
STANOVENÍ REZIDUÍ BOTANICKÝCH PESTICIDŮ POMOCÍ SPME-GC

uplatněná certifikovaná metodika

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

Obsah

1.	Úvod.....	2
2.	Cíl metodiky.....	4
3.	Vlastní popis metodiky	4
3.1.	Chemikálie	4
3.2.	Přístroje a pomůcky.....	6
3.3.	Doporučený způsob odběru vzorků a extrakce	6
3.4.	GC-MS 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“	11
7.	Popis uplatnění certifikované metodiky.....	11
8.	Ekonomické aspekty	12
9.	Seznam použité související literatury	12
10.	Seznam publikací,.....	14
11.	Dedikace	14

1. Úvod

Syntetické pesticidy jsou po desetiletí široce používány v zemědělství proti rostlinným chorobám a škůdcům a jejich nadměrné využívání vedlo v minulosti k závažným zdravotním a ekologickým rizikům. Ačkoliv nová legislativa EU vedla ke značnému snížení počtu povolených účinných látek a k výraznému zlepšení bezpečnosti, používání syntetických pesticidů je stále považováno za potenciální riziko pro lidské zdraví, potravinovou bezpečnost a životní prostředí. V tomto ohledu představují rostlinné silice riziko nesrovnatelně nižší a díky svému přírodnímu původu se jeví jako ideální ekologicky šetrná alternativa konvenčních prostředků, vhodná pro implementaci v integrované ochraně rostlin, zejména pak v ekologickém zemědělství, kde je používání syntetických pesticidů zakázáno.

Rostlinné extrakty jsou využívány v boji proti chorobám a škůdcům rostlin již přes 3 tisíce let, první písemné zmínky o použití extraktů pocházejí z Číny. V průběhu vývoje zemědělství, zejména pak v 20. stol. zaznamenala značný rozvoj chemická ochrana rostlin, 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 řadě dalších rozvinutých zemí. Problémy s chemickými pesticidy vedly u některých z nich ke striktnímu zákazu používání, zároveň pak 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 rostlinné bázi je v současnosti podporován řadou domácích i zahraničních projektů. Přesto však jsou poznatky o sekundárních rostlinných metabolitech a jejich biologické aktivitě stále velmi limitované.

Používání pesticidů pro ochranu zemědělských plodin je v současnosti revidováno a regulováno v Evropské unii (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) 396/2005 a 1095/2007), stále více pozornosti je pak věnováno hodnocení vlivu těchto látek na zdraví lidí a hospodářských zvířat a na životní prostředí. Obavy z nepříznivých dopadů syntetických látek masově používaných pro ochranu rostlin se v mnoha případech potvrdily, což vedlo v posledních letech například k zákazu používání metylbromidu (k 1. 1. 2005 v celé EU) a omezení používání neonikotinoidů a fipronilu. Přesto je objem konvenčních pesticidů používaných v ČR k ochraně rostlin stále značný, například v roce 2009 bylo jen k ošetření polních kultur použito 10 934 tis. kg přípravků. To jsou jedny z hlavních motivů vedoucí vědce k intenzivnímu hledání nových

alternativních strategií ochrany rostlin proti škůdcům a původcům chorob. Tyto komplexní strategie musí být nejen šetrné vůči životnímu prostředí, ale rovněž aplikovatelné v integrovaných systémech produkce bezpečných potravin a v neposlední řadě ekonomicky rentabilní. Jedním z alternativních řešení je využití biologicky aktivních látek získaných z rostlin – tzv. rostlinných (botanických) pesticidů, které vykazují aktivitu proti mikrobům či hmyzům škůdcům jakož i proti vektorům patogenů rostlin. Ačkoliv zatím není reálný předpoklad, že by botanické pesticidy mohly plně nahradit masově vyráběné a levnější syntetické pesticidy, přesto lze ve světě pozorovat nárůst spotřeby přípravků na bázi rostlinných extraktů. Tento nárůst je dán především zvyšujícím se zájmem o produkci ekologicky produkováných 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 náročnost uvedení takového přípravku na trh a proto jsou převážně využívány pro nepotravinářské účely. Seznam aktivních látek rostlinného původu povolených legislativou EU je uveden v [Tabulka 1 tabulce 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 / máťový 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 spp. cortex</i>	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 L.</i>	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 jednoduchou a rychlou metodu pro stanovení reziduí biopesticidů na bázi silic v rostlinném materiálu. Tato metoda je doplněna doporučeným způsobem odběru a zpracování vzorků.

3. Vlastní popis metodiky

Samotná metoda stanovení látek metodou SPME-GC je velmi jednoduchá a díky našemu inovativnímu přístupu i velmi rychlá. V pracovním postupu nejsou použita organická rozpouštědla ani jiné toxické látky, čímž se metoda stává šetrnější k životnímu prostředí ve srovnání s klasickými metodami, kdy je vzorek extrahován v organických rozpouštědlech.

3.1. Chemikálie

Používají se pouze standardy látek analytické čistoty, nejlépe kvality pro reziduální analýzu.

- **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. Analyty byly rozpuštěny v destilované vodě s tweenem 80 (detergent, celkový obsah < 1%). Naváží se alespoň 10 mg s přesností na 5 desetinných míst, navážka se přepočte na deklarovanou čistotu standardu a přidá se příslušné množství vody s detergentem. Roztoky se uchovávají v zatěsněné skleněné vialce při 4 °C a jejich stabilita se pravidelně ověřuje, nejméně 1 x za měsíc. Před použitím je nutné roztoky protřepat.

- **Pracovní roztoky směsí standardů**

Pracovní směšné roztoky se připraví ředěním zásobních roztoků dle požadovaného rozsahu analýzy, obvykle je připravena desetinná ředící řada 1 až 10^{-7} mg/ml. 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 koextraktů a jejich odezva na detektoru může být výrazně odlišná oproti standardu v čistém stavu. Pro spolehlivou kvantifikaci analytů v přítomnosti vzorku je vhodné použít matricové kalibrační standardy, které se připraví ředěním pracovních směšných roztoků požadovanou maticí, 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.

3.2. Přístroje a pomůcky

- Plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) opatřený autosamplerm pro SPME analýzu nebo vodní lázeň a držák SPME pro ruční přípravu vzorku
- Analytická kolona, např.:
 - HP-5MS 30 m · 0,25 mm · 0,25 μm (Agilent)
 - DB XLB 30 m · 0,25 mm · 0,25 μm (J&W Scientific)
 - VF5-MS 30 m · 0,25 mm · 0,25 μm (Varian)
 - DB 1701 30 m · 0,25 mm · 0,25 μm (J&W Scientific)
- Analytické váhy
- Headspace vialky 20 ml skleněné, s krimpovacím víčkem
- SPME vlákno – 100 μm PDMS

3.3. Doporučený způsob odběru vzorků a extrakce

V této metodice je minimalizováno zpracování vzorku. Vzorek je odebrán přímo do předem zvážené 20 ml headspace vialky s vloženým magnetickým míchátkem. Odebrané množství by mělo být 180-250 mg. Aby bylo dosaženo reprezentativního vzorku, je doporučeno vzorkování alespoň z 5ti různých částí rostliny.

Extrakce na SPME vlákno probíhá buď v automatickém vzorkovači – 10 minut ekvilibrace a 10 minut sorpce na SPME vlákno při 80 C, nebo je provedena laboratorním technikem manuálně za dodržení stejných extrakčních podmínek jako pomocí vzorkovače. Sorpční schopnosti používaného SPME vlákna musí být pravidelně kontrolovány a v případě snížení sorpčních schopností je nutné provést výměnu vlákna.

3.4. GC-MS stanovení

Pro stanovení reziduí je využito externí kalibrace, kdy jsou vzorky o známé koncentraci změřeny nejdřív samostatně v koncentrační řadě od 10^{-1} až po 10^{-7} mg/g a následně stejné koncentrace v matrici.

Pro účely této metodiky byla vyvinuta nová rychlá GC metoda (Příklad 1), u které je výrazně redukován čas analýzy, aniž by došlo k významné ztrátě chromatografické separace

předpokládaných analytů. Celková délka GC metody je 18 minut, zatímco původně používaná metoda trvala déle než hodinu (Příklad 2). Teplotní program metody je v případě potřeby nutné přizpůsobit stanovovaným látkám tak, aby bylo dosaženo jejich dostatečné separace od ostatních složek analytu. Měření může být provedeno na různých přístrojích s odlišnými technickými parametry a na různých analytických kolonách, za předpokladu dosažení uspokojivých výsledků.

Příklad 1 Parametry GC-MS pro rychlé stanovení limonenu

Teplotní program: počáteční teplota pece 60 C po dobu 1 min., následně zvyšování teploty 10 C/min. až do 130 C, následně 25 C/min. až do 310 C, následně konstantní teplota po dobu 2,8 min. Nástřík (SPME vlákno) do inletu o teplotě 250 C ve splitless režimu, doba desorpce 2 min., nosný plyn helium o průtoku 1 ml/min. Celkový čas analýzy 18 min.

Příklad 2 Původní parametry pro stanovení reziduí botanických pesticidů klasickou extrakcí rozpouštědlem

Teplotní program: počáteční teplota pece 60 C po dobu 3 min., následně zvyšování teploty 3 °C/min. až do 231 °C, následně konstantní teplota po dobu 10 min. Nástřík 1 µl vzorku do inletu o teplotě 250 °C ve splitovém poměru 12:1, doba desorpce 2 min., nosný plyn helium o průtoku 1 ml/min. Celkový čas analýzy 70 min.

3.5. Kontrola kvality

K zajištění kvalitativních zkoušek stanovení lze použít postupy uvedené v dokumentu SANCO/1257/2013 nebo použít modifikaci postupů z Jednotných pracovních postupů zkoušení krmiv - Stanovení obsahu reziduí pesticidů metodou GC-MS (ÚKZÚZ, 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 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 3: Experimentální ověření výtěžnosti pro limonen v různých koncentracích

koncentrace (mg/g)	0,1	0,001	0,000001
Výtěžnost [%]	72	72	109
SD [%]	11	5	11

- **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 zamraženém stavu.

3.6. Retenční indexy nejčastějších složek silic

V následující tabulce jsou uvedeny retenční indexy látek, které 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:

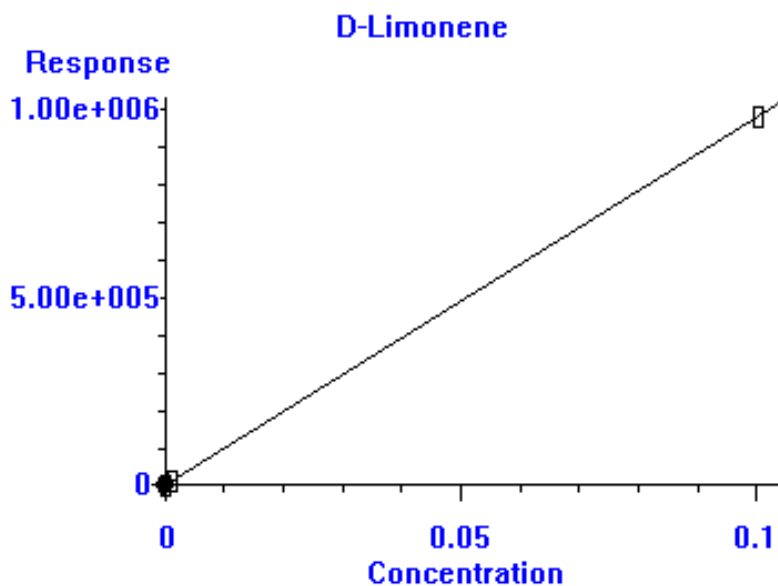
- Retenční čas (RT) analytu přepočtený na retenční (Kovatsův) index (RI)
- Charakteristické spektrum hmot fragmentů v MS spektru
- Společný nástřik vzorku s autentickým standardem

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 odchylky při sorpci a desorpci a změnu sorpčních schopností SPME vlákna.

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/MS stanovení a je odečtena plocha píku jednotlivých koncentrací. Při sestavování kalibračních křivek by měla být dodržena linearita $R^2 \geq 0,999$ (Příklad 4).

Příklad 4: Kalibrační křivka pro limonen



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 limonen vyhovovaly požadavkům na QA. Výtěžnost se pohybovala v povoleném rozmezí 70 % až 130 % (Příklad 3 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 analytů 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“

Ať již se jedná o rostlinné extrakty, silice nebo produkty rostlinného metabolismu, patří aplikace nejrůznějších látek rostlinného původu mezi progresivní způsoby ochrany rostlin a testování a používání těchto substancí se stává celosvětovým trendem. V současné době je zkoumána účinnost řady látek a některé momentálně procházejí registračními řízeními v nejrůznějších zemích (např. NeemAzal, SRN; Neem oil, Indie). Pro stanovení reziduí botanických pesticidů v rostlinném materiálu v současnosti neexistuje žádná oficiální metoda, která by se touto problematikou komplexně zabývala. Předložená metodika využívá ke stanovení těchto látek chromatografických analytických technik. Metodou SPME extrakce s následnou GC-MS analýzou lze detekovat koncentrace rostlinných látek dostatečně nízké, aby bylo možno zjistit obvyklé nejnižší povolené hodnoty reziduí (MLR) 0,01 mg/kg. Tato metoda je např. účinnější než metoda, kterou Adamczyk a kol. stanovil rezidua silic v medu po ošetření včelstva proti parazitickým roztočům. Za využití SPE extrakce se zde detekční limity pohybovaly řádově pouze v desetinách mg/kg.

Analýzy pesticidů jsou důležitou součástí kontroly ekologické produkce, avšak nemohou tuto kontrolu nahradit. Analýzami například nelze postihnout všechny případy použití nepovolených prostředků v ekologické produkci z důvodu velmi rychlého rozkladu některých látek. Za účelem zvýšení efektivity kontrolních systémů je vhodné kombinovat analýzy reziduí s dalšími kontrolními mechanismy, jako je např. kontrola na místě. 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 může také působit jako prevence proti možným podvodům.

7. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena zejména pro vědeckovýzkumné organizace či soukromé subjekty zabývající se výzkumem přírodních látek a jejich využití v ochraně rostlin, v neposlední řadě je pak metodika určena také široké odborné veřejnosti. Může být využita například institucemi jako: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský (ÚKZÚZ), Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) nebo Státní veterinární správa (SVS) a další certifikované

kontrolní subjekty. Residua pesticidů je třeba zkoumat nejen z důvodu jejich případných nežádoucích vlivů, ale také z hlediska způsobů aplikace a stanovení účinnosti jednotlivých látek a jejich efektivních dávek. Vedle aspektů spojených s bezpečností tak metodika najde uplatnění 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 další vybavení, zejména analytické váhy, pipety, SPME automatický nebo ruční dávkovač. Většina analytických laboratoří tímto vybavením již disponuje. Materiálové náklady lze odhadnout ve výši 200 Kč na vzorek. Jedná se zejména o spotřební materiál k přípravě vzorku, např. SPME vlákna, headspace vialky, a spotřební materiál k provedení GC analýz, např. analytické kolony, technické plyny, standardy. 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 ve výši 270 000 Kč, analogicky při analýze 1000 vzorků bude zisk 2 700 000 Kč ročně.

9. Seznam použité související literatury

Adamczyk, S., Lázaro, R., Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Herrera, A., 2005. Evaluation of residues of essential oil components in honey after different anti-varroa treatments. *J. Agric. Food Chem.* 53, 10085–90. doi:10.1021/jf051813f

Antunes, M.D.C., Cavaco, A.M., 2010. The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour Fragr. J.* 25, 351–366. doi:10.1002/ffj.1986

Barkai-Golan, R., 2001. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Development and Control, Postharvest Biology and Technology. Elsevier.

Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

Carvalho, F.P., 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environ. Sci. Policy* 9, 685–692. doi:10.1016/j.envsci.2006.08.002

Damalas, C. a., Eleftherohorinos, I.G., 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 1402–1419. doi:10.3390/ijerph8051402

Isman, M.B., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 45–66. doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151146

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

Kotan, R., Dadasoğlu, F., Karagoz, K., Cakir, A., Ozer, H., Kordali, S., Cakmakci, R., Dikbas, N., 2013. 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. doi:10.1016/j.scienta.2013.01.027

Lang, G., Buchbauer, G., 2012. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour Fragr. J.* 27, 13–39. doi:10.1002/ffj.2082

Măruțescu, L., Saviuc, C., Oprea, E., Savu, B., Bucur, M., Stanciu, G., Chifiriuc, M.C., Lazăr, V., 2009. *In vitro* susceptibility of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et. al. to *Citrus maxima* essential oil. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.* 68, 223–7.

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

Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., Pulkrabek, J., 2009. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control* 20, 157–160. doi:10.1016/j.foodcont.2008.03.007

Ribeiro, N. de C., da Camara, C.A.G., Born, F. de S., de Siqueira, H.A.A., 2010. Insecticidal activity against *Bemisia tabaci* biotype B of peel essential oil of *Citrus sinensis* var. pear and *Citrus aurantium* cultivated in northeast Brazil. *Nat. Prod. Commun.* 5, 1819–22.

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

Tripathi, P., Dubey, N., 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol.* 32, 235–245. doi:10.1016/j.postharvbio.2003.11.005

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

10. Seznam publikací

Zarubova, L., Kourimska, L., Zouhar, M., Novy, P., Douda, O., Skuhrovec, J., Taylor, P., Zarubova, L., Kourimska, L., Zouhar, M., Novy, P., Douda, O., 2014. Botanical pesticides and their human health safety on the example of *Citrus sinensis* essential oil and *Oulema melanopus* under laboratory conditions. *Acta Agric. Scand. Sect. B — Soil Plant Sci.* 65, 89–93. doi:10.1080/09064710.2014.959556

11. 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“.