

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Vliv pesticidů na střevní mikrobiotu lidí

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Kateřina Kočová

Vedoucí práce: prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.

Konzultant práce: Ing. Roman Švejtil

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv pesticidů na střevní mikrobiotu lidí" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Vojtěchu Radovi, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce a konzultantovi Ing. Romanu Švejtilovi za velkou trpělivost, ochotu a pomoc při práci v laboratoři i při zpracování práce.

Dále bych ráda poděkovala všem členům mé rodiny za podporu, kterou mi během doby mého studia a psaní diplomové práce projevili.

V poslední řadě nesmím opomenout poděkovat všem dárcům, kteří věnovali své vzorky stolice pro účely této práce.

Vliv pesticidů na střevní mikrobiotu lidí

Souhrn

Pesticidy jsou látky nebo směsi látek používané v zemědělství proti škůdcům (živočichům, rostlinám a parazitickým houbám), kteří poškozují kulturní rostliny, zásoby zemědělských produktů, potraviny a snižují užitkovost hospodářských zvířat nebo ohrožují zdraví člověka.

Diplomová práce se skládá se ze dvou částí. První část je teoretická, kde je popsáno složení a funkce střevní mikrobioty; pesticidy a jejich klasifikace, environmentální transport a účinky těchto látek na lidské zdraví, dále glyfosát jako účinná složka herbicidu Roundup, jeho mechanismus působení, osud v životním prostředí a prokázané účinky glyfosátu na člověka.

Cílem praktické části této práce bylo testovat vliv pesticidu Roundup na střevní mikroorganismy lidí. Vliv Roundupu byl testován na čistých kulturách v podmínkách *in vitro*. Roundup byl přidán v koncentracích glyfosátu 17 g/L, 1,7 g/L a 0,17 g/L do komplexního média a po kultivaci byl vyhodnocen růst mikroorganismů. Dále byly odebrány vzorky stolice od lidských dobrovolných dárců, které byly podobně kultivovány v komplexním médiu s různými koncentracemi glyfosátu. Po kultivaci byly stanoveny celkové počty mikroorganismů, bifidobakterie, laktobacily, enterokoky a koliformní bakterie.

Při testování pesticidu na čistých kulturách koncentrace glyfosátu 17 g/L statisticky významně inhibovala celkový růst bakterií ($P < 0,05$), u nižších koncentrací již nebyl zaznamenán rozdíl. U kultivace mikroorganismů ze vzorků stolice byla citlivost bakterií na glyfosát prokázána jen u bifidobakterií při nejvyšší užití koncentraci tohoto pesticidu oproti kontrolnímu vzorku.

Klíčová slova: pesticidy, Roundup, glyfosát, střevní mikrobiota

Impact of pesticides on the gut microbiota of human

Summary

Pesticides are substances or mixtures of substances used in agriculture against pests (animals, plants and parasitic fungi), who damage the crops, stocks of agricultural products, food and reduce livestock utility or threaten human health.

The thesis consists of two parts. The first (theoretical) part describes composition and function of gut microbiota; pesticides and their classification, environmental transport and effects of these substances on human health, and glyphosate as the active substance of herbicide Roundup, its mechanism of action, environmental fate and proven effects of glyphosate on human.

The aim of second (practical) part of this thesis was to test impact of pesticide Roundup on the gut microorganisms of human. The impact of pesticide was tested in *in vitro* pure cultures. Roundup was added in concentrations of glyphosate 17 g/L, 1,7 g/L and 0,17 g/L to the complex media and after cultivation the growth of microorganisms was evaluated. The next samples of stool were collected from human volunteers; these were cultivated similarly in the complex media with different concentrations of glyphosate. The total numbers of microorganisms, bifidobacteria, lactobacilli, enterococci and coliformn bacteria were defined after cultivation.

When the pesticide was tested in pure cultures, concentration of 17 g/L glyphosate significantly inhibited total bacterial growth ($P < 0.05$), at lower concentrations no difference was observed. The cultivated microorganisms from samples of stool demonstrated only that bifidobacteria are sensitive to glyphosate at the highest used concentration of this pesticide compared with the control sample.

Keywords: pesticides, Roundup, glyphosate, gut microbiota

Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	CÍL PRÁCE	8
2.1	Hypotéza	8
3	PŘEHLED LITERATURY.....	9
3.1	Střevní mikrobiota.....	9
3.1.1	Složení střevní mikrobioty.....	9
3.1.2	Funkce střevní mikrobioty	11
3.2	Pesticidy	13
3.2.1	Rozdělení pesticidů.....	13
3.2.1.1	Klasifikace podle biologické účinnosti	13
3.2.1.2	Klasifikace podle chemické struktury	14
3.2.1.3	Klasifikace podle působení na cílový organismus	16
3.2.1.4	Klasifikace podle nebezpečnosti	16
3.2.2	Přestup pesticidů do životního prostředí.....	17
3.2.3	Degradace pesticidů po aplikaci	18
3.2.4	Expozice člověka pesticidům.....	19
3.2.5	Účinky pesticidů na lidské zdraví.....	21
3.2.5.1	Akutní toxicita.....	21
3.2.5.2	Chronická toxicita	21
3.3	Glyfosát.....	25
3.3.1	Mechanismus účinku glyfosátu	26
3.3.2	Složení glyfosátových produktů	27
3.3.3	Užití Roundupu.....	28
3.3.4	Aplikační techniky Roundupu	28
3.3.5	Environmentální transport a osud glyfosátu	29
3.3.6	Environmentální zátěž při aplikaci Roundupu.....	30
3.3.7	Expozice člověka glyfosátu	31
3.3.8	Účinky glyfosátu na člověka.....	32
3.3.8.1	Akutní expozice	32
3.3.8.2	Chronická expozice.....	33
3.3.9	Roundup Ready plodiny	34
4	MATERIÁL A METODY	36
4.1	Testování vlivu Roundupu na čisté kultury <i>in vitro</i>	36
4.2	Stanovení hlavních skupin mikroorganismů ve vzorcích stolice.....	36
4.2.1	Analyzovaný materiál	37

4.2.2	Živná média	37
4.2.3	Příprava vzorků.....	38
5	VÝSLEDKY	39
5.1	Testování vlivu Roundupu na čisté kultury <i>in vitro</i>	39
5.2	Stanovení hlavních skupin mikroorganismů po kultivaci ve stolici	45
6	DISKUZE.....	52
7	ZÁVĚR.	55
8	SEZNAM LITERATURY	56
9	SEZNAM PŘÍLOH.....	63
10	PŘÍLOHY	64

1 ÚVOD

Téma diplomové práce „Vliv pesticidů na střevní mikrobiotu lidí“ jsem si vybrala zejména díky mé vlastní zkušenosti s užíváním herbicidu Roundup během svých letních prázdninových brigád, kdy jsem pracovala v údržbě naší obce. Ničení plevelů ve vegetačním období pomocí herbicidu zde bylo (a troufám si tvrdit, že stále je) na denním pořádku. Nikdo tedy asi zatím nepřemýšlel o celkovém množství takto užívaných chemikálií, nad osobní bezpečností exponovaných pracovníků a tím o teoretických dopadech na životní prostředí a zdraví lidí žijících v naší obci.

Pesticidy jsou chemické prostředky a přípravky určené k ochraně rostlin, zásob potravin nebo krmiv, před škůdci a chorobami. Užívají se například v zemědělství, lesnictví, potravinářství a stejné účinné látky se využívají také ve veterinářství. Použití pesticidů je neodmyslitelné v současném konvenčním zemědělství, jelikož zajišťuje vyšší výnosy plodin, vyšší senzorickou, výživovou či technologickou jakost produktů. Aplikace těchto látek však může vést k výskytu reziduí v životním prostředí a potravinách. Proto tedy pesticidy pro člověka představují riziko především ve spojení s chronickou expozicí reziduím pesticidů z potravy a potenciálními negativními zdravotními účinky.

Mikrobiota obsažená ve střevě je někdy považována za „superorgan“¹. Sestává se z bakterií jak aerobních, tak anaerobních, virů, hub a dalších mikroorganismů. Všechny tyto mikroorganismy slouží spolu s imunitním slizničním systémem k ochraně organismu hostitele před patogeny a účastní se některých metabolických pochodů. Mikrobiota gastrointestinálního traktu představuje vyvážený ekosystém, jehož narušením může dojít k uchycení patogenních mikroorganismů a tím ke vzniku onemocnění.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo testovat vliv pesticidu (Roundup) na střevní mikroorganismy.

2.1 Hypotéza

Hypotézou bylo, že různé střevní mikroorganismy se budou v citlivosti ke glyfosátu lišit.

3 PŘEHLED LITERATURY

3.1 Střevní mikrobiota

Lidské tělo je osídleno mnoha různými mikroorganismy. Většina mikroorganismů se vyskytuje v gastrointestinálním traktu (GIT), kde se podílí na mnoha aspektech hostitelské biologie a patobiologie (Camp et al., 2009).

Střevo je přirozeným prostředím pro velké a dynamicky se rozvíjející mikrobiální komunity. Mnoho druhů bakterií se vyvinulo a přizpůsobilo na život a růst v lidském trávicím traktu. Střevo jedince obsahuje 300–500 různých druhů bakterií a počet mikrobiálních buněk v lumen střeva se většinou uvádí asi desetkrát vyšší než je počet eukaryotických buněk v lidském těle (Guarner, 2003; Savage, 1977). Izraelský mikrobiolog Sender však po analýze aktuálně dostupné literatury uvádí, že v průměrném lidském těle se nachází $3,9 \cdot 10^{13}$ bakterií a $3,0 \cdot 10^{13}$ lidských buněk, a proto je počet bakterií a našich buněk v organismu podobný. Vzhledem k tomu, že jsou si tato množství tak podobná, každá defekace pak může zvrátit tento poměr ve prospěch lidských buněk na úkor počtu bakterií (Sender et al., 2016).

3.1.1 Složení střevní mikrobioty

Selektivní tlaky, které působí na mikroorganismy v různých proximálně-distálních místech zažívacího traktu, mají za následek odlišné složení mikrobiální komunity (Tabulka 1). V orálních částech gastrointestinálního traktu převládají aerobní mikroorganismy, směrem aborálním pak dochází k postupné dominanci anaerobů (Camp et al., 2009).

Přesná množství mikroorganismů není možné určit kvůli nemožnosti kultivace všech mikroorganismů klasickými kultivačními metodami a limitacím při odběru vzorků (Guarner and Malagelada, 2003).

V proximální části tenkého střeva je mikrobiální složení podobné jako v žaludku a je do jisté míry ovlivňováno patologickými stavy žaludku. Průměrná koncentrace bakterií v proximální části tenkého střeva u dospělého jedince je 10^{3-4} CFU/g střevního obsahu. V jejunu převládají aeroby a grampozitivní bakterie, ale vyskytují se zde i koliformní bakterie a anaeroby. V ileu, v jeho proximální části, nalezneme v malém množství (10^{2-5} CFU/g střevního obsahu) enterobakterie. V následující distální části ilea je mikrobiota již podobná mikrobiotě tlustého střeva, a to díky průniku mikroorganismů přes ileocekální chlopeč.

Převažují zde gramnegativní mikroorganismy nad grampozitivními; běžně se zde objevují koliformní bakterie, bakteroidy, bifidobakterie, fusobakterie nebo klostridia. Aborálně od ileocekální chlopně množství mikroorganismů narůstá, mezi aeroby dominuje *Escherichia coli* (10^{7-8} CFU/g střevního obsahu), další rody a druhy čeledi *Enterobacteriaceae* a enterokoky. Z anaerobů převládá *Bacteroides fragilis* a *Eubacterium* sp., často se zde vyskytují i anaerobní grampozitivní koky (*Peptostreptococcus* sp., *Peptococcus* sp.), *Clostridium* sp. (Lata a Juránková, 2011).

Specifické selektivní tlaky působící v rámci biotopu hostitelského trávicího traktu (imunita hostitele, fyziologie, strava) dále formují rozmanitost gastrointestinální mikrobioty. Není zcela jasné, které faktory uvnitř hostitelského prostředí jsou odpovědné za výběr specifické mikrobiální komunity, nicméně experimenty na zvířecích modelech začínají objasňovat přínos hostitelského genotypu a stravy na gastrointestinální mikrobiální různorodost (Camp et al., 2009).

Tabulka 1 Složení lidské střevní mikrobioty (Nord and Kager, 1984)

Mikroorganismy	Počty mikroorganismů CFU/g			
	žaludek	jejunum	ileum	colon
celkový počet bakterií	0-10 ³	0-10 ⁵	10 ³ -10 ⁹	10 ¹⁰ -10 ¹²
aerobní bakterie				
čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>	0-10 ²	0-10 ³	10 ² -10 ⁷	10 ⁴ -10 ¹⁰
streptokoky	0-10 ³	0-10 ⁴	10 ² -10 ⁶	10 ⁵ -10 ¹⁰
stafylokoky	0-10 ²	0-10 ³	10 ² -10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁹
laktobacily	0-10 ³	0-10 ⁴	10 ² -10 ³	10 ⁶ -10 ¹⁰
kvasinky	0-10 ³	0-10 ²	10 ² -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁶
anaerobní bakterie				
bakteroidy	vzácné	0-10 ³	10 ³ -10 ⁷	10 ¹⁰ -10 ¹²
bifidobakterie	vzácné	0-10 ⁴	10 ³ -10 ⁹	10 ⁴ -10 ¹¹
peptostreptokoky	vzácné	0-10 ³	10 ² -10 ⁶	10 ¹⁰ -10 ¹²
klostridia	vzácné	vzácné	10 ² -10 ⁴	10 ⁶ -10 ¹¹
eubakterie	vzácné	vzácné	vzácné	10 ¹⁰ -10 ¹²

Bakteriální kolonizace každého jedince začíná v průběhu porodu, kdy novorozenec přichází do kontaktu s mateřskou vaginální mikrobiotou. U dětí narozených císařským řezem jsou zdrojem bakterií, které kolonizují gastrointestinální trakt novorozence, prostředí a

nemocniční personál (Bezirtzoglou, 1997). Prvotní mikrobiota kolonizující střeva novorozence při přirozeném porodu jsou především anaeroby mateřského původu.

U novorozenců narozených císařským řezem se tato mikrobiota vyznačuje nedostatkem anaerobních bakterií, protože tyto bakterie nepřežijí kontakt se vzduchem; osídlování proto probíhá mikroaerofilními mikroorganismy, fakultativně anaerobními a sporulujícími formami bakterií. Prostředí střeva novorozence při narození vykazuje pozitivní redox potenciál. Proto jsou mezi prvními kolonizátory fakultativně anaerobní bakterie, které tento redoxní potenciál snižují spotřebováním kyslíku a vytváří tím tak prostředí vhodné pro striktně anaerobní bakterie, jako jsou *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. a *Bifidobacterium* spp., které se obvykle objeví ve velkém množství v průběhu prvního týdne života. Významný vliv na vznikající mikrobiotu má také kojení. U dětí krmených umělou výživou dominují mezi anaeroby bakteroidy a bylo také nalezeno velké množství enterobakterií (Bezirtzoglou, 1997). Naproti tomu mateřské mléko obsahuje velké množství oligosacharidů, což je jedna z hlavních složek, která selektivně urychluje růst bifidobakterií, a proto v mikrobiotě dětí kojených mateřským mlékem převažují bifidobakterie (Kunz et al., 2000).

Střevní mikrobiota novorozenců se vyznačuje nízkou rozmanitostí. Díky rychlému rozvoji bakteriální komunity a vývoji celkového imunitního systému se však dětská střevní mikrobiota již od konce druhého roku života zcela podobá mikrobiotě dospělých (Rodríguez et al., 2015).

3.1.2 Funkce střevní mikrobioty

Komunita mikrobiálních buněk a genů, kterou náš gastrointestinální trakt obsahuje, nám poskytuje zásadní pomoc při základních fyziologických procesech od trávení a růst až po vlastní obranné mechanismy.

Střevní mikroorganismy jsou zapojeny do různých metabolických reakcí. Metabolická rozmanitost kódovaná ve střevní mikrobiotě zlepšuje účinnost trávení živin a umožňuje tak hostiteli získat živiny, které by pro něj byly jinak nedostupné, např. fermentací nestravitelné vlákniny v potravě (rezistentní škroby, celulóza, hemicelulóza, pektiny nebo slizy). Konečnými produkty těchto metabolických reakcí jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (např. kyseliny octová, máselná, propionová), které jsou absorbovány do střevní stěny, kde butyrát a propionát regulují růst a diferenciaci kolonocytů a fungování imunitního systému, slouží jako zdroj energie pro hostitelské tkáně, zatímco acetát je substrátem pro

lipogenezi a glukoneogenezi (Macfarlane et al., 2011). Mikrobiální fermentací vznikají také monosacharidy, které jsou střevní stěnou absorbovány a posléze dopraveny do jater, kde indukují lipogenezi *de novo*. Střevní mikrobiota rovněž přispívá do hostitelského metabolismu biotransformací konjugovaných žlučových kyselin, syntézou některých vitamínů (zejména K a B₁₂) nebo pomocí vzniklých mastných kyselin s krátkým řetězcem zvyšuje vstřebatelnost některých důležitých minerálních látek, například vápníku, hořčíku a železa. (Camp et al., 2009; Guarner and Malagelada, 2003). Mikrobiota však při produkci mastných kyselin také produkuje určité množství potenciálně toxických látek zahrnujících amoniak, aminy, fenoly, thioly nebo indoly (Smith and Macfarlane, 1996). Střevní mikrobiota též hraje klíčovou roli při přeměně různých bioaktivních látek, zejména polyfenolů, na vstřebatelné aktivní látky, které poté slouží ke zdravější modulaci střevní mikrobioty zvýšením relativního výskytu bifidobakterií a laktobacilů (Marchesi et al., 2015).

Mezi základní funkce střevní mikrobioty patří také vytváření ochranné bariéry proti patogenním mikroorganismům a je tudíž velmi důležitá při prevenci invaze patogenů do tkání. Mikrobiální bariéru prospěšných komenzálních bakterií ve střevě, která brání přerůstání patogenů a potenciálních patogenů, definoval Waaij (1989) jako kolonizační rezistenci gastrointestinálního traktu vůči patogenům (např. salmonely, shigely, yersinie, kampylobakter, vibria) a potenciálním patogenům (např. klostridia, kandidy). Je to schopnost fyziologické střevní mikrobioty zabránit uchycení a proliferaci patogenů. Součástí je také kontrola oportunní mikrobioty (proteus, pseudomonády, enterobakterie, stafylokoky, streptokoky atd.). Kolonizační rezistence je zajišťována těmito mechanismy: obsazení potenciálních vazebných míst střevní výstelky (tzv. receptorová blokáce), brzdění růstu a/nebo usmrcení cizích mikroorganismů prostřednictvím bakteriostatických a baktericidních látek, konkurence v získávání látek, vitaminů a růstových faktorů, snížení střevního pH produkcí organických kyselin a přímý antagonismus fyziologické mikrobioty vůči patogenům a potenciálním patogenům.

Mikrobiální dysbióza je spojena s rostoucím počtem lidských onemocnění, včetně zánětlivého onemocnění střev a obezity. Je-li nemoc spojená se změnou ve složení nebo činnosti gastrointestinální mikrobioty, základním úkolem je určit, zda jsou pozorované změny příčiny a/nebo následky příslušného onemocnění. Zjistí-li se, že střevní mikrobiota přispívá k etiologii onemocnění, specifická antibiotika, prebiotika nebo probiotika mohou být použita pro regulaci intenzity nebo aktivity zúčastněných členů střevní mikrobioty (Camp et al., 2009).

3.2 Pesticidy

Podle definice FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations – Organizace pro výživu a zemědělství v rámci Organizace spojených národů) se pesticidem rozumí jakákoliv látka nebo směs látek určená k prevenci, ničení nebo zapuzení jakéhokoliv škůdce, včetně vektorů onemocnění člověka nebo zvířat, nežádoucích druhů rostlin nebo živočichů způsobujících škody v průběhu výroby, zpracování, skladování, přepravy nebo uvádění na trh potravin, zemědělských komodit, dřeva a výrobků ze dřeva nebo krmiv, nebo látky, které mohou být podávány zvířatům pro redukci hmyzu, pavoukocvů a dalších škůdců v nebo na jejich těle. Tento termín zahrnuje rovněž látky určené pro použití jako regulátory růstu rostlin, defolianty, desikanty, látky zabraňující předčasnému pádu ovoce před sklizní a látky aplikované na plodiny buď před, nebo po sklizni k ochraně před poškozením při přepravě a skladování (FAO, 2005).

Celosvětově je registrováno přibližně 800 druhů sloučenin, které mají různé pesticidní účinky (Prugar, 2007). Každoročně se použije několik stovek tisíc kilogramů účinných látek, a to jak v zemědělství a průmyslu, ale tak i v domácnostech nebo ve zdravotnictví. Užíváním těchto chemikálií v zemědělství je umožněno výrazné zvýšení výnosů a omezení ztrát produkce během sklizně a skladování. Na druhou stranu se takto do životního prostředí dostává celá řada cizorodých látek, které mohou působit i na jiné (necílové) činitele a nabourávat přírodní ekosystémy. Dalším rizikem je také možnost vzniku rezistence škůdce vůči účinkům pesticidů, zvláště pokud je přípravek neodborně používán.

3.2.1 Rozdělení pesticidů

Syntetické pesticidy jsou v průmyslovém zemědělství široce využívány po celém světě již od 50. let minulého století. Klasifikace těchto agrochemikálií je možná na základě různých kritérií, která uvažují například jejich chemickou strukturu, toxické účinky na organismy (cílové i necílové), vlastnosti podmiňující jejich chování při aplikaci nebo osud v prostředí (biotransformaci, degradaci, transport) (Vědecký výbor pro potraviny, 2005).

3.2.1.1 Klasifikace podle biologické účinnosti

Podle cílových škodlivých organismů, u kterých účinné látky vyvolávají toxické účinky, lze pesticidy rozdělit do několika skupin:

- Zoocidy – přípravky určené k hubení živočišných škůdců; podle působení na cílový organismus se dále dělí na:
 - Insekticidy – přípravky určené k hubení hmyzích škůdců
 - Nematocidy – přípravky určené k hubení hlístic
 - Rodenticidy – přípravky určené k hubení myšovitých hlodavců
 - Moluskocidy – přípravky určené k hubení měkkýšů, zejména plžů
 - Akaricidy – přípravky určené k hubení roztočů
 - Avicidy – přípravky určené k hubení ptáků
 - Piscicidy – přípravky určené k hubení ryb

- Fytocidy – přípravky určené k hubení nebo potlačování nežádoucích rostlin; dále je lze rozdělit na:
 - Herbicidy – přípravky k hubení nebo potlačování jednoletých rostlin a bylin
 - Arboricidy – přípravky k hubení dřevin
 - Muscocidy – přípravky k hubení mechů
 - Algicidy – přípravky určené k hubení řas
 - Lichenocidy – přípravky určené k hubení lišejníků

- Fungicidy – přípravky určené k hubení hub a původců houbových chorob

- Baktericidy – přípravky určené k hubení bakterií

- Specifické přípravky – mají obvykle kombinační účinnost, t.j. insekticidní, fungicidní, často i herbicidní; např. Kuprikol (oxychlorid mědi) – fungicid, částečně baktericid, nebo Dithane (mancozeb) – fungicid a částečně akaricid
(Mentberger, 1998)

3.2.1.2 Klasifikace podle chemické struktury

Jsou zde uvedeny jen vybrané příklady chemických skupin:

- ❖ Organochlorové pesticidy (OCPs) – např. tetrachlormethan, chlordan, DDT, heptachlor
Tyto látky jsou klasifikovány jako insekticidy. Jsou odolné vůči teplu, vlhkosti, záření, biologickému rozkladu a tím, že jsou velmi perzistentní ve vodě a půdě, mohou být reálným nebezpečím pro volně žijící živočichy. Na základě jejich bioakumulační

povahy jsou perzistentní v živočišných a rostlinných tkáních a některé z nich jsou řazeny do perzistentních organických polutantů (POPs), které jsou dané právně závaznou mezinárodní Stockholmskou úmluvou (v ČR ratifikována v roce 2002). První organochlorový pesticid DDT byl použit během II. světové války na ničení vši a komárů rodu *Anopheles* přenášejících malárii. Nicméně, stejně jako většina z OCPs, byl v roce 1972 zakázán kvůli jeho toxicitě. Expozice člověka těmto látkám může způsobit reprodukční toxicitu, teratogenitu nebo zapříčinit předčasný porod. U dlouhodobé expozice lidí je také možný vliv na centrální nervovou soustavu, játra, ledviny a močový měchýř. Některé organochlorové pesticidy jsou však ještě stále používány v určitých rozvojových zemích proti vektorům chorob a hmyzím škůdcům v zemědělství. (Pirsaheb et al., 2015)

- ❖ Organofosfátové pesticidy (OPPs) – např. chlorpyrifos, parathion, malathion, fosmet
Velká skupina insekticidních látek, z nichž některé jsou vysoce toxické a byly použity jako chemické zbraně. Hlavním úkolem těchto pesticidů je inhibice enzymu acetylcholinesterázy (AChE), což vede k akumulaci acetylcholinu na synapsích a tím ke stimulaci centrálního a periferního nervového systému. Při expozici člověka těmto látkám často hrozí otrava, protože se velmi rychle vstřebávají kůží a sliznicemi trávicího a dýchacího traktu. Jsou diskutovány také možné souvislosti se vznikem neurodegenerativních poruch (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, amyotrofická laterální skleróza) a karcinogenity (Sánchez-Santed et al., 2016).
- ❖ Karbamáty – např. aldikarb, methiokarb, pirimikarb, karbofural, maneb, mancozeb
Tyto látky mají široké spektrum biologické aktivity, mohou být použity jako insekticidy, fungicidy, nematocidy, akaricidy, moluskocidy, inhibitory klíčení nebo herbicidy. Jsou lipofilní – v organismu se dostávají do tkání s vysokým obsahem tuku, do centrální nervové soustavy nebo do mléka. Obecně působí neurotoxicky, jsou to reverzibilní inhibitory acetylcholinesterázy. Některé z nich mají nepříznivý vliv na vývoj kojenců a malých dětí (Morais et al., 2012).
- ❖ Syntetické pyrethroidy – např. allethrin, cypermethrin, deltamethrin, imiprothrin
Pesticidy, které pochází z přirozeně se vyskytujících pyrethrinů. Jsou toxické pro hmyz, ale také pro vodní organismy, včetně ryb. Mnoho pyrethroidů je spojováno

s poruchami endokrinního systému, reprodukce a vývoje, zásahů do imunitního systému a rakovinou prsu (Thatheyus a Gnana Selvam, 2013).

3.2.1.3 Klasifikace podle působení na cílový organismus

Pokud účinná látka neproniká do rostlinné tkáně, ale zůstává na povrchu rostliny či škůdce, kde vytváří povrchový depozit a působí tudíž jen v místě ošetření, jsou tyto účinné látky řazeny mezi kontaktní pesticidy. Tyto látky se obvykle aplikují postřikem nebo poprachedem. Naproti tomu systémové pesticidy mají schopnost prostupovat rostlinou či škůdcem a následně mohou být transportovány do celého organismu. Mohou být ale také aplikovány přímo na půdu, odkud jsou pak přijímány kořenovým systémem rostlin. Dále existují kvazi-systémové pesticidy, které po aplikaci penetrují do svrchní části rostliny, odtud však už nejsou dále transportovány do hloubky a šíří se pouze translaminárně. V současné době přibývají na trhu kombinované pesticidy, které obsahují kontaktní a zároveň i systémovou složku.

V praxi se neobejdeme bez znalostí spektra účinku dané látky – pesticidy, zejména herbicidy, lze z tohoto pohledu rozdělit na totální, širokospektré (hubí všechny rostliny) a selektivní, výběrové (hubí pouze určitou část rostlinné vegetace, zejména plevele) (Hajšlová, 2004).

Pro usnadnění komunikace na různých úrovních se většina pesticidů označuje triviálním názvem přijatým technickou komisí ISO (dokument ISO/TC 81 Common names for pesticides and other agrochemicals). Daný pesticid může být obsažen v různých typech přípravků, které se mohou lišit označením, respektive komerčním názvem používaným daným výrobcem. V současné době existuje celá řada přehledů shrnujících vlastnosti pesticidních přípravků, které jsou na trhu aktuálně dostupné. Jedním z nejkomplexnějších zdrojů informací je např. The Pesticide Manual, vydávaný BCPC (Britskou radou pro ochranu plodin) (Prugar, 2008).

3.2.1.4 Klasifikace podle nebezpečnosti

Světová zdravotnická organizace (WHO) dělí pesticidní látky na základě akutní toxicity podle Tabulky 2.

Tabulka 2 Rozdělení pesticidů podle nebezpečnosti (WHO, 2010)

WHO třída		LD ₅₀ pro laboratorního potkana [mg/kg]	
		orálně	dermálně
Ia	extrémně nebezpečné	< 5	< 50
Ib	vysoce nebezpečné	5-50	50-200
II	středně nebezpečné	50-2000	200-2000
III	málo nebezpečné	> 2000	> 2000
U	pravděpodobně bezpečné	5000 a více	

LD₅₀ = dávka látky podaná testovaným jedincům, která způsobí úhyn 50 % jedinců do 24 hodin od expozice

3.2.2 Přestup pesticidů do životního prostředí

Pesticidy se aplikují za přesně stanovených podmínek dle zásad tzv. Správné zemědělské praxe (Good Agriculture Practices). Tento termín popisuje podmínky pro správné používání pesticidů pro efektivní a spolehlivou kontrolu škůdců, aniž by došlo k následným nepříjemným nálezům reziduí pesticidů v potravinách (FAO, 2005). Nelze však nikdy zcela vyloučit zasažení i jiných necílových organismů či kontaminaci životního prostředí. Odhaduje se například, že 65 % přípravku použitého k ošetření ovocných stromů zasáhne listovou plochu, 25 % půdu a 10 % se již během aplikace odpaří do atmosféry. Tyto poměry také závisí na dalších faktorech jako je hustota porostu, velikost částic/kapének aplikačního přípravku nebo velikost průtoku daného přípravku z rozprašovacího zařízení, způsob aplikace, počasí a další (Hajšlová, 2004).

Způsob aplikace je podmíněn formou pesticidního přípravku (např. rozpustný prášek, emulgovatelný prášek, smáčitelný dispergovatelný prášek, popraš, granule, pelety). Přípravky se obvykle aplikují postřikem na rostliny nebo ošetřením rostlin nebo půdy poprachem. Molekuly pesticidů se následně mohou vázat na pevné částice v atmosféře a dochází tak k již výše zmíněné kontaminaci atmosféry. Sorbované na tuhé atmosférické částice nebo ve formě par jsou dále transportovány i do vzdálenějších lokalit. Kromě fyzikálně-chemických vlastností je přestup pesticidů do jednotlivých složek životního prostředí ovlivněn mimo jiné např. teplotou, dešťovými srážkami, rychlostí větru, vlastnostmi půdy apod.

Působením deště se mohou rezidua polárních pesticidů dostávat z rostlin do půdy. Následně mohou být z půdy transportována do povrchových i podzemních vod a být ukládána

v říčních sedimentech. Kontaminaci říčních sedimentů pesticidními látkami ovlivňují další faktory jako je například průtok vody, teplota, obsah aktivního kyslíku, charakter dna apod.

V půdě dochází k sorpci látek na půdní částice, čímž je omezena možnost odbourání pesticidů chemickými procesy nebo působením mikroorganismů (Hajšlová, 2004).

3.2.3 Degradace pesticidů po aplikaci

Degradace těchto látek závisí na povaze a stabilitě jednotlivých pesticidů a probíhá působením fyzikálních (teplota, záření,...), chemických (oxidačně-redukční reakce, hydrolyza,...) a biologických vlivů (činnost mikroorganismů).

Jedním z nejvýznamnějších procesů vedoucích k eliminaci pesticidů ze životního prostředí je fotolýza, soubor reakcí iniciovaných slunečním zářením. Účinkem záření resp. tepla dochází k termickému rozkladu (tzv. přímá fotolýza). Mezi fotochemické reakce se řadí i procesy iniciované působením volných radikálů, které vznikají v prostředí účinkem slunečního záření, reakce se singletovým kyslíkem apod. (tzv. nepřímá fotolýza). Množství odbouraného pesticidu závisí na intenzitě slunečního záření, délce trvání expozice a vlastnostech pesticidu.

Při chemické degradaci pesticidů je důležitou chemickou reakcí hydrolyza. Tato reakce probíhá velmi rychle při vysokých hodnotách pH. Významné jsou také oxidačně-redukční procesy. Tento typ degradace je ovlivněn charakterem vazby pesticidu k půdním částicím, teplotou, pH a vlhkostí půdy.

Pesticidy se obecně rychleji rozkládají v půdách s vyšší biologickou aktivitou, kde probíhá tzv. biodegradace činností mikroorganismů. Řada těchto biotransformací může v konečné fázi vést až k vyloučení pesticidu ze životního prostředí. Pesticidy vstupují do běžných metabolických dějů probíhajících v mikrobiálních buňkách nebo mohou být substrátem pro daný mikroorganismus, resp. zdrojem uhlíku a dusíku. Biodegradace je ovlivňována teplotou, pH, vlhkostí, okysličeností půdy a obsahem živin. Na degradaci látek kontaminujících životní prostředí se významně podílí zejména bakterie. Například rody *Pseudomonas* nebo *Flavobacterium* degradují organochlorové pesticidy přítomné ve vodě a půdě. Také karbamátové pesticidy mohou být degradovány působením mikroorganismů – karbamát aldikarb je účinně degradován bakteriemi rodu *Methylosinus*.

Biodegradace však probíhá i v exponovaných rostlinách a živočiších. Průnikem cizorodé látky do organismu se aktivují biologické ochranné mechanismy, které vedou v řadě

případů k degradaci daného xenobiotika. Rychlost vstupu škodlivých látek a jejich distribuce v organismu, tak i detoxikační a eliminační mechanismy, jsou podmíněny anatomickými, fyziologickými, biochemickými a dalšími faktory.

Biotransformace probíhá ve dvou fázích. První fáze zahrnuje zavedení polárních funkčních skupin do molekuly xenobiotika pomocí katalytického působení enzymů (hydrolázy, oxidázy). Následně tyto primární metabolity vstupují do druhé fáze, kde jsou konjugovány s malými polárními endogenními molekulami za vzniku produktů, které jsou neaktivní a lze je z organismu snadno vyloučit. Vznikající sekundární produkty jsou charakteristické pro jednotlivé druhy organismů. U savců, ptáků a některých ryb se metabolity konjugují s kyselinou D-glukuronovou a redukovaným glutathionem, u bezobratlých živočichů a rostlin dochází ke konjugaci s D-glukosou. U rostlin kromě sekrece také pravděpodobně dochází k ukládání sekundárních produktů do jejich ligninových struktur a tím se stávají nedostupnými pro další metabolické reakce.

Biotransformace má převážně detoxikační charakter, ale mohou vzniknout i toxicitější produkty než původní xenobiotikum, např. u organofosfátů probíhá desulfurizace. (Hajšlová, 2004)

3.2.4 Expozice člověka pesticidům

Celá lidská populace je každodenně vystavena určitému množství reziduí pesticidních látek zejména skrze přijímané potraviny a vodu. Proto byly v nařízení č. 396/2005/ES stanoveny evropské maximální limity reziduí (MLR) v potravinách a krmivech, které jsou pro dané potravinové komodity vyjadřovány v mg/kg. MLR určuje nejvyšší přípustné, toxikologicky přijatelné množství pesticidu, které je výsledkem použití pesticidních přípravků v souladu se správnou zemědělskou praxí při ochraně rostlin během vegetace a skladování, nebo je výsledkem kontaminace životního prostředí dnes již nepoužívanými pesticidy. Cílem je předcházet nepovolenému nebo nadměrnému používání pesticidů a chránit zdraví konzumentů ošetřených plodin. MLR však není toxikologický referenční bod a jeho mírné překročení neznamena bezprostřední ohrožení zdraví konzumenta. Jde pouze o kritérium významné pro kontrolu dodržování příslušných právních předpisů pro aplikaci pesticidů (Prugar, 2008).

Pesticidy mohou do potravního řetězce pronikat přímo – rezidua z ošetřených plodin přecházejí do produktů z nich připravených; nebo nepřímo, dojde-li k přenosu reziduí

z mléka, vajec či masných produktů kontaminovaným krmivem. Studie ukazují, že naše strava často obsahuje více druhů residuí, a proto jsme vystaveni celým směsím pesticidů (Fenik et al., 2011). Celkový toxický efekt těchto směsí ještě není stále dobře popsán, ale je již známo, že některé látky mohou vzájemně působit synergicky a tím jejich společný toxický účinek může být mnohem vyšší než u jednotlivých původních složek (Reffstrup et al., 2010).

Podle studií publikovaných v posledních letech se často nejvyšší množství residuí pesticidů vyskytuje v luštěninách, listové zelenině a ovoci (Bempah et al., 2012; Fan et al., 2013; Yuan et al., 2014). Americká nezisková organizace EWG (The Environmental Working Group) uvádí, že téměř dvě třetiny z 3015 vyrobených vzorků testovaných americkým Ministerstvem zemědělství (USDA) v roce 2013 obsahovaly rezidua pesticidů. Bylo nalezeno celkem 165 různých pesticidů v předložených vzorcích ovoce a zeleniny. Pro rok 2015 byly s nejvyšším zatížením pesticidů stanoveny tyto druhy: jablka, broskve, nektarinky, jahody, hroznové víno, celer, špenát, papriky, okurky, cherry rajčata, dovezené lusky hrášku cukrového a brambory. Každá z těchto potravin měla pozitivní nález na různá rezidua pesticidů a obsahovala vyšší koncentrace pesticidů než ostatní produkty. Například 99 % testovaných vzorků jablek, 98 % broskví a 97 % nektarinek obsahovalo alespoň jedno reziduum pesticidu. Ve vzorku hroznového vína a papriky bylo nalezeno celkem 15 pesticidů, jednotlivé vzorky z cherry rajčat, nektarinek, broskví, cukrového hrášku a jahod obsahovaly 13 různých pesticidů na jeden kus potraviny. Naopak nejmenší množství residuí pesticidů z testovaných vzorků obsahovalo avokádo (pouze 1 % obsahovalo stanovitelné množství pesticidů), žádná rezidua pesticidů nebyla zjištěna u 89 % vzorků ananasu, 82 % kiwi, 80 % papáji nebo 61 % melounu (EWG, 2015).

Kromě dietární expozice může být člověk vystaven pesticidům během manipulace s pesticidními přípravky, lidé žijící v zemědělských oblastech mohou být exponováni vyšším dávkám pesticidů díky inhalaci užívaných přípravků, kdy jsou tyto látky během aplikace unášeny větrem, podobně tak i u pesticidů užívaných v parcích a městských oblastech.

V domácnostech slouží pesticidy k regulaci škůdců a tím mohou být kontaminovány i domy a zahrady. Ingesce, inhalace a dermální kontakt s kontaminovaným prachem může vést k pokračující a rozmanité expozici pesticidům (Starr et al., 2008).

3.2.5 Účinky pesticidů na lidské zdraví

Pesticidy ničí nejen cílové organismy, ale mohou být toxické i pro necílové organismy včetně člověka. Z hlediska možnosti intoxikace těmito látkami jsou nejvíce diskutována rizika související s dlouhodobou expozicí jejich reziduím potravou.

3.2.5.1 Akutní toxicita

Týká se bezprostředních následků určité dávky pesticidů na lidské zdraví, vyplývající z expozice obvykle během posledních několika hodin nebo dní. Akutní účinky mohou představovat četné příznaky, včetně dýchacích potíží nebo poruch nervového systému. Příznaky otravy mají široké rozmezí od pouze mírného podráždění až po smrt daného jedince. Pesticidy mohou způsobovat podráždění očí, nosu a krku; pálení, štípání, svědění, kožní vyrážky a puchýře; nevolnost, zvracení a průjemy; kašel, dušnost, bolesti hlavy a malátnost. Protože jsou tyto příznaky podobné nebo totožné těm, které jsou způsobeny jinými chorobami, akutní otravy pesticidy je často špatně diagnostikovatelné. Děti do šesti let představují více než polovinu hlášených akutních otrav pesticidy, obvykle prostřednictvím náhodného požití nebo dermální expozice (Solomon et al., 2000).

3.2.5.2 Chronická toxicita

Laboratorní a epidemiologické studie naznačují, že určité pesticidy jsou spojeny s karcinogenezí, genotoxicitou, imunotoxicitou, neurotoxicitou, poruchami reprodukce, narušením endokrinního systému, poruchami vývoje, onemocněním kůže, nebo onemocněním dýchacích cest. Studovat chronické účinky pesticidů u člověka je problematické, protože většina lidí je vystavena nízkým dávkám směsí pesticidů a opožděné zdravotní účinky jsou obtížně spojitelné s předcházejícími expozicemi (Solomon et al., 2000).

Karcinogeneze. Důležitým faktorem, který se jeví být důležitým pro karcinogenezi, je geneticky daná vnímavost každého jedince ke karcinogenním účinkům pesticidů (Alavanja et al., 2013). Pesticidy se podílejí na vzniku nebo rozvoji mnoha typů karcinomů, leukémií a lymfomů. Některá z těchto onemocnění jsou poměrně běžná, další zcela vzácná. U mnoha nádorů, které jsou spojovány s pesticidy, roste jejich incidence v industrializovaných zemích. Není však jasné, zda expozice pesticidům je v příčinné souvislosti s rostoucím výskytem těchto nádorů. Ačkoliv žádný z dnes používaných pesticidů nebyl Mezinárodní

agenturou pro výzkum rakoviny (IARC) klasifikován jako prokázaný lidský karcinogen, spousta z nich je uváděna jako potenciálně karcinogenní, např. DDT, toxafen nebo amitrol. Mechanismy, kterými pesticidy přispívají ke vzniku rakoviny, se liší a jeden pesticid může působit více než jedním z hlavních mechanismů, které zahrnují:

- genotoxické účinky – přímé změny v DNA
- promoce – fixace a proliferace abnormálních klonů buněk, tento proces zahrnuje endokrinní účinky, kdy mohou být stimulovány jinak klidné, ale hormonálně senzitivní buňky ke karcinogenezi
- imunotoxické účinky – narušení kontrolních mechanismů.

(Solomon et al., 2000)

Expozice před nebo v průběhu těhotenství zvyšuje riziko akutní lymfocytární leukémie, Wilmsova tumoru a nádory mozku (Daniels et al., 1997). Van Maele-Fabry et al. (2010) analyzovali výsledky 10 studií expozice pesticidům související s prací u žen před, v průběhu a po těhotenství a zdraví jejich dětí. Pracovní expozice pesticidům u matek byla spojena s vyšším rizikem rozvoje leukémie u jejich dětí. Toto riziko bylo u predisponovaných dětí 1,6krát vyšší než u dětí, jejichž matky nebyly v zaměstnání vystaveny pesticidům. Weichenthal et al. v roce 2010 přezkoumali výsledky z publikovaných studií AHS (The Agricultural Health Study) v USA a uvádí, že pracovní expozice pesticidům je pravděpodobně spojená s rostoucím rizikem rozvoje všech typů karcinomů (viz Tabulka 3).

V kanadské studii publikované v roce 1994 byly sledovány následky expozice pesticidům u lidí, kteří s nimi nepracovali, ale žili v oblastech, kde se pesticidy používaly nebo byly unášeny větrem. Bylo zjištěno, že sprejový postřik herbicidu zdvojnásobil riziko výskytu non-Hodgkinova lymfomu u lidí žijících v těchto zemědělských regionech (Morrison et al., 1994). Další kanadská studie zkoumající pracovníky v zemědělství zjistila, že také zvýšený výskyt karcinomů prostaty může být spojen s užíváním pesticidů, zejména DDT, simazinu, lindanu, dichlonu, malathionu nebo karbarylů (Band et al., 2011). Riziko karcinomu prostaty bylo vyšší u těch exponovaných lidí, u kterých se tato nemoc vyskytla již dříve v rodině (Alavanja et al., 2003).

Tabulka 3 Pesticidy související s rakovinou při pracovní expozici pesticidům
(Weichenthal at al., 2010)

PESTICID	TŘÍDA PESTICIDŮ	TYP KARCINOMU
Alachlor	organochlorové p.	lymfhematopoetický systém
Aldicarb	karbamáty	střevo
Karbaryl	karbamáty	kůže
Diazinon	organofosfátové p.	lymfhematopoetický systém, plíce
Dicamba	k. benzoová	plíce, střevo
Dieldrin	organochlorové p.	plíce
Chlordan	organochlorové p.	konečník, leukémie
Chlorpyrifos	organofosfátové p.	lymfhematopoetický systém, plíce, konečník, mozek
Fonofos	organofosfátové p.	leukémie, prostata
Imazetapyr	imidazolinony	střevo, močový měchýř
Metolachlor	chloracetamidy	plíce
Permetrin	synt. pyrethroidy	mnohočetné myelomy
Trifluralin	dinitroanalin	střevo

Neurologické a behaviorální účinky. Mnoho pesticidů, zejména insekticidy, jsou specificky zaměřeny na nervový systém škůdců. Z tohoto důvodu mohou být tyto látky neurotoxické i pro necílové organismy, včetně lidí a jiných savců (Bjørning-Poulsen et al., 2008).

Pesticidy mohou pronikat hematoencefalickou bariérou nebo ovlivňují mozek přerušením přívodu kyslíku, živin, hormonů a neurotransmiterů (Keifer a Mahurin, 1997).

Organofosfáty a karbamáty mohou rušit přenos impulsů v periferním nervovém systému. Expozice vyššími dávkami organofosfátů může mít chronické následky jako smyslové, motorické a autonomní poruchy neuropatie (Thiruchelvam et al., 2000). Kognitivní příznaky po expozici organofosfátům zahrnují zhoršení paměti a psychomotorické rychlosti a afektivní poruchy jako je úzkost, podrážděnost, deprese (Solomon et al., 2000).

Ačkoliv příčiny vzniku Parkinsonovy choroby jsou ještě neznámé, existuje stále více důkazů, že velká část výskytu této choroby může být spojena s environmentálními faktory (Langston, 1998). Belgická studie uvádí, že expozice pesticidům u zemědělských pracovníků

je spojená se zvýšeným rizikem rozvoje Parkinsonovy choroby (Van Maele-Fabry et al., 2012). Van der Mark et al. (2012) po zhodnocení 46 studií studujících vztahy mezi pesticidy a Parkinsonovou chorobou dospěli k názoru, že riziko rozvoje Parkinsonovy choroby se výrazně zvyšuje expozicí pesticidům, zejména herbicidům a/nebo insekticidům, ne však fungicidům. Kromě Parkinsonovy choroby se uvažuje o možném působení pesticidů na rozvoj i Alzheimerovy choroby (Zaganas et al., 2013).

Výzkum zaměřený na účinky pesticidů u dětí a prenatální expozice naznačuje problémy v sociálním chování (Ribas-Fito et al., 2007) nebo poruchy hrubé a jemné motoriky (Guillette et al., 1998).

Endokrinní systém. Pesticidy jsou zapojeny do změněné funkce štítné žlázy a snížení testosteronu a estradiolu, což může vést k neplodnosti v pozdějších fázích života (Meeker et al., 2008).

Reprodukce a poruchy vývoje. Pesticidy mohou mít vliv na lidskou reprodukci přímou toxicitou pro reprodukční orgány nebo mohou narušovat hormonální funkce. Účinky pesticidů na reprodukci mohou zahrnovat menstruační abnormality, mužskou i ženskou neplodnost, nebo hormonální poruchy. Vyuvíjející se plod a dítě jsou neúměrně náchylné ke zdravotním účinkům pesticidů. Vývojová toxicita pesticidů může vést až ke spontánnímu potratu, růstové retardaci, vrozeným vývojovým vadám nebo k funkčním deficitům (Solomon et al., 2000).

Imunitní systém. Existují pouze omezené důkazy, že expozice některým pesticidům může oslabit imunitní systém. Závěry jsou založeny především na studiích na zvířatech, které ukazují poškození imunitních orgánů, supresi buněčné imunity a zvýšenou náchylnost k infekčním chorobám. Dospělí profesně vystavení organofosfátům nebo organochlorovým pesticidům mají zvýšenou četnost a závažnost respiračních infekcí, jako je angína, zánět hltanu nebo zánět průdušek. U těchto pracovníků byla také prokázána snížená obranná reakce neutrofilních granulocytů, včetně zhoršení fagocytózy a snížení jejich adhezních vlastností (Solomon et al., 2000). Pesticidy jsou podezřelé, že zvyšují riziko vzniku alergií a senné rýmy (Weselak et al., 2007).

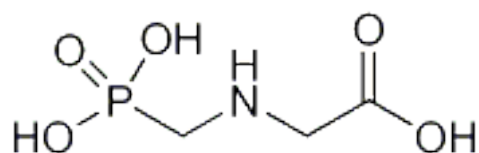
Dýchací systém. Při expozici organofosfátům nebo karbamátům je známo, že tyto látky způsobují inhibici acetylcholinesterázy, což vede k zúžení průdušek, zvýšení sekrece dýchacích cest a respirační nedostatečnosti (Reigart a Roberts, 1999). U některých pesticidů jsou patrné jejich schopnosti senzibilizovat, např. pyrethroidy nebo fungicid tetrachlorisoflalonitril, a mohou tím způsobovat alergické reakce, včetně astmatu (Honda et al., 1992). Avšak souvislost mezi expozicí pesticidům a astmatem je kontroverzní a může být

zkreslena tím, že nemůžeme zcela vyloučit současné působení živočišných, rostlinných a dalších antigenů. Jiné studie potvrzují další respirační změny díky pesticidům, jako jsou plicní hemosideróza, zápal plic, chronická bronchitida, plicní fibróza, Wegenerova granulomatóza nebo poškození dýchacích svalů (Solomon et al., 2000).

Nemoci kůže. Kožní reakce mohou zahrnovat jakoukoliv oblast kůže, včetně oblastí, které jsou kryté oblečením a to zejména v případech, kdy se pesticidy dostanou do kontaktu s oděvem a nasáknou se jím. Nicméně nejčastěji postiženými oblastmi jsou paže, ruce, obličej a krk. Pesticidy způsobují dráždivou dermatitidu, alergickou kontaktní dermatitidu a další kožní problémy včetně fotodermatitidy, pozdních kožních porfyrií nebo chlorakné (O'Malley, 1997). Zejména fungicidy, např. karbamáty maneb, mancozeb, zineb, jsou známé jako potenciální kožní senzibilizátory (Koch, 1996).

3.3 Glyfosát

Glyfosát je derivátem aminokyseliny glycinu, konkrétně N-(fosfonomethyl)glycin. Je to bílý krystalický prášek, který bývá účinnou látkou řady herbicidních přípravků. Produkty určené pro hubení plevelů založené na glyfosátu patří mezi nejčastěji používané širokospektrální herbicidy.



Obrázek 1 Molekula glyfosátu (Petr, 2008)

Molekulu glyfosátu poprvé nasyntetizoval v roce 1950 výzkumník malé švýcarské farmaceutické firmy Cilag, Henri Martin. Herbicidní vlastnosti glyfosátu byly objeveny nadnárodní americkou firmou Monsanto v roce 1970, komerční glyfosátové prostředky pro neselektivní hubení plevelů byly na trh poprvé uvedeny v roce 1974 (Franz et al., 1997) pod obchodním názvem Roundup®. Herbicid si velmi rychle vybudoval své výsadní místo na trhu, v 90. letech minulého století se glyfosát stává nejprodávanější herbicidní aktivní látkou a více či méně si tuto pozici drží i do dalších let. Velká změna přišla v roce 1991, kdy skončila původní patentová ochrana glyfosátu v mnoha částech světa, kromě Spojených států amerických, a tím došlo k okamžitému poklesu cen těchto komerčních přípravků. V roce 2000 končí patentová ochrana glyfosátu i v USA a na trh uvádí glyfosátové přípravky i další

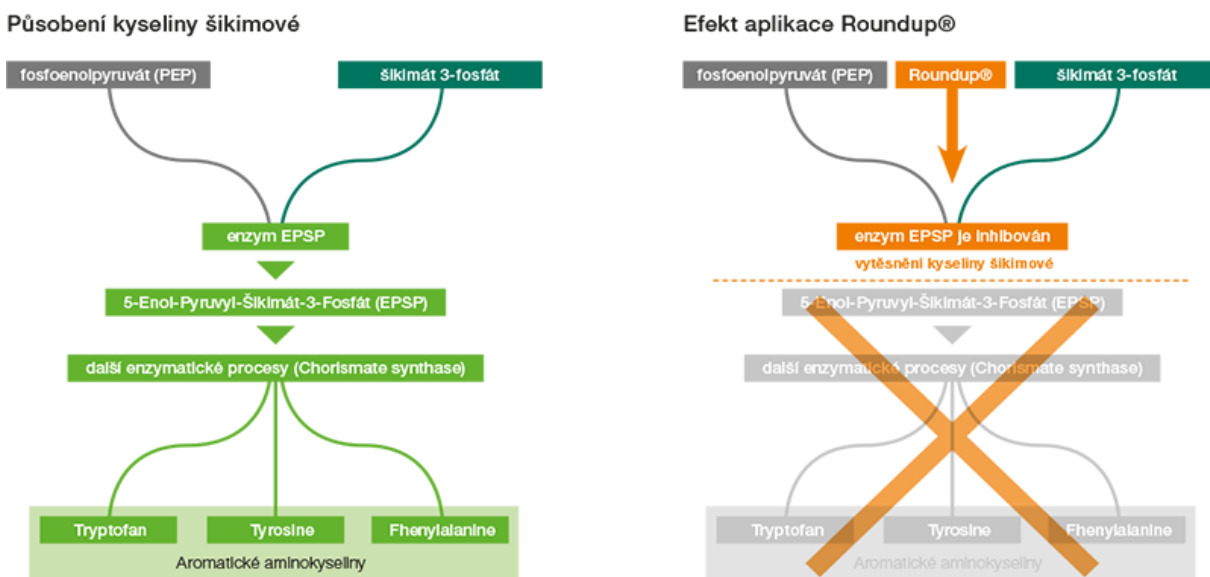
mezinárodní producenti (např. Syngenta, Bayer, BASF, Dow, NuFarm), ale předním výrobcem stále zůstala firma Monsanto (Székács a Darvas, 2012).

V současné době se obrázek mezinárodních výrobců glyfosátu trochu pozměnil, hlavní roli v tomto podnikání získaly chemické firmy v Číně (např. Zhejiang Wynca Chemical Co., Zeijang Jinfanda Biochemical Co.) (Székács a Darvas, 2012).

3.3.1 Mechanismus účinku glyfosátu

Glyfosátové herbicidy mají široké spektrum aktivity u rostlin. Aktivita vůči zvířatům je malá, protože tyto látky působí na biochemické dráhy, které jsou jedinečné pro rostliny a některé mikroorganismy – houby, bakterie, řasy, prokaryota a jednobuněčné eukaryotické organismy (Giesy et al., 2000).

Glyfosát působí na rostlinu skrze kompetitivní inhibici specifického enzymu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy (EPSPS). EPSPS je klíčový enzym v šikimátové dráze, katalyzuje reakci šikimát-3-fosfátu (S3P) a fosfoenolpyruvátu (PEP) na 5-enol-pyruvyl-šikimát-3-fosfát (EPSP). Po defosforylaci EPSP vzniká chorismát, který je prekurzorem pro syntézu tří esenciálních aromatických aminokyselin (fenylalaninu, tyrozinu, tryptofanu) a následně dalších rostlinných metabolitů. Zablokování enzymu tedy vede k narušení proteosyntézy a následnému úhynu rostliny (Steinrücken a Amrhein, 1980; Giesy et al., 2000).



Obrázek 2 Efekt aplikace Roundup (Monsanto, 2016)

Jak glyfosátem indukovaná inhibice šikimátové dráhy rostliny ve skutečnosti zabíjí, však není zcela jasné. Předpokládá se, že je to primárně způsobeno nedostatečnou tvorbou aromatických aminokyselin pro udržení nezbytné syntézy proteinů. Byly ovšem doloženy i důkazy, které podporují názor, že deregulace šikimátové dráhy pomocí inhibice EPSPS zvyšuje průtok uhlíku danou drahou a to má za následek nedostatek uhlíku pro jiné základní metabolické dráhy (Duke a Powles, 2008).

3.3.2 Složení glyfosátových produktů

Existuje celá řada herbicidních přípravků založených na glyfosátu, všechny mají stejné základní složky:

- isopropylaminovou (IPA) sůl glyfosátu jako aktivní složku,
- surfaktant (smáčedlo)
- a vodu.

Roundup nebo tyto úzce související produkty jsou kvalitativně stejné, liší se jen v množství glyfosátu a množstvím a druhem surfaktantu, nicméně IPA sůl glyfosátu je aktivní složkou ve všech přípravcích. Polyoxy-ethylenamin (CAS číslo 61791-26-2, zkráceně POEA), surfaktant, který je směsí polyoxyethylalkylaminů s dlouhým řetězcem syntetizovaných z živočišných mastných kyselin, je převládající povrchově aktivní látka užívaná v produktech na bázi glyfosátu. Tento surfaktant je přidáván k usnadnění průniku glyfosátu skrz kutikulární vosky na cílových rostlinách. Surfaktant tvoří obvykle 15 % a méně objemu přípravku.

Většina glyfosátových přípravků má surfaktant přidáný. Nicméně například herbicid Rodeo je glyfosátový přípravek pro vodní použití registrovaný v USA, který neobsahuje surfaktant. Protože není surfaktant obsažený v prodávaném produktu, musí být pro účinný boj proti plevelům přidán k produktu před aplikací. Spotřebitel si může vybrat surfaktant, který splňuje specifické potřeby pro hubení plevelů. POEA surfaktant může být smíchán s Rodeem tak, že jejich směs je kvalitativně stejná jako Roundup. Dva faktory, které nejčastěji provází výběr surfaktantu, jsou účinnost a potenciální toxicita pro necílové vodní organismy. POEA je toxičtější pro vodní organismy než je aktivní herbicidní látka glyfosátu (Giesy et al., 2000).

3.3.3 Užití Roundupu

Aplikace Roundupu na cílovou vegetaci je dosažena prostřednictvím přímého postřiku na olistění. Glyfosát je vstřebán listy a poté velmi rychle přenášen cévními svazky. Tato vlastnost odpovídá za jeho činnost jako systémový herbicid (Franz et al., 1997). Adsorpce Roundupu na rostliny závisí převážně na difúzi. Faktory ovlivňující difúzi zahrnují plochu pokrytí povrchu a koncentraci, které jsou ovlivněny objemem postřiku a velikostí kapek. Dalším klíčovým faktorem ovlivňující adsorpci Roundupu je povaha rostlinné kutikuly, která vytváří bariéru při vstupu chemikálií do listů. Zde se proto využívá surfaktantů, které mají řadu funkcí, včetně působení jako smáčedlo nebo snížení povrchového napětí mezi povrchem listu a kapkami spreje (Giesy et al., 2000).

Glyfosátové pesticidy se používají k odstranění nežádoucího plevelu, keřů a dřevin jak v zemědělství, tak i v průmyslu, okrasných zahradách nebo na veřejných místech. V zemědělství se užití glyfosátu zvyšuje, zejména při aplikacích zahrnujících geneticky modifikované druhy rostlin vybrané pro schopnost snášet glyfosátové ošetření (Roundup Ready plodiny). Jiné zemědělské užití pro glyfosátové produkty zahrnuje jejich využití jako běžný krok při přípravě pole, defoliaci, urychlení zrání a sušení nebo retardaci růstu rostlin (Giesy et al., 2000).

3.3.4 Aplikační techniky Roundupu

Typické metody aplikace Roundupu zahrnují postřik vodními roztoky, a to buď z pozemního mechanického zařízení s ručním postřikovačem, nebo z licencovaných leteckých aplikátorů. Pozemní postřikovače jsou primární aplikační metodou v zemědělském užití. Aplikační dávka závisí na druhu plevelu, kvůli kterému je herbicid využíván. Dávky pro konkrétní plevel jsou vždy uvedeny v příbalových letácích a na etiketách výrobků.

Načasování a frekvence aplikace Roundupu záleží na cílovém druhu plevelu a musí odpovídat určitým maximálním povoleným aplikačním limitům uvedeným na etiketě. Jediná aplikace je většinou navržena tak, aby účinně zahubila rostliny, které jsou v době ošetření vzrostlé. Komplexní dlouhodobá sezónní kontrola může vyžadovat více aplikací glyfosátových přípravků na rostliny objevujících se postupně v různých růstových etapách. Frekvence aplikace u glyfosát-tolerantních plodin dovoluje více ošetření v menších dávkách k dosažení dlouhodobé sezónní kontroly plevelu (Giesy et al., 2000).

3.3.5 Environmentální transport a osud glyfosátu

Glyfosát nemá významný tlak nasycených par, a proto je ztráta glyfosátu do atmosféry prostřednictvím vypařování z ošetřovaných ploch zanedbatelná. Nicméně pohyb herbicidu mimo místo aplikace je možný skrze unášení postřiků větrem. Potenciál pro únos postřiku během aplikace je závislý na lokálních povětrnostních podmínkách, zvláště na rychlosti větru, a typu užitého sprejovacího zařízení. Sprejová aplikace herbicidů v zemědělských oblastech se obvykle neprovádí za nepříznivých povětrnostních podmínek, jako jsou rychlost větru vyšší než 5 m/s nebo teplotní inverze (Giesy et al., 2000). V současnosti jsou také využívány technologie, které významně snižují unášení postřiku. Pokud unesení herbicidu přece jen nastane, dochází v povrchové depozici s rostoucí vzdáleností od cíleného místa k rychlému poklesu herbicidu, jak pro pozemní, tak i pro vzdušnou aplikaci. Studie unášení postřiků provedené v Evropě ukazují, že únos herbicidů z pozemních aplikací typických pro většinu řádkového zemědělství je přibližně 4 % ve vzdálenosti 1 metr od okraje pole. V 5 metrech je hodnota únosu už jen 0,6 % aplikační dávky (Ganzelmeier et al., 1995).

Pro vzdušnou aplikaci bude unášení poněkud větší než pro pozemní aplikaci, protože postřik se rozšíří do větší vzdálenosti od cílové plodiny nebo půdy. Protože možnost unášení postřiku během aplikace herbicidu nemůže být vyloučena, unášení je uvažováno i ve výpočtech expozice pro určité necílené organismy (obvykle se předpokládá 10 %) (Giesy et al., 2000).

Glyfosát je amfoterní sloučenina. Polarita glyfosátu ho činí prakticky nerozpustným v organických rozpouštědlech. Amfoterní povaha glyfosátu vysvětluje jeho relativně dobrou vazbu na půdní částice. Díky této vlastnosti jsou glyfosátové herbicidy účinné jen tehdy, když jsou aplikovány přímo na povrch rostlin. Pokud glyfosát vstoupí do půdy, je v podstatě rostlinám a jiným půdním organismům nedostupný kvůli jeho vysoké afinitě k půdním částicím. Tato vlastnost vysvětluje, proč mohou být plochy ošetřené glyfosátem následně osazeny plodinami již brzo po této aplikaci (Giesy et al., 2000).

Ačkoliv je tedy glyfosát velmi snadno rozpustný ve vodě, jeho silná sorpce v půdě omezuje mobilitu. Tudíž u glyfosátu je nepravděpodobné, že by se vyluhoval do podzemních vod nebo po aplikaci významně znečistil povrchové vody. Přesto však byly v literatuře některé výsledky monitorování pesticidů v podzemních vodách publikovány. V letech 1989 až 1994 byly v Německu pozorovány detekovatelné koncentrace glyfosátu v 7 ze 424 lokalit, ale pouze dvě z nich byly vyšší než 0,1 µg ekvivalentu volné kyseliny glyfosátu (a.e.) na 1 litr

vody (maximum 0,35 µg a.e./l) (Greenpeace, 1995). Koncentrace 0,1 µg/l pesticidních látek je v Evropě stanovena jako nejvyšší mezní hodnota pro pitnou vodu (European Council, 1980).

Americká EPA (Environmental Protection Agency) také prezentovala výsledky studií, které monitorovaly kvalitu podzemní vody ve studních v období 1971 - 1991. Glyfosát byl detekován v 7 z 247 studní (USEPA, 1992). Další výzkumy dospěly k názoru, že tyto detekce mohou být přisuzovány chybám v analýze, bodové kontaminaci zdroje nebo nevhodné analytické metodě, žádná nebyla stanovena jako platná detekce.

Rozklad glyfosátu v půdě je způsoben především biodegradací, která je zprostředkována půdními mikroorganismy. Glyfosát je jimi metabolizován za vzniku fosforu a sarkosinu, který je pak sarkosinoxidázou konvertován na glycin a amoniak. Hlavní metabolickou půdní drahou je degradace glyfosátu na aminomethylfosfonovou kyselinu (AMPA) a AMPA je pak následně metabolizována na oxid uhličitý (Bradberry et al., 2004). Abiotické degradační procesy jako jsou fotolýza a hydrolýza přispívají k rozkladu glyfosátu v životním prostředí jen minimálně.

Snížení glyfosátových koncentrací v půdních maticích závisí na celkové mikrobiální aktivitě ošetřovaných půd. Polní studie ukazují, že glyfosát se obvykle rychle rozkládá jak z ekosystémů jako jsou zemědělské ekosystémy, tak i z lesů, bez ohledu na různé edafické a klimatické podmínky (Giesy et al., 2000).

Aminomethylfosfonová kyselina. Mikrobiální degradace AMPA, hlavního metabolitu glyfosátu, dle laboratorních studií postupuje pomalejším tempem než u glyfosátu. Přechodné zvýšení koncentrací AMPA v polní půdě byly sledovány v lesních i zemědělských systémech dle toho, jak je glyfosát konvertován na AMPA a následně degradován. Pomalejší rychlost degradace z AMPA může mít za následek její větší adsorpci na půdách a tím snížení dostupnosti mikrobiálním degradačním procesům. Poločas degradace AMPA byl stanoven přibližně na 145 dní, s rozmezím 76 – 240 dní (Giesy et al., 2000).

3.3.6 Environmentální zátěž při aplikaci Roundupu

Půda. Bylo provedeno množství studií k zhodnocení koncentrace glyfosátu v půdě, která jsou výsledkem přímé aplikace Roundupu na holou zem. Téměř všechny koncentrace glyfosátu v půdě byly nižší než 5 mg a.e./kg. Jako nejpřesnější odhad koncentrace pro akutní expozici v půdách byla vybrána hodnota 4,67 mg a.e./kg v lesní půdě, která odpovídá 15,1 mg Roundupu/kg (Giesy et al., 2000).

Rostlinná tkáň. Znalost koncentrací glyfosátu v nebo na rostlinném materiálu, zahrnující listy, semena a plody, je důležitá pro předpovídání potenciální expozice Roundupu a glyfosátu u býložravých ptáků a savců. Při akutní expozici se předpokládá, že požití ošetřené potravy bude hlavní expoziční cestou pro tyto živočichy. Listy nebo rostliny obsahující velká množství Roundupu následně uhynou a tím se stávají nepoživatelnými pro divoká zvířata. Z tohoto důvodu se předpokládá, že chronická expozice glyfosátu u divokých savců a ptáků skrze rostlinnou tkáň bude nevýznamná. Domácí hospodářská zvířata však mohou být vystavena reziduíům glyfosátu v krmivu, jako je seno a zrní. (Williams et al., 2000).

Živočišná tkáň. Ani u glyfosátu, ani u Roundupu se vzhledem k jejich rozpustnosti ve vodě a iontovému charakteru neočekává jejich bioakumulace (WHO, 1994). Nicméně protože se malí hlodavci mohou živit ošetřenými listy, dochází tím k určitému chemickému zatížení v rámci jejich organismu, a proto by měly být hodnoceny účinky a měřeny rezidua glyfosátu v krátkodobém potravním řetězci. Masožraví živočichové, např. dravci nebo lišky, mohou být exponováni Roundupu, když zkonzumují tyto malé hlodavce.

Voda. Koncentrace Roundupu a glyfosátu může být ve vodních systémech přímou aplikací do vod vyšší než ta množství pesticidu, která vyplývají ze zemědělského nebo jiného nevodného použití. Primární užití Roundupu je pro zemědělské aplikace, nicméně v některých částech světa je používán pro kontrolu emergentních a plovoucích vodních vegetací. Přímá aplikace Roundupu do vody v dávce 13,5 kg Roundupu/ha může mít za následek maximální koncentraci 0,68 mg Roundupu/l při stejnoměrném promíchání ve 2 m vodního sloupce, za předpokladu, že nedojde k žádné sorpci na sediment. Ve vodním sloupci s hloubkou 0,15 m by měla být maximální koncentrace 9,0 mg Roundupu/l. Protože Roundup není aplikován přímo do vody, ale spíše na zeleň, předpokládá se 50% zachycení listem. Maximální koncentrace Roundupu ve vodě jsou 0,3 nebo 4,5 mg Roundupu/l pro 2 m a pro 0,15 m hlubokou vodu za předpokladu 50% zachycení. Aktuální sledovaná koncentrace závisí na několika faktorech zahrnujících aplikační dávku, zachycení cílenou vegetací, hloubkou vody, množstvím nerozpuštěných látek, a zda je voda stojatá nebo tekoucí (Giesy et al., 2000).

3.3.7 Expozice člověka glyfosátu

Dalo by se konstatovat, že glyfosát je všudypřítomný. Nejen že se vlastností této látky hojně využívá v zemědělství pro likvidaci plevelů nebo pro stejnoměrné dozrávání a vysušení některých semen (zejména řepka olejná a slunečnice), ale užívá se také pro hubení plevelů např. ve městech, na zarůstajících okrajích silnic a železničních náspů; na hubení rozsáhlých

porostů invazivních rostlin (např. křídlatky) nebo výběrovou likvidaci některých druhů (akát, bolševník), ale také běžně na zahradách a kolem domů, protože jsou tyto přípravky běžně dostupné v maloobchodní síti.

Pokusy na zvířatech ukazují, že 15–30 % glyfosátu se při konzumaci vstřebá do těla. Z toho se malé množství (cca 2 %) metabolizuje na AMPA, zbytek se vyloučí močí (Williams et al., 2000).

Za účelem omezení rizika je nutné dodržovat legislativně stanovená pravidla aplikace herbicidu. Pro preventivní ochranu zdraví jsou stanoveny legislativní limity pro rezidua glyfosátu v potravinách rostlinného i živočišného původu (nařízení 396/2005/ES) a limity jsou průběžně kontrolovány dozorovými orgány. V dětské a kojenecké výživě nesmí celkové množství pesticidů překročit mez detekce.

3.3.8 Účinky glyfosátu na člověka

3.3.8.1 Akutní expozice

Náhodné požití glyfosátového přípravku hrozí většinou jen u malých dětí nebo osob aplikujících tyto přípravky a je obecně spojováno pouze s mírnými, přechodnými gastrointestinálními potížemi. Většina hlášených případů otrav bylo záměrné požití koncentrovaného Roundupu (41 % IPA, 15 % POEA). Požití více než 85 ml koncentrované formulace může u člověka způsobit závažné toxické účinky. Běžné je poleptání sliznice úst a krku, bolest v epigastriu a dysfagie. Časté je také poškození jater a ledvin, většinou díky sníženému prokrvení orgánů. Ve vážných případech se může objevit respirační nedostatečnost, poruchy vědomí, plicní edém, šok, srdeční arytmie, selhání ledvin vyžadující hemodialýzu, metabolická acidóza a hyperkalémie. Dermální expozice může způsobit podráždění, fotodermatitidy a poleptání kůže. Inhalační expozice tvoří menší podíl případů, páry přípravků mohou způsobit ústní nebo nosní dyskomfort, nepříjemnou chuť v ústech, mravenčení a podráždění v krku. Oční expozice může vést k mírnému zánětu spojivek a povrchnímu poranění rohovky. Léčba je symptomatická a podpůrná, v případě dermální expozice by se měl odstranit potřísněný oděv a pokožka by se měla dekontaminovat mýdlem a vodou (Bradberry et al., 2004).

3.3.8.2 Chronická expozice

Glyfosátové přípravky, včetně herbicidu Roundup, byly rozsáhle zkoumány pro možný potenciál vyvolat nežádoucí účinky u necílových organismů. Vládní agentury, mezinárodní organizace a další přezkoumali a posoudili dostupné vědecké informace o glyfosátových přípravcích a nezávisle posoudili jejich bezpečnost. Závěry ze tří hlavních organizací jsou veřejně přístupné a ukazují, že Roundup může být užíván s minimálními riziky pro životní prostředí (Giesy et al., 2000).

I přes relativní bezpečnost glyfosátu se objevují různá tvrzení o nežádoucích vývojových a reprodukčních účincích. Aby bylo možné posoudit tuto vývojovou a reprodukční bezpečnost glyfosátu, byla provedena analýza dostupné literatury. Byly přezkoumány epidemiologické i zvířecí studie a také studie o mechanismech působení v souvislosti s možnými vývojovými a reprodukčními účinky glyfosátu, avšak nebyly nalezeny žádné vlivy působení glyfosátu na reprodukční zdraví nebo na potomky. Toxicita byla sledována ve studiích, které testovaly glyfosátové přípravky a data naznačují, že tyto účinky byly způsobeny surfaktanty přítomnými v přípravcích a nikoliv přímou expozicí vůči glyfosátu. Aby bylo možné odhadnout potenciální koncentraci glyfosátu při expozici člověku jako důsledek práce přímo s herbicidem, byla zkoumána dostupná biomonitorovací data. Tato data ukázala extrémně nízké hladiny expozice při normálních provozních postupech. Kromě toho jsou odhadované koncentrace expozice pro člověka více než 500krát nižší než je referenční perorální dávka pro glyfosát 2 mg/kg/den nastavená od EPA. Dostupná literatura tedy neukazuje žádný pevný důkaz spojující expozici glyfosátu a nepříznivé vývojové nebo reprodukční účinky při reálných koncentracích látek v životním prostředí (Williams et al., 2012).

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny však zařadila glyfosát spolu s malathionem a diazinonem v březnu 2015 mezi pravděpodobné karcinogeny pro člověka (skupina II-A) s odvoláním na důkazy, že glyfosát může u člověka způsobovat rozvoj Non-Hodgkinova lymfomu. Důkazy pocházejí ze studií expozic, převážně zemědělských, v USA, Kanadě a Švédsku publikovaných od roku 2001. Kromě toho existuje důkaz, že glyfosát může způsobovat rakovinu u laboratorních zvířat. Americká EPA původně v roce 1985 klasifikovala glyfosát na základě nádorů u myši jako potencionálně karcinogenní pro člověka (skupina III). Po přehodnocení této studie v roce 1991 EPA změnila zařazení glyfosátu a to do skupiny nekarcinogenních látek. IARC však po vlastním vyhodnocení zpráv nachází významné důkazy pro karcinogenitu a několik nedávných pozitivních výsledků ji utvrzuje

v závěru, že existuje dostatek důkazů o karcinogenitě u pokusných zvířat. Glyphosát také způsobil poškození DNA a chromozomů v lidských buňkách, ačkoliv při testech na bakteriích byly výsledky negativní. Studie v dané komunitě zaznamenala vzestup krevních markerů pro poškození chromozomů po aplikaci glyphosátového přípravku v blízkém okolí této sledované skupiny (IARC, 2015).

Přijaté dogma, že glyphosát není škodlivý pro člověka, protože u něj není přítomna šikimátová dráha, je logické. Nicméně tato dráha ale existuje u střevních bakterií, které hrají důležitou a dosud do značné míry přehlíženou roli v lidské fyziologii. Výskyt zánětlivých střevních onemocnění, jako je juvenilní nástup Crohnovy choroby, se v posledním desetiletí v západní Evropě a Spojených státech výrazně zvýšil. Existuje tedy domněnka, že glyphosátový dopad na střevní bakterie může přispívat k tomuto onemocnění a stavům (Samsel a Seneff, 2013).

3.3.9 Roundup Ready plodiny

Plodiny, které jsou geneticky modifikované tak, aby byly odolné vůči působení glyphosátu, se označují jako „Roundup Ready“ plodiny. Plodiny rezistentní ke glyphosátu v současnosti představují více než 80 % ze 120 milionů hektarů ročně pěstovaných transgenních plodin po celém světě. V roce 1996 byla uvedena první řada transgenní sóji, dnes jsou už rozšířeny i další plodiny, zejména kukuřice, bavlna, řepka olejná a cukrová řepa. Plochy s těmito rostlinami jsou opakovaně ošetřovány Roundupem, což přežijí jen cílové geneticky modifikované rostliny (neplatí zde tedy argument, že genetické modifikace snižují spotřebu chemie v zemědělství, protože geneticky modifikované plodiny jsou odolné vůči škůdcům). Rychlé rozšíření těchto plodin bylo z velké části kvůli ekonomickým výhodám této technologie a stejně tak i kvůli jednoduchému a spolehlivému odstranění plevelu (Duke a Powles, 2009).

Při porovnávání environmentálního vlivu u glyphosát-rezistentních a nerezistentních plodin při použití glyphosátu a jiných běžně používaných herbicidů technologie glyphosát-rezistentních plodin obecně snížila negativní ekologické dopady, protože glyphosát je méně perzistentní a toxický než herbicidy užívané u nerezistentních plodin (Mamy et al., 2010).

Evropská unie nepovolila pěstování geneticky modifikovaných plodin rezistentních vůči glyphosátu, protože jejich rozšíření na evropských polích by vedlo k ještě větší spotřebě glyphosátových herbicidů.

V Americe, s výjimkou Kanady, přijetí geneticky modifikovaných rostlin znamenalo nepřetržitý a intenzivní selekční tlak, což má za negativní následek vývoj glyfosát-rezistentních plevelů (např. i v ČR rezistentní turanka kanadská) a přesun na druhy plevelů, které jsou jen částečně regulované glyfosátem. Tento vývoj ohrožuje výhody této cenné technologie.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Testování vlivu Roundupu na čisté kultury *in vitro*

K testování byly použity kmeny bakterií ze Sbírký Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, které byly kultivovány na komplexním médiu s danými koncentracemi glyfosátu uvedenými v Tabulce 4.

Tabulka 4 Koncentrace glyfosátu použité pro testování jeho vlivu na čisté kultury

	Koncentrace glyfosátu
Vzorky A	17 g/L
Vzorky B	1,7 g/L
Vzorky C	0,17 g/L
Kontrola	0 g/L

Po určitých časových intervalech byla měřena hodnota optické denzity denzitometrem DEN-1 B (Biosan, Riga, Lotyšsko). Tento způsob je založen na měření zákalu způsobeného rostoucí kulturou bakterií. Je k tomu využíváno spektrofotometrické měření při vlnové délce 600 nm a následný přepočet podle McFarlandovy zákalové stupnice (Koch, 1970).

Po ukončení kultivace byl vyhodnocen růst bakterií a statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu Statgraphics Centurion XV (Warrenton, VA, Spojené státy americké).

4.2 Stanovení hlavních skupin mikroorganismů ve vzorcích stolice

Pro účely stanovení hlavních skupin mikroorganismů byla použita plotnová kultivační metoda, která je všeobecně užívána pro průkaz (kvalita) nebo stanovení počtu (kvantita) určitých skupin, rodu nebo druhu bakterií.

V rozboru byly stanoveny celkové počty bakterií, bifidobakterie, laktobacily, enterokoky, *E. coli* a koliformní bakterie.

4.2.1 Analyzovaný materiál

K mikrobiologické analýze bylo použito celkem pět vzorků lidské stolice od dobrovolných dárců. Vzorky byly ihned po defekaci odebrány do zkumavek s minimálním médiem a anaerobním prostředím a následně byly do doby analýzy skladovány v lednici, a to po dobu maximálně 24 hodin.

4.2.2 Živná média

Kultivace jednotlivých skupin mikroorganismů probíhala na Petriho miskách s živnými médii o složení udaném v Tabulce 5.

Tabulka 5 Složení živných médií

	Složení média	
Celkové počty	Wilkins-Chalgren agar	4,3 g/100 mL
	Sójový pepton	0,5 g/100 mL
	Cystein	0,05 g/100 mL
	Tween 80	0,1 mL/100 mL
Bifidobakterie	Wilkins-Chalgren agar	4,3 g/100 mL
	Sójový pepton	0,5 g/100 mL
	Cystein	0,05 g/100 mL
	Tween 80	0,1 mL/100 mL
	Mupirocin – 200 mg/100 mL + kys. octová 100 µL/100 mL	
Laktobacily	Rogosa agar	6 g/mL
	Kyselina octová	132 µL/100 mL
Enterokoky	Slanetz-Bartley agar	4,2 g/100 mL
E. coli	TBX agar	3,66 g/100 mL
Minimální médium pro uchování a ředění vzorků	Nutrient broth	0,5 g/100 mL
	Kvasničný extrakt	0,5 g/100 mL
	Cystein	0,05 g/100 mL
	Tween 80	0,1 mL/100 mL
Růstové médium	Wilkins-Chalgren broth	4,3 g/100 mL
	Sójový pepton	0,5 g/100 mL
	Cystein	0,05 g/100 mL
	Tween 80	0,1 mL/100 mL

4.2.3 Příprava vzorků

Do lékovek, tzv. penicilínek, s růstovým médiem byly přidány udané koncentrace glyfosátu ve formě pesticidu Roundup podle Tabulky 6.

Tabulka 6 Použité koncentrace glyfosátu

	Koncentrace glyfosátu
1. penicilínka	17 g/L
2. penicilínka	1,7 g/L
3. penicilínka	0,17 g/L
4. penicilínka	0,017 g/L
5. penicilínka	0,0017 g/L
6. penicilínka	0,00017 g/L
7. penicilínka (kontrola)	0 g/L

Poté byl do každé penicilínky přidán vzorek stolice ve množství 10 mg, tedy cca 10^9 CFU/mL a vše bylo inkubováno po dobu 24 hodin v termostatu při teplotě 37 °C.

Po inkubaci a dobrém promíchání vzorku byla z každé penicilínky vytvořena decimální ředící řada až do koncentrace 10^{-9} a pomocí plotnové metody byly stanoveny jednotlivé skupiny mikroorganismů. Petriho misky s celkovými počty bakterií a bifidobakteriemi byly inkubovány v anaerobním prostředí v hermeticky uzavřených hrncích, ze kterých byl odsát vzduch a přidána směs H_2 a CO_2 , laktobacily byly dvakrát přelity agarem pro vytvoření mikroaerofilního prostředí (se sníženým parciálním tlakem kyslíku) a zbylé vzorky byly v aerobním prostředí, vše bylo inkubováno v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin.

Po inkubaci byl proveden odečet počtů kolonií tvořících jednotek (KTJ; CFU) a z původního vzorku stolice bylo pomocí indikátorového papírku změřeno přibližné pH jednotlivých vzorků s danými koncentracemi Roundupu. Vyhodnocení bylo provedeno statistickým programem Statgraphics Centurion XV (Warrenton, VA, Spojené státy americké).

5 VÝSLEDKY

5.1 Testování vlivu Roundupu na čisté kultury *in vitro*

Výsledky měření optické denzity při vlnové délce 600 nm jsou uvedeny v Příloze 1. Hodnoty této optické denzity byly dále převedeny na CFU/mL podle tabulky McFarlandovy zákalové stupnice a tyto hodnoty jsou uvedeny v Příloze 2.

Dále byla vypočítána specifická růstová rychlost (μ) podle vzorce:

$$\mu = (\ln x - \ln x_0)/(t - t_0),$$

kde hodnota x je větší naměřená hodnota zlogaritmované optické denzity bakterií, hodnota x_0 je menší naměřená hodnota zlogaritmované optické denzity bakterií, hodnota t je doba v hodinách, ve které byla odečtena hodnota x a hodnota t_0 je doba v hodinách při odečtení hodnoty x_0 . Hodnoty specifické růstové rychlosti jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7 Specifická růstová rychlost bakterií (μ)

	17 g/L	1,7 g/L	0,17 g/L	Kontrola
Klostridie 1	0,17	0,27	0,29	0,29
Klostridie 2	0,002	0,28	0,31	0,37
Klostridie 3	nerostly	0,10	0,27	0,11
Klostridie 4	nerostly	0,12	0,23	0,22
Klostridie 5	nerostly	0,11	0,13	0,11
Bifidobakterie 1	nerostly	0,30	0,33	0,28
Bifidobakterie 2	0,03	0,20	0,22	0,22
Bifidobakterie 3	0,10	0,21	0,26	0,27
Bifidobakterie 4	0,10	0,19	0,24	0,22
Bifidobakterie 5	0,04	0,25	0,28	0,27
Bifidobakterie 6	0,04	0,29	0,31	0,31
Bifidobakterie 7	0,11	0,26	0,27	0,23
Laktobacily 1	0,28	0,32	0,30	0,31
Laktobacily 2	0,24	0,28	0,30	0,29
Laktobacily 3	0,32	0,31	0,28	0,26
Laktobacily 4	0,15	0,21	0,22	0,16
<i>E. coli</i> 1	0,17	0,25	0,25	0,24
<i>E. coli</i> 2	0,13	0,23	0,24	0,24
<i>E. coli</i> 3	0,17	0,25	0,31	0,26
<i>E. coli</i> 4	0,18	0,30	0,25	0,27
<i>Bacteroides</i>	nerostly	0,25	0,29	0,28

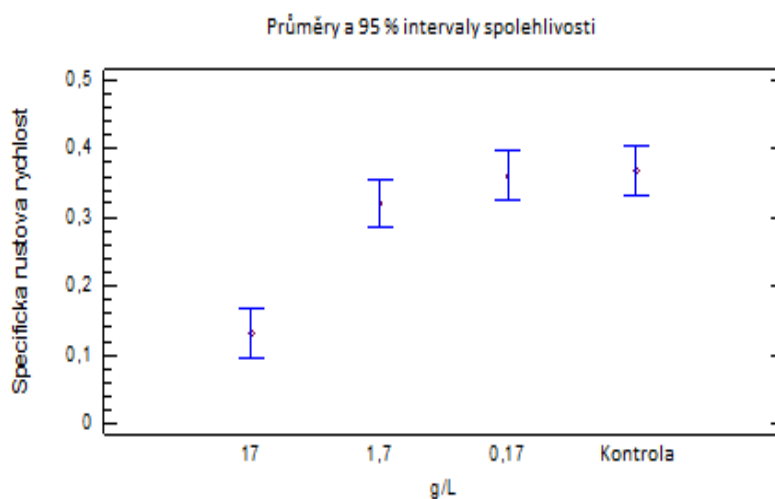
Hodnoty specifické růstové rychlosti pro každý kmen bakterií byly následně použity pro statistické vyhodnocení.

Tabulka 8 Souhrnné statistiky pro všechny testované bakterie

	<i>Počet vzorků</i>	<i>Průměr</i>	<i>Medián</i>	<i>Rozptyl</i>	<i>Standardní odchylka</i>	<i>Variační koeficient</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
17 g/L^a	21	0,131211	0,115531	0,0151181	0,122956	93,7083%	-0,00845594	0,427912
1,7 g/L^b	21	0,32046	0,333546	0,0157273	0,125408	39,1339%	0,0599837	0,634408
0,17 g/L^b	21	0,359927	0,352553	0,011076	0,105243	29,24%	0,16106	0,557522
Kontrola^b	21	0,367647	0,346544	0,0128467	0,113343	30,8294%	0,14608	0,563727
Celkem	84	0,294811	0,30559	0,0225505	0,150168	50,9371%	-0,00845594	0,634408

Pro vyhodnocení statistické významnosti byla využita Fisherova LSD metoda mnohonásobného porovnávání (least significant difference test) s 95% intervalem spolehlivosti. Horní indexy v Tabulce 8 značí statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($P < 0,05$).

Z předložených hodnot lze tedy konstatovat, že kmeny bakterií byly při nejvyšší koncentraci glyfosátu (17 g/L) v růstu výrazně inhibovány oproti ostatním nižším užitým koncentracím herbicidu a kontrolním vzorkům. Toto je možné demonstrovat i na Grafu 1.



Graf 1 Průměrný růst všech kmenů bakterií při různých koncentracích glyfosátu. Graf znázorňuje průměry s 95% intervaly spolehlivosti.

Dále bylo provedeno porovnání růstu bakterií navzájem mezi jednotlivými rody bakterií (Tabulka 9 a 10).

Tabulka 9 Souhrnné statistiky pro jednotlivé kmeny bakterií

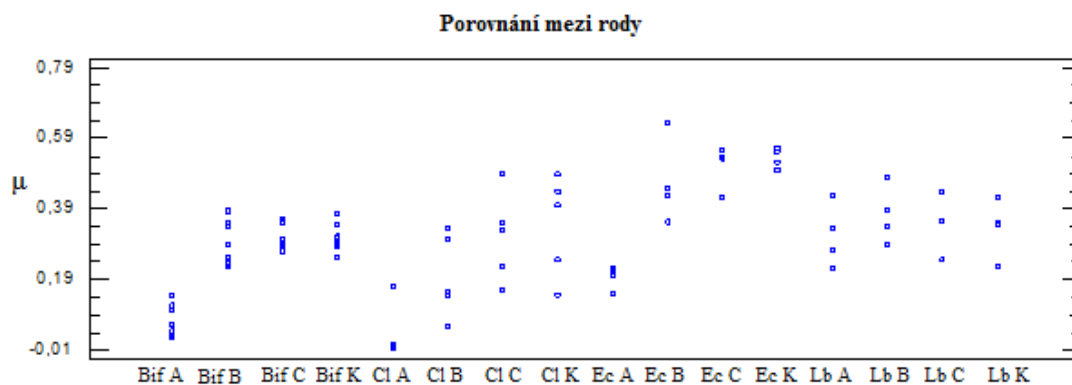
	<i>Počet vzorků</i>	<i>Průměr</i>	<i>Medián</i>	<i>Rozptyl</i>	<i>Standardní odchylka</i>	<i>Variační koeficient</i>
Bifidobakterie 17 g/L	7	0,0764468	0,0652699	0,00205921	0,0453786	59,3596%
Bifidobakterie 1,7 g/L	7	0,297864	0,290458	0,00383368	0,0619167	20,7869%
Bifidobakterie 0,17 g/L	7	0,318996	0,305834	0,00135987	0,0368764	11,5601%
Bifidobakterie Kontrola	7	0,309812	0,307655	0,00166858	0,0408483	13,1849%
Klostridie 17 g/L	5	0,0352263	0,0023687	0,00580435	0,0761863	216,277%
Klostridie 1,7 g/L	5	0,200086	0,156309	0,013198	0,114882	57,4164%
Klostridie 0,17 g/L	5	0,313749	0,332404	0,0161277	0,126995	40,4766%
Klostridie Kontrola	5	0,34448	0,401727	0,0206624	0,143744	41,7278%
<i>E. coli</i> 17 g/L	4	0,197513	0,20902	0,00103989	0,0322473	16,3267%
<i>E. coli</i> 1,7 g/L	4	0,467466	0,439984	0,0140528	0,118544	25,3589%
<i>E. coli</i> 0,17 g/L	4	0,512659	0,534627	0,00362477	0,060206	11,7439%
<i>E. coli</i> Kontrola	4	0,535	0,537898	0,000853556	0,0292157	5,46088%
Laktobacily 17 g/L	4	0,315644	0,305657	0,00781915	0,088426	28,0144%
Laktobacily 1,7 g/L	4	0,375155	0,364222	0,00665762	0,0815943	21,7495%
Laktobacily 0,17 g/L	4	0,350195	0,356427	0,00630686	0,0794158	22,6776%
Laktobacily Kontrola	4	0,33681	0,347622	0,0063794	0,0798711	23,714%
Celkem	80	0,298141	0,306745	0,0224813	0,149938	50,2908%

Tabulka 10 Rozdíly ve specifické růstové rychlosti mezi jednotlivými rody bakterií

<i>Kmen</i>	<i>c glyfosátu (g/L)</i>	<i>Počet vzorků</i>	<i>Průměr</i>	<i>Homogenní skupiny</i>
Klostridie	17	5	0,0352263 ^a	X
Bifidobakterie	17	7	0,0764468 ^a	X
<i>E. coli</i>	17	4	0,197513 ^{b,c}	XX
Klostridie	1,7	5	0,200086 ^b	X
Bifidobakterie	1,7	7	0,297864 ^{c,d}	XX
Bifidobakterie	0	7	0,309812 ^d	X
Klostridie	0,17	5	0,313749 ^d	X
Laktobacily	17	4	0,315644 ^d	X
Bifidobakterie	0,17	7	0,318996 ^d	X
Laktobacily	0	4	0,33681 ^d	X
Klostridie	0	5	0,34448 ^d	X
Laktobacily	0,17	4	0,350195 ^d	X
Laktobacily	1,7	4	0,375155 ^{d,e}	XX
<i>E. coli</i>	1,7	4	0,467466 ^{e,f}	XX
<i>E. coli</i>	0,17	4	0,512659 ^f	X
<i>E. coli</i>	0	4	0,535 ^f	X

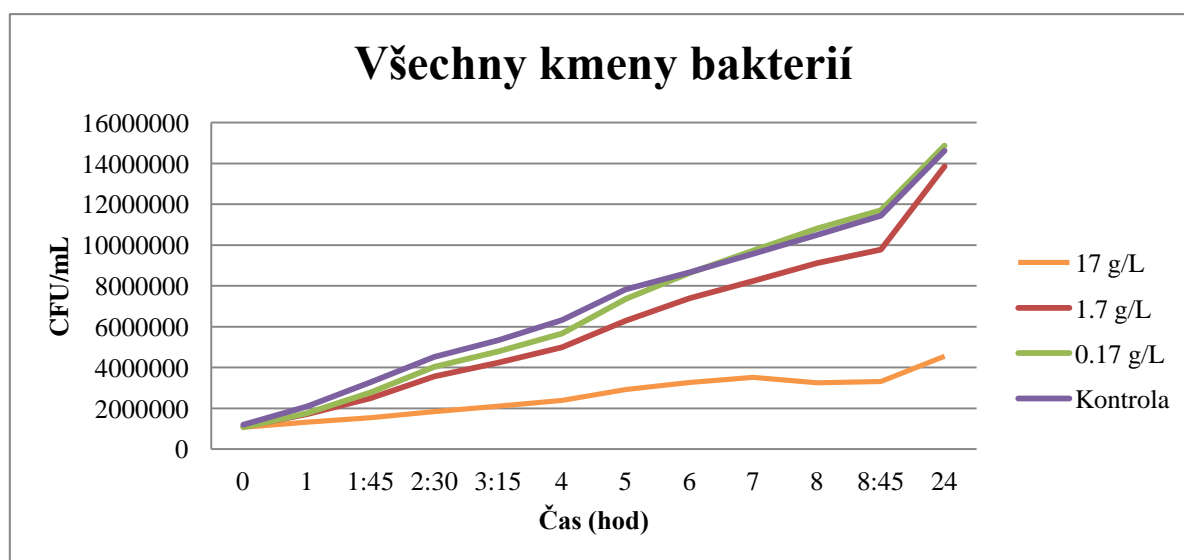
Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) jsou v Tabulce 10 znázorněny pomocí horních indexů i pomocí znaků X ve sloupci „Homogenní skupiny“.

Bylo nalezeno celkem 77 párů kmenů bakterií se statisticky významnými rozdíly v 95% intervalu spolehlivosti. Nejvýrazněji byly inhibovány kmeny bifidobakterií a klostridií při nejvyšší testované koncentraci glyfosátu. Zpomalení růstu při této koncentraci se výrazněji projevilo také u kmenů *E. coli*, nikoliv však u laktobacilů (viz Graf 2).

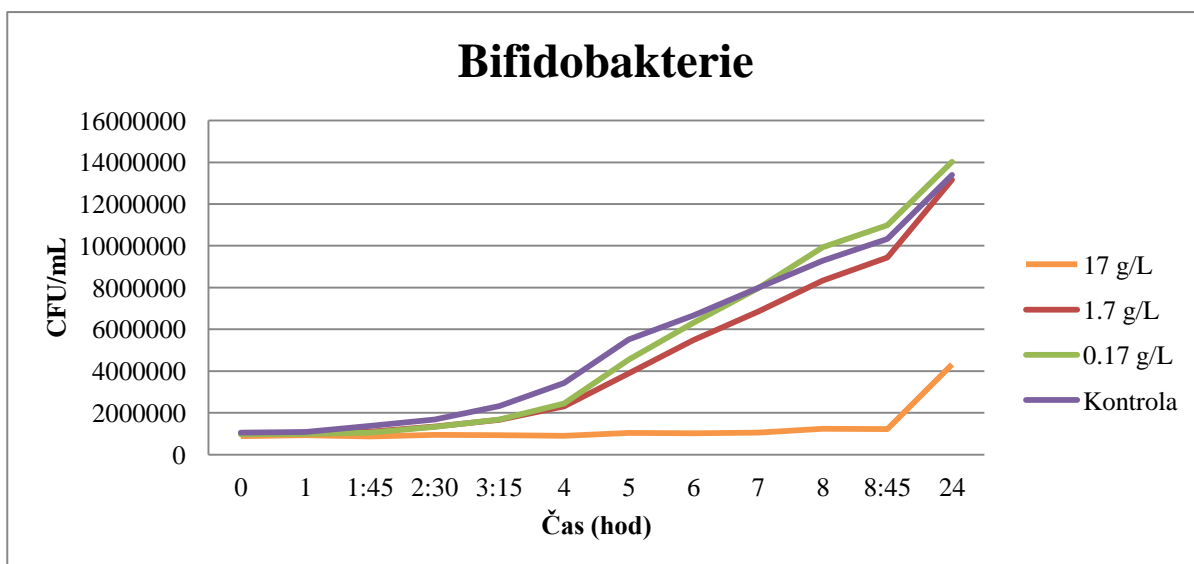


Graf 2 Růst jednotlivých rodů bakterií při různých koncentracích glyfosátu.

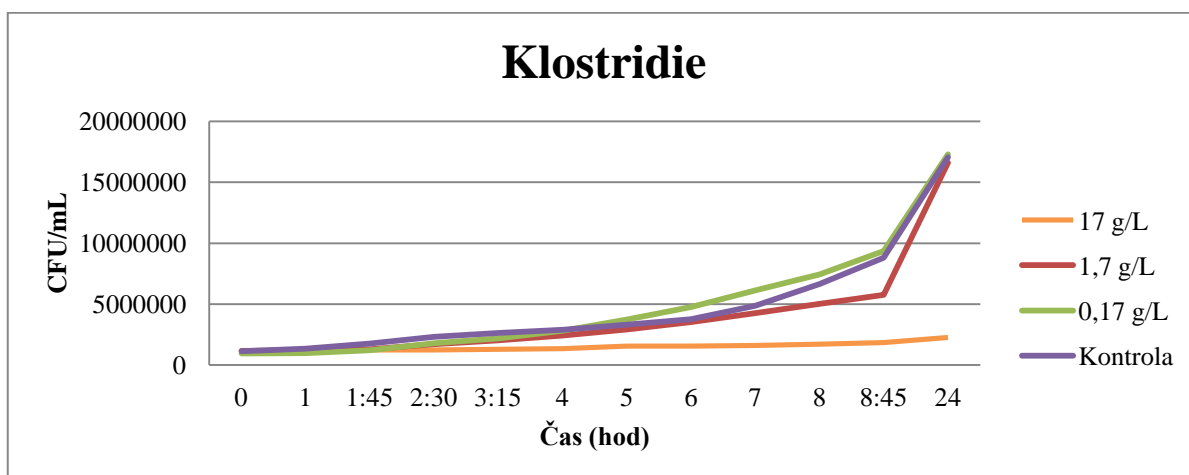
Pro jednotlivé kmeny bakterií byly také vytvořeny grafy dle nárůstu bakterií (CFU) v průběhu času při daných koncentracích glyfosátu.



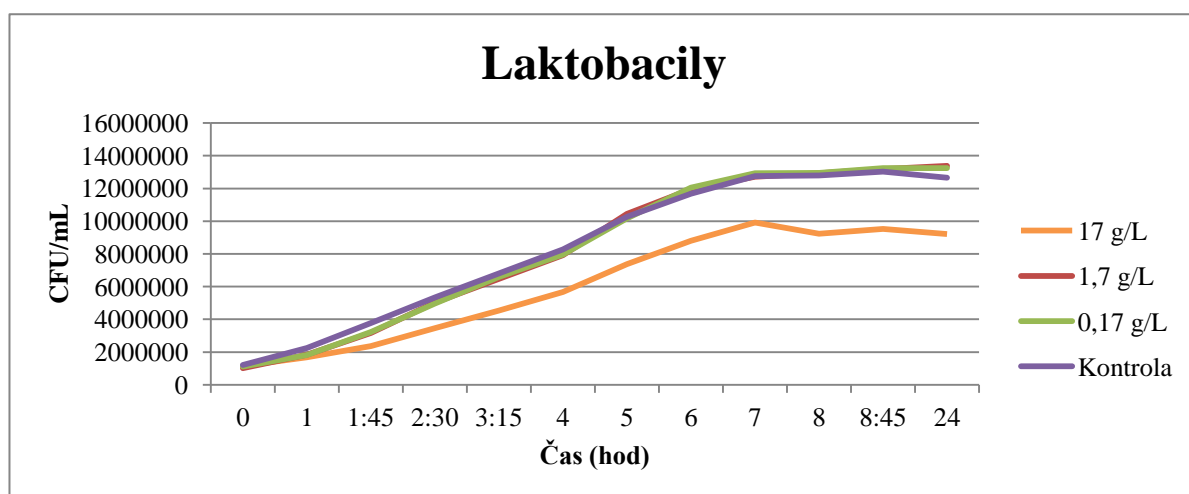
Graf 3 Růst všech kmenů bakterií v průběhu času při jednotlivých koncentracích glyfosátu.



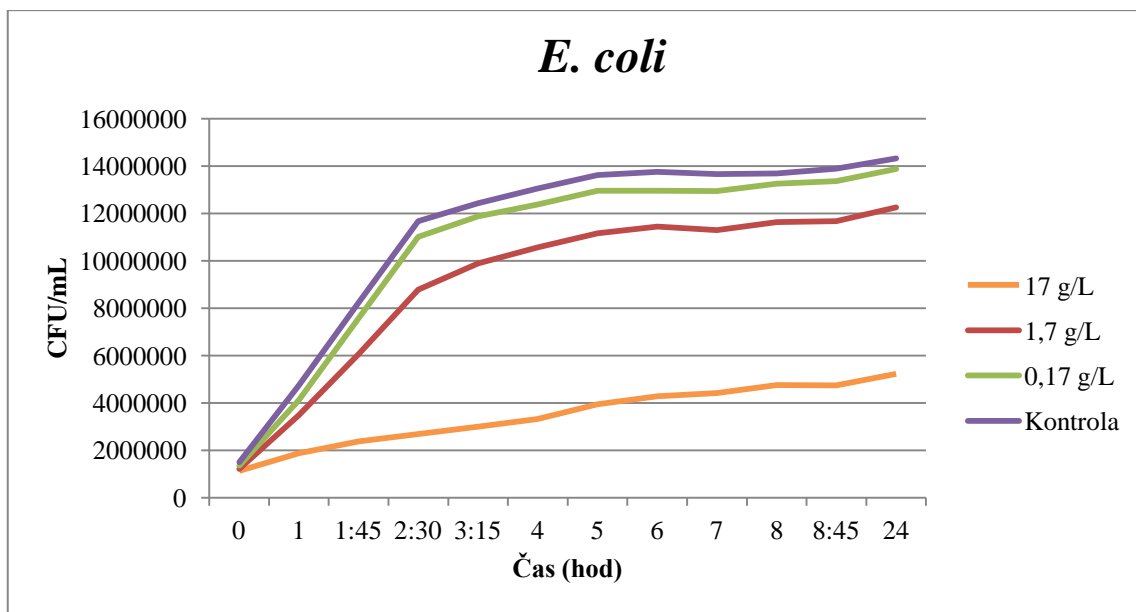
Graf 4 Růst bifidobakterií v průběhu času při jednotlivých koncentracích glyfosátu.



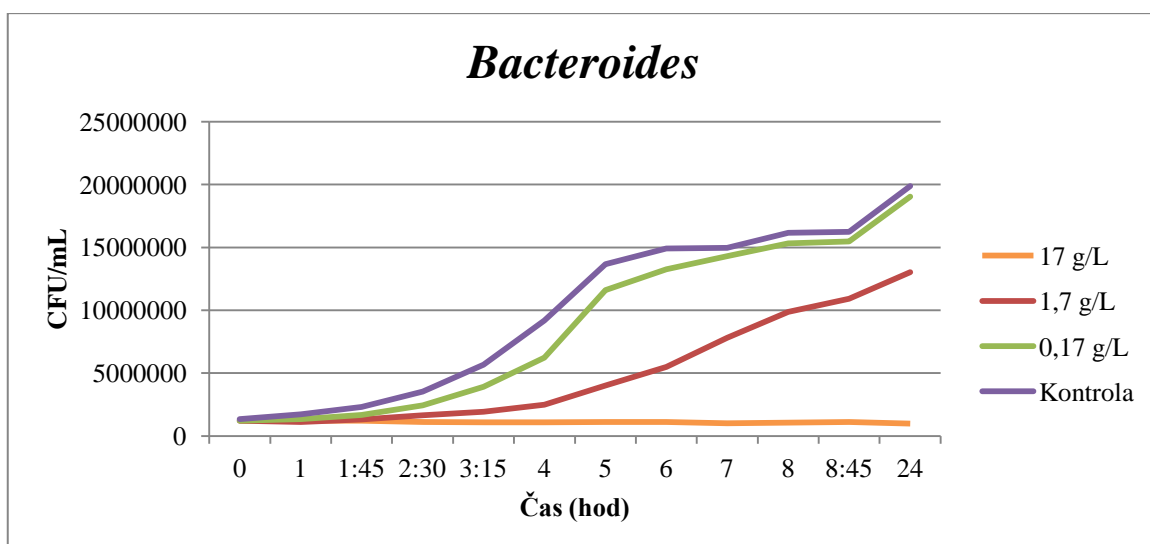
Graf 5 Růst klostridií v průběhu času při jednotlivých koncentracích glyfosátu.



Graf 6 Růst laktobacilů v průběhu času při jednotlivých koncentracích glyfosátu.



Graf 7 Růst *E. coli* v průběhu času při jednotlivých koncentracích glyfosátu.



Graf 8 Růst *Bacteroides* v průběhu času při jednotlivých koncentracích glyfosátu.

5.2 Stanovení hlavních skupin mikroorganismů po kultivaci ve stolici

Počty narostlých kolonií po kultivaci (v log CFU/mL) jsou uvedeny v Tabulce 11. Tato množství byla následně pře počítána na reálná čísla a poté vyjádřena v poměrném zastoupení ku celku (Tabulka 12), vzhledem k nerovnoměrnostem u celkových počtů bakterií u jednotlivých vzorků.

Tabulka 11 Log CFU/mL a hodnoty naměřeného pH

	Celkové počty					Koliformní bakterie	pH
	Bifidobaterie	Laktobacily	Enterokoky	<i>E. coli</i>			
Roman							
17 g/L	8,96	7,83	8,83	8,3	7,91	6,95	5
1,7 g/L	9,34	8,21	8,41	7,28	6,91	6,1	5,6
0,17 g/L	9,22	8,54	8,58	6,91	7,16	6	6
0,017 g/L	9,13	8,19	8,38	6,86	6,56	5,9	6
0,0017 g/L	9,3	8,16	8,61	7,1	7,19	5,9	6
0,00017 g/L	9,04	7,83	8,35	6,44	6,55	5,56	6
Kontrola	9,48	8,64	8,17	7,04	6,95	5,3	6
Martina							
17 g/L	10,41	5,58	9,47	9,41	8,89	7,13	5,3
1,7 g/L	10,3	9,66	9,35	9,12	9,64	7,3	6
0,17 g/L	10,29	9,45	9,1	8,79	9,6	7,3	6
0,017 g/L	10,28	9,59	9,38	9,15	9,6	7,48	6,1
0,0017 g/L	10,2	9,16	9,38	9,38	9,49	7,95	5,5
0,00017 g/L	10,09	9,12	9,11	9,39	9,42	7	5,6
Kontrola	10,08	9,29	9,33	9,08	8,99	7	6
Hanka							
17 g/L	10,09	8,7	8,26	9,21	9,55	-	5
1,7 g/L	10,11	9,58	9,38	8,79	8,79	-	5,1
0,17 g/L	10,32	9,6	9,47	8,84	9,64	-	5,7
0,017 g/L	10,19	9,7	8,87	8,72	8,71	-	5,6
0,0017 g/L	10,43	9,92	8,94	8,54	9,2	-	5,6
0,00017 g/L	10,18	9,68	9,46	8,62	8,85	-	5,6
Kontrola	9,83	9,52	7,9	8,61	8,48	-	5,5
Katka							
17 g/L	10,33	9,41	9,83	8	10,25	9,51	4,6
1,7 g/L	10,68	10,2	10,15	8,13	10,36	8,9	5
0,17 g/L	10,95	10,19	10,23	8,39	10,24	8,78	5,9
0,017 g/L	10,84	10,13	10,11	8,3	10,39	8,9	6
0,0017 g/L	10,87	10,57	10,08	7,85	10,28	8,48	6
0,00017 g/L	10,92	10,79	10,11	8,61	10,52	8,9	6,1
Kontrola	10,8	10,72	10,01	8,41	9	7,66	6,4

	Celkové počty	Bifidobakterie	Laktobacily	Enterokoky	<i>E. coli</i>	Koliformní bakterie	pH
Aneta							
17 g/L	9,33	5	-	9,6	6,6	-	4,8
1,7 g/L	8,97	8,25	-	8,97	8	-	4,8
0,17 g/L	9,67	8,69	-	9,22	7,7	-	5
0,017 g/L	9,91	8,81	-	9,46	9,18	-	5,1
0,0017 g/L	9,92	8,8	-	9,85	8,54	-	5,3
0,00017 g/L	9,91	8,78	-	9,67	9,26	-	5,1
Kontrola	8,64	8,07	-	6,18	8	-	4,5

Tabulka 12 Počty CFU/mL v poměrném zastoupení ku celku (1)

	Celkové počty	Bifidobakterie	Laktobacily	Enterokoky	<i>E. coli</i>	Koliformní bakterie
Roman						
17 g/L	1	0,0741310	0,7413102	0,2187762	0,0891251	0,009772
1,7 g/L	1	0,0741310	0,1174898	0,0087096	0,0037154	0,000575
0,17 g/L	1	0,2089296	0,2290868	0,0048978	0,0087096	0,000602
0,017 g/L	1	0,1148154	0,1778279	0,0053703	0,0026915	0,000588
0,0017 g/L	1	0,0724436	0,2041738	0,0063096	0,0077625	0,000398
0,00017 g/L	1	0,0616595	0,2041738	0,0025119	0,0032359	0,000331
Kontrola	1	0,1445440	0,0489779	0,0036308	0,0029512	0,000066
Martina						
17 g/L	1	0,00001479	0,11481536	0,10000000	0,03019952	0,000524
1,7 g/L	1	0,22908677	0,11220185	0,06606934	0,21877616	0,001000
0,17 g/L	1	0,14454398	0,06456542	0,03162278	0,20417379	0,001023
0,017 g/L	1	0,20417379	0,12589254	0,07413102	0,20892961	0,001584
0,0017 g/L	1	0,09120108	0,15135612	0,15135612	0,19498446	0,005623
0,00017 g/L	1	0,10715193	0,10471285	0,19952623	0,21379621	0,000812
Kontrola	1	0,16218101	0,17782794	0,10000000	0,08128305	0,000831
Hanka						
17 g/L	1	0,04073803	0,01479108	0,13182567	0,28840315	-
1,7 g/L	1	0,29512092	0,18620871	0,04786301	0,04786301	-
0,17 g/L	1	0,19054607	0,14125375	0,03311311	0,20892961	-
0,017 g/L	1	0,32359366	0,04786301	0,03388442	0,03311311	-
0,0017 g/L	1	0,30902954	0,03235937	0,01288250	0,05888437	-
0,00017 g/L	1	0,31622777	0,19054607	0,02754229	0,04677351	-
Kontrola	1	0,48977882	0,01174898	0,06025596	0,04466836	-

	Celkové počty	Bifidobakterie	Laktobacily	Enterokoky	<i>E. coli</i>	Koliformní bakterie
Katka						
17 g/L	1	0,12022644	0,31622777	0,00467735	0,83176377	0,151356
1,7 g/L	1	0,33113112	0,29512092	0,00281838	0,47863009	0,016595
0,17 g/L	1	0,17378008	0,19054607	0,00275423	0,19498446	0,006760
0,017 g/L	1	0,19498446	0,18620871	0,00288403	0,35481339	0,011481
0,0017 g/L	1	0,50118723	0,16218101	0,00095499	0,25703958	0,004073
0,00017 g/L	1	0,74131024	0,15488166	0,00489779	0,39810717	0,009549
Kontrola	1	0,83176377	0,16218101	0,00407380	0,01584893	0,000724
Aneta						
17 g/L	1	0,00004677	-	1,86208714	0,00186209	-
1,7 g/L	1	0,19054607	-	1,00000000	0,10715193	-
0,17 g/L	1	0,10471285	-	0,35481339	0,01071519	-
0,017 g/L	1	0,07943282	-	0,35481339	0,18620871	-
0,0017 g/L	1	0,07585776	-	0,85113804	0,04168694	-
0,00017 g/L	1	0,07413102	-	0,57543994	0,22387211	-
Kontrola	1	0,26915348	-	0,00346737	0,22908677	-

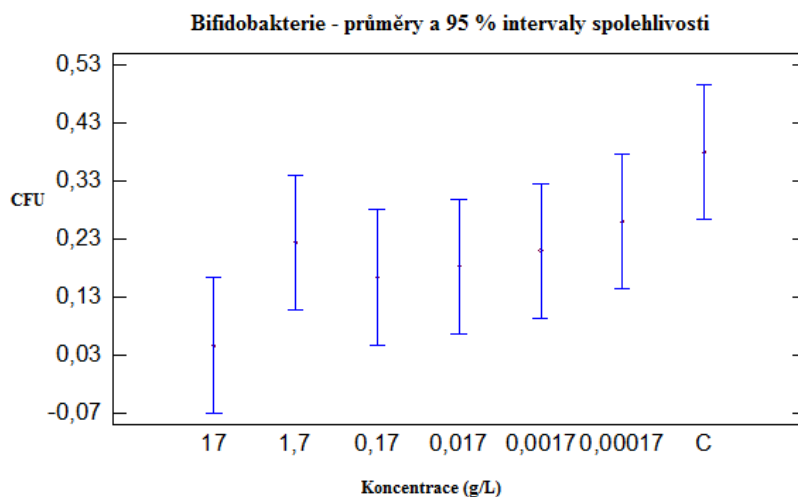
BIFIDOBACTERIE

Souhrnné statistiky pro kmen bifidobakterií jsou uvedeny v Tabulce 13. Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) jsou v Tabulce 13 znázorněny pomocí horních indexů.

Tabulka 13 Souhrnné statistiky pro kmen bifidobakterií

	Počet vzorků	Průměr	Standardní odchylka	Variační koeficient	Minimum	Maximum
17 g/L	5	0,047058 ^a	0,0513252	109,068%	0,0000467735	0,120226
1,7 g/L	5	0,224003 ^{a,b}	0,100176	44,7208%	0,074131	0,331131
0,17 g/L	5	0,164503 ^{a,b}	0,0409611	24,9%	0,104713	0,20893
0,017 g/L	5	0,1834 ^{a,b}	0,0945159	51,5354%	0,0794328	0,323594
0,0017 g/L	5	0,209944 ^{a,b}	0,190805	90,8837%	0,0724436	0,501187
0,00017 g/L	5	0,260096 ^{a,b}	0,288128	110,777%	0,0616595	0,74131
Kontrola	5	0,379484 ^b	0,287799	75,8394%	0,144544	0,831764
Celkem	35	0,209784	0,18833	89,7734%	0,0000467735	0,831764

Byl nalezen statisticky významný rozdíl nárůstu bakterií mezi vzorkem s koncentrací glyfosátu 17 g/L a kontrolním vzorkem (viz také Graf 9). U nižších koncentrací glyfosátu byly rozdíly statisticky nevýznamné.



Graf 9 Průměrný nárůst bifidobakterií při různých koncentracích Roundupu. Graf znázorňuje průměry s 95% intervaly spolehlivosti.

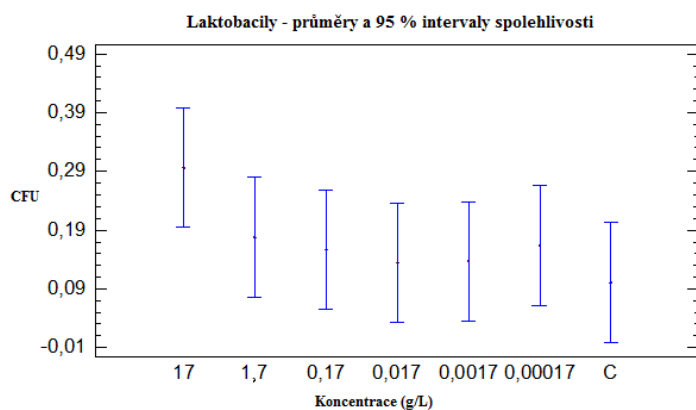
LAKTOBACILY

Souhrnné statistiky pro laktobacily jsou uvedeny v Tabulce 14.

Tabulka 14 Souhrnné statistiky laktobacilů

	<i>Počet vzorků</i>	<i>Průměr</i>	<i>Standardní odchylka</i>	<i>Variační koeficient</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
17 g/L	4	0,296786	0,321773	108,419%	0,0147911	0,74131
1,7 g/L	4	0,177755	0,0851965	47,9291%	0,112202	0,295121
0,17 g/L	4	0,156363	0,0709749	45,3911%	0,0645654	0,229087
0,017 g/L	4	0,134448	0,0635902	47,2972%	0,047863	0,186209
0,0017 g/L	4	0,137518	0,0737136	53,6031%	0,0323594	0,204174
0,00017 g/L	4	0,163579	0,0444073	27,1474%	0,104713	0,204174
Kontrola	4	0,100184	0,0822902	82,1391%	0,011749	0,177828
Celkem	28	0,166662	0,135548	81,3309%	0,011749	0,74131

Při porovnávání množství nakultivovaných laktobacilů nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly (viz Graf 10).



Graf 10 Průměrný nárůst laktobacilů při různých koncentracích glyfosátu. Graf znázorňuje průměry s 95% intervaly spolehlivosti.

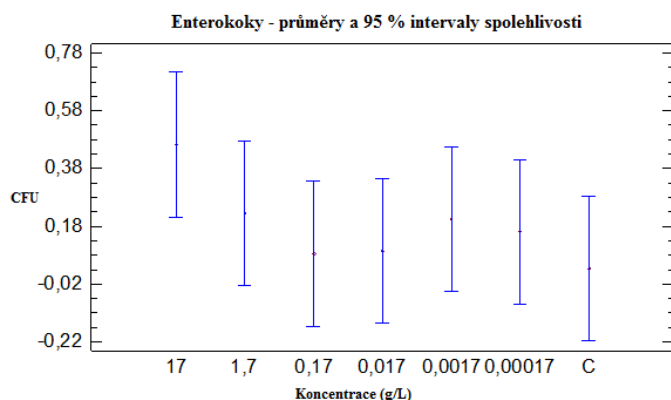
ENTEROKOKY

Souhrnné statistiky pro enterokoky jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 15 Souhrnné statistiky enterokoků

	<i>Počet vzorků</i>	<i>Průměr</i>	<i>Standardní odchylka</i>	<i>Variační koeficient</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
17 g/L	5	0,463473	0,785588	169,5%	0,00467735	1,86209
1,7 g/L	5	0,225092	0,433995	192,808%	0,00281838	1,0
0,17 g/L	5	0,0854403	0,151262	177,038%	0,00275423	0,354813
0,017 g/L	5	0,0942166	0,148483	157,598%	0,00288403	0,354813
0,0017 g/L	5	0,204528	0,366876	179,377%	0,000954993	0,851138
0,00017 g/L	5	0,161984	0,245223	151,388%	0,00251189	0,57544
Kontrola	5	0,0342856	0,0441449	128,756%	0,00346737	0,1
Celkem	35	0,181289	0,375446	207,099%	0,000954993	1,86209

Při porovnávání množství narostlých enterokoků nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly (viz Graf 11).



Graf 11 Průměrný nárůst enterokoků při různých koncentracích glyfosátu. Graf znázorňuje průměry s 95% intervaly spolehlivosti.

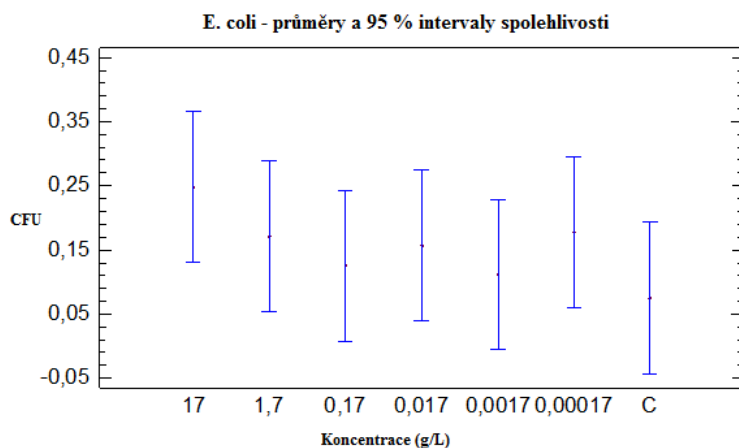
ESCHERICHIA COLI

Souhrnné statistiky pro *E. coli* jsou uvedeny v Tabulce 16.

Tabulka 16 Souhrnné statistiky *E. coli*

	<i>Počet vzorků</i>	<i>Průměr</i>	<i>Standardní odchylka</i>	<i>Variační koeficient</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
17 g/L	5	0,248271	0,344846	138,899%	0,00186209	0,831764
1,7 g/L	5	0,171227	0,18983	110,864%	0,00371535	0,47863
0,17 g/L	5	0,125503	0,105823	84,3191%	0,00870964	0,20893
0,017 g/L	5	0,157151	0,143038	91,019%	0,00269153	0,354813
0,0017 g/L	5	0,112072	0,107881	96,2611%	0,00776247	0,25704
0,00017 g/L	5	0,177157	0,157791	89,0685%	0,00323594	0,398107
Kontrola	5	0,0747677	0,0913671	122,201%	0,00295121	0,229087
Celkem	35	0,152307	0,173101	113,653%	0,00186209	0,831764

Při porovnávání množství narostlých *E. coli* nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly (viz Graf 12).



Graf 12 Průměrný nárůst *E. coli* při různých koncentracích glyfosátu. Graf znázorňuje průměry s 95% intervaly spolehlivosti.

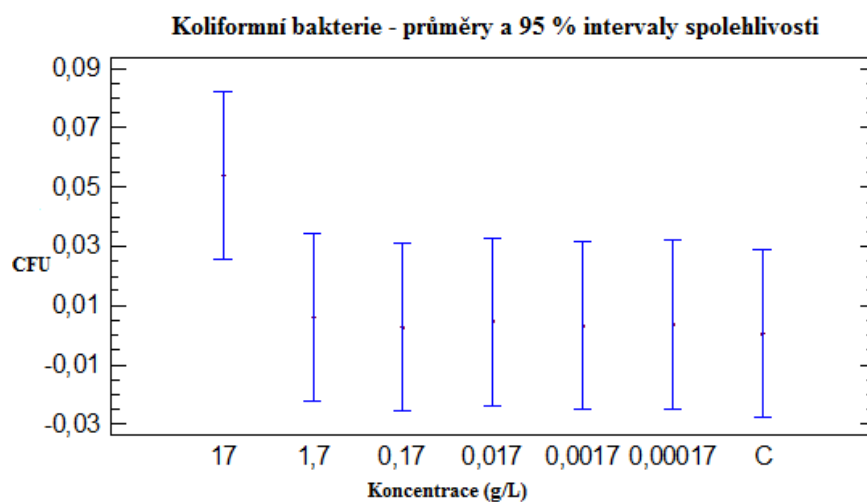
KOLIFORMNÍ BAKTERIE

Souhrnné statistiky pro koliformní bakterie jsou uvedeny v Tabulce 17.

Tabulka 17 Souhrnné statistiky pro koliformní bakterie

	<i>Počet vzorků</i>	<i>Průměr</i>	<i>Standardní odchylka</i>	<i>Variační koeficient</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
17 g/L	3	0,0538844	0,0845395	156,89%	0,000524808	0,151356
1,7 g/L	3	0,0060571	0,00912931	150,721%	0,00057544	0,0165959
0,17 g/L	3	0,00279556	0,00344046	123,069%	0,00060256	0,00676083
0,017 g/L	3	0,00455176	0,00602199	132,3%	0,000588844	0,0114815
0,0017 g/L	3	0,00336511	0,00268377	79,753%	0,000398107	0,00562341
0,000g/L	3	0,00356463	0,00518901	145,569%	0,000331131	0,00954993
Kontrola	3	0,000540756	0,000414579	76,6665%	0,0000660693	0,000831764
Celkem	21	0,0106799	0,0325648	304,916%	0,0000660693	0,151356

Při porovnávání množství nakultivovaných koliformních bakterií nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly (viz Graf 13).



Graf 13 Průměrný nárůst koliformních bakterií při různých koncentracích glyfosátu. Graf znázorňuje průměry s 95% intervaly spolehlivosti.

6 DISKUZE

Vědečtí experti z úřadu EFSA a ze zástupců orgánů pro posuzování rizik v členských státech EU v roce 2015 aktualizovali toxikologický profil glyfosátu a stanovili akutní referenční dávku (ARfD - množství látky v potravinách nebo pitné vodě, které lze konzumovat po dobu 24 hodin nebo kratší bez zřetelných zdravotních rizik pro spotřebitele založených na známých skutečnostech v okamžiku posuzování) pro glyfosát 0,5 mg na 1 kg tělesné hmotnosti. Kromě zavedení akutní referenční dávky pro glyfosát, vědci ve zprávě navrhli také další toxikologické bezpečnostní limity: přijatelnou úroveň expozice obsluhy (AOEL) stanovili na 0,1 mg/kg tělesné hmotnosti za den a akceptovatelný denní příjem (ADI) pro spotřebitele stanovili (v souladu s ARfD) z původní hodnoty 0,3 mg/kg tělesné hmotnosti na hodnotu 0,5 mg/kg tělesné hmotnosti. Vše bude komunikováno se členskými státy (Beránková, 2015).

Navzdory globální dominanci glyfosátu jako herbicidu, probíhá pouze malé množství testů na rezidua glyfosátu v potravinách. V roce 2009 orgány EU provedli 186 852 testů vzorků obilovin na rezidua pesticidů. Ale pouze pět zemí testovalo přímo glyfosát, a to ve výši 462 vzorků, z nichž 42 vzorků bylo pozitivních. Testování glyfosátu se nezdá být prioritním a v EU je zatím jen malý počet laboratoří, které mají vybavení pro detekci této chemikálie. Nedostatek údajů znamená, že je obtížné zjistit, v jak velké míře jsou lidé vystaveni glyfosátu díky perorální expozici (Friends of the Earth Europe, 2013).

Hlavní eliminační cestou glyfosátu v lidském těle je moč, a proto není překvapením, že jsou určitá množství této látky nacházena ve vzorcích lidské moči. Pravděpodobně jsou tyto stopy způsobeny při pracovní expozici nebo příjmem potravy s rezidui pesticidů.

Zemědělská studie v USA měřila glyfosát v moči amerických farmářů a jejich rodin po aplikaci herbicidu na jejich plodiny. V den aplikace mělo 60 % farmářů detekovatelné množství glyfosátu v moči v rozmezí od < 1 do 233 ng/mL. Vzorky moči byly poté znovu odebrány tři dny po aplikaci a glyfosát byl detekovaný v 27 % vzorků s rozmezím od < 1 do 68 ng/mL. Žádná ze systémových dávek z této studie se nepřiblížila k referenční dávce (USEPA) pro glyfosát 2 mg/kg/den (Acquavella et al., 2004).

V loňském roce bylo v německé studii provedeno kritické zhodnocení a porovnání dat získaných z celkem sedmi studií z Evropy a USA. Nebyl odhalen žádný zdravotní problém, protože výsledné odhady expozice byly vždy nižší než ADI nebo AOEL (Niemann et al., 2015).

V této práci byly při testování vlivu různých koncentrací glyfosátu na čisté kultury *in vitro* kmeny bakterií statisticky významně inhibovány v jejich růstu jen při nejvyšší koncentraci glyfosátu (17 g/L), jak oproti kontrolním vzorkům, tak i v porovnání s ostatními nižšími užitými koncentracemi herbicidu.

Při porovnávání jednotlivých kmenů bakterií byly nejvýrazněji inhibovány kmeny bifidobakterií a klostridií, a to opět jen při nejvyšší testované koncentraci glyfosátu. Ovlivnění růstu při této koncentraci se výrazněji projevilo také u kmenů *E. coli*. Jediným kmenem, který na tuto koncentraci nebyl citlivý, byl kmen laktobacilů.

Při stanovení počtu mikroorganismů ze stolice dobrovolných dárců byl shledán statisticky významný rozdíl jen při porovnání počtu bifidobakterií v nejvyšší koncentraci glyfosátu s počtem bifidobakterií v kontrolním vzorku. Z důvodu vysoké variability hodnot narostlých bakterií po kultivaci zde však ani nebyly přepokládány statisticky významné rozdíly.

Shehata et al. (2013) ve své studii vlivu glyfosátu na mikrobiotu drůbeže *in vitro* uvádí, že glyfosát má významné nepříznivé účinky na střevní mikrobiotu u drůbeže, a to snížením množství prospěšných bakterií a zvýšením počtu patogenních bakterií ve střevě. U vysoce patogenních kmenů *Salmonella* a *Clostridium* bylo v této studii zjištěno, že jsou vysoce odolné vůči glyfosátu, zatímco prospěšné bakterie jako *Enterococcus*, *Bacillus* a *Lactobacillus* jsou na glyfosát obzvláště citlivé. Vzhledem k antagonistickému účinku obecně prospěšných bakterií *Enterococcus* spp. na *Clostridium*, toxicita glyfosátu u *Enterococcus* by mohla vést k přemnožení klostridií a vzniku patologií. Naše testované kmeny bakterií však byly méně citlivé ke glyfosátu než ve zmiňované studii. Glyfosát podle studie na mikrobiotě drůbeže inhibuje růst laktobacilů a to již při koncentraci 0,6 g/L. To se však s výsledky u lidských kmenů neshoduje, protože u našeho testování čistých kultur *in vitro* i u sledování růstu laktobacilů pocházejících ze vzorků stolice nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl v citlivosti těchto mikroorganismů. U testování kmene *E. coli* z drůbeží mikrobioty byla stanovena minimální inhibiční koncentrace glyfosátu 1,2 g/L, lidské *E. coli* však na tuto koncentraci také nebyly citlivé.

Krüger et al. (2013) při *in vitro* studii zjistili, že glyfosát může být významným faktorem při pozorovaném zvýšeném riziku infekcí *Clostridium botulinum* u skotu v Německu. Autoři dospěli k závěru, že požití residuí glyfosátu v podaném krmivu mohlo predisponovat dobytek k infekci klostridiemi. U glyfosátu byla prokázána toxicita pro *Enterococcus* spp., která vede v nerovnováze ve střevě a umožňuje přemnožení toxických

Clostridium spp. V našem pozorování však u enterokoků ze stolic dobrovolných dárců nebyla pozorována žádná statisticky významná reakce na glyfosát.

Výsledky této práce podporují domněnku, že střevní bakterie jsou na nižší množství glyfosátu necitlivá. Bakterie většinou reagovaly jen na použité nejvyšší koncentrace glyfosátu 17 g/L, což je takové množství glyfosátu, se kterým se člověk pravděpodobně běžně do kontaktu nedostane a potravou takové množství také nepřijme, jelikož i za předpokladu, že by průměrný evropský spotřebitel konzumoval výhradně potraviny s obsahem glyfosátu na úrovni příslušných maximálních limitů reziduí, jeho příjem glyfosátu byl stanoven na hodnotu 0,132 mg/kg tělesné hmotnosti/den. To je v přepočtu pouze 44 % ADI hodnoty 0,3 mg/kg tělesné hmotnosti/den (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2013). Glyfosát inhibuje syntézu tří aromatických aminokyselin (Steinrücken a Amrhein, 1980; Giesy et al., 2000), což je pro rostliny, vzhledem k autotrofnímu způsobu výživy, letální. Prostředí tlustého střeva je velmi bohaté na živiny, a tudíž předpokládáme, že přítomnost glyfosátu nemá na střevní bakterie výraznější vliv.

7 ZÁVĚR

Z výsledků testování vlivu pesticidu Roundup na různé střevní mikroorganismy vyplývá, že pokud budou brány v potaz jen nižší testované koncentrace glyfosátu, se kterými mohou střevní mikroorganismy přijít do kontaktu, pak hypotéza, která byla formulována na začátku práce, nebyla potvrzena.

Ať už se odborníci shodnou na tom, zdali glyfosát působí karcinogenně nebo ne či do jaké míry tato chemická látka poškozuje nebo nepoškozuje zdraví živočichů a životní prostředí, měli bychom se zamyslet nad tím, jestli nutně musíme používat glyfosát v tak velkém množství. Podle mého mínění by se například i zemědělství mohlo obejít bez nadměrného využívání glyfosátu. Řešením by mohla být například vyšší podpora ekologického zemědělství, ve kterém je používání syntetických pesticidů zakázáno. Je však nutné především snížit spotřebu glyfosátu tam, kde je používání glyfosátu opravdu jen plýtvání chemickými látkami, ať už při desikaci zemědělských plodin před sklizní, nebo ve městech a zahradách, kde se herbicidy používají na místech, na která by stačilo obyčejné pleť, nebo by se vůbec nemusela ošetřovat.

8 SEZNAM LITERATURY

- Acquavella, J. F., Alexander, B. H., Mandel, J. S., Gustin, Ch., Baker, B., Chapman, P., Bleeke, M. 2004. Glyphosate Biomonitoring for Farmers and Their Families: Results from the Farm Family Exposure Study. *Environmental Health Perspectives*. 112(3), 321-326.
- Alavanja, M. C., Samanic C., Dosemeci, M. 2003. Use of Agricultural Pesticides and Prostate Cancer Risk in the Agricultural Health Study Cohort. *American Journal of Epidemiology*. 157(9), 800-814. DOI: 10.1093/aje/kwg040. ISSN 00029262.
- Band, P. R., Abanto, Z., Bert, J., Lang, B., Fang, R., Gallagher, R. P., D. Le, N. 2011. Prostate cancer risk and exposure to pesticides in British Columbia Farmers. *The Prostate*. 71(2), 168-183. DOI: 10.1002/pros.21232. ISSN 02704137.
- Bempah, C. K., Buah-Kwofie, A., Enimil, E., Blewu, B., Agyei-Martey, G. 2012. Residues of organochlorine pesticides in vegetables marketed in Greater Accra Region of Ghana. *Food Control*. 25(2), 537-542. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.11.035. ISSN 09567135.
- Beránková, J. 2015. Glyfosát: EFSA aktualizuje toxikologický profil. Informační centrum bezpečnosti potravin [online]. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/glyfosat-efsa-aktualizuje-toxikologicky-profil.aspx>
- Bezirtzoglou, E. 1997. The Intestinal Microflora During the First Weeks of Life. *Anaerobe*. 3(2-3), 173-177. DOI: 10.1006/anae.1997.0102. ISSN 10759964.
- Bjørning-Poulsen, M., Andersen, H., Grandjean, P. 2008. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environmental Health*. 7(1), 50-. DOI: 10.1186/1476-069X-7-50. ISSN 1476-069x.
- Bradberry, S. M., Proudfoot, A. T., Vale, J. A. 2004. Glyphosate poisoning. *Toxicological Reviews*. Birmingham, 23(3), 159-167.
- Bundesinstitut für Risikobewertung. 2013. Glyphosate in Urine - Concentrations are far below the range indicating a potential health hazard [online]. [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://www.bfr.bund.de/cm/349/glyphosate-in-urine-concentrations-are-far-below-the-range-indicating-a-potential-health-hazard.pdf>
- Camp, J. G., Kanther, M., Semova, I., Rawls, J. F. 2009. Patterns and Scales in Gastrointestinal Microbial Ecology. *Gastroenterology*. 136(6), 1989-2002. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.02.075. ISSN 00165085.
- Daniels, J. L., Olshan, A. F., Savitz, D. A. 1997. Pesticides and childhood cancers. *Environmental Health Perspectives*. 105(10), 1068-1077.
- Duke, S. O., Powles S. B. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*. 64(4), 319-325. DOI: 10.1002/ps.1518. ISSN 1526498x.
- Duke, S. O., Powles, S. B. 2009. Glyphosate-resistant crops and weeds: Now and in the future. *AgBioForum*, 12(3&4), 346-357.

European Council, 1980. Council Directive of 15 July 1980 relating to the quality of water intended for human consumption (80/778/EEC). Official Journal of the European Communities. No L 229/21.

EWG: EWG's 2015 Shopper's Guide to Pesticides in Produce. 2015. Environmental Working Group[online]. [cit. 2016-01-08]. Dostupné z: <http://www.ewg.org/foodnews/summary.php>

Fan, S., Zhang, F., Deng, K., Yu, Ch., Liu, S., Zhao, P., Pan, C. 2013. Spinach or Amaranth Contains Highest Residue of Metalaxyl, Fluazifop-P-butyl, Chlorpyrifos, and Lambda-cyhalothrin on Six Leaf Vegetables upon Open Field Application. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 61(9), 2039-2044. DOI: 10.1021/jf304710u. ISSN 0021-8561.

Fenik, J., Tankiewicz, M., Biziuk, M. 2011. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. Trends in Analytical Chemistry. 30(6). DOI: 10.1016/j.trac.2011.02.008. ISBN 10.1016/j.trac.2011.02.008. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993611000938>

Franz, J. E., Mao, M. K., Sikorski, J. 1997. Glyphosate: a unique global herbicide. Washington, DC: American Chemical Society. ISBN 08-412-3458-2.

Friends of the Earth Europe. 2013. Human contamination by glyphosate [online]. Brusel. [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: https://www.foeeurope.org/sites/default/files/press_releases/foee_4_human_contamination_glyphosate.pdf

Ganzelmeier, H., Rautmann, D., Spangenberg, R., Streloke, M., Herrmann, M., Wenzelburger, H. J., Walter, H. F. 1995. Studies on the spray drift of plant protection products: results of the test program carried out throughout the Federal Republic of Germany. Berlín: Blackwell. 111 s. ISBN 3-8263-3039-0.

Giesy, J. P., Dobson, S., Solomon, K. R. 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 167, 35-120. DOI: 10.1007/978-1-4612-1156-3_2. ISSN 0179-5953. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4612-1156-3_2

Greenpeace. 1995. Pesticides in the Ground Water: Results of a Survey of German Public Health Offices in 1994. Hamburg.

Guarner, F., Malagelada, J. R. 2003. Gut flora in health and disease. The Lancet. 361(9356), 512-519. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12489-0. ISSN 01406736.

Guillette E. A., Meza M. M., Aquilar M. G., Soto A. D., Garcia I. E. 1998. An anthropological approach to the evaluation of preschool children exposed to pesticides in Mexico. Environmental Health Perspectives. 106(6):347-353.

Hajšlová, J. 2004. Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka. Kód publikace: VVF: PROJ/2003/5/deklas. Praha: Vědecký výbor fytoosanitární a životního prostředí, Výzkumný ústav rostlinné výroby.

- Honda, I., Kohrogi, H., Ando, M., Araki, S. 1992. Occupational asthma induced by the fungicide tetrachloroisophthalonitrile. *Thorax*. 47: 760–61.
- IARC. 2015. IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- FAO. 2005. International code of conduct on the distribution and use of pesticides: adopted by the hundred and twenty-third session of the FAO Council in November 2002. Rev. version. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISBN 92-510-5411-8.
- Keifer, M. C., Mahurin, R. K. 1997. Chronic Neurologic Effects of Pesticide Overexposure. *Occupational Medicine*. 12: 291-304
- Koch, A. L. 1970. Turbidity Measurements of Bacterial Cultures in Some Available Commercial Instruments. *Analytical Biochemistry* 38, 252-259.
- Koch, P. 1996. Occupational allergic contact dermatitis and airborne contact dermatitis from 5 fungicides in a vineyard worker. Cross-reactions between fungicides of the dithiocarbamate group? *Contact Dermatitis*. 34(5), 324-329. DOI: 10.1111/j.1600-0536.1996.tb02216.x. ISSN 01051873. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0536.1996.tb02216.x>
- Krüger, M., Shehata, A. A., Schrödl, W., Rodloff, A. 2013. Glyphosate suppresses the antagonistic effect of *Enterococcus* spp. on *Clostridium botulinum*. *Anaerobe*. 20, 74-78. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2013.01.005. ISSN 10759964.
- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N., Strobel, S. 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annual Review of Nutrition*. 20(1), 699-722. DOI: 10.1146/annurev.nutr.20.1.699. ISSN 0199-9885.
- Langston, J. W. 1998. Epidemiology versus genetics in Parkinson's disease: progress in resolving an age-old debate. *Annals of neurology*. 44(3), 45-52.
- Lata, J., Juránková, J. 2011. Střevní mikroflóra, slizniční bariéra a probiotika u některých interních chorob. *Interní medicína*. 13(2), 63-69.
- Macfarlane, G. T., Fava, F. 2011. Fermentation in the Human Large Intestine: a new clinical frontier. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 45, S120-S127. DOI: 10.1097/MCG.0b013e31822fecfe. ISBN 10.1136/gutjnl-2015-309990. ISSN 0192-0790.
- Mamy, L., Gabrielle, B., Barriuso, E. 2010. Comparative environmental impacts of glyphosate and conventional herbicides when used with glyphosate-tolerant and non-tolerant crops. *Environmental Pollution*. 158(10), 3172-3178. DOI: 10.1016/j.envpol.2010.06.036. ISSN 02697491.
- Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F. 2015. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-309990.

Meeker, J. D., Ravi, S. R., Barr, D. B., Hauser, R. 2008. Circulating estradiol in men is inversely related to urinary metabolites of nonpersistent insecticides. *Reproductive Toxicology*. 25(2), 184-191. DOI: 10.1016/j.reprotox.2007.12.005. ISSN 08906238. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890623807003395>

Mentberger, V. 1998. *Pesticidy v ochraně lesa*. Praha.

Monsanto. 2016. Roundup Klasik Pro: Fakta. Roundup [online]. [cit. 2016-02-03]. Dostupné z: <http://www.roundup.cz/roundup-klasik/fakta>

Morais, S., Dias, E., Pereira, M. 2012. *Carbamates: human exposure and health effects. The Impact of Pesticides*. WY Academy Press. 21-38.

Morrison, H. I., Semenciw, R. M., Wilkins, K., Mao, Y., Wigle, D. T. 1994. Non-Hodgkin's lymphoma and agricultural practices in the prairie provinces of Canada. *Scandinavian Journal of Work, Environment*. 20(1), 42-47. DOI: 10.5271/sjweh.1430. ISSN 0355-3140.

Niemann, L., Sieke, CH., Pfeil, R., Solecki, R. 2015. A critical review of glyphosate findings in human urine samples and comparison with the exposure of operators and consumers. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 10(1), 3-12. DOI: 10.1007/s00003-014-0927-3. ISSN 1661-5751. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00003-014-0927-3>

Nord, C. E., Kager, J. 1984. The normal flora of the gastrointestinal tract. *Netherlands Journal of Medicine*. 27: 249–252.

O'Malley, M. A. 1997. Skin reactions to pesticides. *Occupational Medicine State of the Art Reviews* 12. 2: 327–45

Petr, J. 2008. GM rostliny rezistentní k herbicidům a kvalita vod. Objective Source E-Learning [online]. [cit. 2016-02-03]. Dostupné z: <http://www.osel.cz/3571-gm-rostliny-rezistentni-k-herbicidum-a-kvalita-vod.html>

Pirsaheb, M., Limoe, M., Namdari, F., Khamutian, R. 2015. Organochlorine pesticides residue in breast milk: a systematic review. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 29, 228.

Prugar, J. 2008. *Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí*. 1. vydání. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský ve spolupráci s komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV. 327s. ISBN 978-80-86576-28-2.

Reffstrup, T. K., Larsen, J. Ch., Meyer, O. 2010. Risk assessment of mixtures of pesticides. Current approaches and future strategies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 56(2), 174-192. DOI: 10.1016/j.yrtph.2009.09.013. ISSN 02732300. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230009001986>

Reigart, J. R., Roberts, J. R. 1999. *Recognition and management of pesticide poisonings*, 5. vydání, Washington: U.S. Environmental Protection Agency.

Ribas-Fito, N., Torrent, M., Carrizo, D., Julvez, J., Grimalt, J. O., Sunyer, J. 2007. Exposure to Hexachlorobenzene during Pregnancy and Children's Social Behavior at 4 Years of Age. *Environmental Health Perspectives*. 115(3), 447-450. DOI: 10.1289/ehp.9314. ISSN 0091-6765.

Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C. 2015. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health*. 26, -. DOI: 10.3402/mehd.v26.26050. ISSN 1651-2235.

Samsel, A., Seneff, S., 2013. Glyphosate's Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases. *Entropy*. 15(4), 1416-1463. DOI: 10.3390/e15041416. ISSN 1099-4300. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1099-4300/15/4/1416/>

Sánchez-Santed, F., Colomina, M. T., Hernández, E. H. 2016. Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. *Cortex*. 74, 417 - 426. DOI: 10.1016/j.cortex.2015.10.003. ISSN 0010-9452.

Savage, D. C. 1977. Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annual Review of Microbiology*. 31(1), 107-133. DOI: 10.1146/annurev.mi.31.100177.000543. ISSN 0066-4227.

Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. 2016. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *The Preprinter Server for Biology* [online]. [cit. 2016-03-15]. DOI: 10.1101/036103. Dostupné z: <http://biorxiv.org/content/biorxiv/early/2016/01/06/036103.full.pdf>

Shehata, A. A., Schrödl, W., Aldin, A. A., Hafez, H. M., Krüger, M. 2013. The Effect of Glyphosate on Potential Pathogens and Beneficial Members of Poultry Microbiota In Vitro. *Current Microbiology*. 66(4), 350-358. DOI: 10.1007/s00284-012-0277-2. ISSN 0343-8651.

Smith, E. A., Macfarlane, G. T. 1996. Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *Journal of Applied Bacteriology*. 81(3), 288-302. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb04331.x. ISSN 00218847.

Solomon, G., Ogunseitan O. A., Kirsch, J. 2000. *Pesticides and Human Health: A Resource for Health Care Professionals*. San Francisco: Physicians for Social Responsibility and Californians for Pesticide Reform.

Starr, J., Graham, S., Stout, D., Andrews, K., Nishioka, M. 2008. Pyrethroid pesticides and their metabolites in vacuum cleaner dust collected from homes and day-care centers. *Environmental Research*. 108(3), 271-279. DOI: 10.1016/j.envres.2008.07.022. ISSN 00139351. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935108001655>

Steinrücken, H. C., Amrhein, N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 94(4), 1207 - 1212.

Székács, A., Darvas, B. 2012. Forty Years with Glyphosate. *Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds*. InTech. ISBN: 978-953-307-803-8. DOI: 10.5772/32491. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-properties-synthesis-and-control-of-weeds/forty-years-with-glyphosate>

Thatheyus, A. J., Gnana Selvam A. D. 2013. Synthetic Pyrethroids: Toxicity and Biodegradation. *Applied Ecology and Environmental Sciences*. 1(3), 33-36. DOI: 10.12691/aees-1-3-2. ISSN 2328-3912. Dostupné také z: <http://pubs.sciepub.com/aees/1/3/2/index.html>

Thiruchelvam, M., Richfield, E. K., Baggs, R. B., Tank, A. W., Cory-Slechta, D. A., 2000. The Nigrostriatal Dopaminergic System as a Preferential Target of Repeated Exposures to Combined Paraquat and Maneb: Implications for Parkinson's Disease. *The Journal of Neuroscience*. 20(24), 9207-9214.

USEPA. 1992. *Pesticides in Ground Water Database: A Compilation of Monitoring Studies*. EPA number: 734R92001. 203 s. Washington, D. C.: U.S. Environmental Protection Agency.

Van Der Mark, M., Brouwer, M., Kromhout, H., Nijssen, P., Huss, A., Vermeulen, R. 2011. Is Pesticide Use Related to Parkinson Disease? Some Clues to Heterogeneity in Study Results. *Environmental Health Perspectives*. 120(3), 340-347. DOI: 10.1289/ehp.1103881. ISSN 0091-6765. Dostupné také z: <http://ehp.niehs.nih.gov/1103881>

Van Maele-Fabry, G., Lantin, A., Hoet, P., Lison, D. 2010. Childhood leukaemia and parental occupational exposure to pesticides: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes*. 21(6), 787-809. DOI: 10.1007/s10552-010-9516-7. ISSN 0957-5243. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10552-010-9516-7>

Van Maele-Fabry, F., Hoet, P., Vilain, F., Lison, D. 2012. Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Environment International*. 46, 30-43. DOI: 10.1016/j.envint.2012.05.004. ISSN 01604120. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412012001043>

Vědecký výbor pro potraviny. 2005. Rezidua pesticidů v potravinách. Kód publikace: VVP:PEST/2005/1/deklas. In: Vědecký výbor pro potraviny [online]. Brno [cit. 2016-01-03]. Dostupné z: http://czvp.szu.cz/vedvybor/dokumenty/studie/pest_2005_1_deklas.pdf

Waaij, V. D. 1989. The Ecology of the Human Intestine and its Consequences for Overgrowth by Pathogens such as *Clostridium Difficile*. *Annual Review of Microbiology*. 43(1), 69-87. DOI: 10.1146/annurev.mi.43.100189.000441. ISSN 0066-4227.

Weichenthal, S., Moase, C., Chan, P. 2010. A Review of Pesticide Exposure and Cancer Incidence in the Agricultural Health Study Cohort. *Environmental Health Perspectives*. 118(8), 1117-1125. DOI: 10.1289/ehp.0901731. ISSN 0091-6765. Dostupné také z: <http://ehp.niehs.nih.gov/0901731>

Weselak, M., Arbuckle, T. E., Wigle, D. T., Krewski, D. 2007. In utero pesticide exposure and childhood morbidity. *Environmental Research*. 103(1), 79-86. DOI: 10.1016/j.envres.2006.09.001. ISSN 00139351.

WHO. 1994. Glyphosate: Environmental health criteria 159. Geneva: World Health Organization. ISBN 92-415-7159-4.

WHO. 2010. WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. Geneva: World Health Organization. ISBN 978 92 4 154796 3.

Williams, G. M., Kroes, R., Muro, I. C., 2000. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 31(2), 117 - 165.

Willimas, A. L., Watson, R. E., Desesso, J. M. 2012. Developmental and Reproductive Outcomes in Humans and Animals After Glyphosate Exposure: A Critical Analysis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 15(1), 39-96. DOI: 10.1080/10937404.2012.632361. ISSN 1093-7404.

Yuan, Y., Chen, Ch., Zheng, Ch., Wang, X., Yang, G., Wang, Q., Zhang, Z. 2014. Residue of chlorpyrifos and cypermethrin in vegetables and probabilistic exposure assessment for consumers in Zhejiang Province, China. *Food Control*. 36(1), 63-68. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.08.008. ISSN 09567135.

Zaganas, I., Kapetanaki, S., Mastorodemos, V., Kanavouras, K., Coosio, C., Wilks, M. F., Tsatsakis, A. M. 2013. Linking pesticide exposure and dementia: What is the evidence? *Toxicology*. 307, 3-11. DOI: 10.1016/j.tox.2013.02.002. ISSN 0300483x.

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Optická denzita vzorků při vlnové délce 600 nm

Příloha 2 Počty bakterií (CFU/mL)

10 PŘÍLOHY

Příloha 1 Optická denzita vzorků při vlnové délce 600 nm

VZ	0	1	1:45	2:30	3:15	4	5	6	7	8	8:45	24 h
Klostridie 17 g/L	0,37	0,46	0,49	0,60	0,76	0,83	1,06	1,12	1,28	1,53	1,64	2,55
Klostridie 1,7 g/L	0,33	0,47	0,70	1,34	1,86	2,36	2,86	3,26	3,50	3,56	3,48	3,80
Klostridie 0,17 g/L	0,26	0,42	0,73	1,58	2,14	2,81	3,14	3,34	3,49	3,40	3,40	3,68
Klostridie Kontrola	0,29	0,67	1,40	2,38	2,89	3,29	3,76	3,77	3,79	3,73	3,70	4,02
Klostridie 17 g/L	0,48	0,47	0,51	0,50	0,49	0,51	0,52	0,49	0,50	0,47	0,49	0,50
Klostridie 1,7 g/L	0,44	0,47	0,45	0,46	0,55	0,64	0,95	1,52	2,58	3,90	5,14	7,23
Klostridie 0,17 g/L	0,50	0,51	0,46	0,56	0,74	1,07	2,25	3,62	5,33	6,48	7,40	6,99
Klostridie Kontrola	0,24	0,30	0,30	0,28	0,32	0,35	0,60	1,25	2,80	4,44	5,88	6,24
Klostridie 17 g/L	0,33	0,31	0,33	0,27	0,00	0,28	0,33	0,32	0,27	0,30	0,30	0,25
Klostridie 1,7 g/L	0,33	0,30	0,27	0,29	0,20	0,29	0,28	0,30	0,28	0,22	0,21	3,24
Klostridie 0,17 g/L	0,27	0,18	0,23	0,23	0,17	0,25	0,26	0,40	0,76	1,75	2,87	3,72
Klostridie Kontrola	0,33	0,24	0,27	0,26	0,28	0,29	0,32	0,32	0,38	0,51	0,90	3,81
Klostridie 17 g/L	0,39	0,36	0,35	0,32	0,26	0,26	0,35	0,36	0,34	0,24	0,32	0,22
Klostridie 1,7 g/L	0,39	0,39	0,34	0,37	0,35	0,33	0,37	0,35	0,32	0,30	0,37	6,70
Klostridie 0,17 g/L	0,21	0,15	0,23	0,23	0,22	0,23	0,21	0,20	0,23	0,42	1,57	7,15
Klostridie Kontrola	0,54	0,53	0,47	0,44	0,42	0,45	0,45	0,47	0,64	1,98	3,78	7,32
Klostridie 17 g/L	0,37	0,37	0,38	0,37	0,33	0,38	0,33	0,32	0,30	0,31	0,34	0,26
Klostridie 1,7 g/L	0,45	0,42	0,41	0,42	0,41	0,44	0,43	0,46	0,44	0,38	0,42	6,73
Klostridie 0,17 g/L	0,35	0,36	0,39	0,37	0,37	0,36	0,37	0,38	0,39	0,37	0,37	7,30
Klostridie Kontrola	0,50	0,49	0,50	0,49	0,49	0,45	0,42	0,45	0,50	0,43	0,44	7,05
Bifidobakterie 17 g/L	0,31	0,33	0,34	0,36	0,30	0,31	0,31	0,30	0,30	0,29	0,26	0,26
Bifidobakterie 1,7 g/L	0,37	0,41	0,45	0,56	0,70	1,07	2,56	3,94	4,57	5,02	5,07	5,27
Bifidobakt. 0,17 g/L	0,30	0,37	0,40	0,56	0,83	1,37	3,39	4,57	4,91	5,16	5,20	5,74
Bifidobakt. Kontrola	0,43	0,53	0,74	1,03	1,74	3,01	4,52	4,76	5,02	5,02	5,08	5,55
Bifidobakterie 17 g/L	0,24	0,28	0,31	0,31	0,28	0,27	0,31	0,27	0,22	0,23	0,29	0,53
Bifidobakterie 1,7 g/L	0,25	0,36	0,39	0,33	0,39	0,35	0,44	0,65	0,92	1,28	1,46	2,83
Bifidobakt. 0,17 g/L	0,29	0,31	0,25	0,29	0,33	0,34	0,48	0,69	1,01	1,73	2,00	3,36
Bifidobakt. Kontrola	0,34	0,42	0,40	0,42	0,48	0,42	0,74	1,12	1,26	2,02	2,30	3,03
Bifidobakterie 17 g/L	0,30	0,33	0,31	0,33	0,34	0,37	0,45	0,51	0,62	0,71	0,70	1,74
Bifidobakterie 1,7 g/L	0,38	0,35	0,40	0,51	0,60	0,83	1,11	1,49	1,91	2,04	2,45	3,48
Bifidobakt. 0,17 g/L	0,32	0,29	0,37	0,52	0,64	0,94	1,33	1,77	2,25	2,78	3,05	3,79
Bifidobakt. Kontrola	0,29	0,27	0,42	0,52	0,72	0,95	1,56	1,97	2,60	2,98	3,14	3,68
Bifidobakterie 17 g/L	0,19	0,21	0,20	0,24	0,26	0,20	0,29	0,28	0,28	0,40	0,38	0,67
Bifidobakterie 1,7 g/L	0,25	0,21	0,21	0,20	0,31	0,50	0,53	0,93	1,12	1,25	1,35	2,61
Bifidobakt. 0,17 g/L	0,28	0,26	0,26	0,34	0,36	0,51	0,88	1,30	1,84	2,04	2,20	2,95
Bifidobakt. Kontrola	0,31	0,29	0,31	0,35	0,40	0,53	0,99	1,42	1,79	1,98	2,12	2,93

VZ	0	1	1:45	2:30	3:15	4	5	6	7	8	8:45	24 h
Bifidobakterie 17 g/L	0,26	0,30	0,27	0,29	0,26	0,27	0,27	0,29	0,35	0,38	0,37	0,56
Bifidobakterie 1,7 g/L	0,33	0,35	0,33	0,51	0,63	0,91	1,37	1,78	2,22	2,67	2,85	3,31
Bifidobakt. 0,17 g/L	0,28	0,30	0,34	0,42	0,60	0,87	1,38	2,00	2,56	3,09	3,19	3,50
Bifidobakt. Kontrola	0,32	0,31	0,39	0,48	0,62	0,94	1,57	2,12	2,61	2,96	3,26	3,62
Bifidobakterie 17 g/L	0,40	0,38	0,33	0,35	0,38	0,37	0,45	0,40	0,39	0,47	0,47	1,05
Bifidobakterie 1,7 g/L	0,40	0,40	0,48	0,64	0,92	1,40	2,56	3,41	4,16	4,71	5,16	6,73
Bifidobakt. 0,17 g/L	0,37	0,38	0,40	0,50	0,74	1,16	2,46	3,43	4,35	4,97	5,38	6,75
Bifidobakt. Kontrola	0,33	0,33	0,51	0,67	1,01	1,65	2,90	3,57	4,33	4,76	5,05	6,17
Bifidobakterie 17 g/L	0,35	0,35	0,26	0,33	0,34	0,29	0,34	0,35	0,29	0,39	0,36	5,25
Bifidobakterie 1,7 g/L	0,37	0,38	0,31	0,37	0,35	0,33	0,49	0,61	1,08	2,48	3,69	6,49
Bifidobakt. 0,17 g/L	0,42	0,40	0,45	0,47	0,43	0,51	0,68	0,95	1,67	3,40	4,61	6,63
Bifidobakt. Kontrola	0,42	0,37	0,43	0,45	0,45	0,49	0,57	0,59	1,02	1,94	3,16	6,28
Laktobacily 17 g/L	0,40	0,60	0,88	1,38	1,89	2,12	3,31	4,22	4,67	4,66	4,80	4,16
Laktobacily 1,7 g/L	0,35	0,65	1,13	1,81	2,20	2,87	4,61	5,22	5,73	5,69	5,94	5,54
Laktobacily 0,17 g/L	0,43	0,68	1,01	1,83	2,26	2,82	3,96	5,19	5,58	5,69	5,83	5,67
Laktobacily Kontrola	0,38	0,63	1,07	1,75	2,19	2,57	3,64	4,70	5,54	5,57	5,74	5,57
Laktobacily 17 g/L	0,44	0,49	0,60	0,81	1,01	1,34	2,05	2,80	3,62	3,71	3,75	3,79
Laktobacily 1,7 g/L	0,41	0,56	0,70	1,22	1,65	2,20	3,52	4,49	4,83	4,82	4,92	4,90
Laktobacily 0,17 g/L	0,40	0,53	0,72	1,16	1,72	2,34	3,79	4,88	5,40	5,13	5,32	5,24
Laktobacily Kontrola	0,43	0,56	0,81	1,22	1,95	2,71	4,27	5,07	5,36	5,20	5,26	5,18
Laktobacily 17 g/L	0,45	0,88	1,47	2,23	2,94	3,80	4,16	4,25	4,30			
Laktobacily 1,7 g/L	0,37	0,98	2,17	3,41	4,54	5,16	5,29	5,36	5,32	5,40	5,36	5,09
Laktobacily 0,17 g/L	0,46	0,99	2,40	3,42	4,51	5,14	5,42	5,37	5,38	5,30	5,25	4,72
Laktobacily Kontrola	0,52	1,56	2,84	3,85	4,66	5,34	5,29	5,19	5,20	5,13	5,19	4,35
Laktobacily 17 g/L	0,24	0,28	0,19	0,19	0,20	0,29	0,31	0,46	0,63	0,87	0,97	1,27
Laktobacily 1,7 g/L	0,22	0,26	0,22	0,26	0,23	0,32	0,52	0,87	1,07	1,34	1,37	2,32
Laktobacily 0,17 g/L	0,19	0,23	0,18	0,22	0,29	0,31	0,39	0,62	0,89	1,14	1,26	2,02
Laktobacily Kontrola	0,29	0,25	0,30	0,30	0,28	0,41	0,49	0,60	0,90	1,15	1,19	1,77
<i>E. coli</i> 17 g/L	0,40	0,67	0,84	1,04	1,16	1,28	1,51	1,62	1,72	1,81	1,77	1,96
<i>E. coli</i> 1,7 g/L	0,44	1,41	2,23	2,89	3,20	3,37	3,62	3,77	3,69	3,82	3,84	4,02
<i>E. coli</i> 0,17 g/L	0,51	1,72	3,18	3,98	4,02	4,27	4,39	4,54	4,49	4,60	4,63	4,85
<i>E. coli</i> Kontrola	0,56	2,15	3,57	4,13	4,38	4,49	4,66	4,73	4,68	4,70	4,74	4,97
<i>E. coli</i> 17 g/L	0,35	0,46	0,55	0,69	0,72	0,74	0,86	1,00	0,93	1,09	1,06	1,23
<i>E. coli</i> 1,7 g/L	0,41	0,86	1,56	1,96	2,29	2,79	2,91	3,09	2,98	3,14	3,11	3,21
<i>E. coli</i> 0,17 g/L	0,44	0,94	1,89	2,70	3,14	3,21	3,49	3,55	3,55	3,57	3,69	3,74
<i>E. coli</i> Kontrola	0,46	1,11	2,12	3,05	3,34	3,49	3,85	3,88	3,82	3,86	3,90	3,98
<i>E. coli</i> 17 g/L	0,40	0,70	0,93	0,93	1,07	1,29	1,49	1,60	1,63	1,79	1,77	1,96
<i>E. coli</i> 1,7 g/L	0,44	1,16	1,95	3,14	3,61	3,77	4,07	4,05	3,96	3,98	4,07	4,39
<i>E. coli</i> 0,17 g/L	0,31	1,22	2,18	3,79	4,26	4,30	4,60	4,49	4,47	4,60	4,62	4,85
<i>E. coli</i> Kontrola	0,50	1,54	2,70	4,16	4,42	4,69	4,76	4,86	4,82	4,75	4,89	5,07

VZ	0	1	1:45	2:30	3:15	4	5	6	7	8	8:45	24 h
<i>E. coli</i> 17 g/L	0,37	0,67	0,86	0,92	1,06	1,13	1,40	1,49	1,61	1,66	1,73	1,83
<i>E. coli</i> 1,7 g/L	0,33	1,22	2,36	3,72	4,09	4,17	4,28	4,35	4,44	4,57	4,55	4,73
<i>E. coli</i> 0,17 g/L	0,55	1,61	2,86	4,22	4,42	4,73	4,81	4,71	4,76	4,90	4,88	5,07
<i>E. coli</i> Kontrola	0,49	1,52	2,60	4,23	4,44	4,74	4,89	4,87	4,90	4,95	4,99	5,09
<i>Bacteroides</i> 17 g/L	0,40	0,40	0,40	0,37	0,36	0,36	0,37	0,37	0,34	0,35	0,37	0,33
<i>Bacteroides</i> 1,7 g/L	0,40	0,37	0,44	0,55	0,64	0,83	1,34	1,83	2,60	3,29	3,64	4,34
<i>Bacteroides</i> 0,17 g/L	0,40	0,45	0,56	0,81	1,30	2,08	3,87	4,42	4,77	5,11	5,16	6,35
<i>Bacteroides</i> Kontrola	0,45	0,57	0,77	1,18	1,89	3,06	4,56	4,97	4,99	5,39	5,41	6,63

Příloha 2 Počty bakterií (CFU/mL)

Kmen	0 h	1 h	1:45 h	2:30 h	3:15 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	8:45 h	24 h
Klostridie 17 g/L	1110000	1380000	1470000	1800000	2280000	2490000	3180000	3360000	3840000	4590000	4920000	7650000
Klostridie 1,7 g/L	990000	1410000	2100000	4020000	5580000	7080000	8580000	9780000	10500000	10680000	10440000	11400000
Klostridie 0,17 g/L	780000	1260000	2190000	4740000	6420000	8430000	9420000	10020000	10470000	10200000	10200000	11040000
Klostridie Kontrola	870000	2010000	4200000	7140000	8670000	9870000	11280000	11310000	11370000	11190000	11100000	12060000
Klostridie 17 g/L	1440000	1410000	1530000	1500000	1470000	1530000	1560000	1470000	1500000	1410000	1470000	1500000
Klostridie 1,7 g/L	1320000	1410000	1350000	1380000	1650000	1920000	2850000	4560000	7740000	11700000	15420000	21690000
Klostridie 0,17 g/L	1500000	1530000	1380000	1680000	2220000	3210000	6750000	10860000	15990000	19440000	22200000	20970000
Klostridie Kontrola	720000	900000	900000	840000	960000	1050000	1800000	3750000	8400000	13320000	17640000	18720000
Klostridie 17 g/L	990000	930000	990000	810000	900000	840000	990000	960000	810000	900000	900000	750000
Klostridie 1,7 g/L	990000	900000	810000	870000	600000	870000	840000	900000	840000	660000	630000	9720000
Klostridie 0,17 g/L	810000	540000	690000	690000	510000	750000	780000	1200000	2280000	5250000	8610000	11160000
Klostridie Kontrola	990000	720000	810000	780000	840000	870000	960000	960000	1140000	1530000	2700000	11430000
Klostridie 17 g/L	1170000	1080000	1050000	960000	780000	780000	1050000	1080000	1020000	720000	960000	660000
Klostridie 1,7 g/L	1170000	1170000	1020000	1110000	1050000	990000	1110000	1050000	960000	900000	1110000	20100000
Klostridie 0,17 g/L	630000	450000	690000	690000	660000	690000	630000	600000	690000	1260000	4710000	21450000
Klostridie Kontrola	1620000	1590000	1410000	1320000	1260000	1350000	1350000	1410000	1920000	5940000	11340000	21960000
Klostridie 17 g/L	1110000	1110000	1140000	1110000	990000	1140000	990000	960000	900000	930000	1020000	780000
Klostridie 1,7 g/L	1350000	1260000	1230000	1260000	1230000	1320000	1290000	1380000	1320000	1140000	1260000	20190000
Klostridie 0,17 g/L	1050000	1080000	1170000	1110000	1110000	1080000	1110000	1140000	1170000	1110000	1110000	211900000
Klostridie Kontrola	1500000	1470000	1500000	1470000	1470000	1350000	1260000	1350000	1500000	1290000	1320000	21150000
Bifidobakterie 17 g/L	930000	990000	1020000	1080000	900000	930000	930000	900000	900000	870000	780000	780000
Bifidobakterie 1,7 g/L	1110000	1230000	1350000	1680000	2100000	3210000	7680000	11820000	13710000	15060000	15210000	15810000
Bifidobakterie 0,17 g/L	900000	1110000	1200000	1680000	2490000	4110000	10170000	13710000	14730000	15480000	15600000	17220000
Bifidobakterie Kontrola	1290000	1590000	2220000	3090000	5220000	9030000	13560000	14280000	15060000	15060000	15240000	16650000
Bifidobakterie 17 g/L	720000	840000	930000	930000	840000	810000	930000	810000	660000	690000	870000	1590000
Bifidobakterie 1,7 g/L	750000	1080000	1170000	990000	1170000	1050000	1320000	1950000	2760000	3840000	4380000	8490000
Bifidobakterie 0,17 g/L	870000	930000	750000	870000	990000	1020000	1440000	2070000	3030000	5190000	6000000	10080000
Bifidobakterie Kontrola	1020000	1260000	1200000	1260000	1440000	1260000	2220000	3360000	3780000	6060000	6900000	9090000
Bifidobakterie 17 g/L	900000	990000	930000	990000	1020000	1110000	1350000	1530000	1860000	2130000	2100000	5220000
Bifidobakterie 1,7 g/L	1140000	1050000	1200000	1530000	1800000	2490000	3330000	4470000	5730000	6120000	7350000	10440000
Bifidobakterie 0,17 g/L	960000	870000	1110000	1560000	1920000	2820000	3990000	5310000	6750000	8340000	9150000	11370000
Bifidobakterie Kontrola	870000	810000	1260000	1560000	2160000	2850000	4680000	5910000	7800000	8940000	9420000	11040000
Bifidobakterie 17 g/L	570000	630000	600000	720000	780000	600000	870000	840000	840000	1200000	1140000	2010000
Bifidobakterie 1,7 g/L	750000	630000	630000	600000	930000	1500000	1590000	2790000	3360000	3750000	4050000	7830000
Bifidobakterie 0,17 g/L	840000	780000	780000	1020000	1080000	1530000	2640000	3900000	5520000	6120000	6600000	8850000
Bifidobakterie Kontrola	930000	870000	930000	1050000	1200000	1590000	2970000	4260000	5370000	5940000	6360000	8790000
Bifidobakterie 17 g/L	780000	900000	810000	870000	780000	810000	810000	870000	1050000	1140000	1110000	1680000
Bifidobakterie 1,7 g/L	990000	1050000	990000	1530000	1890000	2730000	4110000	5340000	6660000	8010000	8550000	9930000
Bifidobakterie 0,17 g/L	840000	900000	1020000	1260000	1800000	2610000	4140000	6000000	7680000	9270000	9570000	10500000
Bifidobakterie Kontrola	960000	930000	1170000	1440000	1860000	2820000	4710000	6360000	7830000	8880000	9780000	10860000
Bifidobakterie 17 g/L	1200000	1140000	990000	1050000	1140000	1110000	1350000	1200000	1170000	1410000	1410000	3150000
Bifidobakterie 1,7 g/L	1200000	1200000	1440000	1920000	2760000	4200000	7680000	10230000	12480000	14130000	15480000	20190000
Bifidobakterie 0,17 g/L	1110000	1140000	1200000	1500000	2220000	3480000	7380000	10290000	13050000	14910000	16140000	20250000
Bifidobakterie Kontrola	990000	990000	1530000	2010000	3030000	4950000	8700000	10710000	12990000	14280000	15150000	18510000
Bifidobakterie 17 g/L	1050000	1050000	780000	990000	1020000	870000	1020000	1050000	870000	1170000	1080000	15750000
Bifidobakterie 1,7 g/L	1110000	1140000	930000	1110000	1050000	990000	1470000	1830000	3240000	7440000	11070000	19470000
Bifidobakterie 0,17 g/L	1260000	1200000	1350000	1410000	1290000	1530000	2040000	2850000	5010000	10200000	13830000	19890000
Bifidobakterie Kontrola	1260000	1110000	1290000	1350000	1350000	1470000	1710000	1770000	3060000	5820000	9480000	18840000
Laktobacily 17 g/L	1200000	1800000	2640000	4140000	5670000	6360000	9930000	12660000	14010000	13980000	14400000	12480000
Laktobacily 1,7 g/L	1050000	1950000	3390000	5430000	6600000	8610000	13830000	15660000	17190000	17070000	17820000	16620000
Laktobacily 0,17 g/L	1290000	2040000	3030000	5490000	6780000	8460000	11880000	15570000	16740000	17070000	17490000	17010000
Laktobacily Kontrola	1140000	1890000	3210000	5250000	6570000	7710000	10920000	14100000	16620000	16710000	17220000	16710000
Laktobacily 17 g/L	1320000	1470000	1800000	2430000	3030000	4020000	6150000	8400000	10860000	11130000	11250000	11370000
Laktobacily 1,7 g/L	1230000	1680000	2100000	3660000	4950000	6600000	10560000	13470000	14490000	14460000	14760000	14700000
Laktobacily 0,17 g/L	1200000	1590000	2160000	3480000	5160000	7020000	11370000	14640000	16200000	15390000	15960000	15720000
Laktobacily Kontrola	1290000	1680000	2430000	3660000	5850000	8130000	12810000	15210000	16080000	15600000	15780000	15540000
Laktobacily 17 g/L	1350000	2640000	4410000	6690000	8820000	11400000	12480000	12750000	12900000			
Laktobacily 1,7 g/L	1110000	2940000	6510000	10230000	13620000	15480000	15870000	16080000	15960000	16200000	16080000	15270000
Laktobacily 0,17 g/L	1380000	2970000	7200000	10260000	13530000	15420000	16260000	16110000	16140000	15900000	15750000	14160000
Laktobacily Kontrola	1560000	4680000	8520000	11550000	13980000	16020000	15870000	15570000	15600000	15390000	15570000	13050000
Laktobacily 17 g/L	720000	840000	570000	570000	600000	870000	930000	1380000	1890000	2610000	2910000	3810000
Laktobacily 1,7 g/L	660000	780000	660000	780000	690000	960000	1560000	2610000	3210000	4020000	4110000	6960000
Laktobacily 0,17 g/L	570000	690000	540000	660000	870000	930000	1170000	1860000	2670000	3420000	3780000	6060000
Laktobacily Kontrola	870000	750000	900000	900000	840000	1230000	1470000	1800000	2700000	3450000	3570000	5310000

Kmen	0 h	1 h	1:45 h	2:30 h	3:15 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	8:45 h	24 h
E. coli 17 g/L	1200000	2010000	2520000	3120000	3480000	3840000	4530000	4860000	5160000	5430000	5310000	5880000
E. coli 1,7 g/L	1320000	4230000	6690000	8670000	9600000	10110000	10860000	11310000	11070000	11460000	11520000	12060000
E. coli 0,17 g/L	1530000	5160000	9540000	11940000	12060000	12810000	13170000	13620000	13470000	13800000	13890000	14550000
E. coli Kontrola	1680000	6450000	10710000	12390000	13140000	13470000	13980000	14190000	14040000	14100000	14220000	14910000
E. coli 17 g/L	1050000	1380000	1650000	2070000	2160000	2220000	2580000	3000000	2790000	3270000	3180000	3690000
E. coli 1,7 g/L	1230000	2580000	4680000	5880000	6870000	8370000	8730000	9270000	8940000	9420000	9330000	9630000
E. coli 0,17 g/L	1320000	2820000	5670000	8100000	9420000	9630000	10470000	10650000	10650000	10710000	11070000	11220000
E. coli Kontrola	1380000	3330000	6360000	9150000	10020000	10470000	11550000	11640000	11460000	11580000	11700000	11940000
E. coli 17 g/L	1200000	2100000	2790000	2790000	3210000	3870000	4470000	4800000	4890000	5370000	5310000	5880000
E. coli 1,7 g/L	1320000	3480000	5850000	9420000	10830000	11310000	12210000	12150000	11880000	11940000	12210000	13170000
E. coli 0,17 g/L	930000	3660000	6540000	11370000	12780000	12900000	13800000	13470000	13410000	13800000	13860000	14550000
E. coli Kontrola	1500000	4620000	8100000	12480000	13260000	14070000	14280000	14580000	14460000	14250000	14670000	15210000
E. coli 17 g/L	1110000	2010000	2580000	2760000	3180000	3390000	4200000	4470000	4830000	4980000	5190000	5490000
E. coli 1,7 g/L	990000	3660000	7080000	11160000	12270000	12510000	12840000	13050000	13320000	13710000	13650000	14190000
E. coli 0,17 g/L	1650000	4830000	8580000	12660000	13260000	14190000	14430000	14130000	14280000	14700000	14640000	15210000
E. coli Kontrola	1470000	4560000	7800000	12690000	13320000	14220000	14670000	14610000	14700000	14850000	14970000	15270000
Bacteroides 17 g/L	1200000	1200000	1200000	1110000	1080000	1080000	1110000	1110000	1020000	1050000	1110000	990000
Bacteroides 1,7 g/L	1200000	1110000	1320000	1650000	1920000	2490000	4020000	5490000	7800000	9870000	10920000	13020000
Bacteroides 0,17 g/L	1200000	1350000	1680000	2430000	3900000	6240000	11610000	13260000	14310000	15330000	15480000	19050000
Bacteroides Kontrola	1350000	1710000	2310000	3540000	5670000	9180000	13680000	14910000	14970000	16170000	16230000	19890000