. U 80 dobrovolníků byl zjištěn glyfosát v těle o průměrné hodnotě 0,21  $\mu\text{g/l}$ , s nejvyšší koncentrací 1,82  $\mu\text{g/l}$ . AMPA byla přítomna v moči u 65 osob s průměrnou hodnotou 0,18  $\mu\text{g/l}$ , s nejvyšší koncentrací 2,63  $\mu\text{g/l}$ . V porovnání se vzorky ze Spojených států amerických, vykazují vzorky moči 8× vyšší koncentraci látek než



u evropské populace. Ve vzorcích mateřského mléka od amerických matek byla koncentrace glyfosátu 76-166 µg/l. Což je v porovnání s limitem pro pitnou vodu hodnota 760-1600× vyšší [36].

Glyfosát či jeho metabolity se do našeho těla ale mohou dostat jiným způsobem, než je konzumace potravin. University of La Plata, Argentina, provedla analýzu tamponů, hygienických vložek a sterilní gázy. U 85 % vzorků byl zjištěn obsah glyfosátu a u 62 % obsah AMPY. V případě bavlny a sterilní bavlněné gázy to ovšem bylo u 100 % vzorků. V extraktu bavlny byl obsah AMPA 39 µg/l a obsah glyfosátu 13 µg/l, zatím co u gázy byl obsah glyfosátu 17 µg/l, obsah AMPA zde prokázán nebyl [37].

## 3.2 Roundup KLASIK PRO

### 3.2.1 Fyzikální a chemické vlastnosti

Je to nejznámější herbicid na bázi glyfosátu. Jedná se o směs draselné soli glyfosátu a ether alkylamin ethoxylátu. Je to nažloutlá jantarová kapalina s mírným aminovým zápachem. Není těkavý ani hořlavý a ve vodě je zcela rozpustný. Reaguje s pozinkovanou ocelí nebo nevytvorovanou měkkou ocelí a vytváří vodík, extrémně hořlavý plyn, který by mohl vybuchnout. V roce 2007 to byl druhý nejpoužívanější herbicid na světě [38].

### 3.2.2 Toxicita

Může dojít k podráždění kůže nebo očních sliznic. Může způsobit podráždění dýchacích cest. Expozice může zahrnovat nevolnost, zvracení či průjem. Příklady hodnot toxicity u některých organismů jsou uvedeny v tabulce 2.

**Tabulka 2** - Ekotoxikologické hodnoty pro Roundup [38]

<b>Druh organismu</b>	<b>Doba působení</b>	<b>Hodnota LC<sub>50</sub> (EC<sub>50</sub>) [mg/l] LD<sub>50</sub> [g/kg]</b>
Pstruh duhový <i>Oncorhynchus mykiss</i>	96 hodin	LC <sub>50</sub> = 28
Hrotnatka velká <i>Daphnia magna</i>	48 hodiny	EC <sub>50</sub> = 69
Zelená řasa <i>Selenastrum capricornutum</i>	72 hodiny	E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> (rychlost růstu) = 14
Potkan <i>Rattus norvegicus</i>	orálně	LD <sub>50</sub> = 10

### 3.2.3 Použití

Kromě použití na likvidaci nežádoucích plevelů se v zemědělství používá hlavně na desikaci plodin. Pro správné použití je nutno sledovat stupeň zralosti šesulí ve středním patře porostu, kdy zhruba 2/3 šesulí by měly mít 2/3 semen nahnědlých. Pokud je většina semen zelených, je třeba s desikací počkat. A naopak, pokud jsou téměř všechna semena ve středním patře již černá, je na desikaci Roundupem Rapid pozdě. Podle současné legislativy jej nelze používat v ochranném pásmu vod II. stupně [30].

### 3.2.4 „Roundup ready“ plodiny

Na počátku 90. let 20. století objevila firma Monsanto v půdě své továrny kmen bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, které se díky dlouhodobému vystavení glyfosátu staly vůči němu rezistentní. Z bakterií byl izolován gen enzymu EPSP syntázy, který byl vložen do některých zemědělských plodin, jako například sója, řepka olejná, kukuřice či vojtěška. Tyto rostliny jsou potom vůči Roundupu odolné a ten pak zahubí pouze nechtěnou vegetaci. Rostliny rezistentní vůči Roundupu se označují jako „Roundup ready“ a tvoří většinu výměry oseté geneticky modifikovanými plodinami [26].

Masivní používání glyfosátu a GM plodin vůči němu odolných zřejmě vede k rozšiřování rezistentních plevelů. Do roku 2009 bylo nalezeno již 15 druhů rezistentních plevelů [39].

## 4 METODIKA TESTOVÁNÍ

### 4.1 Zkouška inhibice dýchání aktivovaného kalu

Zkušební metoda C.11 dle Nařízení Komise (ES) č. 440/2008 je ekvivalentní testu OECD č. 209 „Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation)“. Měří se rychlost respirace vzorků aktivovaného kalu živěného syntetickou odpadní vodou v uzavřené buňce obsahující kyslíkovou elektrodu po době kontaktu 3 hodiny. Cílem je stanovení hodnoty EC<sub>50</sub>.

#### 4.1.1 Testovací organismus

Testovacím organismem byl aktivovaný kal, což je suspendovaná směs mikroorganismů (např. bakterie, prvoci či hlístice), organických a anorganických látek. Kal pocházel z II. stupně aktivace BČOV Pardubice – Rybitví. Odpadní voda zpracovaná touto čistírnou odpadních vod je převážně obecní.

#### 4.1.2 Příprava testu

##### **Příprava inokula**

Aktivovaný kal byl odebrán dva dny před testem. Po půlhodinové sedimentaci byla vodná vrstva slita a kal byl rozdělen po 500 ml do válců o objemu 2000 ml. Objem byl doplněn pitnou vodou a kal byl 3× promyt. Půl hodiny byl kal provzdušňován a půl hodiny probíhala sedimentace.

##### **Kondicionace syntetickou odpadní vodou**

Ke kalu bylo přidáno 100 ml syntetické odpadní vody, jejíž složení je uvedeno v tabulce 3, byl doplněn vodou a byl provzdušňován. Poté byl kal opět 3× promyt vodou a po sedimentaci bylo odebráno 2× 10 ml suspenze kalu na stanovení sušiny. Pak bylo opět přidáno po 100 ml syntetické odpadní vody, doplněno na objem a provzdušňováno.

**Tabulka 3** - Složení syntetické odpadní vody

Látka	Množství [g]
Pepton	8,0
Masový extrakt	5,5
Močovina	1,5
NaCl	0,35
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,1
CaCl×2H <sub>2</sub> O	0,2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,4

### Příprava a výpočet sušiny aktivovaného kalu

Koncentrace suspendovaných látek byla stanovena sušením do konstantní hmotnosti při teplotě 105 °C.

**Tabulka 4** - Hodnoty pro výpočet průměrné hmotnosti sušiny

	Vzorek 1	Vzorek 2
Objem vzorku	10 ml	10 ml
Hmotnost kelímku [mg]	27,53	28,11
Hmotnost vzorku [mg]	27,40	27,98
Hmotnost sušiny [mg]	0,13	0,13
Průměrná hmotnost sušiny: 0,1300 g/10 ml = <b>13 g/l</b>		

### Objem kalu pro zkušební suspenzi

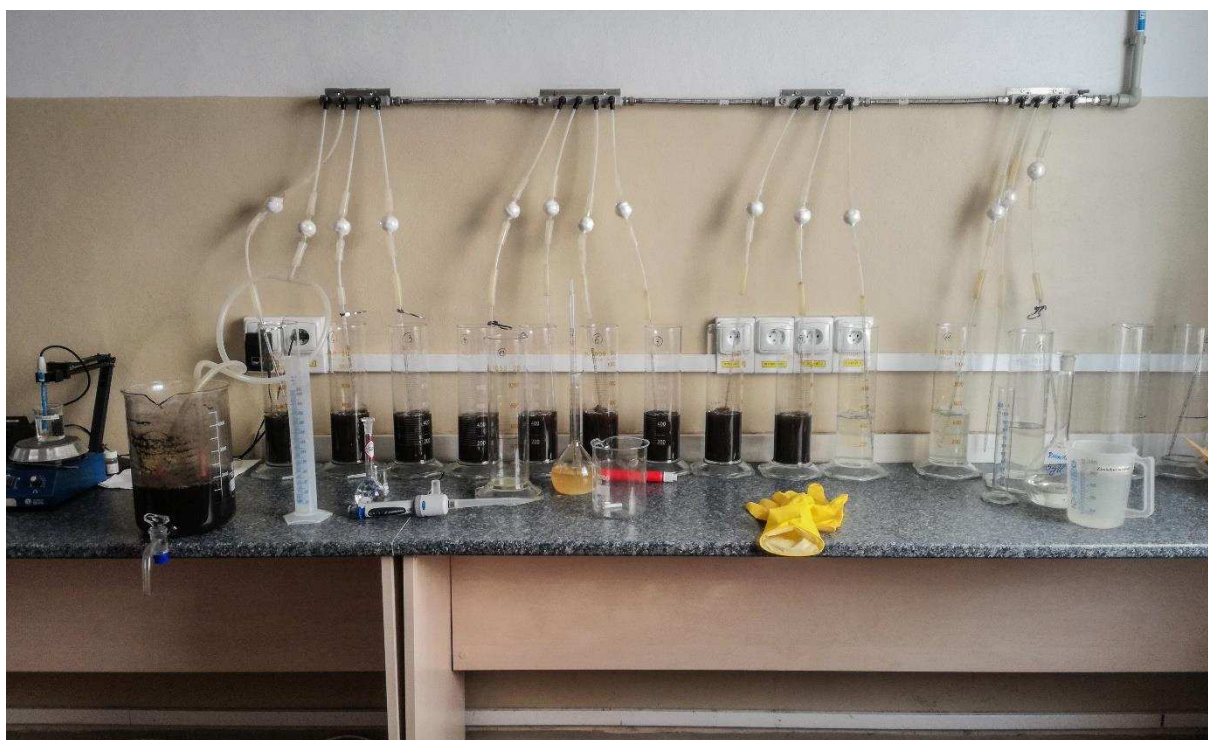
Požadovaná koncentrace kalu: 3000 mg/l  $3000 \div 13 = \mathbf{231 \text{ ml/l}}$

Kal byl 3× promyt vodou a ze suspenze po sedimentaci byla připravena zkušební suspenze. Výpočtem bylo zjištěno, že na 4 l zkušební suspenze bude třeba 924 ml kalu. Ten byl doplněn do 4 l vodou. Hodnota pH byla upravena na 6,0.

Kal musí být udržován za aerobních podmínek a nejdéle do 48 h od odběru na čistírně se musí použít k testu.

### 4.1.3 Průběh testu

Do testovacích nádob, v tomto případě odměrných válců, bylo odměřeno 250 ml aktivovaného kalu, 16 ml syntetické odpadní vody a definovaný objem zásobního roztoku testované látky. Tato směs byla doplněna na 500 ml destilovanou vodou a bylo změřeno pH. Poté byla směs provzdušňována 3 hodiny. Testovací aparatura je na obrázku 10. Tento postup se opakuje v 15minutových intervalech s různými objemy zásobního roztoku zkoušené látky či referenční látky. Jako referenční látka byl použit 3,5-dichlorfenol. První se připravuje kontrolní nádoba a druhá kontrola se připravuje nakonec. Po ukončení provzdušňování bylo opět změřeno pH a také obsah kyslíku. Dobře promíchaný vzorek se převede do měřicí aparatury a 10 minut po ukončení provzdušňování se měří koncentrace kyslíku. Vypočítá se rychlost respirace. Z té se poté vypočítá hodnota  $EC_{50}$  pro testovanou a referenční látku.



**Obrázek 10** - Testovací aparatura inhibice aktivovaného kalu [40]

### 4.1.4 Přístroje a zařízení

- kyslíkové nádoby (BSK láhve) o objemu asi 280 ml pro měření koncentrace kyslíku
- odměrné válce o objemu 1000 ml
- analytické váhy AG 135 (Mettler Toledo)
- analytické váhy Kern 870-15
- oxymetr WTW Inolab OXI 730 s membránovou sondou CelloX 325 a s tiskárnou

- míchací adaptér pro elektrodu
- pH metr WTW – pH 539 s pH-elektrodou WTW SenTix 81 s teplotní sondou
- magnetická míchadla
- provzdušňovaný přístroj se skleněnými konci (tlakový vzduch je veden přes pachový a olejový filtr)
- klimatizovaná laboratoř, bez prachu, s automatickým záznamem teploty
- společné laboratorní vybavení (pipety, kádinky, odměrné válce, odměrné baňky a další)

#### 4.1.5 Zkušební podmínky

Teplota:	20 ° C
Doba expozice:	3 hodiny
Osvětlení:	denní
Míchání a provzdušňování:	filtrovaným tlakovým vzduchem
Hodnota pH reakčních směsí:	cca 7-8

#### 4.1.6 Výpočty

K výpočtům byly použity programy MS Excel a ToxRatPro Version 3.2.1.

Rychlost spotřeby kyslíku pro každou koncentraci a kontrolu (rychlost dýchání, R) byla vypočtena z lineárních částí grafů zaznamenávajících pokles koncentrace kyslíku mezi cca 7,0 a 2,0 mg/l pomocí následujícího vzorce:

$$R = \frac{Q_1 - Q_2}{t_2 - t_1} \times 60 \quad (1)$$

kde:

R..... rychlost respirace reakční směsi [mg/l/h]

Q<sub>1</sub> ..... koncentrace kyslíku na začátku vybraného úseku lineární fáze [mg/l]

Q<sub>2</sub> ..... koncentrace kyslíku na konci vybraného úseku lineární fáze [mg/l]

t<sub>2</sub>-t<sub>1</sub> ..... časový interval mezi těmito dvěma měřeními [min]

Z těchto hodnot byla vypočtena inhibice spotřeby kyslíku pro každou koncentraci testované látky a referenční látky pomocí vzorce (2):

$$I_T = \left[ 1 - \frac{(R_T - R_{TA})}{R_{TB}} \right] \times 100 \quad (2)$$

kde:

$I_T$  ..... inhibice celkové spotřeby kyslíku [%]

$R_T$  ..... rychlost spotřeby kyslíku kontrolou [mg/l/h]

$R_{TA}$  ..... rychlost spotřeby kyslíku v důsledku abiotických procesů

$R_{TB}$  ..... průměrná rychlost založená na slepém testu [mg/l/h]

Specifická rychlost dýchání ( $R_S$ ) je vyjádřena jako množství spotřebovaného kyslíku na gram suché hmotnosti kalu za hodinu [mg/g/h] podle vzorce (3):

$$R_S = \frac{R}{SS} \quad (3)$$

kde:

$R$ ..... rychlost respirace reakční směsi [mg/l/h]

$SS$ ..... koncentrace suspendovaných látek v testované směsi [g/l]

#### 4.1.7 Platnost zkoušky

Zkouška je platná při splnění následujících podmínek:

1. Respirační rychlost slepého vzorku kyslíku by neměla být nižší než 20 mg/g/h.
2. Variační koeficient rychlosti příjmu kyslíku v kontrolních replikách by neměl být na konci zkoušky větší než 30 %.
3. Hodnota  $EC_{50}$  referenční látky, 3,5-dichlorfenolu, by měla být v rozmezí 2-25 mg/l pro úplné dýchání.

## 4.2 Zkouška akutní imobilizace dafnií (*Daphnia* sp.)

Zkušební metoda C.2 dle Nařízení Komise (ES) č. 440/2008 je ekvivalentní testu OECD č. 202 „*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test“. Je to test akutní toxicity ke stanovení účinku chemických látek na dafnie.

Účelem zkoušky je stanovení akutní toxicity jako zjevného nežádoucího účinku, který v testovaném organismu vyvolá testovaná látka během krátkodobého působení a zjištění hodnoty EC<sub>50</sub>.

Dafnie byly vystaveny účinku různých koncentrací testované látky ve vodě po dobu 48 hod. Akutní toxicita byla sledována jako imobilizace dafnií po 24 a 48 hodinách. Za imobilizované (neschopné plavání) se považují dafnie, které nejsou schopné do 15 sekund po lehkém zatřepání testovací kádinkou začít plavat.

**EC<sub>50</sub>** koncentrace, která během nepřetržité expozice po určitou stanovenou dobu imobilizuje 50 % dafnií ve zkušební skupině během doby expozice

### 4.2.1 Testovací organismus

Testovacím organismem byla *Daphnia magna* Straus. Dafnie jsou druhem vodních korýšů, který žije ve sladkých a brakických (do 8 ppt salinity) vodách. Ideální teplota se pohybuje okolo 20 °C. U nás jsou jejím typickým stanovištěm silně eutrofní rybníky.

*Daphnia magna* byla získána acyklickou partenogenezí z vlastního laboratorního chovu Toxily ve VÚOS.

Pro získání jedinců ke zkouškám byly gravidní samice přeloveny do zřed'ovací vody a narozené dafnie byly do 24 hodin odseparovány do manipulační nádoby se zřed'ovací vodou. Odtud byly dafnie odpočítány do testu. Dospělou gravidní samici a mládě lze vidět na obrázku 11.





**Obrázek 11** - Dospělá gravidní dafnie a mládě používané k testování [41]

#### 4.2.2 Příprava testu

Přibližně 48 hodin před začátkem zkoušky byly dafnie s vajíčky přeloveny do aklimatizační nádrže se zřed'ovací vodou. K testu byly použity dafnie stáří maximálně 24 hodin. U zřed'ovací vody se kontroluje hodnota pH, obsah kyslíku a její tvrdost. Složení zřed'ovací vody je uvedeno v tabulce 5.

#### **Stanovení tvrdosti vody**

Tvrdost se stanovovala titračně. Do 20 ml zřed'ovací vody byly přidány 4 ml tlumivého roztoku ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , chelatonát hořečnatodisodný), lžička eriochromové černi a směs byla doplněna na 50 ml destilovanou vodou. Titrovalo se pomocí  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  z růžové do modrofialové.

**Tabulka 5** - Složení zřed'ovací vody

Látka	Množství [g] v 500 ml zásobního roztoku	Objem [ml] v 1 litru vody
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	58,80	2,5
KCl	1,15	2,5
$\text{NaHCO}_3$	12,95	2,5
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	24,65	2,5

### 4.2.3 Průběh testu

Do kádinek byly připraveny testované roztoky ředěné zřed'ovací vodou a pomocí sítka a pipety byly vneseny dafnie. Testovací nádoby byly zakryty proti vniknutí nečistot. Zkouška trvá 48 hodin. Po 24 a 48 hodinách je zkontrolován počet imobilizovaných dafnií. Na počátku a na konci zkoušky bylo změřeno pH a obsah kyslíku u všech testovaných koncentrací.

### 4.2.4 Přístroje a zařízení

- oxymetr WTW Inolab OXI 730 s membránovou sondou CellOx 325
- pH metr WTW – pH 539
- konduktometr FE 30
- analytické váhy AG 135 (Mettler Toledo)
- zařízení pro úpravu vody Goro
- zařízení k udržování a kontrole teploty ve zkušebním prostoru
- kádinky, odměrné baňky, pipety

### 4.2.5 Zkušební podmínky

Teplota:	20 ± 2 °C
Délka expozice:	48 hodin
Osvětlení:	přirozené střídání denního světla a tmy
Objem zkoušeného roztoku:	50 ml (nejméně 2 ml na jedince)
Počet testovacích organismů:	20 ks pro každou koncentraci a kontrolu
Koncentrace rozpuštěného kyslíku:	vyšší než 3 mg/l
- Bez krmení	
- Bez aerace	

### 4.2.6 Platnost zkoušky

Zkouška je platná při splnění následujících podmínek:

1. Imobilizace dafnií v kontrolních skupinách nesmí být na konci zkoušky větší než 10 %.
2. Koncentrace rozpuštěného kyslíku na konci zkoušky není menší než 3 mg/l.

### 4.3 Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas a sinic

Zkušební metoda C.3 dle Nařízení Komise (ES) č. 440/2008 je ekvivalentní testu OECD č. 201 „Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test“. Je to test akutní toxicity ke stanovení účinku chemických látek na řasy a sinice. Testované koncentrace s řasovou kulturou se kultivují 72 hodin. Cílem je stanovení hodnoty  $E_rC_{50}$ .

**EC<sub>50</sub>** koncentrace testované látky rozpuštěné ve zkušebním médiu, která pro danou expoziční dobu vede k 50% snížení růstu testovacího organismu

Pro jednoznačný popis hodnoty EC odvozené z růstové rychlosti (growth rate) nebo z výtěžku (yield) se v příslušných případech používají symboly  $E_rC_{50}$  a  $E_yC_{50}$ .

#### 4.3.1 Testovací organismus

Pro tento test byla použita zelená řasa *Desmodesmus subspicatus* Brinkmann 1953/SAG 86 ze sbírky autotrofních organismů Botanického ústavu AV ČR (obrázek 12). Tato řasa je velmi rozšířená, žije obzvláště ve vodách s nízkým obsahem živin, díky čemuž může *Desmodesmus* sloužit jako bioindikátor vodních ploch.



Obrázek 12 - *Desmodesmus subspicatus* [42]

### 4.3.2 Přístrojové vybavení

- zařízení k udržování a kontrole teploty ve zkušebním prostoru
- rampa se zářivkami (typ zářivky: Philips TLD 36 W/33, bílé světlo, příkon 36 watt)
- mikroskop
- Erlenmeyerovy baňky se zátkami propouštějícími vzduch
- Bürkerova počítací komůrka
- sterilizátor
- filtrační aparatura a mikrofiltry 0,2  $\mu\text{m}$
- laboratorní třepačka SM 30A (Edmund Bühler GmbH)
- pH metr WTW – pH 539
- konduktometr FE 30
- luxmetr TESTO 540
- analytické váhy Mettler AG135
- zařízení pro úpravu vody Goro
- kádinky, odměrné baňky, pipety

#### **Bürkerova komůrka**

Princip počítací metody dle Bürkera je založen na počítání buněk v komůrce pod krycím sklíčkem za použití fluorescenčního mikroskopu. Přikrytím krycího sklíčka na Bürkerově komůrce vzniká vrstvička vody o výšce 0,1  $\mu\text{m}$ . Na dně Bürkerovy komůrky je vyrytá síť čtverců, která rozděluje plochu dna komůrky na 144 čtverců o ploše jednoho čtverce 0,04  $\text{mm}^2$ . V Bürkerově komůrce se počítají všechny buňky uvnitř čtverce a buňky, které se dotýkají zevnitř nebo zvenčí horní a pravé strany, ostatní buňky, které se dotýkají spodní a levé strany se nepočítají.

### 4.3.3 Příprava testu

Jako první bylo připraveno zkušební médium, jehož složení je uvedeno v tabulce 6. Do něj byla naočkována inokulační kultura řas, která se nechala 3 dny před zahájením testování narůst. Po dokončení inkubace byla vypočtena počáteční koncentrace biomasy. U zkušebního média je podmínkou hodnota pH, která se musí rovnat 8,1.

**Tabulka 6 - Složení zkušebního média**

	Množství v zásobním roztoku		Objem [ml] v 1 litru vody
	Látka	Obsah [mg] v 1 litru	
<b>Živiny</b>	NH <sub>4</sub> Cl	1,5	10
	MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	1,2	
	CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O	1,8	
	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	1,5	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16	
<b>Fe – EDTA</b>	FeCl <sub>3</sub> ×6H <sub>2</sub> O	0,064	1
	Na <sub>2</sub> EDTA×2H <sub>2</sub> O	0,1	
<b>Stopové prvky</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,185	1
	MnCl <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> O	0,415	
	ZnCl <sub>2</sub>	0,003	
	CoCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	0,0015	
	CuCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O	0,00001	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	0,007	
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	NaHCO <sub>3</sub>	50	1

#### 4.3.4 Průběh testu

Do Erlenmeyerových baněk byly připraveny testované roztoky, které byly ředěné zkušebním médiem a poté do nich byla naočkována exponenciálně rostoucí řasová kultura. Baňky byly utěsněny pro vzduch propustnou zátkou a byly inkubovány 72 hodin při konstantních podmínkách za stálého třepání, které zajišťuje lepší výměnu plynů. Každých 24 hodin se měří hustota buněk přímým počítáním v Bürkerově komůrce pod mikroskopem. Na počátku a na konci testování bylo u všech testovaných koncentrací změřeno pH. Během testu byla kontrolována teplota a intenzita osvětlení. Na konci testu se stanoví snížení růstu ve srovnání s kontrolou pomocí dvou parametrů – růstová rychlost a výtěžek.

#### 4.3.5 Zkušební podmínky

Teplota:	21–24 °C udržované s přesností na ± 2 °C
Osvětlení:	kontinuální, min. 4 440 lux, max. 8 880 lux
Délka expozice:	72 hodin
Objem testovaného roztoku:	50 ml
Počáteční hustota buněk:	5 000 buněk v 1 ml
-	Bez aerace
-	Zajištění promíchávání kultury třepáním

#### 4.3.6 Platnost zkoušky

Zkouška je platná při splnění následujících podmínek:

1. Biomasa by se měla v kontrolních kulturách během 72hodinové zkušební doby zvýšit exponenciálně, a to nejméně 16×.
2. Střední variační koeficient pro specifické růstové rychlosti v jednotlivých obdobích v kontrolních kulturách nesmí překročit 35 %.
3. Variační koeficient průměrných specifických růstových rychlostí během celého zkušebního období u kontrolních kultur použitých k opakování nesmí překročit 7 %.

#### 4.3.7 Metodika výpočtu

K výpočtům byly použity programy MS Excel a ToxRatPro Version 3.2.1.

##### **Výpočet počtu řasových buněk**

Hustota inokulační kultury (počet buněk v 1 ml) byla stanovena přímým počítáním buněk pod mikroskopem v Bürkerově komůrce. Buňky byly spočítány ve 40 velkých čtvercích (1 čtverec = 0,04 mm<sup>2</sup>). Počet řasových buněk v 1 ml byl vypočítán podle vzorce (4):

$$a = \frac{p \times v \times h \times 1000}{P} \qquad a = \frac{p \times 25 \times 10 \times 1000}{40} \qquad a = p \times 6250 \quad (4)$$

kde:

a..... počet buněk v 1 ml

p ..... součet buněk ve všech počítaných velkých čtvercích (40 čtverců)

v ..... převrácená hodnota plochy jednoho čtverce, v němž jsou buňky počítány

h ..... převrácená hodnota hloubky komůrky

1000 ..... přepočet na 1 ml

P ..... počet počítaných čtverců

### **Průměrná růstová rychlost**

Průměrná specifická růstová rychlost  $\mu$  pro jednotlivá období a průměrná specifická rychlost po celou dobu trvání zkoušky pro každou jednotlivou nádobu s kontrolními a exponovanými vzorky byla vypočítána podle vzorce (5):

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \quad (5)$$

kde:

$\mu_{i-j}$ ..... růstová rychlost od doby i do doby j

$X_i$ ..... biomasa v době i

$X_j$ ..... biomasa v době j

Procentuální inhibice růstové rychlosti u jednotlivých opakování s exponovanými vzorky byla vypočítána ze vzorce (6):

$$\%I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100 \quad (6)$$

kde:

$I_r$  ..... procentuální inhibice průměrné specifické rychlosti

$\mu_c$  ..... střední hodnota průměrné specifické růstové rychlosti v kontrolní skupině

$\mu_T$  ..... průměrná specifická růstová rychlost u opakování s exponovaným vzorkem

## Výtěžek

Výtěžek byl vypočítán jako biomasa na konci zkoušky minus počáteční biomasa pro každou jednotlivou nádobu s kontrolními a exponovanými vzorky.

Procentuální inhibice výtěžku byla vypočtena pro každé opakování s exponovanými vzorky následovně (7):

$$\%I_Y = \frac{Y_c - Y_T}{Y_c} \times 100 \quad (7)$$

kde:

$I_Y$  ..... procentuální inhibice výtěžku

$Y_c$  ..... střední hodnota výtěžku v kontrolní skupině

$Y_T$  ..... hodnota výtěžku u opakování s exponovaným vzorkem



## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Inhibice dýchání aktivovaného kalu

#### 5.1.1 Roundup – předběžná zkouška

Na předběžnou zkoušku inhibice dýchání bylo použito 13 zkoušených vzorků, jejichž koncentrace jsou uvedeny v tabulce 7. Dále jsou uvedeny respirační rychlosti a procenta inhibice. V grafu 3 je znázorněna spotřeba kyslíku na čase u jednotlivých vzorků.

Tabulka 7 - Inhibice dýchání aktivovaného kalu – předběžná zkouška

Označení vzorku	konc. [mg/l]	p <sub>1</sub> [mg/l]	p <sub>2</sub> [mg/l]	t <sub>1</sub> [min]	t <sub>2</sub> [min]	R <sub>T</sub> , R <sub>H</sub> [mg/l/h]	R <sub>S</sub> [mg/g/h]	I <sub>T</sub> [%]
K1	0	6,87	2,13	0,5	9,5	31,60	21,07	0,0
Z1	10	4,99	2,15	0,5	6,0	30,98	20,65	0,0
Z2	100	6,71	2,01	0,5	10,0	29,68	19,79	3,3
Z3	1000	8,06	6,73	0,5	10,0	8,40	5,60	72,7
Z4	1000	8,39	7,38	1,0	10,0	6,73	4,49	78,1
Z5	1000	8,56	7,50	0,5	10,0	6,69	4,46	78,3
R1	5	6,90	3,73	1,5	10,0	22,38	14,92	27,2
R2	10	6,94	4,14	1,0	10,0	18,67	12,44	39,2
R3	20	8,40	7,07	1,0	10,0	8,87	5,91	71,2
Zab1	1000	9,24	9,24	0,5	10,0	0,00	0,00	-
Zab2	1000	9,18	9,18	0,5	10,0	0,00	0,00	-
Zab3	1000	9,04	9,03	0,5	10,0	0,06	0,04	-
K2	0	6,09	2,12	0,5	8,5	29,78	19,85	0,0

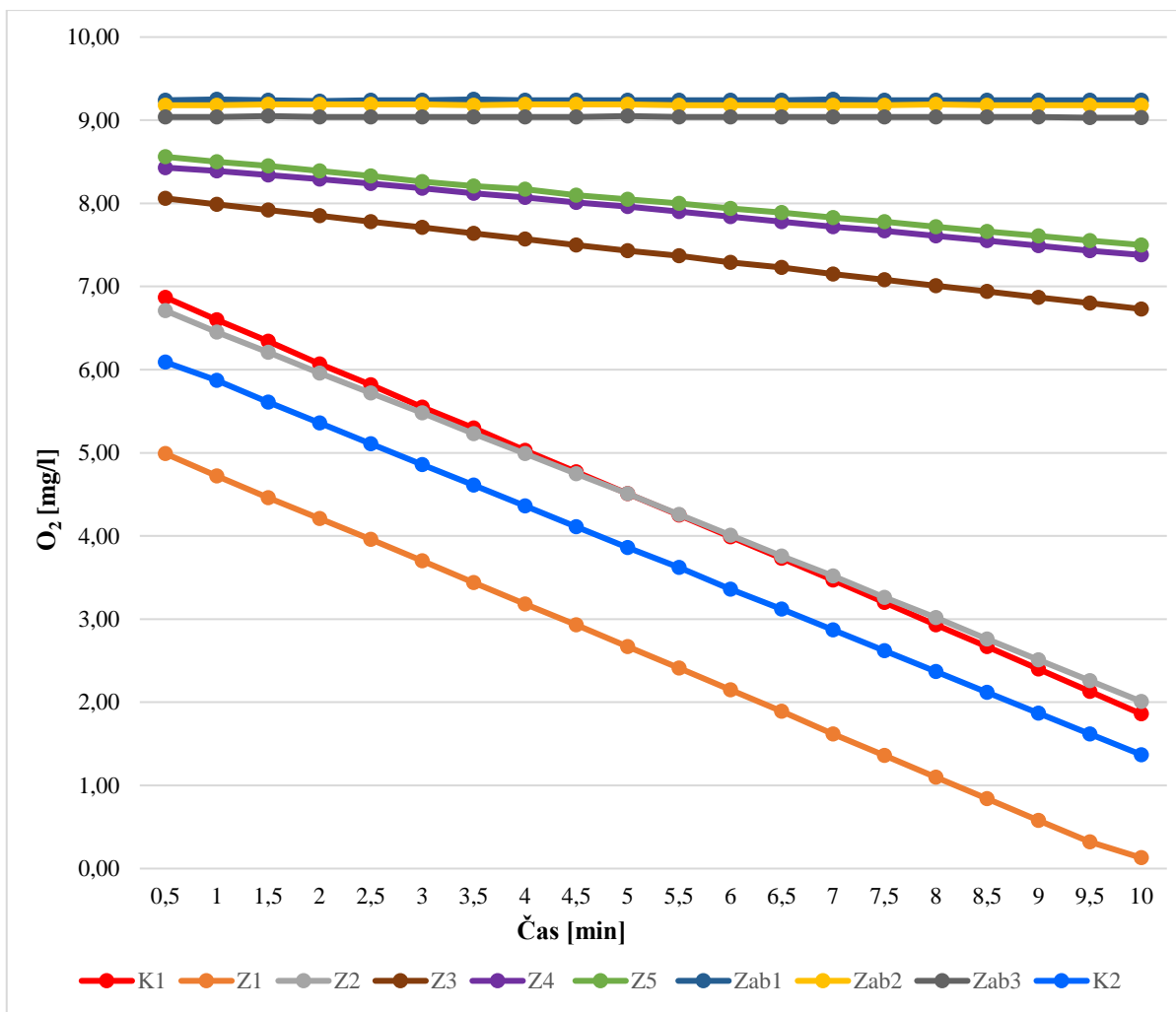
Vysvětlivky:

K (kontrola).....aktivovaný kal, syntetická odpadní voda

Z.....aktivovaný kal, syntetická odpadní voda, Roundup

R (referenční látka) .....aktivovaný kal, syntetická odpadní voda, 3,5-dichlorfenol

Zab .....syntetická odpadní voda, Roundup



Graf 3 - Závislost spotřeby kyslíku na čase

### 5.1.2 Roundup – úplná zkouška

Na úplnou zkoušku inhibice dýchání bylo použito 15 zkoušených vzorků, jejichž koncentrace jsou uvedeny v tabulce 8. Dále jsou uvedeny respirační rychlosti a procenta inhibice.

**Tabulka 8** - Inhibice dýchání aktivovaného kalu – úplná zkouška

<b>Označení vzorku</b>	<b>konc.</b> [mg/l]	<b>p<sub>1</sub></b> [mg/l]	<b>p<sub>2</sub></b> [mg/l]	<b>t<sub>1</sub></b> [min]	<b>t<sub>2</sub></b> [min]	<b>R<sub>T</sub>, R<sub>H</sub></b> [mg/l/h]	<b>R<sub>S</sub></b> [mg/g/h]	<b>I<sub>T</sub></b> [%]
<b>K1</b>	0	3,89	2,02	1,0	3,0	56,10	37,40	0,0
<b>Z1</b>	1000	7,08	6,58	7,0	10,0	10,00	6,67	80,3
<b>Z2</b>	1000	6,17	4,73	0,5	10,0	9,09	6,06	82,0
<b>Z3</b>	660	6,87	3,76	0,5	10,0	19,64	13,09	61,2
<b>Z4</b>	660	4,75	2,13	0,5	9,0	18,49	12,33	63,5
<b>R1</b>	5	6,93	2,2	1,5	10,0	33,39	22,26	34,1
<b>R2</b>	10	7,07	5,66	6,0	10,0	21,15	14,10	58,2
<b>R3</b>	20	8,91	8,02	0,5	10,0	5,62	3,75	88,9
<b>Z5</b>	440	5,73	2,26	0,5	7,0	32,03	21,35	36,8
<b>Z6</b>	440	5,14	2,10	0,5	6,0	33,16	22,11	34,5
<b>Z7</b>	290	5,73	2,04	0,5	6,0	40,25	26,84	20,5
<b>Z8</b>	290	5,95	2,34	0,5	5,5	43,32	28,88	14,5
<b>Z9</b>	190	4,46	1,93	0,5	2,5	75,90	50,60	0
<b>Z10</b>	190	4,75	2,32	0,5	3,5	48,60	32,40	4,0
<b>K2</b>	0	6,61	2,09	0,5	6,5	45,20	30,13	10,8

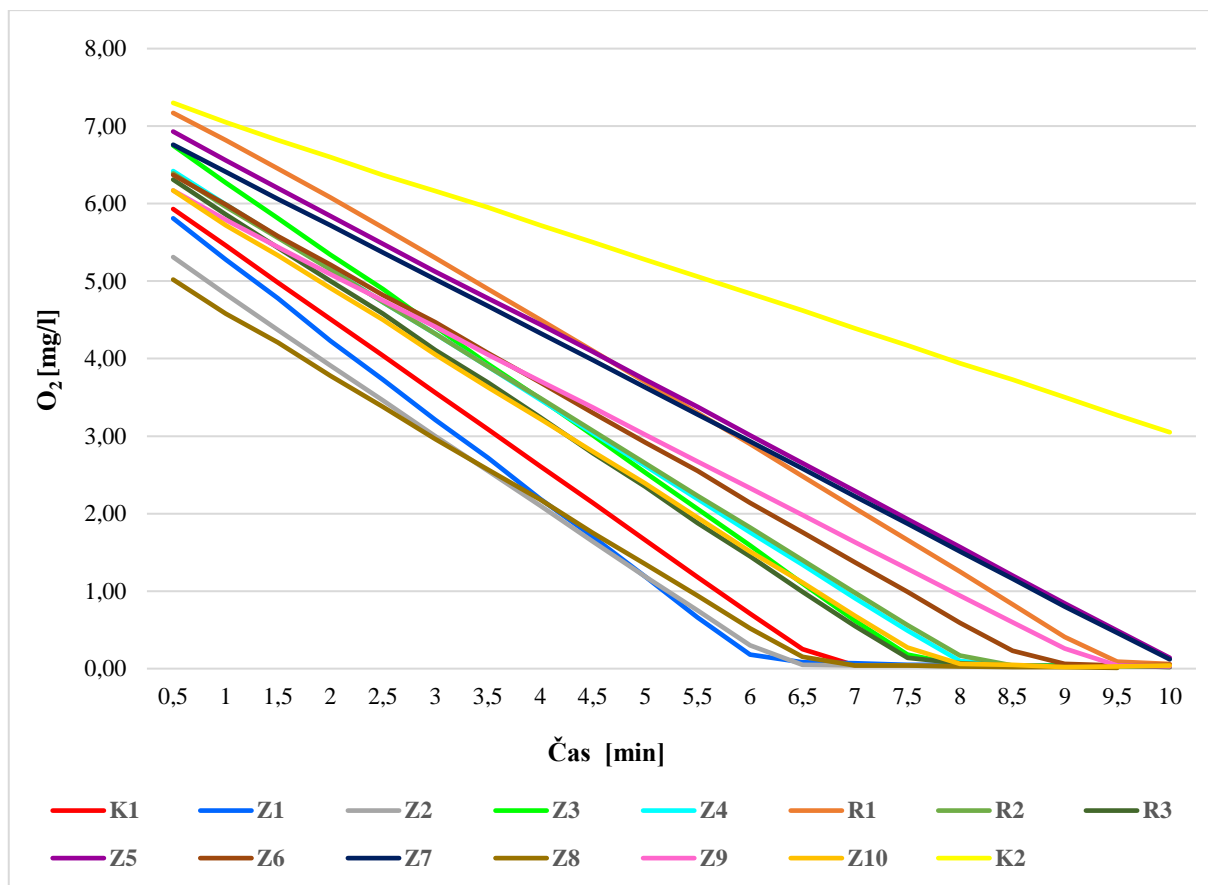
#### Vysvětlivky:

K (kontrola).....aktivovaný kal, syntetická odpadní voda

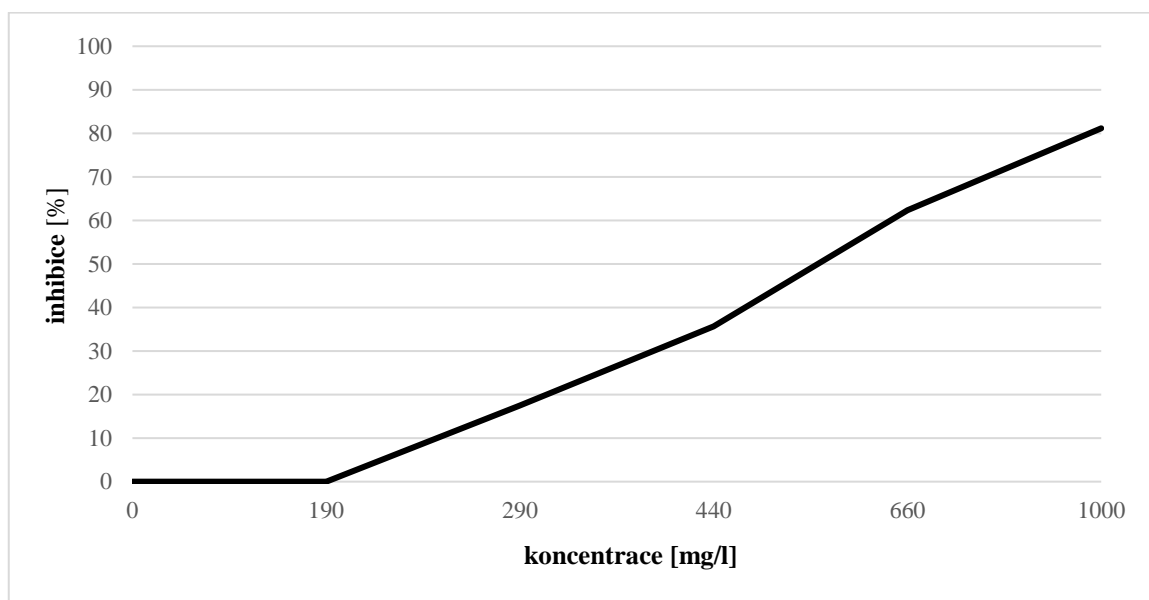
Z.....aktivovaný kal, syntetická odpadní voda, Roundup

R (referenční látka) .....aktivovaný kal, syntetická odpadní voda, 3,5-dichlorfenol

V grafu 4 je znázorněna spotřeba kyslíku na čase u jednotlivých vzorků a v grafu 5 je závislost inhibice na koncentraci látky.



**Graf 4** - Závislost spotřeby kyslíku na čase – úplná zkouška



**Graf 5** - Inhibice v závislosti na koncentraci

Ze získaných hodnot byla vypočtena hodnota **EC<sub>50</sub> = 517,88 mg/l**. Hodnota EC<sub>50</sub> pro referenční látku je rovna 7,65 mg/l. Tato hodnota slouží k ověření postupu testování.

## 5.2 Akutní imobilizace dafnií

### 5.2.1 Glyfosát – předběžný test

Předběžný test akutní imobilizace dafnií probíhal ve čtyřech sadách testovacích roztoků s určenými nominálními koncentracemi a jedním roztokem s nulovou koncentrací testované látky, ten byl použit jako kontrola. V každé nádobě bylo 5 organismů. V tabulce 9 je uveden počet pohybujících se organismů v určitých nominálních koncentracích a kontrolním vzorku po 24 a 48 hodinách. Dále je uvedena imobilizace organismů v procentech. Protože byla patrná imobilizace pouze u koncentrace 100 mg/l, byl proveden ještě limitní test s touto koncentrací.

**Tabulka 9** - Glyfosát: Imobilizace dafnií – předběžný test

		Glyfosát [mg/l]					
		K	1	5	10	50	100
počet mobilních dafnií	řada 1	5	5	5	5	5	4
	řada 2	5	5	5	5	5	4
	řada 3	5	5	5	5	5	5
	řada 4	5	5	5	5	5	5
	celkem	20	20	20	20	20	18
imobilizace [%]	<b>24 h</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>10</b>
počet mobilních dafnií	řada 1	5	5	5	5	5	3
	řada 2	5	5	5	5	5	4
	řada 3	5	5	5	5	5	5
	řada 4	5	5	5	4	5	5
	celkem	20	20	20	19	20	17
imobilizace [%]	<b>48 h</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>15</b>

V tabulce 10 je uveden obsah kyslíku v jednotlivých roztocích a v tabulce 11 hodnoty pH jednotlivých roztoků. Díky těmto hodnotám se může test prohlásit za platný.

**Tabulka 10** - Glyfosát: Obsah kyslíku – předběžný test

		Glyfosát [mg/l]					
		K	1	5	10	50	100
O <sub>2</sub> [mg/l]	0 h	8,44	8,62	8,67	8,65	8,64	8,59
	48 h	8,17	8,28	8,41	8,48	8,58	8,61

**Tabulka 11** - Glyfosát: Hodnoty pH – předběžný test

		Glyfosát [mg/l]					
		K	1	5	10	50	100
pH	0 h	7,60	7,57	7,47	7,35	6,42	5,24
	48 h	7,60	7,55	7,58	7,59	7,46	7,44

### 5.2.2 Glyfosát – limitní test

Limitní test akutní imobilizace dafnií probíhal v šesti sadách testovacích roztoků s koncentrací 100 mg/l a s dvěma kontrolami. V každé nádobě bylo 10 organismů. V tabulce 12 je uveden počet pohybujících se organismů v jednotlivých sadách a v kontrolním vzorku po 24 a 48 hodinách.

**Tabulka 12** - Glyfosát: Imobilizace dafnií – limitní test

		Glyfosát [mg/l]							
		K	K	100	100	100	100	100	100
počet mobilních dafnií	<b>24 h</b>	10	9	10	10	10	9	9	10
imobilizace [%]	<b>24 h</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>0</b>
počet mobilních dafnií	<b>48 h</b>	9	8	8	10	9	9	9	10
imobilizace [%]	<b>48 h</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>0</b>

V tabulce 13 je uveden obsah kyslíku v jednotlivých roztocích a v tabulce 14 hodnoty pH jednotlivých roztoků. Díky těmto hodnotám se může test prohlásit za platný.

**Tabulka 13** - Glyfosát: Obsah kyslíku – limitní test

		Glyfosát [mg/l]	
		K	100
O <sub>2</sub> [mg/l]	0 h	8,64	8,62
	48 h	8,66	8,42

**Tabulka 14** - Glyfosát: Hodnoty pH – limitní test

		Glyfosát [mg/l]	
		K	100
pH	0 h	7,60	5,28
	48 h	7,39	5,67

Protože imobilizace v jednotlivých roztocích byla nižší než 50 %, můžeme říci, že hodnota EC<sub>50</sub> je v tomto případě vyšší než nejvyšší testovaná koncentrace pro ekotoxikologické testy.

Výsledek limitního testu pro glyfosát je tedy hodnota **EC<sub>50</sub> > 100 mg/l**.

### 5.2.3 Roundup

Tento test se bohužel nepodařilo dokončit. Celý chov dafnií byl infikován znečištěnou destilovanou vodou.

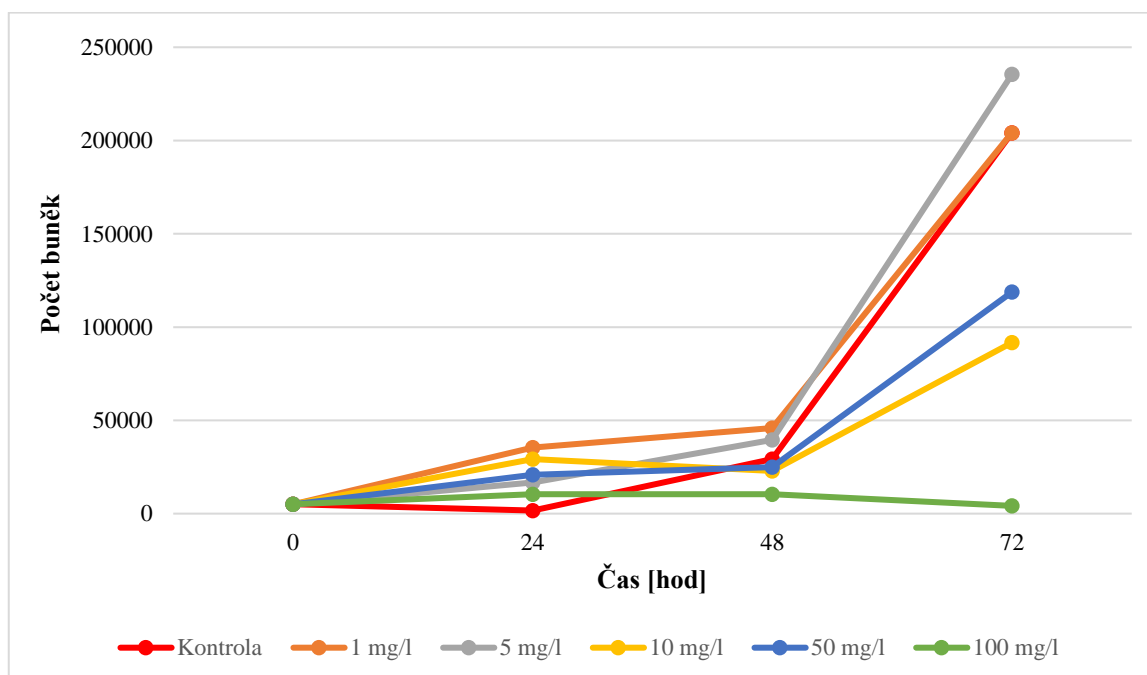
## 5.3 Inhibice růstu sladkovodních řas

### 5.3.1 Glyphosát – předběžný test

Předběžný test inhibice růstu řas probíhal ve třech opakováních testovacích roztoků s určenými nominálními koncentracemi a třemi roztoky s nulovou koncentrací testované látky, jakožto kontrola. V každé nádobě bylo na počátku 5000 řasových buněk. V tabulce 15 jsou uvedeny průměrné hustoty buněk v jednotlivých koncentracích po 24, 48 a 72 hodinách. Tyto hodnoty jsou uvedeny i v grafu 6.

**Tabulka 15** - Glyphosát: Průměrná hustota buněk – předběžný test

Glyphosát [mg/l]	Průměrná hustota buněk v 1 ml			
	Doba expozice [hod]			
	0	24	48	72
<b>Kontrola</b>	5000	16667	29167	204167
<b>1</b>	5000	35417	45833	204167
<b>5</b>	5000	16667	39583	235417
<b>10</b>	5000	29167	22917	91667
<b>50</b>	5000	20833	25000	118750
<b>100</b>	5000	10417	10417	4167



**Graf 6** - Glyphosát: Průměrná hustota buněk – předběžný test



V tabulce 16 jsou uvedeny hodnoty růstové rychlosti a výtěžku, z nichž se počítá hodnota efektivní koncentrace pro inhibici růstu.

**Tabulka 16** - Glyfosát: Růstová rychlost a výtěžek – předběžný test

Glyfosát [mg/l]	Růstová rychlost		Výtěžek	
	Průměrná růst. rychlost [ $\mu$ ]	Redukce [%]	Průměrný výtěžek [Y]	Inhibice [%]
<b>Kontrola</b>	1,24	0	199167	0
<b>1</b>	1,24	0	199167	0
<b>5</b>	1,28	0	230417	0
<b>10</b>	0,97	21,6	86667	56,5
<b>50</b>	1,06	14,6	113750	42,9
<b>100</b>	0	100	0	100

Poté byly vypočteny hodnoty  $EC_{50}$  pro glyfosát.

Hodnota efektivní koncentrace pro růstovou rychlost:  **$E_rC_{50} = 53,7 \text{ mg/l}$**

Hodnota efektivní koncentrace pro výtěžek:  **$E_yC_{50} = 24,4 \text{ mg/l}$**

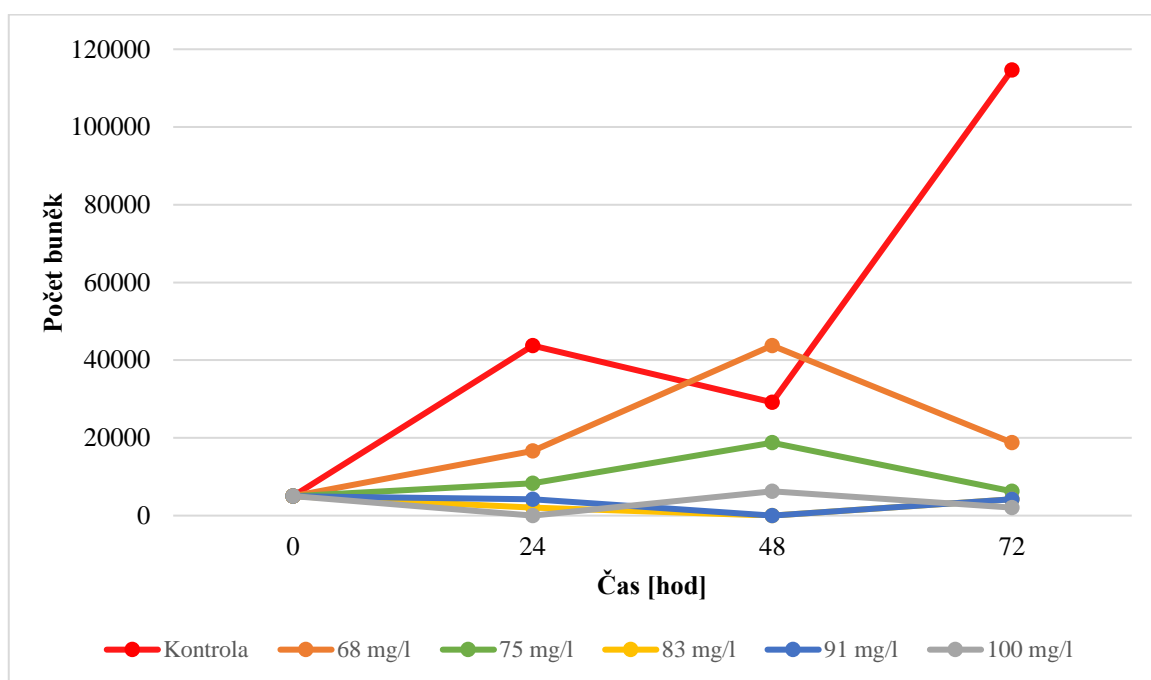
Na základě těchto hodnot bylo rozhodnuto o provedení úplného testu s užším rozmezím testovaných koncentrací pro upřesnění hodnoty  $EC_{50}$ .

### 5.3.2 Glyfosát – úplný test

Úplný test inhibice růstu řas probíhal ve třech opakováních testovacích roztoků s koncentracemi – 68; 75; 83; 91 a 100 mg/l a třemi roztoky s nulovou koncentrací testované látky, jakožto kontrola. V každé nádobě bylo na počátku 5000 řasových buněk. V tabulce 17 jsou uvedeny průměrné hustoty buněk v jednotlivých koncentracích po 24, 48 a 72 hodinách. Tyto hodnoty jsou uvedeny i v grafu 7.

**Tabulka 17** - Glyfosát: Průměrná hustota buněk – úplný test

Glyfosát [mg/l]	Průměrná hustota buněk v 1 ml			
	Doba expozice [hod]			
	0	24	48	72
<b>Kontrola</b>	5000	43750	29167	114583
<b>68</b>	5000	16667	43750	18750
<b>75</b>	5000	8333	18750	6250
<b>83</b>	5000	2083	0	4167
<b>91</b>	5000	4167	0	4167
<b>100</b>	5000	0	6250	2083



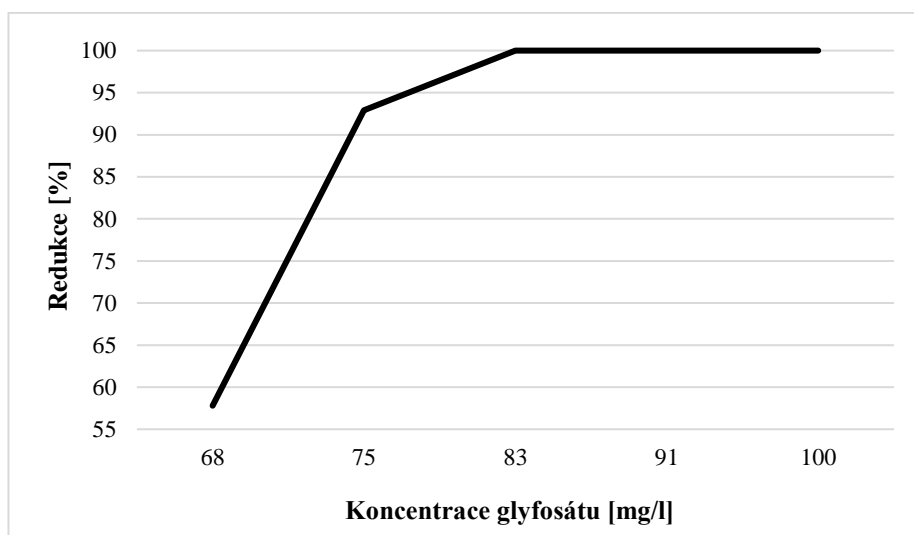
**Graf 7** - Glyfosát: Průměrná hustota buněk – úplný test

V tabulce 18 jsou uvedeny hodnoty růstové rychlosti a výtěžku, z nichž se počítá hodnota efektivní koncentrace pro inhibici růstu.

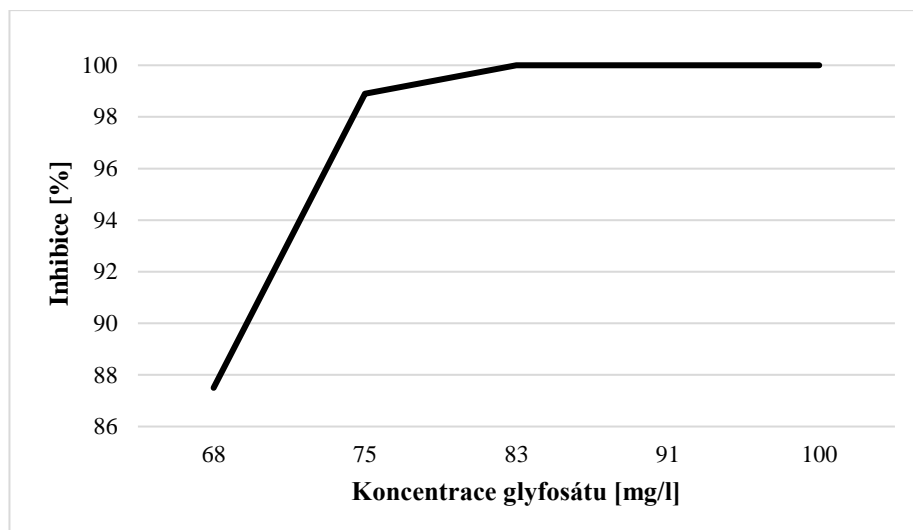
**Tabulka 18** - Glyphosát: Růstová rychlost a výtěžek – úplný test

Glyphosát [mg/l]	Růstová rychlost		Výtěžek	
	Průměrná růst. rychlost [ $\mu$ ]	Redukce [%]	Průměrný výtěžek [Y]	Inhibice [%]
<b>Kontrola</b>	1,04	0	109583	0
<b>68</b>	0,44	57,8	13750	87,5
<b>75</b>	0,07	92,9	1250	98,9
<b>83</b>	0	100	0	100
<b>91</b>	0	100	0	100
<b>100</b>	0	100	0	100

Na grafu 8 je znázorněna závislost redukce růstové rychlosti na koncentraci a na grafu 9 je závislost inhibice výtěžku na koncentraci.



**Graf 8** - Závislost redukce růstové rychlosti na koncentraci glyphosátu



**Graf 9** - Závislost inhibice výtěžku na koncentraci glyfosátu

Na základě těchto hodnot byly vypočteny hodnoty  $EC_{50}$  pro glyfosát.

Hodnota efektivní koncentrace pro růstovou rychlost:  $E_rC_{50} = 67,8 \text{ mg/l}$

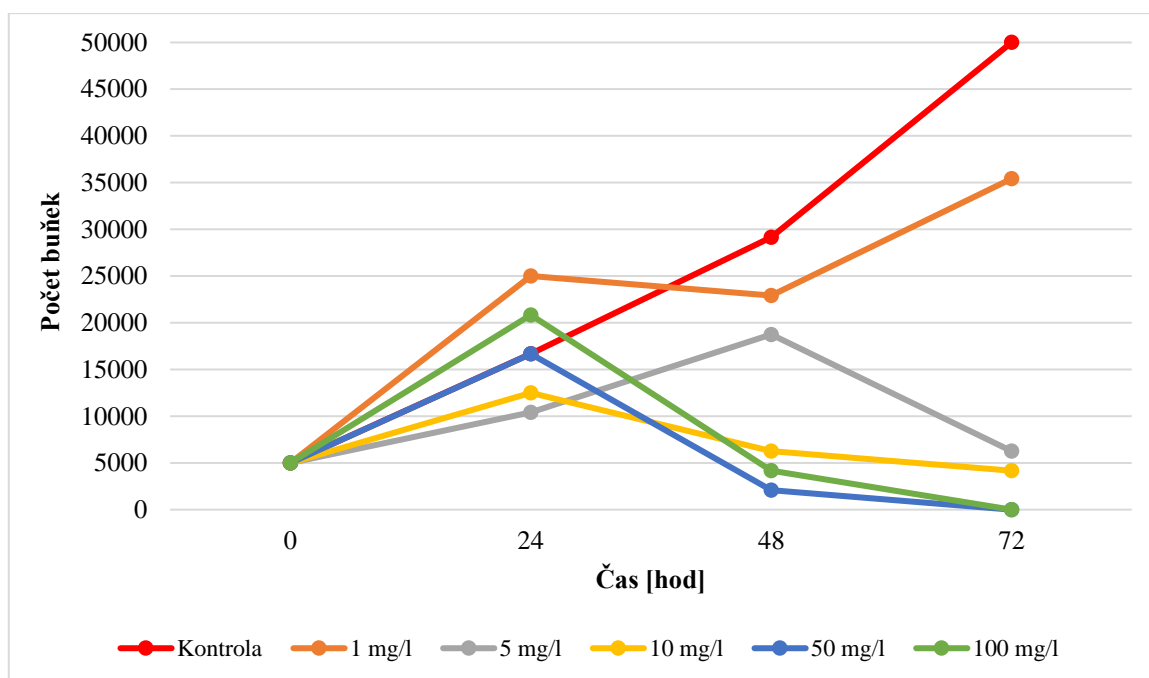
Hodnota efektivní koncentrace pro výtěžek:  $E_yC_{50} = 61,4 \text{ mg/l}$

### 5.3.3 Roundup – předběžný test

Předběžný test inhibice růstu řas probíhal ve třech opakováních testovacích roztoků s určenými nominálními koncentracemi a třemi roztoky s nulovou koncentrací testované látky, jakožto kontrola. V každé nádobě bylo na počátku 5000 řasových buněk. V tabulce 19 jsou uvedeny průměrné hustoty buněk v jednotlivých koncentracích po 24, 48 a 72 hodinách. Tyto hodnoty jsou uvedeny i v grafu 10.

**Tabulka 19** - Roundup: Průměrná hustota buněk – předběžný test

Roundup [mg/l]	Průměrná hustota buněk v 1 ml			
	Doba expozice [hod]			
	0	24	48	72
<b>Kontrola</b>	5000	16667	29167	50000
<b>1</b>	5000	25000	22917	35417
<b>5</b>	5000	10417	18750	6250
<b>10</b>	5000	12500	6250	4167
<b>50</b>	5000	16667	2083	0
<b>100</b>	5000	20833	4167	0



**Graf 10** - Roundup: Průměrná hustota buněk – předběžný test

V tabulce 20 jsou uvedeny hodnoty růstové rychlosti a výtěžku, z nichž se počítá hodnota efektivní koncentrace pro inhibici růstu.

**Tabulka 20** - Roundup: Růstová rychlost a výtěžek – předběžný test

Roundup [mg/l]	Růstová rychlost		Výtěžek	
	Průměrná růst. rychlost [ $\mu$ ]	Redukce [%]	Průměrný výtěžek [Y]	Inhibice [%]
<b>Kontrola</b>	0,77	0	45000	0
<b>1</b>	0,65	15	30417	32,4
<b>5</b>	0,07	90,3	1250	97,2
<b>10</b>	0	100	0	100
<b>50</b>	0	100	0	100
<b>100</b>	0	100	0	100

Poté byly vypočteny hodnoty  $EC_{50}$  pro Roundup.

Hodnota efektivní koncentrace pro růstovou rychlost:

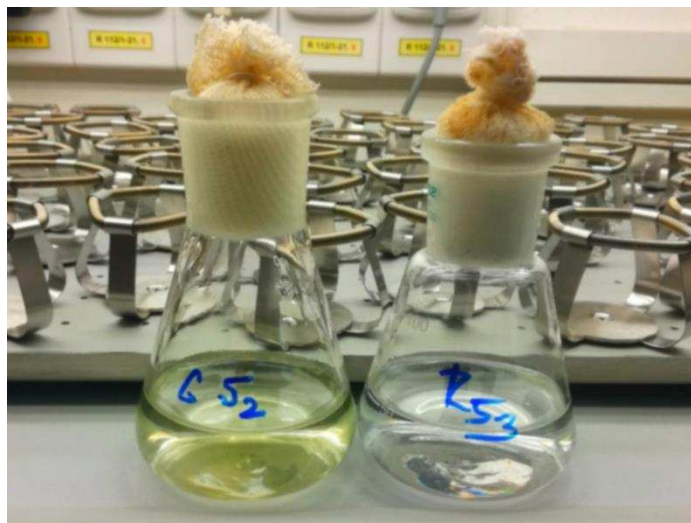
$$E_r C_{50} = 1,0 \text{ mg/l}$$

Hodnota efektivní koncentrace pro výtěžek:

$$E_y C_{50} = 1,4 \text{ mg/l}$$

Na základě těchto hodnot bylo rozhodnuto o provedení úplného testu s užším rozmezím testovaných koncentrací pro upřesnění hodnoty  $E_r C_{50}$ .

Již po provedení předběžných testů bylo jasné, že Roundup bude pro řasy toxickejší než glyfosát. Porovnání dvou testovaných roztoků se shodnou koncentrací 5 mg/l je na obrázku 13.



**Obrázek 13** - Porovnání testovaného roztoku glyfosátu G a Roundupu R [40]

#### 5.3.4 Roundup – úplný test

Úplný test inhibice růstu řas probíhal ve třech opakováních testovacích roztoků s koncentracemi – 0,16; 0,32; 0,63; 1,25; 2,5; 5 a 10 mg/l a třemi roztoky s nulovou koncentrací testované látky, jakožto kontrola. V každé nádobě bylo na počátku 5000 řasových buněk. V tabulce 21 jsou uvedeny průměrné hustoty buněk v jednotlivých koncentracích po 24, 48 a 72 hodinách.

**Tabulka 21** - Roundup: Průměrná hustota buněk – úplný test

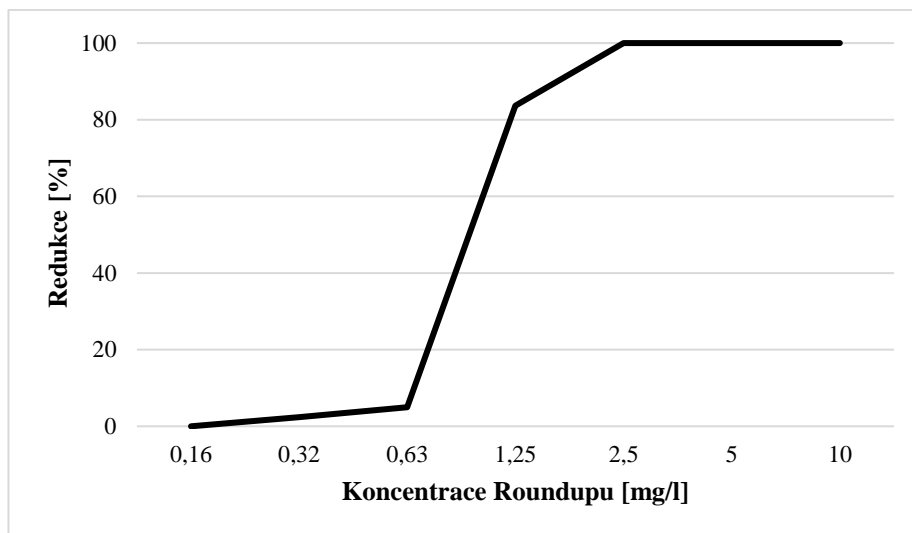
Roundup [mg/l]	Průměrná hustota buněk v 1 ml			
	Doba expozice [hod]			
	0	24	48	72
<b>Kontrola</b>	5000	20833	43750	114583
<b>0,16</b>	5000	10417	20833	162500
<b>0,32</b>	5000	8333	12500	106250
<b>0,63</b>	5000	8333	6250	97917
<b>1,25</b>	5000	8333	4167	8333
<b>2,5</b>	5000	6250	2083	2083
<b>5</b>	5000	4167	0	4167
<b>10</b>	5000	4167	0	0

V tabulce 22 jsou uvedeny hodnoty růstové rychlosti a výtěžku, z nichž se počítá hodnota efektivní koncentrace pro inhibici růstu.

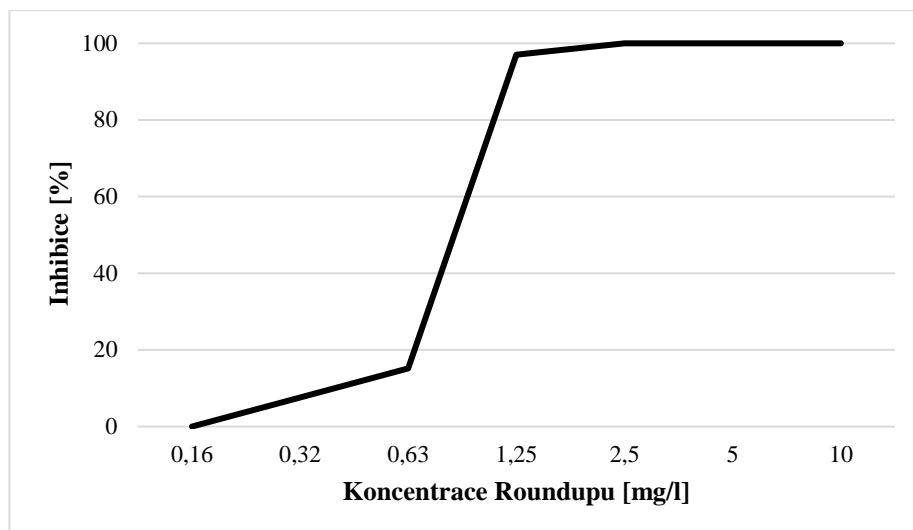
**Tabulka 22** - Roundup: Růstová rychlost a výtěžek – úplný test

Roundup [mg/l]	Růstová rychlost		Výtěžek	
	Průměrná růst. rychlost [ $\mu$ ]	Redukce [%]	Průměrný výtěžek [Y]	Inhibice [%]
<b>Kontrola</b>	1,04	0	109583	0
<b>0,16</b>	1,16	0	157500	0
<b>0,32</b>	1,02	2,4	101250	7,6
<b>0,63</b>	0,99	5,0	92917	15,2
<b>1,25</b>	0,17	83,7	3333	97,0
<b>2,5</b>	0	100	0	100
<b>5</b>	0	100	0	100
<b>10</b>	0	100	0	100

Na grafu 11 je znázorněna závislost redukce růstové rychlosti na koncentraci a na grafu 12 je závislost inhibice výtěžku na koncentraci.



**Graf 11** - Závislost redukce růstové rychlosti na koncentraci Roundupu



**Graf 12** - Závislost inhibice výtěžku na koncentraci Roundupu

Na základě těchto hodnot byly vypočteny hodnoty  $EC_{50}$  pro Roundup.

Hodnota efektivní koncentrace pro růstovou rychlost:  **$E_rC_{50} = 0,98 \text{ mg/l}$**

Hodnota efektivní koncentrace pro výtěžek:  **$E_yC_{50} = 0,76 \text{ mg/l}$**



## 6 ZÁVĚR

V testu inhibice dýchání aktivovaného kalu byla zjištěna pro Roundup hodnota  $EC_{50} = 517,88$  mg/l. Testem s akutní imobilizací dafnií byl prověřován glyfosát a Roundup. Pro glyfosát byla zjištěna hodnota  $EC_{50} > 100$  mg/l. Test s Roundupem nebyl dokončen z důvodu infekce v chovu dafnií. Testem inhibice růstu řas byl zkoušen Roundup i glyfosát. Pro Roundup byly zjištěny hodnoty  $E_rC_{50} = 0,98$  mg/l a  $E_yC_{50} = 0,76$  mg/l. Pro glyfosát byly zjištěny hodnoty  $E_rC_{50} = 67,8$  mg/l a  $E_yC_{50} = 61,4$  mg/l.

Výsledky v diplomové práci odpovídají údajům zjištěným v literatuře. Pro glyfosát je v tabulce 1 uvedena hodnota  $EC_{50}$  pro dafnie 134 mg/l. V diplomové práci byla zjištěna hodnota  $EC_{50} > 100$  mg/l.

U řas byla pozorována vyšší inhibice u komerčně vyráběného Roundupu než u čistého glyfosátu. Pro klasifikaci látky se používá Nařízení komise (EU) č. 286/2011 (novela nařízení CLP), část 4: Nebezpečnost pro životní prostředí, kritéria dle tabulky 4.1.0. Podle této tabulky by byl Roundup zařazen do kategorie Akutní toxicita 1, jelikož je výsledek testu pro řasy menší než 1 mg/l.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Spotřeba v jednotlivých letech. *Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský* [online]. b.r. [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/ukzuz/portal/pripravky-na-or/ucinne-latky-v-por-statistika-spotreba/spotreba-pripravku-na-or/spotreba-v-jednotlivych-letech/>
- [2] Typy přípravků. European Chemicals Agency [online]. b.r. [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/regulations/biocidal-products-regulation/product-types>
- [3] PROKOP, Martin. *Přípravky na ochranu rostlin* [online]. b.r. [cit. 2019-03-21]. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/ochrana-obecne/pripravky-na-ochranu-rostlin>
- [4] *Nařízení Evropského parlamentu a rady č. 528/2012 o dodávání biocidních přípravků na trh a jejich používání*. In: . 2012. Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0528&from=EN>
- [5] ECHA - biocides. ECHA [online]. b.r. [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/biocides>
- [6] ECHA - approval of active substances. ECHA [online]. b.r. [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: <https://echa.europa.eu/cs/regulations/biocidal-products-regulation/approval-of-active-substances>
- [7] Zákon č. 324/2016 Sb., o biocidních přípravcích a účinných látkách a o změně některých souvisejících zákonů: Zákon o biocidech. In: 2016. b.r., částka 126.
- [8] *Historie glyfosátu* [online]. b.r. [cit. 2019-02-01]. Dostupné z: <https://www.glyphosate.eu/history-glyphosate>
- [9] PubChem: Open chemistry database [online]. b.r. [cit. 2019-02-04]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glyphosate>
- [10] *Glyfosát* [online]. b.r. [cit. 2019-01-24].

- [11] *Struktura glyfosátu* [online]. In: . b.r. [cit. 2019-03-20]. Dostupné z:  
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/89/Glyphosate-2D-skeletal.png/300px-Glyphosate-2D-skeletal.png>
- [12] *Acidobazické formy glyfosátu* [online]. In: . b.r. [cit. 2019-02-09]. Dostupné z:  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Glyphosate#/media/File:Glyphosate\\_Dissociation\\_V.1.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Glyphosate#/media/File:Glyphosate_Dissociation_V.1.svg)
- [13] ROBERTS, Terence a David HUTSON. *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Herbicides and plant growth regulators*. 1. Royal Society of Chemistry, 1998. ISBN 0854044949.
- [14] Glyphosate. EPA [online]. 2014 [cit. 2019-02-01].
- [15] IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. IARC [online]. 2015 [cit. 2019-02-24].
- [16] CATTANI, D. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology*. 2014, (320), 34-45. DOI: 10.1016/j.tox.2014.03.001.
- [17] TARAZONA, Jose, Daniele COURT-MARQUES, Manuela TIRAMANI, Hermine REICH, Rudolf PFEIL, Frederique ISTACE a Federica CRIVELLENTI. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Archives of Toxicology* [online]. 2017, **91**(8), 2723-2743 [cit. 2019-04-26]. DOI: 10.1007/s00204-017-1962-5. ISSN 0340-5761. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-017-1962-5>
- [18] KIM, Young-hee, Jung-rak HONG, Hyo-wook GIL, Ho-yeon SONG a Sae-yong HONG. Mixtures of glyphosate and surfactant TN20 accelerate cell death via mitochondrial damage-induced apoptosis and necrosis. *Toxicology in Vitro* [online]. 2013, **27**(1) [cit. 2019-04-26]. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.09.021. ISSN 08872333.
- [19] TOMLIN, C. *The E-Pesticide Manual 2005-2006: An Electronic and Fully Searchable World Compendium of Pesticides* [online]. Surrey, UK, 2005 [cit. 2019-02-24]. ISBN 1901396401. CD.

- [20] O'NEIL, Maryadele. The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14th ed. Whitehouse Station, N.J.: Merck, 2006. ISBN 978-091-1910-001.
- [21] LEWIS, Richard a N. SAX. Sax's dangerous properties of industrial materials. 11th ed. Hoboken, N.J.: J. Wiley, 2004. ISBN 978-047-1476-627.
- [22] Hodnota EC50 pro *Daphnia magna*. In: TOXNET [online]. b.r. [cit. 2019-04-26].  
Dostupné z: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+1071-83-6>
- [23] Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. 6th ed. New York: McGraw-Hill Medical Pub. Division, 2001, s. 795. ISBN 978-0071347211.
- [24] CHENIER, Philip. Survey of industrial chemistry. 3rd. 2012, s. 384. ISBN 978-1-4615-0603-4.
- [25] *Syntéza glyfosátu z kyseliny iminodioxtové* [online]. In: . b.r. [cit. 2019-02-09].  
Dostupné z:  
[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e8/Glyphosate\\_synthesis\\_from\\_chloroacetic\\_acid.svg/600px-Glyphosate\\_synthesis\\_from\\_chloroacetic\\_acid.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e8/Glyphosate_synthesis_from_chloroacetic_acid.svg/600px-Glyphosate_synthesis_from_chloroacetic_acid.svg.png)
- [26] NANDULA, Vijay,K., ed. Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management. Hoboken, NJ: Wiley, 2010. ISBN 978-0-470-41031-8.
- [27] *Syntéza glyfosátu z dimethylfosfitu* [online]. In: . b.r. [cit. 2019-02-09]. Dostupné z:  
[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e6/Glyphosate\\_synthesis\\_from\\_dimethyl\\_phosphite.svg/400px-Glyphosate\\_synthesis\\_from\\_dimethyl\\_phosphite.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e6/Glyphosate_synthesis_from_dimethyl_phosphite.svg/400px-Glyphosate_synthesis_from_dimethyl_phosphite.svg.png)
- [28] *Použití glyfosátu mapa* [online]. In: . b.r. [cit. 2019-02-09]. Dostupné z:  
[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c4/Glyphosate\\_USA\\_2013.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c4/Glyphosate_USA_2013.png)
- [29] *Kde se v Evropě používá glyfosát* [online]. b.r. [cit. 2019-02-09]. Dostupné z:  
[https://weedingtech.cz/wp-content/uploads/2017/11/mapa\\_glyfosaty-v-EU.jpg.jpeg](https://weedingtech.cz/wp-content/uploads/2017/11/mapa_glyfosaty-v-EU.jpg.jpeg)

- [30] ŠILHA, Jiří a Jiří CEJTCHAML, Jiří KŘEPELKA, ed. Ukončování vegetace u hlavních plodin. *Zemědělec* [online]. b.r. [cit. 2019-04-26]. Dostupné z: <https://zemedelec.cz/ukoncovani-vegetace-u-hlavnich-plodin/>
- [31] RUEPPEL, Melvin, Blanche BRIGHTWELL, Jacob SCHAEFER a John MARVEL. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1977, **25**(3), 517-528 [cit. 2019-04-26]. DOI: 10.1021/jf60211a018. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf60211a018>
- [32] SVOBODOVÁ, Alena a Hana DONÁTOVÁ. *Stanovení glyfosátu a AMPA ve vodách metodou HPLC s fluorescenční detekcí* [online]. In: . b.r. [cit. 2019-04-26]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/11885732-Stanoveni-glyfosatu-a-ampa-ve-vodach-metodouhplc-s-fluorescenci-detekci-ing-alena-svobodova-hana-donatova.html>
- [33] KRULIŠ, Tomáš. *Aminofosfinové kyseliny* [online]. Praha, 2015 [cit. 2019-04-26]. Dostupné z: [https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/79002/DPTX\\_2013\\_1\\_11310\\_0\\_420638\\_0\\_142433.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/79002/DPTX_2013_1_11310_0_420638_0_142433.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Diplomová práce. Univerzita Karlova. Vedoucí práce Doc. RNDr. Vojtěch Kubíček, Ph.D.
- [34] HSDB: GLYPHOSATE. In: . b.r. Dostupné také z: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+1071-83-6>
- [35] *Směrnice Rady 98/83/ES ze dne 3. listopadu 1998 o jakosti vody určené k lidské spotřebě*. In: . 1998. Dostupné také z: <http://www.egeis.org/documents/4%20Drinking%20water%20legislation%20draft%20v3%20.pdf>
- [36] Glyphosate is Carcinogenic. Institute of Science in Society [online]. b.r. [cit. 2019-04-26]. Dostupné z: [http://www.i-sis.org.uk/Glyphosate\\_is\\_Carcinogenic.php](http://www.i-sis.org.uk/Glyphosate_is_Carcinogenic.php)
- [37] Argentinian Study: Tampons, Sanitary Pads and Sterile Gauze Contaminated with Probable Carcinogen Glyphosate. The Detox Project [online]. b.r. [cit. 2019-04-26]. Dostupné z: <https://detoxproject.org/argentinian-study-tampons-sanitary-pads-and-sterile-gauze-contaminated-with-probable-carcinogen-glyphosate/>

- [38] *Bezpečnostní list - Roundup Klasik Pro* [online]. In: . b.r. [cit. 2019-04-26].
- [39] U of G Researchers Find Suspected Glyphosate-Resistant Weed [online]. b.r. [cit. 2019-03-09]. Dostupné z: [http://www.uoguelph.ca/news/2009/05/u\\_of\\_g\\_research\\_19.html](http://www.uoguelph.ca/news/2009/05/u_of_g_research_19.html)
- [40] ČERNÁ, Patricie. *Vlastní foto*. 2019.
- [41] ČERNÁ, Patricie. *Vlastní foto*. 2017.
- [42] *Desmodemus subspicatus* [online]. In: . b.r. [cit. 2019-05-06]. Dostupné z: <http://t3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQCCAAuaWiu7HS-R20xOxGrUw3gEN0SvN5j5YcBo-h3Ln6eZzTjlg>