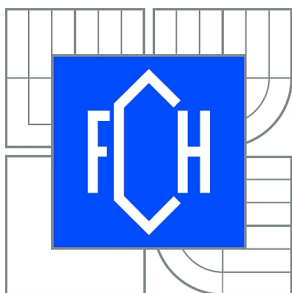




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

VYUŽITÍ ORGANISMU EISENIA FOETIDA V TESTECH EKOTOXICITY

USING OF ORGANISM EISENIA FOETIDA IN ECOTOXICITY TESTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. PAVLÍNA ŠKARKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MVDr. HELENA ZLÁMALOVÁ
GARGOŠOVÁ, Ph.D.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0666/2011** Akademický rok: **2011/2012**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Bc. Pavlína Škarková**
Studijní program: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)
Vedoucí práce: **MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.**
Konzultanti:

Název diplomové práce:

Využití organismu *Eisenia foetida* v testech ekotoxicity

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši týkající se kontaktních testů ekotoxicity se zaměřením na organismus *Eisenia foetida*.
2. Na základě literární rešerše vybrat vhodný kontaktní test pro hodnocení pesticidních přípravků, popř. jejich účinných látek.
3. Pomocí zvoleného testu posoudit vliv pesticidu pop. účinných látek na zástupce půdních organismů.

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Pavlína Škarková
Student(ka)

MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Pesticidní přípravky používané na ochranu rostlin patří mezi chemické látky, které jsou cíleně vnášeny do životního prostředí. V ČR jsou legálně používány pouze takové pesticidní přípravky, které jsou registrovány SRS (Státní rostlinolékařská správa). Pro účely registrace jsou potřeba kromě posouzení případných negativních účinků na zdraví lidí a zvířat, také informace, zda dané přípravky negativně neovlivňují životní prostředí, zejména nezpůsobují kontaminaci akvatického systému nebo nepůsobí na necílové organismy.

Tato diplomová práce se zabývá využitím organismu *Eisenia foetida* (žížaly hnojní) v kontaktních testech ekotoxicity při testování pesticidních přípravků. Byly vybrány pesticidní přípravky, u nichž nejsou celistvé informace o jejich vlivu na necílový půdní organismus (*Eisenia foetida*), přičemž na základě vypracované literární rešerše byl zvolen test ekotoxicity dle metodiky OECD 207 Test akutní toxicity trvající 14 dní. Testovány byly dva pesticidní přípravky Topsin M 500 SC (účinná látka thiofanát-methyl) a Perfekthion (účinná látka dimethoát). Byly vypočteny ekotoxikologické hodnoty a posouzena ekotoxicita těchto látek pro půdní organismy.

ABSTRACT

Pesticide products used for plant protection are one of the chemicals that are intentionally brought into the environment. In Czech Republic there are legally used only those pesticide products, which are registered by SRS (State Phytosanitary Administration). For registration of these products there is required in addition to assessing the likely negative effects on human and animal health, also information whether the pesticide products negatively not affect the environment, in particular avoiding the contamination of aqua system or not effect the non target organisms.

This master's thesis discuss the use of organism *Eisenia foetida* (redworm) in the contact ecotoxicity tests by testing pesticide products. There were selected such pesticide products where there are not solid information about their impact on non-target soil organism (*Eisenia foetida*) and based on literature research was chosen ecotoxicity test by OECD 207 method, the acute toxicity test which is in place for 14 days. Two pesticide products Topsin M 500 SC (active ingredient thiophanate-methyl) and Perfekthion (active ingredient dimethoate) were tested. Ecotoxicological values were calculated and ecotoxicity of such pesticide products for soil organism were avaulated.

KLÍČOVÁ SLOVA

ekotoxicita, kontaktní testy, *Eisenia foetida*, pesticidy

KEYWORDS

ecotoxicity, contact tests, *Eisenia foetida*, pesticides

ŠKARKOVÁ, P. Využití organismu *Eisenia foetida* v testech ekotoxicity. Brno, 2012. 84 s. Diplomová práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, ústav Chemie a chemické technologie ochrany životního prostředí. Vedoucí diplomové práce MVDr. Helena Zlámalová Gargošová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své rodině za pevné nervy a MVDr. Heleně Zlámalové Gargošové, Ph.D za cenné rady, dobré připomínky a velmi vstřícný přístup. Dále pak paní laborantce Haně Štefaníkové za trpělivost.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Ekotoxikologie a ekotoxicita	8
2.2 Testy ekotoxicity	8
2.2.1 Základní rozdělení biotestů	8
2.2.2 Baterie testů	10
2.2.3 Princip testování chemických látek	10
2.2.4 Vyhodnocení testu	10
2.3 Kontaktní neboli terestrické testy	11
2.4 Žížaly	13
2.4.1 Taxonomie	13
2.4.2 Morfologie a biologie žížal	13
2.4.3 Ekologie a nezastupitelnost žížal	15
2.4.4 Druhy žížal běžné v obdělávaných půdách České republiky	16
2.5 Testy na žížalách	17
2.5.1 Artificiální půda	17
2.5.2 Chov žížal	18
2.5.3 Test akutní toxicity žížal OECD 207	19
2.5.4 Test reprodukce u žížal OECD 222	21
2.5.5 Test únikového chování se žížalami ISO 17512-1	22
2.6 Pesticidy	24
2.6.1 Historie pesticidů	24
2.6.2 Dělení pesticidů	25
2.6.3 Legislativní rámec pesticidů	26
2.6.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti pesticidů	26
2.6.5 Aplikace, degradace a transformace pesticidů	28
2.6.6 Přestup pesticidů do životního prostředí	29
2.6.7 Mechanismus účinků pesticidů	30
2.6.8 Nejdůležitější skupiny pesticidů	31
2.7 Účinné látky vybrané pro test na <i>Eisenia foetida</i>	35
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
3.1 Testované látky	37
3.1.1 Standardní látka	37
3.1.2 Topsin M 500 SC	37
3.1.3 Perfekthion	38
3.2 Příprava artificiální půdy pro testy	38
3.3 Založení chovu	39
3.4 Příprava vzorků	40
3.5 Test na organismu <i>Eisenia foetida</i>	41
3.5.1 Testy se standardní látkou	41
3.5.2 Testy s Topsinem M 500 SC	44
3.5.3 Testy s Perfekthionem	47
4 DISKUZE VÝSLEDKŮ	50

5 ZÁVĚR	52
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	53
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	61
8 SEZNAM PŘÍLOH	63
9 PŘÍLOHY	64

1 ÚVOD

První listopad roku 2011 se stal dalším mezníkem nejen pro lidstvo, ale i pro celou planetu Zemi. Tímto datem dle Organizace spojených národů dosáhl počet obyvatel sedm miliard lidí.

K celosvětově rostoucímu počtu obyvatel neodmyslitelně patří i zvyšující se nároky na množství potravin. Jednou z cest, vedoucích k zajištění dostatečného množství potravin, je omezení ztrát zemědělských produktů v důsledku napadení plodin škodlivými činiteli. Základním prostředkem umožňujícím eliminaci nepříznivých vlivů je chemická ochrana rostlin a zemědělských produktů pomocí pesticidů.

Využívání pesticidů tedy umožňuje výraznou intenzifikaci zemědělské produkce a omezení ztrát produktů během sklizně a skladování. Na druhou stranu se touto cestou dostává do životního prostředí nezanedbatelné množství cizorodých látek (je registrováno přibližně 800 sloučenin účinných látek pesticidů), které mohou působit i na jiné než cílové činitele a iniciovat narušení terestrického či vodního ekosystému. Negativním důsledkem je také možnost vzniku rezistence škůdce vůči účinkům pesticidů, zvláště pokud je přípravek neodborně používán.

Do půdy, jež je zcela stěžejní částí terestrických ekosystémů, tak vstupuje i touto cestou nezanedbatelné množství látek přírodě cizích. V půdě se odehrává podstatná část cyklů látek, prvků a energie. Jedná se zejména o dekompoziční procesy, díky kterým se opět uvolňují jednoduché živiny potřebné pro primární produkci. Při těchto procesech odumřelá organická hmota v půdě podléhá složitému rozkladu, na kterém se podílejí nejen mikroorganismy, ale i půdní bezobratlí tzv. zooedafon.

Z ekologického hlediska je jednou z nejvýznamnějších funkcí půdy dekompozice, dále pak mineralizace živin, při které dochází k uvolňování jednoduchých látek jako je CO_2 a H_2O , syntéza složek humusu neboli huminifikace. Také jsou zde lokalizovány hlavní části cyklu dusíku, fosforu, síry a živin.

Polutanty, které vstupují do ekosystému půdy, mohou negativně ovlivnit společenstva dekompozitorů a jejich funkce. Tím dochází ke změnám v cyklech organického materiálu a je narušována stabilita celého ekosystému.

Rozsah a povahu efektů polutantů na půdní organismy lze poznat zapojením celé řady ekotoxikologických testů. Použitá baterie testů by měla obsahovat nejen testy, které pracují s vodným výluhem testovaného pevného materiálu, ale i testy kontaktní, které by zohlednily i obsah látek nerozpustných či málo rozpustných ve vodě. Mezi tyto testy se řadí i testy na žížalách a to zejména s druhem *Eisenia foetida* [1, 2, 3].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Ekotoxikologie a ekotoxicita

Ekotoxikologie

Ekotoxikologie byla poprvé definována okolo roku 1969 členem francouzské akademie věd Dr. Rene Truhautem a to jako oblast toxikologie věnující se studiu toxických účinků vyvolaných přírodními a syntetickými polutanty na složky ekosystémů – živočichy, rostlinstvo a mikroorganismy.

V dnešní době je ekotoxikologie multidisciplinární vědou integrující toxikologii, chemii životního prostředí a ekologii. Zabývá se analýzou a porozuměním vlivu chemických látek na všechny biologické úrovně živé přírody. Její hlavní cíle jsou ochrana živé přírody a člověka jako její integrální součásti, analýza a pochopení přímých a nepřímých účinků chemikálií na všechny biologické úrovně ekosystému, studium a hodnocení (škodlivých) účinků chemických látek, prevence poškození a ohrožení ekosystémů, předpověď a odhady škodlivosti chemikálií, předpověď a odhad rizik spojených s životním cyklem chemikálií a vývoj praktických nástrojů pro odhady škodlivosti a rizik [4, 5].

Ekotoxicita

Ekotoxicita je schopnost látek působit toxicky na zdravý rozvoj přírody, na rovnováhu přírodních ekosystémů, především ekosystémů vod, půd a sedimentů. Nejedná se pouze o toxické účinky na jednotlivé živočichy a rostliny, ale i o toxické účinky na ekosystém jako celek. Významným faktorem ekotoxických látek je jejich stabilita v prostředí. Čím je látka stabilnější, tím může v prostředí působit dlouhodoběji a může větší měrou poškodit přírodu. Mezi persistentní látky jsou řazeny toxické kovy, halogenované a polyaromatické uhlovodíky a celá řada dalších látek, zejména antropogenního původu [4, 5].

2.2 Testy ekotoxicity

Biotest nazývaný také jako bioassay je definován jako „zkouška“ využívající biologický systém, který zahrnuje expozici organismu testovaným materiálem a stanovuje jeho odpověď.

Principem biotestu je kontakt (akutní, chronický apod.) testované látky, směsného či přírodního vzorku za určitých, předem definovaných a kontrolovatelných podmínek s detekčním systémem (zkušebním organismem, tkání, populací, společenstvem apod.). Z jeho reakce lze poté usoudit, zda testovaná látka je toxická, zda vzorek vody obsahuje využitelné živiny, zda je za těchto podmínek sledovaná substance rozložitelná atd.

Biotest nepodává informaci o tom, která látka a v jakém množství je v příslušném vzorku, to je vyhrazeno až chemické analýze, může však velmi jednoduše a rychle ukázat, zda je či není ve vzorku biologicky aktivní [10, 11, 12].

2.2.1 Základní rozdělení biotestů

Biotesty jsou děleny dle dvou základních kritérií. První je dle validace platnou legislativou na testy standardní tedy validované a na testy alternativní, které nevychází z naší platné legislativy. Druhé dělení je na základě prostředí, ve kterém testy probíhají. Tedy testy akvatické, probíhající ve vodním prostředí a testy kontaktní neboli terestrické, jež pracují s pevnou maticí.

Standardní testy

Standardní testy jsou testy ekotoxicity, jež jsou plně validovány naší legislativou. Mezi výhody patří porovnatelnost metodik testů a tedy i výsledků mezi jednotlivými laboratořemi, a také to, že výsledky jsou dobře akceptovatelné pro regulační orgány. Jejich velkou nevýhodou je jejich přílišná specifická a těžká aplikovatelnost jak pro jiné situace, tak do reálného prostředí.

Alternativní testy

Alternativní testy jsou testy, jejichž postupy nejsou validovány naší legislativou. Tyto testy mají mnoho výhod. Významné pozitivum je jejich ekonomičnost. A to zejména proto, že využívají také klidových stádií organismů, vajíčka, cysty atd., což znamená, že nevyžadují udržování a kultivaci matečných kultur. Šetří laboratorní a kultivační prostor, vyžadují jen malé objemy vzorků, proto se jim někdy říká miniaturizované testy.

Nejpoužívanějšími alternativními testy jsou tzv. toxkity, Rotoxkit s vířníkem *Brachionus calyciflorus*, Thamnotoxkit s korýšem *Thamnocephalus platyurus*, Daphtoxkit s korýšem *Daphnia pulex* a *Daphnia magna*.

Akvatické testy

Tyto testy pracují s vodným výluhem testované pevné látky nebo matrice (odpady, sedimenty, zeminy atd.). U kapalných vzorků pak s připraveným roztokem látky či směsí více látek nebo jejich koncentrační řadou (pesticidy, průmyslové chemikálie, odpadní vody atd.) Testovaná látka nebo matrice může být tedy ve stavu pevném nebo kapalném. Veškeré sledované biochemické pochody se v akvatických testech dějí cestou přímého kontaktu organismu s tímto výluhem.

Terestrické testy

Terestrické neboli kontaktní testy nepracují s vodným výluhem, ale přímo s námi zkoumaným pevným materiálem (odpady, kaly, popílky, kontaminované půdy...). Pokud pevná matrice obsahuje nebezpečné a toxické látky, které však nejsou ve vodě rozpustné jako např. PAU (polyaromatické uhlovodíky), PCB (polychlorované bifenyly) a mnoho dalších persistentních organických polutantů, můžeme pomocí těchto testů určit, zda zkoumaný vzorek obsahuje látky z této pevné fáze biodostupné, které tak mohou škodit organismům.

Existuje mnoho dalších způsobů dělení testů ekotoxicky. Mezi nejznámější hlediska patří doba expozice (akutní, subakutní, chronická), testovací uspořádání (statické, semistatické, průtočné), testovaná matrice (abiotická, biotická), trofické úrovně testovacích organismů (producenti, destruenti, konzumenti), typ testovaného vzorku (čistá chemická látka, směs chemických látek), spektrum testovacích organismů (jednodruhové a vícedruhové testy), pokročilost designu testovacího systému (testy první, druhé, třetí a čtvrté generace), způsob vyhodnocení (např. letální, subletální a genotoxické efekty) a způsob přípravy vzorku (připravený v laboratoři, výluhu vzorků přírodní matrice) [1, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13].

2.2.2 Baterie testů

Jelikož odezva organismů není na působení toxických látek stejná, je doporučeno používat sadu ekotoxikologických testů. Existuje mnoho faktorů ovlivňujících reakci organismu. Jsou to zejména biologická dostupnost toxikantu, způsob přijímání toxikantu organismem, jeho bioakumulace nebo schopnost škodlivou látku odbourávat.

Cílem každé ekotoxikologické studie je získání, co nejkomplexnější informace o toxickém působení testované látky, popř. matrice na živé organismy, a jelikož účinky látek jsou druhově specifické a výsledky nepřenositelné, používá se více druhů testovacích organismů, přičemž by se mělo jednat o zástupce všech trofických úrovní daného ekosystému.

Baterie testů by se měla skládat z testů toxicity na třech trofických úrovních; producent, konzument a destruent. A dále by se mělo jednat o testy pracující jak s vodným výluhem, tak v kontaktním uspořádání [1, 12, 14, 15].

2.2.3 Princip testování chemických látek

Při provádění ekotoxikologických testů je velmi důležité zvolit správný rozsah koncentrací testované látky. Tyto koncentrace se mohou pohybovat řádově v desetinách mg na litr až po tisíce mg na litr. Proto se provádí následující testy v daném pořadí.

Limitní test

Test pro zjištění reakce testovaných organismů na koncentraci 100 mg/l. Pokud je test negativní, další testy se nevyžadují. V odůvodněných případech lze provést ještě ověřovací test.

Předběžný test

Tento test se provádí, pokud je limitní test pozitivní. Na test se používá malé množství organismů, provádí se v širokém rozpětí koncentrací testované látky a to od koncentrací 0,01 mg/l až po 100 mg/l. Na základě výsledků tohoto testu se volí užší rozsah koncentrací s předpokládaným účinkem pro základní test.

Základní test

Tento test se provádí v očekávaném rozsahu působení, který nám udává předběžný test. Výsledkem tohoto testu jsou hodnoty LC (IC, EC) 50 [14, 15].

2.2.4 Vyhodnocení testu

Nejčastějšími výstupy testů ekotoxicity jsou hodnoty:

LD50 – smrtelná dávka pro 50 % pokusných jedinců

LC50 – smrtelná koncentrace pro 50 % pokusných jedinců

ED50 – efektivní dávka, při které reaguje 50 % pokusných jedinců

EC50 – efektivní koncentrace, při které reaguje 50 % pokusných jedinců

ID50 – dávka, která způsobí inhibici růstu pro 50 % pokusných jedinců

IC50 – koncentrace, která způsobí inhibici růstu pro 50 % pokusných jedinců

V praxi se používají dávky ED (LD, ID) i pro hodnoty jiné než 50 % jedinců, např. LD10 je smrtelná dávka pro 10 % testovaných jedinců.

LOEC – z anglického Lowest Observed Effect Concentration. Česky odpovídá nejnižší testované koncentraci, ve které již došlo k inhibičnímu efektu.

NOEC – z anglického No Observed Effect Concentration. Česky odpovídá nejvyšší konkrétní zkoušené koncentraci, u které ještě nedošlo k inhibičnímu efektu. Hodnota NOEC odpovídá zkoušené koncentraci bezprostředně pod hodnotou LOEC.

Možností, jak určit ze získaných dat o úhynu organismů hodnotu LC50 je více. Každá má určité přednosti i nedostatky. Závislost mortality na koncentraci má sigmoidální charakter. Takovou závislost však nelze popsat přesnou rovnicí. Je třeba získaná data určitým způsobem transformovat. Nejjednodušší je postavit proti hodnotám mortality logaritmy koncentrací a závislost vyjádřit pomocí lineární regrese. Nevýhodou výše uvedeného způsobu výpočtu je, že přímka nekopíruje dostatečně úmrtnostní křivku.

Nejvhodněji se proto jeví probitová analýza, která vhodným způsobem transformuje úmrtnostní data na tzv. probity, které již mají na logaritmu koncentrace přibližně lineární závislost. Tabulka pro převedení úmrtnostních dat v procentech na probity je uvedena v Příloze 1 [14, 16, 17].

2.3 Kontaktní neboli terestrické testy

Kontaktní neboli terestrické testy nepracují s vodným výluhem, ale přímo se zkoumaným pevným materiálem (odpady, kaly, popílky, komposty, stavební sutě...). Tyto testy jsou již běžně zmiňovány v normách US EPA (United States Environmental Protection Agency; Agentura Spojených států amerických pro ochranu životního prostředí), ISO (International Organisation for Standardization; Mezinárodní organizace pro standardizaci), OECD (Organization for Economic Cooperation and Development; Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj) a jiných organizací.

V naší platné legislativě týkající se hodnocení ekotoxicity jsou obsaženy kontaktní testy v nařízení komise (ES) č. 440/2008 ze dne 30. května 2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek. Část C. Jedná se o test toxicity na žížalách a testy s půdními mikroorganismy na transformaci dusíku a uhlíku. Dále pak testy se včelou medonosnou, zkouška akutní orální toxicity a zkouška akutní kontaktní toxicity.

V České republice vznikla studie zabývající se problematikou využití kontaktních testů toxicity [1]. Cílem této studie bylo porovnat toxicitu daných pevných matric (různé typy pevných odpadů a kontaminovaných zemin). Byly zde testovány jak vzorky obsahující hydrofobní, tak hydrofilní kontaminanty, tak vzorky s anorganickými a organickými látkami. Většina testovaných vzorků odpadů by určitě poškozovala životní prostředí, ale dle stávajícího hodnocení pomocí akvatických testů byly definovány jako ne příliš toxické a ve většině případů by vyhovovaly podmínkám stanoveným pro ukládání odpadů na skládky. Přitom výsledky terestrických testů vykazovaly vysoké nebezpečí pro životní prostředí. Akvatické testy totiž nemohou postihnout toxicitu látek ve vodě málo rozpustných látek. Ve vodě nerozpustné látky, které odpady mohou obsahovat, se po delší době díky přírodním procesům mohou dostat do potravního řetězce a ohrozit i člověka. Velice závažným příkladem jsou hydrofobní organické látky typu PAU či chlorovaných pesticidů. Proto je využití terestrických testů velmi významné.

V řadách světových odborníků vzniklo mnoho prací, které porovnávaly testy ekotoxicity kontaktní s akvatickými prostřednictvím různě kontaminovaných pevných vzorků. Tyto práce

dochází k závěrům, že prostřednictvím akvatických testů pracujících s vodným výluhem testované matrice nelze získat zcela relevantní výsledky, které by vypovídaly o skutečném environmentálním nebezpečí testované matrice. A v těchto pracích dochází též k závěrům, že ani samotná chemická analýza není pro predikci účinků na ekosystém dostačující a biotesty jsou tudíž při posuzování ekotoxicity nenahraditelné [19, 20, 21].

Dále bylo zjištěno, že vodné výluhy odpadů mají reprezentativní výsledky jen pro krátkodobé testy zaměřené na mortalitu. Při zjišťování chronické ekotoxicity jsou zcela irelevantní [1, 12, 18, 19, 20, 21, 23, 73].

End-points

End-points (konečný stav) jsou změny organismů, které jsou v daném testu sledovány. Dříve byla nejčastějším end-pointem mortalita, avšak sledování pouze tohoto end-pointu je nedostatečné. Sledují se i další změny na testovacích organismech např. změny reprodukční schopnosti, reprodukční „rituály“ (hloubení jamek), mutagenita, teratogenita, karcinogenita, změny metabolismu (nitrifikační potenciál, apod.), změny luminiscence, změny respirace, behaviorální změny (vertikální pohyb, norování), malformace (tuhnutí části těla, otoky apod.), neurotoxicita, změny v chování jedinců, fyziologické změny, snížení imunity, aktivity enzymů, biochemické markery a genotoxicita [15, 19, 22].

Optimální vlastnosti kontaktních testů

Základními vlastnostmi dobrého testu by měly být standardizovatelnost a opakovatelnost. Záleží také na ekonomické stránce, tedy na praktické proveditelnosti, ceně a rychlosti. Test by měl být dostatečně citlivý. Důležitá je i jeho vypovídající hodnota a použitelnost na ochranu životního prostředí. Figuruje zde i pojem ekologická relevance, který znamená, že test má respektovat ekologii organismu. Sledované odpovědi by měly být ekologicky relevantní a indikovat stav a funkci organismu (přežití, růst, reprodukce, přijímání potravy a mobilita) pro daný ekosystém. Expoziční cesty, biodostupnost a koncentrace by měly napodobovat reálné [15, 18, 22].

Prostředí kontaktních testů

Terestrické testy se mohou provádět v prostředí umělé nebo reálné půdy.

Umělá půda je uměle připravená a její složení je přesně definováno. Obsahuje 10 % suché a jemně namleté rašeliny, 20 % kaolinitového jílu obsahující minimálně 30 % kaolinitu, 70 % jemného křemenného písku obsahujícího nejméně 50 % zrn o velikosti 0,05 – 0,2 mm a 0,3 – 1 % uhličitanu vápenatého.

Reálná půda je tzv. LUF standardní půda. Těchto půd je několik variant, číselně označených, lze si je koupit. Mají přesně definované složení a pH, důležitá je tedy správná volba vhodné LUFY pro zvolený záměr [15, 37].

Způsoby aplikace

Organismy mohou být toxickou látkou exponovány několika cestami; přímým kontaktem pokožky těla – dermálně, prostřednictvím potravy – ingescí a orálním vstupem nebo dýcháním, což je velice málo probádaná oblast.

Ingescce a orální vstup – tento vstup je charakteristický pro organismy konzumující půdní částice, minerální a organickou hmotu v půdě, tedy především pro členovce. Jedná se o významnou expoziční cestu pro látky sorbované na půdních částicích. Jednotlivé

kontaminanty mohou být bioakumulovány např. v houbách, které pak konzumují chvostokoci a stávají se tak pro ně řádově mnohem toxičtějšími.

Dermální vstup – prostřednictvím tělní stěny dochází k přestupu toxických látek z půdy nebo z pórové vody. Cesta významná pro organismy vrtající v půdě, hlavně tedy žížaly a roupice, dále pak pro organismy s tenkou kutikulou [15, 22].

Volba vhodných testovacích organismů

Pro každý test ekotoxicity je velice důležitý výběr vhodných organismů, to platí jak pro testy akvatické, tak pro testy terestrické. Jak již bylo řečeno, účinky látek jsou druhově specifické, protože každý druh organismu je vůči testované látce jinak citlivý a zastupuje jinou trofickou úroveň. Nejčastěji se používají žížaly a to žížala hnojní (*Eisenia foetida*) a žížala obecná (*Lumbricus terrestris*), dále pak roupice zejména se jedná o druhy *Enchytraeus albidus* a *Cognettia sphagnetorum*, chvostokoci *Folsomia kandida*, *Folsomia fimetaria*, *Isotoma viridis*, *Orchesella quadricellatus* a *Orchesella cincta*, hlístice *Caenorhabditis elegant*, *Panagrellus redivivus* a *Plectus acuminatis*, šneci *Helix aspersa*, roztoči *Platynothrus peltifer* a *Hypoaspis aculeifer*. Lze provádět i testy se členovci a to nejčastěji s druhy *Lithobius Mutabilis* a *Philonthus cognatus* [24].

2.4 Žížaly

2.4.1 Taxonomie

Rod žížal (*Opisthophora*) patří do říše živočichové (*Animalia*), kmenu kroužkovci (*Annelida*), třídy opaskovci (*Clitellata*) a podtřídy máloštětinatců (*Oligochaeta*).

Organismus *Eisenia foetida* patří dále do čeledi žížalovití (*Lumbricidae*) a rodu *Eisenia* [25, 26].

2.4.2 Morfologie a biologie žížal

Tělo žížaly je složené z mnoha segmentů. Větší množství svalů nalezneme v hlavové části, kde jsou často nejsilnější a nejnápadnější. Žížaly nemají žádná kusadla či dokonce zuby, potravu drtí a míchají ve svalnatém žaludku pomocí pozřených půdních částic a drobných zrněk písku. Nad ústním otvorem mají pohyblivý čelní lalok (prostomium), který napomáhá uchopení potravy. S výjimkou prvního a posledního článku má žížala po celém těle osm řad krátkých štětín, které jí pomáhají při pohybu. Štětiny jsou vybavené svalovinou a jsou v jednom směru přichýlené k tělu a usnadňují tak žížale pohyb dopředu a také současně znesnadňují její protisměrné vytažení z chodbičky, což ji chrání při útoku predátorů.

Zažívací soustava žížaly je tvořena na začátku ústním otvorem, dále pak hltanem, jícnem, jehož část je přeměněna v tzv. žláznatý žaludek, svalnatým žaludkem, dlouhým střevem a končí řitním otvorem.

Nervová soustava žížal je žebříčkovitá se dvěma velkými propojenými mozgovými ganglii v přední části těla. Smyslové buňky jsou rozloženy na povrchu těla a může jimi vnímat světlo, chutě, pachy a vibrace.

Uzavřená cévní soustava žížaly se skládá z jedné hlavní stažitelné cévy na hřbetní straně těla a jedné na straně břišní. V přední části těla se nachází dva až pět párů menších cév spojujících hřbetní a břišní cévu, které pumpují hemolymfu do celého těla. Tyto cévy jsou často vybavené svalovinou a označovány jako tzv. pomocná srdce.

Žížala dýchá celým povrchem těla. Těsně pod jejím povrchem jsou uloženy cévy, které umožňují rychlou výměnu plynů mezi vnějším prostředím a hemolymfou. Přebytečná voda a vodorozpustné dusíkaté látky jsou vylučovány párovými metanefridiemi (obdobou ledvin) přímo na tělní povrch.

Žížaly se povětšinou vyhýbají světlu, jsou fotofóbní. Barevné pigmenty, které mají v pokožce, je nejen chrání před UV zářením, ale i vytvářejí ochranné zbarvení a tím činí žížalu hůře rozeznatelnou od okolního prostředí.

Podle jednotlivých zbarvení se dá i poznat, kde tráví jaký druh žížaly ponejvíce času popř. jak se živí, např. žížala obecná, která vystrkuje hlavovou část při hledání potravy nad povrch půdy má nejvíce pigmentu právě v této části těla.

Žížaly jsou hermafroditi, což znamená, že mohou vytvářet jak vajíčka, tak spermie, upřednostňují však páření s dalším jedincem, se kterým si spermie vymění. Jejich typický opasek na přední polovině umístěný poblíž hlavové části slouží k tvorbě kokonů, tj. vaječných kapsulí, které poskytují ochranu a živiny pro vyvíjející se zárodky žížal, jeden kokon může obsahovat až 20 vajíček. Z tohoto kokonu ale téměř vždy stejně vzejde maximálně jeden až dva jedinci.

Po páření během něhož je sperma partnerského jedince přenášeno do malých schránek v pokožce (tzv. spermaték), produkují žlázy v opasku váček se slizem, který má vyživovat a chránit vajíčka. Váček se postupně posouvá k hlavové části žížaly. Během jeho pohybu nad vyústěním samičích pohlavních otvorů (většinou na 14. článku) a otvory spermaték (většinou na 10. a 11. článku) vypustí žížala do slizového váčku svá vajíčka a partnerovy spermie. Váček nakonec sklouzne přes hlavovou část, na obou stranách se uzavře, a vytvoří kokon ve tvaru citrónku. Kokony jsou u většiny druhů žížal žlutohnědé, ale liší se tvarem a velikostí, která se pohybuje v rozmezí 2 až 5 mm.

Obecně se žížaly množí nejvíce na jaře a na podzim, avšak jsou-li pro ně příznivé podmínky, množí se po celý rok. Při teplotě nižší než 3 °C kokony nekladou. Jedna žížala může vyprodukovat 3 až 100 kokonů za rok, závisí to na druhu žížaly, množství živin a klimatu. Například žížala polní vyprodukuje přibližně 20, žížala obecná 10 a žížala červená 100 kokonů za rok.

Každý druh žížal upřednostňuje jiné půdní prostředí, v rašelinných a písčitých půdách se jich vyskytuje velmi málo, více žížal najdeme v jílovitých a hlinitých a nejvíce v půdách humózních. Většina našich druhů pak preferuje nezamokřenou, lehčí, na humus bohatou hlinitou až jílovitou půdu.

Žížaly se dělí do tří základních skupin podle toho, v jaké části půdního profilu se nacházejí a podle jejich stravování. První skupina žížaly povrchové (epigeické) jako např. žížala červená a žížala hnojní. Žížaly žijící v horní vrstvě půdy (endogeické), mezi jejichž zástupce patří kupříkladu žížala polní a žížala růžová. Poslední skupina jsou hlubinné (hektické) žížaly např. žížala obecná a žížala dlouhá. Povrchové a hlubinné žížaly se živí hlavně čerstvě odumřelou organickou hmotou. Žížaly žijící v horních vrstvách půd, se převážně živí více rozloženou organickou hmotou vázanou na půdní částice a mikroorganismy.

Endogeické žížaly mohou přejít do klidového stádia. Nejprve si vytvoří komůrku v půdě, kterou zevnitř pokryjí slizem a v ní se stočí do malého klubička, kde vypustí další množství slizu, aby zabránily vlastnímu vysychání. K této fázi dojde za nepříznivého stavu okolí, spotřeba energie je zde minimální. Hlubinné žížaly klidové stádium vytvoří i bez ohledu na stav okolí a to jak v létě, tak v zimě.

Žížaly slouží jako potrava pro mnohé živočichy, důležitou složkou stravy jsou pro krtky, ježky a především pak pro drobné ptactvo jako jsou drozdi a kosi [25, 26, 27, 28, 29, 30, 31].

2.4.3 Ekologie a nezastupitelnost žížal

Žížala má v půdě několik nezastupitelných úloh, je to především její výrazný podíl na tvorbě půdy, vytváření půdního profilu a dekompoziční činnost. Je typickým geobiontem tzn., že její vývojový cyklus probíhá celý v půdě. Dále se pak řadí mezi makrokoncentrátory, což znamená, že mají výrazné bioakumulační a biokoncentrační schopnosti.

Rozklad velkého množství rostlinných zbytků a stájového hnoje je možný díky kooperaci žížal s dalšími půdními organismy. Žížala červená a obecná nejprve rostlinné zbytky částečně rozloží a teprve poté pokračují v rozkladu organické hmoty další druhy žížal, jako polní a růžová. Společně tak tímto způsobem zpřístupňují živiny pro rostliny a ostatní půdní organismy nebo naopak se tyto živiny mohou vázat do stabilních humusových forem ve výkalech žížal.

Na tvorbě půdního profilu se podílejí tak, že některé z žížal přenášejí rostlinné zbytky směrem nahoru a jiné naopak dolů.

Na místech, kde je žížal nedostatek, může dojít až k vytvoření povrchové vrstvy nerozložených organických zbytků.

Na kvalitu půdy má vliv mnoho faktorů, např. dobrá půdní struktura přispívá k dostatečnému obsahu vody, vzduchu a živin a poskytuje prostor pro kořeny a půdní organismy. Kvalitu půdy udává také mimo jiné i množství žížalích chodbiček, které vytvářejí vhodné podmínky pro růst kořenů a biologickou aktivitu organismů. Půdními agregáty, tzv. půdními drobtý, je tvořena ornice s dobrou strukturou. Pro tyto agregáty jsou důležitým stavebním materiálem právě žížalí exkrementy, dále pak zrnka písku a částičky jílu, jež slepí dohromady humus, sliz a výkaly půdních živočichů.

Například na deset arů půdy může připadat několik set kilometrů žížalích chodbiček, ty slouží dále také jako významné větrací a drenážní kanálky v půdě.

Přítomnost žížal v půdě nabývá na své důležitosti, je tedy nutné snažit se o zvyšování jejich populace především na zemědělsky využívaných půdách. Měli bychom vracet do půdy co nejvíce organické hmoty a vyvarovat se jejímu utužování. Důležitá je i aplikace stájového hnoje, kejdy a ředěné močůvky. Hodnota pH půdy by měla být vždy větší než 5,5. Práce s těžkou technikou by měla být co nejšetrnější. Samozřejmě, že snaha vytvářet optimální podmínky pro jejich existenci a rozmnožování je lepší, než následná introdukce neboli opětovné vysazení. Protože pokud populace žížal výrazně klesne, je potom introdukce velmi málo účinná. Většina jedinců v novém prostředí uhne, neboť není zvyklá na okolní podmínky. V zemědělství jsou nejdůležitější žížala polní a obecná.

Na jednom metru čtverečním zemědělsky využívaných pozemků můžeme v České republice nalézt až 300 jedinců žížal, což představuje 3 miliony žížal na hektar. Při přepočtu na biomasu činí hmotnost žížal 50 až 100 gramů na metr čtvereční, což odpovídá 500 až 1000 kg na hektar. Není však vyloučeno, že v některých půdách může být početnost a biomasa žížal výrazně vyšší [27, 28, 30, 31].

2.4.4 Druhy žížal běžné v obdělávaných půdách České republiky

V České republice je v současnosti potvrzen výskyt 62 druhů žížal. Velké množství těchto druhů se však vyskytuje poskrovnu jen v málo oblastech. V našich orných půdách se můžeme setkat s osmnácti druhy, přičemž skladba jednotlivých druhů se liší dle daného regionu a podmínek okolí, např. dle druhu a typu půdy, teplotně-vlhkostních poměrů. Typické polní společenstvo žížal je tvořeno žížalou polní (z 50 – 100 %), žížalou růžovou (10 – 50 %) a žížalou červenou a obecnou (5 – 10 %). Zastoupení dalších druhů pak většinou nepřesáhne 5 %. Výjimky tvoří orná půda např. v horských a podhorských oblastech, kde se vyskytuje jinak u nás vzácná žížala mléčná (*Octolasion lacteum*).

Žížala hnojní (*Eisenia foetida*) patří mezi drobnější 4 až 12 cm dlouhé žížaly. Řadí se do skupiny povrchových (epigeických) žížal. Dříve tento druh žil především v silně zamokřené opadance listnatých lesů nacházejících se na březích potoků či v prameništích. Dnes je tento druh výrazně závislý na prostředí vytvořeném člověkem, nalézáme ho zejména v kompostech a hnoji, protože pro svůj život potřebuje velké množství organických zbytků. Mají červenohnědou hřbetní stranu a často u nich můžeme pozorovat světlejší kroužky mezi jednotlivými tělními články. Nyní se tyto žížaly nejčastěji používají k produkci biomasy či hnojiv, dále pak v testech ekotoxicity, kde může být nahrazena druhem velice podobným žížalou kalifornské (*Eisenia andrei*).

Žížala obecná (*Lumbricus terrestris*) je velká, silná žížala o délce dosahující až 30 cm, jenž se živí rostlinnými zbytky, které sbírá na povrchu půdy, při tomto sběru vystrkuje hlavovou část, která právě pro ochranu žížaly před predátory obsahuje nejvíce pigmentu na maskování. Patří mezi žížaly hlubinné. Vytváří rozsáhlý systém vertikálních chodeb, který může obývat i mnoho let. Velká část exkrementů slouží této žížale ke zpevnování stěn v chodbičkách, ale část jich zůstává v podobě dobře viditelných hromádek na povrchu půdy. Žížala obecná je typická pro trvalé travní porosty jakou louky, sady.

Žížala polní (*Aporrectodea caliginosa*) 6 až 12 cm dlouhá žížala je nejběžnějším druhem obdělávaných půd. Živí se drobnými částicemi rozložených rostlinných zbytků obsaženými v půdě. Pověštinou se nachází v horní vrstvě půdy do hloubky asi 25 cm, na povrchu půdy se pohybuje jen zcela výjimečně, náleží do skupiny endogeických žížal. Jelikož se tato žížala velice málo vyskytuje na povrchu, obsahuje její pokožka velmi málo pigmentu na ochranu před UV zářením a predátory. V hlavové části je vybavena silnou svalovinou, která jí napomáhá při vytváření především horizontálně orientovaných chodeb.

Žížala růžová (*Aporrectodea rosea*) 3 až 8 cm dlouhá. Její pokožka nemá téměř žádný pigment, a její slabě růžové zbarvení je způsobeno prosvítáním cévní soustavy naplněné hemolymfou (obdobu krve) s červeným krevním barvivem, hemoglobinem. Vyskytuje se hlavně v minerální půdě a patří do skupiny žížal endogeických. Jelikož tato žížala celý život buduje nové chodbičky, patří tak mezi nejdůležitější druhy v obdělávaných půdách, z hlediska jejího vlivu na fyzikální a chemické parametry půdy.

Žížala červená (*Lumbricus rubellus*) 6 až 13 dlouhá. Žije ve svrchní části půdy do hloubky 15 cm, proto se řadí se mezi povrchové (epigeické) žížaly. V tomto prostoru mezi kořeny a rostlinnými zbytky, vytváří chodbičky mělké a ve tvaru písmene „U“. Často jí najdeme zejména v lesních půdách, částečně se nachází i v sadech a na pastvinách. Živí se především čerstvě odumřelými rostlinnými zbytky, trusem býložravců a také drobnými organickými částicemi v půdě.

Žížala dlouhá (*Aporrectodea longa*) 9 až 17 cm dlouhá žížala vytváří hluboké chodbičky, převážně vertikálně orientované, řadí se mezi žížaly hlubinné (hektické). Živí se nejen organickými zbytky na povrchu půdy, ale i drobnými rostlinnými částicemi [31, 32].



Obr. 1: Žížaly reprezentující jednotlivé ekologické kategorie: *Eisenia foetida* (epigeická), *Aporrectodea longa* (hektická) a *Aporrectodea caliginosa* (endogeická).

2.5 Testy na žížalách

Testy na žížalách jsou nejstarší kontaktní testy, mají tedy i velmi propracovanou metodiku a jsou zakotveny v platné české legislativě. Test toxicity na žížalách je uveden v nařízení komise (ES) č. 440/2008 ze dne 30. května 2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek. Část C. Tento předpis vychází z normy OECD 207.

Testy ekotoxicity na žížalách se provádí dle norem ISO (ISO 11268-1-3 a ISO 17512-1), OECD (OECD 207,222) a US EPA (US EPA 850.6200) [33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 73].

2.5.1 Artificiální půda

Prostředí pro kontaktní test může tvořit reálná nebo artifiční půda. Každá z nich má své výhody, ale také některá negativa.

Artificiální neboli umělá půda je běžně používána při laboratorních testech a její složení je přesně definováno dle normy OECD 207. Půda se skládá z 10 % vysušené rašeliny přesáté a homogenizované přes 2mm síto, 70 % vysušeného křemenného písku s minimálně 50% podílem zrn o velikosti 0,05 – 0,2 mm, 20 % vysušeného kaolinového jílu s obsahem kaolinitu minimálně 30 %, 0,3 – 1 % uhličitanu vápenatého k upravení hodnoty pH na $6,0 \pm 0,5$, celkové množství CaCO_3 v artifiční půdě je po přidání 0,3 – 1 %. Vlhkost je upravena destilovanou vodou na 40% WHC (Water Holding Capacity, Vodní kapacita půdy).

Hodnota pH se stanoví na 1M roztok KCl. A to tak, že do zkuševky se vloží 5 ml půdy a doplní se na celkový objem 30 ml 1M roztokem KCl. Suspenze se musí důkladně třepat

po dobu 5 minut, nechat stát 2 hodiny a po opětovném důkladném protřepání se pomocí pH metru odečte hodnota pH suspenze. Ta by se měla nacházet v rozmezí 5,5 až 6,5.

Dále se u půdy stanoví hodnota WHC_{max} (Maximum Water Holding Capacity, Maximální vodní kapilární kapacita půdy), což je stav, kdy je půda schopna v přirozeném stavu udržet v kapilárních pórech největší množství vody.

Nejprve se naváží 50 g suché umělé půdy, které se umístí do předem zváženého a vysušeného válečku, která má dno tvořené polopropustným materiálem. Půda se sklepe, aby sesedla. Válec se umístí do nádoby s vodou tak, aby se hladina vody nacházela ve výšce sloupce vzorku půdy. Ve vodní lázni se válec nechá 3 hodiny, poté se přemístí na misku s pískem s tkaninou na povrchu. Tato miska musí být přikryta tkaninou, aby se zabránilo vysoušení vzorků. Po 3 hodinách se zváží váleček i s půdou, toto vážení se opakuje po 30minutových intervalech do konstantní hmotnosti. Dle následujícího vzorce se vypočte WHC_{max} :

$$WHC_{max} = \frac{(M_{vz} - M_k - 50)}{50} \quad (1)$$

M_{vz} je hmotnost nasycené zeminy i s válcem (g).

M_k je hmotnost válce (g).

Vlhkost umělé půdy do testů s organismem *Eisenia foetida* je nejvhodnější v rozmezí 35 - 40% WHC .

Hlavní důvody, proč se uměle připravená půda v laboratořích používá, je zejména vysoká variabilita přirozených půd a to nejen z hlediska fyzikálních a chemických vlastností, ale také z hlediska míry mikrobiální aktivity, obsahu mikropolutantů, atp. Všechny tyto rozdílné vlastnosti pak mohou mít vliv na výsledky testu a tím se snižuje možnost porovnávání s jinými, již uskutečněnými testy, studiemi a literaturou obecně.

Jako hlavní negativum u umělých půd je vnímána odlišnost od půd reálných a to nejen množstvím zastoupeným složek např. relativně vysoký obsah TOC (total organic carbon, celkový organický uhlík) a menší množství písku než v reálných půdách, ale i jejich charakterem. Používá se rašelina a kaolinový jíl. Bývá tedy označována jako ekologicky nereálná. Je tedy sporné na kolik a zda dovedou umělé půdy zastoupit ty reálné [15, 37, 41].

2.5.2 Chov žížal

Založení chovu žížal

Chov žížal probíhá v nádobách o objemu 10 až 50 litrů, podle počtu jedinců. Nejprve je smíchán zahradní substrát, hnůj a rašelina v poměru 1:0,8:0,2. Musí být zjištěna optimální vlhkost. Ta se zjišťuje tzv. pěstní zkouškou (stlačí-li se ovlhčený substrát pěstí, mají se na povrchu vytlačit malé kapičky, ale voda nesmí vytékat), do druhého dne se nechá připravený substrát ustálit. Poté se změří hodnota pH a upraví se přidávkem uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$) na hodnoty 5,5 až 7. Z jiných chovů se pak přidá dostatečné množství (minimálně 50) dospělých i juvenilních žížal. Půda v boxu se přikryje vlhkým papírem a z alobalu vyrobeným víkem s několika otvory pro přístup vzduchu. Chov musí být umístěn do vhodných podmínek, tím je inkubační místnost s teplotou 20 ± 2 °C. Každý týden se kontroluje vlhkost substrátu, ručně se substrát prokypří a na povrch je přidán ovlhčený hnůj jako potrava, také se zapisuje stav chovů.

Chov žížal a odběr jedinců

Žížaly jsou chovány v substrátu, který nesmí být kontaminován amoniakem nebo močí (je pro žížaly toxický). Pokud je třeba k testu získat generaci žížal o stejné váze i věku, musí se začít kultivace s kokony. Žížaly vylíhnuté z kokonů se mohou použít do testů až v dospělosti, což znamená 2 až 12 měsíců po vylíhnutí [15, 41].

2.5.3 Test akutní toxicity žížal OECD 207

Tento test je nejstarším a tím pádem i nejpropracovanějším testem v kontaktním uspořádání. Byl schválen 4. dubna 1984 a stal se platným standardem OECD. Tento test obsahuje dvě metodiky, test stanovení akutní toxicity na filtračním papíře a test stanovení akutní toxicity na umělé půdě. Test je určen pro vzorky ve vodě rozpustné i nerozpustné. Z tohoto důvodu ho lze použít pro stanovení ekotoxicity pevných materiálů.

Kontaktní test na filtračním papíře

Jak již z názvu vyplývá, tento test probíhá na filtračním papíře, což je jeho velkou nevýhodou. Je velice umělý, neboť dochází k expozici pouze dermální cestou přes pokožku žížal. Jeho dalším nedostatkem je, že jedinci během něj ztrácejí váhu, neboť nejsou dostatečně přikrmováni. Tito jedinci pak mají nižší reprodukční schopnost. Problém s nedostatkem živin během testu, ale i chovu, bývá řešen přidáním kravské nebo koňské mrvy. Výhodou je jednoduchost, rychlost a dobrá reprodukovatelnost testu.

Látka je aplikována buď ve vodném roztoku, nebo volatilním rozpouštědlem, nejčastěji se používá aceton. Toto rozpouštědlo je nutno před zahájením pokusu z filtračního papíru odpařit a následně pak filtrační papír ovlhčit vodou.

Žížaly se nechají 48 hodin na navlhčeném filtračním papíře ve zkumavkách při konstantní teplotě 20 °C (± 2 °C), ve tmě, do každé zkumavky je vložena jedna žížala. Na každou koncentraci je potřeba deset opakování. Předběžný test se provádí v rozsahu koncentrací od 0,01 mg/l až po 100 mg/l. Po jeho provedení zjistíme užší rozsah koncentrací s předpokládaným účinkem pro základní test, na jehož základě se určuje mortalita žížal po 24 a 48 hodinách. Tyto hodnoty se přepočítávají na hodnoty LC 50 popř. jiné.

Test na umělé půdě

V tomto testu je zjišťována akutní toxicita po 14 dnech. Test je prováděn v nádobách o objemu jeden až dva litry. Do nich je umístěno 750 gramů umělé půdy, která má pomocí CaCO₃ upravenou hodnotu pH na $6,0 \pm 0,5$. Půda je ovlhčena na 40 - 60% WHC. Na pokus jsou vybrány pouze žížaly 2 měsíce staré o váze 300 až 600 mg s vyvinutým opaskem. Optimální teplota pro pokus je 20 ± 2 °C. Je prováděn předběžný test, při kterém je zjišťována koncentrační škála pro základní test. Koncentrace testované látky používané v předběžném testu jsou 0,1; 1; 10; 100; 1000 mg/kg suché půdy. Do každé testovací nádoby je umístěno 10 organismů a pro každou koncentraci jsou dvě opakování. Po čtrnácti dnech je zjišťována váha a mortalita žížal. Mortalita je zjišťována reakcí na jemný mechanický stimul. V případě absence této reakce jsou testovaní jedinci považováni za mrtvé. Pro základní test je vybráno 5 koncentrací na základě výsledků předběžného testu. Do každé testovací nádoby je umístěno 10 organismů a pro každou koncentraci jsou čtyři opakování. Po čtrnácti dnech testu je zjišťován celkový počet jedinců v každé nádobě, množství biomasy žijících žížal, obsah vody a hodnota pH v půdě. Obsah vody a hodnota pH jsou v půdě zjišťovány na začátku a na konci pokusu. Následně je na základě mortality jedinců v každé koncentraci vypočtena

hodnota LC50 pro testovanou látku. Doporučuje se použití referenční látky 2-chloracetamidu. Test je platný, pokud u kontroly je mortalita méně než 10 % a úbytek váhy menší než 20 %. A výsledky se standardem v rozmezí hodnot LC50 mezi 20 a 80 mg/kg suché půdy.

Výsledné hodnoty jsou podkladem pro výpočet hodnoty LC 50 popř. jiné. Tento test se stal základem pro normu ISO 11268-2:1997.

Na konečný výsledek testů využívajících umělou půdu, má vliv i její složení, a to zejména obsah organických látek v půdě a hodnota pH půdy [15, 22, 33, 35, 37, 42].

2.5.3.1 Příklady testování pesticidů na organismu rodu *Opisthophora* dle normy OECD 207

Pomocí testu akutní toxicity na žížalách *Eisenia foetida* byly testovány pesticidy imidacloprid a RH-5849.

Ve studii [43] byl testován pesticid imidacloprid, což je nitro-methylenový insekticid, používaný především na mšice, který působí jako nervový jed, [1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitro-imidazolidin-2-ylideneamine] a RH-5849 [2'-benzoyl-1'-tert-butylbenzoylhydrazine], který je entomologickým regulátorem růstu používaný proti hmyzu. Test byl proveden ve třech expozičních systémech, a to v roztoku (24 a 48 hodin), na filtračním papíře (24 a 48 hodin) a v umělé půdě (7 a 14 dní). V testu byly použity žížaly 120 dní staré o váze asi 350 gramů.

Hodnoty LC50 se lišily ve všech třech systémech expozice. Imidacloprid byl trvale toxičtější než RH-5849. To lze jednoduše vysvětlit jejich rozdílnou rozpustností ve vodě a tím i rozdílnou biodostupností pro organismy. K expozici v roztoku a na filtračním papíře docházelo především dermální cestou a v umělé půdě především orálním vstupem a zvýšeným výskytem především ve střevech žížal.

Hodnoty LC50 imidaclopridu po sedmi dnech expozice byly 3,48 mg/kg suché půdy a po 14 dnech expozice 2,30 mg/kg suché půdy. Hodnoty LC50 RH-5849 po sedmi dnech expozice byly 730,46 mg/kg suché půdy a po 14 dnech expozice 466,52 mg/kg suché půdy.

Významným poznatkem vyplývajícím z této studie bylo konstatování, že testy toxicity sloužící ke klasifikaci chemických látek a přípravků ukazují, že analýza subletálních efektů pesticidů na žížalách může pomoci pochopit pohyb a degradaci pesticidů v půdách. A následně tak možnost určit riziko daných pesticidů pro půdní faunu a obecně životní prostředí. Tyto testy jsou tedy pro predikci chování látek v terestrickém ekosystému nenahraditelné [43].

Organofosfátový pesticid profenofos (PFF) byl testován na žížalách *Eisenia foetida* a to expozicí na filtračním papíře po dobu 24 a 48 hodin. Kromě akutní toxicity byly sledovány i histologické a morfologické změny, dále pak neurotoxický potenciál PFF a to pomocí měření inhibice acetylcholinesterázy.

Zaznamenané anatomické symptomy jako bylo stáčení žížal, abnormální otok těla, sekrece hlenu apod. byly shodné s účinkem octanu olovnatého a tetraethylolova.

Z výsledků studie vyplynula velmi vysoká toxicita PFF pro žížaly. Hodnoty LC50 po 24 a 48 hodinách byly 4,56 a 3,55 mg.cm⁻². Nicméně i přes tyto výsledky je pesticid označen jako vhodný a nadále se používá, protože je velmi málo toxický pro ptáky a savce.

Výsledky tohoto testu podpořily význam testů na žížalách při posuzování dopadu aplikace pesticidů na necílové organismy [44].

Chlorpyrifos je insekticidní přípravek (O,O-diethyl-O-(3,5,6-trichlor-2-pyridyl)-fosforthioát) používající se na ošetření napadených listů a plodů ovoce, dále na cukrovou řepu, kukuřici, obilniny, papriku, okurky apod.

V následující studii byla stanovena jeho akutní toxicita pro žížalu *Eisenia foetida* v 48 hodinovém kontaktním testu na filtračním papíře. Hodnota LC50 po 48 hodinové expozici byla 0,063 mg.cm⁻². Dále byla měřena inhibice acetylcholinesterázy. Skenovací elektronová mikroskopová studie odhalila morfologické abnormality v tělech žížal.

V této studii byla navíc prokázána přímá závislost toxicity na dávce a čase expozice. Dále byly porovnány morfologické abnormality s jinými pesticidy a ukázaly se hojnější než normálně a podobné jako u aldrinu, heptachloru a lindanu. Žížaly měly nedostatečnou reakci na vnější podněty, což bylo způsobeno inhibicí AChE, která přerušila spolupráci mezi nervovou a svalovou soustavou. Pozorovaná inhibice AChE a neurotoxické účinky jsou v souladu s obecným působením pesticidů ze skupiny karbamátů.

Opět tento test potvrdil potřebu využití testů na žížalách při testování pesticidů na necílových organismech, kdy umožnil odhalení celé řady nepříznivých efektů právě na tyto užitečné složky edafonu [45].

2.5.4 Test reprodukce u žížal OECD 222

Tento test byl vyvinut pro vyhodnocení efektů chemikálií na reprodukci, růst a přežití žížal. Jedná se o chronický test, jehož princip je obdobný jako u testu akutní toxicity na žížale OECD 207.

Žížaly jsou vystaveny řadě koncentrací testované substance, která je vmíchána do půdy. Koncentrace je volena tak, aby způsobila oba efekty (subletální i smrtící) po dobu 8 týdnů. Mortalita a biomasa jsou zjišťovány po 4 týdnech pokusu. Efekt na reprodukci je zjišťován až po dalších 4 týdnech. Při testu je potřeba udržovat konstantní teplotu 20 °C (± 2 °C).

Předběžný test je obdobný jako u testu akutní toxicity tj. do každé testovací nádoby je umístěno 10 organismů a pro každou koncentraci jsou dvě opakování. Nejdříve je do testovací nádoby aplikována látka o dané koncentraci a následně jsou přidány žížaly, u kterých musí být nejdříve zjištěna jejich individuální hmotnost.

Při testu je kvůli jeho délce expozice nutné přidávat potravu a to 0,5 g hnoje na jedince na týden. Nejdříve je do testovací nádoby aplikována látka o dané koncentraci a následně jsou přidány zvážené žížaly. Pro každou koncentraci jsou čtyři opakování. Po čtyřech týdnech je zjišťována mortalita, množství živé biomasy, spočítají se kokony a juvenilové. Pro zjišťování reprodukce jsou dospělci z nádob vyjmuti a kokony a juvenilové se inkubují další čtyři týdny. Po čtyřech týdnech následuje extrakce juvenilů ručním tříděním, pomocí sít atd.

Výsledkem celého testu jsou váha dospělců a počet juvenilů na dospělého. Následně je vyhodnocena EC50 pro danou testovanou látku. Kontrolní varianta (bez testované látky) musí mít cca 30 juvenilů na jednoho dospělého, koeficient variance pro reprodukci < 30 % a mortalita dospělců po 4 týdnech by neměla být větší než 10 %. Jako referenční látka je doporučen pro tento test karbendazim [15, 22, 38].

2.5.4.1 Příklady testování pesticidů na organismu rodu *Opisthophora* dle normy OECD 222

V následující práci byly testovány pesticidy terbuthylazin, selektivní herbicid, a karbofuran (2,2-dimethyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-7-yl methylkarbamát) jeden z nejtoxičtějších karbamátových pesticidů. Byla sledována reprodukce, vliv na respiraci a exkreci.

Výsledky ukázaly, že i malé a střední koncentrace těchto dvou pesticidů mohou vyvolat měřitelné fyziologické účinky. Avšak při dlouhodobém vystavení pesticidům, po dobu osmi měsíců při velice nízkých koncentracích, neměly pesticidy na reprodukci vliv. Poté při zvýšení dávky na 10 µg karbofuranu a 200 µg terbuthylazinu na gram suché stravy, již došlo ke snížení počtu juvenilů v přepočtu na jednoho dospělého jedince o 50 procent.

Závěrem práce bylo opět konstatováno, že testy na žížalách nejen akutní ale i chronické, mají v testování negativních dopadů pesticidů na jeden z nejrepresentativnějších druhů půdní fauny své významné místo a opodstatnění [46].

Další studie, ve které byl využit chronický test s využitím žížal dle metodiky OECD 222, testovala oxychlorid mědi, fungicid, který byl používán hlavně na vinicích a to především v oblasti Jižní Afriky. Test probíhal po dobu osmi týdnů a byla stanovována reprodukce na základě změřených dat. Zjišťován byl růst žížal, přežití, tvorba kokonů a počet vzešlých jedinců.

Studie ukázala, že oxychlorid mědi má značný vliv již při extrémně nízkých koncentracích a to především na tempo růstu mladých jedinců a na tvorbu kokonů, v obou případech dochází ke značnému poklesu [47].

2.5.5 Test únikového chování se žížalami ISO 17512-1

Test ISO 17512-1:2008 je rychlý screeningový test pro hodnocení půdy a vlivu znečišťujících látek a chemikálií na chování žížal. Tento test může být koncipován jako dvoukomorový nebo vícekomorový. Je to rychlý způsob testování, který odráží biologickou dostupnost kontaminantu v půdách. Jako testovací organismus lze použít druh *Eisenia foetida* a *Eisenia andrei*.

Princip tohoto testu spočívá v tom, že určitý počet dospělých jedinců je ve stejném čase vystaven působení kontrolní a testované přírodní půdě nebo půdě, která byla v laboratoři kontaminována testovanou látkou. Obě dvě půdy jsou přitom obsaženy v jedné testovací nádobě. Délka testu se liší v závislosti na použitém organismu (od několika hodin do několika dní), nejčastěji však tento test trvá 48 hodin.

V případě dvoukomorového systému je plastová nádobka naplněna ovlhčenými substráty do výšky několika cm. Jeden oddíl je naplněn nekontaminovanou kontrolní půdou, druhý oddíl, který je oddělen plastovou přepážkou obsahuje kontaminovanou půdou.

Po vstupu organismů do půdy, se nádobka označí a uzavře plastovým víčkem s otvory, které umožňují dostatečné provzdušnění. Migrace organismů může bez problémů probíhat mezi oběma testovanými substráty. Testovací nádoby jsou po vložení organismů umístěny do termostatu nebo klimatizované místnosti se stálým světelným a teplotním režimem. Po ukončení testu jsou půdy opět odděleny přepážkou a v každém testovaném substrátu se spočítá a zaznamená počet jedinců. Pokud se jedinec při vyhodnocování nachází v obou půdních variantách zároveň, tak se má za to, že se organismus vyskytuje na té polovině, na které má umístěnou přední část těla. Při testování efektu konkrétní chemikálie se připraví koncentrační řada látky, která je následně aplikována do půdy [40, 48].

2.5.5.1 Příklady testování pesticidů na organismu rodu *Opisthophora* dle normy ISO 17512-1

Test únikového chování žížal je využíván v celé řadě studií. V jedné z nich byly testovací organismy vystaveny účinkům 10 různých pesticidů, v různých koncentracích. Test byl prováděn ve dvoukomorovém systému. Testovacími organismy byly žížaly druhu *Lumbricus terrestris*. Mezi testované pesticidy patřily Diazinon, Sevin, Safer Fruit and Vegetable Insect Killer, Lindan, Malathion, Orthen, Spectracid, Captan, Metaldehyd a Daconil.

Organismy nejméně unikaly před Saferem, nejvíce pak před Diazinonem. Lindan vykazoval malou unikovost, nicméně to bylo způsobeno zřejmě narkotickými účinky, které Lindan má, neboť u žížal, které zůstaly v této půdě, byla 50% mortalita. Přestože některé pesticidy byly velmi toxické, jiné méně, některé koncentrované jiné zředěné (byly použity koncentrace uváděné na etiketách komerčně dostupných prostředků), výsledek jasně ukázal, že se stoupající koncentrací klesá preference takto kontaminovaných půd. Testy únikového chování se ukázaly jako velice relevantní pro hodnocení toxicity půd [49].

Efekty pesticidů na žížaly v tropických podmínkách byly zkoumány v následující studii. Testovanými látkami byly pro tropické oblasti relevantní pesticidy. Zvoleným organismem byly žížaly druhu *Eisenia foetida*. Tropickou oblastí byla Brazílie. Pro půdy z Brazílie byly použity žížaly z brazilského chovu. Zkoumané látky byly fungicidy Benomyl, Carbendazim a insekticid a akaricid Lambda-cyhalothrin. Polovina testovaných půd byla také dovezena z Brazílie. Jednalo se o tropickou umělou půdu (TAS) a tropickou přírodní půdu (TNS). Dále v testu byla použita umělá půda OECD a přírodní půda LUFA 2.2. Test byl proveden dle normy ISO 17512. Aby test splňoval tropické parametry, byly pozměněny organismy, substrát a teplota testu. Test trval 48 hodin a byl uskutečněn dle standardního schématu. Teplota byla zvýšena na 28 ± 2 °C.

Výsledky ukázaly, že toxické hodnoty (NOEC, EC50) byly nižší než ve 14denním akutním testu toxicity a zároveň byly přibližně stejné jako u reprodukčních testů na žížalách stejného druhu. Dalo by se tedy shrnout, že žížaly *Eisenia foetida* jsou velice citlivé v únikových testech, ale záleží také na typu půdy a testované chemikálii. V této práci doporučují tyto nové metody pro rychlé hodnocení nebezpečnosti pesticidů pro půdy [50].

Rozdíly mezi testem akutní toxicity, reprodukčním a únikovým byly zkoumány M. Scheeferem [51]. Akutní a reprodukční testy byly provedeny podle normy ISO 11268. Efekt na organismy byl hodnocen jako toxický, pokud způsobil alespoň 20% mortalitu, respektive pokleslo-li líhnutí a produkce kokonů o 20 % oproti kontrolní půdě.

Test únikového chování se ukázal jako více citlivý než akutní nebo reprodukční test. Až na výjimku hodnocení půdy kontaminované ropou, kde byl reprodukční test citlivější než únikový šestikomorový test [51].

Studie zabývající se testy únikového chování, a otázkou jejich vhodnosti použití jako screeningové testy v hodnocení ERA (Ecological Risk Assessment), byla provedena s druhem *Eisenia andrei*. Jedinci byli získáni z chovu z regionu Alentejo z jižního Portugalska. Na žížalách byly testovány látky carbendazim, benomyl, dimethoát, síran měďnatý-pentahydrát a několik základních fungicidů používaných ve vinohradech. Všechny testy byly provedeny s půdou LUFA 2.2.

Výsledky potvrdily využitelnost testů únikového chování k hodnocení toxicity a jejich nenahraditelnost při rychlém rozhodování, zda a jak zkoumat půdu dále. Testy únikového chování mohou být využity pro ERA a také pro hodnocení kvality půd, zaručující kvantitativní hodnocení biodostupnosti kontaminantů a toxicity [52].

2.6 Pesticidy

Jako pesticidy se označují dle FAO (Food and Agricultural Organisation, Organizace pro výživu a zemědělství) sloučeniny nebo jejich směsi určené k prevenci, ničení, potlačení, odpuzení či kontrole škodlivých činitelů. Přičemž jako škodlivý činitel je označován jakýkoliv mikroorganismus, rostlina či živočich mající negativní vliv během produkce, skladování, transportu, zpracování a distribuce potravin, krmiv a zemědělských komodit. Dále jsou to pak regulátory růstu, desikanty a inhibitory klíčení.

V dnešní době je registrováno přibližně 800 účinných látek pesticidů, přičemž dle US EPA 140 z nich je považováno za neurotoxické. V České republice jich je registrováno 340.

Pesticidy obsahují účinnou látku (může jich být i více) a přídatné látky jako např. plnidla, stabilizátory, určené k dobré manipulovatelnosti a aplikovatelnosti prostředku [2, 58].

2.6.1 Historie pesticidů

Používání pesticidů sahá velice hluboko do historie lidstva, které se odedávna snažilo zvýšit zemědělskou produkci, ochránit vypěstované plodiny před škůdci a zamezit tak co nejvíce hrozbě hladomorů.

První zmínky pochází z Číny a to již z období 1000 let před n. l., kdy se začalo využívat potírání sírou kulturních rostlin a to na ochranu před bakteriemi a plísněmi.

V Evropě pak v 17. století byl používán roztok sloučenin nikotinu a anabasinu, získaný z tabákových listů a kořenů, jako ochrana rostlin před hmyzem, dále pak strychnin určený k zabíjení hlodavců. V 19. století byly izolovány pyretrin se silným insekticidním účinkem z rostlin rodu *Pyrethrum* a rotenon z kořenů tropických leguminóz *Derris elliptica* a *Lonchocarpus*. Jedná se o širokospektrální kontaktní a žaludeční jed, který zasahuje nervové a svalové buňky. Největší účinnost má proti housenkám a broukům škodících na listech, požíval se tedy jako silný insekticid i akaricid. Pro lidi je relativně neškodný, ale je velice toxický pro ryby. Byl používán již dříve a to v Jižní Americe domorodými kmeny jakožto rybí jed.

Používaly se i sloučeniny arsenu, rtuti a olova, ale od jejich aplikace se postupně upouštělo z důvodu jejich vysoké toxicity a nízké účinnosti. Mezi nejpoužívanější patřil arsenitan měďnatý řadící se mezi herbicidy, fenylrtuť používaná na ochranu osiva a tzv. bordeauxská jícha, což je přípravek sloužící k ochraně rostlin proti houbovým onemocněním především ovocných stromů a vinné révy obsahující 1 - 2% roztok modré skalice s vápenným mlékem.

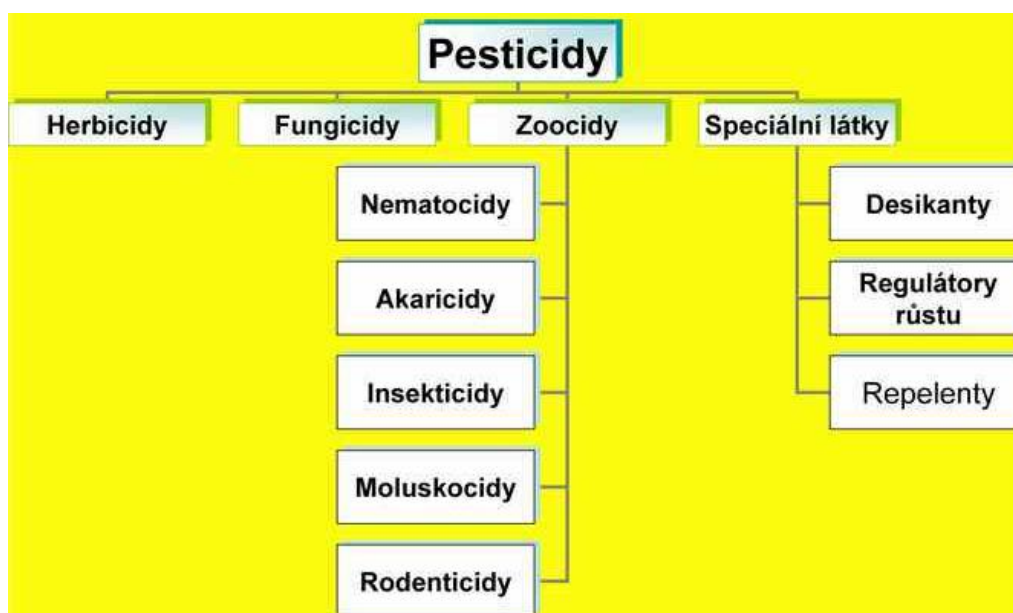
V první polovině minulého století došlo k širokému rozšíření pesticidů, v 30. letech se na trh dostaly dinitro-ortho-kresoly, thiokarbamáty, pentachlorfenoly a i jeden z prvních organofosfátů tetraethylpyrofosfát. DDT [1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan] bylo objeveno roku 1939 Paulem Millerem, jakožto silný insekticidní prostředek, avšak poprvé izolováno bylo již roku 1874. Používalo se především na hubení komárů a moskytů v tropických oblastech, ale samozřejmě byl použit i v zemědělství, a to v masovém měřítku.

Důležitým mezníkem pro používání pesticidů se stal rok 1962, kdy vyšla kniha *Silent Spring* (Mlčící jaro) autorky Rachel Carsonové, kde uvádí u DDT prokazatelné schopnosti akumulace v tukových tkáních, vysokou stabilitu a možnost přenosu do velmi vzdálených oblastí. V důsledcích alarmujících nálezů DDT a některých perzistentních organochlorových insekticidů v různých složkách ekosystému vedly v 60. letech k zavádění analytických metod pro sledování obsahu jejich reziduí v potravinách a zkoumání negativních vlivů na živé organismy. To mělo za následek jejich postupné omezování až do úplného zákazu používání.

Jeho používání je nyní zakázané, výjimku mají pouze některé africké a asijské země s ohledem na výskyt malárie [2, 58].

2.6.2 Dělení pesticidů

Dělení pesticidů probíhá především na základě dvou hledisek, a to z hlediska cílových činitelů, kdy lze pesticidy rozdělit do několika základních skupin (Obr. 2) jejich popis je uveden v tabulce (Tab. 1). Dále pak dle způsobu chování pesticidu v rostlině, tedy jeho mobility v ní (Tab. 2).



Obr. 2: Základní dělení pesticidů dle cílových činitelů.

Tab. 1 : Rozdělení pesticidů podle cílových činitelů.

Skupina pesticidů	Cílový činitel
akaricidy	pavoukovití
fungicity	plísňe
herbicity	plevelle
insekticidy	hmyz
moluskocidy	měkkýši
rodenticidy	hlodavci
regulátory růstu rostlin	přirozený růst
nematocidy	hád'átka

Tab. 2: Rozdělení pesticidů dle mechanismu účinku.

Skupina pesticidů	Účinek
Systémové	Penetrace kutikulou a dále translokace rostlinou.
Kvazisystémové	Omezenější mobilita než pesticidy kontaktní, do kutikuly se penetrují jen v omezeném rozsahu.
Kontaktní	Lokální účinek v místech, kde se nachází jejich povrchový deposit.

Pesticidy aplikované v současnosti se označují jako tzv. „moderní“. Jedná se o sloučeniny obvykle s vyšší polaritou než historické sloučeniny a tedy s nižšími hodnotami pK_{ow} . Tyto látky se v potravním řetězci nekumulují, jsou lépe odbouratelné a nepředstavují velkou zátěž pro ekosystém. Patří sem např. organofosfátové sloučeniny, karbamáty, syntetické pyretroidy a benzoylmočoviny [2, 53, 54, 58].

2.6.3 Legislativní rámec pesticidů

Problematika používání pesticidů je ošetřena zákonem č. 326/2004 Sb. O rostlinolékařské péči a jeho prováděcí vyhláškou č. 32/2012 Sb., o přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin, která ruší vyhlášku č. 146/2009 Sb., kterou se mění vyhláška č. 329/2004 Sb., o přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin, ve znění vyhlášky č. 371/2006 Sb.

Zákon č. 326/2004 Sb. je novelizován zákonem o chemických látkách a chemických směsích a o změně některých zákonů č. 350/2011 Sb., kde je v první části vymezena působnost zákona a to i na přípravky na ochranu rostlin a pomocné prostředky na ochranu rostlin. Z povinností stanovených v tomto zákoně se vztahují na přípravky na ochranu rostlin a pomocné prostředky na ochranu rostlin pouze povinnosti klasifikace, balení a označování.

Dle tohoto zákona v rámci klasifikace se testy ekotoxicity provádí jak s účinnou látkou, tak s pesticidním přípravkem. Zjištěné informace o účinné látce musí být dostatečné, aby umožnily posouzení dopadu přípravku na necílové druhy fauny i flory. Informace o přípravku na ochranu rostlin musí být spolu s informacemi o účinné látce dostatečné zejména pro specifikaci nebezpečnosti přípravku, zhodnocení krátkodobých a dlouhodobých rizik pro necílové druhy, a také pro posouzení zda jsou nezbytná speciální opatření pro jejich ochranu.

Testy by měly být prováděny v souladu s platnou vyhláškou č. 32/2012 Sb. Zjišťují se účinky na ptáky, na vodní organismy, na suchozemské obratlovce kromě ptáků, na včely, na jiné členovce než včely, na žížaly a jiné necílové půdní makroorganismy považované za ohrožené a na necílové půdní mikroorganismy. Přičemž jsou požadovány ekotoxikologické údaje pouze na necílových organismech, jejichž expozice je zhodnocena jako možná. [6, 7].

2.6.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti pesticidů

Pesticidy používané v zemědělské praxi zahrnují široké spektrum sloučenin různých fyzikálně-chemických vlastností. Pro posouzení chování pesticidů po aplikaci a o jejich následném odbourávání rozhodují především následující faktory.

Rozpustnost ve vodě

Rozpustnost ve vodě je jedním z klíčových faktorů, který rozhoduje o distribuci a stabilitě daného pesticidu jak v organismech, tak v životním prostředí. Ve vodě dobře rozpustné pesticidy nejsou zadržovány na půdních částicích, a proto díky zvýšené mobilitě mohou proniknout do zdrojů pitné vody, ze které se vzhledem k nižší těkavosti obtížně uvolňují do atmosféry. Ve vodě jsou také snáze biodegradovatelné (podléhají např. oxidačním reakcím, hydrolýze). Pesticidy s dobrou rozpustností lze snáze smýt z povrchu rostliny, čímž se z nich snadno odstraňují. Oproti tomu lipofilní látky smýt nelze, a proto se odstraňují obtížně nebo vůbec.

Tlak nasycených par

Tlak nasycených par rozhoduje o tom, zda daná látka snadno přechází do plynné fáze anebo je spíše asociována s pevnými částicemi. Druhý případ nastává typicky při tlaku menším než $1 \cdot 10^{-7}$ mPa. Pesticidy s vysokým tlakem nasycených par snadno fumigují, a proto se používají pro ošetření skladových zásob zemědělských plodin či potravin.

Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (Kow)

Hodnota Kow indikuje hydrofobitu daného pesticidu. Látky s vysokou hodnotou rozdělovacího koeficientu Kow ($pKow > 4$) mají velkou afinitu k tukovým složkám, kde se kumulují, pokud nejsou odbourány detoxikačními enzymy. Příkladem takových látek jsou organochlorované pesticidy. Na základě velikosti rozdělovacího koeficientu lze také odhadnout v jakých částech rostlin nebo zemědělských produktů budou lokalizována rezidua sledovaných pesticidů (např. lze očekávat, že pesticidy s vyššími hodnotami pKow budou přítomny v povrchové voskové vrstvě jablek).

Disociační konstanta (Ka)

Hodnoty disociační konstanty vypovídají o schopnosti látky disociovat za běžných podmínek ve vodném prostředí (rozsah hodnot pH 5 – 8). Stupeň disociace ovlivňuje chování pesticidů v daném prostředí jako je odpařování z vodného média, procesy solubilizace, fotolýza, schopnost sorpce na sedimenty, možnost bioakumulace atd. Disociační konstanta se vyjadřuje jako záporný dekadický logaritmus ($pK_a = -\log K_a$).

Půdní adsorpční koeficient (Koc)

Půdní adsorpční koeficient informuje o schopnosti látky vázat se k organické složce půdních částí. Pokud má sloučenina vysoké hodnoty Koc, její část navázaná na organickou složku půdní částice je obtížně biodegradovatelná a současně imobilizovaná vůči pohybu v půdě a případnému odpaření.

Biokoncentrační faktor (BCF)

Biokoncentrační faktor se uvádí pro hydrofobní kontaminanty a indikuje míru přechodu z vodného prostředí a biokoncentraci v organismu v lipidickém podílu. BCF je přímo úměrný hodnotám pKow. Stanovuje se jako poměr rovnovážných koncentrací rezidua v organismu a vodě [2, 53, 54, 58].

2.6.5 Aplikace, degradace a transformace pesticidů

Způsobů aplikace pesticidů je celá škála, záleží také na formě používaných pesticidů. U pesticidů se může jednat o emulgované koncentráty, smáčitelné prášky, rozpustné koncentráty, suspenzní koncentráty či ve vodě dispergovatelné granule.

Aplikovat pesticidy lze pomocí postřiků, takto jsou aplikovány roztoky (jak vodné, tak organické), disperzí pro emulgované nebo dispergované koncentráty, aerosoly, popraše, granule, návnady a pesticid může být i součástí průmyslových hnojiv. Nejčastěji se provádí postřikem rostlin nebo ošetřením rostlin či půdy poprachy.

Degradace a transformace pesticidů v jednotlivých složkách životního prostředí jako je voda a půda, probíhá působením fyzikálních, chemických a biologických vlivů.

Fotolýza

Významným procesem vedoucím k odbourání pesticidů je fotolýza, což je soubor reakcí iniciovaných slunečním zářením. Účinkem záření respektive tepla dochází k termickému rozkladu karbamátových pesticidů, jedná se o tzv. přímou fotolýzu. Mezi fotochemické reakce se řadí i procesy iniciované působením volných radikálů např. hydroxylové, které vznikají v prostředí účinkem slunečního záření, reakcí se singletovým kyslíkem apod., tyto děje se označují termínem nepřímá fotolýza.

Na průběhu fotochemických reakcí se mohou podílet ionty kovů jako katalyzátory. Například ionty Fe^{3+} iniciují radikálovou reakci vedoucí k degradaci karbamátových pesticidů.

Hydrolyzáza

Hydrolyzáza je další důležitou chemickou reakcí, jež se podílí na eliminaci pesticidů z prostředí. Tato reakce probíhá zvláště rychle při extrémních hodnotách pH. Mezi pesticidy, které snadno podléhají hydrolyzáze, se řadí organofosfáty. U nich dochází k hydrolytickému štěpení esterových vazeb. K hydrolyzáze může docházet také v půdě. V tomto prostředí však reakce probíhá pomaleji a je dále ovlivněna i působením mikroorganismů.

Oxidačně-redukční procesy

Oxidačně-redukční procesy se uplatňují například při degradaci triazinů. Jedná se o eliminaci atomu chloru z molekuly, tato reakce probíhá ve vodném prostředí při hodnotách $pH = 1 - 4$. Také organochlorované a organofosfátové pesticidy podléhají oxidačně-redukčním reakcím. Oxidací malathionu ve vodě vzniká malaaxon, podobně fenitrothion je oxidován na fenitroxon nebo parathion-methyl na paraoxon-methyl. Malaaxon vykazuje rovněž insekticidní účinek (jedná se o inhibitor acetylcholinesterázy) a je považována za toxickejší sloučeninu než mateřský insekticid. Tyto chemické přeměny organofosfátů (malathion na malaaxon, parathion na paraoxon) mohou probíhat rovněž *in vivo*.

Působení mikroorganismů

Řada biotransformací, které v konečné fázi vedou až k eliminaci pesticidů ze životního prostředí, je důsledkem působení mikroorganismů. Pesticidy mohou vstupovat do běžných metabolických dějů probíhajících v mikrobiální buňce nebo mohou být pro daný mikroorganismus substrátem (zdrojem uhlíku a dusíku). Zejména bakterie se významně podílejí na odbourání látek kontaminujících životní prostředí. Například bakterie rodu *Pseudomonas*, *Flavobacterium* nebo *Serratia* způsobují degradaci reziduí

hexachlorcyklohexanu a dalších chlorovaných organických látek (např. DDT) přítomných ve vodě a půdě. Bakterie rodu *Pseudomonas* umožňují také degradaci jiných než pouze organochlorovaných pesticidů – například kmen *Pseudomonas putida* vede k úplné eliminaci insekticidu ethoprophosu z půdy. Také karbamátové pesticidy mohou být eliminovány působením mikroorganismů, aldicarb je účinně degradován působením bakterií rodu *Methylosinus*.

Aby mohly být cizorodé látky účinně degradovány, musí mít mikroorganismy zajištěny optimální podmínky pro svou činnost (především vhodnou teplotu a pH). Každý rod bakterií má jiné nároky, což by mělo být bráno v potaz při úvahách o využití mikroorganismů k odbourání xenobiotik z prostředí [2, 53, 54, 58].

2.6.6 Přestup pesticidů do životního prostředí

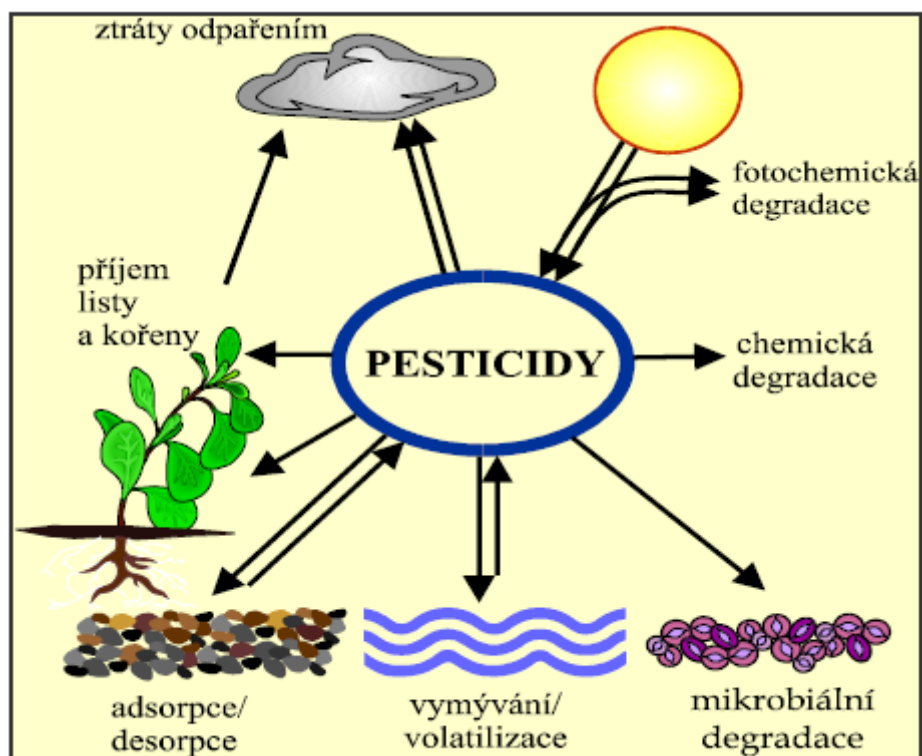
Ačkoli se pesticidy aplikují dle zásad tzv. Správné zemědělské praxe (GAP) nelze vyloučit zasažení necílových organismů či kontaminaci jednotlivých složek životního prostředí.

Je odhadováno, že například 65 % přípravku použitého k ošetření ovocných stromů postřikem zasáhne listovou plochu, 25 % půdu a 10 % se již během aplikace uvolní do atmosféry. Jednotlivé poměry závisí na mnoha dalších faktorech např. hustotě porostu, velikosti částic/kapének, velikosti průtoku daného prostředku z ústí rozprašovacího zařízení, způsobu aplikace, počasí.

Pesticidní přípravky se vyrábějí v různých formách, což podmiňuje způsob jejich aplikace. Během rozprašování přípravků dochází ke kontaminaci atmosféry. Molekuly pesticidu se mohou vázat na pevné částice rozptýlené v atmosféře nebo unikat ve formě par.

Sorbovány na tuhých částicích mohou být transportovány do dalších lokalit, které mohou být často velmi vzdálené od míst původní aplikace. Kromě fyzikálně-chemických vlastností je přestup pesticidů do jednotlivých složek životního prostředí často ovlivněn řadou dalších faktorů, jako je teplota, dešťové srážky, rychlost větru, druh půdy. Například působením deště se mohou rezidua polárních pesticidů dostávat z nadzemních částí rostlin do půdy. Odtud mohou být pesticidy následně transportovány do podzemních i povrchových vod a deponovány v říčních sedimentech. Stejným způsobem se mohou do prostředí dostávat pesticidy aplikované přímo do půdy (některé herbicidy). Kontaminace říčních sedimentů pesticidy závisí na dalších faktorech, jako je například průtok vody, charakter dna, obsah aktivního kyslíku. V půdě může docházet k sorpci pesticidů na půdní částice, to záleží např. na složení půdy, fyzikálně-chemických vlastnostech, přítomnosti polárních funkčních skupin, což omezuje možnosti odbourání pesticidů chemickými procesy nebo působením mikroorganismů. K adsorpci pesticidů může docházet prostřednictvím van der Waalsových sil, vodíkových vazeb či tvorbou komplexů [2, 53, 54, 58].

Na následujícím obrázku (Obr. 3) je naznačen osud pesticidů v životním prostředí.



Obr. 3: Osud pesticidů v prostředí (2).

2.6.7 Mechanismus účinků pesticidů

To jak ovlivňují pesticidy cílové činitele, je dáno z velké části i chemickou povahou jednotlivých látek. Jelikož pod pesticidy spadá široká škála chemických látek, v další části jsou stručně popsány mechanismy účinků nejdůležitějších skupin pesticidů.

Herbicidy

U herbicidů existují různé mechanismy působení na cílové činitele. Využívá se katalýza tvorby hydroperoxidů mastných kyselin v buněčných membránách a v jejímž důsledku dochází k přerušení fotosyntézy. Toto dovedou způsobit např. desikanty patřící mezi kvartérní amoniové sloučeniny (diquat, paraquat), které se aplikují především za účelem likvidace nadzemních částí rostlin. Dále pak mechanismus blokace transportu elektronů při fotosyntéze (látky ze skupiny triazinů a fenyльмоčoviny). Herbicidní účinek některých ostatních látek spočívá v zamezení klíčení semen plevelných rostlin (nitroaniliny) nebo narušování metabolismu nukleových kyselin, které vedou k zastavení růstu cílových plevelů (fenoxyalkanové kyseliny či deriváty benzoové kyseliny, zde se jedná o dicamba).

Insekticidy

V případě insekticidů se jedná především o narušení přenosu signálů mezi nervovými centry. Jako příklad lze použít látky ze skupiny organofosfátů a karbamátů, které inhibují enzym acetylcholinesterázu. Neurotoxické účinky vykazují rovněž syntetické pyrethroidy a klasické organochlorované insekticidy jako DDT. Inhibitory syntézy chitinu jsou látky ze skupiny benzoyльмоčoviny (diflubenzuron, flufenoxuron atd.), ty znemožňují výstavbu kutikuly hmyzu.

Fungicidy

Fungicidy inhibují enzymy obsahující v molekule sulfhydrylové skupiny (např. ethylenbisdithiokarbamáty nebo látky ze skupiny ftalimidů – captan, folpet). Dále pak látky narušující syntézu DNA, což jsou velice často používané fungicidy ze skupiny benzimidazolů (např. thiabendazol, thiofanát-methyl) [2, 53, 54, 58].

2.6.8 Nejdůležitější skupiny pesticidů

Pesticidy se řadí do třech základních generací. U první generace se jedná o sloučeniny arsenu a fluoru, které dnes již nemají žádný význam. Druhá generace obsahuje většinu dnes používaných pesticidů, jejich nejdůležitější zástupci jsou uvedeni v následující části. Třetí generace jsou juvenilní hormony, jež jsou produkovány hmyzem v určité fázi jeho života. Nemají žádný účinek na jiné organismy a místo zabití jedince porušují normální mechanismus vývoje a hmyz odumírá sám.

V následujících pěti podkapitolkách budou stručně popsány základní skupiny klasických i moderních pesticidů a k nim uvedeni i nejdůležitější zástupci. Patří sem organochlorované pesticidy, organofosfáty, karbamáty, pyrethrin a syntetické pyrethroidy, diazinové a triazinové pesticidy.

Další známé pesticidy jsou velmi stručně uvedeny v následujícím odstavci.

Deriváty kyseliny chlorfenoxyoctové (herbicidy). Pesticidy na bázi bipyridilů, řadí se mezi herbicidy a desikanty, nejpoužívanější zástupci jsou diquat a paraquat. Pesticidy na bázi kovů (fungicidy), dříve bylo využíváno mnoho kovů a jejich sloučenin, jako sloučeniny arsenu (insekticidy a rodenticidy), fenylrtuť (fungicid), tributylcin (fungicid), sloučeniny thalia (rodenticidy). V současné době jsou upřednostňovány především sloučeniny mědi např. síran měďnatý a slouží jako fungicidy, algicidy, moluskocidy. Sloučeniny mědi jsou toxické pro ryby. Fipronyl patří do skupiny fenylpyrazolů (insekticidní a antiparazitární účinek). Acylmočoviny a deriváty benzoylmočoviny (insekticidy). Přírodní sloučeniny jiné než pyretriny (rotenon, anabasin, nikotin, abamectin) [2, 53, 54, 55, 58].

2.6.8.1 Organochlorované pesticidy

Organochlorované pesticidy jsou skupinou sloučenin, pro kterou je charakteristický dlouhý poločas rozpadu. Ten se pohybuje v řádu několika let až desetiletí. Patří sem DDT, chlordan, heptachlor, HCH a další.

Největší rozmach zažily tyto pesticidy v období mezi 60. a 80. lety, kdy byly široce používány v zemědělství, na trávnících a v zahradách. Přestože některé z nich jsou již po desetiletí zakázány, v prostředí se kvůli své persistenci udržují stále.

Tyto látky mají většinou lipofilní charakter. Bioakumulují se v tukových tkáních a bioobohacují potravní řetězce. Osud a chování pesticidů v prostředí je dán vlastnostmi těchto látek a také vlastnostmi prostředí, v němž se vyskytují. Vedle mateřských insekticidních sloučenin se vyskytují i některé jejich perzistentní metabolity.

DDT - Poprvé byl dichlordifenyiltrichlorethan připraven roku 1874, ale jeho insekticidní vlastnosti byly objeveny až v roce 1939 Paulem Millerem. Používal se jako přípravek proti hmyzu. Jako první jeho výrobu a používání zakázaly roku 1970 Norsko a Švédsko, v roce 1984 Velká Británie a díky Stockholmské úmluvě je v této době zakázáno ve většině států světa.

Čistý dichlordifenyltrichlorethan je bílá krystalická látka bez zápachu. Ve vodě je téměř nerozpustný, dobře rozpustný je naopak v nepolárních organických rozpouštědlech, jako jsou benzen nebo chloroform. DDT přípravky obsahují příměsi DDE (dichlordifenyldichlorethan) a DDD (dichlordifenyldichlorethan), které vznikají jeho rozkladem. DDT spolu s produkty jeho rozkladu je persistentní, může se shromažďovat v rostlinách a v tukových tkáních živočichů.

Heptachlor - Čistý heptachlor je bílá krystalická látka, technický je voskovitá žlutohnědá. Ve vodě je téměř nerozpustný, naopak v organických rozpouštědlech velmi dobře. Je to látka v prostředí poměrně perzistentní, snadno se adsorbuje na povrch tuhých částic. Ukládá se v játrech, ledvinách, v tukové tkáni a ve svalech a je řazena mezi pravděpodobné karcinogeny. V současné době je výroba a použití heptachloru v České Republice (od roku 1989) a v dalších státech zakázána. Byl však používán na hubení mravenců, termitů, larev a červů.

HCH - 1,2,3,4,5,6-hexachlorocyklohexan (HCH) je bílá až nažloutlá látka typického zápachu, která se v pevném stavu vyskytuje ve formě vloček. Je špatně rozpustný ve vodě. Vyskytuje se v několika izomerních modifikacích a to α , β , γ a δ , přičemž γ -HCH je lindan a je z těchto izomerů nejúčinnějším insekticidem.

HCH je vysoce stabilní látka, která se snadno transportuje na velké vzdálenosti a také se šíří potravním řetězcem. Vysoké koncentrace byly naměřeny zejména v tuku mořských dravých ryb. Technický hexachlorocyklohexan se používal jako insekticid, ale dnes je jeho používání v zemědělství zakázáno.

Chlordan - 1,2,4,5,6,7,8,8-oktachloro-2,3,3a,4,7,7a-hexahydro-4,7-methano-1H-inden je bezbarvá až žlutohnědá viskózní kapalina s aromatickým štiplavým zápachem podobným chloru. Technický chlordan je směsí více než 100 sloučenin. Nejvýznamnější jsou pak cis a trans-chlordan (8 atomů chloru), cis- a trans-nonachlor (9 atomů chloru) a heptachlor (7 atomů chloru).

Chlordan je ve vodě nerozpustný, naopak dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech. Díky své semivolatilitě se může dostat do atmosféry a může být transportován na velké vzdálenosti. Je vysoce toxický především pro vodní organismy.

Chlordan byl poprvé uveden na trh v roce 1945 jako širokospektrální insekticid, který se používal na ošetření zemědělských plodin. V dnešní době je používán proti mravencům, termitům a proti hmyzím larvám, které se živí kořeny rostlin [2, 53, 54, 57, 58].

2.6.8.2 *Organofosfátové pesticidy*

Organofosfáty jsou estery kyseliny ortho-, thio-, pyro- fosforečné, které se používají jako pesticidy a biocidy. Organofosfáty nevratně inhibují enzym acetylcholinesterázu, který na nervových zakončeních katalyzuje rozklad nervového přenašeče acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou, což vede ke zvýšení hladiny acetylcholinu na nervových zakončeních.

Mají systémový účinek, aplikují se na rostlinu, vstřebají se do pletiva, kde působí několik dní až týdnů. Musí se tedy striktně dodržovat ochranné lhůty. Jsou to resorpční jedy, což znamená, že vstupují do organismu všemi cestami.

Fluorofosfáty a kyanofosfáty

Fluorofosfáty a kyanofosfáty byly bojové plyny použité v 1. světové válce (sarin, soman, tabun), nyní jsou všechny zakázány.

Deriváty kyseliny pyrofosforečné

Deriváty kyseliny pyrofosforečné mají insekticidní účinky, patří sem trichlorfon, dichlorvos. V dnešní době jsou již velmi málo používané.

Deriváty kyseliny thiofosforečné

Deriváty kyseliny thiofosforečné jsou selektivně toxické k hmyzu, pro savce pak relativně méně, avšak jejich použití je již dnes také velmi omezeno. Řadí se sem parathion, metathion a diazinon [2, 53, 55, 54, 56, 58].

2.6.8.3 Karbamáty

Karbamáty jsou deriváty nebo estery kyseliny karbarminové. Mají různorodé účinky a vlastnosti. Společným rysem je inhibice cholinesterázy. Vlivem blokády enzymu, který rozkládá acetylcholin, dochází k hromadění aktivního acetylcholinu na synapsích, což má za důsledek zesílené cholinergní působení na hladkou svalovinu a na nervosvalovou ploténku. Jsou nervovými jedy. Na rozdíl od organofosfátů poškození nervového systému při prvních příznacích otravy je reverzibilní. Usmrcují pohyblivá stadia vývoje (larvy, nymfy a dospělce) škůdců, jejich vajíčka nehubí. Mezi nejznámější zástupce patří karbaryl (insekticid), aldikarb (insekticid a nematocid) a benzyf (fungicid).

Karbaryl - 1-naftylmethylkarbamát je bílá krystalická látka, používaná především jako insekticid. Karbaryl je stále velmi používaný insekticid v USA pro oblast zahrádkářství, zemědělství a lesnictví. Karbamáty nejsou perzistentní jako chlorované pesticidy. Přestože je karbaryl toxický pro hmyz, u obratlovců je velmi rychle detoxifikován a eliminován. Neukládá se v tucích ani není vylučován do mateřského mléka [2, 53, 54, 55, 56, 58].

2.6.8.4 Pyrethriny a syntetické pyrethroidy

Pyrethriny

Pyrethriny jsou přírodní organické sloučeniny se silným insekticidním účinkem. Patří sem cineriny, cinerin I, cinerin II, jasmolin I, jasmolin II, pyretrin I a pyretrin II. Nejsou perzistentní, podléhají biodegradaci a rozpadají se působením světla nebo kyslíku. Chemická struktura pyrethrinů je základem pro širokou škálu syntetických insekticidů nazývaných pyrethroidy. Pyrethriny jsou obsaženy v obalech semen trvalky *Chrysanthemum cinerariaefolium* (kopretina starčekolistá), která byla také komerčně pěstována jako zdroj těchto insekticidů. Pyrethriny jsou neurotoxiny působící na nervový systém veškerého hmyzu. Dávky, které nejsou pro hmyz smrtelné, vykazují repelentní účinky. Pyrethriny a pyrethroidy se čím dál častěji stávají pesticidy první volby, namísto organofosfátových a organochlorovaných pesticidů.

Pyrethroidy

Pyrethroidy jsou nervové jedy, používající se jako insekticidy. Narušují rovnováhu mezi sodíkovými a draselnými ionty a tím axiální vedení nervových vzruchů. Jsou fotostabilní, termostabilní, ve vodě nepatrně rozpustné a nepronikají do rostlinných pletiv. V půdě se váží na půdní částice a ztrácejí účinnost. Do povrchových ani podzemních vod se nevyplavují.

Velkou výhodou je, že účinkují v nízkých dávkách, řádově nižších než organofosfáty nebo karbamáty a také rychleji a po delší dobu než většina organofosfátů nebo karbamátů. Usmrcují dospělé a larvy, u některých druhů i vajíčka, žravého i savého a bodavého hmyzu.

Později vyvinuté pyrethroidy (acrinathrin, difenthrin, fenpropathrin, fluvalinát) účinkují akaricidně [2, 53, 54, 55, 58].

2.6.8.5 Diazinové a triazinové pesticidy

Diazinové a triazinové pesticidy patří do skupiny herbicidů. Triaziny jsou antimetabolity pyrimidinových bází jako součásti nukleových kyselin a kyseliny listové. Triazinové sloučeniny působí jako inhibitory fotosyntézy. Triaziny jsou aplikovány ve formě soli a adsorbovány kořeny rostliny. Nicméně, ne všechny rostliny jsou citlivé na triazinové herbicidy. Rostliny jako je kukuřice a cukrová třtina obsahují enzymy, které rychle změní herbicid na prakticky netoxickou formu. Nejznámějšími zástupci jsou atrazin, simazin, propazin a cyanazin.

Triaziny mají sklon rychle se degradovat v různých půdách a neadsorbovat se v částech půdy. Proto triaziny se mohou dostat skrze půdu a stopy těchto kontaminantů mohou být nalezeny ve spodní vodě. Vážným rizikem pesticidů na bázi triazinů je velmi nízká biodegradabilita a dlouhodobé přetrvávání ve vodním prostředí (hlavně v podzemních vodách), stejně jako možnost vzniku nitrosaminů z reziduí triazinů. Triaziny mají estrogení účinky a tak mohou způsobovat feminizaci samců.

Z výše uvedených důvodů je v některých zemích používání triazinových herbicidů zakázáno (Německo), v jiných zemích se jejich používání silně omezuje [2, 53, 54, 58].

2.7 Účinné látky vybrané pro test na *Eisenia foetida*

Pro test akutní toxicity dle metodiky OECD 207 byly vybrány dvě účinné látky dimethoát a thiofánát-methyl.

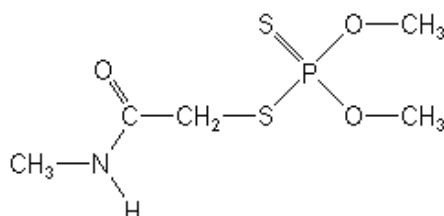
Dimethoát

Tato účinná látka je široce používaná, řadí se mezi organofosfátové insekticidy. Poprvé byla použita v roce 1960 a následně patentována americkou firmou Cyanamid. Dimethoát je silný inhibitor acetylcholinesterázy. Je řazen mezi pesticidy kontaktní a systémové, slouží k likvidaci hmyzu a roztočů včetně mšic a třásněnek např. na okrasných rostlinách, kukuřici, bavlně, hroznech, melounech, citróněch, pomerančích, hruškách, sóji, mandarinkách, tabáku, rajčatech a pšenici. Dále se využívá k odstranění mouchy domácí z hospodářských budov.

Další informace o něm jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 3) a na obrázku (Obr. 4) je znázorněn jeho strukturní vzorec.

Tab. 3: Fyzikálně-chemické vlastnosti dimethoátu.

IUPAC název	O,O-dimethyl S-[2-(methylamino)-2-oxoethyl] dithiophosphate
CAS číslo	60-51-5
Molekulární vzorec	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂
Molekulární hmotnost	229,3 g/mol
Hustota	1,3 g/cm ³ , pevné skupenství
Bod tání	43 – 45 °C
Bod varu	117 °C při 10 Pa
Rozpustnost ve vodě	2,5 g/100 ml



Obr. 4: Strukturní vzorec dimethoátu.

S touto účinnou látkou bylo provedeno mnoho ekotoxikologických studií a to především na rybách, ptácích a včelách. Z výsledků těchto studií vyplývá vysoká toxicita pro včely, střední toxicita pro vodní organismy, jako jsou ryby, více toxický je pak pro vodní bezobratlovce jako např. různonožce z řad korýšů. Přehledná tabulka s výsledky těchto biotestů je uvedena v Příloze 2. Velké množství provedených prací je umístěno na portálu HSDB (Hazardous Substances Data Bank, Databanka nebezpečných látek) a PPDB (Pesticide Properties DataBase, Databáze vlastností pesticidů).

Testů na necílových členovcích, žížalách, bylo provedeno velmi málo a tak lze uvést jen velmi omezené množství dat. Na portálu PPDB je uvedena hodnota LC50 31 mg/kg suché půdy pro čtrnácti denní akutní test na žížale *Eisenia foetida*. A dále pak hodnota EC50 24,06 mg/kg suché půdy, avšak tato hodnota je získána z testu únikového chování na žížale *Eisenia andrei* [59, 60, 61, 62, 74].

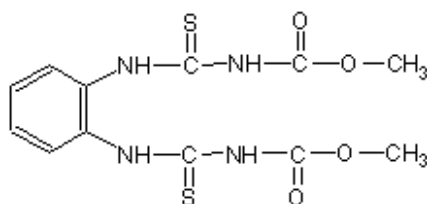
Thiofanát-methyl

Jedná se o látku, řadí se mezi fungicid ze skupiny benzimidazolů se systémovým účinkem. Rostliny ji absorbují pomocí listů a kořenů. Je účinná proti širokému spektru houbových patogenů. Používá se především k ochraně ovocných stromů, vinné révy, pšenice a kořenové zeleniny.

Další informace o thiofanát-methylu jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 4). Na obrázku (Obr. 5) je znázorněn jeho strukturní vzorec.

Tab. 4: Fyzikálně-chemické vlastnosti thiofanát-methylu.

IUPAC název	dimethyl 4,4'-(o-phenylene)bis(3-thioallophanate)
CAS číslo	23564-05-8
Molekulární vzorec	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂
Molekulární hmotnost	342,39 g/mol
Hustota	1,537 g/cm ³
Bod tání	172 °C
Bod varu	478,4 °C při 10 Pa
Rozpustnost ve vodě	< 0,1 g/100 ml při 20 °C



Obr. 5: Strukturní vzorec thiofanát-methylu.

Množství ekotoxikologických studií provedených s touto látkou je značné. V Příloze 3 je uvedena přehledná tabulka s vybranými testy ekotoxicity, ze které vyplývá velice nízká toxicita této látky pro včely. Velká část z provedených studií je opět uvedena v databázi HSDB.

Avšak kontaktních testů se žížalami bylo provedeno jen velmi omezené množství. Na stránkách PPDB je uvedena hodnota pro akutní test trvajícím 14 dní LC₅₀ více jak 13,2 mg/kg suché půdy a účinná látka thiofanát-methyl je označena za středně toxickou. V databázi HSDB je zmíněn test na umělé půdě s výslednou hodnotou LC₅₀ 20,1 mg/kg suché půdy. Další provedené testy s organismem *Eisenia foetida* již neodpovídají metodice OECD 207 [63, 64, 65, 66].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Testované látky

3.1.1 Standardní látka

Pro testy s *Eisenia foetida* se používá jako standardní látka 2-chloracetamid. Výsledky testu OECD 207 musí spadat do daného rozmezí hodnot pro LC50 20 – 80 mg/kg suché půdy. Pokud se výsledná hodnota vymyká tomuto rozmezí, nebyla dodržena metodika testu popř. testovací organismy nebyly v požadované kondici atd. Je pak nutné určit chyby v testování a test zopakovat.

Základní informace o 2-chloracetamidu jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 5). Jeho použití je velice všestranné. V databázi PPDB jsou uvedeny jeho nejčastější následující způsoby použití. Průmyslový konzervační prostředek, v kosmetice se kromě konzervačních schopností látky využívá i jako dezinfekce, jejímž úkolem je zpomalit zhoršování kvality kosmetických prostředků tím, že zpomaluje růst bakterií a plísní. Dále může být aplikován jako součást lepidel používaných ve výrobcích určených pro balení nebo přepravu potravin za předpokladu, že lepidlo je buď odděleno od jídla funkční bariérou, nebo nepřekračuje předepsané meze. Dále se používá jako konzervační prostředek pro kůži a obrazy. Jsou známy i jeho insekticidní vlastnosti vůči mšicím [67, 68].

Tab. 5: Vlastnosti 2-chloracetamidu.

IUPAC název	2-chloroacetamide
CAS číslo	79-07-2
Molekulární vzorec	C ₂ H ₄ ClNO
Molekulární hmotnost	93,51 g/mol
Hustota	1,3 g/cm ³ , pevné skupenství, bílé až světle žluté krystalky
Bod tání	121 °C
Bod varu	225 °C při 10 Pa

3.1.2 Topsin M 500 SC

Topsin M 500 SC je systémový fungicid přijímaný listy a kořeny rostlin. Přípravek obsahuje 500g/l účinné látky thiofanát-methylu. Vyznačuje se dlouhodobým reziduálním účinkem. Má pozitivní vliv na celkový zdravotní stav porostu a výnosovou úroveň.

Dle SRS (Státní rostlinolékařská správa) je jeho uvádění na trh povoleno do 28.2.2016 a jeho používání maximálně do 28.2.2018.

Přípravek je určený k ochraně ječmene ozimého a pšenice ozimé proti stéblolamu. Cukrovku a krmnou řepu chrání proti cercosporióze a slunečnici proti hlízence obecné. Maximální počet ošetření na plodinu za vegetaci je jedenkrát.

Prostředku se aplikuje 0,7 l/ha při ošetření ječmene ozimého a pšenice ozimé a toto množství se dává v 200 – 400 litrech vody. Při ošetření cukrovky a řepy krmné se použije 0,6 – 0,7 l/ha a toto množství je taktéž dávkováno v 200 – 400 litrech vody. Pro slunečnici je nejvyšší množství použitého pesticidu stanoveno na 1,5 – 1,8 l/ha v celkovém množství vody 300 – 400 litrů. U slunečnice se tak dostane na 1 m² 0,18 ml koncentrovaného fungicidu, do půdy pak může proniknout až 30 % z aplikovaného množství, tedy 0,054 ml.

Podrobné informace o pesticidu jsou uvedeny v Příloze 4, která obsahuje bezpečnostní list přípravku [69, 70].

3.1.3 Perfekthion

Perfekthion je systémový insekticidní prostředek k hubení mšic a květilky řepné. Přípravek obsahuje 400 g/l účinné látky dimethoátu. Neměl by být aplikován více než jedenkrát za rok.

Dle SRS je jeho uvádění na trh povoleno do 30.9.2017 a jeho používání maximálně do 30.9.2019.

Používá se na ochranu mnoha druhů rostlin. Na portálu SRS jsou uvedeny následující plodiny. Česnek, cibuli, pór, špenát setý, třešeň, višň a okrasné rostliny chrání před mšicemi a jeho povolené množství na hektar činí 0,6 litru. Cukrovku a krmnou řepu chrání před květilkou řepnou a to v povoleném množství 0,3 – 0,4 l/ha. Při dávce 0,6 l/ha je na 1 m² aplikováno 0,06 ml koncentrovaného insekticidu, do půdy to pak může být až 30 % z aplikovaného množství, tedy 0,018 ml.

Podrobné informace o pesticidu jsou uvedeny v Příloze 5, která obsahuje bezpečnostní list přípravku [71, 72].

3.2 Příprava umělé půdy pro testy

Umělá půda pro test se standardní látkou

Nejprve bylo připraveno 14 kg této půdy pro test se standardní látkou. Rašelina byla rozprostřena v tenké vrstvě a byla ponechána sušit vždy tři dny na vzduchu, poté byla homogenizována a proseta přes síto s otvory o velikosti 2 mm. Celkově bylo nachystáno 1,4 kg rašeliny.

Písku bylo potřeba 9,8 kg a byl sušen po dobu 2 dnů na vzduchu a následně byl proset přes síto s velikostí ok nejprve 0,05 mm, jehož podsítný podíl tvořil z celkové hmotnosti potřebného písku cca 75 %. Zbýlý nadsítný podíl byl proset přes oka o velikosti 0,2 mm a jeho hmotnost tvořila 25 % z celkové hmotnosti písku.

Poté bylo přidáno 2,8 kg kaolinu. Směs byla důkladně promíchána a byl přidán uhličitán vápenatý, a to v takovém množství, aby se výsledné pH nacházelo v rozmezí hodnot $6 \pm 0,5$. Uhličitánu vápenatého bylo na připravené množství 14 kg přidáno 22 gramů.

Hodnota pH byla stanovena tak, že do zkumavky bylo přidáno 5 ml půdy a doplněno následně na celkový objem 30 ml 1M roztokem KCl. Suspenze byla důkladně třepána po dobu 5 minut, nechána stát 2 hodiny a po opětovném důkladném protřepání byla pomocí pH metru změřena hodnota pH suspenze. Ta byla stanovena na 6,1 a zhodnocena jako vyhovující podmínkám testu.

Dále byla u půdy stanovena hodnota WHC_{max} . Nejprve bylo zváženo 50 g suché umělé půdy, které bylo následně umístěno do předem zváženého a vysušeného válečku, které měl dno tvořené polopropustným materiálem. Půda byla sklepana, aby sesedla. Válec byl umístěn do nádoby s vodou tak, aby hladina vody byla ve výšce sloupce vzorku půdy. Ve vodní lázni byl válec ponechán 3 hodiny, poté byl přemístěn na misku s pískem s tkaninou na povrchu. Tato miska byla navíc přikryta, aby se zabránilo vysoušení vzorků. Po 3 hodinách byl zvážen váleček i s půdou, toto vážení bylo dále zopakováno po 30 minutových intervalech do konstantní hmotnosti.

Dle vzorce (1) uvedeného na straně 18, kapitola 2.5.1 Umělá půda, byla vypočtena hodnota WHC_{max} . Vzhledem k tomu, že výchozí umělá půda byla zcela suchá směs, stačilo vypočtenou hodnotu WHC_{max} podělit dvěma a vynásobit množstvím ovlhčované půdy

v gramech. Výsledkem je množství vody, které se musí do jednotlivých nádob testů přidat. Jelikož výsledná hodnota WHC_{max} je 40 %, bylo přidáno do každé misky 150 ml vody.

Na následujícím obrázku (Obr. 6) je připravená umělé půda, v levé části suchá připravená směs a v pravé již ovlhčená na příslušné WHC_{max} .



Obr. 6 Umělé půda před a po ovlhčení.

Umělé půda pro testy s pesticidy

Bylo připraveno 32 kg umělé půdy. Pro toto množství bylo potřeba 22,4 kg písku, 3,3 kg rašeliny a 6,4 kg kaolinitu. Tyto komponenty byly nachystány stejným způsobem jako v předchozím testu. Po důkladném promíchání komponent bylo přidáno 52 gramů uhličitanu vápenatého a byla stanovena hodnota pH pomocí 1M roztoku KCl na 6,4. Hodnota WHC_{max} byla stanovena opět na 40 % a proto bylo přidáno do každé testovací nádoby 150 ml vody.

3.3 Založení chovu

Žížaly byly dodány v počtu cca 600 jedinců. Pocházely ze standardních chovů RECETOXu od paní Ing. Šmídové a z chovu paní profesorky Beklové z VFU. U dodaných žížal se nacházelo i značné množství kokonů, juvenilních jedinců a žížal nevhodných pro test (malá váha, bez vyvinutého opasku). Tito vyselektovaní jedinci posloužili jako materiál k založení chovu na naší fakultě.

Pro přípravu chovného substrátu bylo postupováno následovně. Nejprve byla připravena směs z komponent: zahradní substrát, rašelina a granulovaný koňský hnůj. Tyto komponenty byly smíchány v poměru 10:8:2. Celková hmotnost činila tři kilogramy. Hodnota pH této směsi musí být v rozmezí 5,5 – 7. Také v tomto případě byla hodnota stanovena na 1M roztok KCl. Přesný postup tohoto stanovení je uveden v kapitole číslo 3.2 Příprava umělé půdy. Hodnota pH připraveného substrátu pro chov byla stanovena na 6,4, což je vyhovující hodnota pH. Tato směs byla vložena do plastového boxu o objemu 11 litrů, promíchána s vodovodní vodou na optimální vlhkost. V tomto případě je optimální vlhkost stanovována tzv. pěstní zkouškou následující způsobem. Půda stlačená pěstí má mít na povrchu drobné kapénky, voda však nesmí vytékat. Směs byla ponechána dva dny odstát.

Do směsi s vyhovujícím pH a vlhkostí byly dány kokony, juvenilové a drobné žížaly. Povrch chovu byl přikryt filtračním papírem, který byl lehce ovlhčen vodou a celý box byl přikryt alobalem s několika otvory pro přístup vzduchu. Chov byl umístěn do vhodných teplotních podmínek. Teplota by neměla přesahovat hodnotu 22 °C a klesat pod 18 °C.

Každý týden byl chov kontrolován, ručně prokypřen a dodána potřebná voda. Jako potrava byl přidáván ovlhčený hnůj a zbytky rostlinného původu např. listy salátu. Protože pokud jsou žížaly krmeny pouze granulovaným hnojem, velmi málo přibývají na váze.



Obr. 7: Chov žížal.

3.4 Příprava vzorků

Jednotlivé testované koncentrace standardní látky a pesticidů jsou uvedeny v prvním sloupci následující tabulky (Tab. 6). Ve druhém sloupci této tabulky jsou uvedeny příslušné navážky těchto látek do 0,75 kg umělé půdy. Jednotlivé testované koncentrace standardu a pesticidů byly vždy kvantitativně převedeny do odměrné baňky o objemu 50 ml. K těmto 50 ml bylo následovně přidáno 100 ml destilované vody (celkové množství vody do jedné testovací nádoby je vypočtených 150 ml) do každé testovací nádoby testu. Zbylých 100 ml vody sloužilo ke kvalitativnímu převedení obsahu odměrné baňky.

Tab. 6: Testované koncentrace standardu a pesticidů

2-chloracetamid		Topsin M 500 SC		Perfekthion	
mg/kg	g/0,75 kg	mg/kg	g/0,75 kg	mg/kg	g/0,75 kg
1	0,0008	0,1	0,0001	0,1	0,0001
17,5	0,0131	1	0,0008	1	0,0008
35	0,0265	10	0,0075	10	0,0075
46,6	0,0349	50	0,0375	32,5	0,0244
58,3	0,0437	75	0,0563	55	0,0413
70	0,0525	100	0,0750	75,5	0,0566
125	0,9370	150	0,1125	100	0,0750
250	0,1875	200	0,1500	233	0,1748
		500	0,3750	366	0,2745
		1000	0,7500	500	0,3750
				1000	0,7500

3.5 Test na organismu *Eisenia foetida*

3.5.1 Testy se standardní látkou

Nejprve byl proveden první test se standardní látkou, a to s 2-chloracetamidem v rozmezí následujících koncentrací: 1, 35, 70, 125 a 250 mg/kg suché půdy. Tyto hodnoty byly vybrány na základě faktu, že výsledky daného testu jsou považovány za validní pouze v tom případě, že hodnota LC50 se pohybuje v rozmezí 20 až 80 mg/kg suché půdy.

Testy byly provedeny v nádobách o objemu 1 litr. Tyto nádoby byly důkladně označeny a pro každou koncentraci byly nachystány dvě opakování a pro celý test dvě kontroly. Do nádob bylo umístěno 750 gramů umělé půdy. Dále do nich byl přidán vzorek rozpuštěný v odměrné baňce o objemu 50 ml a zbylých 100 ml destilované vody, z celkového objemu 150 ml, které bylo zároveň využito ke kvalitativnímu převedení vzorku.

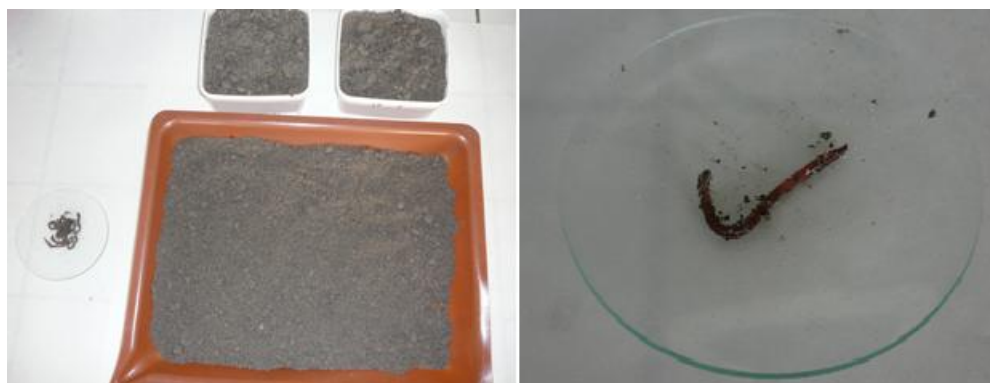
Na každý pokus byli vybráni jedinci o minimální váze 300 mg a s vyvinutým opaskem. Do každé testovací nádoby bylo umístěno 10 organismů.

Organismy byly před testem zváženy, stejně tak byla zvážena celá nádoba s nasazenými organismy. Následně byla přikryta potravinářskou fólií, do které bylo uděláno několik otvorů.

Po prvním týdnu testu byly nádoby opět zváženy a rozdíl ve váze značil úbytek vody, která byla doplněna. Vždy se jednalo o cca 10 ml na každou nádobu.

Po druhém týdnu testu byl obsah každé testovací nádoby vysypán na podložku, byli vybráni žijící jedinci, určena jejich váha, počet a tělesná kondice. Také byla zaznamenána hodnota pH a WHC půdy.

V následující tabulce (Tab. 7) jsou uvedeny podmínky, za kterých test probíhal. A na obrázku (Obr. 8) je v levé části zobrazeno vyhodnocování testu a v pravé části testovací organismus *Eisenia foetida*, který byl následně omyt, osušen a zvážen.



Obr. 8 Vyhodnocování testu s *Eisenia foetida*.

Tab 7: Podmínky základního a předběžného testu.

Podmínky testu	
teplota	20 ± 2 °C
osvětlení	400 - 800 lux
pH půdy	6,1
WHC _{max} půdy	40%

Test se považuje za platný, pokud mortalita v kontrole nepřesáhne 10 % a úbytek váhy nepřesáhne 20 % a hodnota LC50 pro standard 2-chloracetamid je v rozmezí 20 – 80 mg/kg suché půdy. Výsledky kontroly jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 8).

Tab. 8: Výsledky kontroly předběžného testu.

Kontrola	
mortalita	0 jedinců
úbytek váhy	9,6 %
tělesná kondice	velice dobrá
platnost testu	ano
pH půdy před	6,1
pH půdy po	7,4
WHC půdy před	40%
WHC půdy po	23%

Tab. 9: Výsledky předběžného testu.

Koncentrace [mg/kg]	Mortalita [počet jedinců]	Mortalita [%]
1	0	0
35	3	30
70	9,5	95
125	10	100
250	10	100

Z výsledků předběžného testu, uvedených v tabulce (Tab. 9), je zřejmé že pouze u dvou koncentrací došlo k mortalitě v rozmezí 5 – 95 %. Musel být tedy proveden další test s třemi vybranými koncentracemi, abychom měli pět koncentrací v rozmezí 5 – 95% mortality nutných pro sestavení odpovídajícího grafu. Pro základní test byly zvoleny následující koncentrace: 17,5; 46,6 a 58,3 mg/kg suché půdy. U základního testu bylo postupováno stejným způsobem jako u předběžného.

Tab. 10: Výsledky kontroly základního testu.

Kontrola	
mortalita	0 jedinců
úbytek váhy	8 %
tělesná kondice	velice dobrá
platnost testu	ano
pH půdy před	6,1
pH půdy po	7,4
WHC půdy před	40%
WHC půdy po	19%

Tab. 11: Výsledky základního testu.

Koncentrace [mg/kg]	Mortalita [počet jedinců]	Mortalita [%]
17,5	1	10
46,6	5,5	55
58,3	8,5	85

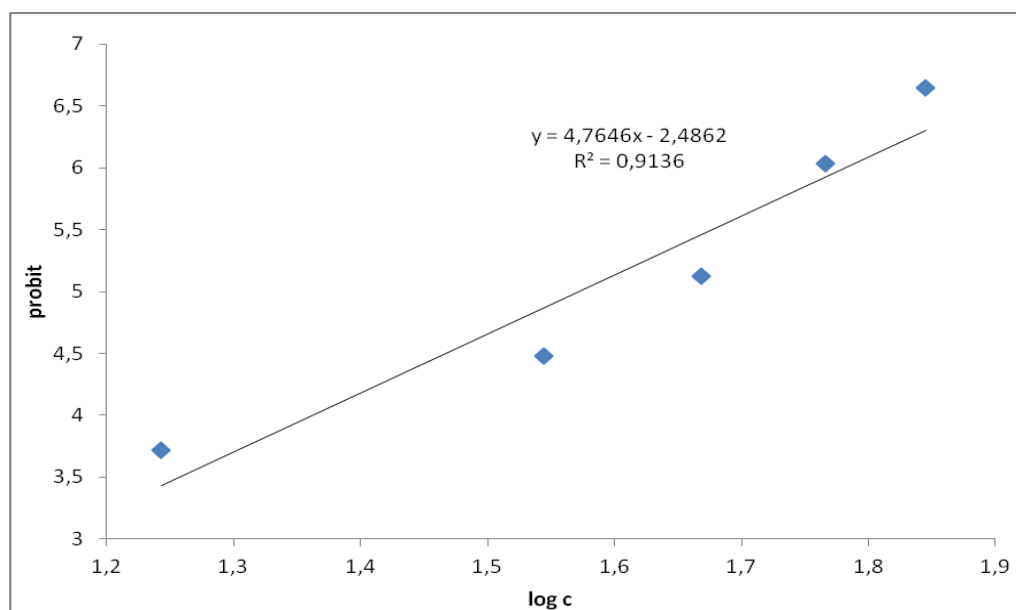
Z výsledků kontroly uvedených v tabulce (Tab. 10) vyplývá, že test byl platný. Výsledná hodnota LC50 po 14 dnech mohla být určena, protože bylo získáno 5 hodnot s letální koncentrací mezi 5 až 95 % (Tab. 9 a Tab. 11), což je počet potřebných bodů k sestrojení přímky závislosti probitů (mortalita vyjádřená v procentech a převedená na probitové hodnoty) na log koncentrace.

Výsledky testů s 2-chloracetamidem, jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 12). Byly použity všechny hodnoty z předběžného a základního testu, u kterých bylo dosaženo mortality v rozmezí 5 až 95 % a to z důvodu nedostatku testovacích organismů *Eisenia foetida*.

Následuje graf (Graf 1) znázorňující závislost mortality převedené na probitové hodnoty na logaritmu koncentrace. Z rovnice regresní přímky proložené body byl vypočten log koncentrace a odlogaritmováním této hodnoty byla získána hodnota LC50 po 14 dnech testu 37,25 mg/kg suché půdy.

Tab. 12: Výsledky testů 2-chloracetamidu.

koncentrace [mg/kg]	log koncentrace	mortalita [%]	probit
17,5	1,243038	10	3,718
35,0	1,544068	30	4,476
46,6	1,668386	55	5,126
58,3	1,765669	85	6,036
70,0	1,845098	95	6,645



Graf 1: Graf závislosti probitových hodnot na log c pro 14denní test s 2-chloracetamidem.

3.5.2 Testy s Topsinem M 500 SC

Nejprve byl proveden předběžný test v následující koncentrační řadě: 0,1; 1; 10; 100 a 1000 mg/kg suché půdy.

Test byl proveden stejným způsobem jako test se standardní látkou, pouze hodnota pH půdy se lišila, protože pro testy s pesticidními přípravky byla připravena uměle vytvořená půda později. Podmínky předběžného a základního testu jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 13).

Tab. 13: Podmínky předběžného a základního testu.

Podmínky testu	
teplota	20 ± 2 °C
osvětlení	400 - 800 lux
pH půdy	6,4
WHC _{max} půdy	40%

Tab. 14: Výsledky předběžného testu.

Koncentrace [mg/kg]	Mortalita [počet jedinců]	Mortalita [%]
0,1	0	0
1	0	0
10	1	10
100	5	50
1000	10	100

Tab. 15: Výsledky kontroly předběžného testu.

Kontrola	
mortalita	0 jedinců
úbytek váhy	5,6 %
tělesná kondice	velice dobrá
platnost testu	ano
pH půdy před	6,4
pH půdy po	7,6
WHC půdy před	40%
WHC půdy po	25%

Z výsledků kontroly (Tab. 15) vyplývá, že provedený test byl platný. Na základě výsledků předběžného testu (Tab. 14) byly zvoleny hodnoty koncentrací testované látky pro základní test. Ten byl proveden s vybranými koncentracemi: 50; 75; 150; 200 a 500 mg/kg suché půdy. Test byl realizován stejným postupem jako předběžný. Pouze doba expozice byla prodloužena na 28 dní. A to z důvodu získání hodnot LC₅₀ pro test trvající 14 a 28 dní a možnosti porovnat tak vliv doby expozice pesticidního přípravku na testovací organismy.

Každý týden byla do testovacích nádob dodávána voda a po přepočítání přeživších jedinců po 14 dnech expozice, byl přidán navíc i granulovaný koňský hnůj cca 5 gramů na 10 jedinců.

Tab. 16: Výsledky základního testu.

Koncentrace [mg/kg]	Mortalita po 14 dnech [%]	Mortalita po 28 dnech [%]
50	35	40
75	45	45
150	60	60
200	65	65
500	80	90

Tab. 17: Výsledky kontroly základního testu.

Kontrola	
mortalita	0 jedinců
úbytek váhy	6,4 %
tělesná kondice	velice dobrá
platnost testu	ano
pH půdy před	6,4
pH půdy po	7,5
WHC půdy před	40%
WHC půdy po	23 %

Z výsledků kontroly (Tab. 17) vyplývá, že provedený test byl platný. Pro pět hodnot koncentrací (Tab. 16) navržených pro základní test mělo za následek mortalitu v rozmezí 5 až 95 % všech pět těchto hodnot.

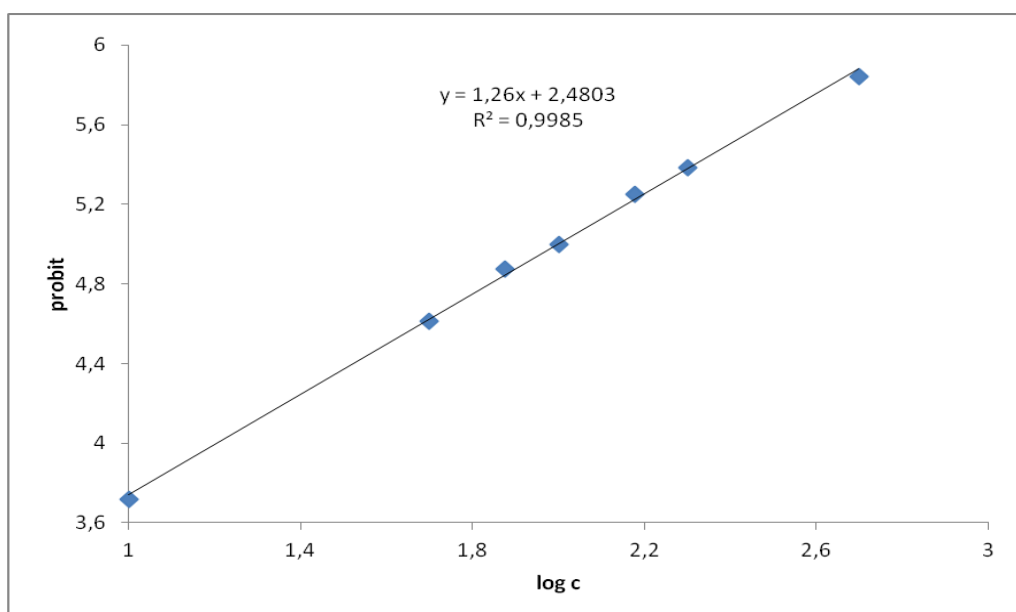
Výsledky testu s Topsinem M 500 SC, jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 18). Byly použity všechny hodnoty z předběžného a základního testu, u kterých bylo dosaženo mortality v rozmezí 5 až 95 % a to z důvodu nedostatku testovacích organismů *Eisenia foetida*.

Následuje graf (Graf 2) znázorňující závislost mortality převedené na probitové hodnoty na logaritmu koncentrace, prostřednictvím kterého byla stanovena hodnota LC50 po čtrnácti dnech testu na 99,95 mg/kg suché půdy a graf (Graf 3), dle kterého byla stanovena hodnota LC50 po dvaceti osmi dnech testu na 86,77 mg/kg suché půdy. Převod úmrtnostních dat vyjádřených v procentech byl na probity proveden dle tabulky uvedené v Příloze 1.

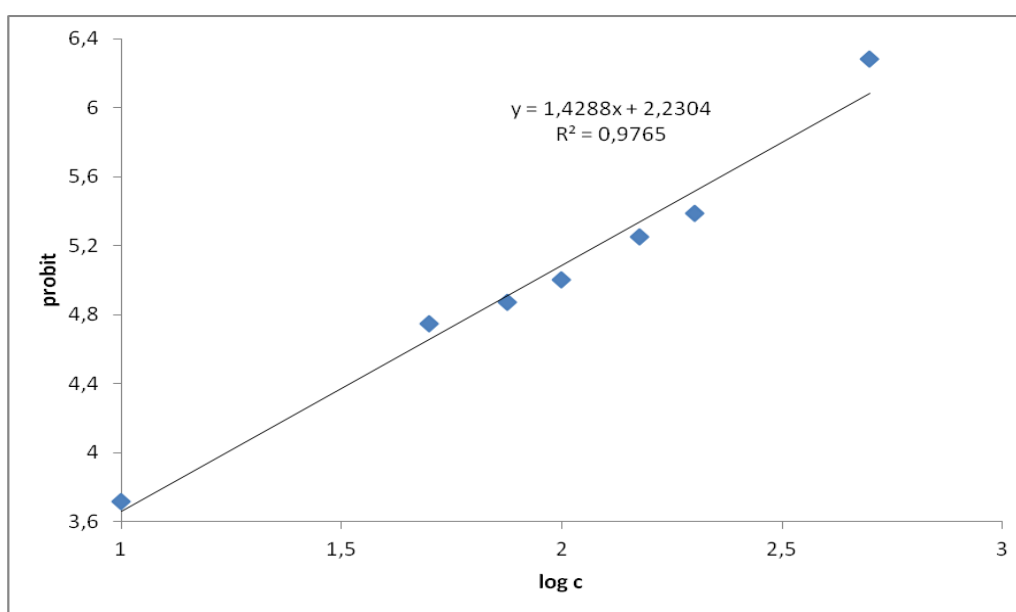
Při vyhodnocování testu po 14 dnech nebyl pozorován větší vliv na hmotnost, velikost a pohyblivost žížal. Po 28 dnech pesticid nevykazoval skoro žádné zvýšení mortality (pouze v koncentracích 50 a 500 mg/kg suché půdy). Vliv na hmotnost žížal byl zaznamenán pouze v nejvyšší koncentraci 500 mg/kg suché půdy, úbytek v tomto případě činil cca 40 mg na jednu žížalu.

Tab. 18: Výsledky testů s Topsinem M 500 SC

koncentrace [mg/kg]	log koncentrace	mortalita 14 dní [%]	probit	mortalita 28 dní [%]	probit
10	1,00000	10	3,718	10	3,718
50	1,69897	35	4,615	40	4,747
75	1,87506	45	4,874	45	4,874
100	2,00000	50	5,000	50	5,000
150	2,17609	60	5,253	60	5,253
200	2,30103	65	5,385	65	5,385
500	2,69897	80	5,842	90	6,282



Graf 2: Graf závislosti probitových hodnot na log c pro 14denní test Topsinu M 500 SC.



Graf 3: Graf závislosti probitových hodnot na log c pro 28denní test Topsinu M 500 SC.

3.5.3 Testy s Perfekthionem

Nejprve byl proveden předběžný test v následující koncentrační řadě: 0,1; 1; 10; 100 a 1000 mg/kg suché půdy.

Test byl proveden stejným způsobem jako test se standardní látkou, pouze hodnota pH půdy se lišila, protože pro testy s pesticidními přípravky byla připravena umělejší půda později. Podmínky předběžného a základního testu jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 19).

Tab. 19: Podmínky předběžného a základního testu.

Podmínky testu	
teplota	20 ± 2 °C
osvětlení	400 - 800 lux
pH půdy	6,4
WHCmax půdy	40%

Tab. 20: Výsledky předběžného testu.

Koncentrace [mg/kg]	Mortalita [počet jedinců]	Mortalita [%]
0,1	0	0
1	0	5
10	1	10
100	5	55
1000	10	100

Tab. 21: Výsledky kontroly předběžného testu.

Kontrola	
mortalita	0 jedinců
úbytek váhy	5,9 %
tělesná kondice	velice dobrá
platnost testu	ano
pH půdy před	6,4
pH půdy po	7,2
WHC půdy před	40%
WHC půdy po	25%

Z výsledků kontroly (Tab. 21) vyplývá, že provedený test byl platný. Výsledky tohoto předběžného testu (Tab. 20) umožnily stanovit koncentrační řadu testované látky pro základní test: 32,5; 55; 75,5; 233; 366 a 500 mg/kg suché půdy. Test byl proveden stejným způsobem jako s předcházejícím pesticidem. Doba trvání testu byla rovněž 28 dní, každý týden byla do nádobek dodávána voda a po počítání přeživších jedinců po 14 dnech expozice, byl přidán navíc i granulovaný koňský hnůj cca 5 gramů na 10 jedinců.

Tab. 22: Výsledky základního testu.

Koncentrace [mg/kg]	Mortalita po 14 dnech [%]	Mortalita po 28 dnech [%]
32,5	25	40
55	35	50
75,5	40	75
233	70	90
366	80	95
500	100	X

Tab. 23: Výsledky kontroly základního testu.

Kontrola	
mortalita	0 jedinců
úbytek váhy	8 %
tělesná kondice	velice dobrá
platnost testu	ano
pH půdy před	6,4
pH půdy po	7,3
WHC půdy před	40%
WHC půdy po	21%

Z výsledků kontroly (Tab. 23) vyplývá, že provedený test byl platný. Pro šest hodnot koncentrací (Tab. 22) navržených pro základní test mělo za následek mortalitu v rozmezí 5 až 95 % pět hodnot.

Výsledky testů s *Perfekthionem*, jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 24). Byly použity všechny hodnoty z předběžného a základního testu, u kterých bylo dosaženo mortality v rozmezí 5 až 95 % a to z důvodu nedostatku testovacích organismů *Eisenia foetida*.

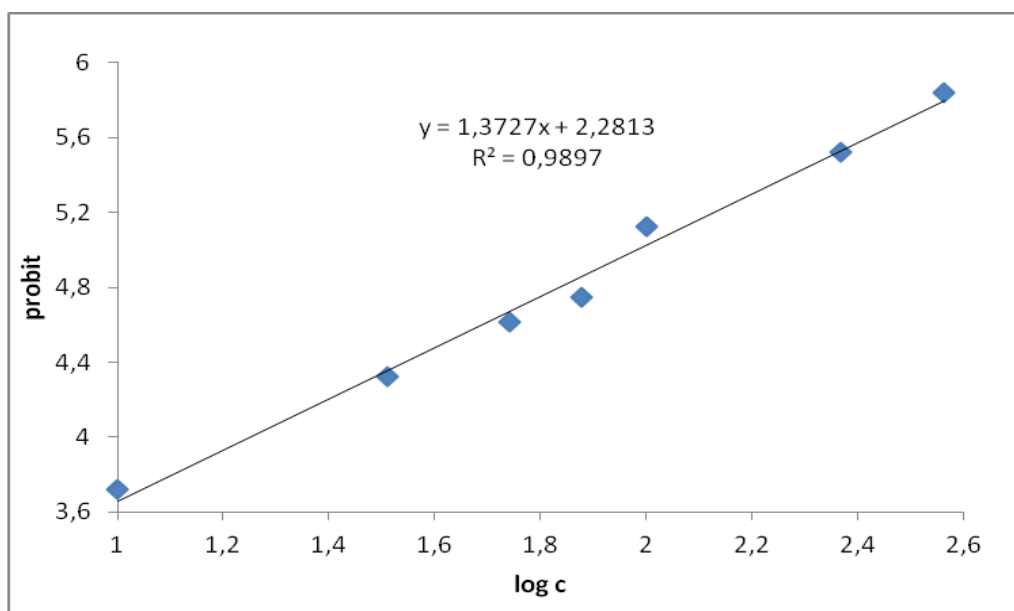
Následuje graf (Graf 4) znázorňující závislost mortality převedené na probitové hodnoty na logaritmu koncentrace, prostřednictvím kterého byla stanovena hodnota LC50 po čtrnácti dnech testu na 95,62 mg/kg suché půdy a graf (Graf 5), dle kterého byla stanovena hodnota LC50 po dvaceti osmi dnech testu na 36,6 mg/kg suché půdy. Převod úmrtnostních dat vyjádřených v procentech byl na probity proveden dle tabulky uvedené v Příloze 1.

Při vyhodnocování testu po čtrnácti dnech byl pozorován vliv na hmotnost a velikost žížal, a to od koncentrace 55 mg/kg suché půdy. Přeživší žížaly ve vyšších koncentracích byly menší s úbytkem váhy cca 100 – 150 mg na jeden organismus. Žížaly se méně pohybovaly a často byly stočené do menších klubíček.

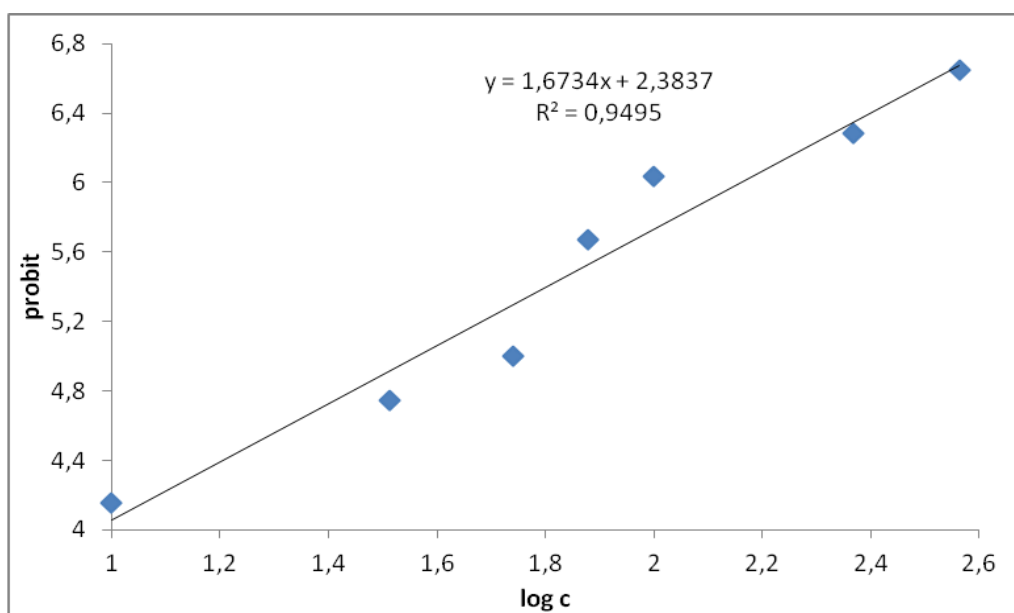
Po dvaceti osmi dnech pesticid vykazoval značné zvýšení mortality ve všech koncentracích, přičemž zejména v koncentraci 100 a 233 mg/kg suché půdy bylo zvýšení velmi značné. Vliv na hmotnost a velikost žížal byl zaznamenán již od koncentrace 32,5 mg/kg suché půdy, jedinci obvykle vážili cca 150 – 200 mg. V kontrole obvykle jedinci vážili v rozmezí 290 – 340 mg.

Tab. 24: Výsledky testů s Perfekthionem.

koncentrace [mg/kg]	log koncentrace	mortalita 14 dní [%]	probit	mortalita 28 dní [%]	probit
10	1,000000	10	3,718	20	4,158
32,5	1,511883	25	4,326	40	4,747
55	1,740363	35	4,615	50	5,000
75,5	1,877947	40	4,747	75	5,674
100	2,000000	55	5,126	85	6,036
233	2,367356	70	5,524	90	6,282
366	2,563481	80	5,842	95	6,645



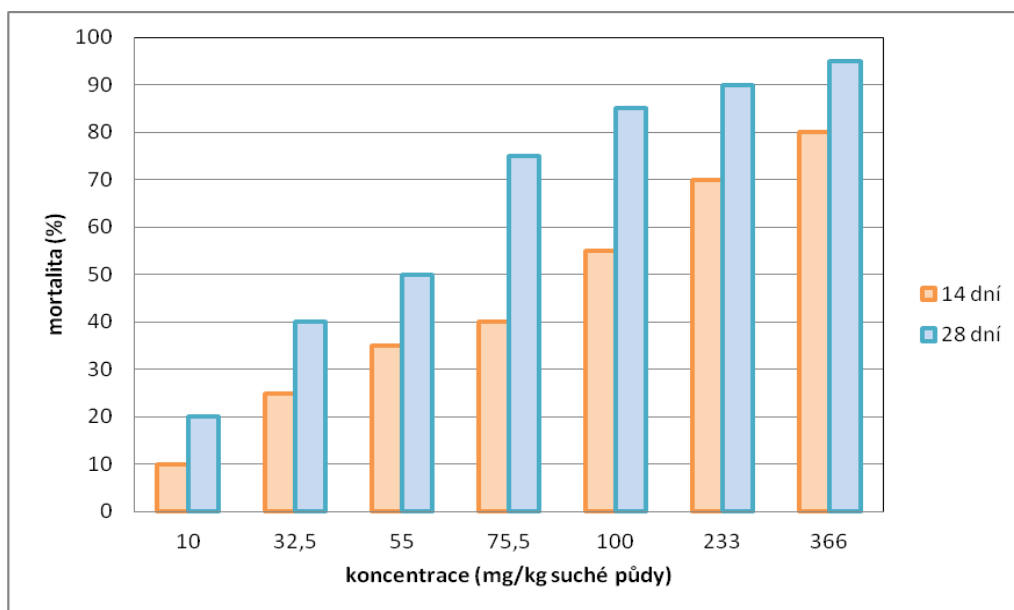
Graf 4: Graf závislosti probitových hodnot na log c pro 14denní test Perfekthionu.



Graf 5: Graf závislosti probitových hodnot na log c pro 28denní test Perfekthionu.

4 DISKUZE VÝSLEDKŮ

Výsledkem testu ekotoxicity Perfekthionu jsou letální koncentrace LC50 po 14 dnech a 28 dnech testu 95,62 mg/kg suché půdy a 36,6 mg/kg suché půdy. Je zde tedy značné zvýšení ekotoxicity v závislosti na době expozice testovacího organismu. Následuje graf (Graf 6), jenž znázorňuje závislost mortality organismů v procentech přímo na koncentraci testovaného pesticidu, pro porovnání úmrtnosti v závislosti na čase po 14 a 28 dnech expozice. Z grafu je zřejmý nárůst mortality jedinců v čase.



Graf 6: Graf závislosti mortality na koncentraci po 14denní a 28denní expozici.

Perfekthion je systémový insekticidní prostředek obsahující cca 400 g/l účinné látky dimethoátu, dále obsahuje cyklohexanon, solventní naftu a acetanhydrid, viz. jeho bezpečnostní list uvedený v Příloze 5.

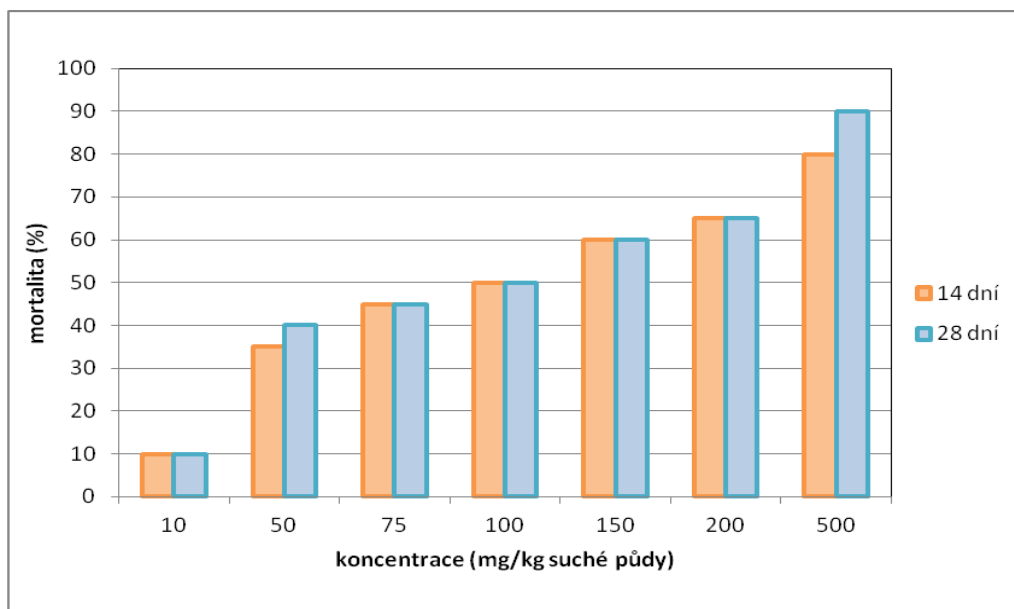
V literární rešerši v kapitole 2.7 Účinné látky vybrané pro test na *Eisenia foetida* jsou uvedeny letální koncentrace vztahující se k dimethoátu. Hodnota LC50 po 14 dnech testu dle metodiky OECD 207 je 31 mg/kg suché půdy.

V pesticidním přípravku je 400 g/l účinné látky, hodnota LC50 31 mg/kg suché půdy by měla být teoreticky navýšena na 72 mg/kg suché půdy. Jelikož jsou v přípravku obsaženy i další látky, přičemž pouze některé z nich jsou uvedeny v bezpečnostním listu přípravku např. cyklohexanon a acetanhydrid, tím pádem je možná na základě interakcí těchto látek menší ekotoxicita konečného přípravku než samotné účinné látky.

Směsná toxicita látek se může od individuální toxicity diametrálně lišit. Může dojít k vzájemným interakcím, které mají vliv na celkovou toxicitu směsi látek. Mezi základní způsoby interakce chemických látek patří aditivnost (prosté sčítání intenzity účinků dvou látek), synergistický efekt (souhlasné působení dvou látek), potenciace (mnohonásobné zesílení efektu) a antagonismus (protichůdné působení dvou látek). Dvě a více látek tak může mít společný toxikologický účinek zvýšený, zesílený, znásobený nebo zeslabený.

Je tedy velice důležité netestovat pouze samotné účinné látky, ale i používané přípravky, v nichž jsou tyto látky obsaženy, a to nejen v oblasti pesticidů.

U pesticidního přípravku Topsin M 500 SC, byla zjištěna letální koncentrace LC50 po 14 dnech a 28 dnech testu 99,95 mg/kg suché půdy a 86,77 mg/kg suché půdy. Což ukazuje na nepatrné zvýšení ekotoxicity přípravku v závislosti na čase. Následuje graf (Graf 7), jenž znázorňuje závislost mortality organismů v procentech přímo na koncentraci testovaného pesticidu, pro porovnání úmrtnosti v závislosti na čase po 14 a 28 dnech expozice. Z grafu je zřejmý velice nepatrný nárůst mortality jedinců v čase a to pouze ve dvou koncentracích (50 a 500 mg/kg suché půdy).



Graf 7: Graf závislosti mortality na koncentraci po 14denní a 28denní expozici.

Kontaktních testů účinné látky Topsinu M 500 SC thiofanát-methylu s testovacím organismem *Eisenia foetida* odpovídající metodice OECD 207 bylo provedeno jen velmi omezené množství. V literární rešerši v kapitole 2.7 Účinné látky vybrané pro test na *Eisenia foetida* je uvedena hodnota LC50 pro 14 denní test více jak 13,2 mg/kg suché půdy a další hodnota LC50 20,1 mg/kg suché půdy.

V pesticidním přípravku je 500 g/l účinné látky, hodnota LC50 po čtrnácti dnech testu by se tedy měla teoreticky pohybovat okolo hodnot 26,4 až 40,2 mg/kg suché půdy. V pesticidním přípravku jsou kromě účinné látky obsaženy např. tenzidy, avšak přesné složení pesticidu nebylo možné dohledat a není uvedeno ani v jeho bezpečnostním listu (Příloha 4). Na základě již zmiňovaných interakcí chemických látek je však možná menší ekotoxicita konečného přípravku než samotné účinné látky.

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit ekotoxikologický vliv vybraných pesticidních prostředků na organismus *Eisenia foetida*. K testování byly použity žížaly dodané ze standardních chovů. Nejprve byl uskutečněn test akutní toxicity na žížalách OECD 207 se standardní látkou 2-chloracetamidem. Jelikož tento test bylo možno považovat za platný, protože jeho výsledky odpovídaly předepsanému rozmezí hodnot LC50, uskutečnily se dále testy s dvěma vybranými pesticidními přípravky Topsinem M 500 SC a Perfekthionem. V testech byla data odečítána po 14 dnech, a abychom mohli porovnat i vliv doby expozice, tak následovalo odečítání po 28 dnech testu.

Výsledky testů byly zpracovány a uvedeny v předcházejících kapitolách. Významným výsledkem bylo porovnání vlivu doby expozice a vlivu testovaných pesticidů na hmotnost, vzhled a chování žížal. Kde u Perfekthionu, ačkoliv jeho hodnota LC50 po 14 dnech expozice (95,62 mg/kg suché půdy) se příliš neliší od hodnoty Topsinu M 500 SC (99,95 mg/kg suché půdy), byl pozorován znatelný vliv na hmotnost a chování žížal. Žížaly měly větší úbytky na váze a velice málo se pohybovaly, byly spíše stočeny do klubíček a obalené zrníčkami písku. Zatímco u žížal v testech s Topsinem M 500 SC nebyl pozorován větší vliv na hmotnost a velikost žížal.

Po 28 dnech expozice se již hodnoty LC50 značně lišily, u Perfekthionu se toxicita výrazněji zvýšila na hodnotu 36,6 mg/kg suché půdy a u Topsinu M 500 SC byla vypočtena hodnota LC50 86,77 mg/kg suché půdy. Přičemž přeživší jedinci v testu s Perfekthionem byli velice malí a nepohybliví. U Topsinu M 500 SC nebyl pozorován skoro žádný vliv na pohyblivost a váhu žížal téměř v celé koncentrační řadě, výjimku tvořila pouze nejvyšší testovaná koncentrace 500 mg/kg suché půdy.

Jak tedy vyplývá ze zjištěných údajů, je důležité věnovat se i jiným end-piontům než pouze mortalitě jedinců, důležité informace o vlivu pesticidů na organismus *Eisenia foetida* nám mohou ukázat i např. behaviorální změny, hmotnost jedinců, malformace (tuhnutí části těla, otoky apod.) a pozorovatelné fyziologické změny. Důležitá je i doba expozice, provádění pouze akutních testů toxicity není dostatečné, cennější informace o působení testované látky na organismy získáme z chronické expozice. Což nám ukázaly i výsledky tohoto testování.

Další důležitou součástí diplomové práce bylo založení chovu žížal a odchov nové synchronizované generace vhodné pro další testy. Chovu, který byl založen 23. března 2012, se velice daří, a při bližším ohledání bylo nalezeno velké množství kokonů, jenž signalizují vitální stav dospělých jedinců a přizpůsobení se novému prostředí.

Snahou této diplomové práce bylo poukázat na možnost využívání kontaktních testů, které mají své nezastupitelné místo v hodnocení ekotoxicity, především pak v půdní ekotoxikologii. Dále snaha poukázat na necelistvost toxikologických informací vztahujících se k pesticidním přípravkům a jejich účinným látkám, kde je velice těžké dohledat odpovídající toxikologická data.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. HOFMAN, J., VÁCHA, R., KULOVANÁ, M.: Ekotoxikologické hodnocení vytěžených sedimentů a tuhých odpadů. In *Odpadové fórum 2009 - sborník přednášek*. [s.l.] : [s.n.], 2009. s. 8.

2. HAJŠLOVÁ, J., KOCOUREK, V.: *Osud prostředků pro ochranu rostlin v potravním řetězci člověka* [online]. 2003 [cit. 2011-08-11]. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Dostupné z WWW:

< <http://www.phytopsanitary.org/?link=cs/projekty/2003/>>.

3. PENÍŽEK, V.: *Obecný úvod do pedologie, Vývoj a vznik půdy (Fyto I)* [online]. [cit. 2011-10-25]. Katedra pedologie a ochrany půd ČZU Praha, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů. Dostupné z WWW:

< http://af.czu.cz/~penizek/FytoI/FYTO_I_1prednaska.pdf>.

4. ČABALA, R.: *Ekotoxikologie* [online]. 2009 [cit. 2010-04-09]. Universita Karlova v Praze, Přírodovědná fakulta. Dostupné z WWW:

<<https://portal.natur.cuni.cz/Members/cabala/ke-stazeni/ekotoxikologie/soubor-prednasek-z-ekotoxikologie-zs2009/prednaska-1>>.

5. KOČÍ, V.: Postavení testů toxicity v monitoringu životního prostředí. In KOČÍ, V., HALOUSKOVÁ, O. *Ekotoxikologické biotesty 1*, 18. - 19. října 2002. Seč : [s.n.], 2002. s. 5.

6. Zákon č. 350/2011 o chemických látkách a chemických směsích a o změně některých zákonů (chemický zákon), který novelizuje zákon č. 326/2004 Sb. Zákon o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů.

7. Vyhláška č. 32/2012 Sb., o přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin, která ruší vyhlášku č. 146/2009 Sb., kterou se mění vyhláška č. 329/2004 Sb., o přípravcích a dalších prostředcích na ochranu rostlin, ve znění vyhlášky č. 371/2006 Sb.

8. HILSCHNEROVÁ, K.: *Legislativní rámec ekotoxikologických biotestů*. [online]. 2009 [cit. 2010-04-09]. Informační systém Masarykovy univerzity. Dostupné z WWW: <<http://is.muni.cz/el/1431/jaro2009/Bi5620/um/7865700/Legislativa2009.pdf?fakulta=1431;obdobi=4445;kod=Bi5620;lang=en>>.

9. MARŠÁLEK, B.: *Alternativní testy toxicity* [online]. 2009 [cit. 2010-04-09]. Informační systém Masarykovy univerzity. Dostupné z WWW:

<http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_dalsi_mater/mikrobiotesty.pdf>.

10. MARŠÁLEK, B.: *Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití*. [online]. 2009 [cit. 2010-04-09]. Informační systém Masarykovy univerzity. Dostupné z WWW:

<http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/marsalek/EB_prezentace/Rozdeleni_EB.pdf>.

11. ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J.: *Encyklopedie hydrobiologie* [online]. 0. [s.l.] : VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2010-03-16]. Dostupné z WWW:
<http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/>.

12. MARŠÁLEK, B.: Ekotoxikologické biotesty: rozdělení, přehled, použití.. In KOČÍ, Vladimír, HALOUSKOVÁ, Olga. *Ekotoxikologické biotesty 1, 18 - 19.října 2002*. Seč : [s.n.], 2002. s. 16.

13. HOFFMAN, D. J., RATTNER B. A., BURTON G. ALLEN, Jr., CAIRNS J., Jr.: *Handbook of ecotoxicology*, CRC Press, 1995, 755 stran, ISBN 0-87371-585-3.

14. SVOBODOVÁ, Z., MÁCHOVÁ, J., BEKLOVÁ, M., CUPÁKOVÁ, Š., MINSK, J.: *Ekotoxikologie praktická cvičení část I*. Veterinární a Farmaceutická univerzita, Brno 2000. 64 s.

15. HOFMAN, J.: *Půdní biotesty* [online]. 2009 [cit. 2010-04-09]. Informační systém Masarykovy univerzity. Dostupné z WWW:
<http://is.muni.cz/el/1431/jaro2009/Bi5620/um/7676529/Pudni_biotesty.pdf?fakulta=1431;obdobi=4445;kod=Bi5620;lang=en>.

16. Vyhláška č. 376/2001 Sb. ve znění vyhlášky č. 502/2004 Sb. je Vyhláška o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů.

17. KOČÍ, V., RAKOVICKÝ, T., ŠVAGR, A. (2001): Testy akutní a semichronické toxicity. VŠCHT Praha, interní text Laboratoře ekotoxikologie a LCA.

18. KOČÍ, V., KULOVANÁ, M., VOSÁHLOVÁ, S.: Srovnání citlivosti akvatických a terestrických testů toxicity při testování ekotoxicity odpadů a kontaminovaných zemín. In *Odpadové fórum 2008 - sborník přednášek*. [s.l.] : [s.n.], 2008. s. 9.

19. LEITGIB, L., KÁLMÁN, J., GRUIZ, K.: Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere* [online]. January 2007, 66, 3, [cit. 2010-04-29]. s. 428-434 . Dostupný z WWW:
<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V74-4KGG5SK-B&_user=10&_coverDate=01%2F31%2F2007&_alid=1334369692&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=5832&_sort=r&_docanchor=&view=c&_ct=541&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=6f880a67f0cf1766c40f37be10d66f5a>.

20. DOMENE, X., ALCAÑIZ, J. M.; ANDRÉS, P.: Comparison of solid-phase and eluate assays to gauge the ecotoxicological risk of organic wastes on soil organisms. *Environmental Pollution* [online]. February 2008, 151, 3, [cit. 2010-04-29]. s. 549-558. Dostupný z WWW:
<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VB5-4NVC92M-1&_user=10&_coverDate=02%2F29%2F2008&_alid=1316177175&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=5917&_docanchor=&view=c&_ct=5&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=e2aed2fb5e7c31dbeb605869d7fe66ac>.

21. PROKOP, Z., CUPR, P., et al. Mobility, bioavailability, and toxic effects of cadmium in soil samples. *Environmental Research* [online]. February 2003, 91, 2, [cit. 2010-04-29]. s. 119-126 . Dostupný z WWW:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WDS-47RJH3V-2&_user=10&_coverDate=02%2F28%2F2003&_alid=1316194289&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=6774&_sort=r&_docanchor=&view=c&_ct=1681&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=6eb8e1e2879a72a359520e4515116234>.

22. HOFMAN, J.: Půdní ekotoxikologie. In KOČÍ, V., MARŠÁLEK, B., HALOUSKOVÁ, O. *Ekotoxikologické biotesty 3, 22 - 23.října 2003*. Brno : [s.n.], 2003. s. 27.

23. SCHUURMANN, G.; MARKERT, B.: *Ecotoxicology : Ecological Fundamentals, Chemical Exposure and Biological Effects*. New York : John Wiley and Sons, Inc., 1998. 900 s.

24. ŠKARKOVÁ, P.: Význam kontaktních testů ekotoxicity. Brno, 2010. 40 s. Bakalářská práce na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně, ústav Chemie a chemické technologie ochrany životního prostředí. Dostupný z WWW:

<http://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=27120>.

25. SEDLÁK, E.: *Zoologie bezobratlých*. 2. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 337 s.

26. ROZSYPAL, S., et al.: *Nový přehled biologie*. 1. vydání. Praha : Scientia, s.r.o., pedagogické nakladatelství, 2003. 797 s.

27. COLLICUT, D.: *Biology of The Night Crawler* [online]. 2000 [cit. 2011-07-11]. Dostupné z WWW:

<<http://naturenorth.com/fall/ncrawler/ncrawler2.html>>.

28. EDWARDS, C. A.; BOHLEN, P. J.: *Biology and ecology of earthworms* [online]. Londýn : Chapman and Hall, 1996 [cit. 2011-11-08]. Dostupné z WWW:

<http://www.google.com/books?hl=cs&lr=&id=ad4rDwD_GhsC&oi=fnd&pg=PR9&dq=b+iology+of+earthworms&ots=39cZwFYzX&sig=CjTdm1Untdyl6adVSDpZ5XzY13g#v=one+page&q&f=false>.

29. CONRAD, J.: *The Backyard Nature Website* [online]. 2010 [cit. 2011-11-08]. Earthworms. Dostupné z WWW:

<<http://www.backyardnature.net/earthworm.htm>>.

30. RATNASHRI, D.: *Buzzle.com : Intelligent Life on the Web* [online]. 2010 [cit. 2011-11-08]. Earthworm Reproduction. Dostupné z WWW:

<<http://www.buzzle.com/articles/earthworm-reproduction.html>>.

31. POMMERESCHE, R.; HANSEN, S.; LØES, A.: *Žížaly a jejich význam pro zlepšování kvality půdy* [online]. Olomouc : Bioinstitut, 2010 [cit. 2011-11-08]. Dostupné z WWW: <http://www.bioinstitut.cz/publikace/documents/Meitemark_cz_web.pdf>.
32. BAXAMUSA, B.: *Buzzle.com : Intelligent Life on the Web* [online]. 2010 [cit. 2011-1-08]. *Eisenia foetida*. Dostupné z WWW: <<http://www.buzzle.com/articles/eisenia-fetida.html>>.
33. Vyhláška č. 389/2005 Sb., kterou se mění vyhláška č. 222/2004 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně-chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí.
34. ISO 11268-1:1993. Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia foetida*): Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW: <http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=19246>.
35. ISO 11268-2:1998. Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia foetida*): Determination of effects on reproduction , [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW: <http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=20993>.
36. ISO 11268-3:1999. Effects of pollutants on earthworms: Guidance on the determination of effects in field situations, [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný na WWW: <http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=22764&commid=54328>.
37. OECD TG 207. Earthworm, Acute Toxicity Test, [online]. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2006, 21 stran, Dostupný na WWW: <<http://www.oecd.org/dataoecd/18/1/1948293.pdf> >.
38. OECD TG 222. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia foetida*, *Eisenia andrei*), [online]. OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2004, 18 stran, Dostupný na WWW: <<http://oberon.sourceoecd.org/vl=2438611/cl=20/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n2/s23/p1>>.
39. US EPA 850.6200. Earthworm subchronic toxicity test, [online]. US EPA Ecological Effects Test Guidelines, 1996, 13 stran, Dostupný na WWW: <http://www.epa.gov/ocsp2/pubs/frs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-6200.pdf>.

40. ISO 17512-1:2006 Soil quality: Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour: Test with earthworms (*Eisenia foetida* and *Eisenia andrei*), [online]. ISO International Standards for Business, Government and Society, Dostupný z WWW:

<http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=38402>.

41. HOFMAN J., VAŠÍČKOVÁ J.: *Laboratorní praktikum z půdní ekotoxikologie* [online]. 2010 [cit. 2011-07-11]. Centrum pro toxické látky v životním prostředí. Masarykova Univerzita.

42. ELLIS, R. S., HODSON, M. E., WEGE, P.: The influence of different artificial soil types on the acute toxicity of carbendazim to the earthworm *Eisenia foetida* in laboratory toxicity tests. *European Journal of Soil Biology* [online]. November 2007, 43, 1, [cit. 2010-04-29]. s. 239-245 . Dostupný z WWW:

<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6VR7-4PRHJ8B-B&_user=10&_coverDate=11%2F30%2F2007&_alid=1259018591&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=6227&_sort=r&_st=4&_docanchor=&_ct=1336&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=7037ae2a625a1c9b82b5ed3caf36daef>.

43. ZANG, Y., et al.: Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia foetida*. *Environmental Pollution* [online]. 2000, 108, [cit. 2011-11-09]. Dostupný z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749199001918>>.

44. REDDY, N. Ch.; VENKATESWARA R., J.: Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2008, 71, [cit. 2011-11-09]. Dostupný z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651308000079>>.

45. VENKATESWARA RAO, J., et al.: Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm, *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2003, 54, [cit. 2011-11-08]. Dostupný z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651302000131>>.

46. KLEIN, W.: Physiological basis in the assessment of ecotoxicity of pesticides to soil organisms. *Chemosphere* [online]. 1997, 35, [cit. 2011-11-08]. Dostupný z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653597001586>>.

47. HELLING, B.; REINECKE, S.A.; REINECKE, A.J.: Effects of the Fungicide Copper Oxychloride on the Growth and Reproduction of *Eisenia foetida* (Oligochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2000, 46, [cit. 2011-11-08]. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651399918808>>.

48. YEARDLEY, Roger B., et al.: The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environmental Toxicology and Chemistry* [online]. 1996, 15, [cit. 2011-11-08]. Dostupný z WWW:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620150915/abstract>>.

49. SLIMAK, K. M.: Avoidance response as a sublethal effect of pesticides on *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 1997, 29, [cit. 2011-11-08]. Dostupný z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071796000272>>.

50. GARCIA, M., et al.: Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environmental Pollution* [online]. 2008, 153, [cit. 2011-11-08]. Dostupný z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749107004113>>.

51. SCHAEFER, M.: Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology, Evaluation of different test systems in soil toxicity assessment. *JOURNAL OF SOILS AND SEDIMENTS* [online]. 2003, 3, [cit. 2011-11-08]. Dostupný z WWW:

<<http://www.springerlink.com/content/27287u677hv23634/>>.

52. LOUREIRO, Susana, et al.: Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental Pollution* [online]. 2005, 138, [cit. 2011-11-08]. Dostupný z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749105001673>>.

53. KAZDA, J.: *Chemická ochrana rostlin* [online]. [cit. 2010-04-09]. Česká zemědělská univerzita v Praze. Dostupné z WWW:

<http://etext.czu.cz/php/skripta/skriptum.php?titul_key=56>.

54. MATTHEWS, G. A.: *Pesticides: health, safety and the environment* [online]. USA : John Wiley & Sons, 2006 [cit. 2011-11-08]. Dostupné z WWW:

<http://books.google.com/books?id=zDa0QzAAPnkC&printsec=frontcover&hl=cs&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false>.

55. PLACHÝ J.: Bezpečnost používání biocidů v ČR rozsah implementace Direct a Biocidní direktivy v ČR. [online]. 2008 [cit. 2011-08-11]. Výzkumný ústav rostlinné výroby. Dostupné z WWW:

< www.phytopsanitary.org/projekty/2008/Projekt5.pdf >.

56. POUZAR M.: Ekotoxické účinky pesticidů I. Organofosfáty a karbamáty. [online]. 2010 [cit. 2011-08-11]. Ústav environmentálního a chemického inženýrství. Universita Pardubice. Dostupné z WWW:

< http://mpouzar.net/prednasky_ecotox.htm>.

57. POUZAR M.: Ekotoxické účinky pesticidů II. Halogenované uhlovodíky [online]. 2010 [cit. 2011-08-11]. Ústav environmentálního a chemického inženýrství. Universita Pardubice. Dostupné z WWW:

< http://mpouzar.net/prednasky_ecotox.htm>.

58. VÁVROVÁ, M.: Pesticidy 21.3.2011. Přednáška k předmětu CHTOŽP II. Ústav chemie a technologie životního prostředí FCH VUT Brno.

59. TOXNET - Databases on toxicology, hazardous chemicals, environmental health, and toxic releases.: Hazardous Substances Data Bank [online]. 10.11.2011 [cit. 2012-04-13]. Dostupné z WWW:

<<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~umgFDq:1>>.

60. UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE. *AERU: AGRICULTURE & ENVIRONMENT RESEARCH UNIT): Pesticide Properties DataBase (PPDB)* [online]. 21.12.2011 [cit. 2012-04-13]. Dostupné z WWW:

<<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/244.htm>>.

61. FAO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR AGRICULTURAL PESTICIDES. *DIMETHOATE*: [on-line]. Srpen 2005, 27 s. [cit. 13.4.2012]. Dostupné z WWW:

<<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/docs/Pdf/new/dimethoa.pdf>>.

62. CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT. Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Dimethoate. In: [online]. 1999 [cit. 2012-04-13]. Dostupné z WWW:

<<http://ceqg-rcqe.ccme.ca/>>.

63. TOXNET - Databases on toxicology, hazardous chemicals, environmental health, and toxic releases.: Hazardous Substances Data Bank [online]. 10.11.2011 [cit. 2012-04-13]. Dostupné z WWW:

<<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~RBxXkQ:1>>.

64. CAPALDO, A., et al: The newt *Triturus carnifex* as a model for monitoring the ecotoxic impact of the fungicide thiophanate methyl: adverse effects on the adrenal gland. *Comparative Biochemistry and Physiology: Part C: Toxicology & Pharmacology* [online]. roč. 143, č. 1, 86–93 [cit. 2012-04-13]. Dostupné z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045605002632>>.

65. UNIVERSITY OF HERTFORDSHIRE. *AERU: AGRICULTURE & ENVIRONMENT RESEARCH UNIT): Pesticide Properties DataBase (PPDB)* [online]. 21.12.2011 [cit. 2012-04-13]. Dostupné z WWW:

<<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/640.htm>>.

66. MA, J; ZHENG, R.; XU, L.; WANG, S.: Differential Sensitivity of Two Green Algae, *Scenedes musobliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*, to 12 Pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. Květen 2002, roč. 52, č. 1, 57–61 [cit. 2012-04-13]. Dostupné z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651302921469>>.

67. TOXNET - Databases on toxicology, hazardous chemicals, environmental health, and toxic releases.: Hazardous Substances Data Bank [online]. 10.11.2011 [cit. 2012-04-13]. Dostupné z WWW:

<<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~2YqmGK:1>>.

68. MOSER, H., RÖMBKE, J.: *Ecotoxicological Characterization of Waste: Results and Experiences of an International Ring Test* [online]. New York: Springer, 1.5.2009, s. 73 [cit. 2012-04-13]. ISBN 987-0-387-88959-7.

69. Registr přípravků na ochranu rostlin. STÁTNÍ ROSTLINOLÉKAŘSKÁ SPRÁVA. EAGRI [online]. 2012-04-13 [cit. 2012-04-13]. Dostupné z WWW:

<<http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Detail.aspx?id=22525>>.

70. Bezpečnostní list. *TOPSIN M 500SC*®. Sumi Agro Czech, [online]. 06.08.2008. cit. [2012-04-13]. Dostupné z WWW:

<http://www.agromanual.cz/download/pdf_bezpecnost/bl_topsin_m_%20500.pdf>.

71. Registr přípravků na ochranu rostlin. STÁTNÍ ROSTLINOLÉKAŘSKÁ SPRÁVA. EAGRI [online]. 2012-04-13 [cit. 2012-04-13]. Dostupné z WWW:

<<http://eagri.cz/public/app/eagriapp/POR/Detail.aspx?id=23661&stamp=1334318890526>>

72. Bezpečnostní list. *PERFEKTHION*. BASF The chemical company, [online]. 17.03.2010. . cit. [2012-04-13]. Dostupné z WWW:

<http://www.agromanual.cz/download/pdf_bezpecnost/bl_perfekthion.pdf>.

73. NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008 ze dne 30. května 2008, kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek. Část C.

74. SILVA, P. M. C. S.; AMARASINGHE, N. J. S.: Assessment of dimethoate toxicity on compost worm (*Eisenia andrei*) using earthworm avoidance test. *Tropical Agricultural Research* [online]. 2009, roč. 20, s. 25-33 [cit. 2012-04-26]. ISSN 1016-1422. Dostupné z WWW:

<<http://www.cabdirect.org/abstracts/20103173630.html;jsessionid=2E9ECE12031036BBAFAD0F0A968F4B5A>>.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BCF	Biokoncentrační faktor
CAS	Chemical Abstracts Service
DDD	dichlordifenyldichlorethan
DDE	dichlordifenyldichlorethen
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
EC50	Efektivní koncentrace, která má efekt na 50 % jedinců v testu
ERA	Ecological Risk Assessment (Posouzení ekologických rizik)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organizace pro výživu a zemědělství)
GAP	Good Agricultural Practices (Správné zemědělské postupy)
HCH	1,2,3,4,5,6-hexachlorocyklohexan
HSDB	Hazardous Substances Data Bank (Databanka nebezpečných látek)
IC50	Inhibiční koncentrace, která má efekt na 50 % jedinců v testu
ISO	International Organisation for Standardization (Mezinárodní organizace pro standardizaci)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Mezinárodní unie pro čistou a aplikovanou chemii)
LC50	Letální koncentrace, která má efekt na 50 % jedinců v testu
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration (Nejnižší pozorovaná účinná koncentrace)
MŽP	Ministerstvo životního prostředí
NOEC	No Observed Effect Concentration (Koncentrace bez pozorovaného účinku)
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj)
OSN	United Nations Organization (Organizace spojených národů)
PAU	Polyaromatické uhlovodíky
PCB	Polychlorované bifenyly
PPF	profenofos
PPDB	Pesticide Properties DataBase (Databáze vlastností pesticidů)
RECETOX	Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí (Research Centre for Environmental Chemistry and Ecotoxicology)
SRS	Státní rostlinolékařská správa
TAS	Tropická umělá půda
TNS	Tropická přírodní půda
TOC	Celkový organický uhlík
US EPA	United States Environmental Protection Agency (Agentura Spojených států amerických pro ochranu životního prostředí)
VFU	Veterinární a farmaceutická univerzita

WHC Water holding capacity
(Vodní kapacita půdy)

8 SEZNAM PŘÍLOH

- PŘÍLOHA 1 Převedení úmrtnostních dat v procentech na probity.
- PŘÍLOHA 2 Tabulka s vybranými ekotoxikologickými testy s dimethoátem.
- PŘÍLOHA 3 Tabulka s vybranými ekotoxikologickými testy s thiofanát-methylem.
- PŘÍLOHA 4 Bezpečnostní list Topsinu M 500 SC
- PŘÍLOHA 5 Bezpečnostní list Perfekthionu

9 PŘÍLOHY

PŘÍLOHA 1

%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit
0,2	2,122	10,0	3,718	30,0	4,476	50,0	5,000	70,0	5,524	90,0	6,282
0,4	2,348	11,0	3,773	31,0	4,504	51,0	5,025	71,0	5,553	91,0	6,341
0,6	2,488	12,0	3,825	32,0	4,532	52,0	5,050	72,0	5,583	92,0	6,405
0,8	2,591	13,0	3,874	33,0	4,560	53,0	5,075	73,0	5,613	93,0	6,476
1,0	2,574	14,0	3,920	34,0	4,588	54,0	5,100	74,0	5,643	94,0	6,555
1,2	2,743	15,0	3,964	35,0	4,615	55,0	5,126	75,0	5,674	95,0	6,645
1,4	2,803	16,0	4,006	36,0	4,642	56,0	5,151	76,0	5,706	95,5	6,695
1,6	2,856	17,0	4,046	37,0	4,668	57,0	5,176	77,0	5,739	96,0	6,751
1,8	2,903	18,0	4,085	38,0	4,695	58,0	5,202	78,0	5,772	96,5	6,812
2,0	2,946	19,0	4,122	39,0	4,722	59,0	5,228	79,0	5,806	97,0	6,881
2,5	3,040	20,0	4,158	40,0	4,747	60,0	5,253	80,0	5,842	97,5	6,966
3,0	3,123	21,0	4,194	41,0	4,772	61,0	5,278	81,0	5,878	98,0	7,054
3,5	3,188	22,0	4,228	42,0	4,798	62,0	5,305	82,0	5,915	98,2	7,096
4,0	3,249	23,0	4,261	43,0	4,824	63,0	5,332	83,0	5,954	98,4	7,144
4,5	3,305	24,0	4,294	44,0	4,849	64,0	5,358	84,0	5,994	98,6	7,197
5,0	3,355	25,0	4,326	45,0	4,874	65,0	5,385	85,0	6,036	98,8	7,257
6,0	3,445	26,0	4,357	46,0	4,900	66,0	5,412	86,0	6,080	99,0	7,326
7,0	3,524	27,0	4,387	47,0	4,925	67,0	5,440	87,0	6,126	99,2	7,409
8,0	3,595	28,0	4,417	48,0	4,950	68,0	5,468	88,0	6,175	99,4	7,512
9,0	3,659	29,0	4,447	49,0	4,975	69,0	5,496	89,0	6,227	99,6	7,652
										99,8	7,878

PŘÍLOHA 2

Druh organismu	Druh organismu	Test	Čas expozice a podmínky	Výsledky
<i>Cyprinus carpio</i>	Kapr obecný	neuveďeno	96 hodin	LC50 = 694 mg/l
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Pstruh duhový	neuveďeno	96 hodin	LC50 = 30,2 mg/l
<i>Lepomis macrochirus</i>	Slunečnice obecná	akutní	96 hodin	LC = 6,0 mg/l
<i>Daphnia magna</i>	Hrotnatka velká	neuveďeno	24 hodin čistota 95 %	EC50 = 4,7 mg/l
<i>Daphnia magna</i>	Hrotnatka velká	neuveďeno	21 dní, čistota 99 %	EC50 = 0,04 - 0,1 mg/l
<i>Phasianus colchicus</i>	Bažant obecný	akutní, orální	neuveďeno	LD50 = 20 mg/kg
<i>Anas platyrhynchos (m)</i>	Kachna divoká (m)	akutní, orální	neuveďeno	LD50 = 41,7 mg/kg
<i>Anas platyrhynchos (f)</i>	Kachna divoká (ž)	akutní, orální	neuveďeno	LD50 = 63,5 mg/kg
<i>Passer montanus</i>	Vrabc polní	akutní, orální	neuveďeno	LD50 = 22 mg/kg
<i>Agelaius phoeniceus</i>	Vlhovec červenokřídý	akutní, orální	neuveďeno	LD50 = 6,6 - 17,8 mg/kg
<i>Sturnus vulgaris</i>	Špaček obecný	akutní, orální	neuveďeno	LD50 = 31,6 mg/kg
<i>Turdus merula</i>	Kos černý	akutní, orální	neuveďeno	LD50 = 26 mg/kg
<i>Apis mellifera</i>	Včela medonosná	kontaktní	neuveďeno	LD50 = 0,12 µg/včela
<i>Apis mellifera</i>	Včela medonosná	orální	neuveďeno	LD50 = 0,15 µg/včela
<i>Rana cyanophlyctis (m)</i>	Druh skokana (m)	statické	96 hodin	LC50 = 39,0 mg/l
<i>Rana cyanophlyctis (f)</i>	Druh skokana (ž)	statické	96 hodin	LC50 = 36 mg/l
<i>Xenopus laevis</i>	Drápatka vodní	chronické	100 dní	NOLC = 1mg/l NOEC = 32 mg/l

PŘÍLOHA 3

Druh organismu	Druh organismu	Test	Čas expozice a podmínky	Výsledky
<i>Cyprinus carpio</i>	Kapr obecný	neueden	48 hodin	LC50 = 11 mg/l
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Pstruh duhový	neueden	48 hodin	LC50 = 7,8 mg/l
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Druh řasy	akutní	96 hodin	EC50 = 137,8 mg/l
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Druh řasy	akutní	96 hodin	EC50 = 5,7 mg/l
<i>Triturus carnifex</i>	Čolek dravý	akutní	48 hodin	LD50 = 9,6 µg/l
<i>Daphnia magna</i>	Hrotnatka velká	neueden	48 hodin	LC50 = 20,2 mg/l
<i>Apis mellifera</i>	Včela medonosná	neueden	neuedeno	LD50 = 10 µg/včela
<i>Coturnix japonica</i>	Křepelka japonská	neueden	neuedeno	LD50 > 5000 mg/kg
<i>Navicula pelliculosa</i>	Druh rozsivky	sladkovodní, statické	5 dní	EC50 = 930 µg / l
<i>Lepomis macrochirus</i>	Slunečnice obecná	sladkovodní, průtočné	96 hodin	LC50 = 41 mg/l

PŘÍLOHA 4



Datum vyhotovení: 06.08.2008

Datum revize: 17.01.2011

Bezpečnostní list

TOPSIN M 500SC®

strana: 1/7

1. Identifikace přípravku a společnosti/podniku	
1.1. Identifikace přípravku	TOPSIN M 500SC®
1.2. Použití přípravku	Fungicid
1.3. Identifikace společnosti nebo podniku Identifikace výrobce v ES Jméno nebo obchodní jméno Místo podnikání nebo sídlo: Telefon:/Fax/www Telefonní číslo pro naléhavé situace Email:	Nisso Chemical Europe GmbH. Berliner Allee 42 40212 Dusseldorf, Německo +49-211-1306686-0/+49-(0)211-328231 (001)3523233500 sds@nisso-chem.de
Identifikace zhotovitele/dovozce/následného uživatele v ČR (IČ) Místo podnikání nebo sídlo: Telefon/fax/www: telefonní číslo pro naléhavé situace E-mail:	Sumi Agro Czech s.r.o.(26512416) Na Strži 63, 140 62 Praha 4 261 090 281/261 090 280/www.sumiagro.cz 261 090 261 gyongyi.bezdekova@sumiagro.cz (ing. Gyöngyi Bezděková)
1.4. Nouzové telefonní číslo:	Telefon nepřetržitě: 224 919 293, 224 915 402 Toxikologické informační středisko, Na bojišti 1, 128 08 Praha 2

2. Identifikace nebezpečnosti	
2.1. Přípravek je klasifikovaný jako nebezpečný.	ANO
2.2. Údaje o nebezpečnosti a klasifikace/označování přípravku Přípravek je z hlediska ochrany zdraví a z hlediska ochrany životního prostředí klasifikován jako nebezpečný Klasifikace: Mut.kat.3;R68, Xn; R20, R22, senzibilizující; R43; R52; R53	
2.3. Nejzávažnější nepříznivé účinky na zdraví člověka Xn: Zdraví škodlivý, R68: Možné nebezpečí nevratných účinků, R20/22: Zdraví škodlivý při vdechování a při požití., R43: Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží.	
2.4. Nejzávažnější nepříznivé účinky na životní prostředí R52/53:Škodlivý pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí. Označování přípravku z hlediska rizik pro necílové organismy a životní prostředí podle vyhlášky č. 326/2004 Sb. a vyhlášky č. 329/2004 Sb. je uvedené v kap. 15.	
2.5. Nejzávažnější nepříznivé účinky z hlediska fyzikálně-chemických vlastností: Nejsou.	
2.6. Nesprávné použití a jiná nebezpečí Přípravek nesmí být použit jinak, než je uvedeno v návodu na použití. Chraňte před dětmi a nepoučenými osobami.	

3. Složení/Informace o složkách				
3.1. Chemická charakteristika přípravku: Přípravek je ve formě suspenzního koncentrátu (SC).				
3.2. Nebezpečné látky a látky, pro které je stanoven expoziční limit Společenství pro pracovní prostředí: Thiofanát methyl 500 g/l, Účinná látka je klasifikovaná jako nebezpečná ve smyslu směrnice 67/548/EHS (Příloha I), R-věty byly přiřazeny na základě přílohy III směrnice 1999/45/ES.				
Chemický název látky	Obsah (% hm.)	Číslo CAS	Číslo ES	klasifikace
Thiofanát-methyl (ISO), tj. dimethyl-44'-(1,2-fenylen)bis(3-thioallofanát), Název podle seznamu závazně klasifikovaných látek: 1,2-dí[3-(methoxykarbonyl) thioureido] benzen	50%	23564-05-8	245-740-7	Mut.kat. 3; R68, Xn; R20, R43, N; R50, R53
Plná znění R-vět jsou uvedena v položce 16.				

4. Pokyny pro první pomoc



Bezpečnostní list
TOPSIN M 500SC®

Datum vyhotovení: 06.08.2008

Datum revize: 17.01.2011

strana: 2/7

4.1. Okamžitá lékařská pomoc	
4.2. Všeobecné pokyny	Projeví-li se zdravotní potíže nebo v případě pochybností uvědomte lékaře a poskytněte mu informace z bezpečnostního listu, nebo etikety / štítku nebo příbalového letáku.
4.3. Při nadýchání	Přerušete expozici, opusťte zamořený prostor, zajistěte tělesný i duševní klid; nenechte prochladnout. Přetrvávají-li dýchací potíže, vyhledejte lékařskou pomoc/zajistěte lékařské ošetření.
4.4. Při styku s kůží	Odložte kontaminovaný oděv. Zasažené části pokožky umyjte pokud možno teplou vodou a mýdlem, pokožku dobře opláchněte. Při známkách silného podráždění vyhledejte lékařskou pomoc/zajistěte lékařské ošetření.
4.5. Při zasažení očí	Při otevřených víčkách vyplachujte – zejména prostory pod víčky - čistou pokud možno vlahou tekoucí vodou. Přetrvávají-li příznaky (zarudnutí, pálení) neprodleně vyhledejte lékařskou pomoc (zajistěte odborné lékařské ošetření).
4.6. Při požití	Ústa vypláchněte vodou (pouze za předpokladu, že postižený je při vědomí a nemá-li křeče); nevyvolávejte zvracení. Vyhledejte lékařskou pomoc a ukažte štítek / etiketu popř. obal přípravku nebo bezpečnostní list. Při vyhledání lékařského ošetření informujte lékaře o přípravku, se kterým postižený pracoval, a o poskytnuté první pomoci. V případě potřeby lze další postup při první pomoci (i event. následnou terapii) konzultovat s Toxikologickým informačním střediskem)

5. Opatření pro hašení požáru	
Přípravek není hořlavý.	
5.1. Vhodná hasiva	CO ₂ , prášek, pěna. Vodu použít jen ve formě jemného zamlžování a pouze v případech, kdy je dokonale zabezpečeno, aby kontaminovaná voda nemohla proniknout do veřejné kanalizace, zdrojů podzemních a povrchových vod a nemohla zasáhnout zemědělskou půdu.
5.2. Nevhodná hasiva	Nejsou známa.
5.3. Zvláštní nebezpečí způsobená expozicí látky samotnému přípravku, produktům hoření, nebo vznikajícím plynům	Odpadní plyny a produkty rozkladu mohou být toxické a uvolňovat dým obsahující: oxidy uhlíku, dusíku a oxid siřičitý.
5.4. Zvláštní ochranné prostředky pro hasiče	Použijte uzavřený průmyslový ochranný oděv, celoobličejovou masku a izolační dýchací přístroj podle velikosti požáru.

6. Opatření v případě náhodného úniku	
6.1. Preventivní opatření na ochranu osob	Použijte osobní ochranné pracovní prostředky, aby se minimalizovala osobní expozice během čištění. Zamezte styku s kůží a očima. Nevdechujte aerosoly. V uzavřených prostorech zajistěte dostatečné větrání. Osobní ochranné prostředky jsou uvedeny v položce 8. Zamezte vstupu nepovolaným osobám do zamořené oblasti. Zdržujte se na větrané straně mimo dosah toxických výparů
6.2. Preventivní opatření na ochranu životního prostředí	Zamezte kontaminaci životního prostředí, tj. úniku přípravku na nebezpečný terén, do kanalizace nebo vodních toků. V případě úniku do povrchových nebo podzemních vod postupujte v souladu s havarijním plánem.
6.3. Metody čištění a zneškodňování	Použijte osobní ochranné pracovní prostředky (ochranné rukavice, brýle a ochrannou masku). Evakuujte zasaženou oblast a uzavřete dopravu. Uniklý přípravek absorbujte dostatečným množstvím absorbentu (vapex, písek, zemina apod). Kontaminovaný absorbent umístěte ve vhodných uzavíracích nádobách a tyto uložte před likvidací na vhodném schváleném místě. Do uzavřených nádob umístěte také všechny použité čisticí pomůcky a kontaminované oděvy a předměty. Zabraňte tvorbě prachu, zasaženou oblast umyjte velkým množstvím vody. Zajistěte, aby odstraňování bylo v souladu s platnými zákony a předpisy.



Bezpečnostní list TOPSIN M 500SC®

Datum vyhotovení: 06.08.2008

Datum revize: 17.01.2011

strana: 3/7

7. Zacházení a skladování	
7.1. Zacházení	<p>Dodržujte obecné zásady hygieny při manipulaci s chemikáliemi. Vždy těsně uzavřete obaly. Řádně uzavřete i prázdné obaly. Manipulujte s přípravky jen v řádně odvětrávaných místnostech. Zamezte zasažení očí, kůže nebo oděvu, nadýchání se aerosolů. Při aplikaci použijte osobní ochranné pracovní prostředky k minimalizaci osobní expozice. Vyperte kontaminovaný oděv před opětovným použitím. Na pracovišti je zakázáno jíst, pít, kouřit a ukládat potraviny. Používejte za bezvětrí. Postupujte dle pokynů na etiketě a návodu k použití. Zamezte úniku přípravku do životního prostředí. Viz speciální pokyny nebo bezpečnostní listy. Přípravek je škodlivý pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí. Nevylévejte do kanalizace. Tento materiál a jeho obal musí být zneškodněny bezpečným způsobem.</p>
7.2. Skladování	<p>Uchovávejte v originálních obalech, těsně uzavřené, chráněné před světlem a vlhkostí při teplotách 5°C až 30°C. Skladovat odděleně od potravin, nápojů a krmiv pro zvířata. Chránit před mrazem, a přímým slunečním svitem, tj teplotami pod -10°C a nad 40°C. Zamezte kontaminaci přípravkem jiných pesticidů, hnojiv, vody, potravin, krmiv. Skladujte jen v souladu s platnými právními předpisy.</p>
7.3. Specifické použití	<p>TOPSIN M 500SC je určen pro použití jako systémový fungicid. Obsluha, která může přijít do styku s přípravkem by měla používat osobní ochranné pracovní prostředky, které jsou uvedeny v položce 8.</p>

8. Omezování expozice / osobní ochranné prostředky	
8.1. Limitní hodnoty expozice	Expoziční limity v pracovním prostředí nejsou stanoveny (podle nařízení vlády č. 361/2007 Sb.)
8.2. Scénáře expozice	
<p>Thiophanát-methyl: hodnota AOEL a dermální absorpce byly převzaty z hodnocení účinné látky na Annex I, směrnice rady 91/414/EHS – List of end points (Německo, září 2004). AOEL_{sys} pro: thiofanát-methyl = 0,08 mg/kg těl. hm za den. Hodnoty AOEL dle modelu UK POEM i Německého modelu pro 75% Percentil pro thiofanát-methyl jsou při použití doporučených osobních ochranných pracovních prostředků přijatelné, nedojde k ohrožení operátora při práci s přípravkem Topsin M 500SC.</p>	
8.3. Omezování expozice	
<p>Nejezte, nepijte a nekuřte při používání. Nevdechujte aerosoly. Zamezte styku s kůží a očima. Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné brýle nebo obličejový štít. (Před použitím si přečtete příložený návod k použití.) Přípravek se aplikuje pozemně postřikem schválenými postřikovači. Postřik provádějte jen za bezvětrí nebo mírného vánku, v tom případě ve směru po větru od dalších osob. Ucpané trysky postřikovače se nesmějí profukovat ústy. Zamezte přístupu nepovolaných, nechráněných osob a dětí do pracovní oblasti. Po skončení práce, až do odložení pracovního oděvu a dalších OOPP a do důkladného umytí (sprcha nebo koupel, umytí vlasů) nejezte, nepijte a nekuřte. Pracovní oděv a OOPP před dalším použitím vyperte, resp. očistěte/omyjte mýdlovým roztokem nebo roztokem sody, popř. postupujte podle doporučení výrobce OOPP.</p>	
<p>Při práci s přípravkem používejte osobní ochranné pracovní pomůcky. Ochrana dýchacích orgánů: maska/polomaska/čtvrťmaska podle ČSN EN 133 a ČSN EN 136 a příslušný filtr proti plynům/parám podle ČSN EN 14387 nebo příslušný filtr proti částicím podle ČSN EN 143 popř. polomaska proti částicím podle ČSN EN 149 v obou případech s integrovanou vrstvou aktivního uhlí. Ochrana rukou: gumové nebo plastové rukavice označené piktogramem pro chemická nebezpečí podle ČSN EN 420 s uvedeným kódem podle přílohy A k ČSN EN 374-1. Ochrana očí a obličeje: bezpečnostní ochranné brýle nebo ochranný štít podle ČSN EN 166. Ochrana těla: celkový ochranný oděv z textilního materiálu např. podle ČSN EN 14605 nebo podle ČSN EN 13034 označený piktogramem „ochrana proti chemikáliím“ podle ČSN EN 340 a nepromokavý plášť s kapucí (turistická pláštěnka), popř. (při míchání/ředění přípravku) plastová zástěra nebo zástěra z pogumovaného textilu.</p>	



Bezpečnostní list
TOPSIN M 500SC®

Datum vyhotovení: 06.08.2008

Datum revize: 17.01.2011

strana: 4/7

Dodatečná ochrana hlavy: čepice se štítkem nebo klobouk.	
Dodatečná ochrana nohou: gumové nebo plastové holinky podle ČSN EN ISO 20346.	
Omezování expozice životního prostředí	Vždy je třeba postupovat podle předpisů, týkajících se ochrany životního prostředí. Viz pol.15, označení z hlediska rizik pro necílové organismy a životní prostředí

9. Fyzikální a chemické vlastnosti	
9.1. Obecné informace	
Skupenství (při 20°C)Vzhled:	kapalina,
Barva	bílošedá suspenze
Zápach (vůně):	mírný organický zápach
9.2 Informace důležité z hlediska ochrany zdraví, bezpečnosti a životního prostředí	
Hodnota pH	5-7 (20°C) (nezředěný přípravek) 6,1 (0,1% vodná disperze)
Bod varu/rozmezí bodu varu	nevztahuje se
Bod vzplanutí	nehořlavý
Hořlavost	nehořlavý
Teplota samovznícení (°C)	výrobce neuvádí
Výbušné vlastnosti	výrobce neuvádí
Meze výbušnosti: horní mez (% obj.) dolní mez (% obj.)	výrobce neuvádí
Oxidační vlastnosti	výrobce neuvádí
Tenze par (Pa) při 20 °C	neaplikovatelný údaj
Relativní hustota	1,17 – 1,23 g/cm ³
Rozpustnost	
Rozpustnost ve vodě	suspensní koncentrát
V organických rozpouštědlech (g/l)	výrobce neuvádí
Rozdělovací koeficient: n-oktanol/voda	Log Po/w=1,50
Dynamická viskozita	výrobce neuvádí
Kinematická viskozita	výrobce neuvádí
Hustota par	výrobce neuvádí
Sypná hmotnost	výrobce neuvádí
Rychlost odpařování	výrobce neuvádí
9.3. Další informace	
Další údaje	teplota tuhnutí -9°C

10. Stálost a reaktivita	
10.1. Podmínky, kterým je třeba zabránit:	Teploty pod -10°C a nad 40°C.
10.2. Materiály, kterých je třeba se vyvarovat:	Nejsou známe.
10.3. Nebezpečné produkty rozkladu	Nejsou známe

11. Toxikologické informace	
Přípravek Topsin M 500SC je zdraví škodlivý při požití, zdraví škodlivý při vdechování, senzibilizující kůži a je klasifikován jako mutagen kategorie 3, R68.	
Akutní toxicita	Potkan
LC 50, inhalačně,	2,25 mg/l (4h), klasifikován: R20 Zdraví škodlivý při vdechování.



Bezpečnostní list
TOPSIN M 500SC®

Datum vyhotovení: 06.08.2008

Datum revize: 17.01.2011

strana: 5/7

LD50, orálně (mg/kg)	♂1000–2000 mg/kg, ♀ 816 mg/kg, klasifikován: R22 Zdraví škodlivý při požití.
LD50 dermálně (mg/kg)	> 2000 mg/kg neklasifikován
Dráždivost	
Při styku s okem	velmi slabě dráždí oči/ neklasifikován jako dráždivý pro oči
Při styku s kůží	lehce dráždí kůži / neklasifikován jako dráždivý pro kůži
Senzibilizace	senzibilizující kůži: R43
Karcinogenita	neklasifikován (aktivní ingredient/potkan, myš)
Mutagenita	Thiofanát-methyl: Ames test – negativní; chromosomal aberation test(CHL) – negativní; micronucleus test (myš) – pozitivní; UDS studie – negativní. Thiofanát methyl vykazuje mutagenní potenciál Mutagen kategorie 3. R68
Narkotizující účinek	výrobce neuvádí
Toxicita pro reprodukci	neklasifikován
Zkušenosti u člověka	výrobce neuvádí

12. Ekologické informace

12.1. Ekotoxicita	
Akutní toxicita	Přípravek je klasifikován: R52: Škodlivý pro vodní organismy
Ryby LC50, 96 hod, (mg/l)	> 100 (pstruh <i>Oncorhynchus mykiss</i>)
Bezobratlí EC50, 48 hod., Dafnie (mg/l)	11
Řasy EC50, 72 hod, (mg/l)	45,5
Chronická toxicita	
Chronická toxicita	Přípravek je klasifikován: R53: Může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí
Toxicita pro další organismy	Přípravek nevyžaduje klasifikaci z hlediska ochrany ptáků, suchozemských obratlovců, včetně necílových členovců, půdních makroorganismů, půdních mikroorganismů a necílových rostlin.
12.2. Mobilita	výrobce neuvádí
12.3. Persistenceence a rozložitelnost	výrobce neuvádí
12.4. Bioakumulační potenciál	výrobce neuvádí
12.5. Výsledky posouzení PBT	výrobce neuvádí
12.6. Další údaje	výrobce neuvádí

13. Pokyny pro odstraňování

13.1. Možné riziko při odstraňování	Zamezte kontaminaci vodních zdrojů, potravin, krmiv přípravkem nebo použitými obaly. Nepoužívejte opětovně použitý obal.
13.2. Způsoby odstraňování	Vzniklé odpady se zneškodňují ve spalovnách pro nebezpečné látky, vybavených dvoustupňovým spalováním při teplotě 1200°C-1400°C ve druhém stupni a s následným čištěním plynných zplodin nebo v jiném zařízení schváleném pro zneškodňování nebezpečných odpadů, postupuje se při tom podle zákona o odpadech a podle prováděcích předpisů o zneškodňování odpadů (viz kap. 15). Stejným způsobem je nutné likvidovat nepoužitelné zbytky přípravku. S použitými obaly se nakládá jako s nebezpečným odpadem. Prostředky užití při odstraňování náhodného úniku (kap. 6) jakož i nepoužité osobní ochranní pracovní prostředky se zneškodňují obdobně jako použité obaly.
13.3. Doporučené zařazení odpadu (podle vyhláška 381/2001 Sb., ve znění pozdějších předpisů)	Zařazení odpadu dle Katalogu odpadů: kód odpadu 02 01 08*: Agrochemické odpady obsahující nebezpečné látky.

14. Informace pro přepravu




Bezpečnostní list
TOPSIN M 500SC®

Datum vyhotovení: 06.08.2008

Datum revize: 17.01.2011

strana: 6/7

Přípravek není nebezpečným zbožím ve smyslu mezinárodních a národních předpisů o přepravě.	
14.1. Bezpečnostní opatření pro přepravu a převoz obecně Přípravek přepravujte v běžných krytých čistých dopravních prostředcích chráněných před povětrnostními vlivy, odděleně od nápojů, potravin a krmiv	
14.2. Informace o přepravní klasifikaci	
ADR/ RID Třída: Číslo UN: Obalová skupina Označení Klasifikační kód: EMS Látka znečišťující moře	
15. Informace o právních předpisech vztahujících se k přípravku	
15.1. Posouzení chemické bezpečnosti: Nebylo dosud provedeno.	
15.2. Značení uvedená na štítku:	
Označování na štítku	Xn, R20/22,, R43, R68, R52/53, S2, S13, S20/21, S23, S24/25, S36/37/39, S26, S28, S46, S35, S61
Výstražný symbol: Xn Zdraví škodlivý	 zdraví škodlivý
Nebezpečné látky:	thiofanát-methyl (ISO) účinná látka byla zařazena do Přílohy I ke směrnici Rady 91/414/EHS směrnici komise 2005/53/ES ze dne 16.září 2005
R -věty	(R20/22) Zdraví škodlivý při vdechování a požití. (R43) Může vyvolat senzibilizaci při styku s kůží. (R68) Možné nebezpečí nevratných účinků. (R52/53) Škodlivý pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí.
S-věty	(S2) Uchovávejte mimo dosah dětí. (S13) Uchovávejte odděleně od potravin, nápojů a krmiv. (S20/21) Nejezte, nepijte a nekuřte při používání. (S23) Nevdechujte aerosoly. (S24/25) Zamezte styku s kůží a očima. (S36/37/39) Používejte vhodný ochranný oděv, ochranné rukavice a ochranné brýle nebo obličejový štít. (S26) Při zasažení očí okamžitě důkladně vypláchněte vodou a vyhledejte lékařskou pomoc. (S28) Při styku s kůží okamžitě omyjte velkým množstvím vody. (S46) Při požití okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc a ukažte tento obal nebo označení. (S35) Tento materiál a jeho obal musí být zneškodněn bezpečným způsobem. (S61) Zabraňte uvolnění do životního prostředí. Viz speciální pokyny nebo bezpečnostní listy.
	V označení se uvedou R-věty a S-věty formou textu a výstražný symbol Xn ve formě piktogramu a slovního vyjádření nebezpečnosti.
Specifická ustanovení týkající se ochrany osob nebo životního prostředí	Označení z hlediska rizik pro necílové organismy a životní prostředí: (SP1) Zabraňte kontaminaci vody přípravkem nebo jeho obalem. Nečistěte aplikační zařízení v blízkosti povrchové vody, zabraňte kontaminaci vod splachem z farem a cest. OP II.st. Přípravek je vyloučen z použití v ochranném pásmu II.stupně zdrojů povrchové vody.



Bezpečnostní list
TOPSIN M 500SC®

Datum vyhotovení: 06.08.2008

Datum revize: 17.01.2011

strana: 7/7

	<p>(SPe3) Za účelem ochrany vodních organismů snižte úlet dodržением neošetřeného ochranného pásma 5m vzhledem k povrchové vodě při aplikaci do pšenice a ječmene.</p> <p>(SPe3) Za účelem ochrany vodních organismů snižte úlet dodržением neošetřeného ochranného pásma 4m vzhledem k povrchové vodě při aplikaci do cukrové a krmné řepy.</p> <p>Přípravek nevyžaduje klasifikaci z hlediska ochrany ptáků, suchozemských obratlovců, včel, necílových členovců (kromě včel), půdních makroorganismů, půdních mikroorganismů a necílových rostlin.</p> <p>Dodržujte pokyny pro používání, abyste se vyvarovali rizik pro člověka a životní prostředí.</p> <p>(Před použitím přípravku si důkladně přečtěte návod na použití).</p> <p>Zařazení přípravku z hlediska ochrany</p> <p>Včel: nevyžaduje klasifikaci</p> <p>Vodních organismů: škodlivý</p> <p>Zvěře: nevyžaduje klasifikaci</p>
	<p>Tento přípravek je registrovaný fungicid, který může být používán pouze pro použití pro která je registrován ve shodě s etiketou schválenou zákonnými orgány</p>
15.3. Právní předpisy, které se vztahují na přípravek	<p>Právní předpisy k tomuto bezpečnostnímu listu jsou uvedené v Příloze č.1.</p>

<p>16. Další informace</p> <p>16.1. Seznam R-vět uvedených v bodě 3:</p> <p>R20: Zdraví škodlivý při vdechování</p> <p>R43: Může vyvolat sensibilizaci při styku s kůží</p> <p>R50/53: Vysoce toxický pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí</p> <p>R68: Možné nebezpečí nevratných účinků</p>
<p>16.2. Pokyny pro proškolení</p> <p>Vysvětlit stručně a výstižně jednotlivé kapitoly bezpečnostního listu.</p>
<p>16.3. Doporučená omezení použití</p> <p>Tento přípravek může být používán pouze osobami, které byly seznámeny s jeho nebezpečnými vlastnostmi a byly proškoleny v BOZP s tímto přípravkem. Uživatel tohoto bezpečnostního listu musí kontrolovat platnost informací podle místních okolností.</p> <p>Pravidelná práce s přípravkem je nevhodná pro alergiky.</p>
<p>16.4. Další informace</p> <p>Pro profesionální použití!</p>
<p>16.5. Zdroje údajů při sestavování bezpečnostního listu:</p> <p>Při vypracování tohoto bezpečnostního listu byla použita verze originálního bezpečnostního listu výrobce Nisso Chemical Europe GmbH, ze dne 10.října 2008 (version 7)</p>
<p>16.6. Přidané nebo upravené informace:</p> <p>Datum vyhotovení 6.8.2008</p> <p>Datum revize: 23.2.2009 (dle Rozhodnutí o registraci Státní rostlinolékařské správy ze dne 23.února 2009, Toxikologického posudku ze dne 5.2.2009 a Odborného posudku ze dne 9.února 2009 Státního zdravotního ústavu).</p> <p>Datum revize: 29.03.2010 aktualizace kapitol: 2, 3, 8, 11, 12, 13, 15.</p> <p>Datum revize: 04.10.2010, aktualizace kapitol: 1, 2, 8, 11, 12, 13, 15.</p> <p>Datum revize: 17.01.2011, aktualizace kapitoly 15.</p> <p>Údaje vycházejí ze současného stavu znalostí. Přípravek je popsán se zřetelem k požadavkům bezpečnosti práce a ochrany životního prostředí a nejedná se o jakostní normu.</p>



The Chemical Company

Bezpečnostní list

Strana: 1/11

BASF Bezpečnostní list v souladu se Směnicí 1907/2006/ES

Datum / Přepracováno.: 17.03.2010

Produkt: **PERFEKTHION**

Verze: 2.1

152 59 I

(30260584/SDS_CPA_CZ/CS)

Datum tisku 20.03.2010

1. Identifikace látky / směsi a společnosti / podniku

PERFEKTHION

Použití: přípravek na ochranu rostlin, insekticid

Výrobce:

BASF SE

67056 Ludwigshafen

GERMANY

Kontaktní adresa:

BASF spol. s r.o.

Šafránkova 3

15500 Praha 5

CZECH REPUBLIC

Telefon: +421 2 58 266-170

Číslo faxu: +421 2 58 266-167

E-mailová adresa: adriana.grupacova@basf.com

Informace pro nouzové situace:

Klinika nemocí z povolání, Tox. inf. středisko

Na bojišti 1, 128 08 Praha 2

CZECH REPUBLIC

224919293, 224915402, 224914575

International emergency number:

Telefon: +49 180 2273-112

2. Identifikace rizik

Možná nebezpečí (dle směrnice 67/548/EWG nebo 1999/45/EG)

Hořlavý.

Zdraví škodlivý při vdechování a při požití.

Dráždí oči a kůži.

Toxický pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí.

3. Složení / informace o složkách

CHEMICKÁ CHARAKTERISTIKA

přípravek na ochranu rostlin, insekticid, emulzní koncentrát

Nebezpečné složky
 dle Směrnice 1999/45/ES

dimethoát

Obsah (W/W): 37,2 %
 Číslo CAS: 60-51-5
 ES-číslo: 200-480-3
 INDEX-číslo: 015-051-00-4
 Symbol(y) nebezpečí: Xn
 R-věty: 21/22

Cyclohexanon

Obsah (W/W): $\geq 43,5\%$ - $\leq 48\%$
 Číslo CAS: 108-94-1
 ES-číslo: 203-631-1
 Symbol(y) nebezpečí: Xn
 R-věty: 10, 20/21/22, 38, 41

solventní nafta

Obsah (W/W): $\geq 4,2\%$ - $\leq 5,2\%$
 Číslo CAS: 64742-94-5
 ES-číslo: 265-198-5
 Symbol(y) nebezpečí: Xn, N
 R-věty: 51/53, 65, 66

Acetanhydrid

Obsah (W/W): $\leq 5\%$
 Číslo CAS: 108-24-7
 ES-číslo: 203-564-8
 INDEX-číslo: 607-008-00-9
 Symbol(y) nebezpečí: C
 R-věty: 10, 20/22, 34

Jestliže jsou uvedené nebezpečné přísady, je znění symbolů nebezpečí a R-vět specifikováno v kapitole 16.

4. Pokyny pro první pomoc

Všeobecné pokyny:

Znečištěný oděv okamžitě odstraňte. Personál poskytující první pomoc musí dbát na vlastní bezpečnost. Při hrozícím bezvědomí postiženého uložit a přepravovat ve stabilizované boční poloze. Nádobu, štítek popř. bezpečnostní údaje o materiálu ukažte lékařům.

BASF Bezpečnostní list v souladu se Směrnicí 1907/2006/ES
Datum / Přepracováno.: 17.03.2010
Produkt: **PERFEKTHION**

Verze: 2.1

152 59 I
(30260584/SDS_CPA_CZ/CS)

Datum tisku 20.03.2010

Při nadýchání:

Postiženého udržovat v klidu, přemístit na čerstvý vzduch, vyhledat lékařskou pomoc.

Při styku s kůží:

Okamžitě důkladně omyjte mýdlem a vodou, vyhledejte lékařskou pomoc.

Při kontaktu s očima:

Okamžitě vyplachujte zasažené oči po dobu alespoň 15 minut proudem vody při roztažených víčkách a obraťte se na očního lékaře.

Při požití:

Okamžitě vypláchněte ústa a vypijte 200-300 ml vody, vyhledejte lékaře.

Poznámky pro lékaře:

Symptomy: inhibice cholinesterázy

Zacházení: Léčbu provádějte podle symptomů (dekontaminace, vitální funkce), aplikujte atropin pro inhibici cholinesterázy.

5. Opatření pro zdolávání požáru

Vhodná hasiva:

pěna, suché hasicí prostředky, oxid uhličitý, voda

Zvláštní nebezpečí:

Oxid uhelnatý, oxidy dusíku, oxidy síry

V případě požáru může dojít k uvolnění zmíněných látek/skupin látek.

Speciální ochranné vybavení:

Použijte autonomní dýchací přístroj a protichemický oblek.

Další informace:

V případě požáru nebo výbuchu nevdechujte dýmy. Při vystavení ohni ochlazujte nádoby stříkáním vody. Odděleně zachyťte vodu kontaminovanou při hašení, nenechte ji odtéci do systému kanalizace nebo odpadních vod. Zbytky po požáru a voda kontaminovaná po hašení musí být zlikvidovány v souladu s platnými předpisy.

6. Opatření v případě náhodného úniku

Opatření pro ochranu osob:

Používat osobní ochranný oděv. Zamezte kontaktu s pokožkou, očima a s oděvem. Znečištěný oděv, spodní prádlo a boty okamžitě svléknout.

Opatření pro ochranu životního prostředí:

Nevylévejte do podzemní vrstvy země/do země. Nevypouštějte do odpadů, povrchových a podzemních vod.

Metody čištění nebo sběru:

Pro malá množství: Nabírat s vhodným absorbujícím materiálem (např. pískem, pilinami nebo víceúčelovým pojivem, křemelinou).

Pro velká množství: Zahradit/zadržet hrází. Produkt odčerpejte.

Čistící operace se musí provádět pouze s dýchacím přístrojem. Zlikvidujte absorbovanou látku v souladu s předpisy. Odpad zachycovat do vhodných nádob, které lze označit a utěsnit.

Kontaminované podlahy a předměty důkladně očistit vodou a čistícími prostředky při současném dodržení ekologických předpisů. Spalte nebo dopravte na speciální úložiště odpadu v souladu s platnými místními předpisy.

7. Zacházení a skladování

Manipulace

Při správném skladování a manipulaci nejsou nutná žádná zvláštní opatření. Zajistěte důkladné větrání skladů a pracovních prostor.

Ochrana před ohněm a výbuchem:

Produkt je hořlavý. Páry se vzduchem mohou vytvářet explozivní směs. Zamezte vzniku elektrostatického náboje - zápalné zdroje musí být udržovány v dostatečné vzdálenosti - hasicí přístroje musí být připraveny v pohotovosti.

Skladování

Izolovat od potravin, poživatin a krmiv pro zvířata. Uvolňující zápach: Izolovat od produktů citlivých na zápach. Oddělte od zásad.

Vhodné materiály pro obaly: vysokohustotní polyetylén (HDPE), fluorovaný

Další informace k podmínkám skladování: Chraňte před teplem. Chraňte před přímým slunečním svitem. Chránit proti vlhkosti. Uchovávejte pouze v původním obalu na chladném, dobře větraném místě. Uchovávejte obal těsně uzavřený.

Stabilita při skladování:

Doba skladování: 24 mes.

Ochrana před teplotami nižšími než: -10 °C

Vlastnosti produktu se reverzibilně změní při poklesu pod mezní teplotu.

Ochrana před teplotami vyššími než: 25 °C

Pokud je produkt/látka skladován/a při vyšší než uvedené teplotě po delší dobu, může dojít ke změně vlastností produktu.

8. Omezování expozice / osobní ochranné prostředky

Složky s kontrolními parametry pracoviště

BASF Bezpečnostní list v souladu se Směrnicí 1907/2006/ES
 Datum / Přepracováno.: 17.03.2010
 Produkt: **PERFEKTHION**

Verze: 2.1

152 59 I
 (30260584/SDS_CPA_CZ/CS)
 Datum tisku 20.03.2010

108-94-1: Cyklohexanon

Hodnota PEL 40 mg/m³ (OEL (CZ))
 NPK-P 80 mg/m³ (OEL (CZ))
 Účinek na pokožku (OEL (CZ))
 Látka může být pokožkou vstřebána.

108-24-7: Acetanhydrid

NPK-P 20 mg/m³ (OEL (CZ))

Vybavení pro ochranu osob

Ochrana dýchacího ústrojí:

Ochrana dýchání, pokud se vytváří plyny/výpary. Pokud není dostatečná ventilace, použijte respirační ochranu. Plynový filtr EN141 Typ A pro plyny/páry organických sloučenin (bod varu >65 °C).

Ochrana rukou:

Vhodné ochranné pracovní rukavice odolné proti chemikáliím (EN 374) i pro delší, přímý kontakt (doporučeno: index ochrany 6, odpovídající > 480 minutám doby permeace podle EN 374): např. z nitrilkaučuku (0,4 mm), chloroprenkaučuku (0,5 mm), polyvinylchloridu (0,7 mm) a další.

Ochrana očí:

Ochranné brýle s bočními štíty (rámové brýle) (EN 166)

Ochrana těla:

Ochrana těla je nutno zvolit podle aktivity a možné expozici, např. zástěra, ochranné vysoké boty, protichemický ochranný oděv (podle DIN-EN 465).

Obecná bezpečnostní a hygienická opatření:

Při zacházení s prostředky na ochranu rostlin v balení konečného spotřebitele platí údaje o vybavení pro ochranu osob v návodu k použití. Zamezte kontaktu s pokožkou, očima a s oděvem. Doporučuje se používání nepropustných pracovních oděvů. Okamžitě odložte veškeré kontaminované oblečení. Uchovávejte pracovní oděv odděleně. Uchovávejte odděleně od potravin, nápojů a krmiv. Na pracovišti se nesmí jíst, pít, kouřit ani šňupat. Před přestávkami a na konci směny musí být umyty ruce popř. obličej.

9. Fyzikální a chemické vlastnosti

Forma:	tekutý	
Barva:	modrá, čirá	
Zápach:	odporný	
Hodnota pH:	3,4 (voda, 1 %(m), 20 °C)	(pH meter)
teplota krystalizace:	< -20 °C	(naměřený)
Začátek varu:	cca. 154 °C Informace se vztahuje na rozpuštědlo.	

BASF Bezpečnostní list v souladu se Směrnicí 1907/2006/ES
 Datum / Přepracováno.: 17.03.2010
 Produkt: **PERFEKTHION**

Verze: 2.

152 59

(30260584/SDS_CPA_CZ/CS

Datum tisku 20.03.201

Bod vzplanutí:	46 °C	(Směrnici 92/69/EEC, A.9, uzavřený kelímek)
Samozápalnost:	Samovznícení při zvýšené teplotě. (Metoda: Směrnici 92/69/EEC, A.15)	Teplota: 310 °C Tlak: 1.003 - 1.013 hPa
Nebezpečí výbuchu:	neexplozivní	(Směrnice 92/69/EHS, A.14)
Vlastnosti podporující oheň/požár:	nepodporující šíření ohně	(UN Test O.2 (oxidizing liquids))
Tenze par:	< 5 hPa (20 °C) Informace se vztahuje na rozpouštědlo.	
Hustota:	1,074 g/cm ³ (20 °C)	(OECD Směrnice 109)
Relativní hustota:	1,074 (20 °C)	(OECD Směrnice 109)
Rozpustnost ve vodě:	emulgovatelný	
Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda (log Pow):	nepoužitelný	
Povrchové napětí:	41,3 mN/m (20 °C; 0,1%) 38,8 mN/m (20 °C; 0,4%)	(OECD Směrnice 115, Desková metoda) (OECD Směrnice 115, Desková metoda)
Dynamická viskozita:	8,4 mPa.s (20 °C, 100 1/s)	(OECD 114)

10. Stálost a reaktivita

Nepřípustné podmínky:
 Teplota: > 25 °C

Tepelný rozklad: 125 °C, 590 kJ/kg (DSC (OECD 113))

Tepelný rozklad: Při skladování a manipulaci podle pokynů nedochází k rozkladu.

Nepřípustné látky:
 voda, alkálie

Nebezpečné reakce:
 Neslučitelný se zásadami.

Nebezpečné produkty rozkladu:
 Žádné nebezpečné produkty rozkladu, jsou-li dodržovány předpisy/instrukce pro skladování a manipulaci. Dlouhodobé tepelné zatížení může vést k uvolňování produktů rozkladu.

11. Toxikologické informace

Akutní toxicita

Experimentální/vypočtené údaje:

LD50 krysa (orální): > 500 - < 2.000 mg/kg (Směrnice OECD 423)

LC50 krysa (Vdechováním): 4,6 mg/l 4 h (Směrnice OECD 403)
Aerosol byl otestován.

LD50 krysa (Kožní): > 2.000 mg/kg (Směrnice OECD 402)
Úmrtnost nebyla pozorována.

Podráždění

Experimentální/vypočtené údaje:

Poleptání/podráždění kůže králik: Dráždivý. (Směrnice OECD 404)

Vážná poškození/podráždění očí králik: Dráždivý. (Směrnice OECD 405)

Senzibilizace dýchacích cest/kůže

Experimentální/vypočtené údaje:

modifikovaný Buehlerův test morče: Při zkouškách na zvířatech nebyl zjištěn senzibilizační účinek na pokožku. (Směrnice OECD 406)

Další informace o toxicitě

Nesprávné použití může být zdraví škodlivé.

12. Ekologické informace

Ekotoxicita

Toxicita pro ryby:

LC50 (96 h) 61,3 mg/l, Pstruh duhový (OECD 203; ISO 7346; 84/449/EHS, C.1, semistatický)
Produkt nebyl testován. Specifikace byla odvozena podle produktů s podobnou strukturou a složením.

LC50 (96 h) 38,96 mg/l, Lepomis macrochirus (OECD 203; ISO 7346; 84/449/EHS, C.1, semistatický)
Produkt nebyl testován. Specifikace byla odvozena podle produktů s podobnou strukturou a složením.

Vodní bezobratlí:

EC50 (48 h) 4,47 mg/l, Daphnia magna (Směrnice OECD 202, díl 1, statický)

Vodní rostliny:

EC50 (72 h) 562,8 mg/l (rychlost růstu), Selenastrum capricornutum (Směrnice OECD 201, statický)
Produkt nebyl testován. Specifikace byla odvozena podle produktů s podobnou strukturou a složením.

BASF Bezpečnostní list v souladu se Směrnicí 1907/2006/ES
 Datum / Přepracováno.: 17.03.2010
 Produkt: **PERFEKTHION**

Verze: 2.1

152 59 I
 (30260584/SDS CPA CZ/CS)

Datum tisku 20.03.2010

Stálost a rozložitelnost*Údaje o: Dimethoát**Vyhodnocení biodegradace a vylučování (H₂O):**Není snadno biologicky odbouratelný (podle kritérií OECD).**Údaje o: solventní nafta (ropná), těžká aromatická**Vyhodnocení biodegradace a vylučování (H₂O):**Není snadno biologicky odbouratelný (podle kritérií OECD). Středně/částečně biologicky odbouratelný.***Dodatečné informace**

Další ekologicko-toxikologický pokyn:

Nevypouštějte produkt nekontrolovaně do okolního prostředí.

13. Pokyny k likvidaci

Likvidaci na skládce či spálení je nutno provést v souladu s místními předpisy.

Zákon č. 185/2001 Sb. o odpadech a ve znění pozdějších a souvisejících předpisů

Kontaminovaný obal:

Kontaminované obaly musí být optimálně vyprázdněny a jak látka, tak i produkt musí být zlikvidovány.

14. Informace pro přepravu**Pozemní doprava**

ADR

Třída nebezpečí:	3
Obalová skupina:	III
Identif. číslo látky:	UN 1993
Bezpečnostné značky:	3, EHSM
Správný název pro přepravu:	LÁTKA HOŘLAVÁ, KAPALNÁ, J.N. (obsahuje CYCLOHEXANON, SOLVENTNÍ NAFTA, DIMETHOATE)

RID

Třída nebezpečí:	3
Obalová skupina:	III
Identif. číslo látky:	UN 1993
Bezpečnostné značky:	3, EHSM
Správný název pro přepravu:	LÁTKA HOŘLAVÁ, KAPALNÁ, J.N. (obsahuje CYCLOHEXANON, SOLVENTNÍ NAFTA, DIMETHOATE)

BASF Bezpečnostní list v souladu se Směrnicí 1907/2006/ES

Datum / Přepracováno.: 17.03.2010

Verze: 2.1

Produkt: **PERFEKTHION**

152 59 I

(30260584/SDS_CPA_CZ/CS)

Datum tisku 20.03.2010

Vnitrozemská vodní doprava

ADNR

Třída nebezpečí:	3
Obalová skupina:	III
Identif. číslo látky:	UN 1993
Bezpečnostné značky:	3, EHSM
Správný název pro přepravu:	LÁTKA HOŘLAVÁ, KAPALNÁ, J.N. (obsahuje CYCLOHEXANON, SOLVENTNÍ NAFTA, DIMETHOATE)

Námořní doprava

IMDG

Třída nebezpečí:	3
Obalová skupina:	III
Identif. číslo látky:	UN 1993
Bezpečnostné značky:	3, EHSM
Znečištění moře:	ANO
Správný název pro přepravu:	LÁTKA HOŘLAVÁ, KAPALNÁ, J.N. (obsahuje CYCLOHEXANON, SOLVENTNÍ NAFTA, DIMETHOATE)

Sea transport

IMDG

Hazard class:	3
Packing group:	III
ID number:	UN 1993
Hazard label:	3, EHSM
Marine pollutant:	YES
Proper shipping name:	FLAMMABLE LIQUID, N.O.S. (contains CYCLOHEXANONE, SOLVENT NAPHTHA, DIMETHOATE)

Letecká doprava

IATA/ICAO

Třída nebezpečí:	3
Obalová skupina:	III
Identif. číslo látky:	UN 1993
Bezpečnostné značky:	3
Správný název pro přepravu:	LÁTKA HOŘLAVÁ, KAPALNÁ, J.N. (obsahuje CYCLOHEXANON, SOLVENTNÍ NAFTA, DIMETHOATE)

Air transport

IATA/ICAO

Hazard class:	3
Packing group:	III
ID number:	UN 1993
Hazard label:	3
Proper shipping name:	FLAMMABLE LIQUID, N.O.S. (contains CYCLOHEXANONE, SOLVENT NAPHTHA, DIMETHOATE)

15. Informace o předpisech**Předpisy Evropské unie (Značení) / Státní legislativa/předpisy**

Symbol(y) nebezpečí

N	Nebezpečný pro životní prostředí.
Xn	Zdraví škodlivý.

R-věty

R10	Hořlavý.
R20/21/22	Zdraví škodlivý při vdechování, styku s kůží a při požití.
R36/38	Dráždí oči a kůži.
R51/53	Toxický pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí.

S-věty

S2	Uchovávejte mimo dosah dětí.
S13	Uchovávejte odděleně od potravin, nápojů a krmiv.
S20/21	Nejezte, nepijte a nekuřte při používání.
S28.1	Při styku s kůží okamžitě omýt mýdlem a velkým množstvím vody.
S36/37	Používejte vhodný ochranný oděv a ochranné rukavice.
S46	Při požití okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc a ukažte tento obal nebo označení.

Komponent(y) určující nebezpečí pro označování: dimethoát, CYCLOHEXANON, SOLVENTNÍ NAFTA, Acetanhydrid

Jiné předpisy

Pro uživatele tohoto přípravku na ochranu rostlin platí: 'Pro ochranu lidí a životního prostředí je nutné dodržovat pokyny pro použití.' (Směrnice 1999/45/EC, článek 10, č. 1.2).

Zákon č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví a Nařízení vlády č. 178/2001 Sb., kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví zaměstnanců při práci, ve znění pozdějších a souvisejících předpisů. Zákon č. 477/2001 Sb. o obalech ve znění pozdějších a souvisejících předpisů.

ČSN 65 0201 a ČSN 65 6060 pro skladování, manipulaci a přepravu

Dodržujte pokyny pro používání, abyste se vyvarovali rizik pro člověka a životní prostředí. (Vyhláška č. 329/2004 Sb, par.15, odst.2)

Dle zákona č. 434/2005 Sb. o chemických látkách a chemických přípravcích je výrobek klasifikován jako nebezpečný.

16. Další informace

Pro náležitý a bezpečný zacházení s produktem dbejte prosím schválených podmínek, které jsou uvedeny na produktové etiketě.

Úplné znění symbolů nebezpečnosti a R-vět, pokud jsou uvedeny v kapitole 3 pod nebezpečnými složkami látky nebo přípravku:

Xn	Zdraví škodlivý.
N	Nebezpečný pro životní prostředí.
C	Žíravý.
21/22	Zdraví škodlivý při styku s kůží a při požití.
10	Hořlavý.
20/21/22	Zdraví škodlivý při vdechování, styku s kůží a při požití.
38	Dráždí kůži.
41	Nebezpečí vážného poškození očí.
51/53	Toxický pro vodní organismy, může vyvolat dlouhodobé nepříznivé účinky ve vodním prostředí.
65	Zdraví škodlivý: při požití může vyvolat poškození plic.
66	Opakovaná expozice může způsobit vysušení nebo popraskání kůže.
20/22	Zdraví škodlivý při vdechování a při požití.
34	Způsobuje poleptání.

BASF Bezpečnostní list v souladu se Směrnicí 1907/2006/ES

Datum / Přepracováno.: 17.03.2010

Produkt: **PERFEKTHION**

Verze: 2.1

152 59 I

(30260584/SDS_CPA_CZ/CS)

Datum tisku 20.03.2010

Svislé čáry na levém okraji upozorňují na změny oproti předchozí verzi.

Údaje v tomto Bezpečnostním listě se zakládají na našich současných znalostech a zkušenostech a popisují produkt z hlediska bezpečnostních požadavků. Údaje nelze považovat v žádném případě za popis vlastností zboží (specifikace produktu). Dohodnutá kvalita nebo vhodnost produktu pro konkrétní způsob nasazení nemůže být odvozena z našich údajů. Na případná ochranná práva stejně jako stávající zákony a ustanovení musí dbát příjemce našeho produktu na vlastní zodpovědnost.