

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chemie



Analýza vybraných residuů pesticidů v medu

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Filip Morávek

Obor studia: Výživa zvířat a dietetika

Vedoucí práce: Ing. Miloslav Šulc, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Analýza vybraných residuí pesticidů v medu" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne _____

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval mému vedoucímu diplomové práce Ing. Miloslavu Šulcovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady a věcné připomínky. Dále bych rád poděkoval skupině včelařů, kteří během roku 2017 pečlivě odebírali vzorky medu a nektaru ze svých včelstev a následně mi tyto vzorky poskytli k analýze.

Analýza vybraných residuí pesticidů v medu

Souhrn

Práce se zabývá analýzou vzorků medu a nektaru, které byly odebírány v průběhu celého snůškového období v roce 2017 v oblasti Hlinsko v Čechách na jedenácti stanovištích od devíti včelařů. V odebraných vzorcích byla pomocí LC-MS zjišťována přítomnost šesti insekticidních látek. Pyretroidní insekticidy deltametrin, cypermetrin, λ cyhalotrin, τ -fluvalinát, neonikotinoid thiaklopid a organofosfát chlorpyrifos.

Cílem této diplomové práce bylo:

- Zprovoznit a optimalizovat LC-MS metodu na měření vybraných pesticidů.
- Zjistit přítomnost vybraných pesticidních látek ve vzorcích medu a nektaru odebíraného od včelařů z oblasti Hlinecka během celého snůškového období v roce 2017.
- Prokázat nezávadnost vzorků medu i přes rozšířené používání pesticidů v okolí včelstev.
- Nadlimitní koncentrací pesticidů v medu prokázat intenzivní používání pesticidů v okolním zemědělském prostoru.
- Pokud budou residua pesticidů detekována, zjistit jejich koncentrace v čase na jednotlivých stanovištích.

Hypotézy této diplomové práce byly:

- Ve vzorcích medu budou detekována residua pesticidů.
- Residua pesticidů nebudou zjištěna v nadlimitních koncentracích.
- Největší koncentrace pesticidních residuí budou během měsíce července.

Výsledky analýz ukázaly, že pyretroidní insekticidy a chlorpyrifos nebyly ve vzorcích medu vůbec detekovány (jejich hodnoty byly pod limitem detekce). Jediným insekticidem, který byl ve vzorcích medu detekován je neonikotinoid thiaklopid, který byl detekován v 89 % analyzovaných vzorků v intervalu od 0,01 - 1,18 mg v kg matrice. Zjištěná množství thiaklopidu v analyzovaných vzorcích nepřekročila hodnotu LD₅₀ pro včely a maximální residuální limity, které jsou Evropskou legislativou (EC 396/2005) povoleny v potravinách

určených k lidskému konzumu. Nejvyšší kumulace residuí pesticidů byla ve vzorcích naměřena od 14. 5. do 26. 6. v závislosti na nadmořské výšce stanovišť včelstev.

Klíčová slova: med, nektar, pesticidy, insekticidy, včela medonosná (*Apis mellifera*), LC-MS, QuEChERS extrakce

Pesticide analysis in honey

Summary

This work deals with pesticide analysis of honey and nectar. Samples were taken from nine beekeepers in area of Hlinsko v Čechách (Czech Republic) in eleven locations during the harvest season in 2017. Consequently, six different insecticides (four pyrethroid insecticides deltamethrin, cypermethrin, λ cyhalotrin, τ -fluvalinate and the neonicotinoid thiacloprid and organophosphate chlorpyrifos) were analyzed.

The aim of this thesis work was:

- To implement and optimize LC-MS method.
- To find out if the six chosen pesticides are present in honey and nectar samples during the whole 2017 harvest season.
- To prove the pesticide residue levels do not exceed the legal allowed limits and thus pose no risk to human health.
- To demonstrate the extensive use of pesticides in the nearby agrarian environments if significant amounts of pesticide residues are found.
- To look into how the levels of pesticide residues differ with time at each location.

Hypothesis:

- In samples of honey were not detected residues of pesticides.
- There will be some pesticide residues detected in the honey and nectar samples but these amounts of residuals should not be present in above-limit concentrations.
- Expectation of higher/greatest concentration of pesticide residues during the month of July.

The results have shown that no pyrethroid insecticides or organophosphate insecticides were detected altogether in the honey and nectar samples. The only insecticide that was detected in honey samples was the neonicotinoid thiacloprid which was detected in 89 % of cases in the range of 0.01 - 1.18 mg/kg of matrix. The detected amounts of thiacloprid in the samples did not exceed the LD₅₀ value for honey bees and also the maximum residual limits allowed in

foods for human consumption. The highest amounts of pesticide residues were detected in samples collected during May 14 to June 26, 2017 and were dependent on the altitude of the bee hives.

Keywords: honey, nectar, pesticides, insecticides, honey bee (*Apis mellifera*), LC-MS, QuEChERS method

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce	3
3	Literární rešerše.....	4
3.1	Insekticidy	4
3.1.1	Organofosfáty	4
3.1.1.1	Mechanismus účinku	6
3.1.1.2	Toxicita organofosfátů pro včely.....	6
3.1.1.3	Zástupci organofosfátů	6
3.1.2	Neonikotinoidy	7
3.1.2.1	Mechanismu účinku.....	10
3.1.2.2	Toxicita neonikotinoidů pro včely.....	10
3.1.2.3	Zástupci neonikotinoidů	13
3.1.2.4	Přítomnost neonikotinoidů v gutační vodě.....	13
3.1.2.5	Neonikotinoidy a legislativa Evropské unie.....	14
3.1.3	Pyretriny a pyretroidy	15
3.1.3.1	Pyretriny	15
3.1.3.2	Pyretroidy	16
3.1.3.3	Mechanismus účinku pyretroidů	17
3.1.3.4	Toxicita pyretroidů pro včely	18
3.1.3.5	Zástupci	19
3.1.4	Insekticidy ve včelích produktech	19
3.1.5	Syndrom zhroucení včelstev CCD (Colony Colapse Disorder)	27
3.1.6	Legislativní ochrana včel v České republice	28
3.1.7	Otravy včelstev v České republice.....	28
3.1.8	Postup při ohlášení a šetření otravy včel	30
3.1.9	Analytické metody sloužící k detekci residuí pesticidů v medu.....	31
3.1.9.1	Metoda QuEChERS.....	31
3.1.9.2	Kapalinová chromatografie	32
3.1.9.3	Hmotnostní spektrometrie	33
4	Metodika	34
4.1	Odběr vzorků medu a nektaru	34

4.2	Zjišťované insekticidy ve vzorcích medu a nektaru.....	34
4.3	Chemikálie	35
4.4	Přístroje:	35
4.5	Software	36
4.6	Příprava vzorků medu a nektaru k extrakci.....	36
4.7	QuEChERS extrakce	36
4.8	Parametry a postup LC/MS analýzy	37
5	Výsledky	40
5.1	Hodnocení jednotlivých vzorků medu a nektaru	40
5.2	Hodnocení vzorků medu a nektaru na jednotlivých stanovištích.....	43
5.2.1	Stanoviště 1	43
5.2.2	Stanoviště 2.....	44
5.2.3	Stanoviště 3.....	45
5.2.4	Stanoviště 4.....	46
5.2.5	Stanoviště 5.....	48
5.2.6	Stanoviště 6.....	49
5.2.7	Stanoviště 7.....	50
5.2.8	Stanoviště 8.....	51
5.2.9	Stanoviště 9.....	52
5.2.10	Stanoviště 10.....	53
5.2.11	Stanoviště 11.....	54
6	Diskuze.....	56
7	Závěr	61
8	Použitá literatura:	62
9	Samostatné přílohy.....	68
	Seznam příloh	71

1 Úvod

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je jedním z nejvýznamnějších opylovačů hmyzosnubných rostlin. Opylení včelou medonosnou je nezbytné pro rozmnožování extenzivně rostoucích rostlin, ale také rostlin, které jsou zemědělci intenzivně pěstovány na orné půdě. Úlohou extenzivně rostoucích rostlin v krajině je především zachování pestré biodiverzity krajiny. Intenzivně pěstované rostliny jsou zemědělci pěstovány za účelem co nejvyššího výnosu z jednotky plochy a následného finančního zisku z pěstování dané plodiny.

V několika posledních letech je zaznamenáván celosvětový pokles stavů včelstev. Mezi příčiny, které jsou dávány do souvislosti s tímto poklesem stavů včelstev, patří syndrom zhroucení včelstev (Colony Collapse Disorder). Syndrom zhroucení včelstev je vědci a včelaři dokumentován především na území Severní Ameriky a Evropy. Příčinou výskytu tohoto syndromu je podle nejnovějších vědeckých poznatků nedostatek kvalitní potravy včel, onemocnění včelstev a expozice včel pesticidním přípravkům. Interakce mezi těmito příčinami syndromu zhroucení včelstev vede k negativnímu ovlivnění včelstev vedoucím až k zániku jednotlivých včelstev.

Nedostatek kvalitní potravy pro včely v krajině je způsoben poklesem biodiverzity pestrosti rostlin, ze kterých včely čerpají zdroje potravy nezbytné pro jejich výživu. Příčinou poklesu této biodiverzity pestrosti rostlin v krajině je to, že jsou na obrovských plochách pěstovány monokultury plodin, do kterých zemědělci aplikují různé pesticidní přípravky. Úhyny včelstev zapříčiněné nevhodnou aplikací pesticidních přípravků do zemědělských plodin ročně způsobují úhyny nemalého počtu včelstev. Jako kontrola stavu kvality životního prostředí a kontrola správného zacházení zemědělských podniků s pesticidy by mělo být dokumentováno, zda se v potravě včel a v dalších matricích, se kterými včely běžně přichází do styku, vyskytují residua pesticidů.

Situace, kterou by jistě uvítal každý včelař, by byla taková, aby se ve zdrojích potravy včel a v matricích, se kterými včely přicházejí běžně do styku, nevyskytovala žádná residua pesticidů. Z pohledu zemědělce je uspokojivé, aby množství residuí pesticidů ve zdrojích potravy a dalších matricích, se kterými včely běžně přichází do styku, nepřesahovala legislativně povolené limity.

V současnosti a také v budoucnosti bude třeba hledat kompromisy mezi využíváním pesticidních přípravků, které jsou v současné době nezbytné pro chod zemědělství a mezi včelaři, kteří jsou mnohdy odpůrci používání pesticidních přípravků. Včela medonosná (*Apis mellifera*) přináší užitek a radost nejen samotným včelařům, ale také přináší užitek zemědělským

podnikům, proto hledání kompromisu mezi stranami zemědělců a včelařů by mohlo do budoucna přispět nejen k obnovení mnohdy ne příliš přátelských vztahů mezi zemědělci a včelaři, ale také ke zlepšení kvality životního prostředí, ve kterém žijí včely, lidé a další živé organismy.

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo:

- Zprovoznit a optimalizovat LC-MS metodu na měření vybraných pesticidů.
- Zjistit přítomnost vybraných pesticidních látek ve vzorcích medu odebíraného od včelařů z oblasti Hlinecka během celého snůškového období v roce 2017.
- Prokázat nezávadnost vzorků medu i přes rozšířené používání pesticidů v okolí včelstev.
- Nadlimitní koncentrací pesticidů v medu prokázat intenzivní používání pesticidů v okolním zemědělském prostoru.
- Pokud budou rezidua pesticidů detekována, zjistit jejich koncentrace v čase na jednotlivých stanovištích.

Hypotézy této diplomové práce byly:

- Ve vzorcích medu budou detekována rezidua pesticidů.
- Rezidua pesticidů nebudou zjištěna v nadlimitních koncentracích.
- Největší koncentrace pesticidních residuí bude během měsíce července.

3 Literární rešerše

3.1 Insekticidy

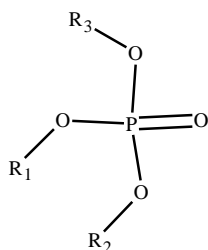
United States Environmental Protection Agency (2016) popisuje insekticidní přípravky jako chemické látky, které se používají k hubení hmyzu. Insekticidy jsou klasifikovány podle jejich chemické struktury a podle způsobu jejich účinku na hmyz. V zemědělství jsou používány jako ochrana před nežádoucími škůdci, kteří parazitují na zemědělských plodinách. V následujícím rozdělení insekticidů podle chemické struktury jsou uvedeny skupiny insekticidů, které jsou v zemědělské praxi běžně používány:

- organofosfáty
- neonikotinoidy
- pyretroidy

3.1.1 Organofosfáty

Gupta (2006) udává, že první sloučenina organofosfátového původu byla syntetizována v roce 1854. Následně, v roce 1932, bylo zjištěno, že výpary organofosfátů ovlivňují živé organismy tak, že při inhalaci těchto výparů dochází k poruchám zraku a k poruchám dýchání. Sledování těchto sloučenin vedené chemikem Gerhardem Schraderem vedlo ke vzniku nové skupiny insekticidů, organofosfátů. Některé organofosfátové sloučeniny jako sarin, tabun a soman byly zneužity jako nervové bojové plyny. Gupta (2006) také udává, že organofosfáty jsou z chemického hlediska estery kyseliny fosforečné. Obecný vzorec organofosfátu je uveden na Obr. 1.

Obrázek 1 Obecný vzorec organofosfátového insekticidu



Nejčastěji používanými organofosfáty na území České republiky (Tab. 1) jsou chlorpyrifos, dimetoát, malathion a chlorpyrifos-metyl. Strukturální vzorce těchto organofosfátů jsou uvedeny na Obr. 2.

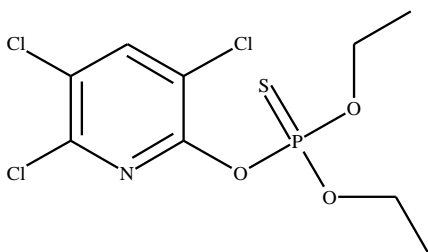
Tabulka 1 Spotřeba organofosfátů na území České republiky v roce 2016

	účinná látka			
	chlorpyrifos	dimetoát	malathion	chlorpyrifos-metyl
spotřebováno celkem (kg)	155 885,89	9 304,83	4 022,23	2 173,30
obiloviny (kg)	27 291,83	8 722,01		
kukuřice (kg)	1 705,02			
luskoviny (kg)	2 806,15			
řepa cukrová (kg)	3 950,71	560,65		
brambory (kg)	1 068,84			
olejniný (kg)	119 050,83		4 022,23	62,04
zelenina (kg)	12,52	16,97		42,24
ovoce (kg)		5,20		2 069,03

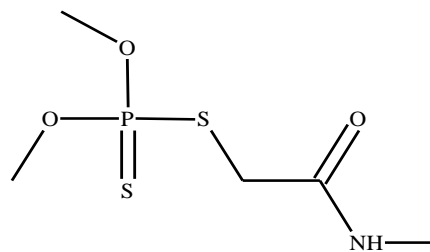
Zdroj: www.ukzuz.cz

Obrázek 2 Strukturální vzorce organofosfátových insekticidů

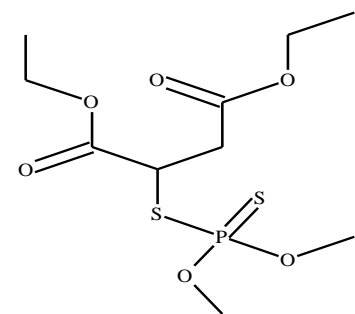
chlorpyrifos



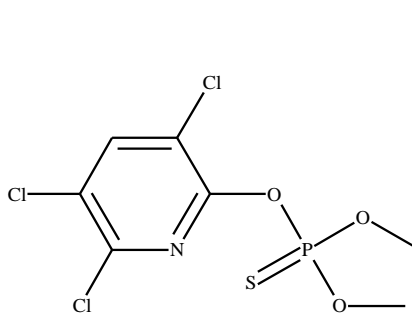
dimetoát



malathion



chlorpyrifos-metyl



3.1.1.1 Mechanismus účinku

Mechanismus účinku organofosfátů na cílové organismy spočívá v blokování enzymu acetylcholinesterázy (Gilbert, 2014). Blokace tohoto enzymu vede k nadměrné stimulaci a následně k dysfunkci nervového systému (Woodcock, 2012). Výsledkem blokace enzymu acetylcholinesterázy je úhyn hmyzu (Gilbert, 2014).

3.1.1.2 Toxicita organofosfátů pro včely

Horák a kol. (2004) udávají, že LD₅₀ je v toxikologii označení pro dávku látky podané testovaným jedincům, která způsobí úhyn 50 % testovaných jedinců do 24 hodin od expozice. Sagili a Hooven (2013) zařazují organofosfáty mezi látky, které vykazují vysokou toxicitu pro včely, to znamená, že LD₅₀ pro jednu včelu je nižší než 2 µg.

Woodcock (2012) ve své práci uvádí, že otrava včel organofosfáty se projevuje symptomy, mezi které patří pokles aktivity, abnormální pohyby při letu a opakované vyvrhování nektaru z trávicího traktu. Včely, které byly intoxikovány organofosfáty se nacházely v poloze, kdy ležely na zadové části těla, a v této poloze aktivně mávaly křídly. Woodcock (2012) také napsal, že názvy organofosfátů mají typické koncovky: -phos, -fos, -vos a -thion.

3.1.1.3 Zástupci organofosfátů

Podle Agromanuálu jsou Dursban 480 EC, Dursban Delta, Nurelle D a Pyrifos 480 EC komerční názvy insekticidních přípravků, kde je jako účinná látka využíván chlorpyrifos. V roce 2016 bylo podle Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského spotřebováno 155 885,89 kg této účinné látky. Druhým nejpoužívanějším organofosfátem je v České republice dimetoát. Účinnou látku dimetoát nalezneme v komerčních přípravcích BI 58 EC, Danadim Progress a Perfekthion. Třetím nejpoužívanějším organofosfátem je na území České republiky malathion. Tato účinná látka je obsažena v komerčních přípravcích Fyfanon 440 g/l EW. Čtvrtým nejpoužívanějším organofosfátem je na území České republiky chlorpyrifos-metyl, který je obsažen v komerčních přípravcích Daskor a Reldan 22.

3.1.2 Neonikotinoidy

Výzkum neonikotinoidů započal v roce 1970. V roce 1985 se na trhu začíná objevovat první komerční synteticky vyráběný insekticid ze skupiny neonikotinoidů, imidakloprid (Fulton, 2013). Strukturální vzorec imidaklopridu je uveden na Obr. 3.

Titěra (2013) ve studii zaměřené na rozsah a vliv používání vysoce rizikových insekticidů ze skupiny neonikotinoidů pro včely udává, že neonikotinoidy jsou skupinou syntetických insekticidů odvozených od molekuly nikotinu (Obr. 3). Při jejich vývoji od roku 1970 bylo pokládáno za příznivé zjištění, že akutní toxicita neonikotinoidů pro savce je podstatně nižší než u široce používaných organofosfátů a karbamátů. Porovnání toxicity neonikotinoidů a organofosfátů pro savce (krysa) je uvedeno v Tab. 2. Většina neonikotinoidů je daleko méně jedovatá pro savce než pro hmyz (Tab. 3), ale značně jedovaté jsou některé metabolity neonikotinoidů. Metabolity imidaklopridu, thiomethoxamu a acetamipridu jsou uvedeny v Tab. 4. Strukturální vzorce jednotlivých metabolitů jsou uvedeny na Obr. 4 - 6, které jsou znázorněny v Samostatných přílohách na straně 68 - 69.

Tabulka 2 Hodnoty LD₅₀ neonikotinoidních a organofosfátových insekticidů pro savce (krysa)

neonikotinoid	LD ₅₀ (mg/kg živé hmotnosti samce krysy)	organofosfát	LD ₅₀ (mg/kg živé hmotnosti samce krysy)
imidakloprid	450 ¹	chlorpyrifos	82-155 ⁶
klotianidin	2 000 ²	dimetoát	180-330 ⁷
thiamethoxam	1 563 ³	malathion	1 000-1 375 ³
dinotefuran	2 000 ³		
nitenpyram	1 680 ⁴		
thiakloprid	621 ⁵		
acetamiprid	217 ⁴		

Zdroj: ¹Mehlhorn (2001), ²EPA (2003), ³Marrs (2012), ⁴Yamamoto (1999), ⁵WHO (2006),

⁶Gupta (2006), ⁷Kamrin (1997).

Tabulka 3 Porovnání hodnot LD₅₀ neonikotinoidů pro včely a savce (krysa)

insekticid	LD ₅₀ (µg/včela)	LD ₅₀ (µg/kg živé hmotnosti samce krysy)
imidakloprid	18,0 ¹	450 000 ²
klotianidin	22,0 ¹	2 000 000 ³
thiamethoxam	30,0 ¹	1 563 000 ⁴
dinotefuran	75,0 ¹	2 000 000 ⁴
nitenpyram	138,0 ¹	1 680 000 ⁵
thiakloprid	14,6 ¹	621 000 ⁶

Zdroj: ¹ Iwasa a kol. (2013), ² Mehlhorn (2001), ³ EPA (2003), ⁴ Marrs (2012),

⁵ Yamamoto (1999), ⁶ WHO (2006)

Tabulka 4 Metabolity imidaklopridu, klotianidinu a thiamethoxamu

neonikotinoid	metabolity
imidakloprid	6-chloronikotinová kyselina
	6-hydroxynikotinová kyselina
	6-metylmerkaptonikotinová kyselina
	2-imidazolidon
klotianidin	1-metyl-3-nitroguanidin
	Nitroguanidine
	N-(2-chlorothiazol-5-ylmetyl)-N-nitroguanidin
	2-(methylthio)thiazol-5-karboxylová kyselina
	Methylguanidin
thiamethoxam	N-(2-chlorothiazol-5-ylmetyl)-N-nitroguanidin
	3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmetyl)-1,3,5-oxadiazin-4-ylidene (nitro) amin

Zdroj: Hayenga (2008)

Neonikotinoidy jsou v současnosti světově nejrozšířenější skupinou insekticidů. Steier a kol. (2017) udávají, že na trhu je aktuálně okolo pěti set různých neonikotinoidů a obchod s neonikotinoidy činí 25 % z celosvětového obchodu s pesticidy.

Pro neonikotinoidní insekticidy je charakteristické, že jsou velice nestabilní, pokud jsou vystaveny slunečnímu záření. Nestabilita neonikotinoidů na světle je z pohledu včel pozitivní vlastností těchto insekticidů, protože pokud jsou neonikotinoidy v přírodě vystaveny slunečnímu záření, dochází k degradaci neonikotinoidů a následné produkty degradace již nejsou pro včely hrozbou jako samotné neonikotinoidy (Titěra, 2013). Gupta a kol. (2008) sledovali vliv slunečního záření na degradaci dvou neonikotinoidů acetamipridu a thiaklopridu v půdě. Bylo zjištěno, že pokud jsou acetamiprid a thiakloprid vystaveny slunečnímu záření, poločas rozpadu residuí acetamipridu je 25,1 dne a poločas

rozpadu residuí thiaklopridu je 19,1 dne. Titěra (2013) píše, že ve tmě je poločas rozpadu až v řádu let, to do značné míry vysvětluje překvapivě dlouhodobou perzistenci residuí neonikotinoiďů ve včelstvech, zejména v přirozených zásobách potravy.

Podle Tab. 5 jsou nejpoužívanějšími zástupci neonikotinoiďních insekticidů na území České republiky thiakloprid, acetamiprid, thiamethoxam a imidakloprid. Strukturní vzorec thiaklopridu, acetamipridu a thiamethoxamu na Obr. 3.

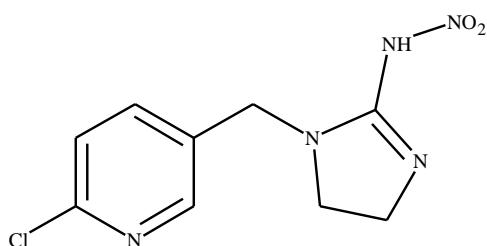
Tabulka 5 Spotřeba neonikotinoiďů na území České republiky v roce 2016

	účinná látka			
	thiakloprid	acetamiprid	thiamethoxam	imidakloprid
spotřebováno celkem (kg)	25 972,18	3 543,65	291,23	50,56
obiloviny (kg)	1 894,54			
kukuřice (kg)	135,63			
luskoviny (kg)	850,63			
řepa cukrová (kg)	227,52			
brambory (kg)	1 057,09	51,29	160,84	
olejiny (kg)	20 658,85	3 278,63		
zelenina (kg)	143,96	0,03	0,03	
ovoce (kg)	867,7	195,74		22,48
chmel (kg)			130,37	28,08

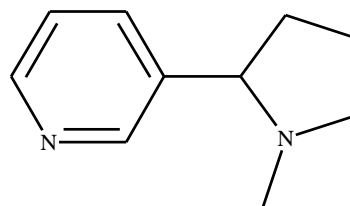
Zdroj: www.ukzuz.cz

Obrázek 3 Strukturní vzorce neonikotinoiďních insekticidů

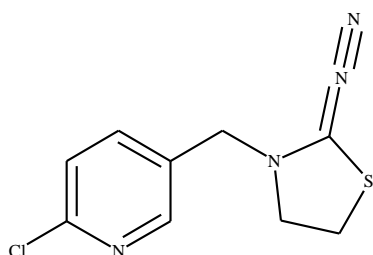
imidakloprid



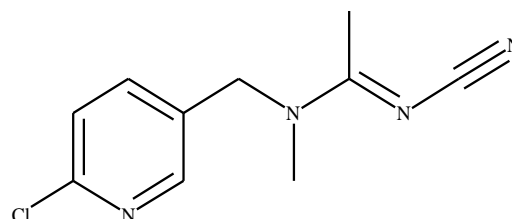
nikotin



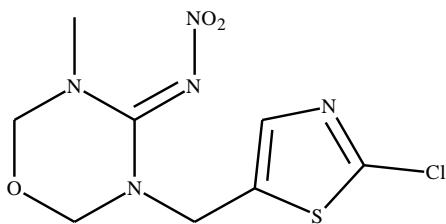
thiakloprid



acetamiprid



thiamethoxam



3.1.2.1 Mechanismu účinku

Hayenga (2008) udává, že mechanismus účinku neonikotinoidů je shodný s mechanismem účinku molekuly nikotinu. Neonikotinoidy se v těle včely váží na nikotinové acetylcholinové receptory (nAChR) hmyzu, čímž dochází k přerušení šíření nervového vzruchu v těle včely. Následně dochází k paralýze a ke smrti hmyzu.

3.1.2.2 Toxicita neonikotinoidů pro včely

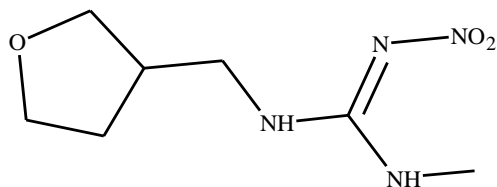
Iwasa a kol. (2013) ve své studii udávají, že nitro substituované neonikotinoidy, tzn. neonikotinoidy, které ve své molekule obsahují skupinu NO_2 , jsou pro včely mnohem více toxické než kyano substituované molekuly neonikotinoidů, které ve své molekule obsahují kyano skupinu CN . Důvodem nižší toxicity kyano substituovaných neonikotinoidů pro včely je podle Iwasa a kol. (2013) to, že kyano substituované neonikotinoidy jsou včelím organismem rychleji metabolizovány než nitro substituované neonikotinoidy, a vzniklé metabolity mají nízkou toxicitu pro včely.

Ve studii Iwasa a kol. (2013) byly zjišťovány hodnoty LD_{50} pro nitro substituované neonikotinoidy imidaklopid, klotianidin, thiamethoxam, dinoterfuran a nitenpyram. Strukturní vzorec dinoterfuranu a nitenpyramu jsou znázorněny na Obr. 7. Hodnoty LD_{50} pro jednotlivé nitro substituované neonikotinoidy jsou uvedeny v Tab. 6.

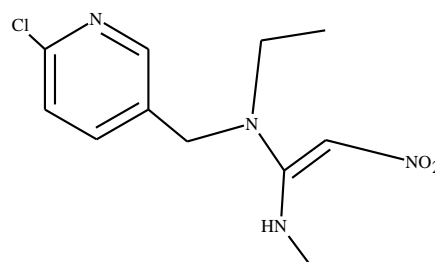
Kyano substituované neonikotinoidy vykazují vyšší hodnoty LD_{50} pro včely. Mezi kyano substituované neonikotinoidy patří acetamiprid a thiaklopid. Hodnoty LD_{50} acetamipridu a thiaklopidu jsou uvedeny v Tab. 6.

Obrázek 7 Strukturální vzorce nitro substituovaných neonikotinoidů

dinotefuran



nitenpyram



Tabulka 6 hodnoty LD₅₀ pro nitro substituované a kyano substituované neonikotinoidy

nitro substituovaný neonikotinoid	LD ₅₀ (ng/včela)
imidaklopid	18
klotianidin	22
thiamethoxam	30
dinotefuran	75
nitenpyram	138
kyano substituovaný neonikotinoid	
thiaklopid	14 600
acetamiprid	7 100

Zdroj: Iwasa a kol. (2013)

Iwasa a kol. (2013) se ve své studii také zaměřili na synergismus neonikotinoidů a dalších chemických látek používaných v zemědělství při ochraně rostlin. Tento synergismus je v zemědělské praxi běžným jevem, protože zemědělci z ekonomických důvodů často kombinují více pesticidních přípravků a hnojiv do jednoho postřiku. Kombinace více pesticidních přípravků a hnojiv může mít zesilující účinek na výslednou toxicitu jednotlivých nejen neonikotinoidních insekticidů.

Ve studii zaměřené na synergistický efekt neonikotinoidů a dalších chemických látek běžně používaných v zemědělství, byly použity látky PBO (piperonyl butoxid). Strukturální vzorec PBO je znázorněn na straně 69 v Samostatných přílohách, Obr. 8. Gerberding (2013) řadí PBO mezi látky, které zvyšují účinnost insekticidních přípravků. Mechanismus účinku PBO spočívá v inhibici enzymů, především enzymů cytochrom P450, které by za nepřítomnosti PBO degradovali insekticidy přítomné v organismu včel a tím dochází ke zvýšení účinku insekticidu na včelí organismus. Dále byly v této studii použity fungicidní přípravky triflumizol, triadimefon, epoxikonazol, propikonazol a jeden regulátor

růstu, unikonazol. Strukturální vzorce jednotlivých fungicidů a uniconazolu jsou součástí Samostatných příloh na straně 70, Obr. 8.

Z výsledků studie Iwasa o kol. (2013) je patrné, že pokud jsou neonikotinoidy acetamiprid, imidakloprid a thiakloprid kombinovány s látkami jako je piperonyl butoxid, triflumizol, triadimefon, epoxikonazol, propikonazol, unikonazol, dochází ke zvýšení výsledné toxicity neonikotinoidů na včelí organismus. Zvýšení toxicity je dokumentováno snížením hodnot LD₅₀ jednotlivých neonikotinoidů pro včely (Tab. 7-9).

Tabulka 7 Synergistický účinek acetamipridu a dalších chemických látek běžně používaných v zemědělství

složení směsi	LD ₅₀ (μg/včela)
pouze acetamiprid	7,07
PBO + acetamiprid	1,17
triflumizol + acetamiprid	0,029
propikonazol + acetamiprid	0,0675
triadimefon + acetamiprid	0,0844
epoxikonazol + acetamiprid	0,5
unikonazol + acetamiprid	1,12

Zdroj: Iwasa a kol. (2013)

Tabulka 8 Synergistický účinek imidaklopridu a dalších chemických látek běžně používaných v zemědělství

složení směsi	LD ₅₀ (μg/včela)
pouze imidakloprid	0,0179
PBO + imidakloprid	0,0105
triflumizol + imidakloprid	0,0097
propikonazol + imidakloprid	0,0118

Zdroj: Iwasa a kol. (2013)

Tabulka 9 Synergistický účinek thiaklopridu a dalších chemických látek běžně používaných v zemědělství

složení směsi	LD ₅₀ (μg/včela)
pouze thiakloprid	14,6
PBO + thiakloprid	0,0948
triflumizol + thiakloprid	0,0128
propikonazol + thiakloprid	0,0261

Zdroj: Iwasa a kol. (2013)

3.1.2.3 Zástupci neonikotinoidů

Agromanuál udává, že thiakloprid je obažen v komerčních přípravcích Biscaya 240 OD, Calypso 480 SC, Calypso AL, Proteus 110 OD a Sonido. Druhým nejpoužívanějším neonikotinoidním insekticidem je na území České republiky acetamiprid. Acetamiprid je účinnou látkou v komerčních přípravcích Aceptir 200 SE, Apis 200 SE, Careo Combi granulát proti škůdcům, Careo Combi tyčinky proti škůdcům, Careo postřik proti škůdcům, Mospilan 20 SP, Substral Careo Ultra. Třetím nejpoužívanějším neonikotinoidním insekticidem je na území České republiky thiamethoxam. Thiamethoxam je obsažen v komerčních přípravcích Actara 25 WG, Compo Axoris, Cruiser 350 FS, Cruiser 70 WS. Nejméně využívaným neonikotinoidem na území České republiky je imidakloprid. Tato účinná látka je součástí komerčních přípravků Confidor 200 OD, Gaucho 70 WS, Janus Forte, Mido 20 SL, Monceren G, Nuprid 600 FS (red), Nuprid 600 FS (white) a Warrant 700 WG.

3.1.2.4 Přítomnost neonikotinoidů v gutační vodě

Tapparo a kol. (2011) udávají, že neonikotinoidy se používají jako mořidla osiv, ze kterých následně vyrůstají rostliny určené ke sklizni. Neonikotinoidní insekticidy, které jsou obsaženy v mořidlech semen, pronikají z mořených semen nejen do rostlinných pletiv, ale také do nektaru, pylu a do gutační vody, kterou rostlina na svém povrchu vylučuje a včely ji mohou využívat jako zdroj vody

Rostliny, které vyrostly z osiva ošetřeného neonikotinoidními přípravky, obsahují ve svých pletivech neonikotinoidy a jsou tak chráněny před hmyzem, který by mohl způsobit ekonomické ztráty na těchto zemědělských plodinách. Moření semen je používanou praktikou především u rostlin, jako je kukuřice, slunečnice a řepka. K moření semen rostlin se používají neonikotinoidy thiamethoxam, klotianidin a imidakloprid. V současné době je používání neonikotinoidních přípravků za účelem moření osiva na území České republiky zakázáno. Více v kapitole 3. 1. 2. 5.

Ve studii Tapparo a kol. (2011) bylo zjištěno, že pokud jsou semena rostlin mořena neonikotinoidními přípravky, je následně zjišťována přítomnost neonikotinoidů v gutační vodě. Hodnoty neonikotinoidů nalezených v gutační vodě jsou natolik vysoké, že mohou mít na včely, které tuto vodu přijímají, letální účinek. Hodnoty neonikotinoidů naměřené v gutační vodě v Tab. 10. Studie Tapparo a kol. (2011) je příkladem toho, že pokud ošetříme semena rostlin účinnou látkou typu neonikotinoid, dochází následně k jejímu vylučování na povrchu listů, do kapiček gutační vody, kde může být přijímána včelami, nebo jiným hmyzem. Hodnoty

neonikotinoidů, které byly zjišťovány v gutační vodě tohoto pokusu měly na včely letální účinek. Z toho plyne, že v gutační vodě tohoto pokusu byly překročeny hodnoty LD₅₀ neonikotinoidů pro včely. V Tab. 11 je udán přehled hodnot LD₅₀ neonikotinoidů, které se při běžné zemědělské praxi ve světě používají.

Tabulka 10 Hodnoty neonikotinoidů naměřené v gutační vodě

neonikotinoid	hodnoty naměřené v gutační vodě (µg/l)
imidaklopid	0,346
klotianidin	0,102
thiamethoxam	0,146

Zdroj: Tapparo a kol. (2011)

Tabulka 11 Hodnoty akutní toxicity neonikotinoidů pro včely

neonikotinoid	akutní orální toxicita LD ₅₀ (µg/včela)	akutní kontaktní toxicita LD ₅₀ (µg/včela)
acetamiprid	14,53	8,01
klotianidin	0,00379	0,04426
imidaklopid	0,0037	0,081
thiaklopid	17,32	38,82
thiamethoxan	0,005	0,024

Zdroj: Titěra (2013)

3.1.2.5 Neonikotinoidy a legislativa Evropské unie

Podle prováděcího nařízení Komise Evropské unie číslo 485/2013 ze dne 24. května 2013 bylo na základě principu předběžné opatrnosti a zprávy Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA), v níž jsou popsána závažná rizika těchto látek pro včely, zakázáno použití a prodej osiva ošetřeného přípravky na ochranu rostlin obsahující účinné látky klotianidin, thiamethoxam a imidaklopid. Ve výše zmíněné zprávě EFSA, Guidance document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus spp.* and solitary bees) z roku 2013, jsou účinné neonikotinoidní látky klotianidin, thiamethoxam a imidaklopid považovány za rizikové pro včely.

Evropská komise udává, že účinné látky klotianidin, thiamethoxam a imidaklopid představují akutní riziko pro včely vyplývající především z expozic prostřednictvím prachu, konzumace residuí v kontaminovaném pylu a nektaru a z expozice prostřednictvím gutační

tekutiny. Kromě toho nelze vyloučit nepříjemné riziko v důsledku akutních nebo chronických účinků na přežití včelstva a jeho další rozvoj.

Aby se minimalizovala expozice včel, je omezeno používání účinných látek klotianidinu, thiamethoxamu a imidaklopridu. Dále jsou omezeny přípravky na ochranu rostlin, které obsahují účinné látky klotianidin, thiamethoxam a imidakloprid. Zejména je zakázáno použití přípravků na ochranu rostlin, které obsahují klotianidin, thiamethoxam a imidakloprid, pro ošetření osiva a pro ošetření půdy v případě plodin atraktivních pro včely, v případě obilovin s výjimkou použití ve sklenících a v případě ozimů. Ošetření listů přípravky na ochranu rostlin, které obsahují klotianidin, thiamethoxam a imidakloprid, je zakázáno v případě plodin atraktivních pro včely a obilovin s výjimkou použití ve sklenících a použití po skončení květu. Plodiny, které se sklízí před vykvetením, se nepovažují za atraktivní pro včely. S přihlédnutím k rizikům spojeným s použitím ošetřeného osiva je zakázáno použití a uvádění osiva ošetřeného přípravky na ochranu rostlin, které obsahují klotianidin, thiamethoxam a imidakloprid, na trh v případě osiva plodin atraktivních pro včely a v případě osiva obilovin s výjimkou ozimů a osiva používaného ve sklenících.

Zákaz se nevztahuje na neonicotinoidy acetamiprid a thiakloprid, které působí na hmyz podobným mechanismem jako výše zmíněné zakázané látky a mohou je proto nahradit. Důvodem, proč zůstala dvojice neonicotinoidů acetamiprid a thiakloprid Evropskou legislativou povolena je to, že jejich hodnoty LD₅₀ pro včely nabývají daleko větších expozičních hodnot než u zakázaných neonicotinoidů imidaklopridu, thiamethoxamu a klotianidinu. Porovnání hodnot LD₅₀ u zakázaných a povolených neonicotinoidních insekticidních přípravků je patrné z Tab. 11.

3.1.3 Pyretriny a pyretroidy

3.1.3.1 Pyretriny

Pyretriny jsou přirozeně se vyskytující insekticidní látky v rostlině kopretina starčekolistá (J. Gerberding, 2003). Pyretriny mohou být extrahovány ze semen, nebo z nadrcených rostlin, které jsou sklizeny krátce po vykvetení rostliny. Rostliny obsahují 1 - 2 % pyretrinů, vztaženo na hmotnost sušiny (Casida and Quistad, 1995). Gunasekara (2004) uvádí, že prášek z těchto rozdrcených rostlin byl pro svůj insekticidní účinek využíván v Číně již kolem roku 1000 př. n. l. Výhoda pyretrinů je to, že jsou v prostředí rychle degradovány, pokud jsou vystaveny slunečnímu záření (J. Gerberding, 2003).

Gunasekara (2004) také píše, že za přítomnosti slunečního záření je 99 % pyretrínů degradováno do pěti hodin.

Todd (2003) popisuje, že pyretriny mohou být kombinovány s látkami, které mají synergizující účinek s pyretriny a výsledná účinnost této kombinace látek je vyšší než účinnost samotného pyretrinu. Mezi tyto synergisty řadíme piperonyl butoxid a piperonyl sulfoxid. Strukturální vzorec piperonyl sulfoxidu je znázorněn v Samostatných přílohách na straně 70, Obr. 9.

3.1.3.2 Pyretroidy

Pyretroidy jsou synteticky vyráběné chemické látky, které mají podobnou chemickou strukturu jako výše popisované pyretriny. Výhodou pyretroidů je to, že jsou více toxické pro hmyz a méně toxické pro savce (Todd, 2003). Porovnání toxicity pyretroidů pro hmyz (včela) a pro savce (krysa) je uvedeno v Tab. 12. Důvodem jejich nízké toxicity pro savce je to, že jsou po přijetí do organismu velice rychle degradovány na sloučeniny, které jsou pro organismus savců méně toxické než samotné pyretroidy.

Tabulka 12 Porovnání hodnot toxicity pyretroidů pro hmyz (včela) a savce (krysa)

pyretroid	LD ₅₀ (μg/včela)	LD ₅₀ (μg/kg živé hmotnosti samce krysy)
cypermetrin	0,025 ¹	247,2 ¹
deltametrin	0,02 ²	2 943,0 ³
λ cyhalotrin	0,05 ²	56,2 ⁴
τ-fluvalinat	8,66 ²	261,0 ⁵

Zdroj: ¹ Jones (1996), ² Bayo (2014), ³ Junquera (2017), ⁴ Woltering (2007), ⁵ Kamrin (1997)

Nevýhodou pyretroidů je to, že jsou ze životního prostředí degradovány delší dobu než pyretriny. Takahashi (1985) prováděl pozorování, kdy pyretroidní sloučeninu cypermetrin aplikoval do půdy, a sledoval rychlost degradace cypermetrinu. Pokud je cypermetrin v půdě vystaven slunečnímu záření, tak se jeho poločas degradace pohybuje v intervalu 0,6 - 1,9 dne. Pokud cypermetrin nebyl v půdě vystaven slunečním záření, bylo po sedmi dnech sledováno jeho množství v intervalu 80,8 - 94,2 % z výchozího množství. Při sledování rychlosti degradace ve vodě bylo v Takahashiho studii zjištěno, že poločas degradace se ve vodě pohybuje v intervalu 0,6 - 2,6 dne za přítomnosti slunečního záření. Při měření poločasu degradace cypermetrinu ve vodě za nepřítomnosti slunečního záření Takahashi dospěl k závěru, že po deseti

dnech se množství cypermetrinu pohybovalo v intervalu 55,3 - 97,4 % z výchozího množství cypermetrinu.

Pyretroidy jsou v praxi často kombinovány s látkami, které zvyšují účinnost pyretroidních insekticidních látek. Látky, které zvyšují účinnost samotných pyretroidů, jsou piperonyl butoxid a piperonyl sulfoxid. Mechanismus účinku piperonyl butoxidu a piperonyl sulfoxidu je inhibice detoxikačních enzymů, především enzymu cytochrom P450. Pokud jsou tedy pyretroidní insekticidy kombinovány s piperonyl butoxidem či piperonyl sulfoxidem, detoxikační enzymy včelího organismu jsou inhibovány, což vede ke zvyšování účinku pyretroidů na organismus (Gerberding, 2003).

Na území České republiky řadíme mezi nejpoužívanější pyretroidní insekticidy cypermetrin, deltametrin, λ cyhalotrin a τ -fluvalinát (Tab. 13).

Tabulka 13 Spotřeba pyretroidů na území České republiky v roce 2016

	účinná látka			
	cypermetrin	deltametrin	λ cyhalotrin	τ -fluvalinát
spotřebováno celkem (kg)	19 170,89	1 810,28	1 382,56	832,58
obiloviny (kg)	5 930,43	549,53	669,18	
kukuřice (kg)	170,50	12,92	85,67	
luskoviny (kg)	280,63	41,74	20,02	
řepa cukrová (kg)	395,08	22,75	14,74	
brambory (kg)	106,90	16,82	26,82	5,02
olejniny (kg)	12 286,09	1 144,65	541,78	827,56
zelenina (kg)	1,25	12,38	15,09	
ovoce (kg)		0,81	0,10	
ostatní (kg)		8,68	9,16	

Zdroj: www.ukzuz.cz

3.1.3.3 Mechanismus účinku pyretroidů

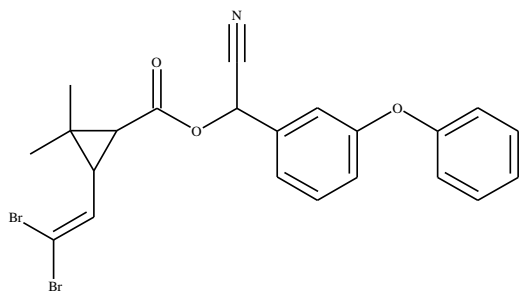
Junquera (2017) udává, že mechanismus působení synteticky vyráběných pyretroidů spočívá v blokaci přenosu nervového vzruchu. Konkrétně dochází k blokaci uzávěru sodíkových kanálů v průběhu depolarizace membrány neuronu, to vede k narušení přenosu nervového vzruchu. Pokud je hmyz vystaven nízkým koncentracím pyretroidů, projevem této expozice je hyperaktivita. Při vyšších koncentracích je hmyz paralyzován a následně dojde ke smrti.

3.1.3.4 Toxicita pyretroidů pro včely

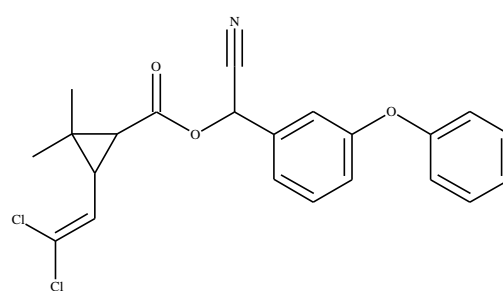
Fishel (2005) ve své publikaci uvádí, že pyretroidy deltametrin, λ cyhalotrin a cypermetrin jsou pro včely vysoce toxické. Vysoce toxické látky pro včely jsou ty, jejichž hodnota LD_{50} se pohybuje pod hranicí 2 $\mu\text{g}/\text{včela}$. Účinná látka τ -fluvalinát je podle Fishela (2005) řazena mezi látky se střední toxicitou pro včely. Hodnoty LD_{50} pro látky se střední toxicitou se pohybují v rozmezí 2 - 11 $\mu\text{g}/\text{včela}$. Hodnoty LD_{50} jednotlivých pyretroidních insekticidů jsou uvedeny v Tab. 12. Strukturální vzorce deltametrimu, λ cyhalotrinu, cypermetrimu a τ -fluvalinátu na Obr. 10.

Obrázek 10 Strukturální vzorce pyretroidních insekticidů

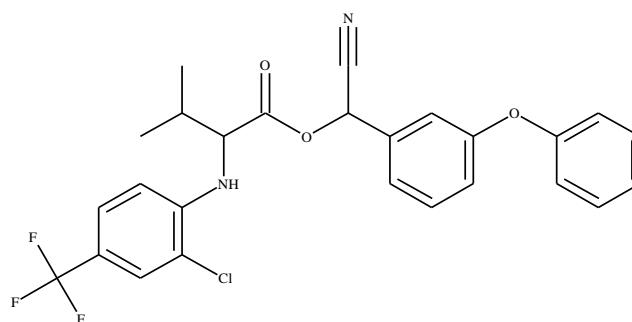
deltametrin



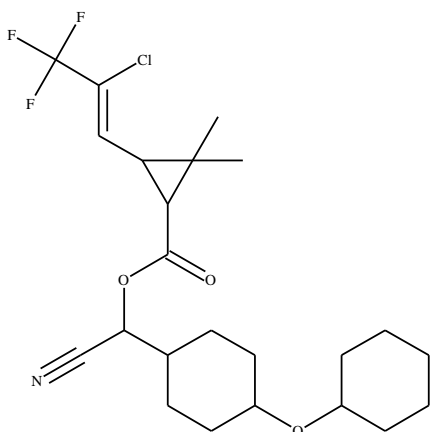
cypermetrin



τ -fluvalinát



λ cyhalotrin



3.1.3.5 Zástupci

Agromanuál udává, že látka cypermetrin je obsažena v komerčních přípravcích Cyperkill 25 EC, Cyperkill Max, Daskor, Forester, Nurelle D a Talisma EC. Druhým nejpoužívanějším pyretroidem je deltametrin. Deltametrin je součástí komerčních přípravků Decis AL, Decis Forte, Decis Mega, Decis Protec, Delcaps 050 CS, Deltop 050 CS, Fast M, Granprotec, K-Obiol EC 25, Poleci, Proteus 110 OD a Scatto. Třetím nejvyužívanějším pyretroidem je podle Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského λ cyhalotrin. Ten je obsažen v komerčně prodávaných přípravcích Ampligo, Hunter SPU, Kaiso Sorbie, Karate se Zeon technologií 5 CS a Karis 10 CS. Mavrik 2 F je komerčně prodávaný insekticid, ve kterém je jako účinná látka zastoupena τ -fluvalinát.

Dle Výzkumného ústavu včelařského je pyretroidní sloučenina τ -fluvalinát využívána v boji proti roztoči rodu *Varroa*. Přípravky, ve kterých je obsažena účinná látka τ -fluvalinát slouží především k preventivním ošetřením včelstev proti roztoči *Varroa destructor*. Mezi tyto přípravky patří Varidol 125, MP 10 FUM, M-1 AER a Gabon PF 90.

3.1.4 Insekticidy ve včelích produktech

Residua insekticidních přípravků se mohou vyskytovat ve včelích produktech, především v medu, pylu a vosku. Fontana a kol. (2010) udává, že residua insekticidů jsou nebezpečná nejen pro samotné včely, ale mohou také ohrozit zdraví člověka, protože působí na organismus toxicky. Jedním z parametrů kvality medu je MRL (maximální residuální limity). Evropská komise popisuje maximální residuální limity jako nejvyšší hodnoty pesticidních residuí, které jsou legálně tolerovány v potravinách. Dále Evropská komise udává, že množství

residuí v potravinách musí být pro spotřebitele bezpečné a zároveň by měly být tyto hodnoty co nejnižší. V Tab. 14 jsou uvedeny maximální residuální limity vybraných insekticidů.

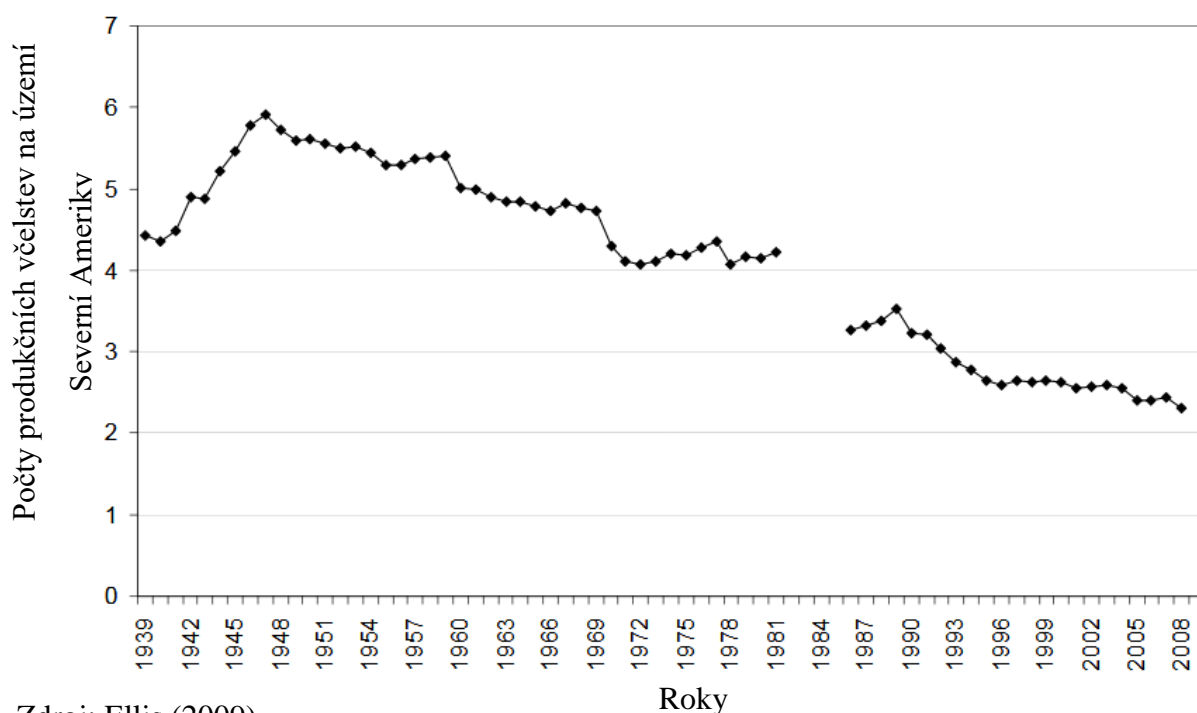
Tabulka 14 Maximální residuální limity (MRL) mg/kg pro potraviny určené k lidské spotřebě

potravina	chlorpyrifos	cypermetrin	deltametrin	thiakloprid	τ -fluvalinát
med a ostatní včelí produkty	0,05	0,05	0,05	0,2	0,05

Zdroj: Evropská komise (2016)

Wiest a kol. (2011) píší, že po celém světě dochází ke zvýšené mortalitě včel. Klesající počty včelstev jsou nejvíce patrné na území Severní Ameriky (Obr. 11). Jedna z hypotéz, která vysvětluje zvýšenou mortalitu včel, je to, že dochází k nadměrnému používání pesticidních přípravků. Tette a kol. (2016) uvádějí, že toto nadměrné využívání pesticidních přípravků přineslo významné benefity pro zemědělství. Ovšem negativním dopadem využívání pesticidních přípravků je zasažení necílových organismů, kontaminace půdy, vody a potravin.

Obrázek 11 Klesající počty produkčních včelstev na území Severní Ameriky



Zdroj: Ellis (2009)

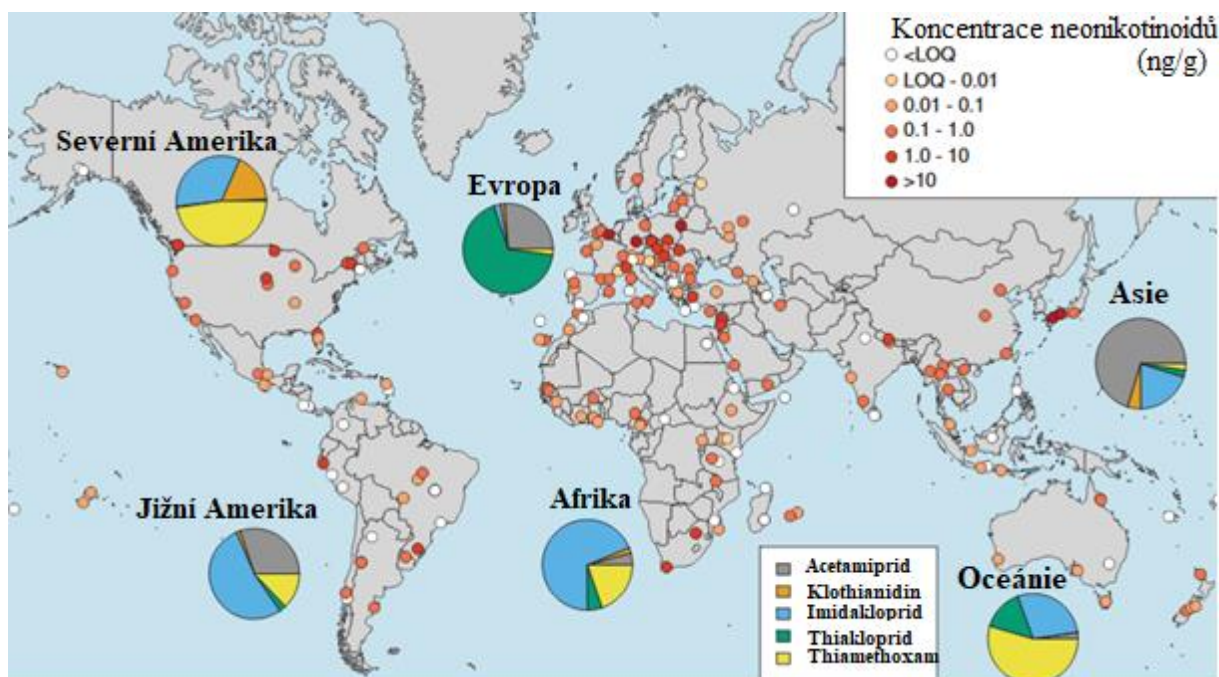
Tette a kol. (2016) napsali, že při užívání pesticidů dochází ke kontaminaci prostředí pesticidními přípravky a následně mohou být tyto pesticidní látky přítomny ve včelích produktech. Z tohoto důvodu je důležité vyhodnocovat hladiny residuí ve včelích produktech

a zjišťovat potenciální rizika pro zdraví spotřebitele a včel. Takovýto monitoring může posloužit jako kontrola používání pesticidních přípravků a jako kontrola dodržování správných zemědělských postupů jednotlivých zemědělských podniků. V tomto ohledu mohou být jednotlivé včelí produkty využity jako biologické indikátory pro hodnocení stavu životního prostředí. Nadměrné používání pesticidních přípravků je podle vědců příčinou výskytu syndromu zhroucení včelstev nazývaného CCD (Colony Collapse Disorder). Více o syndromu CCD v kapitole 3. 1. 5.

Mitchell a kol. (2017) ve své studii testovali vzorky medu od včelařů ze všech trvale obydlených kontinentů. Vědci pátrali po neonikotinoidech acetamipridu, klotianidinu, imidaklopridu, thiaklopridu a thiamethoxamu. Konečná bilance této celosvětové inventury zveřejněná v předním vědeckém časopise Science je neradostná. Více než tři čtvrtiny ze 198 analyzovaných medů obsahovaly alespoň jeden sledovaný neonikotinoid. Nejhorší situace byla v Severní Americe, kde bylo alespoň jedním neonikotinoidem kontaminováno 86 % analyzovaných vzorků medu. Následují Asie s 80 % a Evropa se 79 % kontaminace. Nejméně medů kontaminovaných neonikotinoidy má Jižní Amerika. Ale i tam se alespoň jeden z pěti neonikotinoidů našel ve více než polovině medů, konkrétně šlo o 57 % analyzovaných vzorků. U 45 % vzorků se našly dva nebo tři neonikotinoidy a každý desátý vzorek obsahoval čtyři nebo pět neonikotinoidů. Kontaminace větším počtem neonikotinoidů byla opět nejčastější v Severní Americe, Asii a Evropě a nejnižší v Jižní Americe a Oceánii.

Nejčastěji identifikovaným neonikotinoidem se ukázal imidakloprid, který byl přítomný ve více než polovině vzorků. Relativně vzácně (16 %) se vyskytoval v medu klotianidin. Důvodem nižšího výskytu klotianidinu je to, že jeho používání v celosvětovém měřítku je menší, než u ostatních neonikotinoidů (Obr. 12). Nejvyšších koncentrací dosahovaly v medu acetamiprid a thiakloprid. Přitom se ukázalo, že různým oblastem dominují různé neonikotinoidy. Pro Afriku a Jižní Ameriku je typický výskyt imidaklopridu, v Evropě je hlavním neonikotinoidem thiakloprid. V Asii převládá acetamiprid a v Oceánii a Severní Americe thiamethoxam.

Obrázek 12 Celosvětový přehled kontaminace medů a přehled neonikotinoidů, které jsou zemědělci na jednotlivých kontinentech nejvíce využívány (LOQ – limit kvantifikace)



Zdroj: Mitchell a kol. (2017)

Ravoet a kol. (2015) uvádí, že ve studii, kterou provedli na deseti belgických včelstvech, našli residuální stopy osmnácti pesticidů. V této studii nebyl analyzován jediný vzorek včelího vosku, který by měl nulovou hodnotou residuí insekticidů. Tato residua pochází z několika zdrojů. Jedním zdrojem jsou veterinární přípravky, které se používají především k preventivnímu ošetření včelstev proti roztoči rodu *Varroa*.

Hillesheim a kol. (1996) popisují roztoče rodu *Varroa* jako jednoho z nejvýznamnějších ohrožení evropských včel. Roztoč rodu *Varroa* původně parazitoval na včelách *Apis cerana*, které jsou typické pro Asijský kontinent. Později tento roztoč zasáhl také včelu *Apis mellifera*, která je charakteristická pro náš Středoevropský region. Bohužel se naše, nám bližší včela *Apis mellifera*, zatím nedokázala tomuto roztoči přizpůsobit a při napadení včelstev tímto roztočem je výsledek často fatální. Proti tomuto roztoči existuje řada přípravků, které se aplikují především jako prevence proti masivnímu rozšíření daného roztoče ve včelstvu. Na území České republiky jsou nejrozšířenějšími účinnými látkami, které se využívají při každoroční prevenci proti roztočům rodu *Varroa*, pyrethroid τ -fluvalinát a sloučenina s akaricidními vlastnostmi amitraz. Ravoet a kol. (2015) ve vzorcích včelího vosku pocházejícího z Belgie detekovali τ -fluvalinát ve všech analyzovaných vzorcích včelího vosku.

Dalším zdrojem residuí pesticidů ve včelích produktech jsou pesticidní přípravky, které se využívají v zemědělské praxi za účelem ochrany rostlin proti škůdcům. Údaje o kontaminaci

včelích produktů pesticidními přípravky, které nejsou spotřebiteli konzumovány, vosk a pyl, jsou méně časté než údaje o kontaminaci medu pesticidními residui. Ovšem med přichází do těsného kontaktu s voskem a rezidua pesticidů mohou difundovat ze včelího vosku do medu, a proto by neměly být údaje o obsahu pesticidních přípravků ve vosku opomíjeny.

Chauzat (2007) zjišťoval přítomnost residuí pesticidů ve včelím vosku na území Francie. Chauzat zjistil, že nejčastěji se vyskytujícím pesticidním residuem ve včelím vosku byl τ -fluvalinát. Residua τ -fluvalinátu byla obsažena v 61,9 % vzorků. Byla zjištěna i přítomnost dvou pyreteroidních sloučenin. Cypermetrin byl zjištěn v 21,9 % vzorků. Deltametrin byl zjištěn v 2,4 % vzorků. Tato studie byla provedena na počtu 125 včelstev.

Boi (2015) provedl studii na Italském území, bylo analyzováno 1319 vzorků včelího vosku. Residua τ -fluvalinátu vykazovala druhou nejvyšší incidenci. Tato látka byla detekována u 38 % vzorků. Residua pesticidů byla nalezena i ve vzorcích vosku pocházejících ze Španělska. Studii se španělskými vzorky včelího vosku provedl v roce 2010 Serra-Bonvehia. 93,6 % vzorků bylo pozitivních na τ -fluvalinát. Kontaminace včelího vosku residui pesticidů ve studiích Ravoeta a kol. (2015), Chauzata (2007), Boie (2015) a Serra-Bonvehia (2010) je považována za závažnou s ohledem na negativní vliv residuí na zdraví včel.

Mullin a kol. (2010) ve studii provedené v Severní Americe našel 121 různých pesticidů v 887 vzorcích vosku, pylu a včel. Téměř 60 % z celkového počtu 259 vzorků vosku a 350 vzorků pylu obsahovalo residua alespoň jednoho pesticidního přípravku. Ve vzorcích vosku bylo nalezeno 87 různých pesticidů a metabolitů. Nejvyšší počet jednotlivých pesticidů v jednom vzorku vosku je roven číslu 39 a průměrný počet detekovaných pesticidů v jednom vzorku vosku je 8. Výběr pesticidů, které byly zjištěny ve vzorcích včelího vosku této studie je uveden v Tab. 15. Při analýzách pylu bylo identifikováno 98 pesticidů a nejvyšší počet pesticidů detekovaných v jednom vzorku pylu je 31. Průměrný počet detekovaných pesticidů v jednom vzorku byl 7,1. Výběr pesticidů, které byly zjištěny ve vzorcích pylu této studie je znázorněn v Tab. 16. Při analýzách včel byla zjištěna nižší detekce residuí, konkrétně 2,5 residua na jeden vzorek. Nejvyšší počet residuí pesticidů ve vzorku včely byl roven hodnotě 25. Výběr pesticidů, které byly zjištěny ve vzorcích včel této studie je uveden v Tab. 17.

Tabulka 15 Výběr pesticidů, které byly detekovány ve vzorcích včelího vosku ze Severní Ameriky

insekticid	pozitivní vzorky	analyzované vzorky	% pozitivních	nejvyšší koncentrace (ppb)	nejnižší koncentrace (ppb)
τ-fluvalinat	254	259	98,1	204000,0	2,0
chlorpyrifos	163	258	63,2	890,0	1,0
cypermetrin	13	258	5,0	131,0	4,5
λ cyhalotrin	13	258	5,0	16,9	1,0
deltametrin	8	258	3,1	613,0	107,0
thiakloprid	4	208	1,9	7,8	1,9

Zdroj: Mullin a kol. (2010)

Tabulka 16 Výběr pesticidů, které byly detekovány ve vzorcích pylu ze Severní Ameriky

insekticid	pozitivní vzorky	analyzované vzorky	% pozitivních	nejvyšší koncentrace (ppb)	nejnižší koncentrace (ppb)
τ-fluvalinat	309	350	88,3	2670	1,6
chlorpyrifos	153	350	43,7	830	0,1
cypermetrin	25	350	7,1	49	1,6
deltametrin	11	350	3,1	91	28
thiakloprid	19	350	5,4	115	1,7

Zdroj: Mullin a kol. (2010)

Tabulka 17 Výběr pesticidů, které byly detekovány ve vzorcích včel ze Severní Ameriky

insekticid	pozitivní vzorky	analyzované vzorky	% pozitivních	nejvyšší koncentrace (ppb)	nejnižší koncentrace (ppb)
τ-fluvalinat	117	140	83,6	5860,0	1,1
chlorpyrifos	12	140	8,6	10,7	1,0
cypermetrin	9	140	6,4	25,8	2,0
λ cyhalotrin	3	140	2,1	1,8	1,1
deltametrin	6	140	4,3	39,0	23,0

Zdroj: Mullin a kol. (2010)

Wallner (1998) udává, že kontaminovaný vosk rezidui pesticidů je významným zdrojem residuí pesticidů v medu. Pokud jsou ve včelím vosku obsažena residua pesticidů a tento vosk přijde do kontaktu s medem, dochází na základě procesu difuze k migraci residuí z vosku do medu. Včelí vosk dokáže absorbovat enormní množství residuí. Bonzini a kol. (2010) udávají, že důvodem akumulace enormního množství residuí pesticidů ve vosku je chemická vlastnost

lipofilita. Na základě této chemické vlastnosti dochází k hromadění pesticidů v matricích tukové povahy, mezi které patří i vosk.

Akaricidní přípravky se používají jako preventivní ochrana proti roztoči *Varroa destructor*. Ve studiích Ravoeta a kol. (2015), Chauzata (2007), Boie (2015) a Serra-Bonvehia (2010) byla nalezena residua akaricidu τ -fluvalinátu. Residua akaricidů ve včelím vosku jsou příčinou vzniku resistencí roztočů na dané akaricidy. Většina pesticidů je rozpustná v tucích, a proto se ve včelím vosku obvykle nacházejí vyšší množství residuí, než je tomu například u pylu, nebo medu.

Wu (2011) ve své studii zkoumala vliv residuí pesticidů na vývoj včelího plodu a následnou délku života včelích dělnic. Pokud je včelí plod vychováván ve voskovém díle, které obsahuje residua pesticidů, nedochází v porovnání s plodem, který byl vychováván ve voskovém díle neobsahující residua pesticidů, ke zvýšené mortalitě plodu. Dospělé dělnice, které vznikly z plodu, který byl uložen ve voskovém díle, které obsahovalo pesticidní residua, mají zkrácenou délku života v průměru o 4 dny. Dalším faktem je to, že dochází k prodloužení vývoje včelího jedince až o několik dní. Toto prodloužení vývoje včelího jedince od fáze vajíčka až po vznik dospělého jedince vede k reprodukčním výhodám roztoče *Varroa destructor*. Tato reprodukční výhoda roztoče *Varroa destructor* spočívá v prodloužení délky vývoje roztoče, což vede k tomu, že dochází ke vzniku většího počtu reprodukčně aktivních jedinců a následně k většímu rozšíření roztoče *Varroa destructor* ve včelstvu. Z této studie vyplývá především to, že všechny věkové kategorie včel jsou náchylné k účinkům pesticidních přípravků.

Pesticidy mají dle studie Wu (2011) vliv i na včelí matky. Matky mohou přijít do kontaktu s pesticidy či s residuí pesticidů několika možnými cestami. První možnou cestou, kdy může dojít ke kontaminaci matky, je kontakt s kontaminovanými včelami. Další možností přenosu je kontaminovaný vosk, či zdroje potravy, které matka přijímá. Expozice matky pesticidům vede k její snížené reprodukční schopnosti. Mezi snížené reprodukční schopnosti u matek patří snížená tvorba vajíček či menší hmotnost vaječnicků. Collins a Pettis (2012) prováděli studii se včelími matkami. Chtěli prokázat, že pokud jsou matky v larválním vývoji vystaveny působení akaricidů, mají následně v dospělosti menší hmotnost, menší objem spermatéky, menší množství spermií ve spermatéce oproti matkám, které těmto nepříznivým vlivům vystaveny nebyly. Ovšem tento jev se nepodařilo prokázat.

Jak již bylo zmíněno výše, residua akaricidů používaných proti roztoči *Varroa destructor* obsažená ve včelím vosku mohou vést k tvorbě resistencí na používané akaricidní

přípravky. Milani (1999) ve své práci popisuje příčiny vzniku a dopady vzniku resistencí roztočů *Varroa destructor* na účinnou látku τ -fluvalinát na Italském území.

V letech 1991-1992 došlo v některých regionech severní Itálie k velkým ztrátám včelstev. Z dostupných statistických hodnot je možné vyčíst, že ztráty včelstev dosahovaly hodnot 50 % a v některých regionech až 90 %. Tento úbytek včelstev byl způsoben roztoči *Varroa destructor*, kteří si vytvořili resistenci vůči léčivům, která byla v daném regionu používána k jejich preventivnímu tlumení. Hillesheim a kol. (1996) zjišťovali, jaké mechanismy roztočů rodu *Varroa* vedou k větší odolnosti vůči účinné látce τ -fluvalinát. Bylo zjištěno, že resistance roztočů na účinnou pyretroidní sloučeninu τ -fluvalinát lze vysvětlit zvýšenou aktivitou detoxikačních enzymů. V tomto případě se jedná o enzym monooxygenázu, která je součástí komplexu cytochrom P450. Hodnota LC_{50} udává smrtelnou koncentraci látky ve vzduchu pro polovinu počtu organismů vystavených této dávce po dobu 1 hodina. Při použití inhibiční látky PBO (piperonyl butoxid), která inhibuje aktivitu monooxygenázy, došlo k výraznému snížení hodnot LC_{50} .

Fries (1998) publikoval studii, ve které posuzuje vliv residuí τ -fluvalinátu ve včelím vosku na plodnost a mortalitu roztoče *Varroa jacobsoni*. Tento pokus byl koncipován tak, že do vosku prostého residuí, ze kterého byly následně vytvářeny mezistěny, byl přidán τ -fluvalinát v koncentraci 1, 10 a 100 ppm. Účinek τ -fluvalinátu na roztoče byl pozorovatelný od koncentrace 100 ppm, kdy byla pozorována snížená fertilita roztoče. Ovšem tento jev neplatil v případě, kdy byla sledována fertilita roztoče na vyvíjejícím se plodu v druhé a vyšší generaci vznikajícího v buňkách včelího díla, kde již došlo k vývoji jedné generace včel. Tento jev je patrně způsoben tím, že pokud již v daných buňkách proběhl vývoj jedné generace plodu, dochází zde k hromadění tzv. košilek. Košilky jsou obaly vývojového stádia včelí larvy, které po vzniku dospělého jedince zůstávají v buňkách včelího díla, kde probíhal vývoji včelího jedince. Tyto košilky následně fungují jako bariéra mezi residui akaricidů obsaženými ve vosku a roztoči vyskytujícími se v buňkách.

Wu a kol. (2012) uvádějí, že včelí plod, který byl chován ve voskovém díle obsahující pesticidní residua, následně vykazuje vyšší náchylnost k infekci organismem hmyzomorka včelí (*Nosema ceranae*). Tento organismus způsobuje u dospělých včelích jedinců průjmová a zažívací postižení a pokud se mikrosporidie hmyzomorky včelí nadlimitně rozšíří ve včelstvech, může tento jev vést až k samotnému zániku postižených včelstev.

3.1.5 Syndrom zhroucení včelstev CCD (Colony Colapse Disorder)

Mullin a kol. (2010) píše, že v pokusu, který byl proveden v USA, bylo zjištěno 98 pesticidů a metabolitů pesticidů, které se v analyzovaných vzorcích vyskytovaly ve vyšších koncentracích než 214 ppm. Tyto hodnoty byly naměřeny v matricích, které jsou včelami přijímány jako potrava, či s těmito matricemi přichází do těsného každodenního kontaktu. Pokud jsou včely vystaveny těmto pesticidním residuům, které se podle této studie vyskytují v potravě včel v relativně vysokých koncentracích, zcela jistě dochází k negativnímu ovlivnění jejich zdravotního stavu. Desneux (2006) uvádí, že pokud jsou včely vystaveny účinkům pesticidů, dochází ke snižování počtu plazmocytů, které jsou odpovědné za imunitní reakci organismu. Plazmocyty řadíme mezi bílé krvinky a při snížení jejich množství může docházet k negativnímu ovlivnění zdravotního stavu včel. Desneux (2006) zjistil, že pokud jsou včely vystaveny účinkům pesticidů, dochází k poklesu plazmocytů o 13-16 %. Účinky pesticidních látek jsou dávány do přímé souvislosti se syndromem CCD (Colony Colapse Disorder).

Jedna třetina včelstev v USA nepřežila období zimy v letech 2006-2009. Tyto alarmující hodnoty se netýkají pouze primárního opylovače *Apis mellifera*, nýbrž dochází k úbytku i ostatních opylovačů. V poslední době není tento fenomén pouze problémem USA, ale případy podobného typu jsou hlášeny již i na Evropském kontinentu. Syndrom zhroucení včelstev je charakterizován typickými symptomy, mezi které patří rychlá ztráta dospělých včel, ale nikoliv ztráta plodu a matky. V těchto včelstvech nejsou původci včelích onemocnění a parazitů včel.

Pesticidy jsou již dlouho podezřelé z poklesu stavů včelstev a jsou to sloučeniny, při jejichž detekci byla využívána metoda plynové chromatografie (GC-MS). Následně došlo k rozmachu systémových pesticidů, které mají za úkol chránit celou rostlinu, včetně květu. Pokud se tyto systémové pesticidy nacházejí i v květech jsou jimi také kontaminovány zdroje potravy opylovačů, jako je pyl a nektar. Mezi systémové pesticidy řadíme neonikotinoidy. S rozvojem separační metody kapalinová chromatografie používané společně s detekční metodou hmotnostní spektrometrie (LC-MS) je možné tyto systémové pesticidy detekovat v již relativně nízkých koncentracích. Možná residua je možné díky těmto metodám detekovat již na úrovni ppb. Detekce v jednotkách ppb by bez LC-MS nebyla možná. Tyto nízké koncentrace působí na opylovače subletálně, to znamená, že tyto nízké koncentrace opylovače nezabíjí, ale ovlivňují jejich chování, či imunitní systém.

3.1.6 Legislativní ochrana včel v České republice

Včelařství (2018) uvedlo, že Česká republika patří mezi první zemi, která legislativně upravila ochranu včel při použití přípravků na ochranu rostlin. První právní úprava ochrany včel spadá již do roku 1957, kdy tehdejší Ministerstvo zemědělství a lesního hospodářství vypracovalo pro způsob ošetřování rostlin chemickými prostředky vyhlášku číslo 79/1957 Sb. O šest let později byla vydána vyhláška Ministerstva zemědělství, lesního a vodního hospodářství číslo 37/1963 Sb. ve znění pozdějších novel o ochraně včel, ryb a lovné zvěře při hubení škůdců přípravky na ochranu rostlin. Tato vyhláška byla vydána na základě zmocňovacího ustanovení zákona číslo 188/1950 Sb. o zdokonalení rostlinné výroby a zákona číslo 11/1955 Sb. o vodním hospodářství. Uvedené zákony však obsahovaly jen rámcová ustanovení o ochraně zdraví lidí a zvířat při hubení škůdců rostlin přípravky na ochranu rostlin, takže vyhláška číslo 37/1963 Sb. byla komplexní právní úpravou.

V současné době danou problematiku upravují dva předpisy – zákon o rostlinolékařské péči číslo 326/2004 Sb. (ve znění poslední novely číslo 299/2017 Sb.) a vyhláška o ochraně včel, zvěře, vodních organismů a dalších necílových organismů při použití přípravků na ochranu rostlin číslo 327/2012 Sb. (ve znění poslední novely číslo 428/2017 Sb).

3.1.7 Otravy včelstev v České republice

Od roku 2014 jsou Státní veterinární správou sumarizovány roční úhyny včelstev. Tyto jednotlivé úhyny, které jsou na následujících mapách zobrazeny (Obr. 13–16), jsou úhyny, ke kterým byla přivolána Státní veterinární správa jako nejvyšší autorita při snaze vyšetřit příčiny jednotlivých úhynů včelstev.

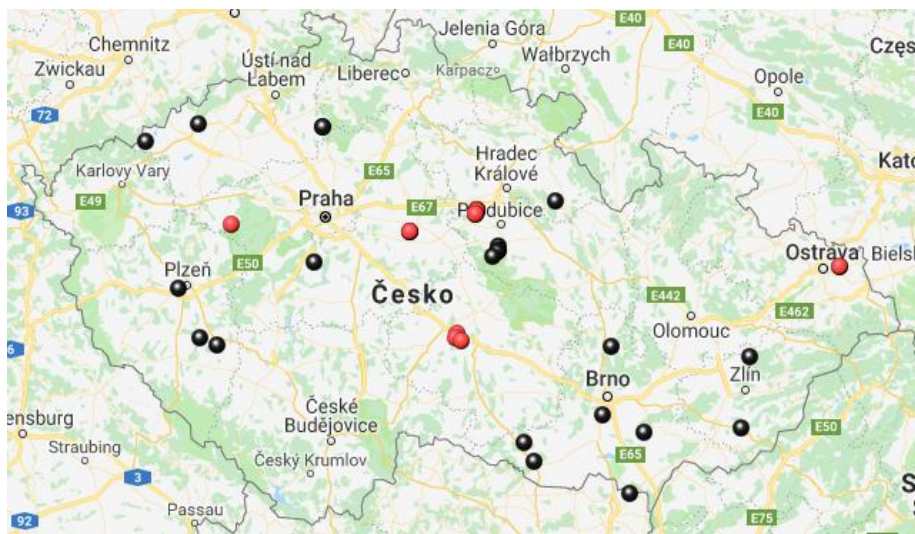
Na Obr. číslo 13–16 jsou černými body znázorněny případy šetření úhynů včelstev při podezření na použití prostředků na ochranu rostlin. Červenými body jsou znázorněny prokázané úhyny včelstev, související s použitím prostředků na ochranu rostlin. Z následujících map zveřejněných Státní veterinární správou je mezi roky 2014–2017 patrný klesající trend výskytu prokázaných otrav včelstev prostředky na ochranu rostlin.

Obrázek 13 Mapa stanovišť s šetřením příčin hromadných úhynů včelstev v roce 2014



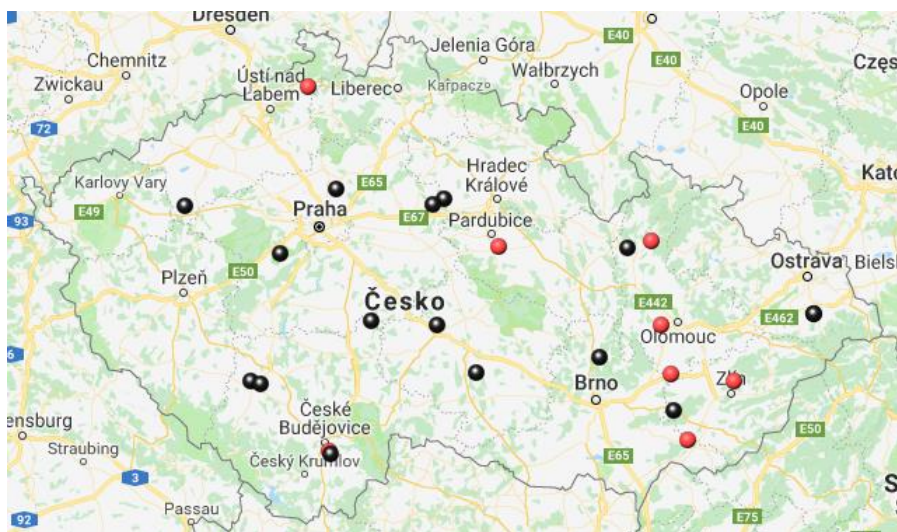
Zdroj: www.svs-cr.cz

Obrázek 14 Mapa stanovišť s šetřením příčin hromadných úhynů včelstev v roce 2015



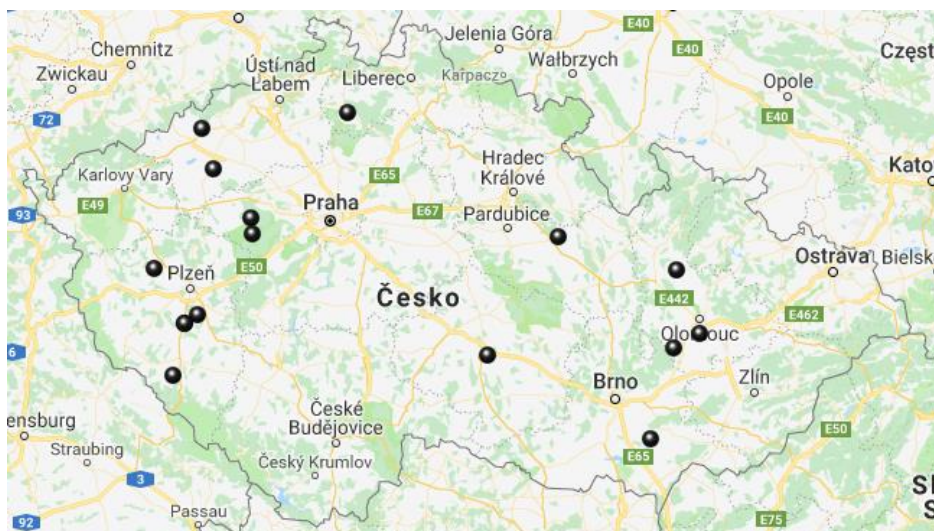
Zdroj: www.svs-cr.cz

Obrázek 15 Mapa stanovišť s šetřením příčin hromadných úhynů včelstev v roce 2016



Zdroj: www.svs-cr.cz

Obrázek 16 Mapa stanovišť s šetřením příčin hromadných úhynů včelstev v roce 2017



Zdroj: www.svs-cr.cz

3.1.8 Postup při ohlášení a šetření otravy včel

Erban a kol. (2017) uvádějí, že dle platné legislativy vyhlášky č. 327/2012 Sb. musí být vzorky uhynulých včel ze stanoviště, kde došlo k úhynu včelstva či včelstev, doručeny odbornému ústavu k provedení analýzy nejpozději do 72 hodin po ošetření porostu. Vzorky uhynulých včel musí být odebrány v počtu nejméně 500 uhynulých jedinců a vzorek rostlin ošetřených pesticidními přípravky musí odpovídat hmotnosti minimálně 200 g.

V § 51 zákona č. 326/2004 Sb. je uvedeno, že zjistí – li chovatel, že došlo k úhynu včel v důsledku použití přípravku na ochranu rostlin, oznámí to neprodleně příslušné Krajské veterinární správě (KVS). Pro účely úspěšného prokázání otrav včel jsou za tímto účelem zřízeny tzv. krizové linky Státní veterinární správy, které jsou v jarním období dostupné 24 hodin denně. Veterinární lékař KVS provede místní šetření na stanovišti včel. Veterinární správa kontaktuje rostlinolékaře Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZUZ), který provede místní šetření u zemědělců obhospodařující pole v okolí stanoviště včelstev s podezřením otravy včelstev. Má – li veterinář pochybnosti o příčině úhynu v souvislosti s použitím přípravku po vyloučení jiných příčin úhynu (např. úmyslná otrava, varroáza, bakteriální choroby) zajistí odběr vzorků způsobem stanoveným prováděcím právním předpisem, jejich vyšetření odborným ústavem a informování chovatele včel o výsledku tohoto vyšetření. Záznam o výsledku místního šetření a výsledek vyšetření vzorků poskytne veterinář ÚKZUZ a chovatelům včel, pokud jsou tyto osoby důsledky použití přípravku dotčeny. Rostlinolékař ÚKZUZ určí, zda došlo k porušení zákona č. 326/2004 Sb. o rostlinolékařské péči.

3.1.9 Analytické metody sloužící k detekci residuí pesticidů v medu

3.1.9.1 Metoda QuEChERS

Anastassiades a kol. (2010) píší, že metoda QuEChERS je rychlá, jednoduchá a levná metoda, která se používá za účelem extrakce a přečištění vzorků potravin pro residuální analýzu pesticidů. Cílem metody QuEChERS je nahrazení extrakčních metod, které jsou vysoce účinné, ale také velmi náročné na vybavení laboratoře, a tedy i velmi drahé.

Extrakční metoda QuEChERS se skládá ze dvou základních kroků. Prvním krokem je extrakce vzorku, dále frakcionace pomocí organického rozpouštědla a pomocí roztoku solí. Následujícím, druhým krokem je extrakce a přečištění organické vrstvy pomocí disperzivní SPE (solid - phase - extraction). Disperzivní SPE je složeno ze síranu hořečnatého a z PSA (primární sekundární amin). Ze vzorků, které byly extrahovány pomocí metody QuEChERS, jsou odstraňovány složky, které ztěžují následnou analýzu vzorků. Mezi složky vzorků, které jsou metodou QuEChERS odstraňovány patří sacharidy, lipidy, organické kyseliny, proteiny, pigmenty a voda.

3.1.9.2 Kapalinová chromatografie

Arsenault (2009) udává, že kapalinová chromatografie je jedním z nástrojů moderní analytické chemie. Schopností kapalinového chromatografu je separace složek vzorku za účelem stanovení jejich přítomnosti a následně i stanovení koncentrace v analyzovaném vzorku. Pomocí této separační techniky mohou být identifikovány složky analyzovaných vzorků již na úrovni ppt. Principem funkčnosti kapalinového chromatografu je aplikace vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Tyto dvě vzájemně nemísitelné fáze jsou fáze stacionární, která se nachází uvnitř chromatografické kolony a fáze mobilní. V systému kapalinového chromatografu jsou déle zadržovány ty látky, které mají větší afinitu ke stacionární fázi. Kapalinový chromatograf je zařízení, které je běžně používáno ve farmaceutickém a chemickém průmyslu. Dále je tato technika využívána při zjišťování kontaminace potravin pesticidy.

Zařízení kapalinového chromatografu je složeno z několika základních částí. První důležitou složkou jsou zásobní lahve, které obsahují mobilní fáze. Úkolem mobilní fáze je transport vzorku do následujících částí kapalinového chromatografu a detekčního zařízení. Mobilní fáze můžeme do systému kapalinového chromatografu vhánět dvěma odlišnými způsoby. První způsob je isokratický, to znamená, že složení mobilní fáze se při analýze vzorků nemění. Druhou možností je způsob gradientu. Při využití možnosti gradientu je využíváno více, z chemického hlediska odlišných mobilních fází, které jsou během analýzy jednoho vzorku míseny v určitých poměrech. Součástí kapalinového chromatografu je vysokotlaká pumpa, díky které je mobilní fáze poháněna celým systémem kapalinového chromatografu a následně vháněna do detektoru. Následující součástí zařízení je aplikátor vzorků do protékající mobilní fáze. Tato aplikace vzorků do mobilní fáze se odehrává před vstupem mobilní fáze do kolony. Kolona je zařízení, které slouží k samotné separaci jednotlivých složek vzorku. Uvnitř kolony se nachází tzv. stacionární fáze.

Detekční zařízení je propojeno s počítačem a jednotlivé složky vzorku, které procházejí detektorem, jsou pomocí elektrických signálů zaznamenávány. Pomocí tohoto záznamu elektrických signálů je na obrazovce počítače generováno grafické znázornění průchodu jednotlivých složek detektorem, chromatogram. Na základě tohoto grafického vyjádření průchodu jednotlivých složek detektorem je umožněna identifikace a kvantifikace jednotlivých složek vzorku.

3.1.9.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda analytické chemie, která slouží k identifikaci a kvantifikaci jednotlivých, od sebe separovaných složek vzorku.

Balogh (2009) uvádí, že hmotnostní spektrometr může detekovat pouze ty molekuly, které jsou převedeny do podoby iontů. Existuje několik způsobů ionizace molekul, mezi které patří elektronová ionizace (EI), chemická ionizace (CI), elektrosprejová ionizace (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI). Tyto vzniklé ionty jsou separovány podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Následně dochází k detekci a k záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů a ke kvalitativnímu a kvantitativnímu zhodnocení jednotlivých detekovaných složek vzorku.

4 Metodika

4.1 Odběr vzorků medu a nektaru

Vzorky medu a nektaru byly odebírány v oblasti Hlinska v Čechách. Do tohoto pokusu se zapojilo devět včelařů, kteří odebírali vzorky na jedenácti stanovištích. Poloha jednotlivých stanovišť je uvedena na Obr. 21 – 31. Vzorky byly odebírány v průběhu snůškového období v roce 2017. První odběr vzorků medu a nektaru byl situován na termín 29. - 30. 4. 2017. Důvodem konání prvních odběrů v uvedeném termínu bylo, že včely v tomto termínu již mají ve včelích plástech uložen med i nektar, který byl včelami sesbíráán v průběhu předchozích týdnů. Dalším důvodem je to, že venkovní teploty v tomto datu již umožňují včelařům provádět ve včelstvech větší zásahy, mezi které patří i odebrání vzorků medu a nektaru. Vzorky byly odebírány vždy ve dvoutýdenních intervalech. Odběr vzorků byl ukončen k datu, kdy jednotlivý včelaři provedli poslední vytočení medu určeného k lidské spotřebě. Toto datum se u jednotlivých včelařů lišilo.

Nejdříve byly odebírány vzorky medu a nektaru, které byly uloženy ve vystavěném voskovém díle, z plodiště. Minimální velikost těchto odebíraných vzorků byla 100 cm². Požadavek na odebírané vzorky byl, aby byly z obou stran zaneseny medem a nektarem z důvodu maximální možné výtěžnosti medu a nektaru. Po nasazení medníku včelaři odebírali na jednotlivých stanovištích vzorky nejen z plodiště, ale také vzorky medu a nektaru z medníku. Minimální velikost vzorku odebíraného z medníku je totožná s velikostí vzorku odebíraného z plodiště, tzn. 100 cm².

Vzorky byly vyřezávány ostrým nožem a následně ukládány do skleněné nádoby. Poté byly vzorky nejpozději do sedmi dnů od odběru uloženy do mrazícího zařízení, kde byly uloženy až do data analýzy při teplotě -18 °C. Analýza vzorků byla prováděna od 28. února do 6. března 2018.

4.2 Zjišťované insekticidy ve vzorcích medu a nektaru

V odebraných vzorcích medu a nektaru byla zjišťována přítomnost:

- neonikotinoidního insekticidu thiaklopridu
- organofosfátového insekticidu chlorpyrifosu
- pyretroidních insekticidů deltametrinu, cypermetrinu, τ -fluvalinátu a λ cyhalotrinu.

Těchto šest insekticidů bylo vybráno proto, protože jsou v oblastech, kde byly odebírány vzorky medu a nektaru pro diplomovou práci, zemědělci nejčastěji používanými insekticidy při ochraně zemědělských plodin proti škůdcům.

4.3 Chemikálie

Metanol HPLC, čistota $\geq 99,9$ %, (Biosolve, Francie)
Acetonitril HPLC, čistota $\geq 99,9$ %, (Fischer Scientific, UK)
Ultračistá voda, 18 m Ω , vyrobená systémem Millipore Simplicity UV
Síran hořečnatý, čistota $\geq 98,0$ %, (VWR Chemicals, USA)
Chlorid sodný, čistota 99,5 %, (Lachner, Česká republika)
Citronan sodný, čistota $\geq 99,0$ %, (VWR Chemicals, USA)
Seskvihydrát citrátu disodného, čistota 99,0 %, (Sigma Aldrich, USA)
QuEChERS dSPE kit (1200 mg síranu hořečnatého, 400 mg PSA), (Phenomenex, USA)
Mravenčan amonný, čistota $\geq 99,0$ %, (Thomas Scientific, USA)
Kyselina mravenčí, čistota $\geq 99,0$ %, (Fischer Scientific, USA)
Chlorpyrifos, čistota $\geq 98,0$ %, (Sigma Aldrich, USA)
Thiaklopid, čistota $\geq 98,0$ %, (Sigma Aldrich, USA)
Cypermetrin, čistota $\geq 90,0$ %, (Sigma Aldrich, USA)
Deltametrin čistota $\geq 98,0$ %, (Sigma Aldrich, USA)
 λ cyhalotrin, čistota $\geq 95,0$ %, (Sigma Aldrich, USA)
 τ -fluvalinat, čistota $\geq 98,0$ %, (Sigma Aldrich, USA)

4.4 Přístroje:

Laboratorní váhy Kern E6, (Kern, Německo)
Analytické váhy Kern 770, (Kern, Německo)
Mrazák (Liebherr, Německo)
Automatická pipeta 10 - 100 μ l, (Fischer Scientific, USA)
Automatická pipeta 100 - 1000 μ l, (Fischer Scientific, USA)
Automatická pipeta 1 - 10 ml, (Fischer Scientific, USA)
Systém na úpravu vody Millipore Simplicity UV, (Merck, Německo)
Centrifuga 5810 R, (Eppendorf, Německo)
Injekční stříkačky, 1 ml, a injekční jehly, (Norm-Ject, Německo)
Hmotnostní spektrometr 3200 Q Trap (Sciex, Kanada)

HPLC Ultimate 3000 RS, (Thermo - Fischer, USA)
Kolona Kinetex 1,7 μm XB - C18 100 A, 50 x 2,1 mm, (Phenomenex, USA)
Plastové centrifugační zkumavky, kónické s víčkem, 15 a 50 ml, (Fischer Scientific, USA)
Plastové lžičky, (Fischer Scientific, USA)
HPLC vialky, 2 ml, (Fischer Scientific, USA)
Odměrné baňky, 10 a 25 ml, (Fischer Scientific, USA)
Kádinky 15, 50, 150 a 400 ml, (Fischer Scientific, USA)
Lahve pro mobilní fáze, 1 l, (Fischer Scientific, USA)
Nylonový syringe filtr; 13 mm; 0,22 μm ; (Agilent Technologies, USA)
Kádinky, 100 ml, (Fischer Scientific, USA)

4.5 Software

Analyst Software 1. 5. 2., (Sciex, Kanada)
Chromeleon Xpress, (Fischer Scientific, USA)
ACD/ChemSketch 12.01, (Advanced Chemistry Development, Inc., Kanada)
Microsoft Excel 2010, (Microsoft, USA)
Microsoft Word 2010, (Microsoft, USA)

4.6 Příprava vzorků medu a nektaru k extrakci

Skleněné nádoby se vzorky byly po vyndání z mrazícího zařízení ponechány v temnu 8 hodin při pokojové teplotě, aby konzistence vzorků byla vhodná pro další manipulaci. Důvodem uložení vzorků v temnu je, že některé analyty na světle rychle degradují.

4.7 QuEChERS extrakce

Vzorky medu a nektaru byly z voskového díla ručně vymačkány do kádinky o objemu 100 ml. 5 g vzorku medu nebo nektaru bylo naváženo do plastové centrifugační zkumavky o objemu 50 ml. Následně bylo ke vzorku napipetováno 10,0 ml ultračisté vody a vortexováno do doby, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění vzorku medu a nektaru. Následně bylo ke směsi napipetováno 10,0 ml acetonitrilu a směs byla vortexována 25 sekund. Pak byla přidána směs citrátového pufru, která se skládala ze 4,0 g síranu hořečnatého, 1,0 g chloridu sodného, 1,0 g citronanu sodného a 0,5 g seskvihydrátu citrátu disodného. Směs byla jednu minutu ručně třepána a jednu minutu vortexována. Poté následovalo pět minut centrifugace (5000 ot./min).

8 ml supernatantu bylo transferováno do plastové centrifugační zkumavky o objemu 15 ml, ve které nacházelo 500 mg dSPE fáze, skládající se z 375 mg bezvodého síranu hořečnatého a 125 mg primárního/sekundárního aminu (PSA). Následně byl vzorek třepán jednu minutu v ruce a jednu minutu byl vortexován. Následovala centrifugace po dobu pěti minut (5000 ot./min). 1,5 ml supernatantu bylo přefiltrováno (nylonový syringe filtr; 13 mm; 0,22 µm) do HPLC vialky o objemu 2 ml.

4.8 Parametry a postup LC/MS analýzy

LC-MS metoda vycházející z práce Wiesta (2011) byla optimalizována a přizpůsobena podmínkám laboratoře na České zemědělské univerzitě v Praze. Byla použita kolona Kinetex 1,7 µm XB – C18 100 A, 50 x 2,1 mm. Mobilní fáze A obsahovala 10 mM mravenčanu amonného, 0,1 % kyseliny mravenčí (v/v) a ultračistou vodu. Mobilní fáze B se skládala z 0,1 % kyseliny mravenčí (v/v) a metanolu. Používaný gradient mobilních fází je uveden v Tab. 18. Retenční časy jednotlivých analytů jsou uvedeny v Tab. 19.

Tabulka 18 Gradient mobilních fází používaný při analýzách vzorků

čas analýzy (min)	zastoupení fáze B (%)
0	20
0,5	20
3	70
7	85
8	85
9	20
12	20

Tabulka 19 Retenční časy jednotlivých analytů

insekticid	retenční čas (min)
chlorpyrifos	4,04
thiakloprid	2,25
cypermetrin	4,17
λ cyhalotrin	4,11
τ-fluvalinat	4,37
deltametrin	4,19

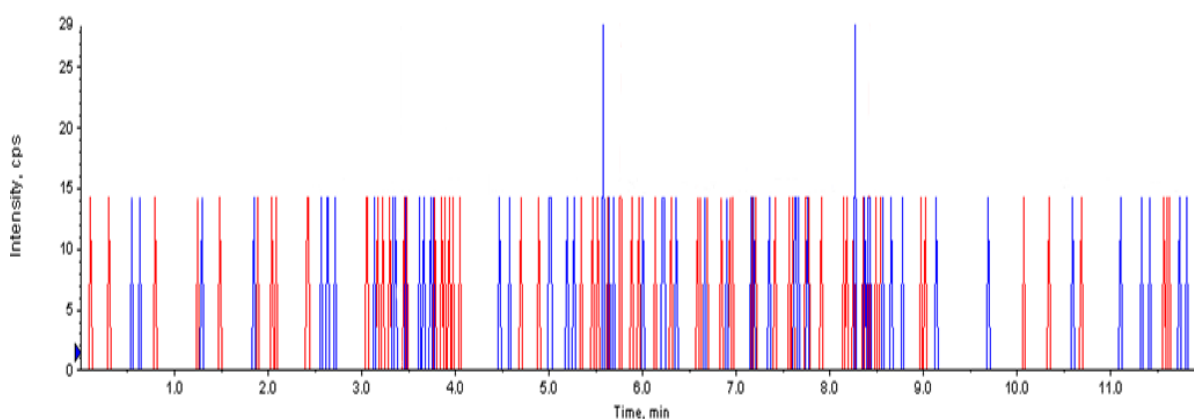
Délka analýzy vzorku činila 12 minut. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml/min. Kalibrace byla prováděna po každých osmnácti vzorcích. Teplota autosampleru byla nastavena na 20 °C a teplota kolony na 30 °C.

Vzorky, ve kterých byla odezva na úrovni šumu (< 100 cps) byly hodnoceny jako negativní na přítomnost residuí insekticidů (< LD). Pokud píky analytů ve vzorku dosáhly výšky 101 - 300 cps, byly tyto vzorky nad úrovní limitu detekce (> LD). Limity detekce jednotlivých analytů jsou uvedeny v Tab. 20. Pokud bylo ve vzorku medu a nektaru detekováno > 301 cps, bylo možno analyty spolehlivě kvantifikovat (> LK). Ukázky chromatogramů s negativní detekcí (< LD), s detekcí > LD a > LK jsou uvedeny na Obr. 17 - 19. Ukázka chromatogramu s píky jednotlivých analytů na Obr. 20., tento chromatogram je přiblížen na čas analýzy 0 - 6,4 min.

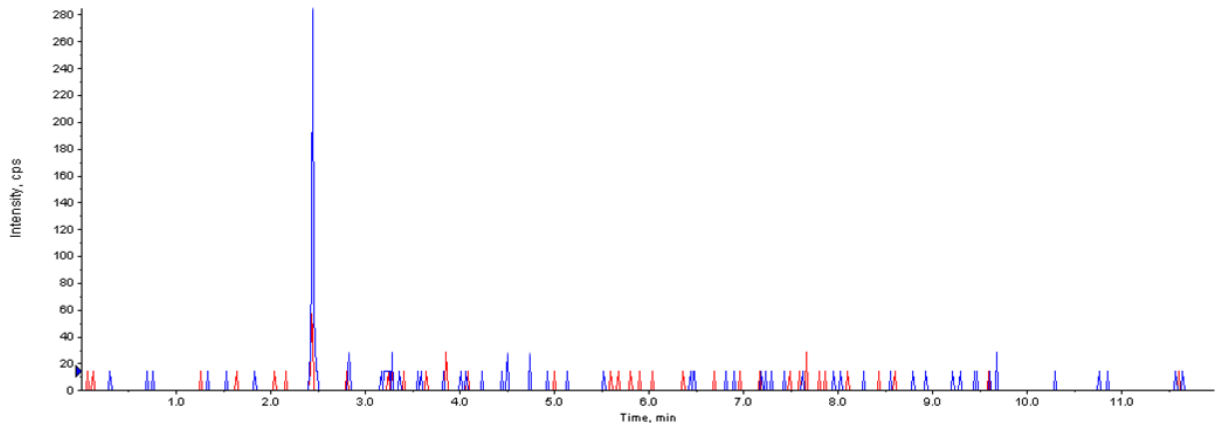
Tabulka 20 Limity detekce jednotlivých analytů

insekticid	limit detekce (ppb)
chlorpyrifos	5
thiakloprid	0,05
cypermetrin	5
λ cyhalotrin	5
τ - fluvalinat	5
deltametrin	5

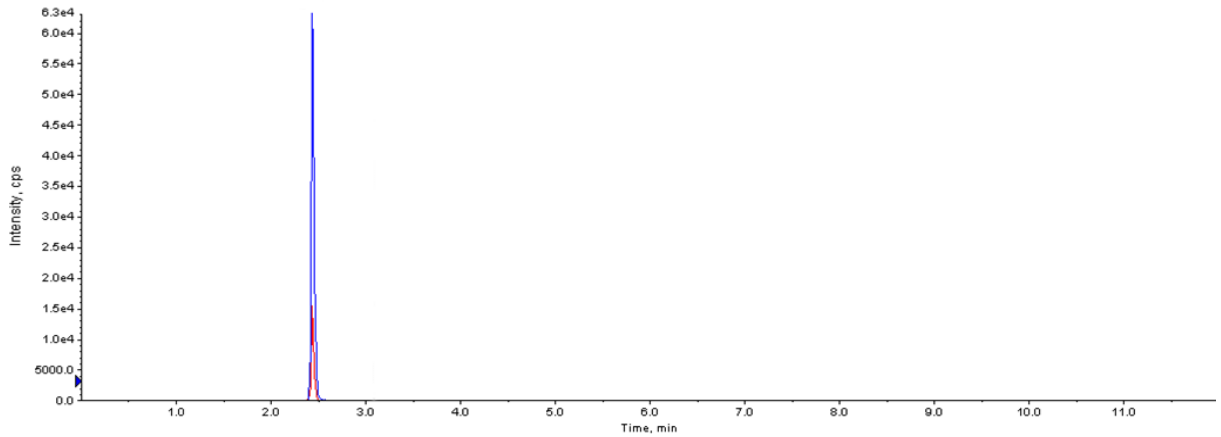
Obrázek 17 Chromatogram vzorku, ve kterém nebyla detekována residua thiaklopridu



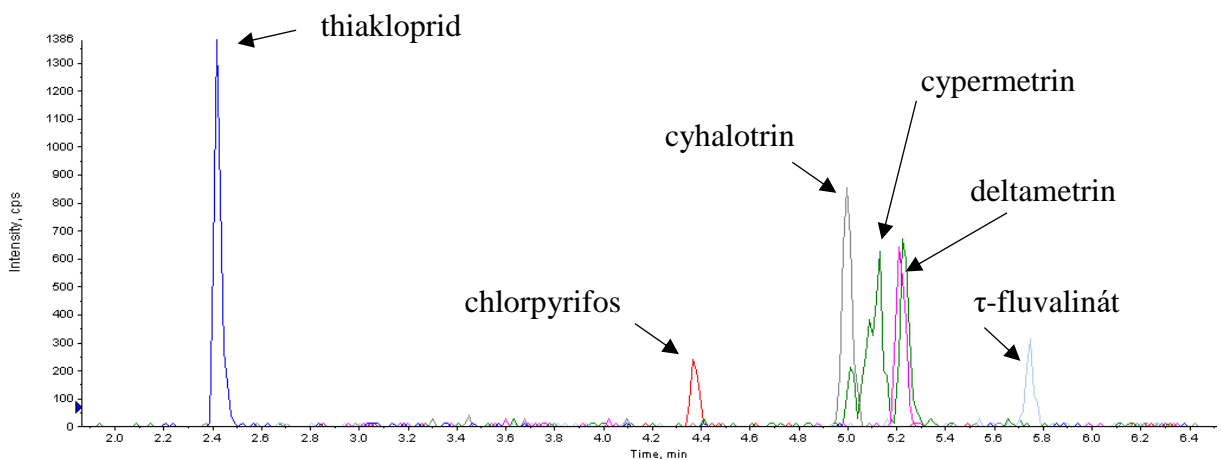
Obrázek 18 Chromatogram vzorku, ve kterém je thiaklopid nad limitem detekce



Obrázek 19 Chromatogram vzorku, ve kterém je thiaklopid nad limitem kvantifikace



Obrázek 20 Chromatogram s píky jednotlivých analytů



Barvy píků: tmavě modrá (thiaklopid), červená (chlorpyrifos), šedá (cyhalotrin), zelená (cypermetrin), fialová (deltametrin), světle modrá (τ-fluvalinát).

5 Výsledky

Výtěžnost jednotlivých insekticidů z matrice byla zjištěna na základě porovnání velikosti ploch píků při použití QuEChERS a bez jejího použití (=100 %). Výtěžnost jednotlivých analytů je uvedena v Tab. 21.

Tabulka 21 Výtěžnost insekticidů při použití extrakční metody

insekticid	výtěžnost (%)
chlorpyrifos	88,49
thiaklopid	100,00
cypermetrin	81,94
λ cyhalotrin	94,14
τ-fluvalinát	81,65
deltametrin	86,78

5.1 Hodnocení jednotlivých vzorků medu a nektaru

Statistické vyhodnocení výsledků analýz vzorků nebylo možné provést z důvodu malého počtu nasbíraných dat. V této diplomové práci bylo analyzováno 73 vzorků medu a nektaru. Přehled jednotlivých vzorků v Tab. 22. Jediným insekticidem, který byl ve vzorcích detekován, je neonikotinoid thiaklopid.

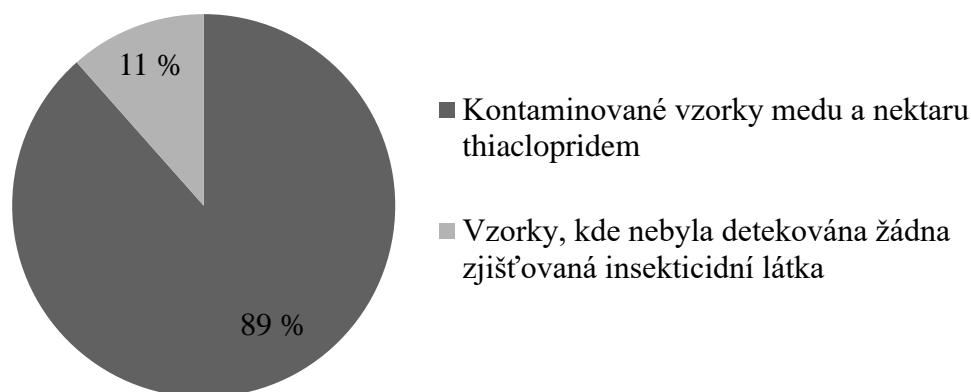
Přítomnost thiaklopidu byla zjištěna v 65 vzorcích a v 50 vzorcích bylo možné thiaklopid kvantifikovat (Tab. 22). Procentuální zastoupení vzorků, které byly pozitivní na přítomnost thiaklopidu je 89 % (Graf 1). Ostatní zjišťované insekticidy, tzn. pyretroidy deltametrin, cypermetrin, λ cyhalotrin, τ-fluvalinát a organofosfátový insekticid chlorpyrifos, nebyly v analyzovaných vzorcích vůbec detekovány. Nejvyšší naměřené množství thiaklopidu v jednom vzorku bylo 1,18 mg/kg matrice. Množství thiaklopidu detekovaná v jednotlivých vzorcích medu a nektaru jsou uvedené v Tab. 22.

Tabulka 22 Přehled jednotlivých vzorků medu a nektaru

stanoviště	datum odběru vzorku	místo odběru vzorku (plodiště/medník)	nadmožská výška stanoviště (m. n. m.)	thiaklopid (mg/kg)
1	1. 5.	plodiště	520	> LD
1	15. 5.	plodiště	520	> LD
1	30. 5.	plodiště	520	< LD
1	30. 5.	medník	520	< LD
1	10. 7.	plodiště	520	> LD
1	10. 7.	medník	520	> LD
1	14. 7.	plodiště	520	> LD
1	14. 7.	medník	520	0,01
2	30.4.	plodiště	270	0,02
2	14.5.	plodiště	270	1,18
2	30.5.	plodiště	270	1,07
3	30.4.	plodiště	381	> LD
3	14.5.	plodiště	381	0,26
3	30.5.	medník	381	0,38
4	30. 4.	plodiště	632	> LD
4	14.5.	plodiště	632	> LD
4	28.5.	medník	632	< LD
4	26.6.	plodiště	632	0,02
4	26.6.	medník	632	0,02
5	13.5.	plodiště	650	< LD
5	27.5.	plodiště	650	< LD
5	27.5.	medník	650	0,02
5	10.6.	plodiště	650	0,39
5	10.6.	medník	650	0,11
5	24.6.	plodiště	650	0,01
5	24.6.	medník	650	0,01
5	9.7.	plodiště	650	0,03
5	9.7.	medník	650	0,03
6	1.5.	plodiště	588	< LD
6	15.5.	plodiště	588	> LD
6	15.5.	medník	588	> LD
6	25.5.	medník	588	0,18
6	10.6.	plodiště	588	0,05
6	10.6.	medník	588	0,06
6	24.6.	plodiště	588	0,04
6	9.7.	plodiště	588	0,05
6	9.7.	medník	588	0,03
7	6.5.	plodiště	633	> LD
7	15.5.	plodiště	633	0,01

7	15.5.	medník	633	> LD
7	28.5.	plodiště	633	0,05
7	28.5.	medník	633	0,04
7	12.6.	plodiště	633	0,03
7	12.6.	medník	633	0,06
7	26.6.	plodiště	633	0,01
7	26.6.	medník	633	> LD
7	9.7.	plodiště	633	> LD
7	9.7.	medník	633	0,03
8	14.5.	plodiště	590	0,01
8	28.5.	plodiště	590	0,37
8	28.5.	medník	590	0,06
8	12.6.	medník	590	0,19
9	29.4.	plodiště	525	< LD
9	14.5.	plodiště	525	< LD
9	28.5.	plodiště	525	0,86
9	28.5.	medník	525	0,37
9	12.6.	medník	525	0,29
9	26.6.	plodiště	525	0,09
9	26.6.	medník	525	0,02
9	9.7.	medník	525	0,05
10	29.4.	plodiště	535	0,04
10	14.5.	plodiště	535	0,14
10	27.5.	plodiště	535	0,09
10	12.6.	plodiště	535	0,15
10	26.6.	plodiště	535	0,08
10	10.7.	plodiště	535	0,04
11	14.5.	plodiště	586	> LD
11	28. 5.	plodiště	586	0,1
11	28.5.	medník	586	0,06
11	12.6.	plodiště	586	0,03
11	12.6.	medník	586	0,12
11	26.6.	plodiště	586	0,16
11	9.7.	plodiště	586	0,03

Graf 1 Procentuální zastoupení kontaminovaných vzorků z celkového počtu vzorků (n = 73)



Z výsledků analýzy jednotlivých vzorků medu a nektaru je zřejmé, že pokud hodnoty thiaklopridu, které se v jednotlivých vzorcích vyskytují, přepočítáme na hmotnost medu a nektaru, které včely denně přijímají (4 mg), zjistíme, že v žádném vzorku nebyly překročeny hodnoty LD₅₀ thiaklopridu pro včelu. Hodnota LD₅₀ thiaklopridu pro včely je podle Titěry (2013) 0,01732 mg/včela. Zjištěná množství residuí thiaklopridu v analyzovaných vzorcích medu a nektaru nemají na včely letální účinek, ovšem naměřená množství residuí thiaklopridu mohou mít na včely účinek subletální.

Pokud zjištěné výsledky posoudíme z pohledu zdravotní nezávadnosti medu a nektaru pro lidskou spotřebu, je možné dojít k závěru, že všechny analyzované medy vyhověly Evropské legislativě (EC 396/2005). Evropská komise (2016) stanovila, že množství residuí thiaklopridu v medech, které jsou určeny k lidské spotřebě, nemohou překročit hodnotu 0,2 mg thiaklopridu/kg medu.

5.2 Hodnocení vzorků medu a nektaru na jednotlivých stanovištích

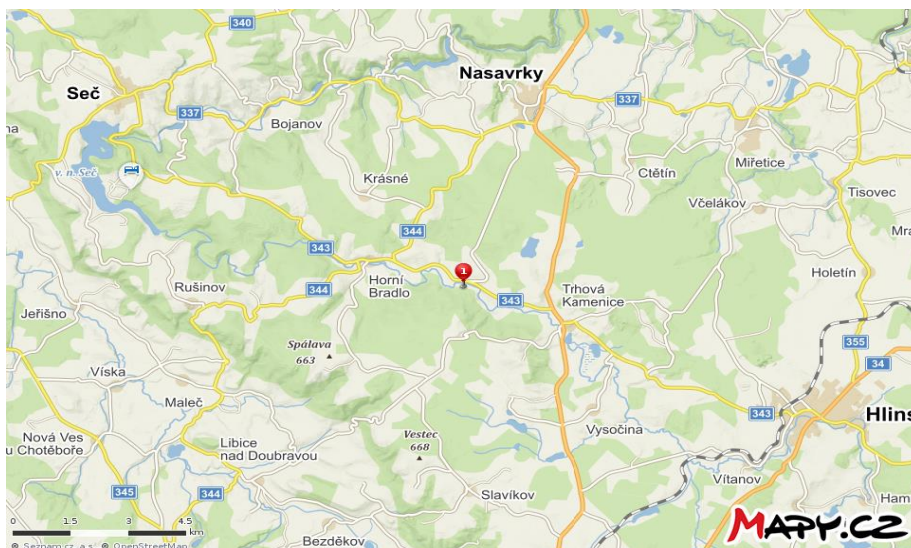
5.2.1 Stanoviště 1

Poloha stanoviště 1 je zobrazeno na Obr. 21. Souřadnice stanoviště 1, které se nachází v nadmořské výšce 520 m. n. m., jsou 49°47'47.769"N, 15°46'49.140".

Na stanovišti 1 bylo odebráno 8 vzorků. 2 vzorky medu a nektaru obsahovaly množství thiaklopridu, které bylo pod limitem detekce. 5 vzorků obsahovalo množství thialopridu, které bylo nad limitem detekce. Residua thiaklopridu nad limitem kvantifikace byla detekována pouze v jediném vzorku. Tento vzorek byl odebrán dne 14. 7. z medníku. Z pohledu kvality

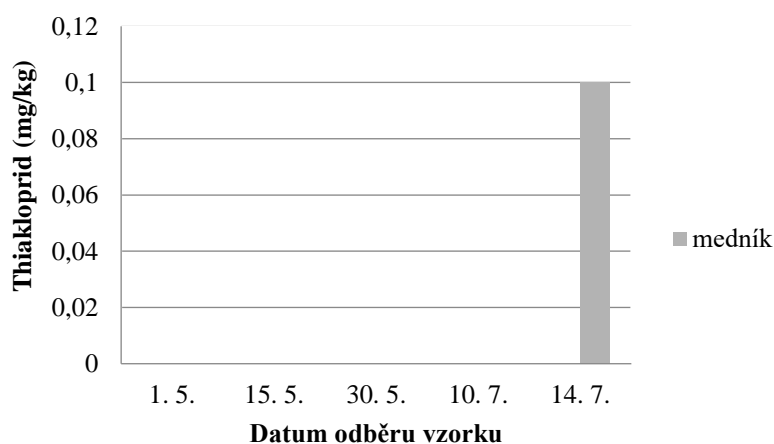
medu, která je vyjádřena množstvím residuí pesticidů v medu, je stanoviště 1 a med z něj pocházející hodnocen nejkvalitněji. Grafické znázornění hodnot residuí thiaklopridu v čase (Graf 2).

Obrázek 21 Poloha stanoviště číslo 1



Zdroj: www.mapy.cz

Graf 2 Vyhodnocení hodnot residuí thiaklopridu v průběhu snůškového období roku 2017



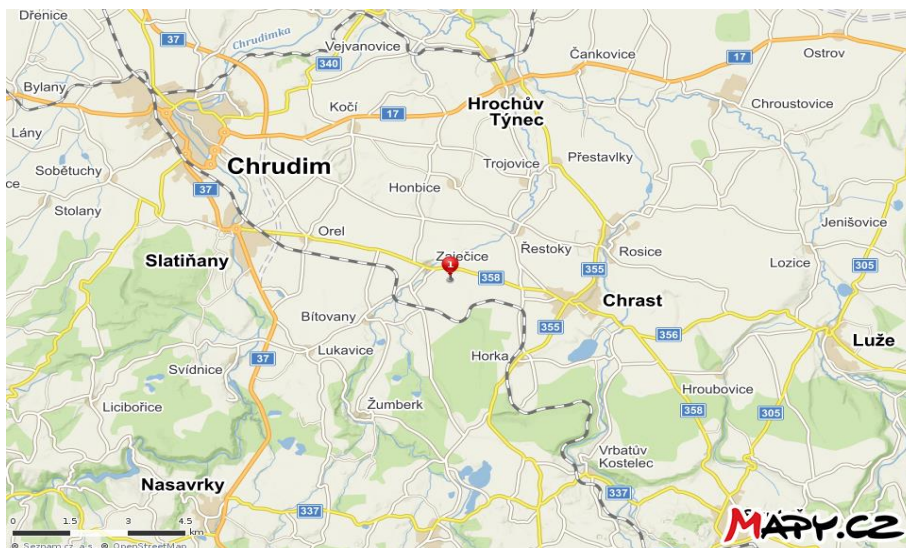
5.2.2 Stanoviště 2

Souřadnice stanoviště 2, které se nachází v nadmořské výšce 270 m. n. m., jsou 49°54'28.333"N, 15°53'31.656"E a poloha stanoviště je zobrazena na Obr. 22

Na stanovišti 2 byly odebrány 3 vzorky a ve všech byla zjištěna residua thiaklopridu nad limitem kvantifikace. Ve vzorku, který byl odebrán dne 14. 5. v plodišti, bylo detekováno největší množství residuí thiaklopridu ze všech analyzovaných vzorků (n = 73), konkrétně

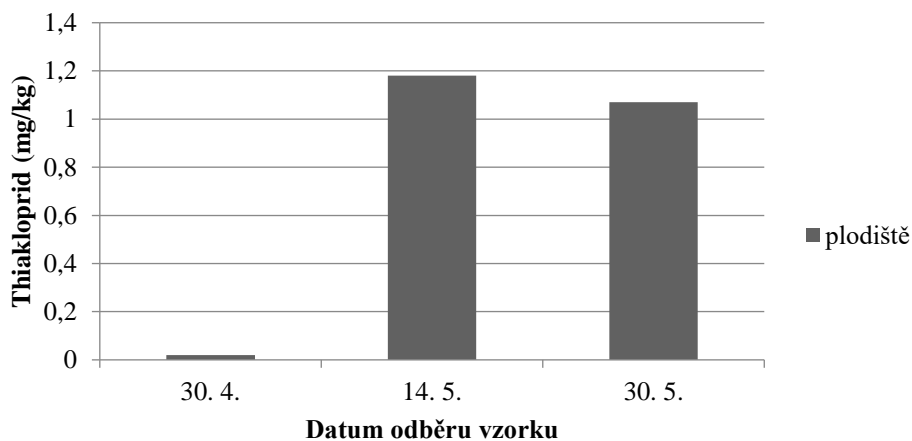
1,18 mg thiaklopridu/kg matrice. Z pohledu kvality medu, která je vyjádřena množstvím residiuí obsažených v medu, je toto stanoviště hodnoceno jako nejméně kvalitní. Grafické znázornění hodnot residiuí thiaklopridu v čase (Graf 3).

Obrázek 22 Poloha stanoviště číslo 2



Zdroj: www.mapy.cz

Graf 3 Vyhodnocení hodnot residiuí thiaklopridu v průběhu snůškového období roku 2017

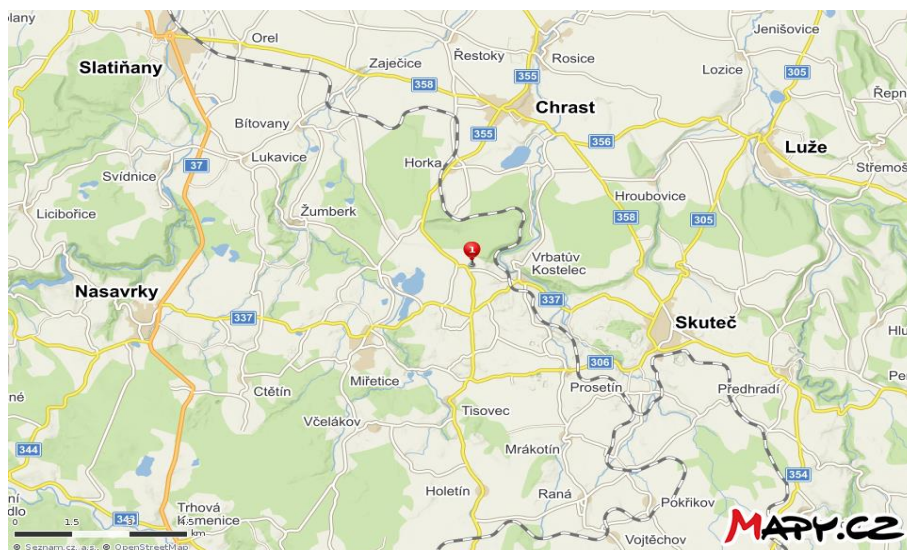


5.2.3 Stanoviště 3

. Souřadnice stanoviště 3, které se nachází v nadmořské výšce 381 m. n. m., jsou 49°51'38.377"N, 15°55'11.103"E. Poloha stanoviště je zobrazena na Obr. 23.

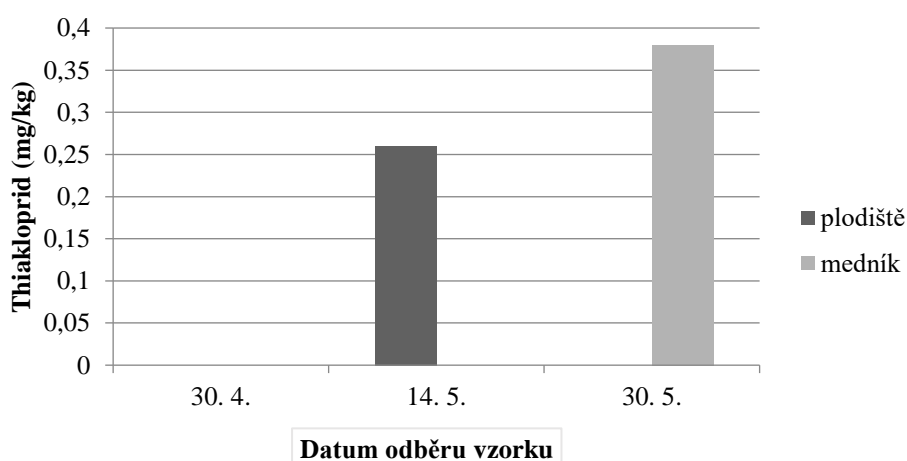
V průběhu snůškové sezóny roku 2017 byly na tomto stanovišti odebrány 3 vzorky medu a nektaru. V prvním vzorku byla residua thiaklopridu nad limitem detekce, následující dva vzorky obsahovaly kvantifikovatelná množství thiaklopridu. Na stanovišti číslo 3 byly naměřeny nejvyšší hodnoty residuí thiaklopridu ve vzorku, který byl odebrán dne 14. 5. z plodiště. Grafické znázornění hodnot residuí thiaklopridu v čase (Graf 4).

Obrázek 23 Poloha stanoviště číslo 3



Zdroj: www.mapy.cz

Graf 4 Vyhodnocení hodnot residuí thiaklopridu v průběhu snůškového období roku 2017

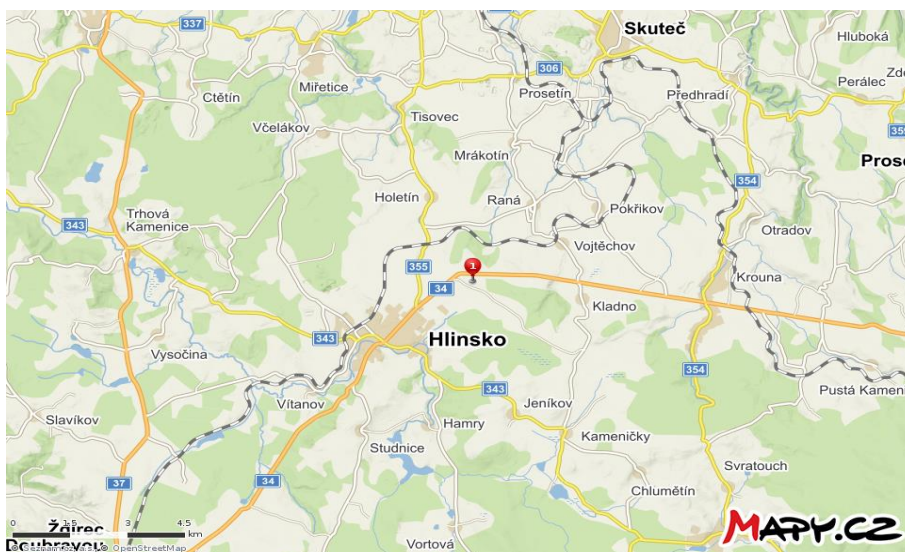


5.2.4 Stanoviště 4

Souřadnice stanoviště 4, které se nachází v nadmořské výšce 632 m. n. m., jsou 49°46'39.902"N, 15°56'31.440"E a poloha stanoviště je zobrazena na Obr. 24.

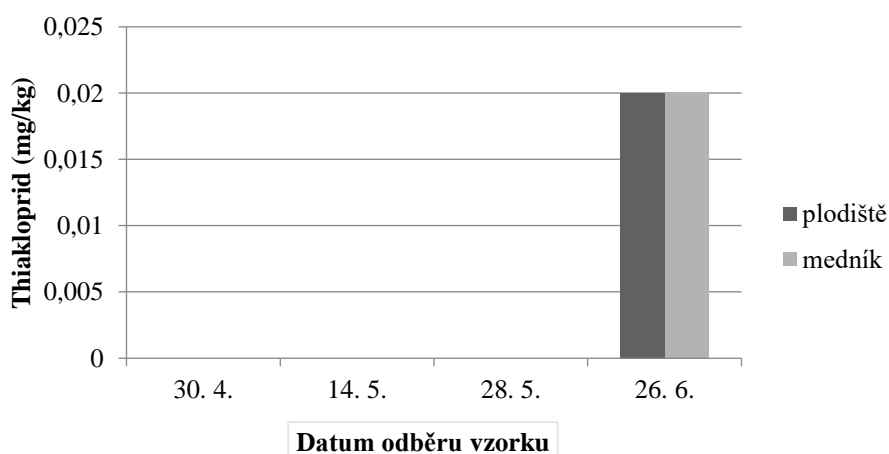
Bylo zde odebráno 5 vzorků medu a nektaru. V prvních dvou odebraných vzorcích byla residua thiaklopridu nad limitem detekce. Třetí vzorek obsahoval thiakloprid v množství, které bylo pod limitem detekce. Ve dvou následně odebraných vzorcích byl thiakloprid kvantifikován. Nejvyšší naměřená množství residuí thiaklopridu byla ve vzorcích, které byly odebrány dne 26. 6. z plodiště a z medníku. Grafické znázornění hodnot residuí thiaklopridu v čase (Graf 5).

Obrázek 24 Poloha stanoviště číslo 4



Zdroj: www.mapy.cz

Graf 5 Vyhodnocení hodnot residuí thiaklopridu v průběhu snůškového období roku 2017

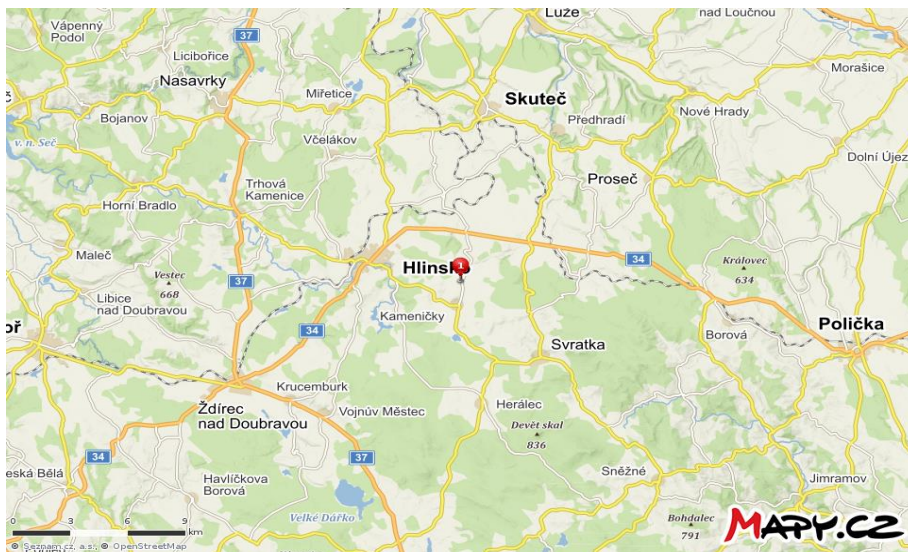


5.2.5 Stanoviště 5

Souřadnice stanoviště 5, které leží v nadmořské výšce 650 m. n. m., jsou 49°45'6.943"N, 15°58'38.418"E. Poloha stanoviště je zobrazena na Obr. 25.

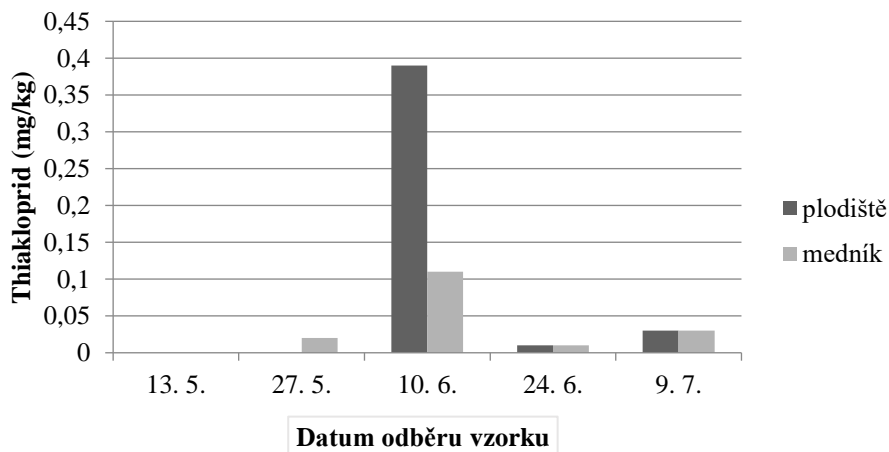
Na stanovišti číslo 5 bylo odebráno 9 vzorků. V prvních dvou odebraných vzorcích nebyla detekována žádná residua thiaklopridu. V sedmi vzorcích byl thiakloprid přítomen nad limitem kvantifikace. Nejvyšší kumulace residuí thiaklopridu byla ve vzorku, který byl odebraný dne 10. 6. z plodiště. Grafické znázornění hodnot residuí thiaklopridu v čase (Graf 6).

Obrázek 25 Poloha stanoviště číslo 5



Zdroj: www.mapy.cz

Graf 6 Vyhodnocení hodnot residuí thiaklopridu v průběhu snůškového období roku 2017

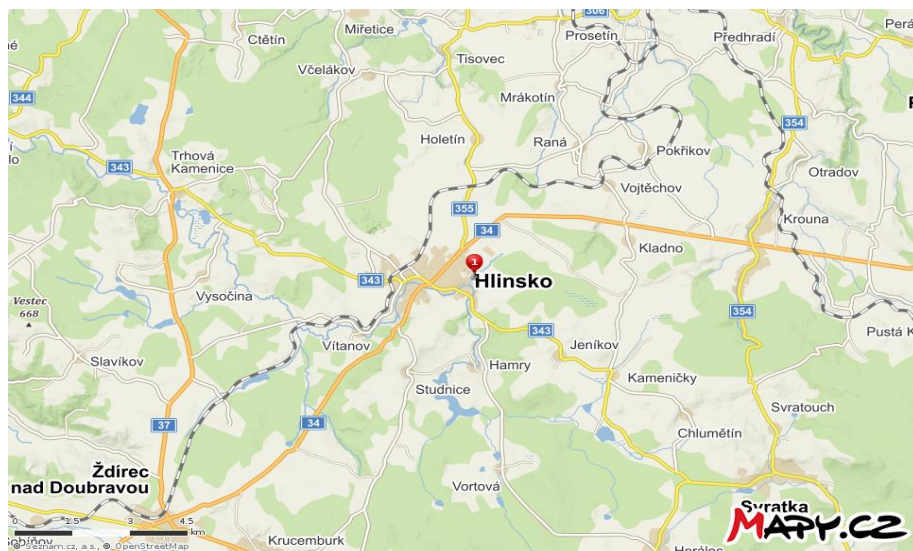


5.2.6 Stanoviště 6

Souřadnice stanoviště 6, které se nachází v nadmořské výšce 588 m. n. m., jsou 49°45'48.421"N, 15°55'33.611"E. Poloha stanoviště je zobrazena na Obrázku 26.

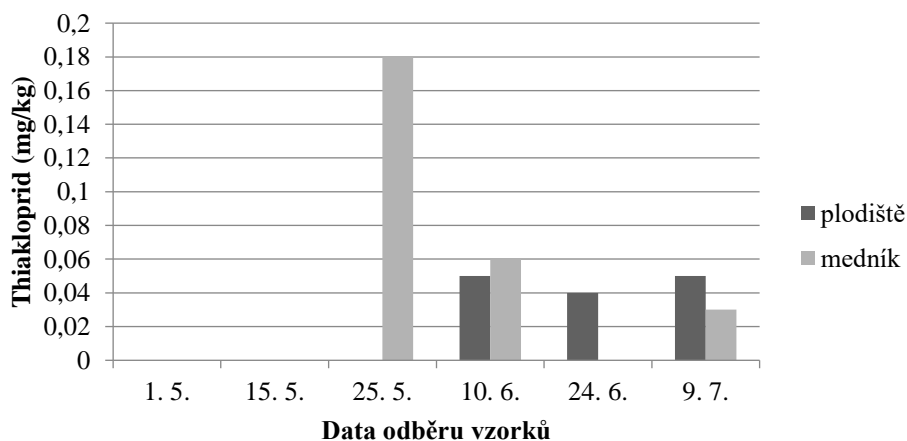
Na stanovišti číslo 6 bylo odebráno 9 vzorků. V prvním odebraném vzorku nebyl thiaklopid detekován. V následujících dvou vzorcích byl thiaklopid přítomen nad limitem detekce. Ve 4. - 7. vzorku byl thiaklopid nad limitem kvantifikace. Nejvyšší hodnoty residuí thialopridu byly zjištěny ve vzorku, který byl odebrán dne 25. 5. z medníku. Grafické znázornění hodnot residuí thiaklopidu v čase (Graf 7).

Obrázek 26 Poloha stanoviště číslo 6



Zdroj: www.mapy.cz

Graf 7 Vyhodnocení hodnot residuí thiaklopidu v průběhu snůžkového období roku 2017

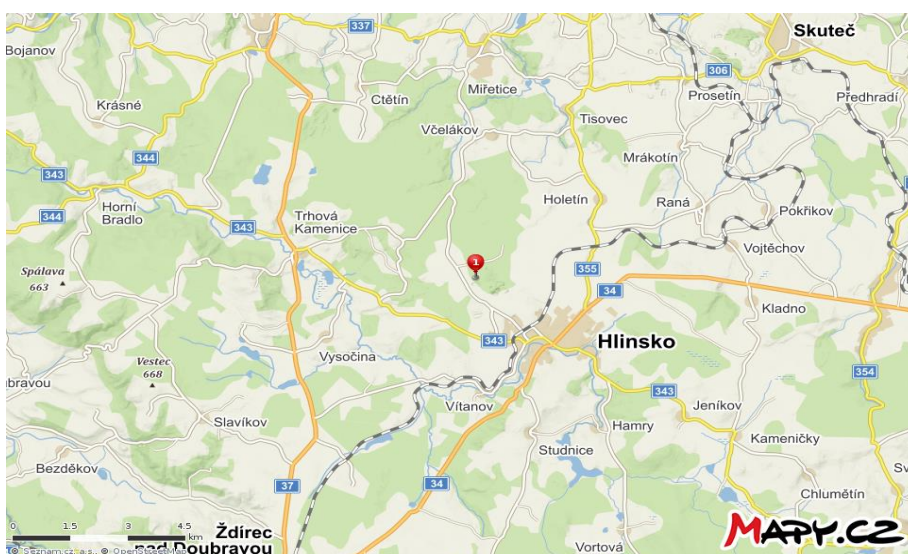


5.2.7 Stanoviště 7

Souřadnice stanoviště 7, které se nachází v nadmořské výšce 633 m. n. m., jsou 49°46'46.264"N, 15°52'54.164"E. Poloha stanoviště je zobrazena na Obrázku 27.

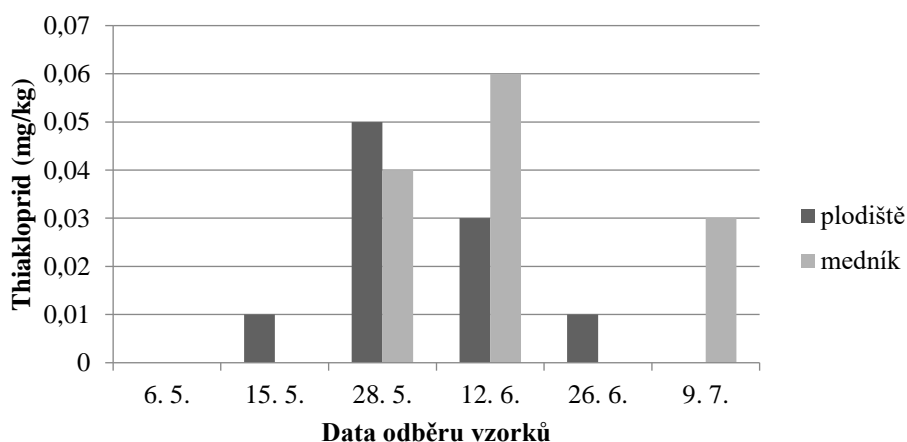
Na stanovišti číslo 7 bylo odebráno 11 vzorků. Ve čtyřech vzorcích byl thiakloprid přítomen nad limitem detekce a v sedmi vzorcích nad limitem kvantifikace. Nejvyšší naměřené množství residuí thiaklopridu na stanovišti 7 bylo ve vzorku, který byl odebraný dne 12. 6. v medníku. Grafické znázornění hodnot residuí thiaklopridu v čase (Graf 8).

Obrázek 27 Poloha stanoviště číslo 7



Zdroj: www.mapy.cz

Graf 8 Vyhodnocení hodnot residuí thiaklopridu v průběhu snůškového období roku 2017

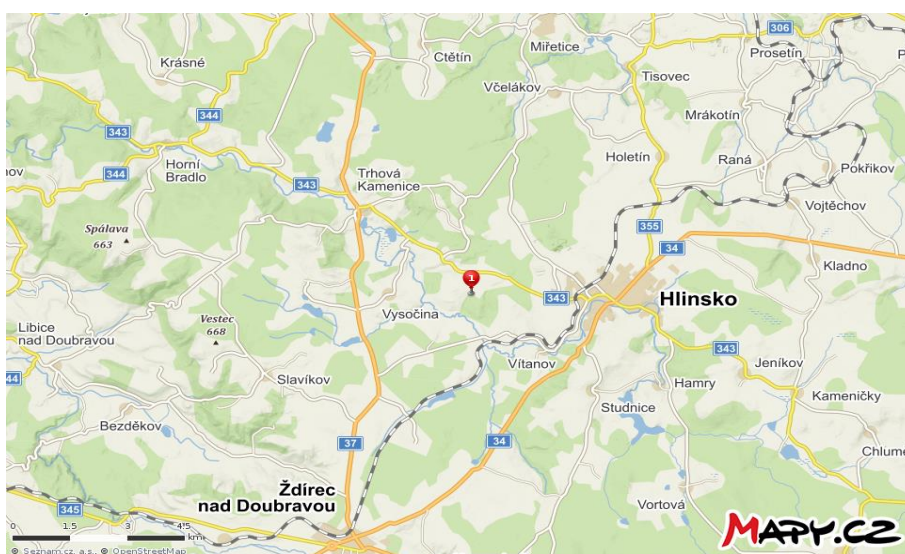


5.2.8 Stanoviště 8

Souřadnice stanoviště 8, které se nachází v nadmořské výšce 590 m. n. m., jsou 49°45'49.974"N, 15°51'26.621"E. Poloha stanoviště je zobrazena na Obr. 28.

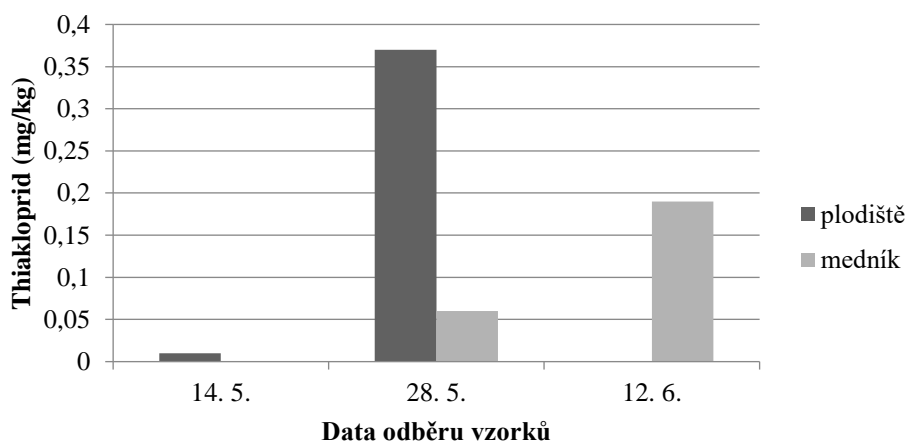
Na stanovišti číslo 8 byly v průběhu snůškové sezóny roku 2017 odebrány 4 vzorky medu a nektaru. Všechny čtyři vzorky obsahovaly kvantifikovatelná množství thiaklopridu. Nejvyšší naměřené množství residuí thiaklopridu bylo zjištěno ve vzorku, který byl odebrán dne 28. 5. v plodišti. Grafické znázornění hodnot residuí thiaklopridu v Grafu 9.

Obrázek 28 Poloha stanoviště číslo 8



Zdroj: www.mapy.cz

Graf 9 Vyhodnocení hodnot residuí thiaklopridu v průběhu snůškového období roku 2017

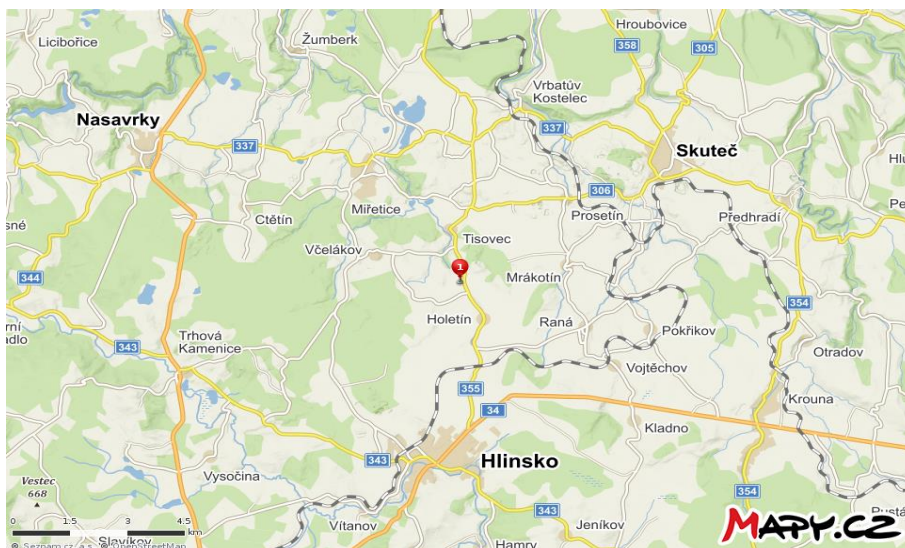


5.2.9 Stanoviště 9

Souřadnice stanoviště 9, které se nachází v nadmořské výšce 525 m. n. m., jsou 49°48'36.327"N, 15°55'6.924"E. Poloha stanoviště je zobrazena na Obr. 29.

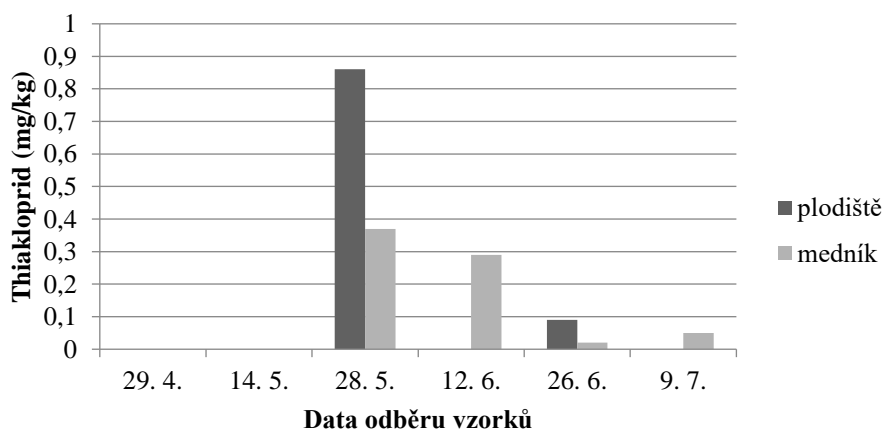
Na stanovišti číslo 9 bylo odebráno celkem 8 vzorků medu a nektaru. První dva odebrané vzorky byly na přítomnost thiaklopridu negativní. Následujících šest vzorků bylo na přítomnost thiaklopridu pozitivní a tato zjištěná množství thiaklopridu byla nad limitem kvantifikace. Nejvyšší množství residuí thiaklopridu bylo zjištěno ve vzorku, který byl odebrán 28. 5. z plodiště. Grafické znázornění hodnot residuí thiaklopridu v čase (Graf 10).

Obrázek 29 Poloha stanoviště číslo 9



Zdroj: www.mapy.cz

Graf 10 Vyhodnocení hodnot residuí thiaklopridu v průběhu snůškového období roku 2017

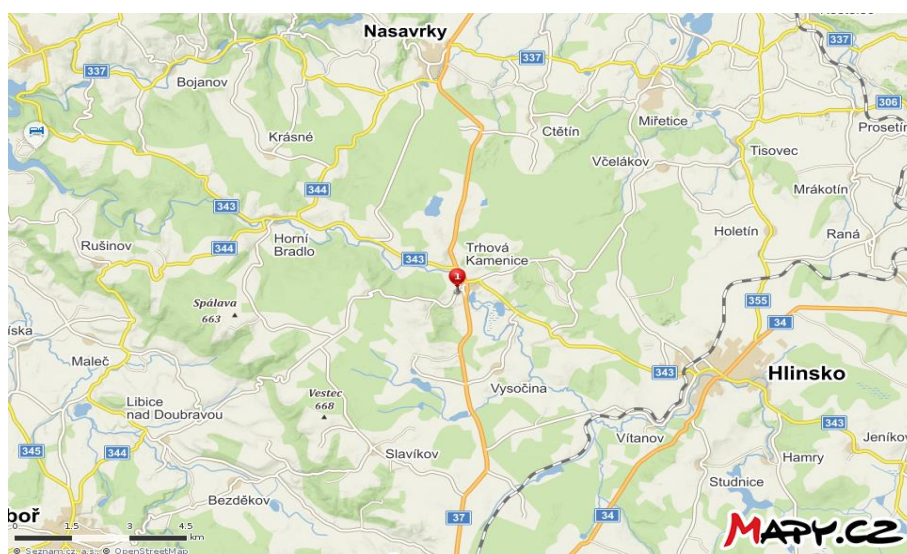


5.2.10 Stanoviště 10

Souřadnice stanoviště 10, které leží v nadmořské výšce 535 m. n. m., jsou 49°47'3.547"N, 15°48'45.166"E. Poloha stanoviště je zobrazena na Obr. 30.

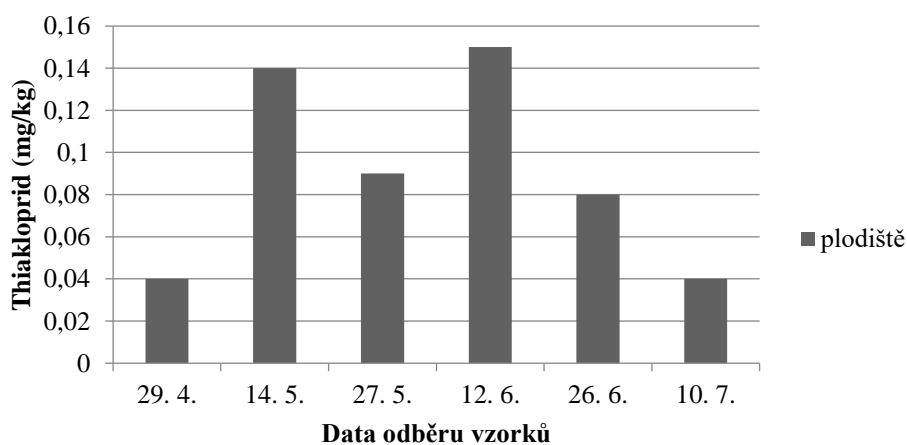
Na stanoviště číslo 10 bylo odebráno 6 vzorků. Ve všech vzorcích odebraných na tomto stanovišti se thiakloprid nacházel v množství, které bylo možné kvantifikovat. Nejvyšší zjištěné množství residuí thiaklopridu bylo zjištěno ve vzorku, který byl odebrán dne 12. 6. v plodíšti. Grafické znázornění hodnot residuí thiaklopridu v čase (Graf 11).

Obrázek 30 Poloha stanoviště číslo 10



Zdroj: www.mapy.cz

Graf 11 Vyhodnocení hodnot residuí thiaklopridu v průběhu sňžkového období roku 2017

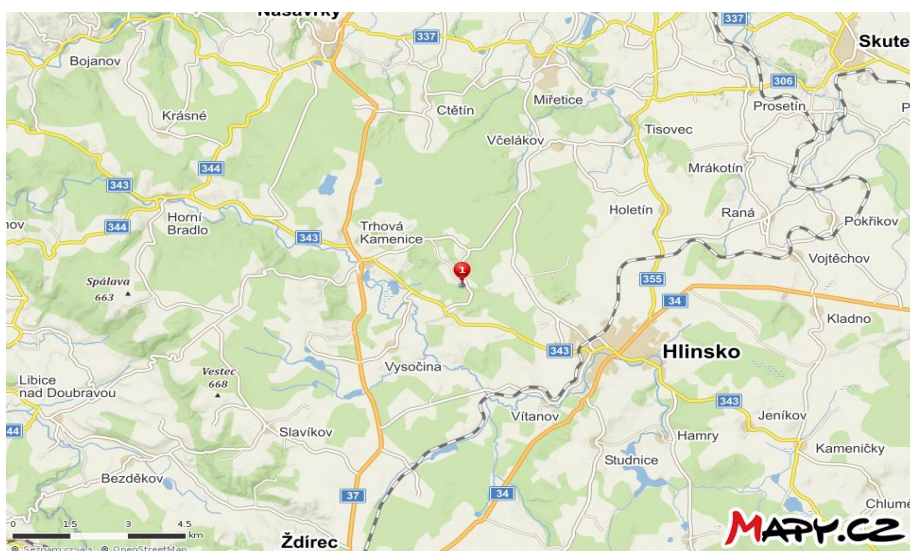


5.2.11 Stanoviště 11

Souřadnice stanoviště 11, které se nachází v nadmořské výšce 586 m. n. m., jsou 49°46'48.818"N, 15°51'10.747"E. Poloha stanoviště je zobrazena na Obr. 31.

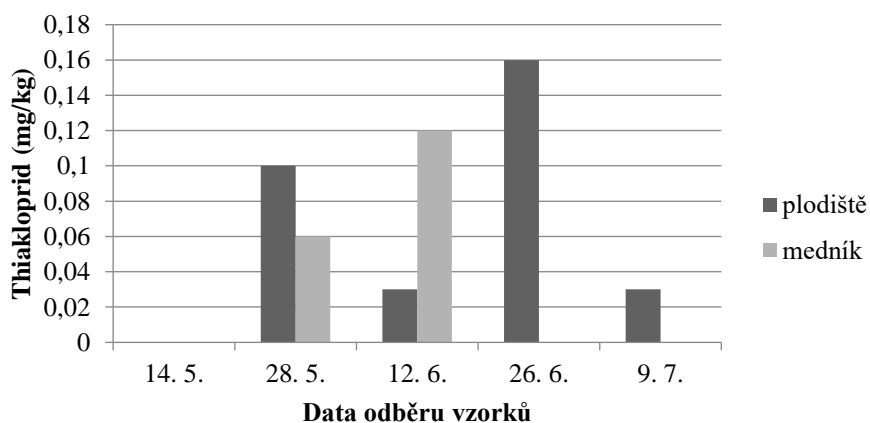
Na stanovišti číslo 11 bylo odebráno celkem 7 vzorků. Vzorek, který byl odebrán jako první, obsahoval množství thiaklopridu, které bylo nad limitem detekce. Následujících šest odebraných vzorků obsahovalo kvantifikovatelné množství thiaklopridu. Nejvyšší naměřené množství residuí thiaklopridu na stanovišti číslo 11 bylo ve vzorku, který byl odebrán dne 26. 6. Grafické znázornění hodnot residuí thiaklopridu v čase (Graf 12).

Obrázek 31 Poloha stanoviště číslo 11



Zdroj: www.mapy.cz

Graf 12 Vyhodnocení hodnot residuí thiaklopridu v průběhu snůškového období roku 2017



Výsledky vzorků z pohledu změny residuí thiaklopridu v průběhu snůškové sezóny 2017 ukázaly, že nejvyšší kumulace residuí thiaklopridu byla na stanovišti 2 až 11 v rozmezí od 14. 5. do 26.6. Tomuto trendu se vymykaly pouze vzorky, které byly odebrány na stanovišti číslo 1 a vykazovaly nejvyšší kumulaci residuí thiaklopridu ve vzorku, který byl odebraný dne 14. 7.

Stanoviště číslo 2 a 3, která vykazovala nejvyšší kumulaci residuí thiaklopridu ve vzorku odebraném dne 14. 5., se nacházejí na stanovištích s nadmořskou výškou 270 a 381 m. n. m. Vzorky odebrané na stanovištích číslo 4-11, které vykazovaly největší kumulaci residuí thiaklopridu v období od 28. 5. do 26. 6. pocházejí z oblastí s průměrnou nadmořskou výškou 584 m. n. m. Důvodem toho, že maximálních naměřených hodnot residuí thiaklopridu na stanovišti 2 a 3 bylo dosaženo dříve oproti stanovišti 4-11 je to, že stanoviště číslo 2 a 3 se nachází v nižší nadmořské výšce než stanoviště 4-11. V nižší nadmořské výšce stanoviště 2 a 3 je vegetační fáze zemědělských plodin v předstihu oproti vyšší nadmořské výšce, kde se nacházejí stanoviště 4-11. Vegetační fáze zemědělských plodin v nižší nadmořské výšce vede zemědělce, kteří obhospodařují zemědělské plodiny k tomu, že aplikace pesticidních přípravků je oproti vyšší nadmořské výšce v předstihu. To je příčina toho, že na stanovišti číslo 2 a 3 jsou maxima hodnot residuí thiaklopridu zjišťována dříve než na stanovištích 4-11.

Příčinou výskytu naměřených hodnot residuí thiaklopridu ve vzorcích odebraných na stanovištích s nadmořskou výškou 270 a 381 m. n. m. a ve vzorcích odebíraných na stanovištích s průměrnou nadmořskou výškou 584 m. n. m. je to, že dochází k ošetření porostů řepky insekticidními přípravky obsahující thiakloprid. Tato ošetření insekticidními přípravky do porostů řepky jsou prováděna v období, kdy tyto porosty mohou být navštěvovány včelami. Včely, které shromažďují potravu (nektar a pyl) na porostech řepky, která je kontaminována insekticidními přípravky, následně transportují tyto kontaminované zdroje potravy do včelího úlu, kde jsou včelami konzumovány. Dalším zdrojem, kde včely mohly přijít do styku s insekticidní látkou thiakloprid, jsou samotné aplikace insekticidních přípravků do porostů zemědělských plodin a následný transport účinné látky thiakloprid do úlů na povrchu svých těl.

6 Diskuze

V kapitole 3. 1. 7. je uvedeno, že počty hromadných úhynů včelstev způsobených přípravky na ochranu rostlin se během roku 2014 zastavily na počtu 30. V roce 2015 byla Státní veterinární správa přivolána k 22 úhynům včelstev a z toho 8 úhynů včelstev bylo zapříčiněno přípravky na ochranu rostlin. V roce 2016 bylo Státní veterinární správou vyšetřováno 27 úhynů včelstev a z toho byla u 7 včelstev prokázána otrava přípravky na ochranu rostlin. V roce 2017 nebyla prokázána žádná otrava včelstev zapříčiněná přípravky na ochranu rostlin. Dle mého názoru a vlastních zkušeností se domnívám, že ročně dojde k mnohonásobně většímu počtu otrav včelstev, které jsou zapříčiněny nesprávnou aplikací pesticidních přípravků na zemědělské plodiny. Důvodem toho, že Státní veterinární správa společně s Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským jsou, jako nejvyšší autority při vyšetřování příčin úhynů včelstev na území České republiky přivolány k minimu otrav včelstev je to, že velké množství otrav včelstev způsobených prostředky na ochranu rostlin není včelaři vůbec odhaleno a zaznamenáno.

Bridi a kol. (2017) píše, že při analýze, kterou provedli na šestnácti vzorcích medu pocházejících z Chile, bylo zjištěno, že ve čtrnácti vzorcích medu nebyla zjištěna přítomnost thiaklopidu. Ve dvou vzorcích medu pocházejících z Chile byla zjištěna přítomnost thiaklopidu v množství 63 $\mu\text{g}/\text{kg}$ medu, ve druhém vzorku bylo detekováno 31 $\mu\text{g} / \text{kg}$. Tato zjištěná množství thiaklopidu ve vzorcích medu pocházejících z Chile odpovídají hodnotám, které byly zjištěny v rámci analýz této diplomové práce tj. 10 – 1 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ matrice. Z analýz, které provedl Bridi a kol. (2017) vyplývá, že bylo kontaminováno 12,5 % vzorků, z celkového počtu 16 vzorků. Z analýz uvedených v diplomové práci je zřejmé, že procentuální zastoupení kontaminovaných vzorků thiaklopidem je 89 %. Pravděpodobným důvodem vyššího procentuálního zastoupení thiaklopidu v medu a nektaru pocházejícího ze stanovišť, kde byly jednotlivé vzorky odebrány je to, že thiaklopid je v ČR více využíván než v Chile. Neonikotinoidní insekticid preferovaný v Chile je imidaklopid. Přehled používání neonikotinoidních účinných látek na jednotlivých kontinentech je uveden na Obr. 12.

Codling a kol. (2016) zjišťovali přítomnost pesticidních residuí v medech, které pocházely z okolí města Saskatoon na území Kanady a našli jeden kontaminovaný vzorek medu z celkového počtu 30 vzorků. Zjištěné množství thiaklopidu bylo na úrovni 0,02 mg thiaklopidu/kg medu. Množství thiaklopidu zjištěné v medu pocházejícím z Kanady opět odpovídá množství thiaklopidu zjištěných ve vzorcích medu a nektaru diplomové práce. Důvodem toho, že z celkového počtu 30 vzorků kanadských medů byl thiaklopidem

kontaminovaný pouze jeden vzorek je to, že na území Severní Ameriky jsou zemědělci preferováni jiné neonikotinoïdní insekticidy (Obr. 12). Nejvíce využívanými neonikotinoïdními insekticidy na území Severní Ameriky jsou thiamethoxam a imidakloprid.

Brandt a kol. (2015) sledovali subletální vliv thiaklopridu na včelí organismus. Důvodem tohoto sledování bylo, že včely jsou v přírodě často vystavovány subletálními dávkami thiaklopridu, které negativně ovlivňují zdravotní stav jednotlivých včel a včelstev. Autoři se zaměřili na sledování počtu imunitních buněk a hemocytů v hemolymfě včel. V jejich studii byly včely vystavovány dvěma různými koncentracemi thiaklopridu, které byly smíchány s cukerným roztokem. Tento roztok včely ad libitum přijímaly po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách, kdy včely přijímaly cukerný roztok, ve kterém byl obsažen thiakloprid v koncentracích 200 $\mu\text{l/l}$ a 2000 $\mu\text{l/l}$, jim byla odebrána hemolymfa. V těchto odebraných vzorcích hemolymfy byly sledovány počty imunitních buněk hemocytů. Počty hemocytů včel přijímající cukerný roztok obsahující thiakloprid byly porovnávány s počtem hemocytů kontrolní skupiny, která přijímala pouze samotný cukerný roztok. Výsledky ukázaly, že pokud včely přijímaly cukerný roztok s obsahem 200 μl thiaklopridu/l, byly počty hemocytů těchto včel nižší než počty hemocytů u kontrolní skupiny. Kontrolní skupina vykazovala hodnotu mediánu hemocytů 8200/ μl . Skupina přijímající cukerný roztok s obsahem thiaklopridu 200 $\mu\text{l/l}$ vykazovala hodnotu mediánu hemocytů 6200/ μl . Nejnižší počet hemocytů měla skupina včel, která přijímala cukerný roztok s obsahem thiaklopridu 2000 $\mu\text{l/l}$. Medián počtu hemocytů této skupiny byl 3100 hemocytů/ μl . Z této studie vyplývá, že včely, které jsou vystaveny subletálními množstvími thiaklopridu, který je přijímán orální cestou, mají snížený počet imunitních buněk v hemolymfě. Tyto včely s nižším počtem hemocytů v hemolymfě mohou následně vykazovat nižší odolnost vůči patogenním vlivům, které mohou na včely působit. Výsledky diplomové práce ukázaly, že thiakloprid, který byl zastoupen v 89 % vzorcích medu a nektaru, byl detekován v množstvích, která mají na včely subletální účinek, a nikoliv účinek letální. Letální hodnoty množství thiaklopridu jsou hodnoty, u kterých dochází k překročení hodnoty LD_{50} pro včely. Titěra (2013) udává, že hodnota LD_{50} pro thiakloprid je 17,32 $\mu\text{g/včela}$. To znamená, že včely ze stanovišť, kde byly odebrány vzorky a v těchto vzorcích byla následně zjištěna subletální množství thiaklopridu, by podle výše uvedené studie Brandta a kol. (2015) mohly mít ve své hemolymfě nižší počet hemocytů než včely, které nebyly vystaveny expozici thiaklopridu.

Retschnig (2013) zjistil, že existuje vztah mezi přežitelností včel vystavených parazitu hmyzomorka včelí (*Nosema ceranae*) a mezi množstvím thiaklopridu, který včely přijímají orální cestou. V jeho studii bylo vytvořeno 6 skupin včel s 20 - ti jedinci. První skupina včel

byla kontrolní skupina. Další skupina včel byla vystavena vysoké koncentraci thiaklopridu, 70mg/l. Třetí skupina adlibitně přijímala cukerný roztok s 35 mg thiaklopridu/l. Čtvrtá skupina byla vystavena pouze expozici spór hmyzomorky včelí. Pátá skupina přijímala cukerný roztok s obsahem 70 mg thiaklopridu/l a zároveň byla tato skupina vystavena expozici spór hmyzomorky včelí. Poslední, šestá skupina přijímala cukerný roztok s obsahem 3 mg thiaklopridu/l a zároveň byla tato skupina také vystavena spórám hmyzomorky včelí. Největší úmrtnost byla zaznamenána u skupiny, která byla vystavena spórám hmyzomorky včelí a zároveň včely z této skupiny přijímaly cukerný roztok s obsahem 70 mg thiaklopridu/l. Z této studie vyplývá, že pokud jsou včely zasaženy vysokými expozičními dávkami thiaklopridu (70 mg/l a více) a zároveň u těchto včel dochází k napadení jejich organismu hmyzomorkou včelí, která se ve včelstvech může běžně vyskytovat, dochází k interakci mezi příjmem vysokých dávek thiaklopridu a zasažením organismu včel hmyzomorkou včelí. Tato interakce může vést ke zvýšené mortalitě včel. V případě, že včely přijímají vysoké dávky thiaklopridu (70 mg/l a více) a organismus včel není zasažen organismem hmyzomorka včelí, tak mortalita včel nedosahuje tak vysokých hodnot v porovnání se stavu, kdy včely přijímají vysoké dávky thialopridu (70 mg/l a více) a organismus včel je zasažen hmyzomorkou včelí. Pokud porovnáme výsledky studie Retschnig (2013) a výsledky v diplomové práci dojdeme k závěru, že pokud by včelstva, ze kterých byly odebírány vzorky medu a nektaru, byla pozitivní na přítomnost hmyzomorky včelí, nemělo by docházet ke zvýšené mortalitě včel na základě interakce mezi přijatým množstvím thiaklopridu a zasažením organismu včel hmyzomorkou včelí. Interakce v případě včelstev diplomové práce by nebyla možná, protože expoziční hodnoty thiaklopridu přijímané včelami orální cestou nedosahovaly hodnot 70 mg thiaklopridu/l, ale hodnot nižších.

Tison a kol. (2016) zjišťovali vliv příjmu cukerného roztoku s obsahem 4,5 ppm thiaklopridu na schopnosti včel vyhledávat a zapamatovat si jednotlivé zdroje potravy v přírodě. Bylo zjištěno, že včely, které přijímaly cukerný roztok obsahující 4,5 ppm thiaklopridu, vyčerpaly objem krmítka průměrně o 0,78 dne déle oproti kontrole, která přijímala pouze samotný cukerný roztok. Důvodem tohoto pomalejšího vyčerpání objemu krmítka se zastoupením thiaklopridu je to, že thiaklopid negativně ovlivňuje schopnosti včel vyhledávat a pamatovat si stanoviště, kde se jednotlivé zdroje potravy nacházejí. Dalším důvodem pomalejšího příjmu obsahu krmítka se zastoupením 4,5 ppm thiaklopridu může být to, že příjem thiaklopridu negativně ovlivňuje schopnost včel předávat si informace o stanovištích, kde se jednotlivé zdroje potravy nacházejí. Toto subletální množství thiaklopridu, které včely přijímaly v pokusu Tisona a kol. (2016) mělo na včely negativní

dopad. Vzorky medů a nektaru v diplomové práci taktéž obsahovaly subletální množství thiaklopridu. To znamená, že včelstva, ze kterých byly odebrány vzorky medu a nektaru se subletálním množstvím thiaklopridu mohou být negativně ovlivněna. Může docházet k poruše chování včel, které je využíváno při vyhledávání zdrojů potravy a při předávání informací o stanovištích, kde se nacházejí zdroje potravy.

V dalším experimentu Tisona a kol. (2016) bylo zjišťováno, zda příjem cukerného roztoku s obsahem thiaklopridu 4,5 ppm má vliv na schopnost včel vracet se zpět do svého domovského úlu. Z výsledků vyplývá, že procentuální zastoupení včel, které se vrátily do svého domovského úlu a přijímaly pouze cukerný roztok, bylo 91,8 %. Oproti tomu procentuální zastoupení včel, které se vrátily do svého domovského úlu a přijímali cukerný roztok s 4,5 ppm thiaklopridu, bylo 76 %. Z těchto výsledků vyplývá, že včely přijímající subletální dávky thiaklopridu mají nižší schopnost vrátit se do svého domovského úlu.

Z výsledků analyzovaných vzorků medu a nektaru v diplomové práci je patrné, že všechny vzorky, ve kterých byla zjištěna přítomnost thiaklopridu, obsahovaly pouze subletální dávky. To znamená, že včely pocházející z úlů, odkud byly odebrány pozitivní vzorky na přítomnost thiaklopridu, mohou mít negativně ovlivněnu schopnost vracet se zpět do svého domovského úlu.

Tison a kol. (2016) testovali, zda přítomnost thialopridu v cukerném roztoku bude mít na včely repelentní účinek. Včely měly možnosti příjmu potravy ze dvou krmítek. V prvním krmítku byl pouze cukerný roztok a v druhém krmítku byl cukerný roztok s 5 ppm thiaklopridu. Výsledky ukázaly, že včely nerozlišovaly mezi krmítkem se zastoupením pouze cukerného roztoku a krmítkem, ve kterém byl cukerný roztok s 5 ppm thiaklopridu. Průměrný čas příjmu potravy z krmítka, kde se nacházel pouze cukerný roztok, byl 6,88 sekund. Průměrný čas příjmu potravy z krmítka, kde se nacházel cukerný roztok s 5 ppm thiaklopridu byl 7,37 sekund. Z těchto výsledků je patrné, že zastoupení thiaklopridu v množství 5 ppm neměl na včely repelentní účinek.

Dle mého názoru by bylo vhodné, kdyby používané pesticidní přípravky měly na včely a další opylovače, kteří navštěvují rostliny ošetřené pesticidními přípravky, repelentní účinek. Kdyby docházelo k tomu, že ošetřené plochy pesticidními přípravky, by měly na včely a další opylovače repelentní účinek, pravděpodobně by docházelo ke snížení počtu otrav včelstev způsobených pesticidními přípravky a také by se následně residua aplikovaných pesticidů do porostů rostlin atraktivních pro včely vyskytovala ve včelích produktech a ve zdrojích potravy včel s menší frekvencí a také v menších množstvích.

Důvodem toho, že v analyzovaných vzorcích nebyly detekovány pyretroidní sloučeniny deltametrin, cypermetrin, λ cyhalotrin, τ -fluvalinat a organofosfát chlorpyrifos je dle mého názoru to, že tyto insekticidy jsou po aplikaci do porostů zemědělských plodin velice rychle degradovány vlivem slunečního záření. Takahashi (1985) udává, že poločas degradace pyrethroidního insekticidu pyretrinu se za přítomnosti slunečního záření pohybuje v intervalu 0,6 – 1,9 dne. Doba, za kterou byly vzorky od data odběru dopraveny do laboratoře České zemědělské univerzity, se pohybovala v řádu sedmi dnů. Tato délka transportu do laboratoře zcela jistě zapříčinila nulový výskyt pyretroidních insekticidů ve vzorcích medu a nektaru.

7 Závěr

- Metoda LC-MS byla vhodně upravena pro podmínky měření vzorků medu a nektaru odebíraných od včelařů v průběhu snůškové sezony roku 2017
- Přítomnost neonikotinoidního insekticidu thiaklopridu byla zjištěna v 89 % analyzovaných vzorcích. Přítomnost pyretroidních insekticidů deltametrinu, cypermetrinu, λ cyhalotrinu, τ -fluvalinatu a organofostátu chlorpyrifosu nebyla zjištěna v žádném vzorku.
- Všechny analyzované vzorky vyhověly limitům Evropské legislativy pro medy, které jsou určeny k lidskému konzumu.
- V žádném vzorku nebyly překročeny hodnoty LD₅₀ pro včely. Množství detekovaných residuí thiaklopridu nebyla pro včely letální, ale tato naměřená množství thiaklopridu ve vzorcích medu a nektaru mohla mít na včely subletální účinek.
- Naměřená množství thiaklopridu se pohybovala v intervalu od 0,01 do 1,18 mg/kg matrice.
- Byla potvrzena hypotéza, že v analyzovaných vzorcích byla zjištěna přítomnost residuí pesticidů, ale tato residua se ve vzorcích nevyskytovala v nadlimitních koncentracích.
- Bylo zjištěno, že největší koncentrace pesticidů se v analyzovaných vzorcích pohybovala od 15. 4. do 26. 6. v závislosti na nadmořské výšce stanoviště, odkud byly jednotlivé vzorky odebírány.
- Z pohledu včelaře nejsou tyto zjištěné hodnoty residuí pesticidů ve vzorcích medu a nektaru uspokojivé. Pro včelaře by bylo uspokojivé, kdyby v analyzovaných vzorcích byla detekována nulová množství residuí pesticidů. Z pohledu zemědělce jsou tyto výsledky uspokojivé, protože nedošlo k překročení limitů Evropské legislativy pro medy, které jsou určeny k lidské spotřebě a také nedošlo k překročení hodnot LD₅₀ pro včely.

8 Použitá literatura:

Agromanual: Účinné látky [online]. [cit. 2018-03-07]. Dostupné z: <https://www.agromanual.cz/cz/pripravky/ucinne-latky&asort=M>.

ANASTASSIADES, Michelangelo. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International* [online]. Wyndmoor, Pensylvánie, 25. říjen 2002, **2003**, 412-431 [cit. 2018-03-26].

ARSENAULT, Joseph a Patrick MCDONALD. *Liquid chromatography*. Milford, USA: Waters Corporation, 2009.

BALOGH, Michael. *The mass spectrometry primer*. Milford, USA: Waters Corporation, 2009.

BELGIE. Prováděcí nařízení komise (EU) č. 485/2013. In: Brusel, 2013.

BLACQUIÈRE, Tjeerd a Guy SMAGGHE. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* [online]. Londýn, Anglie, 2012, 18. únor 2012, (21), 973-972 [cit. 2018-03-29].

BOI, Michele a Giorgia SERRA. A 10 year survey of akaricide residues in beeswax analysed in Italy. *Pest Management Science* [online]. Bologna, Itálie, 2015, **72** [cit. 2018-01-23].

BONZINI, Sara. Predicting pesticide fate in the hive (part 1): experimentally determined τ -fluvalinate residues in bees, honey and wax. *Apidologie* [online]. Miláno, Itálie, 26. leden 2010, **2011**(42), 378-390 [cit. 2018-03-19].

BRANDT, Anenely a GORENFLO Anna. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera L.*). *Journal of Insect Physiology* [online]. Kirchhain, Německo, 22. červen 2015, **2016**(86), 40-47 [cit. 2018-03-29].

BRIDI, Raquel. LC-MS/MS analysis of neonicotinoid insecticides: Residue findings in chilean honeys. *Ciência e Agrotecnologia* [online]. Saskatoon, Kanada, 2. srpen 2017, **2018**, 51-57 [cit. 2018-03-26].

CABONI, Pierluigi. Degradation of pyrethrin residues on stored durum wheat after postharvest treatment. *J. Agric. Food Chem* [online]. 2007, 12. leden 2007, 832-835 [cit. 2018-03-15].

CASIDA, John Edward. Pyrethrum; a benefit to human welfare. In pyrethrum flowers; production, chemistry, toxicology, and uses. *Oxford University Press* [online]. New York, USA, 1995, 345-350 [cit. 2018-03-29].

CODLING, Garry. Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey, pollen and honey bees (*Apis mellifera L.*) in central Saskatchewan, Canada. *Chemosphere* [online]. Saskatoon, Kanada, 15. červen 2015, **2016**, 2321-2328 [cit. 2018-03-26].

- CRESSWELL, James, Nicolas DESNEUX a Dennis Van ENGELSDORP. Dietary traces of neonicotinoid pesticides as a cause of population declines in honeybees: an evaluation by Hill's epidemiological criteria. *Pest Management Science* [online]. Oregon, USA, 2012, (68), 819-827 [cit. 2018-03-29].
- ČESKÁ REPUBLIKA. Zákon o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů. In: č. 326/2004 Sb.
- ČESKÁ REPUBLIKA. Vyhláška o ochraně včel, zvěře, vodních organismů a dalších necílových organismů při použití přípravků na ochranu rostlin. In: 327/2012 Sb.
- ČESKÁ REPUBLIKA. Zákon o rostlinolékařské péči. In: č. 326/2004 Sb.
- DESNEUX, Nicolas. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* [online]. University of Minnesota, 14. červenec 2006, 81-106 [cit. 2018-03-19].
- DI PRISCO, Gennaro a Valeria CAVALIERE. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proc Natl Acad Sci USA*. [online]. Illinois, USA, 21. říjen 2013 [cit. 2018-03-29].
- DOBRYNIN, Nikolay Dmitrievich. Insecticides residual hazard to bees. *Agriculture & Forestry* [online]. Podgorica, Černá Hora, 2016, (62), 187-193 [cit. 2018-03-29].
- ELLIS, James D. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research* [online]. Beltsville, USA, 2009, 3. prosince 2009, 134-136 [cit. 2018-03-15].
- ERBAN, Tomáš. Nový přístup hodnocení suspektních otrav včel pesticidy [online]. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. Praha, 2017, 27 [cit. 2018-02-22].
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. EFSA Guidance document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus spp.* and solitary bees). *EFSA Journal* [online]. Parma, Itálie, 4. červenec 2013, (11) [cit. 2018-03-29].
- EVROPSKÁ KOMISE. Maximum Residue Levels [online]. 2016 [cit. 2018-01-19].
- FAROOQI, Muhammad Aslam, Muhammad Altaf SABRI a Nazir JAVED. Assessment of insecticide residues in raw honey by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Pakistan Journal of Zoology* [online]. Faisalabad, Pakistan, 2015, 965-970 [cit. 2018-03-29].
- FISHEL, Frederik. *Pesticide toxicity profile: Synthetic pyrethroid pesticides* [online]. Gainesville, Florida, červen 2005 [cit. 2018-03-29].
- FONTANA, Ariel R. a Alejandra B. CAMARGO. Coacervative microextraction ultrasound-assisted back-extraction technique for determination of organophosphate pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* [online]. 2010 [cit. 2018-01-19].

FRIES, Ingemar. Effects on *Varroa jacobsoni* from acaricides in beeswax. *Journal of Apicultural Research* [online]. Uppsala, Sweden, **1998**(37) [cit. 2018-01-20].

GERBERDING, Julie. Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* [online]. Atlanta, Georgia, **2003** [cit. 2018-03-29].

GILBERT, Steven. Organophosphates [online]. 2014, **2016** [cit. 2017-04-18].

GIROLAMI, V. a L. MAZZON. Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *J. Econ. Entomol.* [online]. 2009, 8. květen 2009, (102), 1808-1815 [cit. 2018-03-30].

GOUGH, H. J. Toxicity to honeybees of water the use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera L.*) 1981-1992. *J. Apic. Res.* [online]. **1994**(33), 119-125 [cit. 2018-03-29].

GUPTA, S. Effect of light on the degradation of two neonicotinoids viz acetamiprid and thiakloprid in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* [online]. **2008**(81), 185-189 [cit. 2018-03-29].

HAYENGA, Ingrid. Neonicotinoids pesticides and metabolites. *AnalytiX* [online]. Baden-Württemberg, Německo, 2008, **9**(3) [cit. 2018-03-14].

HOOVEN, L. a R. SAGILI. *How to reduce bee poisoning from pesticides* [online]. Oregon State University, USA, 2013, 1 - 35 [cit. 2018-03-29].

HORÁK, Josef, Igor LINHART a Petr KLUSOŇ. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky* [online]. VŠChT, Praha, 2004 [cit. 2018-03-29]. ISBN 80-7080-548-X.

CHRISTENSEN, K., B. HARPER a B. LUUKINEN. Chlorpyrifos technical fact sheet. *National Pesticide Information Center* [online]. Oregon, USA, 2009 [cit. 2018-03-29].

IWASA, Takao, Naoki MOTOYAMA a John AMBROSE. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* [online]. Raleigh, USA: North Carolina State University, 30. listopad 2001, (23), 371-378 [cit. 2018-03-29].

JONES, Dee An. Deltametrin: safety summary for veterinary use in Dogs, Cats, Horses, Cattle, Sheep, Goats, Swine and Poultry. Poisoning, intoxication, overdose, antidote: deltametrin: safety summary for veterinary use [online]. 15. prosinec 2017 [cit. 2018-03-15].

JONES, Dee An. Environmental fate of cypermethrin. *Environmental Monitoring & Pest Management* (Department of Pesticide Regulation) [online]. Sacramento, CA, 1996 [cit. 2018-03-15].

JUNQUERA, P. *Synthetic pyrethroids for veterinary use in dogs, cats, horses and livestock-cattle, sheep, goats, pig, poultry-against external parasites* [online]. 2017 [cit. 2018-03-29].

KAMRIN, Michael. Pesticides profil: Toxicity, Enviromental impact, and fate. Michigan State University, 1997. ISBN 0-56670-190-2.

MARRS, Tim a Diana ANDERSON. *Mammalian toxicology of insecticides*. 12. Royal Society of Chemistry, 2012. ISBN 9067642215.

MEHLHORN, Heinz. *Encyclopedic reference of parasitology*. 2. Düsseldorf, Německo: Heinrich-Heine-University, 2000. ISBN 3-540-66829-2.

MILANI, Norberto. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* [online]. Udine, Itálie, 1999, (2-3), 229-234 [cit. 2018-03-29].

MITCHELL, E. A. D. A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science* [online]. 6. října 2017, 109-111 [cit. 2018-03-13].

MULLIN, Christopher A. a Maryann FRAZIER. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for honey bee health. *Plos One* [online]. 19. květen 2010, 5(3) [cit. 2018-03-29].

PFEIL, R. Thiacloprid. *World health organization* [online]. 2006 [cit. 2018-03-29].

PIECHOWICZ, Bartosz, Kinga STAWARCZYK a Michal STAWARCZYK. *Circadian changes in susceptibility of young honey bee workers to intoxication by pyrethroid, carbamate, organophosphorus, benzoyl urea and pyridine derivate insekticide* [online]. University of Rzeszow, Polsko, 2012 [cit. 2018-03-29].

Registrované přípravky pro tlumení varroázy [online]. [cit. 2018-03-29]. Dostupné z: http://www.beedol.cz/nase_produkty/leky/

RETSCHNIG, Gina. Thiacloprid-*Nosema ceranae* interactions in honey bees: Host survivorship but not parasite reproduction is dependent on pesticide dose. *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. Bern, Švýcarsko, 20. listopad 2013, 2014(118), 18-19 [cit. 2018-03-29].

ROBERTS, Terry. *Metabolic pathways of agrochemicals*. Cambridge, Anglie: Royal Society of Chemistry, 2010. ISBN 978-0854044993.

SANCHEZ-BAYO, Francisco. Pesticide residues and bees-a risk assessment [online]. The University of Sydney, 9. květen 2014 [cit. 2018-03-15].

SERRA-BONVEHI, J. a J. ORANTES-BERMEJO. Acaricides and their residues in Spanish commercial bees wax. *Pest Management Science* [online]. 2010, (66) [cit. 2018-01-23].

Spotřeba přípravků na ochranu rostlin v jednotlivých letech. Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský [online]. Brno, 2017, 6. 6. 2017 [cit. 2018-03-07]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/537721/celek_2016_CZ.pdf

STEIER, Gabriela. *International farm animal, wildlife and food safety law*. Boston, USA, 2017. ISBN 978-3-319-18001-4.

TAKAHASHI, Naohiro. Photodegradation of the pyrethroid insecticide cypermethrin in water and on soil surface. *Journal Pesticide Science* [online]. Takarazuka, Japonsko, 2007, 30. březen 1985, **10**, 629-642 [cit. 2018-03-15].

TAPPARO, Andrea a Chiara GIORIO. Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated seeds. *Journal of environmental monitoring* [online]. Padova, Itálie: Università degli Studi di Padova, 21. duben 2011 [cit. 2018-03-29].

TETTE, Patrícia Amaral Souza a Fabiano Aurélio da Silva OLIVEIRA. Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry* [online]. Brazílie, 2016, 6. květen 2016, (15), 130-139 [cit. 2018-03-30].

TETTE, Patrícia Amaral Souza a Letícia Rocha GUIDI. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. *Talanta* [online]. Brazílie, 2016, 1.květen 2016, (149), 124-141 [cit. 2018-03-30].

TISON, Léa a Marie-Luise HAHN. Honey bees' behavior is impaired by chronic exposure to the neonicotinoid thiacloprid in the field. *Environ. Sci. Technol.* [online]. Berlin, Německo, 2016, 7. červenec 2016, **50**(13) [cit. 2018-03-30].

TITĚRA, Dalibor. Prevence otrav včel pesticidy a jejich praktické řešení. 10.4. 2017. Aula Výzkumného ústavu rostlinné výroby Ruzyně, Drnovská 507/73, Praha 6: Česká společnost rostlinolékařská, z.s.

UNEP. (2010). Global honey Bee Colony Disorders and Other Threats to Insect Pollinators.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Clothianidin. *Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances* [online]. Pensylvánie, USA, 30. květen 2003 [cit. 2018-03-29].

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. *Insecticides* [online]. USA, 2006 [cit. 2018-03-30]. Dostupné z: https://www3.epa.gov/caddis/ssr_ins_int.html

Včely-Ostatní: Mapa stanovišť s šetřením příčin hromadných úhynů včelstev. Státní veterinární správa [online]. 31.5. 2017 [cit. 2018-02-21]. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/vcely-ostatni/>

WALLNER, Klaus. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* [online]. Stuttgart, Německo, 1998, **30**, 235-248 [cit. 2018-01-22].

WIEST, Laure a Audrey BULETÉ. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography* [online]. Solaize, Francie, 2011, 21. duben 2011, 5743-5756 [cit. 2018-03-30].

WOLTERING, G. Lambda cyhalotrin. Pesticides residues in food - 2007 [online]. Centre for Substances and Integrated Risk Assessment, Nizozemsko, 2007, 173-200 [cit. 2018-03-15].

WOODCOCK, Thomas S. Woodcock. Pollination in the agricultural landscape: Best Management Practices for Crop Pollination. 2012.

WU, Judy a Carol ANELLI. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *Plos One* [online]. 2011, 4. květen 2010, (2), 1-11 [cit. 2018-03-30].

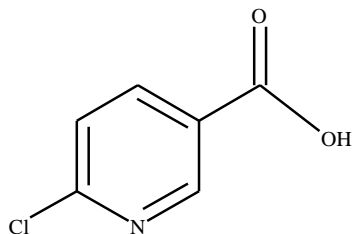
WU, Judy Y. a Matthew D. SMART. Honeybees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *JournalofInvertebratePathology* [online]. 2012, 326-329 [cit. 2018-01-22].

YAMAMOTO, I.; *Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor*. Tokyo, Japonsko: Springer, 1999. ISBN 978-4-431-70213-9.

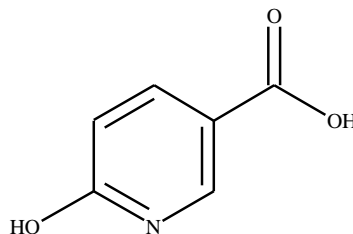
9 Samostatné přílohy

Obrázek 4 Strukturální vzorce metabolitů imidaklopridu

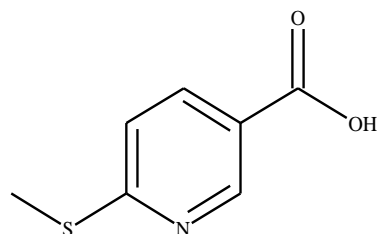
6-chloronikotinová kyselina



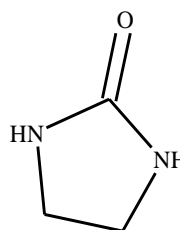
6-hydroxynikotinová kyselina



6-metylmerkaptonikotinová kyselina

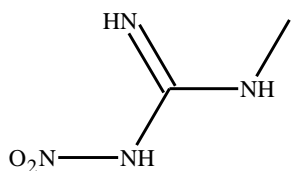


2-imidazolidon

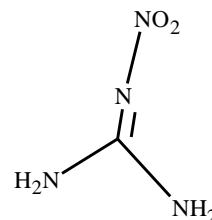


Obrázek 5 Strukturální vzorce metabolitů klotianidinu

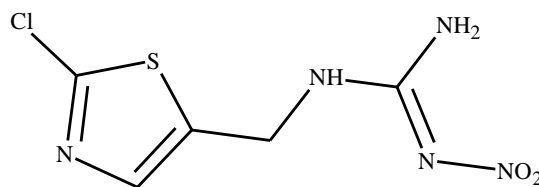
1-metyl-3-nitroguanidin



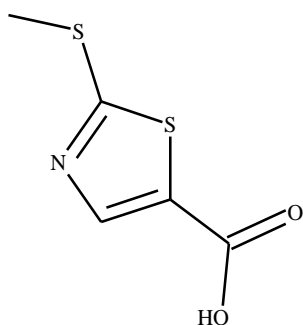
nitroguanidin



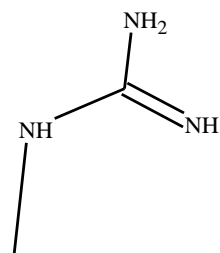
N-(2-chlorothiazol-5-ylmetyl)-N-nitroguanidin



2-(methylthio)thiazol-5-karboxylová kyselina

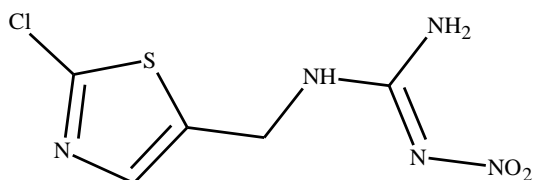


methylguanidin

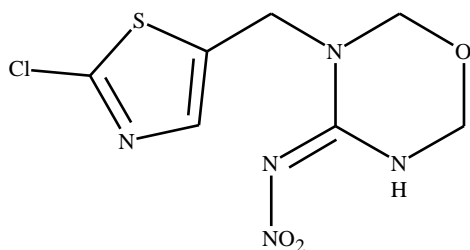


Obrázek 6 Strukturní vzorec metabolitů thiamethoxamu

N-(2-chlorothiazol-5-ylmethyl)-N-nitroguanidin

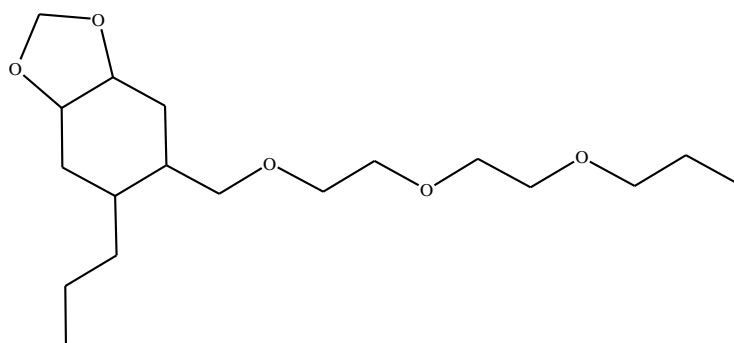


3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-1,3,5-oxadiazin-4-ylidene (nitro) amin

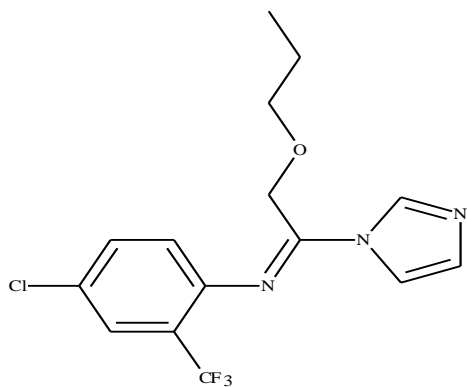


Obrázek 8 Strukturní vzorce sloučenin, u kterých byl ve studii Iwasa a kol. (2013) sledován synergistický efekt s neonikotinoidy

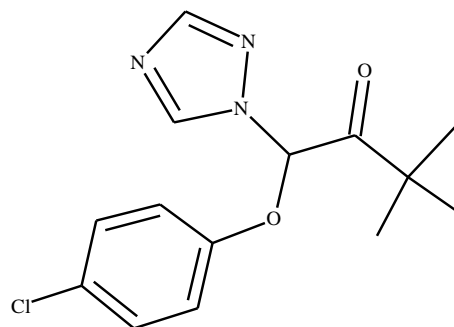
PBO (piperonyl butoxid)



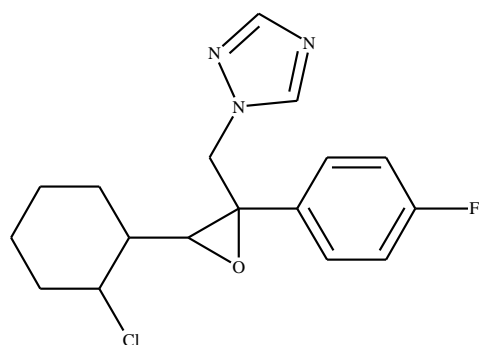
triflumizol



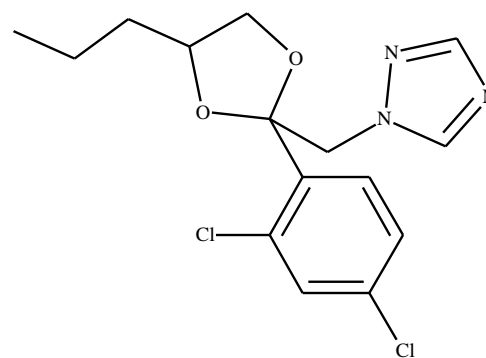
triadimefon



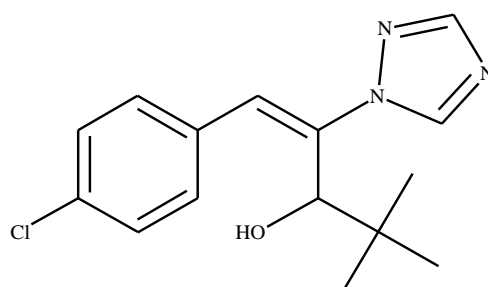
epoxikonazol



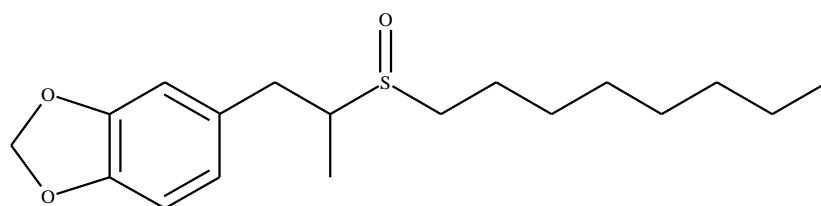
propikonazol



unikonazol



Obrázek 9 Strukturní vzorec piperonyl sulfoxidu



Seznam příloh

Obrázek 4	Strukturní vzorce metabolitů imidaklopridu	68
Obrázek 5	Strukturní vzorce metabolitů klotianidinu.....	68
Obrázek 6	Strukturní vzorec metabolitů thiamethoxamu	69
Obrázek 8	Strukturní vzorce sloučenin, u kterých byl ve studii Iwasa a kol. (2013) sledován synergistický efekt s neonikotinoidy	69
Obrázek 9	Strukturní vzorec piperonyl sulfoxidu.....	70