
STANOVENÍ REZIDUÍ BOTANICKÝCH PESTICIDŮ OBSAHUJÍCÍCH ÚČINNÉ LÁTKY Z ROSTLINNÝCH SILIC

uplatněná certifikovaná metodika

Autoři: Matěj Božik, Pavel Nový, Lenka Kouřimská, Pavel Klouček, Lenka Zárubová, Miloslav Zouhar, Ondřej Douša.

Obsah

1.	Úvod.....	2
2.	Cíl metodiky.....	4
3.	Vlastní popis metodiky	4
3.1.	Chemikálie	4
3.2.	Přístroje a pomůcky.....	5
3.3.	Doporučený způsob odběru vzorků a extrakce	6
3.4.	GC-MS, GC-FID stanovení.....	6
3.5.	Kontrola kvality.....	7
3.6.	Retenční indexy nejčastějších složek silic	8
4.	Výpočet a vyjádření výsledků.....	9
4.1.	Identifikace.....	9
4.2.	Kvantifikace	10
5.	Validace metody	10
5.1.	Spolehlivost a použitelnost metody	10
6.	Srovnání „novosti postupů“	10
7.	Popis uplatnění certifikované metodiky.....	11
8.	Ekonomické aspekty	11
9.	Příklad použití.....	12
10.	Seznam použité související literatury	12
11.	Seznam publikací	13
12.	Dedikace	14

1. Úvod

První písemné zmínky o použití extraktů v boji proti chorobám a škůdcům rostlin pocházejí z Číny. Postupně docházelo k selekci rostlin, u kterých byl zaznamenán insekticidní a fungicidní účinek. V průběhu vývoje zemědělství, zejména v 19. stol. přišla na řadu chemická ochrana, která měla za cíl syntetizovat analogy rostlinných biologicky aktivních látek. Vznikly tak první syntetické pesticidy. Syntetické přípravky postupně vytlačily botanické přípravky nejen v Evropě, ale v několika dalších rozvinutých zemích. Problémy s chemickými pesticidy vedly ke striktnímu zákazu používání některých z nich. Ale především vedly k hledání nových environmentálně a zdravotně nezávadných alternativ ochrany rostlin. Hledání nových biologicky aktivních látek z rostlin s pesticidními účinky a vývoj nových přípravků na bázi je v současnosti podporován mnoha našimi i zahraničními projekty. Pravdou ale zůstává, že o sekundárních metabolitech a jejich biologické aktivitě víme stále jen velmi málo.

Použití pesticidů pro ochranu zemědělských plodin je v současné době revidováno a omezováno legislativou Evropské Unie (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) 396/2005 a 1095/2007), stále více pozornosti je věnováno hodnocení vlivu těchto látek na životní prostředí i na zdraví lidí a hospodářských zvířat. Oprávněné obavy z nepříznivých dopadů syntetických látek masově používaných pro ochranu rostlin se v mnoha případech potvrdily. To vedlo v posledních letech k zákazu používání například metylbromidu v celé EU k 1. 1. 2005. Přitom objem konvenčních pesticidů používaných v ochraně rostlin v ČR je značný, například v roce 2009 bylo k ošetření pouze polních kultur použito 10 934 tis. kg přípravků. Toto jsou hlavní důvody vedoucí vědce k intenzivnímu hledání nových alternativních strategií ochrany rostlin proti škůdcům a původcům chorob. Nové komplexní strategie musejí být nejen šetrné vůči našemu životnímu prostředí, ale rovněž ekonomicky rentabilní a v neposlední řadě aplikovatelné v integrovaných systémech produkce bezpečných potravin. Proto se v dnešní době klade důraz na hledání nových environmentálně a zdravotně bezpečných systémů ochrany rostlin. Jedna z alternativ řešení je využití biologicky aktivních látek obranného charakteru získaných z rostlin - rostlinných pesticidů. Ačkoliv není předpoklad, že botanické pesticidy nahradí levnější a snadněji produkovatelnější syntetické pesticidy, přesto můžeme ve světě pozorovat nárůst spotřeby přípravků na bázi extraktů z rostlin. Tento nárůst je dán především zvyšujícím se zájmem o produkci ekologicky produkovaných bezpečných potravin (bez pesticidních reziduí) a v neposlední řadě také

roste zájem drobných spotřebitelů, kteří na botanické pesticidy nahlíží jako na vhodnou alternativu chemických přípravků. Lze tedy předpokládat, že zájem o takovéto přípravky poroste nejen ve světě, ale i v našich podmínkách, kde je prozatím hlavní překážkou legislativní náročnost uvedení takového přípravku na trh, a proto jsou převážně využívány pro nepotravinářské účely. Seznam povolených aktivních látek na bázi rostlin je uveden v Tabulka 1.

Tabulka 1: Přírodní látky použitelné jako pesticidy podle legislativy EU

Účinná látka	Stav podle Nařízení (EC) č. 1107/2009	Legislativa	MRL
Rostlinné oleje/olej z voňatky nardové (<i>Cymbopogon nardus</i>)	Schválený	Nařízení Komise (EU) č. 504/2014 a 540/2011	-
Rostlinné oleje/hřebíčkový olej	Schválený	Nařízení Komise (EU) č. 127/2008, 141/2014 a 540/2011	-
Rostlinné oleje / mátový olej	Schválený	Nařízení Komise (EU) č. 127/2008, 540/2011 a 608/2012	-
Silice pomerančová	Schválený	Nařízení Komise (EU) č. 1165/2013, 442/2007 a 438/2009	-
Eugenol	Schválený	Nařízení Komise (EU) č. 546/2013	-
Výtažek z česneku	Schválený	Nařízení Komise (EU) č. 127/2008 a 540/2011	-
Geraniol	Schválený	Nařízení Komise (EU) č. 570/2013	0,01 mg/kg
Extrakční zbytky pepřového prášku (PDER)	Schválený	Nařízení Komise (EU) č. 127/2008, 369/2012 a 540/2011	-
<i>Salix</i> spp. cortex	Schválený	Nařízení Komise (EU) č. 1107/2015 a 540/2011	0,01 mg/kg
Terpenová směs QRD 460	Schválený	Nařízení Komise (EU) č. 1192/2015 a 540/2011	0,01 mg/kg
Tymol	Schválený	Nařízení Komise (EU) č. 568/2013	0,01 mg/kg
Výtažek z kajeputu střídavolistého (tea tree)	Schválený	Nařízení Komise (EU) č. 127/2008, 154/2014 a 540/2011	-
<i>Artemisia absinthium</i> L.	V řízení		0,01 mg/kg
Dimetyl disulfid	V řízení		0,01 mg/kg
Olej z tymiánu obecného	V řízení	Rozhodnutí Komise 2010/164/EU	0,01

			mg/kg
Olej z aksamitníku	V řízení	Rozhodnutí Komise 2010/164/EU	0,01 mg/kg

2. Cíl metodiky

Řada přírodních látek se dnes dostává na seznam povolených látek (Tabulka 1) použitelných v zemědělství, některé jako přípravky na ochranu rostlin jiné jako pomocné přípravky. Cílem předkládané práce je poskytnout souborně základní metody pro stanovení reziduí biopesticidů na bázi silic v rostlinném materiálu. Tyto metody jsou doplněny doporučeným způsobem odběru a zpracování vzorků.

3. Vlastní popis metodiky

Tato metoda zahrnuje práci s toxickým a zdraví škodlivým materiálem, proto je třeba při pracovním postupu dodržovat odpovídající opatření dle bezpečnostních listů.

3.1. Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, nejlépe kvality pro reziduální analýzu. Rozpouštědla musejí být v hodná pro GC analýzu. Dostačující čistota chemikálií a rozpouštědel se testuje proměřením slepého vzorku.

- **Standardy biopesticidů**

Obecně se jedná o nejčastější složky silic. Standardy je vždy nutné volit podle analyzovaných nebo předpokládaných složek biopesticidu. Certifikované analytické standardy se kupují v pevném nebo kapalném stavu s deklarovanou čistotou a následně jsou uchovávány na temném a chladném místě, tak aby nedocházelo k jejich degradaci.

- **Zásobní roztoky biopesticidů.**

Dle požadavků analýzy se pro každý analyt připraví zásobní roztok o přesné koncentraci. V této metodice jsou použity zásobní roztoky o koncentraci 1 mg/ml n-hexanu. Navažuje se alespoň 10 mg s přesností na 5 desetinných míst, navážka se přepočte na deklarovanou čistotu standardu a přidá se příslušné množství rozpouštědla. Roztoky se uchovávají v zatěsněné skleněné vialce při 4 °C a jejich stabilita se pravidelně ověřuje, nejméně 1x za měsíc.

- **Pracovní roztoky směsí standardů**

Pracovní směsné roztoky se připraví ředěním zásobních roztoků dle požadovaného rozsahu analýzy obvykle je připravena desetinná ředící řada 1 až 10^{-6} mg/ml n-hexanu. Pro každý použitý biopesticid je nutné navrhnout vlastní směs standardů tak aby mohly být kvantifikovány látky s různým retenčním časem (Tabulka 2) a současně byly tyto látky zastoupeny v majoritním množství.

- **Matricové kalibrační směsi**

Analyty ve standardní směsi mohou být významně ovlivněny přítomností matričních ko-extraktů a jejich odezva na detektoru může být výrazně odlišná oproti standardu v čistém rozpouštědle. Pro spolehlivou kvantifikaci analytů v přítomnosti extraktu vzorku je vhodné použít matricové kalibrační standardy, které se připraví ředěním pracovních směsných roztoků extraktem požadované matrice, přičemž obsah této matrice by měl být minimálně 80%. Stabilita pesticidů v přítomnosti matrice je nižší, proto je nutné tyto směsi připravovat čerstvé před každou analýzou.

- **Vnitřní standardy (ISTD)**

Roztok v n-hexanu, koncentrace $c = (2,5-10)$ mg/ml, přidává se do každého analyzovaného vzorku tak aby jeho výsledná koncentrace byla 10 μ g/ml. Pro analýzu silic mohou být jako vnitřní standardy použity nonan a oktadekan. Vnitřní standardy se volí dle požadavků analýzy a slouží ke kontrole retenčních časů, výtěžnosti a/nebo ke kvantifikaci obsahu stanovovaných analytů.

- **Kapalný dusík**

Homogenizaci vzorků je nutné provádět při nízkých teplotách tak, aby nedocházelo k nechtěnému snížení výtěžnosti metody.

3.2. Přístroje a pomůcky

- Plynový chromatograf s hmotnostní spektrometrem (GC-MS)
- Plynový chromatograf s plamenoionizačním detektorem (GC-FID)
- Analytická kolona, např.:

- DB XLB 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm (J&W Scientific),
- VF5-MS 30m x 0,25mm x 0,25 μm (Varian),
- DB 1701 30m x 0,25mm x 0,25 μm (J&W Scientific)
- Analytické váhy s přesností $\pm 1\text{mg}$
- Centrifugační zkumavky s víčkem
- Nylonové centrifugační filtry
 - např.: Corning® Costar® Spin-X® 0,45 μm
- Ultrazvuková lázeň
- Vialky skleněné, šroubovací, objemy 2 ml s inserty 200 μl
- Třecí misky s tloučky
- Dewarova nádoba pro manipulaci s kapalným dusíkem

3.3. Doporučený způsob odběru vzorků a extrakce

Z ošetřeného rostlinného materiálu se odebere reprezentativní vzorek. Aby bylo dosaženo reprezentativního vzorku, je doporučeno vzorkování alespoň z 5 různých částí rostliny. Vzorek je homogenizován v třecí misce v kapalném dusíku, dokud nevznikne homogenní sypká směs. Při manipulaci s kapalným dusíkem je nutné dbát zvýšené opatrnosti a používat osobní ochranné pomůcky. Homogenní směs se opatrně nabere tak, aby nedocházelo k termálnímu šoku, je vhodné nabrat směs rovnou do centrifugačního filtru o známé hmotnosti. Z rozdílu hmotností je vypočtena navážka vzorku a přidá se odpovídající množství n-hexanu v poměru 2:1. Doporučená je navážka 200-250 mg. Zkumavka s filtrem se uzavře a intenzivně se protřepe, následně je umístěna do ultrazvukové lázně na 5 minut. Po extrakci jsou vzorky centrifugovány 15 000 ot. 3 minuty. Po centrifugaci jsou odstraněny vnitřní části filtrů s pevným obsahem a extrakt je odpipetován do skleněné vialky. Pro přesné oddělení zbytkové vody od extraktu je možné filtrační zkumavku ponořit na pár sekund do kapalného dusíku a následně odpipetovat extrakt.

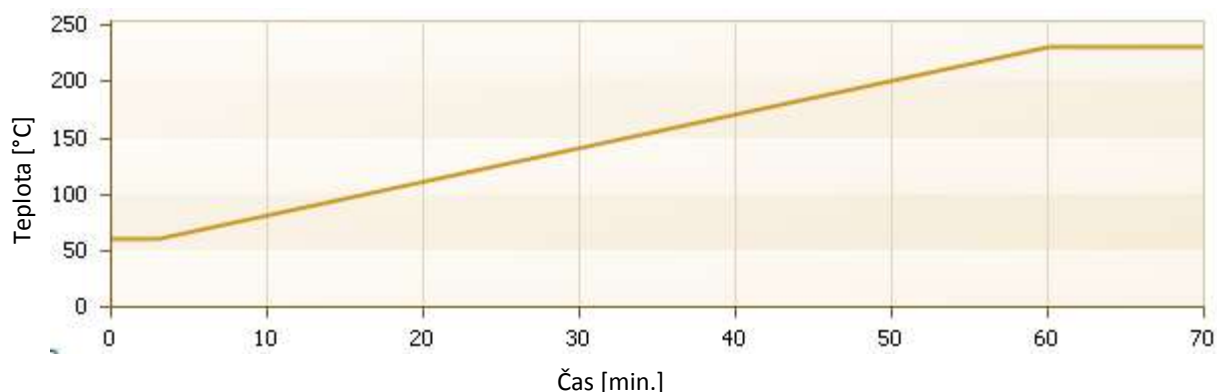
3.4. GC-MS, GC-FID stanovení

150-200 μl extraktu se převede do 2ml vialky s insertem a provede se analýza metodou GC-MS (Příklad 1) ve vhodné sekvenci vzorků a standardů. V případě významného nálezu reziduí biopesticidů se použije metoda standardního přídatku ke vzorku, pro přesnější kvantifikaci obsahu se provede měření metodou GC-FID. Měření může být provedeno na různých přístrojích

s odlišnými technickými parametry a na různých analytických kolonách, za předpokladu dosažení uspokojivých výsledků.

Příklad 1: Vhodný teplotní program pro stanovení účinných látek ze silic

Agilent 7890A; kolona: HP-5MS 5 % Phenyl Methyl Siloxan, 30 m x 250 μm x 0,25 μm ;
s teplotní rampou 60 $^{\circ}\text{C}$ / 3 min. \rightarrow 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. \rightarrow 231 $^{\circ}\text{C}$ / 10 min



3.5. Kontrola kvality

K zajištění kvalitativních zkoušek stanovení lze použít postupy uvedené v dokumentu SANCO/1257/2013 nebo použít modifikaci postupů z Jednotné pracovní postupy zkoušení krmiv - Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou GC-MS (ÚKZUZ, 2014)

- **Zkouška na přítomnost interferencí (slepý pokus)**

Připraví se procesní slepý pokus a slepý pokus s matricí bez přítomnosti sledovaných analytů. Chromatogram slepých vzorků nesmí obsahovat významné interferující píky v retenčním čase pro jednotlivé stanovované látky.

- **Kontrola kvality pomocí ISTD**

Pro GC aplikace se použijí jako ISTD pouze ty sloučeniny, které nejsou významně ovlivňovány matricí. Vlivem nežádoucích efektů na ISTD během analýzy může dojít k chybám při kvantifikaci. Ztráty ISTD během extrakce a čištění vedou k nadhodnocení obsahu stanovovaných analytů a tato chyba výrazně převyšuje ostatní zdroje chyb. Pro matricový efekt při GC aplikacích je typické zesílení signálu a má za následek podhodnocení výsledku.

- **Kontrola kvality pomocí obohacených vzorků**

Pro tento účel lze využít vzorek se zanedbatelným obsahem zájmových analytů, který se obohatí přídatkem testovaných látek na relevantních hladinách, tj. hladina odpovídající reporting limitu nebo jeho násobku, případně na hladině maximálního reziduálního limitu. Povolený rozsah výtěžností při rutinní kontrole kvality je 60 % až 140 %.

Příklad 2: Experimentální ověření výtěžnosti standardů

	p-cymen	γ -terpinen	tymol	linalool	β -citronelol	geraniol	limonen	citral	geranyl acetát
Průměr [%]	95	96	80	94	88	89	134	120	107
SD [%]	24	19	13	9	11	11	27	35	27

- **Kontrola kvality pomocí interních referenčních materiálů**

Pro tento účel lze využít vzorky získané při účasti v testech způsobilosti pořádaných EU-RL pro rezidua pesticidů, uchovávané v zamrazeném stavu.

3.6. Retenční indexy nejčastějších složek silic

V následující tabulce (Tabulka 2) jsou uvedeny retenční indexy látek, kterou jsou častou součástí používaných botanických pesticidů.

Tabulka 2: Retenční indexy nejvýznamnějších složek silic na koloně DB-5

standard	RI	standard	RI
anisol	921	borneol	1169
α -pinen	937	(+)-mentol	1176
kamfen	952	4-terpineol	1181
benzaldehyd	963	d-dihydrokarvon	1198
β -pinen	979	estragol	1199

myrcen	993	2-dekanol	1202
butyl-isothiokyanát	999	(-)-menthon	1223
α -terpinen	1019	β -citronelol	1234
p-cymen	1028	citral	1244
limonen	1032	(-)-karvon	1247
eukalyptol	1034	geraniol	1259
γ -terpinen	1063	cinnamaldehyd	1271
(+)-fenchon	1089	(-)-bornyl acetát	1287
linalool	1102	tymol	1296
růžový oxid	1112	karvakrol	1306
kafr	1146	eugenol	1361
isopulegol	1149	geranyl acetát	1387
(+)-citronelal	1158	β -karyofylen	1420
		citronelyl propionát	1448

4. Výpočet a vyjádření výsledků

4.1. Identifikace

Pro potvrzení přítomnosti stanovovaného analytu ve vzorku lze použít více parametrů:

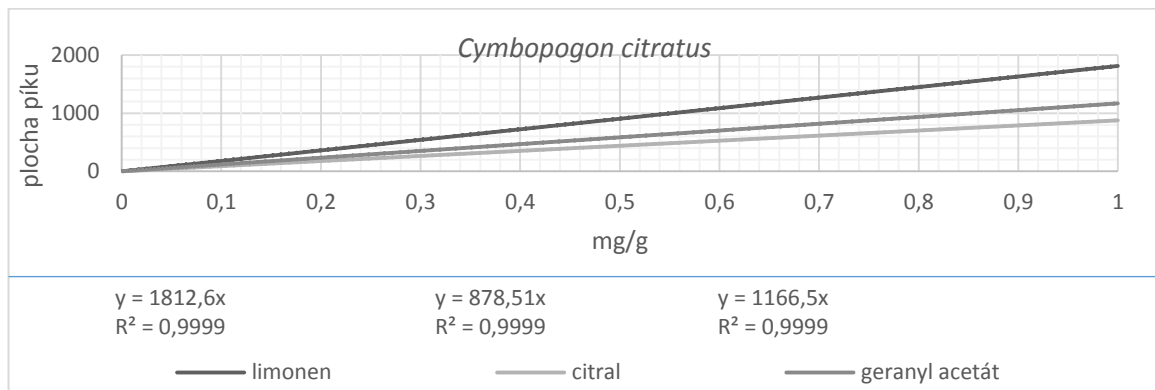
- Retenční čas (RT) analytu přepočtený na retenční (Kovatsův) index (RI)
- Charakteristický tvar píku analytu
- Charakteristické spektrum hmot fragmentů v MS spektru

Parametry pro identifikaci jednotlivých analytů se získají proměřením analytických standardů. Pro vyšší stupeň jistoty může být provedeno konfirmační stanovení za jiných chromatografických separačních podmínek. Vzorek se zpracovává s přidavkem vnitřního standardu, který umožní korekci na změnu objemu extrakčního rozpouštědla během procesu čištění i nastříkovaného objemu vzorku při vlastní chromatografické analýze.

4.2. Kvantifikace

Kvantifikace látek ve vzorku je provedena na základě matricových kalibračních křivek. Do známého množství matrice je přidáno známé množství analytu. Následně je provedeno GC FID stanovení a je odečtena plocha píku jednotlivých koncentrací. Při sestavování kalibračních křivek by měla být dodržena linearita $R^2 \geq 0,999$ (Příklad 3).

Příklad 3: Kalibrační křivky pro hlavní složky silice Cymbopogon citratus



5. Validace metody

5.1. Spolehlivost a použitelnost metody

Metoda byla ověřena analýzou obohacených reprezentativních matric na různých koncentračních hladinách. Základní validační parametry, výtěžnost a opakovatelnost stanovení pro většinu pesticidních látek vyhovovaly požadavkům na QA. Výtěžnost se obvykle pohybovala v povoleném rozmezí 70 % až 130 % (Příklad 2 nahoře) a relativní standardní odchylka opakovaného stanovení byla menší než 30 %.

Dosažitelné meze detekce a meze stanovitelnosti pro tuto metodu úzce souvisejí s množstvím stanovovaných parametrů ve vzorku, s citlivostí a selektivitou použitého přístrojového uspořádání, ale jsou vesměs dostatečné pro zjištění přítomnosti reziduí pesticidů i na hodnotě 0,01 mg/kg (obvyklá nejnižší hodnota MRL).

6. Srovnání „novosti postupů“

Aplikace nejrozličnějších látek rostlinného původu patří mezi progresivní způsoby ochrany rostlin. Ať již se jedná o rostlinné extrakty, silice nebo produkty rostlinného metabolismu, je

testování a používání těchto substancí celosvětovým trendem. Účinnost řady látek je v současné době zkoumána a některé momentálně procházejí v nejrůznějších zemích registračními řízeními (např. NeemAzal, SRN; Neem oil, Indie, další viz tabulka 1). V současné době v ČR neexistuje metodika, která by se uceleně zabývala stanovením přítomnosti reziduí aplikovaných látek z rostlinných silic v rostlinném materiálu. Metodika využívá ke stanovení těchto látek chromatografických analytických technik. Významnou novostí je také metoda přípravy vzorku, kdy je pro homogenizaci použito zmrazení vzorku v tekutém dusíku, díky kterému je zabráněno odpaření těkavých látek, a extrakce za použití centrifugačních mikrozkušavek s filtrem, které umožňují rychlé zpracování velkého počtu vzorků.

Analýzy pesticidů jsou důležitou součástí kontroly ekologické produkce, avšak nemohou tuto kontrolu nahradit. Vzhledem k faktu, že některé pesticidy se velmi rychle rozkládají, analýzy nemohou postihnout všechny případy použití nepovolených pesticidů v ekologické produkci. Pro co nejvyšší efektivitu kontrolního systému je třeba analýzy reziduí pesticidů kombinovat s dalšími kontrolními mechanismy, jako je např. vizuální kontrola. Analýzy reziduí pesticidů založené na hodnocení rizik jsou mnohem účinnější než necílený (plošný) monitoring. Šíření informací o možnostech analýzy reziduí pesticidů v rámci sektoru ekologické produkce rovněž působí jako prevence proti možným podvodům.

7. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena jak odborné veřejnosti, tak i výzkumným institucím, které se zabývají výzkumem přírodních látek a jejich využitím v ochraně rostlin. Například: Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI), Státní veterinární správa (SVS), Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ). Analýzy reziduí pesticidů také provádí v mnohem menším měřítku soukromé kontrolní a certifikační organizace (kontrolní subjekty). Pro výzkum je dále třeba zjistit residua pesticidů nejen z hlediska jejich případných nežádoucích vlivů, ale také pro stanovení efektivních dávek, způsobů aplikace a stanovení účinnosti jednotlivých látek. Uplatnění tak bude významné i z hlediska zavádění jednotlivých pesticidů do pěstitelské praxe.

8. Ekonomické aspekty

Uživatelé metodiky budou nabízet popsané stanovení jako jeden ze svých produktů/služeb. Náklady na zavedení metodiky lze rozdělit na investiční a materiálové.

Investiční náklady na pořízení potřebného vybavení lze odhadnout na 2 000 000,- Kč. Zásadní je pořízení plynového chromatografu s hmotnostním a plamenoionizačním detektorem, a pak další vybavení, zejména analytické váhy, centrifuga, ultrazvuková lázeň, pipety, Dewarova nádoba. Většina analytických laboratoří tímto vybavením již disponuje. Materiálové náklady lze odhadnout ve výši 300,- Kč na vzorek. Jedná se zejména o spotřební materiál k přípravě vzorku, např. kapalný dusík, nylonové centrifugační filtry, třecí misky, a spotřební materiál k provedení GC analýz, např. analytické kolony, vialky, inserty, technické plyny, standardy, rozpouštědla. Dále je třeba započítat osobní náklady, podle provedených příkladů je možno počítat s celkovým časem 10-30 minut na jeden vzorek, kdy větší počet vzorků významně zkrátí celkový čas přepočtený na jeden vzorek. Osobní náklady tak dosáhnou cca 100,- Kč na jeden vzorek. Cena jedné analýzy, za kterou bude nabízena, se bude pohybovat v cenové relaci cca 3000,- Kč za vzorek. Vzhledem k těžko předvídatelnému rozvoji ve využití ekologických pesticidů na bázi rostlinných silic, lze uvést možné příklady. Při analýze 100 vzorků ročně bude zisk očištěný od nákladů ve výši 300 000,- Kč, analogicky při analýze 1000 vzorků bude zisk 3 000 000,- Kč ročně.

9. Příklad použití

Metodika byla využita při stanovení residuí 3 silic a celkem 9 obsahových látek na mrkvi a cibuli ošetřené roztokem těchto silic. Konkrétní výsledky jsou uvedeny výše (příklad 1 a 2).

10. Seznam použité související literatury

Antunes, M. D. C. & Cavaco, A. M. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour Fragr. J.* 25, 351–366 (2010).

Barkai-Golan, R. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. *Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables* (Elsevier, 2001).

Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–53 (2004).

Carvalho, F. P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environ. Sci. Policy* 9, 685–692 (2006).

TNS Opinion & Social. Special Eurobarometer 354 Food-related Risks. Special Eurobarometer 354, Wave 73.5 (2010). In

http://ec.europa.eu/public_opinion/archives/ebs/ebs_354_en.pdf

Kim, J., Marshall, M. R. & Wei, C. I. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2839–2845 (1995).

Kotan, R. et al. Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 153, 34–41 (2013).

Lang, G. & Buchbauer, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr. J.* 27, 13–39 (2012).

Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M. & Pulkrabek, J. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control* 20, 157–160 (2009).

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, 2014, Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou GC-MS, *Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv*.

Matos, O. Aromatic plants as sources of photoactive biological products useful to crop protection. in *Acta Horticulturae* 933, 531–538 (2012).

Măruțescu, L. et al. In vitro susceptibility of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et. al. to *Citrus maxima* essential oil. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 68, 223–7 (2009).

Tripathi, P. & Dubey, N. . Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 32, 235–245 (2004).

11. Seznam publikací

Zarubova, L., Kourimska, L., Zouhar, M., Novy, P., Doua, O., & Skuhrovec, J. (2014). Botanical pesticides and their human health safety on the example of *Citrus sinensis* essential oil and *Oulema melanopus* under laboratory conditions. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, 65(1), 89–93. doi:10.1080/09064710.2014.959556

12. Dedikace

Tato metodika vznikla v rámci řešení výzkumného projektu QJ1310226 „Vývoj nových metod ochrany obilnin a zeleniny proti významným patogenům a škůdcům pomocí botanických pesticidů využitelných v ekologickém i integrovaném zemědělství“.