

**UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu**

**KATEDRA Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt**

**PRACOWNIA Pszczelnictwa**

**Agnieszka Marta Murawska**

**Zmiana poziomu wskaźników biochemicznych oraz kondycji rodziny pszczelej (*Apis mellifera* L.) narażonej na środki ochrony roślin i ich mieszaniny**

**Change in the level of biochemical indicators and the condition of the bee colony (*Apis mellifera* L.) exposed to pesticides and their mixtures**

**Rozprawa doktorska napisana pod kierunkiem**

**prof. dr. hab. inż. Adama Romana**

**oraz dr. inż. Pawła Migdała**

**Wrocław 2022**

Praca finansowana przez Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
z projektu badawczego o numerze N070/0014/21,  
w ramach programu „Innowacyjny Doktorat”

## ***Podziękowania***

*Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi Panu prof. dr. hab. Adamowi Romanowi za życzliwość i wsparcie podczas trwania studiów doktoranckich, a także cenne uwagi i sugestie, które wpłynęły na ostateczny kształt tej pracy oraz mojemu promotorowi pomocniczemu dr. inż. Pawłowi Migdałowi za przekazanie wiedzy i umiejętności pszczelarskich, inspirację do zgłębiania zagadnień naukowych, wiarę w moje możliwości oraz pomoc w najtrudniejszych momentach.*

*Szczególne podziękowania składam przyjaciołom, którzy okazywali wsparcie w trakcie studiów i pisania rozprawy doktorskiej oraz wszystkim tym, bez których powstanie niniejszej pracy nie byłoby możliwe: Ewie, Markowi, Antoniemu, Hubertowi i Luizie Gutkowskim, Alinie Gutkowskiej i Janowi Migdałowi, Ewelinie Berbeć, Agacie Wojdon-Kusibab, Katarzynie Kozal, Natalii Grabny, Piotrowi Froniowi, Adze Mrowiec, Bartkowi Krawczykowi, Oli Galler, Julii Turskiej, Małgorzacie Żmijowskiej, Edwardowi Żmijowskiemu, Pani Krystynie Pogodzie-Sewerniak, Pani mgr Annie Burek, Kubie Kusibabowi oraz Jakubowi Smolińskiemu.*

*Chciałabym także w sposób wyjątkowy podziękować rodzinie, a w szczególności rodzicom za cierpliwość i ogromne wsparcie na całej mojej drodze edukacji oraz Pawłowi i Krzysztofowi za pomoc, której nie da się opisać słowami.*

## Streszczenie

Robotnice pszczoły miodnej podczas poszukiwania pokarmu i wody mogą mieć kontakt z wieloma środkami ochrony roślin (ŚOR) w niskich stężeniach. Niejednokrotnie po kontakcie ze śladowymi ilościami ŚOR (np. w przyniesionym pokarmie) są one zdolne do powrotu do ula, co może przyczynić się do ekspozycji całej rodziny pszczelej na szkodliwe substancje.

W niniejszej rozprawie przedstawiono efekt ekspozycji na ŚOR i ich mieszaniny na kondycję rodzin pszczelich i wybrane wskaźniki biochemiczne robotnic, których rozwój przebiegał z narażeniem na ŚOR w środowisku ula. W badaniach wykorzystano komercyjne formułacje acetamiprydu (insektycydu), glifosatu (herbicydu) i tebukonazolu (fungicydu) w stężeniach odpowiadających pozostałościom tych substancji w środowisku (tj. 250, 7 200 i 147 ppb). Środki te są powszechnie stosowane w produkcji roślinnej. Jako wskaźniki kondycji rodzin wybrano siłę rodziny, powierzchnię czerwiu i zapasów pokarmu, tempo odbudowy węży i instynkt higieniczny. Do analizy biochemicznej wybrano wskaźniki systemu detoksykacyjnego i antyoksydacyjnego: aminotransferazę asparaginianową (AST), aminotransferazę alaninową (ALT), fosfatazę alkaliczną (ALP), gamma-glutamylotranspeptydazę (GGTP), albuminy, kreatyninę, mocznik, kwas moczowy oraz całkowity potencjał antyoksydacyjny organizmu (TAS).

W badaniach własnych wykazano, że ŚOR i ich mieszaniny powodują zmiany w poziomie/aktywności badanych wskaźników biochemicznych robotnic, jednak nie odnotowano zmian we wskaźnikach kondycji rodziny pszczelej. Acetamipryd (insektycyd) wpłynął istotnie na poziom mocznika w hemolimfie pszczoł modnych, obniżając jego zawartość. Glifosat (herbicyd) nie wpłynął istotnie na poziom żadnego z analizowanych wskaźników biochemicznych robotnic. Tebukonazol (fungicyd) spowodował zmiany w poziomie większości badanych wskaźników biochemicznych. ŚOR pojedynczo i w mieszaninach charakteryzowały się odmiennym wpływem na poziom badanych wskaźników biochemicznych.

Uzyskane wyniki pokazują, że przewlekła ekspozycja na ŚOR w niskich stężeniach powoduje zmiany na poziomie biochemicznym, które mogą być zagrożeniem dla pszczoł. Na pszczołę miodną w środowisku, oprócz ŚOR, wpływa wiele innych czynników szkodliwych takich, jak np. choroby, pole elektromagnetyczne czy zmiany klimatu. Choć pojedynczo mogą one nie wywoływać zauważalnych zmian na poziomie rodziny pszczelej, ich wspólne oddziaływanie przyczyniać się może do znacznego jej osłabienia.

## Abstract

While searching for food and water, worker bees may come into contact with a variety of low-concentration chemical plant protection products (PPPs). In many cases, after coming into touch with trace levels of PPPs (for example, in gathered food), they are able to return to the hive, potentially exposing the entire bee colony to harmful substances.

In this dissertation, the effect of exposure to PPPs and their combinations on the bee colonies and chosen biochemical markers of worker bees whose growth followed exposure to PPPs in the hive environment is presented. Commercial formulations of acetamiprid (insecticide), glyphosate (herbicide), and tebuconazole (fungicide) were utilized in this study in amounts/concentrations that corresponded to residues of these substances in the environment (i.e. 250, 7200 and 147 ppb). These substances are commonly used in plant production. The following biochemical indicators of the detoxification and antioxidant system were selected for the analysis: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyltranspeptidase (GGTP), albumin, creatinine, urea, and the total antioxidant status (TAS). Colony strength, brood area and food supplies, as well as the rate of starter combs building and hygienic behavior were chosen as indicators of the condition of the colonies.

The author's own research has shown that PPPs and their mixtures cause changes in the level/activity of the examined biochemical indicators of worker bees, however no changes were noted in colonies. Acetamiprid (insecticide) significantly decreased the level of urea in the hemolymph of worker bees. Glyphosate (herbicide) did not affect significantly the level/activity of any of the analyzed biochemical indicators of female workers. Tebuconazole (fungicide) caused changes in the level of most of the studied biochemical indicators. PPPs had a distinct influence on the level/activity of the biochemical markers evaluated, both singly and in mixes.

The findings reveal that persistent exposure to PPPs at low concentrations produces biochemical alterations in bees, which might pose a hazard to them.

Aside from the PPPs, many other damaging variables, such as diseases, electromagnetic fields, and climate changes, have an impact on honey bees in the environment. Although their individual effects may not be obvious at the level of a bee colony, their combined influence may contribute to its major deterioration.

# Spis treści

<i>Streszczenie</i> .....	4
<i>Abstract</i> .....	5
<i>Alfabetyczny wykaz skrótów stosowanych w pracy</i> .....	8
<b>1. Wstęp</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 Pszczoła miodna – charakterystyka wybranych elementów biologii</b> .....	<b>11</b>
1.1.1 Charakterystyka i znaczenie .....	11
1.1.2 Indywidualne i społeczne mechanizmy obronne .....	11
<b>1.2 Środki ochrony roślin – charakterystyka, klasyfikacja, znaczenie i stan prawny</b> .....	<b>14</b>
1.2.1 Charakterystyka i klasyfikacja ŚOR.....	14
1.2.2 Znaczenie ŚOR.....	17
1.2.3 ŚOR jako czynnik zagrażający pszczole miodnej w środowisku .....	18
1.2.4 Sytuacja prawna w kontekście bezpieczeństwa dla pszczoły miodnej.....	19
1.2.5 Uwarunkowania badań ŚOR z wykorzystaniem rodzin pszczelich.....	22
<b>1.3 Aktualny stan wiedzy na temat substancji aktywnych wykorzystanych w badaniach własnych oraz ich wpływu na pszczolę miodną</b> .....	<b>24</b>
1.3.1 Acetamipryd .....	24
1.3.2 Glifosat .....	28
1.3.3 Tebukonazol.....	31
<b>2. Cel pracy i hipotezy badawcze</b> .....	<b>33</b>
<b>3. Materiały i metody</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1 Rodziny pszczele</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2 Roztwory doświadczalne i ekspozycja rodzin na środki ochrony roślin</b> .....	<b>36</b>
<b>3.3 Pobranie i analiza hemolimfy</b> .....	<b>38</b>
3.3.1 Pobranie hemolimfy .....	38
3.3.2 Analiza hemolimfy .....	39
<b>3.4 Ocena rodzin pszczelich</b> .....	<b>42</b>
3.4.1 Siła rodziny, powierzchnia czerwiu krytego i pokarmu .....	42
3.4.2 Ocena instynktu higienicznego .....	44
3.4.3 Ocena stopnia odbudowy węzy .....	45
3.4.4 Ocena zimotrwałości rodzin pszczelich .....	45
<b>3.5 Analiza pozostałości badanych substancji aktywnych w próbach</b> .....	<b>46</b>

3.6	Warunki atmosferyczne .....	46
3.7	Analiza statystyczna.....	46
4	<b>Wyniki</b> .....	47
4.1	<b>Pozostałości badanych substancji aktywnych w zebranych próbach</b> .....	47
4.1.1	Obecność matki i jakość czerwienia.....	47
4.1.2	Siła rodziny oraz powierzchnia czerwiu krytego i pokarmu na ramkach.....	47
4.1.3	Instykt higieniczny i stopień odbudowy węży .....	54
4.1.4	Ocena zimotrwałości rodzin pszczelich .....	55
4.2	<b>Wpływ badanych substancji aktywnych obecnych w formulacjach ŚOR na aktywność/poziom wskaźników biochemicznych</b> .....	56
4.2.1	Enzymy detoksykacyjne i antyoksydacyjne – ALT, AST, ALP oraz GGTP .....	57
4.2.2	Nieenzymatyczne antyoksydanty – albuminy, kreatynina, kwas moczowy i mocznik .....	60
4.2.3	Wskaźnik całkowitej pojemności antyoksydacyjnej organizmu – TAS.....	64
5	<b>Dyskusja</b> .....	65
5.1	<b>Wpływ badanych substancji aktywnych obecnych w formulacjach ŚOR na rodziny pszczele</b> .....	65
5.2	<b>Wpływ badanych substancji aktywnych obecnych w formulacjach ŚOR na poziom wskaźników biochemicznych</b> .....	66
5.2.1	Enzymy detoksykacyjne i antyoksydacyjne (ALT, ALP, AST, GGTP) .....	67
5.2.2	Nieenzymatyczne antyoksydanty (mocznik, kwas moczowy, kreatynina, albuminy) .....	70
5.2.3	TAS .....	71
6.	<b>Podsumowanie</b> .....	72
7.	<b>Wnioski</b> .....	74
8.	<b>Spis piśmiennictwa</b> .....	75
9.	<b>Spis aktów prawnych</b> .....	95
10.	<b>Załączniki</b> .....	96

## Alfabetyczny wykaz skrótów stosowanych w pracy

Skrót	Rozwinięcie skrótu
AChE	Acetylocholinoesteraza (enzym)
a.i	Substancja aktywna
ALP	Fosfataza alkaliczna (enzym)
ALT	Aminotransferaza alaninowa (enzym)
AST	Aminotransferaza asparaginianowa (enzym)
ATP	Adenozyno-5'-trifosforan (nukleotyd)
BHC	$\beta$ -heksachlorocykloheksan (insektycyd)
CAT	Katalazy (enzymy)
CCD	Zespół masowego ginięcia pszczoły miodnej
COE	Karboksyloesterazy (enzymy)
DDT	Dichlorodifenylotrichloroetan (insektycyd)
EPPO	Europejska i Śródziemnomorska Organizacja Ochrony Roślin
EPSP	Syntaza 5-enolopirogroniano-szikimowo-3-fosforanowa (enzym)
FRAP	Zdolność redukowania jonów żelaza (III)
GGTP	Gamma-glutamylotranspeptydaza (enzym)
GP6D	Dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (enzym)
GST	S-transferazy glutationu (enzymy)
GPX	peroksydaza glutationowa (enzym)
hq	Iloraz zagrożenia
L.	Karol Linneusz
LC-MS/MS	Chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas
LD <sub>50</sub>	Dawka powodująca śmierć 50% osobników
mld	Miliard
mln	Milion
nAChRs	Receptory nikotynowe N
OECD	Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju
PER	Odruch wysunięcia trąbki przez owada
ppb	Liczba cząstek na miliard (jednostka)
sd	Odchylenie standardowe
SOD	Dysmutaza ponadtlenkowa (enzym)
SPE	Ekstrakcja do fazy stałej
ŚOR	Środki ochrony roślin
TAS	Całkowity status antyoksydacyjny
UE	Unia Europejska
USD	Dolar amerykański



## 1. Wstęp

Środki ochrony roślin (ŚOR) to pestycydy stosowane w ochronie upraw rolniczych, sadowniczych, ogrodniczych oraz roślin ozdobnych. Obejmują przede wszystkim insektycydy (środki owadobójcze), fungicydy (środki grzybobójcze) i herbicydy (środki chwastobójcze) [1]. Użycie tych substancji niszczy szkodniki, choroby i chwasty w uprawach, co wpływa na zwiększenie plonów i ma duże znaczenie w produkcji żywności i pasz [2]. O znaczeniu pestycydów dla ludzkości świadczy Nagroda Nobla przyznana w 1948 roku Paulowi Mullerowi za odkrycie owadobójczych właściwości dichlorodifenylotrichloroetanu (DDT). Środek ten wykorzystywano do ochrony roślin oraz likwidacji owadów przenoszących choroby zakaźne występujące u ludzi i zwierząt [3]. Nikt wtedy nie spodziewał się, że pestycydy mogą mieć negatywny wpływ na środowisko. Jedną z głównych wad ŚOR jest ryzyko ich nieselektywnego sposobu działania oraz możliwość akumulacji w środowisku [4]. Wiele z niegdyś powszechnie stosowanych ŚOR zostało wycofanych z użycia z powodu szkodliwości dla ludzi i zwierząt stałocielnych [5].

Od wielu lat doniesienia naukowe wskazują na toksyczność ŚOR wobec pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.). Owad ten jako zapylniczy stanowi bardzo ważne ogniwo w zwiększeniu plonów rolniczych oraz zachowaniu bioróżnorodności [6]. ŚOR i ich wpływ na pszczołę miodną jest przedmiotem wielu badań. Jednak różnorodność grup chemicznych, ogromna liczba substancji aktywnych, stężenie ich pozostałości w środowisku, formułacje oraz sposoby aplikacji, a także nieustannie aktualizowane przepisy prawne powodują, że nadal jest to szerokie zagadnienie. Dodatkowym czynnikiem, który wpływa na złożoność tego tematu jest struktura rodziny pszczolej, w której poszczególne osobniki różnią się płcią, wiekiem i pełnionymi funkcjami, co przekłada się na ich wrażliwość oraz stopień narażenia na toksyczne substancje [7, 8].

Najwięcej analiz dotyczących zagrożeń dla pszczoły miodnej ze strony ŚOR przeprowadza się z wykorzystaniem insektycydów, natomiast pozostałe grupy ŚOR, takie jak herbicydy i fungicydy, są mniej popularnym przedmiotem badań [9]. Testy wykonywane są najczęściej w laboratorium z wykorzystaniem robotnic. Uwzględniają one jedynie sytuację, w której owady te są narażone na wysokie dawki pojedynczego środka i krótkotrwałą ekspozycję [10–12]. Tymczasem robotnice pszczoły miodnej podczas poszukiwania pokarmu i wody są najczęściej narażone jednocześnie na wiele ŚOR (w tym również fungicydów i herbicydów) w niskich stężeniach [13]. W przypadku związków działających systemicznie,

takich jak np. insektycydy neonikotynoidowe, nie można wykluczyć efektów długoterminowych, ponieważ produkt może być obecny w nektarze lub pyłku roślin [14–16].

Kontakt ze ŚOR może wpłynąć na fizjologię owada, a w wielu przypadkach po kontakcie ze śladowymi ilościami ŚOR robotnice są zdolne do powrotu do ula, co może przyczynić się do eskpozycji całej rodziny pszczelej na szkodliwą substancję. W zależności od stężenia i toksyczności ŚOR, efekt może być widoczny po kilku dniach, tygodniach, a nawet miesiącach. Pozostałości mogą znajdować się w pokarmie, istnieje więc ryzyko, że będą wpływać na nowe pokolenia pszczół i osłabiać rodzinę pszczelą [16–27]. Niestety, w warunkach laboratoryjnych niemożliwe jest obserwowanie oddziaływania ŚOR na wszystkie stadia rozwojowe i prowadzenie wychowu czerwiu przez robotnice. Badanie laboratoryjne wpływu ŚOR z wykorzystaniem tylko pojedynczej kasty, nie odzwierciedli więc wpływu danej substancji na całą rodzinę pszczelą [16].

Badania, w których wykorzystuje się całe rodziny pszczele są skomplikowane i wymagają dużych nakładów finansowych, dlatego są przeprowadzane znacznie rzadziej od badań laboratoryjnych. Dodatkowe utrudnienie stanowi fakt, że nie ma możliwości kontrolowania wpływu warunków atmosferycznych oraz ograniczenia poruszania się przez pszczoły miodne w środowisku. Oznacza to, że oprócz badanych substancji, na rodziny pszczele wpływać może wiele innych czynników. Mimo tego, badania toksyczności ŚOR z wykorzystaniem rodzin pszczelich są przeprowadzane, a ich wyniki uznawane za cenne.

Przedmiotem niniejszej pracy jest analiza poziomu wybranych wskaźników biochemicznych w hemolimfie robotnic oraz kondycji rodzin pszczelich narażonych na ŚOR (insektycyd, fungicyd i herbicyd) oraz ich mieszaniny w stężeniach odpowiadającym pozostałościom wykrywanym w środowisku. Analiza hemolimfy odgrywa kluczową rolę w monitorowaniu stanu fizjologicznego pszczoły miodnej, mimo iż zmiany w poziomie i aktywności wskaźników biochemicznych są jednym z najmniej poznanych i zarazem trudnym do interpretacji aspektem biologii tego owada. Badanie przewlekłego wpływu ŚOR (w tym fungicydów i herbicydów) oraz ich mieszanin w niskich stężeniach wykrywanych w środowisku na całe rodziny pszczele jest istotnym zagadnieniem badawczym nie tylko w hodowli pszczoły miodnej, ale również w utrzymaniu odpowiedniej populacji zapylaczy oraz ochrony środowiska i produkcji roślinnej.

## 1.1 Pszczoła miodna – charakterystyka wybranych elementów biologii

### 1.1.1 Charakterystyka i znaczenie

Zapylenie przez owady jest niezbędne dla zachowania bioróżnorodności i funkcjonowania całego ekosystemu. Zbierając pokarm i przemieszczając się z kwiatu na kwiat, pszczoły przyczyniają się do zapylenia, które jest niezbędnym procesem w wytwarzaniu przez rośliny nasion, a następnie owoców [28]. Na trzeciej parze odnóży robotnic pszczoły miodnej znajdują się tzw. koszyczki służące do transportu pyłku. Dodatkowo, ciało owada pokryte jest włoskami, na których osadza się pyłek. Choć pszczoła miodna nie jest odpowiedzialna za zapylenie wszystkich owadopylnych gatunków roślin, możliwość hodowli tego owada i jego szybkiego transportu powoduje, że jest to najbardziej cenny owad ze względów ekonomicznych [29]. Praca pszczoły miodnej jako zapylacza wyceniana jest na około 15 mld USD w Stanach Zjednoczonych Ameryki, 19 mld USD w Europie oraz 69 mld USD we wschodniej Azji [6]. Pszczoła miodna zapyła wiele gatunków roślin użytkowych: warzyw i owoców, ziół i przypraw, używek, roślin pastewnych, oleistych, czy włóknistych. Jest zatem niezbędnym elementem nie tylko w produkcji żywności dla ludzi, ubrań czy oleju, ale także paszy dla zwierząt [30].

Niestety, ten cenny owad jest wrażliwy na zagrożenia w środowisku. Na rodzinę pszczelą silnie oddziałują warunki atmosferyczne i zmiany klimatu. Zjawiska takie jak urbanizacja, intensyfikacja rolnictwa i globalizacja również nie pozostają dla niej obojętne [31]. Najbardziej narażone są robotnice. Podczas poszukiwania i zbierania pokarmu oraz wody są wystawione na wiele stresorów biologicznych (patogeny, pasożyty, drapieżniki), chemicznych (np. substancje stosowane w rolnictwie) i fizycznych (np. pole elektromagnetyczne) [30–33].

### 1.1.2 Indywidualne i społeczne mechanizmy obronne

Aby ograniczyć negatywny wpływ patogenów, pasożytów i szkodliwych substancji, organizm pszczoły miodnej wykształcił wiele mechanizmów obronnych takich, jak system immunologiczny, antyoksydacyjny i detoksykacyjny. Oprócz mechanizmów na poziomie indywidualnym, pszczoła miodna posiada również społeczne mechanizmy obronne. Funkcjonowanie poszczególnych mechanizmów jest od siebie zależne [34].

## *Indywidualne mechanizmy antyoksydacyjne i detoksykacyjne*

Indywidualne mechanizmy detoksykacyjne organizmu pszczoły miodnej obejmują przede wszystkim enzymy biorące udział w metabolizmie toksyn lub procesie detoksykacji, czyli monooksygenazy cytochromu P450 (P450), transferazę glutationową (GST), karboksyloesterazy (COE), aminotransferazę asparaginianową (AST), aminotransferazę alaninową (ALT), fosfatazę alkaliczną (ALP), gamma-glutamylotranspeptydazę (GGTP) i bilirubinę [8, 35]. Mechanizmy systemu antyoksydacyjnego mają za zadanie usunąć wolne rodniki z organizmu lub ograniczyć ich ewentualną nadaktywność. Antyoksydanty oddają elektrony wolnym rodnikom, a w efekcie zablokowana zostaje możliwość utlenienia innych składników. Antyoksydantami mogą być enzymy, takie jak peroksydaza glutationowa (GPX), katalazy (CAT), dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) lub dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa (GP6D) i nieenzymatyczne antyoksydanty (np. albuminy, kreatynina, glutation, kwas moczowy, mocznik, witaminy) [7, 35]. Miarą antyoksydacyjnych zdolności organizmu może być np. całkowity status antyoksydacyjny (TAS) i zdolność redukcji jonów żelaza (III) (FRAP) [36, 37]. Wskaźniki te były dotychczas mierzone w hemolimfie oraz homogenatach pszczół [38–41].

Analiza hemolimfy odgrywa ważną rolę w monitorowaniu stanu fizjologicznego pszczoły miodnej, która podobnie jak inne stawonogi, posiada otwarty układ krążenia [42]. Głównymi funkcjami hemolimfy są transport substancji odżywczych, hormonów, enzymów i produktów przemiany materii. Jej skład różni się w zależności od wieku, kasty płciowej i pory roku [42, 43].

Ponieważ środki ochrony roślin mogą uruchamiać mechanizmy detoksykacyjne i antyoksydacyjne organizmu pszczoły miodnej [7, 8, 44–47], w ramach badań własnych postanowiono poddać analizie aktywność enzymów detoksykacyjnych i antyoksydacyjnych – AST, ALT, ALP, GGTP oraz poziom nieenzymatycznych antyoksydantów – albumin, kreatyniny, kwasu moczowego i mocznika, a także wskaźnik zdolności antyoksydacyjnej organizmu – TAS w hemolimfie robotnic. AST i ALT biorą udział w metabolizmie aminokwasów, a ALP katalizuje defosforylację wielu estrów fosforanowych [48, 49]. Obecność tych enzymów została stwierdzona w hemolimfie wielu owadów, w tym pszczoły miodnej. Aktywność ALP oznacza się również w tkankach jelita pszczoły miodnej [45, 47, 50, 51]. GGTP to enzym powszechnie występujący w organizmach, od bakterii po ssaki [52], oznaczono go m.in. w hemolimfie pszczoły miodnej oraz barciaka większego (*Galleria mellonella* L.) [53, 54]. GGTP odgrywa kluczową rolę w cyklu gamma-glutamylowym, szlaku

syntezy i degradacji glutationu oraz detoksykacji ksenobiotyków. Katalizując wczesne etapy degradacji glutationu wytwarza cysteinyloglicynę [55–58]. Cysteinyloglicyna jest związkiem tiolowym o bardzo wysokiej reaktywności i tworzy reaktywne formy tlenu, co z kolei ułatwia reakcję oksydacyjną [59, 60]. Mocznik wykryto w hemolimfie i odchodach wielu owadów, w tym również pszczoły miodnej [38, 39, 49]. Uważa się go za drugorzędny produkt końcowy metabolizmu azotu [61, 62]. Produktem końcowym metabolizmu azotu jest również kwas moczowy [41]. Związek ten jest oznaczany w hemolimfie pszczoły miodnej [38, 39, 49, 64]. Kreatynina jest produktem rozpadu fosfokreatyny występującej w tkance mięśniowej. Albuminy to białka mające właściwości przeciwutleniające i regulujące ciśnienie osmotyczne [44]. Obecność kreatyniny i albumin stwierdzono w hemolimfie pszczoły miodnej [38, 39, 49, 64]. Poziom enzymów antyoksydacyjnych i nieenzymatycznych antyoksydantów wpływa na poziom TAS, który służy do oceniania całkowitej aktywności antyoksydacyjnej organizmu. Jest to zdolność do obrony przed szkodliwym działaniem wolnych rodników, która polega na ich inaktywacji do produktu o obojętnym ładunku [36].

### *Spoleczne mechanizmy obronne*

Odporność społeczna pszczoły miodnej opiera się na mechanizmach obronnych, które wykształciła rodzina, aby w jak największym stopniu ograniczyć zagrożenie ze strony patogenów, pasożytów i szkodliwych substancji [34, 66]. W tego rodzaju odporności wyróżnia się odporność sekrecyjną i behawioralną [34].

Odporność sekrecyjna obejmuje produkty pszczele, które zawierają substancje działające przeciw drobnoustrojom. Takie właściwości ma mleczko pszczele (którym robotnice karmią larwy i matkę), wosk (budulec plastrów), jad (którym robotnice pokrywają siebie oraz plastry), propolis (którym robotnice pokrywają wnętrze ula, uszczelniają gniazdo i polerują komórki) czy miód i pierzga (pokarm) [67–71].

Odporność behawioralna opiera się głównie na ograniczaniu inwazji pasożytów [66]. Pszczoły podczas wzajemnej pielęgnacji mogą usuwać roztocza (np. *Varroa destructor*) z siebie oraz innych osobników. Niektóre z robotnic wykazują szczególnie instynkt higieniczny, który polega na wykrywaniu i usuwaniu zmarłego, zaatakowanego przez patogeny lub pasożyty czerwiu [72]. Do ograniczenia inwazji pasożytów przyczynia się również rojenie. Część pszczół opuszcza wtedy gniazdo, w którym mogą znajdować się pasożyty [73]. Pszczoła miodna jest zdolna do kontrolowanego podnoszenia temperatury w gnieździe (gorączka społeczna), co powoduje ograniczenie rozwoju patogennego grzyba *Ascosphaera apis* [66].

Ponadto, pszczoła miodna eliminuje z rodziny osobniki chore, aby powstrzymać rozprzestrzenianie się patogenów. Niektóre zakażone osobniki opuszczają gniazdo, aby nie stwarzać zagrożenia dla innych [74]. Co więcej, czerwiem i matką opiekują się młode pszczoły, które nie opuszczają ula, przez co ich kontakt z zanieczyszczeniami i patogenami znajdującymi się na zewnątrz jest ograniczony [34]. Robotnice mogą wykonywać też taniec alarmowy, jeśli zorientują się, że wziętek stanowi zagrożenie dla rodziny [75].

Przeżycie rodziny pszczelej jest zależne od współpracy pomiędzy osobnikami, dlatego nawet niewielkie zmiany w funkcjonowaniu jednostek mogą oddziaływać negatywnie na całą rodzinę [34]. Ponieważ środki ochrony roślin mogą wpływać na zachowanie i fizjologię pszczoły miodnej, istnieje ryzyko, że zmiany uwidoczną się poprzez obniżenie kondycji i zdrowotności rodziny. W celu oceny kondycji rodziny pszczelej w praktyce pszczelarskiej określa się powierzchnię czerwiu i zapasów pożywienia, siłę rodziny (szacowana liczba pszczół), tempo odbudowy węzy oraz instynkt higieniczny. Brak zmian w tych parametrach świadczy o prawidłowym funkcjonowaniu rodziny pszczelej.

## **1.2 Środki ochrony roślin – charakterystyka, klasyfikacja, znaczenie i stan prawny**

### **1.2.1 Charakterystyka i klasyfikacja ŚOR**

Środki ochrony roślin (ŚOR) są pojęciem węższym niż pestycydy. Pestycydy są wykorzystywane do zwalczania wszelkich niepożądanych organizmów, nie tylko w ochronie roślin, ale także m.in. zbiorników wodnych, magazynów z żywnością, szpitali czy gospodarstw domowych [76]. ŚOR to substancje, mieszaniny substancji lub organizmy żywe wykorzystywane w ochronie upraw rolniczych (w tym również do zaprawiania nasion) oraz roślin ozdobnych. Mogą być zarówno naturalne, jak i syntetyczne. Służą do zwalczania lub odstraszania niepożądanych organizmów, jak również zapobiegania ich inwazji lub zmniejszenia wyrządzonych przez nie szkód [1].

Zgodnie z *rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotyczące wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin i uchylające dyrektywy Rady 79/117/EWG i 91/414/EWG (Dz. Urz. UE L 309 z 24.11.2009, str. 1 z późn. zm.* ŚOR mogą mieć różne formułacje (formy użytkowe), czyli wodę lub olej z rozcieńczonym środkiem w postaci np. proszku do sporządzania zawiesiny wodnej, granul, zawiesiny olejowej. Formułacje poza substancjami czynnymi (czyli substancjami odpowiedzialnymi za działanie bójcze środka), mogą zawierać wiele innych substancji, np. sejfner, synergetyki, adiuwanty, czy składniki obojętne.

Sejfnery są to substancje dodawane do ŚOR w celu zmniejszenia działania środka na niektóre rośliny, nie będące celem zastosowania. Synergetyki to substancje, które mogą wzmocnić działanie substancji czynnej i w tym celu są dodawane do ŚOR. Z kolei adiuwanty to substancje, które użytkownik może mieszać ze środkiem ochrony roślin. Składają się one z jednego lub kilku składników obojętnych w postaci gotowej do połączenia ze ŚOR. Adiuwanty mają za zadanie zwiększyć skuteczność ŚOR. Składniki obojętne to substancje, które są stosowane w ŚOR lub adiuwantach, lecz nie są substancjami czynnymi, sejfnerami lub synergetykami.

Klasyfikacja ŚOR, może uwzględniać różne kryteria, w tym m.in.:

- 1) rodzaj zwalczanego szkodnika,
- 2) budowę chemiczną,
- 3) sposób działania [1].

Ad. 1) Podstawowe kryterium podziału ŚOR dotyczy rodzaju zwalczanego szkodnika [76]. Klasyfikacja ta obejmuje głównie zoocydy (środki zwalczające zwierzęta), fungicydy (środki grzybobójcze) i herbicydy (środki chwastobójcze). Wśród zoocydów wymienić należy insektycydy (środki owadobójcze), akarycydy (środki roztoczobójcze), moluskocydy (środki ślimakobójcze), nematocydy (środki nicieniobójcze) i rodentocydy (środki zwalczające gryzonie) [77, 78].

Ad. 2) Biorąc pod uwagę budowę chemiczną, ŚOR dzielą się na organiczne i nieorganiczne. Do nieorganicznych ŚOR zalicza się m.in. miedź, siarkę, wapno, siarczan miedzi. Skład organicznych ŚOR jest bardziej złożony, klasyfikuje się je ze względu na przynależność do danej grupy chemicznej, np. neonikotynoidów (jedna z grup insektycydów), triazoli (jedna z grup fungicydów), sulfonilomoczników (jedna z grup herbicydów) [79]. Klasyfikacja ta łączona jest z mechanizmem działania danego środka. Oznacza to, że substancje w obrębie danej grupy wykazują ten sam mechanizm działania wobec niepożądanego organizmu, np. wszystkie insektycydy z grupy pyretroidów powodują wydłużenie otwarcia kanałów sodowych w komórkach nerwowych owadów, co powoduje zaburzenie w przewodzeniu impulsów nerwowych, a w rezultacie śmierć [80].

Ad. 3) ŚOR ze względu na sposób działania dzieli się na:

- a) kontaktowe, które wykazują toksyczne działanie bezpośrednio po aplikacji i fizycznym kontakcie środka ze szkodnikiem, patogenem lub niepożądaną rośliną. Jeśli ŚOR działa w sposób jedynie kontaktowy, to nie wnika w tkanki roślinne, nie jest transportowany przez jej układ naczyniowy, co oznacza, że działa toksycznie głównie w miejscu aplikacji,
- b) żołądkowe, które wnikają do organizmu szkodnika przez układ pokarmowy i wywołują zatrucie; intoksykacja następuje po bezpośrednim zjedzeniu substancji lub części rośliny, na które zaaplikowano środek,
- c) systemiczne (układowe), które po zaaplikowaniu na roślinę przenikają do jej tkanek rozprzestrzeniając się od korzeni do pędów i liści (bądź odwrotnie, od liści do korzeni); oznacza to m.in., że owad nie musi mieć bezpośredniego kontaktu z preparatem by być narażony na jego toksyczne działanie, wystarczy, że będzie żerował np. na sokach rośliny, na którą wcześniej zaaplikowano systemiczny ŚOR,
- d) gazowe, które zwalczają szkodniki poprzez ekspozycję na toksyczne pary; dostają się do organizmu poprzez układ oddechowy i w przypadku zwierząt stałocieplnych, skórę,
- e) odstraszające (repelenty), które nie likwidują szkodników, a jedynie zniechęcają do żerowania na roślinach, na które zaaplikowano dany środek repelent może mieć odstraszający zapach, smak lub wpływać negatywnie na zdolność odnalezienia uprawy przez szkodnika [78].

Nie wyklucza to działania wielotorowego, na przykład dany środek może działać jednocześnie kontaktowo, a po wnikięciu w tkanki roślin również systemicznie.



### 1.2.2 Znaczenie ŚOR

W XX wieku liczba ludności wzrosła z około 1,5 mld (1900 r.) do 6,1 mld (2000 r.), a do 2050 roku ma wynosić 9,2-10 mld [81]. Ze względu na rosnącą populację przewiduje się, że popyt na produkcję żywności do 2050 roku wzrośnie o 70% [82]. Produkcji roślinnej zagrażają m.in. szkodniki, chwasty, choroby grzybowe, co może wpływać na obniżenie plonów. Na świecie traci się średnio 35% potencjalnego plonu z powodu szkodników [83], a zmniejszenie tych strat jest jednym z głównych zadań stawianych współczesnej produkcji roślinnej [2]. Produkcja żywności wymaga wykorzystania dużych obszarów, a ponieważ ekspansja rolnictwa pociąga za sobą takie procesy jak wylesianie i niszczenie siedlisk wielu gatunków zwierząt i roślin, lepszym wyjściem wydaje się jego intensyfikacja, tzn. wzrost produkcji, dzięki zwiększeniu nakładów przypadających na jednostkę powierzchni użytków rolnych [81]. W rolnictwie intensywnym, oprócz wysoko wyspecjalizowanych maszyn czy nawozów, stosuje się również środki ochrony roślin [84]. Użycie syntetycznych ŚOR na szeroką skalę rozpoczęło się po 1945 roku wraz z odkryciem owadobójczych właściwości DDT, BHC, dieldryny, aldryny, chlordanu czy parationu. Substancje te, ze względu na wysoką toksyczność wobec zwierząt nie będących celem zwalczania, zostały zakazane trzy dekady później, w latach 70-tych XX wieku. W ciągu kolejnych dwudziestu lat na rynek wprowadzono wiele nowych substancji, m.in. insektycydy fosforoorganiczne, pyretroidowe, neonikotynoidowe; herbicydy triazolopirymidynowe, triketonowe i izoksazolowe oraz fungicydy strobilurynowe i azolonowe [78]. Światowe zużycie pestycydów w sektorze rolnictwa wynosi obecnie około 4 mln ton. W pierwszej trójce krajów o największym zużyciu tych produktów w 2018 roku znajdowały się Chiny (1 774 tysiące ton), Stany Zjednoczone (408 tysięcy ton) i Brazylia (377 tysięcy ton) [85]. W 2018 roku wartość światowego rynku środków ochrony roślin wyniosła 68,2 mld USD [86]. Rolnicy w wysoko rozwiniętych krajach oczekują cztero- lub pięciokrotnego zwrotu kosztów wydawanych na środki ochrony roślin [87, 88]. Na badania nad substancjami aktywnymi, które będą działać w sposób selektywny i nie będą powodowały oporności wśród zwalczanych organizmów, a ponadto rozłożą się na nietoksyczne związki w stosunkowo krótkim czasie, wydawane są miliardy USD. Rynek środków ochrony roślin stoi przed dużym wyzwaniem, aby zapewnić plony na poziomie wystarczającym do wyżywienia ludzkości przy jednoczesnej ochronie środowiska naturalnego [2].

### 1.2.3 ŚOR jako czynnik zagrażający pszczole miodnej w środowisku

Spośród wszystkich zagrożeń, szczególnie tych pochodzenia antropogenicznego, to ŚOR są wymieniane jako jeden z głównych czynników szkodzących pszczołom [33].

Do zatrucia pszczoły miodnej ŚOR dojść może kontaktowo i/lub pokarmowo. Powszechnie stosowane w krajach rozwiniętych systemiczne ŚOR rozprzestrzeniają się w tkankach roślinnych i mogą gromadzić się w nektarze roślinnym i pyłku [14–16]. Pszczoła miodna jest owadem polilektycznym, co oznacza, że nie specjalizuje się w zbieraniu pyłku z konkretnych gatunków roślin. Korzysta ona z nektaru lub pyłku produkowanego przez wiele gatunków, również roślin uprawnych, na których stosuje się opryski ŚOR [78]. Najbardziej narażona na ŚOR jest podczas żerowania na drzewach owocowych w sadach, uprawach rzepaku, gryki czy słonecznika [89, 90]. Ze względu na to, że w produkcji roślinnej stosuje się wiele różnych ŚOR, a ich pozostałości mogą kumulować się w środowisku, pszczoły mają kontakt z wieloma różnymi ŚOR jednocześnie. Ponad 64% wszystkich terenów rolniczych (czyli około 2,5 mld ha) jest obciążone ryzykiem skażenia przez więcej niż jedną substancję aktywną ŚOR [13]. Oprócz narażenia na szkodliwe substancje w środowisku, pszczoły mogą mieć również z nimi kontakt w ulu, ponieważ zbierają potencjalnie skażony nektar lub pyłek i przechowują go w plastrach [16]. Mogą też przenosić pozostałości ŚOR na powierzchni ciała.

Między poszczególnymi substancjami aktywnymi może dochodzić do interakcji, zmieniając toksyczność względem pszczoły miodnej. Po połączeniu może wystąpić efekt addytywny (czyli równy sumie pojedynczych substancji), synergiczny (efekt większy niż addytywny) lub antagonistyczny (efekt mniejszy niż addytywny) [91]. Pszczoła miodna jest więc stale narażona na mieszkankę różnych substancji chemicznych, zazwyczaj w niskich stężeniach, które mogą długotrwale oddziaływać na jej zdrowie [16]. Jak dotąd wykazano, że narażenie pszczoły miodnej na subletalne dawki środków ochrony roślin (głównie insektycydów) wpływa na aktywność motoryczną, orientację w terenie, rozwój czerwiu, zdolność uczenia się, wyszukiwania pokarmu i pamięć, osłabia układ odpornościowy i rozrodczy oraz uruchamia mechanizmy antyoksydacyjne i detoksykacyjne organizmu [7, 8, 29, 92–94]. Ponadto środki ochrony roślin mogą wpływać na rozwój czerwiu i gromadzenie zapasów przez rodzinę [27, 95–100].

#### 1.2.4 Sytuacja prawna w kontekście bezpieczeństwa dla pszczoły miodnej

Jedną z kwestii dotyczącej stosowania ŚOR, która jest przedmiotem wielu debat publicznych i spotkań na arenie międzynarodowej jest bezpieczeństwo pszczoły miodnej. Środki ochrony roślin stosowane w krajach członkowskich Unii Europejskiej mogą zawierać jedynie te substancje czynne, które zostały zatwierdzone przez Komisję Europejską. Wszystkie aktualnie dopuszczone do obrotu substancje czynne w Polsce wraz z ich komercyjnymi formułacjami znajdują się w *rejestrze środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu zezwoleniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotyczące wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin i uchylające dyrektywy Rady 79/117/EWG i 91/414/EWG (Dz. Urz. UE L 309 z 24.11.2009, str. 1 z późn. zm.)*. Rejestr aktualizowany jest co trzy miesiące. Ponadto, Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi określa treść etykiety danego ŚOR dopuszczonego do obrotu. Informacje na etykiecie obejmują warunki stosowania preparatu, w tym m.in. maksymalną dawkę dozwoloną do jednorazowego stosowania, terminy, czy liczbę zabiegów.

Jak podaje *rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotyczące wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin i uchylające dyrektywy Rady 79/117/EWG i 91/414/EWG (Dz. Urz. UE L 309 z 24.11.2009, str. 1 z późn. zm.)* „środki ochrony roślin należy stosować właściwie”. Dalej zostaje wyszczególnione, że „właściwe stosowanie obejmuje stosowanie zasad dobrej praktyki ochrony roślin i spełnianie warunków ustanowionych zgodnie z art. 31 i podanymi w etykietach. Musi być ono również zgodne z przepisami dyrektywy 2009/128/WE, a w szczególności z ogólnymi zasadami integrowanej ochrony roślin, o których mowa w art. 14 tej dyrektywy oraz w załączniku III do niej, które będą stosowane najpóźniej dnia 1 stycznia 2014 r.” Zgodnie z powyższym *rozporządzeniem* łączenie środków ochrony roślin jest prawnie dozwolone, chyba że widnieje wyraźny tego zakaz na etykiecie danego środka. Odpowiedzialność spoczywa na osobie stosującej środki.

Ocena bezpieczeństwa i możliwość dopuszczenia ŚOR do obrotu jest przeprowadzana przez Komisję Europejską przy udziale państw członkowskich. Następnie państwa członkowskie są odpowiedzialne za ocenę środka i dopuszczają jego użycie na swoim terytorium *rozporządzeniem Komisji (UE) Nr 546/2011 z dnia 10 czerwca 2011 r. wykonującym rozporządzenie (WE) nr 1107/2009 Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu*

do jednolitych zasad oceny i udzielania zezwolenia na środki ochrony roślin (Dz. Urz. L 155 z 11.06.2011, s. 127).

Zanim ŚOR zostanie dopuszczony do obrotu zostaje więc poddany w procedurze rejestracji ocenie naukowej i technicznej. Obejmuje ona badania dotyczące m.in. toksyczności dla ludzi, organizmów wodnych i pszczoły miodnej. Dany środek (substancja czynna, sejfner lub synergetyk) nie może zostać dopuszczony do obrotu, jeśli zostanie odrzucony na etapie któregośkolwiek z badań zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) Nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r. dotyczące wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin i uchylające dyrektywy Rady 79/117/EWG i 91/414/EWG (Dz. Urz. UE L 309 z 24.11.2009, str. 1 z późn. zm.) i rozporządzeniem Komisji (UE) Nr 283/2013 z dnia 1 marca 2013 r. ustanawiające wymogi dotyczące danych dla substancji czynnych, zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 w odniesieniu do wymogów dotyczących danych dla środków ochrony roślin (Dz. Urz. L 155 z 11.06.2011, s. 67). Jeżeli istnieje prawdopodobieństwo narażenia pszczół, należy przeprowadzić badanie toksyczności ostrej (pokarmowej i kontaktowej) oraz przewlekłej, w tym podać zaobserwowane efekty subletalne. Ponadto, jeśli nie można wykluczyć efektu subletalnego na wzrost i rozwój pszczoły miodnej (a osoba wnioskująca o rejestrację ŚOR nie wykaże, że czerw pszczeli nie może być narażony na działanie danej substancji) należy przeprowadzić badanie oceniające wpływ danego środka na czerw. Oceny nie przeprowadza się, jeśli ŚOR przeznaczony jest do stosowania tylko w sytuacjach o mało prawdopodobnym ryzyku narażenia pszczół takich, jak np. wykonywanie zabiegów doglebowych środkami o działaniu nieukładowym, z wyjątkiem granul; wykładanie przynęt na gryzonie o działaniu nieukładowym; stosowanie w szklarniach, w których pszczoły nie występują jako zapylacze.

Wymaganiem etapem jest więc badanie toksyczności ostrej drogą pokarmową i/lub kontaktową dla pszczoły miodnej. Ostra toksyczność drogą pokarmową wg definicji znajdującej się w rozporządzeniu Komisji (UE) Nr 283/2013 z dnia 1 marca 2013 r. ustanawiające wymogi dotyczące danych dla substancji czynnych, zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 w odniesieniu do wymogów dotyczących danych dla środków ochrony roślin (Dz. Urz. L 155 z 11.06.2011, s. 67) oznacza „negatywne skutki powstające w granicach maksymalnego okresu 96 godzin po podaniu doustnym pojedynczej dawki badanej substancji”. Natomiast ostra toksyczność kontaktowa „to negatywne skutki powstające w granicach maksymalnego okresu 96 godzin po miejscowym podaniu pojedynczej dawki substancji”.

Ocenę przeprowadza się na podstawie metod opracowanych przez Organizację Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (ang. *Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD) [101, 102], której treść znajduje się również w *Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 440/2008 z dnia 30 maja 2008 r. ustalające metody badań zgodnie z Rozporządzeniem (WE) nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów*. Niniejsze rozporządzenie powołuje się również na metody opisane przez Europejską i Śródziemnomorską Organizację Ochrony Roślin (ang. *European and Mediterranean Plant Protection Organization*, EPPO). Rozporządzenie nie wyklucza stosowania innych metod badań. Wymagane może być również zbadanie efektów subletalnych, takich, jak wpływ na zachowanie i reprodukcję, w odniesieniu do pojedynczych osobników lub, w odpowiednich przypadkach, w odniesieniu do rodziny pszczelej. W niniejszym rozporządzeniu nie ma jednoznacznych wytycznych, w jakim przypadku, po wykonaniu badań dotyczących analizy ostrej toksyczności dla pszczół, powinna być przeprowadzona ocena z wykorzystaniem rodzin pszczelich. Według opracowania EPPO [103], na które powołuje się rozporządzenie badania półpolowe (z wykorzystaniem tuneli, wolier lub namiotów) sugeruje się wykonywać jeśli występuje podejrzenie działania ogólnoustrojowego środka lub jeśli iloraz zagrożenia (ang. *hazard quotient*, hq) w badaniu ostrej toksyczności pokarmowej lub kontaktowej wynosi więcej lub jest równy 50. Iloraz zagrożenia to stosunek potencjalnego narażenia na substancję do dawki, przy którym nie są spodziewane żadne niekorzystne skutki. Badania polowe według opracowania EPPO mogą być przeprowadzone z wielu różnych powodów, np. podejrzenie wpływu na rozwój czerwiu. Autorzy opracowania podkreślają, aby wytyczne były interpretowane z odpowiednią elastycznością.

### 1.2.5 Uwarunkowania badań ŚOR z wykorzystaniem rodzin pszczelich

Pszczoła miodna jest uznawana za zwierzę gospodarskie, ale w przeciwieństwie do pozostałych zwierząt utrzymywanych przez człowieka w gospodarstwie rolnym, nie można odizolować jej zupełnie od wpływu warunków atmosferycznych i możliwości swobodnego poruszania się oraz dostępu do pożywienia. Choć pszczoła miodna jest utrzymywana w ulu i może być poddawana wielu zabiegom gospodarki pasiecznej, wylatując z ula pozostaje poza kontrolą pszczelarza. Obszar, na którym się porusza wynosi średnio około 700 ha [12].

W związku z tym, utrzymywanie rodzin pszczelich w celach doświadczalnych w zupełnie kontrolowanych warunkach (tzn. mając wpływ na czynniki atmosferyczne oraz całkowitą kontrolę nad pożytkiem i miejscem lotu pszczół) jest niemożliwe.

Opracowano wiele wytycznych, które należy wziąć pod uwagę przy planowaniu doświadczeń z wykorzystaniem rodzin pszczelich [12, 103, 104]. Oprócz badanego ŚOR, na rodziny może wpływać wiele innych czynników, dlatego metody te nie są doskonałe [12, 104].

Jednym z proponowanych rozwiązań jest tzw. badanie polowe. Rodziny pszczele umieszcza się w pobliżu pożytku (np. rzepaku), a następnie na uprawę aplikowany jest ŚOR. Taki rodzaj badań najbardziej odpowiada warunkom naturalnym, w jakich pszczoły mogą mieć kontakt ze ŚOR, ma jednak ograniczenia takie jak np.:

- brak kontroli nad kierunkiem lotu pszczół zbieraczek, nawet jeśli znajdują się blisko uprawy, na którą zaaplikowano badany ŚOR, mogą one wybrać inną plantację jako źródło pokarmu; to skutkuje brakiem pewności, że rodziny pszczele były jednakowo narażone na kontakt z badanym ŚOR,
- konieczność lokalizacji grupy kontrolnej w innym miejscu niż grupy doświadczalne (ok. 6 km odległości), tak aby pszczoły kontrolne nie miały kontaktu z badanym ŚOR; to wymaganie powoduje jednak odmienne lokalne warunki pożytkowe i atmosferyczne pomiędzy grupą kontrolną a grupami doświadczalnymi, co może mieć wpływ na wyniki badań i ich powtarzalność,
- bardzo wysokie koszty doświadczeń i duże nakłady pracy, związane zarówno z utrzymaniem rodzin pszczelich, jak i prowadzeniem uprawy (ok. 2 ha).

Inną propozycją są tzw. badania półpolowe z wykorzystaniem tuneli, wolier lub namiotów [12]. Rodziny pszczele umieszcza się w odpowiednio dużym (przynajmniej 120 m<sup>2</sup>) zamkniętym tunelu, wolierze lub namiocie na uprawie, na której zaaplikowany zostanie ŚOR.

Pozwala to, w przeciwieństwie do badań polowych, na pewność, że rodziny pszczele mają kontakt z badanym ŚOR i nie korzystają z innych pożytków. W takim doświadczeniu grupa kontrolna może znajdować się w tej samej lokalizacji co grupy doświadczalne, potrzebny jest jedynie oddzielny tunel, woliera lub namiot. Koszty takiego doświadczenia oraz nakłady pracy również są wysokie, jednak niższe niż badań polowych. Niestety, rodziny pszczele znajdujące się na ograniczonym obszarze nie rozwijają się tak dobrze, jak w warunkach naturalnych, co ogranicza możliwość pozyskiwania danych na temat realnego wpływu substancji na wskaźniki kondycyjno-wydajnościowe.

Kolejną metodą, również kwalifikowaną jako badania półpolowe, jest wykorzystanie możliwości karmienia rodzin pszczelich w ulu [12, 105]. Rodzinom pszczelim podaje się pokarm w formie płynnej lub stałej z dodatkiem badanego ŚOR. Ten sposób pozwala na ograniczenie kosztów badań ze względu na brak konieczności posiadania terenu pod uprawę i/lub zakupu tuneli, wolier czy namiotów. Ważnym elementem tych badań jest zminimalizowanie dostępu rodzin pszczelich do pożytków, czyli wykorzystywanie okresów bezpożytkowych.

We wszystkich badaniach ocenia się różne parametry, w zależności od celu doświadczenia, takie jak np. śmiertelność, rozwój czerwiu i, jeśli to możliwe, wydajność miodową.

Wybór środka ochrony roślin i stężenia substancji aktywnej, tak aby oddawała warunki naturalne, jest kolejnym problematycznym zagadnieniem. Zaleca się m.in. wybór stężenia w najgorszym możliwym scenariuszu dla pszczoły, to znaczy, najwyższe zalecane przez producenta stężenie substancji aplikowane na uprawę w czasie aktywności lotnej [12]. Taka praktyka (aplikacja ŚOR w czasie aktywności lotnej pszczół) przez rolników jest jednak prawnie na terenie UE zabroniona i chociaż wciąż ma miejsce, dzieje się to raczej sporadycznie. Pszczoła miodna w środowisku jest narażona częściej na niższe stężenia, niż te zakładane w najgorszym scenariuszu, dlatego bada się również niższe stężenia, na przykład na podstawie oznaczeń pozostałości ŚOR w pyłku kwiatowym, nektarze czy miodzie, szczególnie jeśli badane środki działają systemicznie [16].

### 1.3 Aktualny stan wiedzy na temat substancji aktywnych wykorzystanych w badaniach własnych oraz ich wpływu na pszczołę miodną

Poniżej przedstawiono charakterystykę wybranych substancji aktywnych oraz ich wpływ na pszczołę miodną. Autorzy podają informację dotyczącą stężenia substancji w syropie lub dawki, na którą eksponowane były osobniki. Dla uporządkowania danych i ułatwienia porównania uzyskanych przez poszczególnych autorów wyników, stężenia sprowadzono do wspólnej jednostki ppb, natomiast dawki do jednostki ng/pszczołę.

#### 1.3.1 Acetamipryd

##### 1.3.1.1 Charakterystyka

Acetamipryd ((E)-N1-(6-chloro-3-pyridylometylo)-N2-cyjano-N1-metyloacetamidyna) jest insektycydem cyjano-podstawionym z grupy neonikotynoidów, które są chemicznie spokrewnione z nikotyną. Neonikotynoidy są szerzej stosowane w produkcji roślinnej w porównaniu z innymi insektycydami [16], w 2008 roku stanowiły 17% wszystkich sprzedawanych na świecie insektycydów [106]. Acetamipryd działa systemicznie. Podobnie jak pozostałe neonikotynoidy, jest antagonistą acetylocholino w receptorach błon postsynaptycznych w komórkach nerwowych owadów. Wiążąc się z receptorami zamiast acetylocholino, nie jest rozkładany przez enzym acetylocholinosterazę, co powoduje pobudzenie i zaburzenie w przewodzeniu impulsów nerwowych [16]. Grupa neonikotynoidów, oprócz acetamiprydu, obejmuje między innymi klotianidynę, imidaklopryd, nitenpiram, tiaklopryd i tiametoksam [107].

Na podstawie *Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2018/113 z dnia 24 stycznia 2018 r.* jest dozwolony do stosowania na terenie państw członkowskich Unii Europejskiej do 28 lutego 2033 r. W Polsce acetamipryd jest obecnie substancją czynną w 31 środkach ochrony roślin dopuszczonych do obrotu zgodnie z aktualnym *rejestrzem środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu zezwoleniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi*. Stosowanie pozostałych insektycydów z grupy neonikotynoidów jest zakazane lub dozwolone jedynie w uprawach szklarniowych.

Acetamipryd jest stosowany do zwalczania szkodników ssących i gryzących, głównie z rzędu pluskwiaków (*Hemiptera*), motyli (*Lepidoptera*) i wciornastków (*Thysanoptera*) m.in. na uprawach rzepaku, w sadach, w uprawie warzyw i roślin ozdobnych, a także w lasach [108]. Jego pozostałości są oznaczane w nektarze, pyłku kwiatowym, pierdze i miodzie,



stanowią więc potencjalne zagrożenie dla pszczoły miodnej (tab. 1.). Acetamipryd jest jednym z najczęściej oznaczanych środków ochrony roślin w miodzie [109].

**Tabela 1.** Pozostałości acetamiprydu w pyłku kwiatowym, nektarze, miodzie i pierzdze na podstawie danych literaturowych

Rodzaj próbki	Pozostałości acetamiprydu [ppb]	Źródło
Pyłek rzepaku	7,81 – 14 800	[90, 110, 111]
Pyłek wielokwiatowy	0,002 – 104	[24, 25]
Nektar pozyskany z plastrów pszczelich	0,1 – 6,8	[111]
Nektar bezpośrednio z kwiatów rzepaku	0,2 – 7,6	[111]
Pierzga	0,1 – 4,7	[111]
Miód	0,1 – 633	[17, 109, 111]

### 1.3.1.2 Wpływ na pszczołę miodną

Toksyczność neonikotynoidów względem pszczół oraz powiązanie z zespołem masowego ginięcia pszczoły miodnej (*ang. Colony Collapse Disorder, CCD*) jest przedmiotem wielu badań od ponad dwudziestu lat. Fakt ten zapoczątkowały obserwacje zaniepokojonych pszczelarzy, którzy alarmowali, że spada liczebność pszczół w ulach znajdujących się w pobliżu pól obsiewanych nasionami zaprawionymi neonikotynoidami. Założono wtedy, że zbieraczki były narażone na subletalne dawki tych insektycydów podczas pobierania pokarmu, a następnie nie potrafiły powrócić do ula [16]. W kilku badaniach potwierdzono, że pszczoły narażone na subletalne dawki neonikotynoidów w pożywieniu, mają trudności z rozpoznaniem pożytków, pobieraniem pokarmu, orientacją w terenie [92, 95–97, 99, 112]. Co więcej pszczoła miodna chętniej pobiera nektar zawierający neonikotynoidy [113]. Najlepiej przebadanym neonikotynoidem jest imidaklopyrd, acetamipryd jest mniej popularnym przedmiotem badań [108].

Cyjano-podstawione neonikotynoidy (acetamiprid, tiaklopyrd) mają wyższą wartość dawki powodującej śmierć 50% osobników pszczoły miodnej ( $LD_{50}$ ) niż nitro-podstawione (imidaklopyrd, klotianidyna, tiametoksam) i są uważane za mniej toksyczne od nich [16, 107, 114].  $LD_{50}$  acetamiprydu wynosi 14530 ng/pszczołę (ekspozycja pokarmowa) oraz 8090 ng/pszczołę (ekspozycja kontaktowa) [16]. Niższa toksyczność acetamiprydu względem pszczoły miodnej nie jest jeszcze wytłumaczona, ale może być powiązana z jego stosunkowo szybkim metabolizmem w organizmie pszczoły [114, 115].

## *Wpływ na śmiertelność i rozwój rodziny*

Acetamipryd w zależności od dawki lub stężenia i sposobu aplikacji może wpływać na zwiększoną śmiertelność pszczoły miodnej. Efekt ten obserwowany jest głównie w badaniach laboratoryjnych [91, 114, 116–118]. Po aplikacji na tułów acetamipryd w dawce 1 000 i 2 000 ng/pszczołę zwiększył śmiertelność robotnic w porównaniu do grupy kontrolnej. Dawka 2 000 ng/pszczołę skróciła długość życia robotnic o ok. 4 dni [98, 116]. Pszczoły skarmione jednorazowo syropem z dodatkiem tego insektycydu w stężeniu 600, 1 200, 2 400, 6 000 i 60 000 ppb cechowały się śmiertelnością poniżej 25% [114]. Robotnice karmione roztworami acetamiprydu w ilości 25 000 ppb (od 2-dniowych larw do 14-dniowych imago, z wyjątkiem stadium poczwarki) cechowały się krótszą długością życia w stosunku do grupy kontrolnej o około 1 dzień, niższą masą po wygryzieniu i opóźnieniem wygryzania z komórek. Ekspozycja spowodowała również zmniejszenie liczby komórek z czerwem krytym [117].

W badaniu laboratoryjnym oraz półpolowym oceniono wpływ acetamiprydu w połączeniu z adiuwantami (N-metylopirolidon [NMP], Silwet L-77 i Triton X-100). Adiuwanty nie wykazywały istotnej toksyczności wobec pszczoły miodnej, jednak w testach laboratoryjnych znacznie zwiększyły ostrą toksyczność kontaktową acetamiprydu. W badaniach półpolowych śmiertelność robotnic pszczoły miodnej była istotnie statystycznie wyższa niż w przypadku grupy kontrolnej. Zmniejszyła się również aktywność lotna zbieraczek, powierzchnia czerwiu oraz siła rodziny [118]. Z kolei w badaniach polowych z wykorzystaniem rodzin pszczelich, które miały dostęp do pożytku, na którym zastosowano oprysk acetamiprydem w połączeniu z adiuwantami, nie odnotowano wpływu na śmiertelność, rozwój czerwiu, siłę rodziny czy miodność. Poziom pozostałości acetamiprydu w miodzie wyprodukowanym przez pszczoły doświadczalne wyniósł od 0,1 do 7,6 ppb, a w pierdze i pyłku od 0,6 do 10,5 ppb [111]. Acetamipryd zaaplikowany na pole rzepaku w stężeniu 120 000 ppb nie wpłynął na śmiertelność ani na aktywność lotną robotnic pszczoły miodnej [89].

Wpływ acetamiprydu na pszczołę miodną badano również w połączeniu z innymi substancjami aktywnymi. Większość mieszanin acetamiprydu z abamektyną, emamektyną, dikrotofosem, difentryną, cypermetryną i/lub lambda-cyhalotryną po ekspozycji pokarmowej spowodowała wyższą śmiertelność pszczół w stosunku do pojedynczych pestycydów [91]. Wykazano, że przewlekła ekspozycja robotnic *Apis cerana* na acetamipryd i propikonazol (fungicyd) wywarła znaczący wpływ na śmiertelność zarówno jednodniowych pszczół, jak i zbieraczek. Dodatkowo masa nowo wygryzionych robotnic pszczoły miodnej była niższa

w porównaniu do grupy kontrolnej. Pszczoły karmione były przez 10 dni syropem cukrowym dodatkiem acetamiprydu (3 660 ppb dla pszczoł jednodniowych i 9 150 ppb dla zbieraczek) i/lub propikonazolu (24 000 ppb dla pszczoł jednodniowych i 60 000 ppb dla zbieraczek). Po połączeniu acetamiprydu i propikonazolu zaobserwowano efekt synergiczny [119].

### *Wpływ na zachowanie*

Acetamipryd wpływa na zdolność uczenia się i zapamiętywania u pszczoły miodnej oraz na orientację w terenie [98, 99, 116, 120, 121]. Zdolność uczenia się i zapamiętywania pogorszyła się u pszczoł narażonych na syrop z dodatkiem tego insektycydu w dawce 10 ng/pszczołę i 100 ng/pszczołę [120, 121]. Podawany robotnicom drogą pokarmową w dawce 1 000 ng spowodował obniżoną wrażliwość na zawartość cukru w roztworze, badaną za pomocą odruchu PER (ang. *proboscis extension reflex*). Odruch ten polega na wysunięciu trąbki przez owada na skutek dotknięcia czułkiem np. nektaru lub syropu cukrowego [122]. W dawce (100; 500 i 1 000 ng/pszczołę, kontaktowo) zwiększył odpowiedź PER na wodę [120, 123]. Środek ten aplikowany na tułów zwiększył również aktywność ruchową (100 i 500 ng/pszczołę) [120]. W dawce 500; 1 000 i 2 000 ng/pszczołę (kontaktowo) wpłynął dodatkowo na poziom ekspresji genów związanych z uczeniem się i pamięcią [116]. Acetamipryd w dawce 2 000 ng/pszczołę wywoływał przedwczesną aktywność zbieraczek i zmniejszył liczbę ich lotów [98]. Acetamipryd w stężeniu 100; 500; 1 000; 5 000 ppb (pokarmowo) wpłynął na zdolność powrotu do ula. Najniższe stężenie spowodowało, że 47% zbieraczek nie powróciło do gniazda, natomiast w przypadku najwyższej dawki 93% zbieraczek nie powróciło do gniazda [99].

### *Wpływ na fizjologię*

Połączenie acetamiprydu i propikonazolu wpłynęło na aktywność P450, GST i CAT u robotnic [107]. Istotny spadek aktywności AChE oraz zmianę aktywności polifenylooksydazy, COE i GST zaobserwowano u pszczoł narażonych na działanie acetamiprydu, w stężeniu 600, 1 200, 2 400, 6 000 i 60 000 ppb. Acetamipryd w połączeniu z innymi neonikotynoidami (klotianidyną, imidakloprydem lub tiametoksanem) nie wpłynął na transkrypcję nAChRs i witellogeniny w sposób odmienny niż pojedyncze neonikotynoidy, ponadto zaobserwowano słabsze działanie acetamiprydu w porównaniu do pozostałych neonikotynoidów. Wpływ badano 24, 48 i 72h po ekspozycji [124].

## 1.3.2 Glifosat

### 1.3.2.1 Charakterystyka

Glifosat (N-(fosfonometylo)glicyna) to herbicyd należący do grupy aminofosfonianów stosowany dolistnie. Wprowadzony został na rynek w 1975 roku przez Monsanto Chemical Company pod nazwą Roundup™ [125]. Działa systemicznie. Jest powszechnie stosowany na świecie od ponad 40 lat, dzięki swojemu szerokiemu spektrum działania. Początkowo stosowany był głównie do eliminacji chwastów wzdłuż torowisk, dróg czy linii wysokiego napięcia. Od 1996 roku rośliny uprawne można modyfikować genetycznie, tak aby były odporne na jego działanie. Glifosat jest więc stosowany z powodzeniem również w produkcji roślinnej [126–128]. W 2014 roku jego zużycie w rolnictwie wyniosło około 800 000 ton, natomiast poza rolnictwem mniej niż 100 000 ton [128, 129]. Jest to najlepiej sprzedający się pestycyd na świecie, stanowiący 71,6% wszystkich sprzedawanych składników aktywnych w pestycydach [128]. Herbicyd ten poprzez inaktywację enzymu EPSP powoduje zaburzenia w szlaku biosyntezy aminokwasów takich, jak fenyloalanina, tryptofan i tyrozyna. Doprowadza to do głodu aminokwasowego, a w następstwie śmierci rośliny [127]. Ze względu na to, że enzym ten występuje jedynie w roślinach i niektórych mikroorganizmach, glifosat jest często uważany za bezpieczny dla ludzi i zwierząt. Wraz z wygaśnięciem patentu posiadanego przez Monsanto Chemical Company, wiele innych koncernów chemicznych wprowadziło glifosat na rynek pod różnymi formułacjami. Jego wykorzystanie, a co za tym idzie, ilość w środowisku znacznie wzrosła [125]. W ostatnich kilku latach stosowanie glifosatu stało się kontrowersyjne, gdyż pojawiły się doniesienia na temat możliwych negatywnych skutków dla ludzi i zwierząt. Wciąż jednak nie udało się objąć jednoznacznego stanowiska w tej sprawie [125, 130].

Glifosat jest dopuszczony do stosowania w krajach członkowskich Unii Europejskiej do 15 grudnia 2022 roku zgodnie z *rozporządzeniem wykonawczym Komisji (UE) 2017/2324 z dnia 12 grudnia 2017 r. w sprawie odnowienia zatwierdzenia substancji czynnej glifosat, zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1107/2009 dotyczącym wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin, oraz w sprawie zmiany załącznika do rozporządzenia wykonawczego Komisji (UE) nr 540/2011*. Zezwolenie to może zostać przedłużone o kolejne lata. Zgodnie z obowiązującym rejestrem środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu zezwoleniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi, środki ochrony roślin zawierające glifosat powinny zostać zużyte do końca 2023 roku. Obecnie glifosat znajduje się w 99 środkach ochrony roślin dopuszczonych do obrotu w Polsce.

Glifosat stosuje się do likwidacji niepożądanych roślin na ścierniskach po uprawach roślin, wzdłuż torowisk oraz na polach uprawnych (w tym również rzepaku) przed zbiorem, uprawach roślin sadowniczych i w szkółkach leśnych. Jego pozostałości są oznaczane w pyłku, nektarze, miodzie i pierzdze, pszczoła miodna jest więc narażona na kontakt z tym środkiem (tab. 2.).

**Tabela 2.** Pozostałości glifosatu w pyłku kwiatowym, nektarze, miodzie i pierzdze na podstawie danych literaturowych

Rodzaj próbki	Pozostałości glifosatu [ppb]	Źródło
Pyłek kwiatowy	2 122 – 614 841	[131]
Nektar pozyskany od zbieraczek	2 780 – 31 300	[132]
Pierzga	17 – 6 922	[131]
Miód	20 – 120 000	[20, 22, 23, 131, 133]

#### *1.3.2.2 Wpływ na pszczołę miodną*

Choć początkowo glifosat był uważany za bezpieczny dla pszczoły miodnej coraz więcej doniesień wskazuje na jego negatywny wpływ, nawet w dawkach zalecanych przez producenta [11].

#### *Wpływ na śmiertelność i rozwój rodziny*

Pszczoły mające kontakt z roślinami opryskanymi glifosatem (10 000 ppb i 20 000 ppb) cechowały się wyższą śmiertelnością od grupy kontrolnej [134]. Dodatek glifosatu do pokarmu larw spowodował zwiększoną śmiertelność (4 000 lub 20 000 ppb) [135] oraz zmniejszenie masy i opóźnienie wylinki (1 250–5 000 ppb) [136]. Glifosat podawany rodzinom pszczelim w syropie (4 800 ppb i 137 600 ppb) spowodował niewielki wpływ na kondycję rodziny i przeżycie poszczególnych robotnic. Wyższe stężenie co prawda przyczyniło się do wolniejszego rozwoju czerwiu, jednak zdarzenie to nie wpłynęło na ogólną kondycję rodzin [131]. Natomiast w rodzinach karmionych syropem z dodatkiem glifosatu w stężeniu 75 000, 150 000 lub 301 000 ppb nie zaobserwowano żadnego istotnego wpływu na przeżycie, rozwój i średnią masę czerwiu ani na śmiertelność robotnic [132]. Zimującym pszczołom miodnym podawano pokarm zawierający glifosat, imidaklopyryd i difenokonazol, pojedynczo lub w mieszaninach (0,1; 1 i 10 ppb) przez 20 dni. Śmiertelność pszczół była wyższa po ekspozycji na te 3 pestycydy, zarówno pojedynczo, jak i w połączeniu [45].

### *Wpływ na zachowanie*

Glifosat negatywnie wpływa na procesy uczenia się zbieraczek, zdolności poznawcze i sensoryczne młodych pszczoł [137]. Glifosat pogorszył orientację robotnic pszczoły miodnej w terenie, zmniejszył wrażliwość na cukier, upośledził zdolność uczenia się (2 500 ppb, 500 ppb, pokarmowo) i zapamiętywania (1500 ng/pszczołę) [138, 139]. Podawany w syropie spowodował pokonywanie dłuższej trasy do ula i wydłużenie czasu trwania lotu (125 ng/pszczołę, 150 ng/pszczołę, a w dawce 500 ng/pszczołę [140] oraz 5 000 i 10 000 ppb [141]. Dodatek 100 000 ppb glifosatu do syropu zmniejszył reaktywność na cukier i miał negatywny wpływ na zapamiętywanie zapachów przez robotnice [142]. Podobne efekty zaobserwowano przy dawce 720 000, 3 600 000, 7 200 000 ppb [143].

### *Wpływ na fizjologię*

Glifosat w stężeniu 0,1 i 1 ppb zwiększył aktywność AChE i GST, stężenie 1 ppb wpłynęło dodatkowo na aktywność GP6D u zimujących pszczoł [45]. Z kolei herbicyd ten w stężeniu 1 217 500 ppb aplikowany kontaktowo nie wpłynął na aktywność esterazy, GST i AChE u jednodniowych pszczoł [44].

Glifosat zmienił ekspresję genów kodujących enzymy odpowiedzialne za detoksykację organizmu u larw podawany w stężeniu 0,8 ppb i 2 500 ppb [136, 144]. Herbicyd ten wywarł niekorzystny wpływ na układ odpornościowy oraz metabolizm aminokwasów i węglowodanów zarówno u robotnic *Apis mellifera* jak i *Apis cerana* [145]. Glifosat podawany robotnicom pokarmowo w stężeniu 0,1 ppb nie wpłynął istotnie statystycznie na aktywność fizjologicznych markerów układu nerwowego (AChE), detoksykację (GST) i układ antyoksydacyjny (CAT, ALP) [46, 146]. Może oddziaływać negatywnie na mikroflorę jelit podawany pszczołom w syropie cukrowym w ilości 1 691, 169 100 ppb [147], 10 000 ppb [148], 210 000 ppb, 1 080 000 ppb [149] oraz 5 000 000 i 10 000 000 ppb [150], a w przypadku larw w stężeniu 20 000 ppb [135]. Karmienie robotnic glifosatem (120 ppb) zwiększyło peroksydację lipidów, co mogło wpłynąć na szlak metaboliczny witaminy A [151]. U pszczoł skarmianych syropem z glifosatem (1,25; 2,50 i 5,0 ng / pszczołę) spadła zawartość  $\beta$ -karotenu ekstrahowanego z homogenatu z całych pszczoł [152]. Podanie pokarmu zawierającego glifosat rodzinom spowodowało spadek produkcji mleczka pszczelego i zmianę jego składu (6 680 ppb i 2 160 ppb) [153, 154]. Spożycie 50 ng glifosatu spowodowało pogłębienie snu pszczoł miodnych. Owady te przejawiają stan snu jako zmniejszenie napięcia mięśniowego i ruchów czulek. Autorzy badania sugerują, że zjawisko to wskazuje na wzmożoną potrzebę regeneracji spowodowaną stresem metabolicznym wywołanym przez herbicyd [155].

### 1.3.3 Tebukonazol

#### 1.3.3.1 Charakterystyka

Tebukonazol ((RS)-1-(4-chlorofenylo)-4,4-dimetylo-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilometylo) pentan-3-ol) jest fungicydem z grupy azoli, dokładniej triazoli. Hamuje on syntezę ergosterolu, który jest niezbędny w tworzeniu grzybni i błony komórkowej grzybów. Fungicydy azolowe należą do najczęściej stosowanych fungicydów przeciw chorobom grzybiczym upraw rolniczych. Tebukonazol działa układowo [21].

Zgodnie z rozporządzeniem Wykonawczym Komisji (UE) NR 921/2014 z dnia 25 sierpnia 2014 r. zmieniające rozporządzenie wykonawcze (UE) nr 540/2011 w odniesieniu do warunków zatwierdzenia substancji czynnej tebukonazol jest dopuszczony do stosowania w krajach członkowskich Unii Europejskiej do 31 sierpnia 2022 roku. Zezwolenie to może zostać przedłużone o kolejne lata. Zgodnie z obowiązującym Rejestrem środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu zezwoleniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi, środki ochrony roślin zawierające tebukonazol powinny zostać zużyte do końca lutego 2024 roku. Obecnie tebukonazol znajduje się w 99 środkach ochrony roślin dopuszczonych do obrotu w Polsce.

Tebukonazol stosuje się zarówno w celach profilaktycznych, jak i do zwalczania chorób grzybowych m.in. na uprawach rzepaku i roślin sadowniczych. Jego pozostałości są oznaczane w pyłku, nektarze, miodzie i pierdze, pszczoła miodna jest więc potencjalnie narażona na kontakt z tym środkiem (tab. 3.). Tebukonazol jest jednym z najczęściej oznaczanych fungicydów w miodzie [109].

**Tabela 3.** Pozostałości tebukonazolu w pyłku kwiatowym, nektarze, miodzie i pierdze na podstawie danych literaturowych

Rodzaj próbki	Pozostałości tebukonazolu [ppb]	Źródło
Pyłek kwiatowy	0,12 – 4 530	[25, 26, 156]
Nektar	0,18	[25]
Miód	5 – 53,39	[18, 22, 109]
Pierzga + pyłek	2,95 – 52,02	[19]
Miód + nektar	49 – 389,3	[111]

### *Wpływ na pszczołę miodną*

Niewiele jest badań odnośnie wpływu tebukonazolu na pszczołę miodną. Wykazano jednak, że fungicydy azolowe mogą nasilać toksyczność insektycydów [157–160]. Tebukonazol (2 000 ng/pszczołę) zwiększył toksyczność tiachloprydu. Pszczoły miodne narażone na tebukonazol lub tiachloprid nie wykazywały większej śmiertelności od pszczół kontrolnych, jednak połączenie tych środków spowodowało śmiertelność 70% badanych pszczół [119]. W innych badaniach tebukonazol (447 ng/pszczołę pokarmowo lub kontaktowo) w połączeniu z neonikotynoidami spowodował zwiększenie toksyczności, najwyższy poziom synergii, 2,6-krotny, zaobserwowano między tebukonazolem i tiametoksamem [161]. Tebukonazol może wpływać na drobnoustroje w różnych środowiskach, w tym w jelitach owadów [162, 163]. W badaniu przenikania pozostałości tebukonazolu z wosku, a następnie do mleczka pszczelego w komórkach, w których rozwijały się matki pszczele, nie wykryto pozostałości tebukonazolu w larwach matek i nowo wygryzionych pszczołach [164].



## 2. Cel pracy i hipotezy badawcze

Niniejsza praca miała na celu określenie zmian w poziomie lub aktywności wybranych wskaźników biochemicznych w hemolimfie robotnic pszczoły miodnej poddanych chronicznej ekspozycji na acetamipryd, tebukonazol, glifosat oraz ich mieszaniny w warunkach półpolowych. W pracy określano również zmiany kondycji rodzin pszczelich po narażeniu na ŚOR.

Hipotezy:

1. Czy substancje aktywne w wybranych formulacjach i stężeniach wpływają na poziom lub aktywność wybranych wskaźników biochemicznych i kondycję rodzin?
2. Czy substancje aktywne w wybranych formulacjach i stężeniach wpływają na poziom lub aktywność wybranych wskaźników biochemicznych i kondycję rodzin w sposób odmienny pojedynczo i w mieszaninach?
3. Czy acetamipryd (insektycyd) powoduje więcej zmian w poziomie lub aktywności wybranych wskaźników biochemicznych i kondycji rodzin niż glifosat (herbicyd) i tebukonazol (fungicyd)?

### 3. Materiały i metody

#### 3.1 Rodziny pszczele

##### *Charakterystyka rodzin pszczelich, z których tworzono rodziny doświadczalne*

W badaniach wykorzystano 22 jednolite genetycznie rodziny pszczele *Apis mellifera* Carnica, które utrzymywano w dwunasto-ramkowych drewnianych ulach na ramce wielkopolskiej (wymiary 375x270 mm). Rodziny były wolne od widocznych objawów chorób, takich jak zgnilec amerykański, zgnilec europejski, choroba woreczkowa. W marcu rodziny poddano zabiegom leczniczym przeciwko warrozie, tj. 4-krotnej fumigacji lekiem Apiwarol® (amitraz 12,5 mg/tabł) w odstępach 4-dniowych. Ponadto przeprowadzona została kontrola liczby spór *Nosema spp.* w komorze zliczeniowej. Rodziny były poddawane regularnym (cotygodniowym) przeglądom do czasu podziału na rodziny doświadczalne (tj. od kwietnia do lipca 2021 roku). Prace pasieczne polegały na utrzymaniu rodzin w wyrównanej sile i zapobieganiu rójkom.

##### *Tworzenie rodzin doświadczalnych*

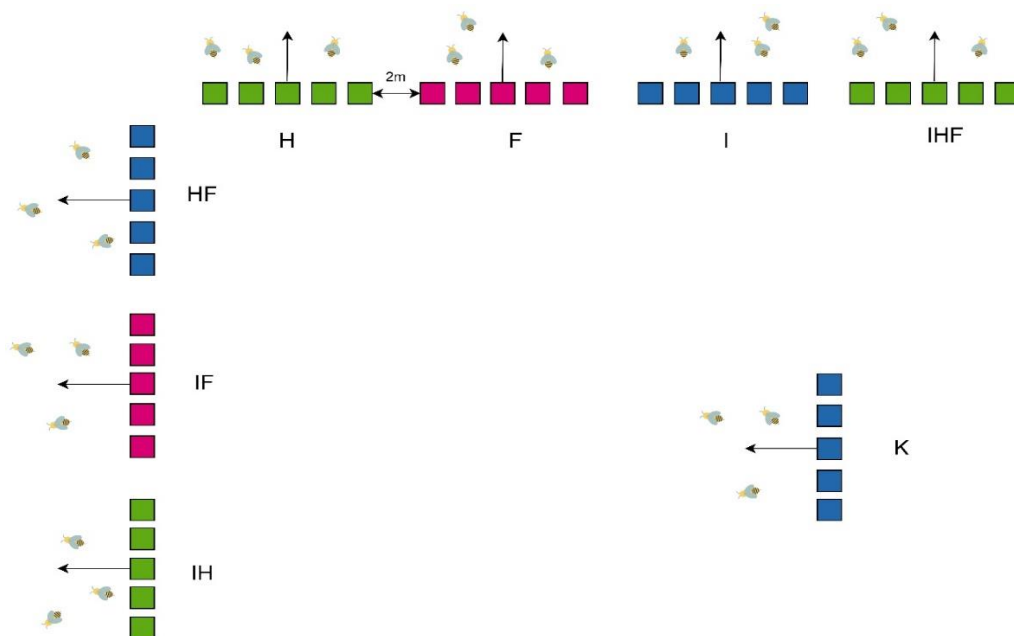
Rodziny utrzymywane były w pasiece usytowanej w Nowej Jabłonie (województwo lubuskie). W lipcu 2021 roku z 22 rodzin pszczelich *Apis mellifera* Carnica utworzono 40 rodzin doświadczalnych. W każdej umieszczano 4 plastry obsiadane przez pszczoły „na czarno”, po jednym plastrze z jajami, czerwiem otwartym i krytym oraz plastrem z pierzgą. Do czasu ekspozycji (tj. przez 14 dni) rodziny doświadczalne karmione były ciastem pszczelim (Apikand firmy Łysoń) zawierającym 52% dekstrozy, 40% fruktozy, 3% triozy i 2% maltozy. Po podziale, do rodzin pszczelich poddano unasienione matki rasy kraińskiej. Matki zamykano w klatkach i umieszczano pomiędzy plastrami z czerwiem otwartym. Po tygodniu upewniano się, że w każdej rodzinie pszczelej znajduje się matka i rozpoczęła czerwienie.

##### *Termin badań*

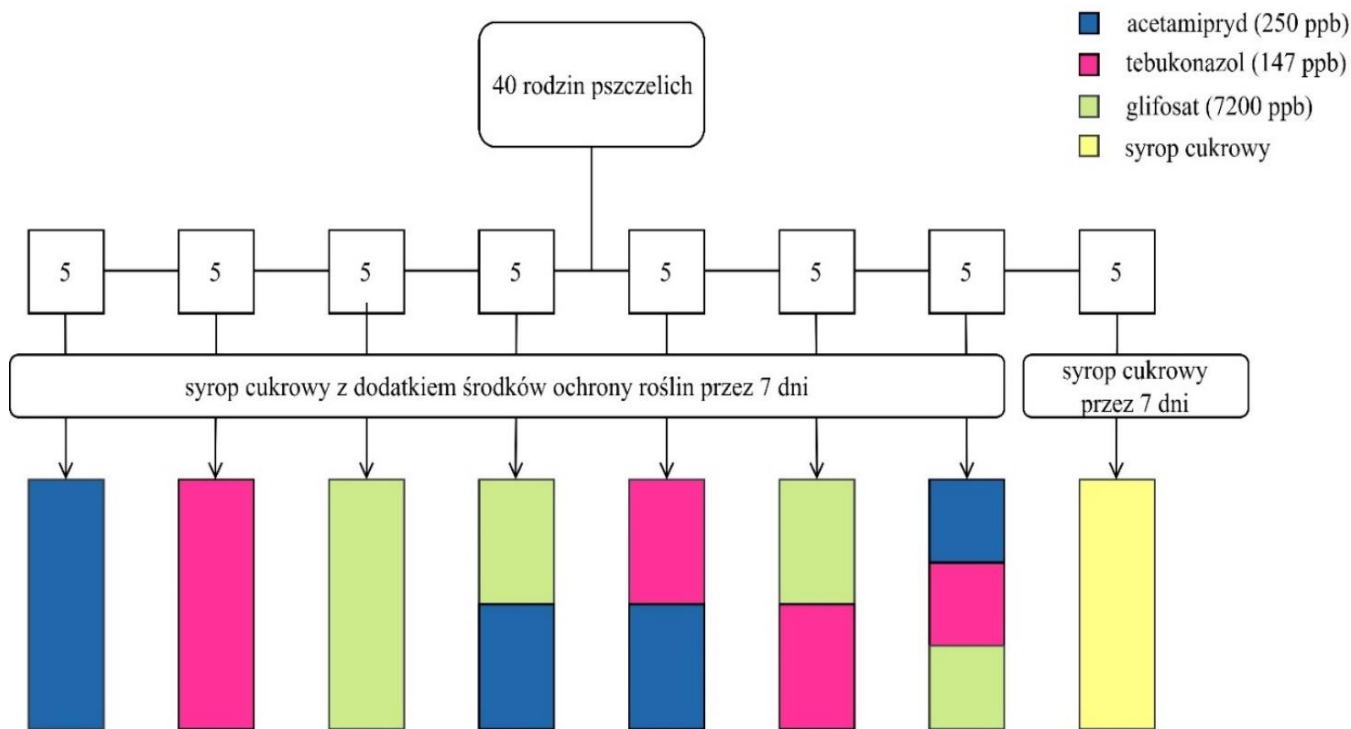
Badania właściwe prowadzono od 07.2021 roku do 03.2022 roku. Ekspozycja na ŚOR miała miejsce w lipcu, po przekwitnięciu lip, w okresie z ograniczonym pożytkiem, tj. w czasie, kiedy nie był dostępny żaden towarowy pożytek oraz kwitło niewiele roślin atrakcyjnych dla pszczół. Tym sposobem, pszczoły pobierały zadawany im pokarm, a ryzyko pobierania przez zbieraczki nektaru z kwiatów, które mogły mieć kontakt z pestycydami było ograniczone do minimum.

## Podział na grupy doświadczalne

Rodziny doświadczalne (40 sztuk) podzielono losowo na osiem grup: siedem grup doświadczalnych i jedną grupę kontrolną. Nazwy poszczególnych grup to pierwsze litery substancji aktywnych dodanych do syropu. Np. grupa otrzymująca syrop z dodatkiem połączenia acetamiprydu i glifosatu nazwana została A+G. Grupę kontrolną oznaczono literą „K”. Wszystkie grupy liczyły po 5 rodzin. Ule, w których utrzymywane były rodziny doświadczalne, miały trzy kolory (zielony, niebieski, różowy). W obrębie danej grupy, kolor uli był jednakowy. Odstępy między grupami doświadczalnymi wynosiły 2m, a grupy o jednakowych kolorach uli ze sobą nie sąsiadowały. Grupa kontrolna znajdowała się w odległości 10-15m od pozostałych grup. Ustawienie uli przedstawiono na schemacie 1. Różne kolory uli i odstępy ograniczały ryzyko zalatywania pszczół do rodzin z innych grup. Rodzinom pszczelim podawano płynną mieszankę paszową (syrop cukrowy) bez dodatku (grupa kontrolna - K); z dodatkiem pojedynczego środka ochrony roślin (trzy grupy – A, T, G); z dodatkiem mieszaniny dwóch środków ochrony roślin w równych proporcjach (trzy grupy – A+T, A+G, G+T) lub z dodatkiem mieszaniny trzech środków ochrony roślin w równych proporcjach (jedna grupa – A+T+G) (schemat 2.).



**Schemat 1.** Ustawienie uli w doświadczeniu. Nazwy grup pochodzą od pierwszych liter nazw substancji aktywnych obecnych w formułacji środka ochrony roślin lub ich mieszanin („A” – acetamipryd, „T” – tebukonazol, „G” – glifosat, „K” – kontrola (syrop bez dodatków)). ↑ - kierunek wylotu pszczół z ula.



**Schemat 2.** Układ doświadczenia z wykorzystaniem środków ochrony roślin

### 3.2 Roztwory doświadczalne i ekspozycja rodzin na środki ochrony roślin

#### *Środki ochrony roślin użyte w doświadczeniu*

W doświadczeniu wykorzystano komercyjne formułacje acetamiprydu (insektycyd Mospilan 20 SP a.i 20%), glifosatu (herbicyd Agrosar 360 SL a.i 36%) oraz tebukonazolu (fungicyd Tebu 250 EW a.i 25,8%). Wszystkie wybrane w doświadczeniu ŚOR działają układowo (systemowo) i są powszechnie stosowane. Wybór stężenia substancji aktywnych w roztworach doświadczalnych został oparty na danych literaturowych dotyczących pozostałości tych substancji w nektarze, miodzie, pyłku kwiatowym oraz pierdze. Dodatkowo, przy wyborze stężeń brano pod uwagę maksymalną jednorazową dawkę dopuszczoną do stosowania na uprawie rzepaku ozimego. Informacja ta znajduje się na etykiecie każdego z wybranych środków. Ostateczny wybór stężenia jest częścią (1/1 000 w przypadku insektycydu i herbicydu oraz 1/10 000 w przypadku fungicydu, którego pozostałości są niższe) maksymalnej jednorazowej dawki dopuszczonej do stosowania na uprawie rzepaku ozimego, która mieści się w zakresie stężenia danej substancji w nektarze i pyłku kwiatowym opracowanym na podstawie literatury (tab. 4.).

**Tabela 4.** Zestawienie stężenia substancji aktywnych wykorzystanych w doświadczeniu ze stężeniami pozostałości oznaczanymi w nektarze, miodzie, pierzdze i pyłku kwiatowym na podstawie literatury [ppb]

Substancja aktywna	Nazwa handlowa środka ochrony roślin	Stężenie substancji aktywnej w doświadczeniu [ppb]	Dane literaturowe na temat pozostałości substancji aktywnej w pokarmie [ppb]	Źródło
Acetamipryd	Mospilan 20 SP	250	0,002 – 14 800	[17, 24, 25, 90, 110, 111]
Glifosat	Agrosar 360 SL	7 200	20 – 120 000	[20, 22, 23, 131–133]
Tebukonazol	Spekfree 430 S.C.	147	0,12 – 4 530	[18, 19, 22, 25, 26, 109, 111, 156]

#### *Przygotowanie roztworów doświadczalnych i ekspozycja na środki ochrony roślin*

Formulacje środków ochrony roślin rozpuszczano w płynnej mieszance paszowej (syropie cukrowym) dla pszczoł (Apikand Premium). Mieszanka ta składała się z 40% fruktozy, 30% glukozy i 30% sacharozy. Wyjściowe roztwory środków ochrony roślin przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta znajdującymi się na etykietach poszczególnych środków. Do rozpuszczenia każdego środka zastosowano więc maksymalną jednorazową dawkę dopuszczoną do stosowania na uprawie rzepaku ozimego (tj. Mospilan 20 SP: 1,25g/L i/lub Agrosar 360 SL: 20 ml/L, i/lub Spekfree 430 S.C.: 3,75ml/L) oraz rozpuszczono ją w 1 L syropu cukrowego (ilość syropu cukrowego była równa najmniejszej zalecanej przez producenta ilości wody, w której ma być rozpuszczony środek). Następnie z tak przygotowanego roztworu pobierano 10 ml w przypadku insektycydu i herbicydu oraz 1 ml w przypadku fungicydu i dodawano do 10 L syropu cukrowego, aby otrzymać roztwory doświadczalne o końcowym stężeniu substancji aktywnej.

Przygotowane pokarmy podawano w ilości 0,5 L codziennie przez 7 dni. Pokarm podawano w godzinach wieczornych po ustaniu aktywności lotnej pszczoł, aby uniknąć zjawiska rabowania się rodzin [12]. Pokarm podawano za pomocą podkarmiaczek powałkowych skrzynkowych (fot. 1.).



**Fotografia 1.** Podkarmiaczka powałkowa skrzynkowa (pomarańczowa na zdjęciu), w której podawano pokarm (fot. Agnieszka Murawska).

### **3.3 Pobranie i analiza hemolimfy**

#### **3.3.1 Pobranie hemolimfy**

Na dwa dni przed ekspozycją na środki ochrony roślin do każdej rodziny została wprowadzona ramka z suszem, aby matka mogła złożyć na niej jaja. Dzień przed ekspozycją skontrolowano zaczerwienie plastrów. Po upływie 21 dni od złożenia jaj z każdej grupy zebrano do klatki doświadczalnej około 300 świeżo wygryzionych robotnic. Hemolimfę pobierano niezwłocznie po zebraniu pszczół w przystosowanym do tego celu pomieszczeniu w sąsiedztwie pasieki. Aby pobrać hemolimfę pszczołę umieszczano na drewnianym statywie. Po usunięciu czułka, delikatnie naciskano odwłok (od tyłu ku przodowi), aby umożliwić wypływ hemolimfy [165]. Hemolimfę pobierano do szklanych kapilar typu end to end o pojemności 20  $\mu$ l bez antykoagulanta. Kapilary (10 sztuk) umieszczano w probówce typu Eppendorf o pojemności 2 ml z 200  $\mu$ l wody destylowanej. Aby uniknąć melanizacji hemolimfy, cały proces odbywał się na blokach chłodzących, po zebraniu pełnej próbówki (tj. 10 sztuk kapilar) umieszczano materiał w zamrażarce (-25°C), a następnie do czasu analizy w -80°C.

### 3.3.2 Analiza hemolimfy

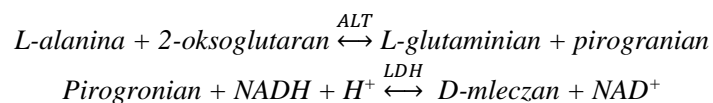
Oznaczenia enzymów i nieenzymatycznych antyoksydantów wykonano za pomocą analizatora biochemicznego Pentra 400 (HORIBA ABX Diagnostics, Francja) z wykorzystaniem oryginalnych kitów producenta (tab. 5.). Oznaczenie całkowitego statusu antyoksydacyjnego wykonano z użyciem gotowego zestawu firmy Randox Laboratories Ltd., Wielka Brytania. Oznaczenia wykonano w laboratorium biochemicznym Katedry Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

**Tabela 5.** Odczynniki wykorzystane w oznaczeniach wskaźników biochemicznych

Wskaźnik	Nazwa odczynnika
ALT	ABX Pentra ALT CP
AST	ABX Pentra AST CP
ALP	ABX Pentra ALP CP
GGTP	ABX Pentra GGT CP
Albuminy	ABX Pentra Albumin CP
Mocznik	ABX Pentra Urea CP
Kwas moczowy	ABX Pentra Uric Acid CP
Kreatynina	ABX Pentra Creatinine 120 CP

#### Aminotransferaza alaninowa (ALT)

Oznaczenie ALT wykonano przy użyciu metody enzymatycznej (detekcja UV) bez użycia fosforanu pirydoksalu zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Federacji Chemii Klinicznej (IFCC).

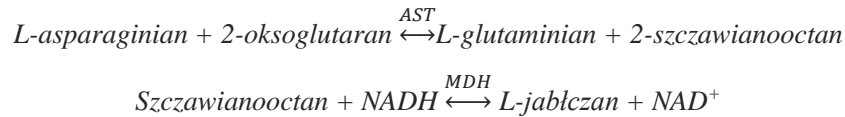


*ALT* = aminotransferaza alaninowa,

*LDH* = dehydrogenaza mleczanowa

## Aminotransferaza asparaginianowa (AST)

AST oznaczono przy użyciu metody enzymatycznej (detekcja UV) bez użycia fosforanu pirydoksalu zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Federacji Chemii Klinicznej (IFCC).

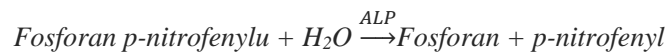


*AST = aminotransferaza asparaginianowa,*

*MDH = dehydrogenaza jabłczanowa*

## Fosfataza alkaliczna (ALP)

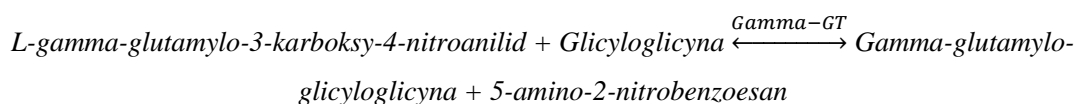
Do oznaczenia ALP wykorzystano fotometryczny test kinetyczny zgodnie z zaleceniami Międzynarodowej Federacji Chemii Klinicznej (IFCC).



*ALP – fosfataza alkaliczna*

## Gamma-glutamylotranspeptydaza (GGTP)

Do oznaczenia GGTP wykorzystano kinetyczny test fotometryczny. Stężenie produktu zostało oznaczone kolorymetrycznie przez pomiar absorbancji przy długości fali równej  $\lambda = 405 - 410 \text{ nm}$ .



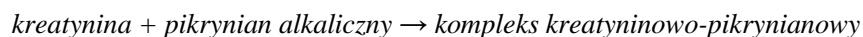
## Albuminy

Stężenie albumin oznaczono metodą kolorymetrii z zastosowaniem zieleni bromokrezolowej (BCG). W środowisku o pH 4,2 zieleń bromokrezolowa wiąże się selektywnie z albuminą, powodując jej niebieskie zabarwienie.



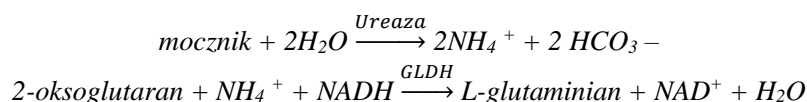
## Kreatynina

Stężenie kreatyniny oznaczono metodą kinetyczną z wykorzystaniem alkalicznego pikrynianu. W środowisku o zasadowym pH, kreatynina reaguje z pikrynianem, tworząc kompleks Janovsky'ego. Tempo wzrostu absorbancji przy fali 510 nm wynikające z tworzenia się kompleksów kreatyninowo-pikrynianowych jest wprost proporcjonalne do stężenia kreatyniny w próbce.



## Mocznik

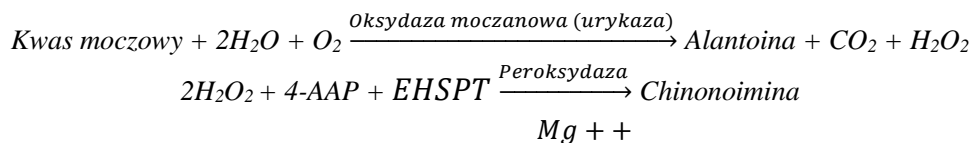
Oznaczenie mocznika wykonano z wykorzystaniem „Ureasa - GLDH” – testu enzymatycznego UV.



GLDH = Dehydrogenaza glutaminianowa

## Kwas moczowy

Kwas moczowy oznaczono metodą enzymatyczną z wykorzystaniem metody Trindera.

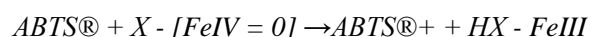
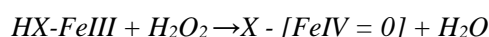


EHSPT = N-Etylo-N-(2-hydroksy-3-sulfopropylo) n-toluidyna,

4 AAP = 4-aminoantypiryna

## Całkowity status antyoksydacyjny TAS

Ocenę całkowitej pojemności antyoksydacyjnej hemolimfy wykonano metodą kolorymetryczną. ABTS® po inkubacji z metmioglobina i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> przechodzi w formę kationorodnika ABTS<sup>+</sup> o niebiesko-zielonej barwie, której absorbcję zmierzono przy długości fali 600 nm.



*HX-FeIII = Metmioglobina*

*X - [FeIV= O] = Ferrylmioglobina*

*ABTS<sup>+</sup> = 2,2'-Azyno-di-[3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian diamonu]*

Obliczenia:

$$\text{Czynnik} = \frac{\text{stężenie standardu}}{\Delta A \text{ próba ślepa} - \Delta A \text{ standard}}$$

Gdzie  $\Delta A = A_2 - A_1$

A1 – wartość początkowa absorbancji

A2 – wartość absorbancji po 3 min reakcji.

*Opierając się na wartościach czynnika wyliczono całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAS): TAS = czynnik × ( $\Delta A$  próba ślepa –  $\Delta A$  surowicy).*

### 3.4 Ocena rodzin pszczelich

#### 3.4.1 Siła rodziny, powierzchnia czerwiu krytego i pokarmu

Rodziny doświadczalne poddano ocenie wstępnej na 12 dni przed ekspozycją na środki ochrony roślin (czy cechują się wyrównaną siłą, obecnością matki i jaj). Następnie poddano je ocenie właściwej 7 dni przed ekspozycją, w dniu ekspozycji oraz 7, 14, 21, 28 od czasu rozpoczęcia ekspozycji [12, 104]. Każdorazowo oceniana była siła rodziny, jakość czerwienia i obecność matki, powierzchnia zapasu węglowodanowego, pierzgi oraz czerwiu krytego na plastrach. Przed i po zimowli przeprowadzono jedynie ocenę siły rodzin. Ocenę siły rodziny, jakości czerwienia i obecność matki zapisywano w karcie ulowej (zał. 1.). Szacunki powierzchni pokarmu oraz czerwiu krytego na plastrach zapisywano w karcie do oceny powierzchni (zał. 2).

## Siła rodziny

Siła rodziny oceniana była na podstawie szacunku powierzchni zajmowanej przez pszczoły na plastrach, tj. podawano liczbę plastrów obsiadanych przez pszczoły „na czarno”. Za wymiary plastra uznano powierzchnię węzy wielkopolskiej, która ma wymiary 335×235 mm (powierzchnia 787,25 cm<sup>2</sup>). W celu określenia przybliżonej liczby robotnic pszczoły miodnej, przyjęto, że na powierzchnię 100 cm<sup>2</sup> jednej strony plastra przypada 120 pszczół [104]. Oceniano każdy plaster obustronnie, we wszystkich ulach.

Obliczenia:

$$\text{Szacowana liczba pszczół} = (787,25 \text{ cm}^2 / 100 \text{ cm}^2) \times 2 \times 120 \times A,$$

Gdzie  $A$  = liczba ramek obsiadanych przez pszczoły „na czarno”

## Jakość czerwienia i obecność matki

Obecność matki określano na podstawie obecności lub braku jaj. Oceniano czy czerw jest zwarty czy rozstrzelony. Jeśli matka zaczerwiła komórki sąsiadujące ze sobą i nie pozostawiała między nimi pustych komórek, czerw klasyfikowany był jako „zwarty”. Natomiast jeśli między komórkami z czerwem znajdowało się wiele pustych komórek, czerw określano jako „rozstrzelony”. Sprawdzano także, czy matka składa tylko po jednym jajku do jednej komórki.

## Powierzchnia zapasu węglowodanowego, pierzgi oraz czerwiu krytego na plastrach

Powierzchnię zapasu węglowodanowego, pierzgi oraz czerwiu krytego określano wizualnie za pomocą procentu zajmowanej powierzchni plastra przez zapas węglowodanowy, pierzgę oraz czerw kryty (schemat 3). Następnie procent zajmowanej powierzchni plastra przeliczano na cm<sup>2</sup>. Za wymiary plastra uznano powierzchnię węzy wielkopolskiej, która ma wymiary 335×235 mm (787,25 cm<sup>2</sup>) [104]. Oceniano każdy plaster obustronnie, we wszystkich ulach. Następnie dla każdej rodziny sumowano powierzchnie zajmowane przez czerw kryty, zapas węglowodanowy lub pierzgę na poszczególnych plastrach.

Obliczenia:

$$\text{Powierzchnia czerwiu krytego, pierzgi lub zapasu węglowodanowego} = B \times 787,25 \text{ cm}^2,$$

Gdzie  $B$  = procent powierzchni zajmowanej przez czerw kryty, pierzgę lub zapas węglowodanowy na plastrze



**Schemat 3.** Przykładowy plaster pszczeli z zaznaczonym obszarem zajmowanym przez czerw kryty, zapas węglowodanowy i pierzga. Czerw kryty zajmuje około 40% plastra, pierzga około 10%, zapas węglowodanowy około 15%. Pozostałe komórki są puste lub zawierają czerw otwarty.

### 3.4.2 Ocena instynktu higienicznego

Do oceny instynktu higienicznego wybierano plaster z czerwiem pszczelim krytym, następnie nakłuwano igłą entomologiczną 100 takich komórek tak, aby uśmiercić larwę [19]. Ramkę znakowano kolorową pinezką. Po 12h i 24h sprawdzano liczbę oczyszczonych komórek, a wynik zapisywano. Komórka była zaliczana jako oczyszczona, jeśli zasklep był przez pszczoły całkowicie usunięty, a we wnętrzu komórki nie stwierdzono pozostałości larwy. Wynik przedstawiono za pomocą stosunku liczby wyczyszczonych komórek do liczby wszystkich nakłutych komórek. Instynkt higieniczny oceniono trzykrotnie w każdej rodzinie doświadczalnej – 7 dni przed ekspozycją, dzień po rozpoczęciu ekspozycji oraz 28 dni od rozpoczęcia ekspozycji.

Obliczenia:

$$\text{Instynkt higieniczny} = \frac{\text{liczba wyczyszczonych komórek}}{\text{liczba wszystkich nakłutych komórek}} \times 100\%$$

### 3.4.3 Ocena stopnia odbudowy węzy

Stopień odbudowy węzy był oceniany po ekspozycji na środki ochrony roślin. Ramkę z węzą certyfikowaną firmy Łysoń umieszczono 26 lipca w każdym ulu, jako drugą od brzegu. Odbudowę węzy oceniano po 24h, 72h oraz po 5 i 12 dniach od umieszczenia jej w ulu. Odbudowa węzy oceniana była w skali 6-stopniowej na podstawie procentu odbudowanej przez pszczoły powierzchni węzy (tab. 6.).

**Tabela 6.** Kryteria oceny odbudowy węzy

Procent powierzchni odbudowanej węzy	Liczba punktów
0%	0p
1-20%	1p
21<40%	2p
41<60%	3p
61<80%	4p
81<90%	5p
100%	6p

### 3.4.4 Ocena zimotrwałości rodzin pszczelich

Rodziny pszczele zostały zakarmione we wrześniu, płynną mieszanką paszową (Apikand Premium) składającą się z 40% fruktozy, 30% glukozy i 30% sacharozy. W grudniu ule docieplono matami górnymi wykonanymi z filcu. Podczas tej czynności sprawdzano, czy rodziny pszczele żyją, uchylając daszek i zaglądając do gniazda. Kolejną ocenę zimotrwałości przeprowadzono w marcu.

Wszelkie oceny szacunkowe prowadzone były przez tę samą osobę, aby uniknąć błędu pomiarowego.

### **3.5 Analiza pozostałości badanych substancji aktywnych w próbach**

Analizę pozostałości ŚOR przeprowadzono dla syropu cukrowego, którym pszczoły były karmione podczas trwania ekspozycji na ŚOR oraz zakarmiane na zimę; a także ciasta, którym pszczoły były karmione przed narażeniem.

Analiza została przeprowadzona przez Zakład Bezpieczeństwa Żywności Instytutu Ogrodnictwa Państwowego Instytutu Badawczego. Do analizy pozostałości acetamiprydu i tebukonazolu wykorzystano metodę PN-EN 15662 (QuEChERS) z zastosowaniem analizy opartej na chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) po podziale acetonitrylem i oczyszczeniu metodą dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Pozostałości glifosatu oznaczono metodą EURL-SRM QuPPe wykorzystującą ekstrakcję z metanolem oraz LC-MS/MS.

### **3.6 Warunki atmosferyczne**

Wszystkie prace związane z oceną rodzin pszczelich, instynktu higienicznego i stopnia odbudowy węzy przeprowadzane były w bezchmurny dzień przy temperaturze powyżej 15°C i prędkości wiatru nie przekraczającej 20 km/h. Temperaturę powietrza oraz siłę wiatru sprawdzano na stronie internetowej Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej Państwowego Instytutu Badawczego [166]. Średnia temperatura powietrza podczas oceny rodzin i ekspozycji na ŚOR wynosiła w lipcu 20,8°C, w sierpniu 17,7°C, natomiast we wrześniu 15,4°C. Uśredniona suma opadów atmosferycznych w tych miesiącach wynosiła kolejno 70, 120 i 20 mm [167–169]. W trakcie zimowli średnia temperatura wynosiła: w październiku 10,2°C, w listopadzie 5,5°C, w grudniu 0,6°C, w styczniu 1,9°C, w lutym 3,2°C. Uśredniona suma opadów atmosferycznych wynosiła odpowiednio 30, 35, 40, 45, 45 mm. W marcu średnia temperatura wyniosła 4,1°C, natomiast suma opadów 10 mm [170–173].

### **3.7 Analiza statystyczna**

Do analizy danych wykorzystano pakiet statystyczny R Core Team (2013). Do oceny normalności rozkładu użyto testu Shapiro-Wilka. Istotność statystyczną różnic pomiędzy grupami określono za pomocą testu Kruskala-Wallisa.

## 4 Wyniki

### 4.1 Pozostałości badanych substancji aktywnych w zebranych próbach

W syropie cukrowym i cieście nie stwierdzono obecności analizowanych substancji aktywnych.

#### 4.1.1 Obecność matki i jakość czerwienia

Wszystkie rodziny pszczele w momencie rozpoczęcia doświadczenia posiadały matki pszczele. W trakcie trwania badań terenowych w grupie A+T jedna rodzin pszczela straciła matkę pszczelą przed narażeniem na środki ochrony roślin (stwierdzono 24.07.2021). Natomiast w grupie K jedna rodzina pszczela zlikwidowała matkę (stwierdzono 07.08.2021). W pozostałych rodzinach matki pszczele były obecne podczas trwania całego doświadczenia.

W trakcie oceny czerwienia nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w jakości czerwiu. Czerw był zwarty oraz równomiernie pokrywał plastry pszczele. Wyjątek stanowiła jedna rodzina pszczela w grupie A+T+G, ponieważ matka pszczela strutowała (stwierdzono 07.08.2021).

#### 4.1.2 Siła rodziny oraz powierzchnia czerwiu krytego i pokarmu na ramkach

##### Siła rodziny

Średnią siłę rodzin wyrażoną przez szacowaną liczbę pszczół w poszczególnych grupach wraz z odchyleniem standardowym przedstawiono w tab. 7. Grupy nie różniły się istotnie między sobą pod względem siły rodziny, zarówno przed ekspozycją na ŚOR, jak i po narażeniu. W porównaniu do grupy K, duży spadek w sile rodzin zauważono po 28 dniach od rozpoczęcia ekspozycji (21.08.2021) do oceny przed zimowlą (11.09.2021) w grupach skarmianych pokarmem z dodatkiem pojedynczych środków ochrony roślin oraz mieszaniną G + T. Był to największy spadek siły dla tych grup. Dla pozostałych grup (grupy kontrolnej (K) oraz A+G, A+T, A+T+G) największa różnica odnotowana została w porównaniu siły przed zimowlą (ocena 11.09.2021) do siły na wiosnę (ocena 23.03.2022). Największy spadek zauważyć można w grupie K (o ok. 42%), natomiast najmniejszy w grupie T (o ok. 3%). Różnica w sile rodzin między pierwszą a ostatnią oceną była największa w grupie T+G (spadek o ok. 36%), natomiast najmniejsza w grupach A+T oraz A+T+G (spadek o ok. 20%). W grupie kontrolnej (K) liczba pszczół spadła w tym czasie o ok. 28%.

**Tabela 7.** Wpływ acetamiprydu, glifosatu i/lub tebukonazolu na siłę rodzin wyrażoną w szacowanej liczbie pszczoł w rodzinach pszczelich

Data oceny	Nazwa grupy							
	A	T	G	A+T	A+G	T+G	A+T+G	K
<b>17.07.21</b> 7 dni przed ekspozycją	8502,30 ±0,00	8124,42 ±0,00	8502,30 ±517,43	8266,13 ±472,35	8502,30 ±0,00	8313,36 ±422,48	8502,30 ±771,34	8266,13 ±472,35
<b>24.07.21</b> dzień ekspozycji	9258,06 ±422,48	8880,18 ±0,00	9447,00 ±844,97	9210,83 ±472,35	9447,00 ±0,00	9258,06 ±422,48	9919,35 ±545,42	9210,83 ±472,3500
<b>31.07.21</b> 7 dni od rozpoczęcia ekspozycji	10958,52 ±844,97	10202,76 ±0,00	11336,40 ±1034,87	10864,05 ±944,70	11336,40 ±0,00	10580,64 ±1034,87	11100,23 ±472,35	11336,40 ±0,00
<b>07.08.21</b> 14 dni od rozpoczęcia ekspozycji	11714,28 ±517,43	11147,46 ±517,43	11714,28 ±1034,87	11336,40 ±0,00	11336,40 ±0,00	10958,52 ±844,97	11808,75 ±545,42	11572,58 ±472,35
<b>14.08.21</b> 21 dni od rozpoczęcia ekspozycji	11525,34 ±422,48	11147,46 ±517,43	11714,28 ±1034,87	11572,58 ±472,35	11525,34 ±422,48	11147,46 ±1034,87	11808,75 ±545,42	11572,58 ±472,35
<b>21.08.21</b> 28 dni od rozpoczęcia ekspozycji	11525,34 ±422,48	11147,46 ±517,43	11714,28 ±1034,87	11572,58 ±472,35	11525,34 ±422,48	11147,46 ±1034,87	11808,75 ±545,42	11572,58 ±472,35
<b>11.09.21</b> przed zimowłą	7179,72 ±1580,79	6423,96 ±1689,93	6801,84 ±1034,87	8502,30 ±1090,85	9069,12 ±1580,79	7179,72 ±2463,48	9919,35 ±1808,96	10391,70 ±1090,85
Liczba rodzin w grupie	N=5	N=5	N=5	N=4	N=5	N=5	N=4	N=4
<b>23.03.2022</b> po zimowli	5668,20 ±2004,01	6046,08 ±944,70	6612,90 ±844,97	6612,90 ±2987,40	6140,55 ±1219,60	5290,32 ±1432,71	6849,08 ±2094,74	5983,10 ±1443,05
Liczba rodzin w grupie	N=5	N=5	N=5	N=4	N=4	N=5	N=4	N=3

Przedstawiono wartości średnie ( $\pm$ sd) powierzchni czerwiu [cm<sup>2</sup>]. Nazwy grup pochodzą od pierwszych liter nazw substancji aktywnych obecnych w formulacji środka ochrony roślin lub ich mieszanin („A” – acetamipryd, „T” – tebukonazol, „G” – glifosat, „K” – kontrola (syrop bez dodatków)). Nie wykazano różnic istotnych statystycznie na poziomie istotności  $\leq 0,05$ .



## Powierzchnia czerwiu krytego

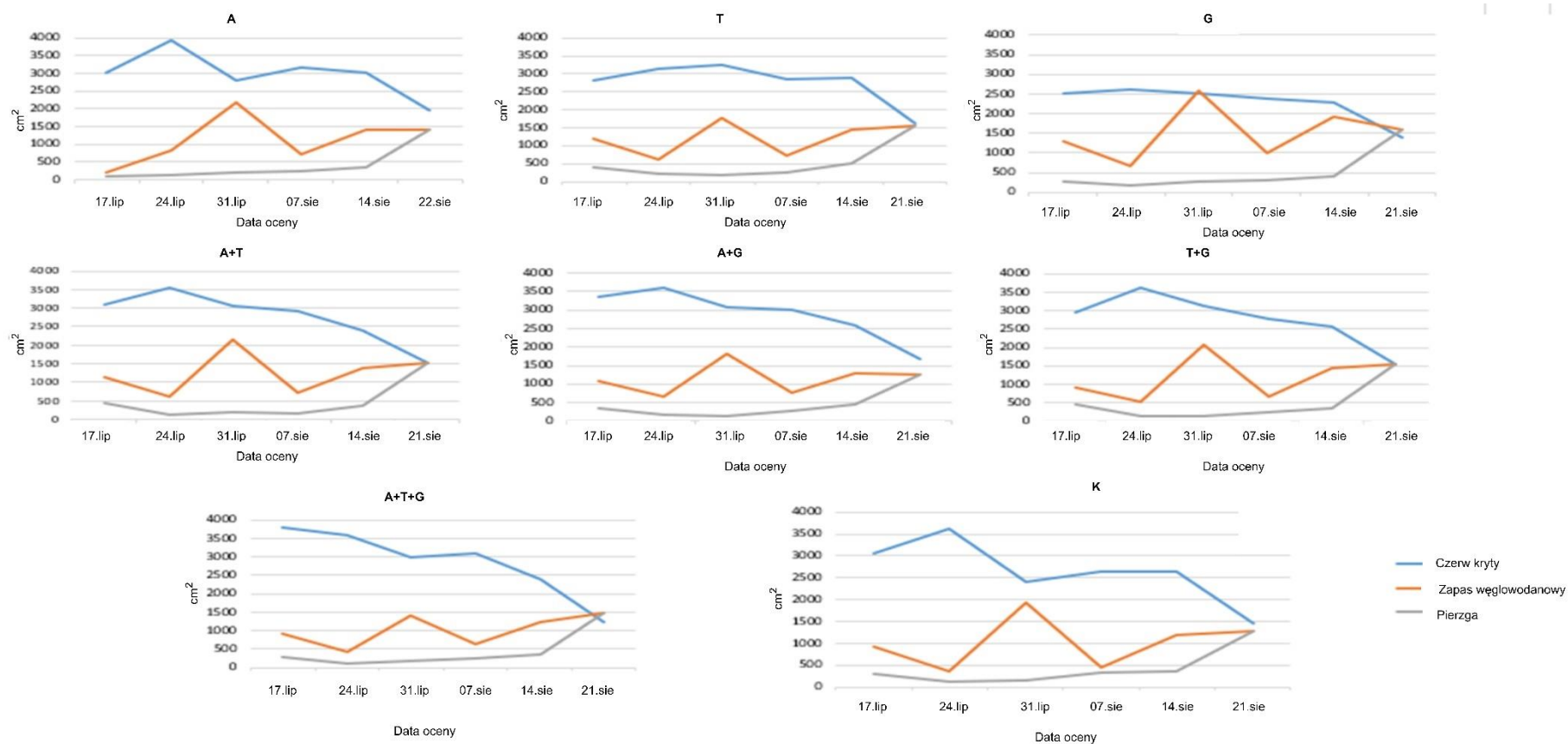
Średnią powierzchnię czerwiu krytego w poszczególnych grupach wraz z odchyleniem standardowym przedstawiono w tab. 8. W powierzchni czerwiu krytego nie wykazano żadnych statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami, zarówno na początku doświadczenia, jak i po ekspozycji na środki ochrony roślin.

Największą różnicę w powierzchni czerwiu krytego pomiędzy pierwszą a ostatnią oceną odnotowano w grupie rodzin karmionych pokarmem z dodatkiem mieszaniny trójskładnikowej (spadek o 68%), natomiast najmniejszą w grupie A (spadek o 35%) (wyk. 1.). Spadek w grupie kontrolnej (K) wyniósł również około 35%. Do czasu ekspozycji na ŚOR we wszystkich grupach, za wyjątkiem grupy A+T+G, odnotowano wzrost powierzchni czerwiu krytego. Największy wzrost wystąpił w grupie A (o około 30%), najmniejszy w grupie G (3,75%). Najwięcej czerwiu krytego przed ekspozycją było w grupie A+T+G, najmniej w grupie G. Po 7 dniach od rozpoczęcia ekspozycji na ŚOR zauważono spadek powierzchni czerwiu krytego w każdej grupie, za wyjątkiem grupy T. Po 14 dniach nastąpił wzrost powierzchni czerwiu krytego w grupach A, A+T+G i K, a w pozostałych grupach spadek. Po 21 dniach jedyną grupą, w której zaobserwowano wzrost powierzchni czerwiu krytego była grupa T. Po 28 dniach w każdej grupie odnotowano spadek, największy w grupie T (o 44% od poprzedniej oceny), natomiast najmniejszy spadek w grupie A+T (o 37% od poprzedniej oceny). Grupa pszczół skarmiana syropem z dodatkiem glifosatu (G) charakteryzowała się najmniej zmienną ilością czerwiu krytego podczas trwania doświadczenia. Tylko raz odnotowano niewielki wzrost powierzchni czerwiu krytego (przed ekspozycją na ŚOR). Po 7, 14 i 21 dniach wystąpił nieznaczny spadek powierzchni czerwiu krytego. W grupie rodzin skarmianych syropem z dodatkiem tebukonazolu (T) 3 razy odnotowano wzrost powierzchni czerwiu krytego. Była to jedyna grupa, w której powierzchnia czerwiu krytego zwiększyła się po 7 i 21 dniach od rozpoczęcia ekspozycji. Po 28 dniach w tej grupie zaobserwowano największy, w porównaniu do innych grup, spadek powierzchni czerwiu.

**Tabela 8.** Wpływ acetamiprydu, glifosatu i/lub tebukonazolu na powierzchnię czerwiu krytego [cm<sup>2</sup>] w rodzinach pszczelich

Data oceny	Nazwa grupy							
	A	T	G	A+T	A+G	T+G	A+T+G	K
<b>17.07.21</b> 7 dni przed ekspozycją	3030,9 ±519,2	2810,5 ±266,4	2519,2 ±506,4	3080,1 ±639,1	3337,9 ±461,9	2960,1 ±492,7	3798,5 ±475,1	3050,6 ±631
<b>24.07.21</b> dzień ekspozycji	3920,5 ±594,8	3141,1 ±524	2613,7 ±923,4	3552,5 ±297	3613,5 ±748,1	3629,2 ±616,4	3582 ±740,6	3621,4 ±715,1
<b>31.07.21</b> 7 dni od rozpoczęcia ekspozycji	2786,9 ±433,4	3243,5 ±151,4	2511,3 ±761,4	3050,6 ±408,4	3070,3 ±401,4	3133,3 ±446,7	2991,6 ±308,3	2401,1 ±765,3
<b>07.08.21</b> 14 dni od rozpoczęcia ekspozycji	3156,9 ±201,5	2865,6 ±442,2	2393,2 ±639,2	2912,8 ±526,1	3007,3 ±573,5	2771,1 ±713,2	3090 ±1013	2647,1 ±237
<b>14.08.21</b> 21 dni od rozpoczęcia ekspozycji	3007,3 ±471,2	2905 ±601,7	2283 ±530,1	2401,1 ±374,8	2574,3 ±392,3	2566,4 ±355,8	2391,3 ±838,9	2637,3 ±669,6
<b>21.08.21</b> 28 dni od rozpoczęcia ekspozycji	1968,1 ±476,4	1621,7 ±370,7	1385,6 ±624,9	1515,5 ±315,7	1684,7 ±317,8	1550,9 ±443,2	1230,1 ±597,3	1446,6 ±432,8
Liczba rodzin w grupie	N=5	N=5	N=5	N=4	N=5	N=5	N=4	N=4

Przedstawiono wartości średnie ±sd powierzchni czerwiu [cm<sup>2</sup>]. Nazwy grup pochodzą od pierwszych liter nazw substancji aktywnych obecnych w formulacji środka ochrony roślin lub ich mieszanin („A” – acetamipryd, „T” – tebukonazol, „G” – glifosat, „K” – kontrola (syrop bez dodatków)). Nie wykazano różnic istotnych statystycznie na poziomie istotności ≤0,05.



**Wykres 1.** Wpływ acetamiprydu, glifosatu i/lub tebukonazolu na powierzchnię czerwiu krytego, zapasu węglowodanowego i pierzgi w rodzinach pszczelich. Przedstawiono wartości średnie powierzchni czerwiu krytego, zapasu węglowodanowego i pierzgi w rodzinach pszczelich [cm<sup>2</sup>]. Nazwy grup pochodzą od pierwszych liter nazw substancji aktywnych obecnych w formulacji środka ochrony roślin lub ich mieszanin („A” – acetamipryd, „T” – tebukonazol, „G” – glifosat, „K” – kontrola (syrop bez dodatków)). Nie wykazano różnic istotnych statystycznie na poziomie istotności  $\leq 0,05$ .

## Powierzchnia pokarmu

Średnią powierzchnię pierzgi i zapasu węglowodanowego w poszczególnych grupach wraz z odchyleniem standardowym przedstawiono odpowiednio w tab. 9. i tab. 10. Grupy nie różniły się istotnie między sobą pod względem powierzchni pokarmu, zarówno przed ekspozycją na ŚOR, jak i po narażeniu. Ilość zapasu węglowodanowego w rodzinach do czasu ekspozycji kształtowała się na poziomie około 780 cm<sup>2</sup>. Dzień po zakończeniu ekspozycji (31 lipca) zapasy w rodzinach wynosiły średnio 1980 cm<sup>2</sup>, przy czym najmniej zapasu węglowodanowego było w grupie A+T+G (1407,21 cm<sup>2</sup>), natomiast najwięcej w grupie G (2582,18 cm<sup>2</sup>) (wyk. 1.). Wszystkie rodziny każdorazowo pobierały cały zadany im pokarm.

We wszystkich grupach, z wyjątkiem grupy pszczoł otrzymujących syrop z dodatkiem acetamiprydu (A) powierzchnia pierzgi oceniona 24 lipca była niższa niż 18 lipca. 14 sierpnia we wszystkich grupach odnotowano nieznaczny wzrost, powierzchnia pierzgi średnio wyniosła 388 cm<sup>2</sup>. W grupie pszczoł karmionych syropem z dodatkiem tebukonazolu oraz połączeniem acetamiprydu i glifosatu odnotowano spadek również podczas oceny 31 lipca. Najwięcej pierzgi we wszystkich grupach odnotowano 21 sierpnia, powierzchnia wyniosła średnio 1455 cm<sup>2</sup>. Porównując pierwszą ocenę z ostatnią, największy zapas pierzgi zgromadziła grupa G (1324,16 cm<sup>2</sup>), natomiast najmniejszą grupą A+T+G (936,83 cm<sup>2</sup>).

**Tabela 9.** Wpływ acetamiprydu, glifosatu i/lub tebukonazolu na powierzchnię pierzgi [cm<sup>2</sup>] w rodzinach pszczelich

Data oceny	Nazwa grupy							
	A	T	G	A+T	A+G	T+G	A+T+G	K
<b>17.07.21</b> 7 dni przed ekspozycją	96,04 ±30,69	406,22 ±182,91	273,96 ±208,39	448,73 ±162,49	330,65 ±185,88	466,05 ±184,74	295,22 ±165,45	314,90 ±128,56
<b>24.07.21</b> dzień ekspozycji	110,22 ±58,38	220,43 ±71,51	168,47 ±202,98	137,77 ±50,82	165,32 ±64,68	133,83 ±65,87	127,93 ±19,68	137,77 ±104,14
<b>31.07.21</b> 7 dni od rozpoczęcia ekspozycji	188,94 ±98,01	181,07 ±59,70	275,54 ±144,63	186,97 ±59,04	149,58 ±98,01	141,71 ±71,51	167,29 ±93,01	167,29 ±67,22
<b>07.08.21</b> 14 dni od rozpoczęcia ekspozycji	251,92 ±81,62	267,67 ±153,46	314,90 ±224,40	147,61 ±103,52	283,41 ±93,98	236,18 ±73,64	246,02 ±121,85	334,58 ±50,82
<b>14.08.21</b> 21 dni od rozpoczęcia ekspozycji	330,65 ±153,97	519,59 ±155,97	401,50 ±128,76	364,10 ±37,69	464,48 ±143,01	330,65 ±146,23	344,42 ±59,04	354,26 ±136,36
<b>21.08.21</b> 28 dni od rozpoczęcia ekspozycji	1409,18 ±413,21	1550,88 ±625,85	1598,12 ±354,92	1525,30 ±607,57	1267,47 ±356,88	1543,01 ±326,26	1466,25 ±336,12	1279,28 ±204,53
Liczba rodzin w grupie	N=5	N=5	N=5	N=4	N=5	N=5	N=4	N=4

Przedstawiono wartości średnie ±sd powierzchni pierzgi [cm<sup>2</sup>]. Nazwy grup pochodzą od pierwszych liter nazw substancji aktywnych obecnych w formulacji środka ochrony roślin lub ich mieszanin („A” – acetamipryd, „T” – tebukonazol, „G” – glifosat, „K” – kontrola (syrop bez dodatków)). Nie wykazano różnic istotnych statystycznie na poziomie istotności ≤0,05.

**Tabela 10.** Wpływ acetamiprydu, glifosatu i/lub tebukonazolu na powierzchnię zapasu węglowodanowego [cm<sup>2</sup>] w rodzinach pszczelich

Data oceny	Nazwa grupy							
	A	T	G	A+T	A+G	T+G	A+T+G	K
<b>17.07.21</b> 7 dni przed ekspozycją	212,556 ±100,05	1204,49± 161,34	1281,64 ±1020,90	1151,35 ±199,10	1094,28± 385,07	921,08 ±205,67	905,34 ±278,33	934,86 ±145,07
<b>24.07.21</b> dzień ekspozycji	826,61 ±383,66	621,93 ±212,70	653,42 ±384,26	610,12 ±364,32	669,16 ±325,78	527,46 ±270,72	432,99 ±367,85	373,94 ±267,93
<b>31.07.21</b> 7 dni od rozpoczęcia ekspozycji	2164,94 ±927,74	1755,57 ±266,39	2582,18 ±732,50	2135,42 ±510,58	1810,68 ±259,61	2078,3 ±283,19	1407,21 ±407,01	1928,76 ±708,52
<b>07.08.21</b> 14 dni od rozpoczęcia ekspozycji	708,53 ±169,30	728,21 ±145,52	984,06 ±311,93	708,53 ±167,00	755,76 ±276,10	669,16 ±114,76	649,48 ±188,78	462,51 ±245,56
<b>14.08.21</b> 21 dni od rozpoczęcia ekspozycji	1417,05 ±361,84	1440,67 ±257,52	1913,02 ±678,70	1387,53 ±273,42	1275,35 ±468,73	1440,67 ±246,76	1220,24 ±344,66	1180,88 ±372,04
<b>21.08.21</b> 28 dni od rozpoczęcia ekspozycji	1409,18 ±413,21	1550,88 ±625,85	1598,12 ±354,92	1525,30 ±607,57	1267,47 ±356,88	1543,01 ±326,26	1466,25 ±336,12	1279,28 ±204,53
Liczba rodzin w grupie	N=5	N=5	N=5	N=4	N=5	N=5	N=4	N=4

Przedstawiono wartości średnie ±sd powierzchni zapasu węglowodanowego [cm<sup>2</sup>]. Nazwy grup pochodzą od pierwszych liter nazw substancji aktywnych obecnych w formulacji środka ochrony roślin lub ich mieszanin („A” – acetamipryd, „T” – tebukonazol, „G” – glifosat, „K” – kontrola (syrop bez dodatków)). Nie wykazano różnic istotnych statystycznie na poziomie istotności ≤0,05.

#### 4.1.3 Instynkt higieniczny i stopień odbudowy węży

##### Instynkt higieniczny

Wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym dla instynktu higienicznego przedstawiono w tab. 11. Nie wykazano żadnych statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami, zarówno na początku doświadczenia, jak i po ekspozycji na środki ochrony roślin. W większości grup odsetek oczyszczonych komórek wynosił ponad 90%. Najmniej oczyszczonych komórek odnotowano 21 sierpnia, po 12h od przeprowadzenia testu, w grupie pszczoł karmionych syropem z dodatkiem acetamiprydu (69%) i tebukonazolu (75%). Po 24h wszystkie grupy oczyściły komórki w 100%.

**Tabela 11.** Wpływ acetamiprydu, glifosatu i/lub tebukonazolu na instynkt higieniczny robotnic [%]

Data i czas oceny		Grupy doświadczalne							
		A	T	G	G+T	A+T	A+G	A+T+ G	K
		% oczyszczonych komórek							
<b>17.07.2021</b> 7 dni przed ekspozycją	12h	92,25 ±15,5	84,6 ±18,16	96,2 ±6,1	98,33 ±4,08	97 ±4,0	97,2 ±4,4	97,75 ±4,4	96,5 ±5,8
	24h	100 ±0,0	96,2 ±6,34	99,4 ±1,3	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0
<b>25.07.2021</b> 1 dzień po rozpoczęciu ekspozycji	12h	96,25 ±3,1	86,6 ±18,1	91 ±9,2	86,2 ±8,6	92 ±8,6	83,2 ±19,1	95 ±10,0	86,75 ±26,5
	24h	100 ±0,0	97,4 ±5,8	99,4 ±1,3	94,3 ±13,9	100 ±0,0	99,6 ±0,9	100 ±0,0	90,75 ±18,5
<b>21.08.2021</b> 28 dni po rozpoczęciu ekspozycji	12h	69 ±27,4	75 ±33,9	86,6 ±12,3	79 ±34,5	94,75 ±6,9	96 ±4,7	91,75 ±10,5	98 ±4,0
	24h	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0	100 ±0,0
Liczba rodzin w grupie		N=5	N=5	N=5	N=5	N=4	N=5	N=4	N=4

Przedstawiono procent oczyszczonych komórek (±sd). Nazwy grup pochodzą od pierwszych liter nazw substancji aktywnych obecnych w formułacji środka ochrony roślin lub ich mieszanin („A” – acetamipryd, „T” – tebukonazol, „G” – glifosat, „K” – kontrola (syrop bez dodatków)). Nie wykazano różnic istotnych statystycznie na poziomie istotności  $\leq 0,05$ .

## Stopień odbudowy węzy

Ocenę stopnia odbudowy węzy w skali 0-6 pkt. przeprowadzono czterokrotnie po dodaniu ramki z węzą do rodzin pszczelich. Wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym oraz przedstawiono w tab. 12. Nie wykazano żadnych statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami. W ostatniej ocenie najniższą średnią liczbę punktów otrzymała grupa G, natomiast najwyższą grupy A+T oraz A+T+G.

**Tabela 12.** Wpływ acetamiprydu, glifosatu i/lub tebukonazolu na stopień odbudowy węzy [pkt]

Data oceny (czas od wprowadzenia węzy do rodziny)	Grupy doświadczalne							
	A	T	G	G+T	A+T	A+G	A+T+G	K
<b>27.07.2021</b> (24h)	3 ±0,7	2,6 ±0,5	2,2 ±0,8	2,2 ±0,8	2,25 ±0,5	2,2 ±0,5	2,25 ±0,5	2,5 ±0,6
<b>29.07.2021</b> (72h)	4 ±0,7	3,4 ±0,9	2,6 ±0,6	3,4 ±1,3	3,5 ±1,0	2,8 ±0,4	3,75 ±1,3	3,5 ±0,6
<b>31.07.2021</b> (5 dni)	5,4 ±1,3	4,6 ±1,1	4,2 ±1,3	5 ±1,2	5 ±1,4	5 ±1,0	5,75 ±0,5	4,9 ±0,8
<b>07.08.2021</b> (12 dni)	5,8 ±0,5	5,8 ±0,5	5,4 ±0,9	5,6 ±0,9	6 ±0,0	5,8 ±0,5	6 ± 0,0	5,75 ±0,5
Liczba rodzin w grupie	N=5	N=5	N=5	N=5	N=4	N=5	N=4	N=4

Przedstawiono wartości średnie stopnia odbudowy węzy w skali 0-6p. Nazwy grup pochodzą od pierwszych liter nazw substancji aktywnych obecnych w formulacji środka ochrony roślin lub ich mieszanin („A” – acetamipryd, „T” – tebukonazol, „G” – glifosat, „K” – kontrola (syrop bez dodatków)). Nie wykazano różnic istotnych statystycznie na poziomie istotności  $\leq 0,05$ .

### 4.1.4 Ocena zimotrwałości rodzin pszczelich

Dwie rodziny osypały się w trakcie zimowli, jedna rodzina w grupie K oraz jedna rodzina w grupie A+G, co zostało odnotowane 25.12.21. Pozostałe rodziny przezimowały (ocena po zimowli 23.03.2021).

## 4.2 Wpływ badanych substancji aktywnych obecnych w formulacjach ŚOR na aktywność/poziom wskaźników biochemicznych

Najwięcej różnic z grupą kontrolną odnotowano w przypadku pszczoł karmionych syropem z dodatkiem tebukonazolu (fungicydu) – z 9 badanych wskaźników biochemicznych, poziom 5 (GGTP, ALP, kreatynina, kwas moczowy i mocznik) różnił się istotnie statystycznie, w większości przypadków był niższy (tab. 13). To także w tej grupie poziom wskaźników biochemicznych najczęściej różnił się istotnie statystycznie od poziomu wskaźników w pozostałych grupach doświadczalnych. W przypadku pszczoł w grupach G, A+T, A+G i T+G poziom żadnego analizowanego wskaźnika nie różnił się istotnie statystycznie z grupą kontrolną.

**Tabela 13.** Wpływ acetamiprydu, tebukonazolu i/lub glifosatu na poziom wskaźników biochemicznych w hemolimfie robotnic pszczoł miodnych

Nazwa wskaźnika biochemicznego	Nazwy grup doświadczalnych							
	A	T	G	A+T	A+G	T+G	A+G+T	K
ALT [U/L]	275,74 ±29,91 A	277,15 ±34,61 <sup>A</sup>	262,03 ±46,74 AB	258,29 ±33,45 AB	271,37 ±23,26 <sup>A</sup>	250,02 ±34,04 AB	232,61 ±22,77 <sup>B</sup>	279,79 ±50,88 <sup>A</sup>
AST [U/L]	167,81 ±20,80 A	157,74 ±11,73 <sup>AB</sup>	156,98 ±34,25 AB	126,24 ±18,64 C	148,96 ±12,34 ABC	153,07 ±16,51 AB	124,48 ±45,87 <sup>BC</sup>	150,07 ±19,20 ABC
ALP [U/L]	8,29 ±2,42 <sup>A</sup> D	3,70 ±1,66 <sup>B</sup>	8,63 ±2,47 <sup>AD</sup>	6,22 ±1,86 ACD	8,69 ±1,57 <sup>D</sup>	4,18 ±1,86 <sup>BC</sup>	5,86 ±1,38 <sup>BC</sup>	6,34 ±1,67 <sup>AC</sup> D
GGTP [U/L]	8,33 ±4,92 AD	1,96 ±0,73 <sup>B</sup>	6,13 ±4,54 ACD	6,8 ±4,7 ACD	7,67 ±2,14 <sup>AD</sup>	3,3 ±2,44 <sup>BC</sup>	3,7 ±2,59 <sup>BC</sup>	7,59 ±2,28 <sup>A</sup>
Albuminy [g/L]	1,03 ±0,11 AC	1,18 ±0,07 <sup>AB</sup>	1,1 ±0,17 ABC	1,23 ±0,17 AB	1,25 ±0,19 <sup>B</sup>	1,08 ±0,11 ABC	0,93 ±0,21 <sup>C</sup>	1,17 ±0,17
Kreatynina [ $\mu$ mol/L]	80,05 ±37,11 AD	43,11 ±3,65 <sup>B</sup>	62,53 ±24,79 DC	76,39 ±34,51 ACD	58,66 ±4,49 ACD	52,32 ±12,01 BC	50,10 ±9,5 <sup>BC</sup>	54,95 ±6,06 ACD
Kwas moczowy [ $\mu$ mol/L]	32,71 ±24,73 A	110,32 ±24,34 <sup>B</sup>	54,2 ±27,78 AD	67,48 ±33,2 CD	48,87 ±18,04 ACDE	62,16 ±27,22 ACDE	90,28 ±41,02 <sup>BCD</sup>	56,67 ±29,36
Mocznik [mmol/L]	0,2 ±0,15 <sup>A</sup>	0,26 ±0,12 <sup>AB</sup>	0,53 ±0,43 <sup>BC</sup>	0,41 ±0,13 BC	0,3 ±0,23 ABC	0,34 ±0,16 ABC	0,51 ±0,33 <sup>BC</sup>	0,44 ±0,06 <sup>C</sup>
TAS [mmol/L]	2,1 ±0,06 AC	2,21 ±0,03 <sup>B</sup>	2,02 ±0,18 <sup>C</sup>	2,12 ±0,09 AC	2,13 ±0,03 <sup>AC</sup>	2,1 ±0,09 <sup>AC</sup>	1,83 ±0,82 <sup>ABC</sup>	2,14 ±0,07 ABC

Tabela zawiera wartości średnie ( $\pm$  odchylenie standardowe) poziomu wskaźników biochemicznych. Nazwy grup pochodzą od pierwszych liter nazw substancji aktywnych obecnych w formulacji środka ochrony roślin lub ich mieszanin („A” – acetamipryd, „T” – tebukonazol, „G” – glifosat, „K” – kontrola (syrop bez dodatków)). Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami oznaczono literami. Różne litery oznaczają różnice na poziomie istotności  $\leq 0,05$ .



#### 4.2.1 Enzymy detoksykacyjne i antyoksydacyjne – ALT, AST, ALP oraz GGTP

Aktywność ALT była niższa we wszystkich grupach doświadczalnych w porównaniu z grupą kontrolną, w przypadku pszczoł karmionych mieszaniną trójskładnikową różnica ta była istotna statystycznie (aktywność spadła o 16,9%) (tab. 13.).

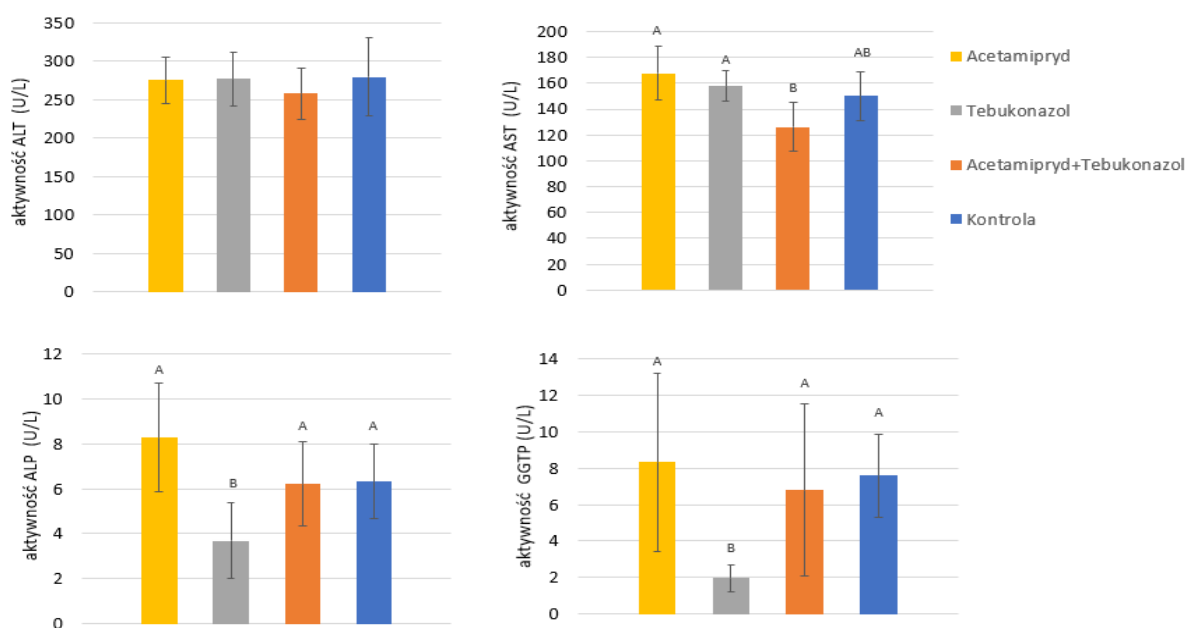
Aktywność ALP była również istotnie niższa (o 41,6%) w grupie T w odniesieniu do grupy kontrolnej. U pszczoł otrzymujących połączenie glifosatu i tebukonazolu aktywność ALP była niższa (różnica nieistotna statystycznie), a pojedynczego glifosatu wyższa (różnica nieistotna statystycznie). W ALP można zauważyć wzrost aktywności w grupie G, natomiast spadek w grupie T i T+G.

W aktywności AST nie wykazano żadnych istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami doświadczalnymi a grupą kontrolną. Podawany rodzinom acetamipryd i tebukonazol spowodował wzrost aktywności AST, natomiast połączenie tych środków spadek w porównaniu do grupy kontrolnej (wyk. 2.). Różnica między grupą A+T a grupami A i T była istotna statystycznie.

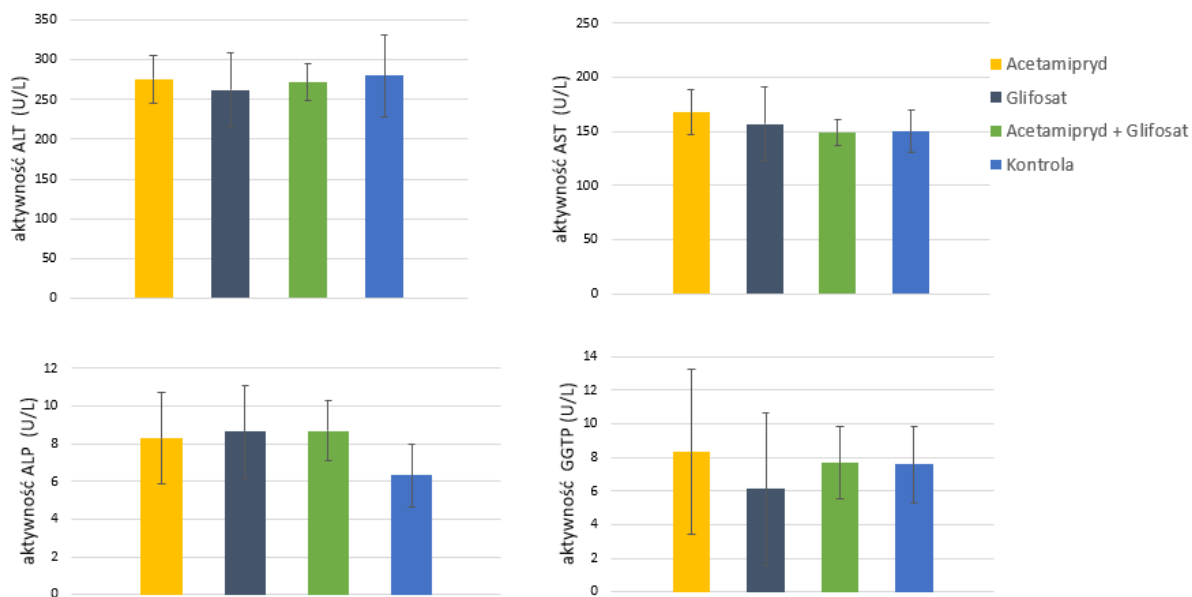
Dodatek tebukonazolu do syropu spowodował istotnie większy spadek aktywności GGTP w hemolimfie pszczoł w porównaniu do grupy kontrolnej, zmiana ta różniła się istotnie od zmiany wywołanej przez acetamipryd oraz połączenia acetamiprydu z tebukonazolem (tab. 13., wyk. 2.). Istotnie niższą aktywność GGTP odnotowano w grupie T w odniesieniu do grupy kontrolnej (spadek o 74,1%). Na aktywność GGTP istotnie wpłynęła również mieszanina trójskładnikowa, obniżając ją o 51,2% w porównaniu do grupy kontrolnej (wyk. 5.). Dodatkowo można zauważyć, że aktywność GGTP zmniejszyła się w grupach T, G, oraz T+G (wyk. 4.).

Mieszaniny ŚOR nie wpłynęły na aktywność żadnego z analizowanych enzymów w sposób większy lub równy od sumy działania dwóch pojedynczych środków. Oznacza to, że badane substancje aktywne po połączeniu wykazują efekt antagonistyczny. W grupie pszczoł otrzymujących syrop z dodatkiem mieszaniny trójskładnikowej (A+T+G) nie odnotowano większych zmian w aktywności enzymów niż w grupach pszczoł otrzymujących syrop z dodatkiem mieszanin dwuskładnikowych (A+T, A+G, T+G) (wyk. 2-5). Wyjątkiem jest poziom GGTP i ALT, na których aktywność bardziej wpłynęła mieszanina trójskładnikowa (spadek w porównaniu z grupą kontrolną) (wyk. 2-5). Mieszaniny dwuskładnikowe nie spowodowały istotnych statystycznie zmian w aktywności żadnego z analizowanych enzymów w hemolimfie pszczoł. Jednak w wielu przypadkach zmiany spowodowane

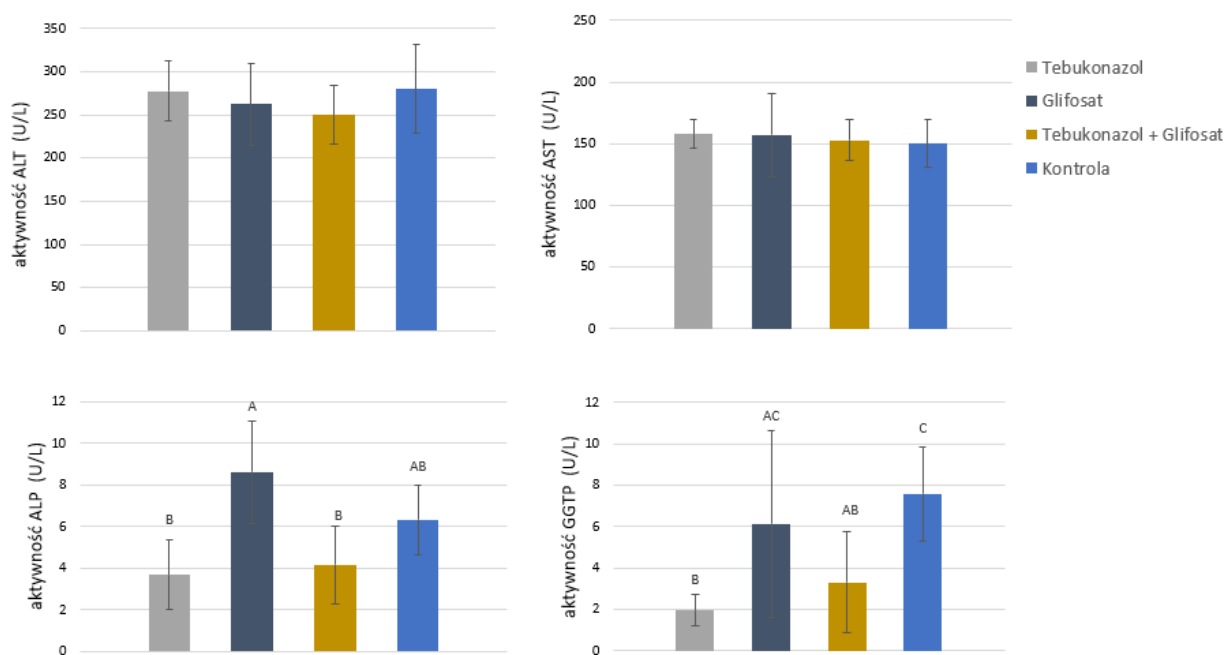
przez pojedyncze środki, różniły się istotnie od zmian wywołanych przez ich połączenie. Zmiany aktywności analizowanych enzymów spowodowane przez mieszaninę trójskładnikową różniły się istotnie od zmian spowodowanych przez co najmniej jedną substancję aktywną w przypadku wszystkich enzymów, z wyjątkiem ALP (wyk. 2-5). Mieszanina acetamiprydu i tebukonazolu (A+T) nie zmieniła aktywności analizowanych enzymów w sposób różny od pojedynczego acetamiprydu (A) (wyk. 2.). Połączenie acetamiprydu i glifosatu (A+G) nie wywołało istotnych statystycznie zmian w aktywności żadnego z analizowanych enzymów w hemolimfie pszczół w porównaniu z grupami A i G (wyk. 3.).



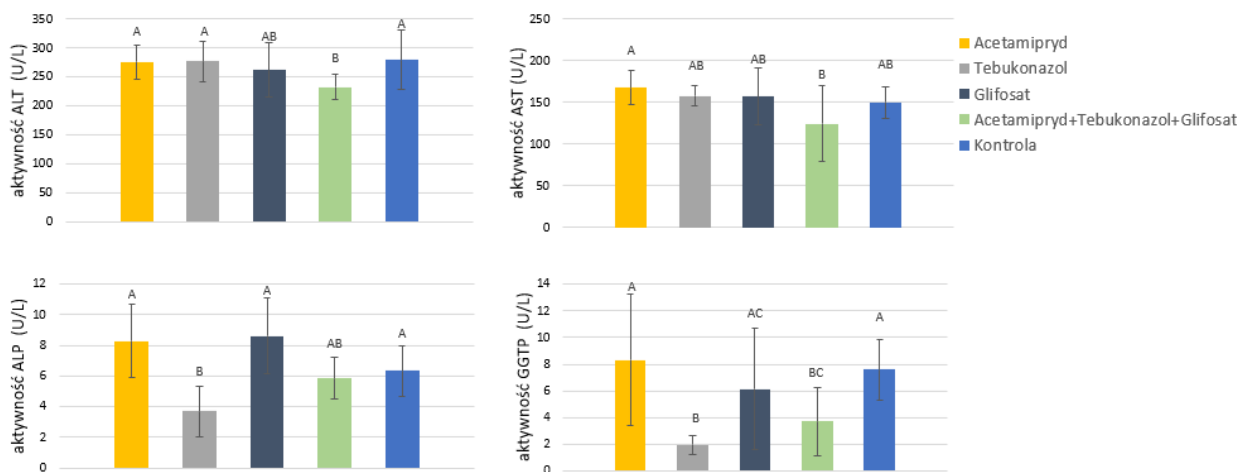
**Wykres 2.** Wpływ acetamiprydu i tebukonazolu (pojedynczo lub w mieszaninie) na aktywność ALT, AST, ALP i GGTP w hemolimfie robotnic. Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami oznaczono literami. Różne litery oznaczają różnice na poziomie istotności  $\leq 0,05$ . Słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.



**Wykres 3.** Wpływ acetamiprydu i glifosatu (pojedynczo lub w mieszaninie) na aktywność ALT, AST, ALP i GGTP w hemolimfie robotnic. Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami oznaczono literami. Różne litery oznaczają różnice na poziomie istotności  $\leq 0,05$ . Słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.



**Wykres 4.** Wpływ tebukonazolu i glifosatu (pojedynczo lub w mieszaninie) na aktywność ALT, AST, ALP i GGTP w hemolimfie robotnic. Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami oznaczono literami. Różne litery oznaczają różnice na poziomie istotności  $\leq 0,05$ . Słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.



**Wykres 5.** Wpływ acetamiprydu, tebukonazolu i glifosatu (pojedynczo lub w mieszaninie) na aktywność ALT, AST, ALP i GGTP w hemolimfie robotnic. Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami oznaczono literami. Różne litery oznaczają różnice na poziomie istotności  $\leq 0,05$ . Słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.

#### 4.2.2 Nieenzymatyczne antyoksydanty – albuminy, kreatynina, kwas moczowy i mocznik

Stężenie większości wskaźników biochemicznych było niższe w hemolimfie pszczoł otrzymujących ŚOR w porównaniu z grupą kontrolną, w większości nie były to jednak różnice istotne statystycznie (tab. 13.). W stężeniu albumin nie wykazano żadnych istotnych różnic pomiędzy grupami doświadczalnymi a grupą kontrolną. W przypadku pojedynczych substancji, acetamipryd i tebukonazol wywołały istotny statystyczny spadek poziomu mocznika w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio o 53,6% i 40,9%). Tebukonazol spowodował również istotny spadek poziomu kreatyniny (o 21,5%) oraz wzrost poziomu kwasu moczowego (o 94,8%) w porównaniu z grupą kontrolną. Glifosat nie wpłynął istotnie na poziom żadnego z analizowanych wskaźników. Mieszanki ŚOR nie spowodowały istotnych zmian w poziomie żadnego z analizowanych wskaźników w hemolimfie pszczoł w porównaniu z grupą kontrolną.

Podobnie jak w przypadku enzymów detoksykacyjnych i antyoksydacyjnych, na poziom żadnego z analizowanych wskaźników mieszaniny ŚOR nie wpłynęły w sposób większy lub równy od sumy działania dwóch pojedynczych środków. Oznacza to, że badane substancje aktywne, w tym przypadku po połączeniu, wykazują efekt antagonistyczny. Mimo iż mieszanki dwuskładnikowe nie spowodowały istotnych statystycznie zmian w poziomie

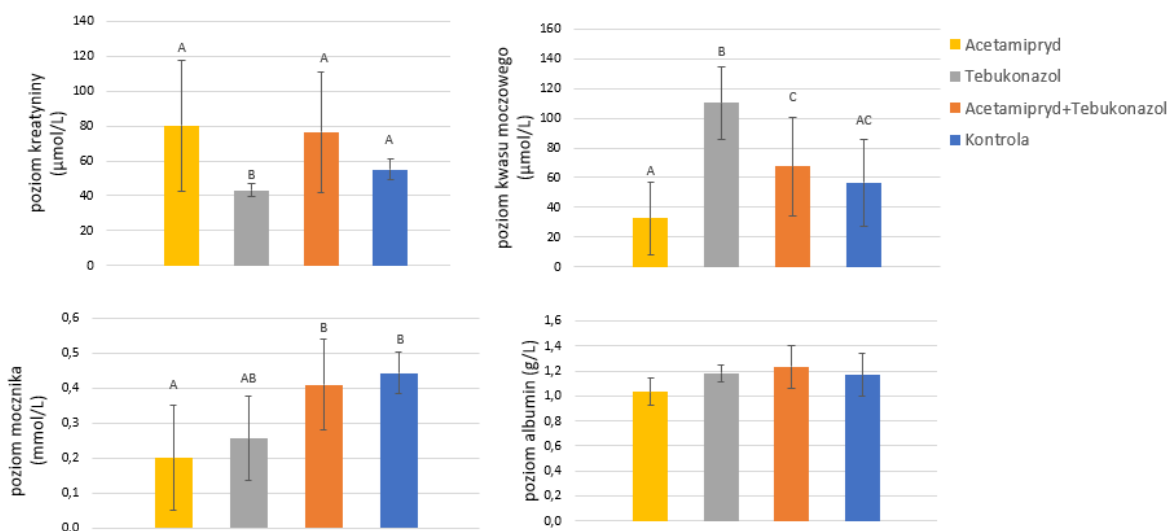
żadnego z analizowanych wskaźników w hemolimfie pszczoł, w wielu przypadkach zmiany spowodowane przez pojedyncze środki różniły się istotnie od zmian spowodowanych przez ich połączenie. W grupie pszczoł otrzymujących syrop z dodatkiem mieszaniny trójskładnikowej (A+T+G) nie odnotowano większych zmian w poziomie wskaźników, niż w grupach pszczoł otrzymujących syrop z dodatkiem mieszanin dwuskładnikowych (A+T, A+G, T+G) (wyk. 6-9).

Zmiany spowodowane przez mieszaninę acetamiprydu i tebukonazolu różnią się istotnie od zmian wywołanych przez pojedynczy acetamipryd i/lub tebukonazol w przypadku wszystkich wskaźników z wyjątkiem albumin (wyk. 6.). Pszczoły w grupie T charakteryzowały się istotnie niższym poziomem kreatyniny od pszczoł w grupach A, A+T i K.

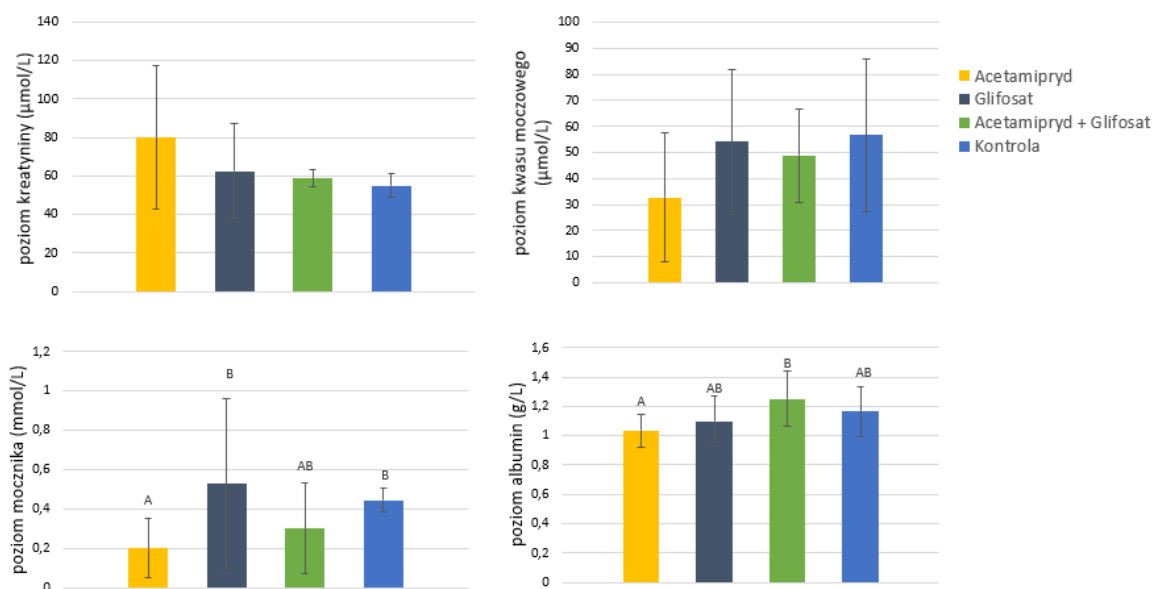
W przypadku połączenia acetamiprydu i glifosatu odnotowano najmniej różnic istotnych statystycznie w poziomie analizowanych wskaźników biochemicznych (wyk. 7.). Połączenie acetamiprydu i glifosatu (A+G) spowodowało wzrost poziomu albumin, natomiast acetamipryd (A) i glifosat (G) spadek. Acetamipryd pojedynczo (A) i w połączeniu z glifosatem (A+G) spowodował spadek stężenia mocznika w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast glifosat (G) jego wzrost.

Dodatek glifosatu (G) oraz mieszaniny glifosatu i tebukonazolu (T+G) do syropu spowodował spadek poziomu kwasu moczowego, natomiast dodatek tebukonazolu (T) wzrost (różnica istotna statystycznie) w porównaniu do grupy kontrolnej (wyk. 8.).

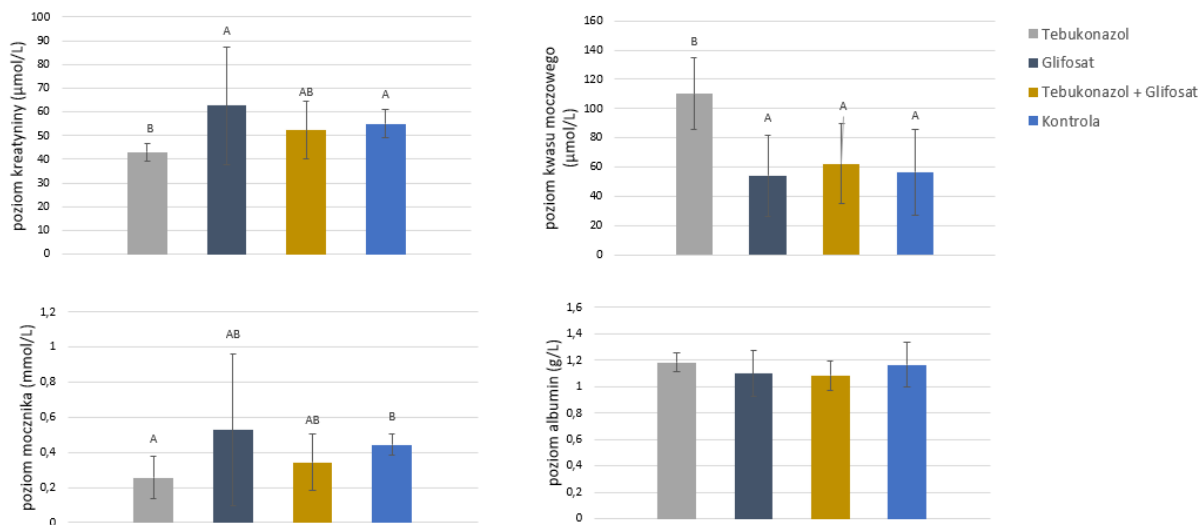
Zmiany spowodowane przez mieszaninę wszystkich trzech środków różniły się istotnie od zmian spowodowanych przez co najmniej jedną pojedynczą substancję w przypadku wszystkich wskaźników z wyjątkiem albumin (wyk. 9.).



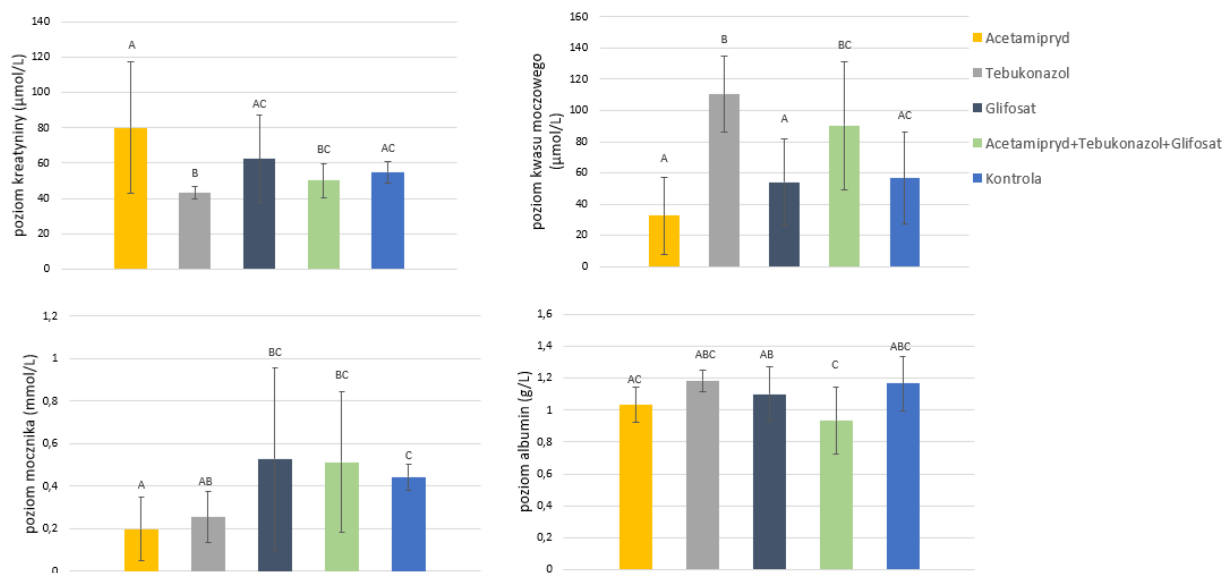
**Wykres 6.** Wpływ acetamiprydu i tebukonazolu (pojedynczo lub w mieszaninie) na poziom antyoksydantów nieenzymatycznych w hemolimfie robotnic. Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami oznaczono literami. Różne litery oznaczają różnice na poziomie istotności  $\leq 0,05$ . Słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.



**Wykres 7.** Wpływ acetamiprydu i glifosatu (pojedynczo lub w mieszaninie) na poziom antyoksydantów nieenzymatycznych w hemolimfie robotnic. Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami oznaczono literami. Różne litery oznaczają różnice na poziomie istotności  $\leq 0,05$ . Słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.



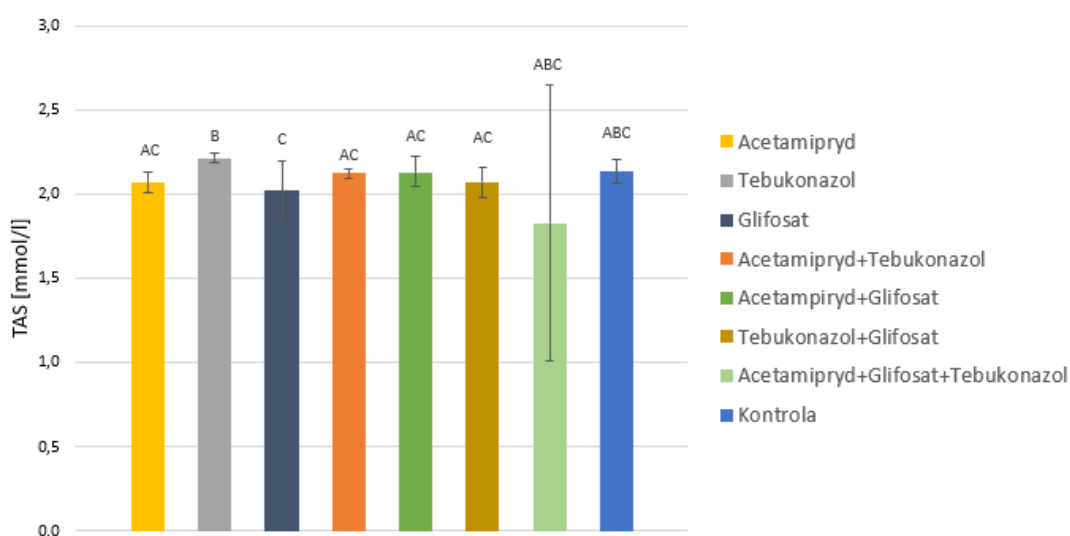
**Wykres 8.** Wpływ tebukonazolu i glifosatu (pojedynczo lub w mieszaninie) na poziom antyoksydantów nieenzymatycznych w hemolimfie robotnic. Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami oznaczono literami. Różne litery oznaczają różnice na poziomie istotności  $\leq 0,05$ . Słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.



**Wykres 9.** Wpływ acetamiprydu, tebukonazolu i glifosatu (pojedynczo lub w mieszaninie) na poziom antyoksydantów nieenzymatycznych w hemolimfie robotnic. Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami oznaczono literami. Różne litery oznaczają różnice na poziomie istotności  $\leq 0,05$ . Słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.

#### 4.2.3 Wskaźnik całkowitej pojemności antyoksydacyjnej organizmu – TAS

W poziomie TAS nie wykazano żadnych istotnych różnic pomiędzy grupami doświadczalnymi a grupą kontrolną (tab. 13., wyk. 10.). Pszczoły otrzymujące syrop z dodatkiem tebukonazolu cechowały się istotnie statystycznie wyższym poziomem TAS niż pszczoły z grup otrzymujących syrop z dodatkiem glifosatu, acetamiprydu i mieszanin dwuskładnikowych.



**Wykres 10.** Wpływ acetamiprydu, tebukonazolu i glifosatu (pojedynczo lub w mieszaninie) na średni poziom TAS w hemolimfie nowo wygryzionych robotnic. Rodzinom pszczelim przez 7 dni podawany był syrop cukrowy z dodatkiem komercyjnych formułacji środków ochrony roślin. Grupa kontrolna otrzymywała syrop bez dodatków. Różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi wartościami średnimi wskaźników biochemicznych dla grup oznaczono literami. Różne litery oznaczają różnice na poziomie istotności  $\leq 0,05$



## 5 Dyskusja

### 5.1 Wpływ badanych substancji aktywnych obecnych w formulacjach ŚOR na rodziny pszczele

Istnieje niewiele danych na temat wpływu badanych w niniejszej pracy substancji na wskaźniki wydajnościowe i rozwojowe rodziny pszczelej. Badane ŚOR i ich mieszaniny nie wpłynęły statystycznie istotnie na obecność matki pszczelej, jakość czerwienia przez matkę, powierzchnię czerwiu, pokarmu oraz siłę rodzin, a także stopień odbudowy węży i instykt higieniczny. Stosunkowo wysokie odchylenie standardowe badanych parametrów we wszystkich grupach świadczy o dużym naturalnym zróżnicowaniu rozwoju rodzin pszczelich, pomimo ich jednolitego genetycznie pochodzenia. Taka różnorodność jest charakterystycznym elementem występującym w badaniach biologicznych. Efektem tego może być różna podatność rodzin pszczelich na toksyczne działanie ŚOR i trudność w zaobserwowaniu zmian powodowanych przez ŚOR [89, 136]. Literatura wskazuje na znaczną zmienność w reakcji pszczół na substancje toksyczne w laboratoryjnych doświadczeniach klatkowych, a mając na uwadze złożoność funkcjonowania rodziny pszczelej, oczekuje się, że różnica w reakcji między osobnikami i społeczności pszczelej jest jeszcze większa w warunkach naturalnych [12].

W badaniach własnych nie odnotowano wpływu acetamiprydu w stężeniu 250 ppb na oceniane parametry w rodzinach pszczelich (tab. 13.). Odmienne wyniki otrzymano w badaniach Shi i wsp. [174], ekspozycja na acetamipryd w stężeniu 25 000 ppb spowodowała zmniejszenie liczby komórek z czerwem krytym w rodzinach. Do podobnych wniosków doszli również Chen i wsp. [118] po zastosowaniu stężenia 2 431 ppb, dodatkowo odnotowali oni zwiększoną śmiertelność pszczół, obniżoną aktywność lotną zbieraczek oraz mniejszą siłę rodziny. Może to być spowodowane wyższym stężeniem zastosowanym przez innych autorów niż tym wykorzystanym w badaniach własnych. Z kolei w badaniach polowych przeprowadzonych na rodzinach pszczelich, mających dostęp do pożytku, na którym zastosowano oprysk acetamiprydem, nie odnotowano wpływu tego środka na śmiertelność, rozwój czerwiu, siłę rodziny czy miodność. Poziom pozostałości acetamiprydu w miodzie wyprodukowanym przez pszczoły w tym doświadczeniu wyniósł od 0,1 do 7,6 ppb, a w pierdze i pyłku od 0,6 do 10,5 ppb [111]. W badaniach Dworzańskiej i wsp. [89], acetamipryd zaaplikowany na pole rzepaku w stężeniu 120 000 ppb również nie wpłynął na śmiertelność, ani na aktywność lotną pszczoły miodnej. Wyniki badań polowych, zarówno w niższych stężeniach, jak i wyższych od tych zastosowanych w badaniach własnych,

potwierdzają obserwacje własne. Acetamipryd uważany jest za mniej toksyczny w porównaniu do pozostałych neonikotynoidów [16, 107, 114]. Niższa toksyczność acetamiprydu względem pszczoły miodnej nie jest jeszcze wytłumaczona, ale może być powiązana z jego stosunkowo szybkim metabolizmem w organizmie pszczoły miodnej [114, 115].

Glifosat w badaniach własnych przy stężeniu 7200 ppb nie wpłynął na oceniane parametry w rodzinach pszczelich (tab. 13.). Takie wyniki potwierdzają również badania Odemera i wsp. [131], herbicyd ten podawany rodzinom w syropie w ilości 4 800 ppb i 137 600 ppb nie wpłynął na kondycję rodziny i przeżycie poszczególnych robotnic, mimo iż wyższe stężenie przyczyniło się do wolniejszego rozwoju czerwiu. Glifosat podawany rodzinom w syropie w jeszcze wyższych stężeniach (75 000, 150 000 lub 301 000 ppb) również nie wpłynął na przeżycie, rozwój i średnią masę czerwiu, ani na śmiertelność robotnic [175]. Z kolei po podaniu glifosatu w stężeniu 0,1; 1 i 10 ppb zimującym pszczołom miodnym, stwierdzono ich wyższą śmiertelność niż w grupie kontrolnej [45].

W badaniach własnych tebukonazol w stężeniu 147 ppb, podobnie jak glifosat i acetamipryd, nie wpłynął na oceniane w rodzinach pszczelich parametry (tab. 13.). W literaturze nie ma dostępnych informacji na temat wpływu tego fungicydu na rodziny pszczele. Badania analizujące wpływ fungicydów z innych niż tebukonazol grup chemicznych sugerują, że mogą one stanowić zagrożenie dla rodzin pszczelich [176].

## **5.2 Wpływ badanych substancji aktywnych obecnych w formulacjach ŚOR na poziom wskaźników biochemicznych**

Środki ochrony roślin mogą zmieniać mechanizmy detoksykacyjne, antyoksydacyjne i biochemiczne związane z odpornością u pszczoły miodnej, które wpływają na funkcjonowanie całego jej organizmu. Wiele badań potwierdziło, że ŚOR powodują wzrost lub spadek aktywności enzymów oraz zmieniają poziom niektórych kluczowych substancji (np. ATP, białek i glutationu [7, 8, 44, 45, 50]). Nie oszacowano jednak wartości referencyjnych wskaźników biochemicznych dla pszczoły miodnej [35]. W poszczególnych testach z wykorzystaniem ŚOR robotnice różnią się wiekiem, a parametry fizjologiczne i wrażliwość na pestycydy zmieniają się wraz z starzeniem się pszczół [7, 35]. Ponadto do analizy wykorzystywane są różne materiały (np. hemolimfa, cała głowa, czy jelita, a poziom i/lub aktywność wskaźników może być odmienna w różnych tkankach i narządach [45, 47, 50]). Dodatkowo, ŚOR aplikowane są w różny sposób, w odmiennych stężeniach i czasie ekspozycji, co jest również istotną kwestią w interpretacji wyników.

### 5.2.1 Enzymy detoksykacyjne i antyoksydacyjne (ALT, ALP, AST, GGTP)

Przeprowadzono kilka badań, w których analizowano aktywność ALT, AST i ALP w hemolimfie pszczoł. Uzyskane przez poszczególnych autorów wyniki różnią się. Aktywność AST wyniosła od 20 do 150 U/L, ALT od 25 do 150 U/L, natomiast ALP od 5,66 do 25 U/L [7, 38, 39, 49, 54, 64, 177]. Różnice mogą wynikać z odmiennej metody analizy oraz niejednakowego wieku pszczoł. Aktywność AST i ALP u zdrowych pszczoł wzrasta do 22 dnia, a ALT do 26 dnia życia, a następnie spada [38]. Dowiedziono również, że aktywność ALT, AST i ALP w hemolimfie pszczoł na ogół maleje w wyniku działania szkodliwych substancji i pasożytniczej aktywności *Varroa destructor* [48, 49], a także pola elektromagnetycznego [64], natomiast może wzrastać pod wpływem stresujących czynników (np. zbyt wysokiej temperatury [54] oraz substancji działających stymulująco, np. kurkuminy [38, 39, 177]). W badaniach własnych aktywność ALT w hemolimfie pszczoł z grupy kontrolnej wyniosła 279,79 U/L; AST 150,07 U/L; natomiast ALP 6,34 U/L. Porównując wyniki otrzymane w badaniach własnych z badaniami innych autorów, można zauważyć, że aktywność ALT jest wyższa w przypadku badań własnych, natomiast AST i ALP mieści się w uzyskanych przez innych autorów przedziałach [7, 38, 39, 49, 54, 64, 177].

Analiza aktywności GGTP w hemolimfie pszczoły miodnej była przedmiotem niewielu badań. Dowiedziono, że poziom GGTP w hemolimfie pszczoły miodnej wzrasta pod wpływem stresujących czynników, np. zbyt wysokiej temperatury. W badaniach Şapcaliu i wsp. [54] w grupie kontrolnej aktywność tego enzymu kształtowała się na poziomie od 2,56 do 3,33 U/L. Dodatkowo aktywność GGTP była badana w hemolimfie larw barciaka większego (*Galleria mellonella* L.) Wykazano, że pod wpływem substancji chemicznych w postaci leków weterynaryjnych poziom tego enzymu spadł [53]. W badaniach własnych w grupie kontrolnej aktywność GGTP wyniosła 7,59 U/L.

W badaniach własnych acetamipryd w stężeniu 250 ppb podawany rodzinom pszczelim nie spowodował istotnych zmian w aktywności badanych enzymów (tab. 13.). W literaturze nie ma danych na temat wpływu acetamiprydu w tej dawce na analizowane w niniejszej pracy wskaźniki. W wyższych stężeniach (tj. 600, 1200, 2400, 6000 i 60 000) ppb insektycyd ten wpłynął na aktywność antyoksydantów: polifenolooksydazy i karboksyoesterazy oraz enzymu detoksykacyjnego GST [114]. W badaniach Paleologa i wsp. [8] analizowano wpływ innego neonikotynoidu, imidaklopyrydu (w stężeniu 5 i 200 ppb). Podawany w syropie obniżył aktywność ALP, ALT i AST w hemolimfie wszystkich kast, niezależnie od wieku [8]. Aktywność ALP u pszczoł miodnych jest również analizowana w tkankach jelita osobników

narażonych na ŚOR. Dowiedziono, że aktywność tego enzymu w jelicie może zmieniać się pod wpływem szkodliwych substancji. U pszczoł jednodniowych karmionych syropem z dodatkiem deltametryny (insektycyd z grupy pyretroidów) aktywność ALP otrzymanej z jelita nieznacznie różniła się od grupy kontrolnej [47]. Pszczoły narażone pokarmowo na działanie spor bakterii *Bacillus thuringiensis* (bioinsektycyd) cechowały się zwiększoną aktywnością ALP (ekstrahowanej z jelita po 10 dniach, natomiast zmniejszoną po 20 dniach w porównaniu do grupy kontrolnej). Ekspozycja pokarmowa na fipronil (insektycyd neonikotynoidowy) spowodowała wzrost aktywności ALP po 10 dniach, natomiast po 20 dniach nie zaobserwowano żadnego efektu [50]. U pszczoł zimujących skarmianych syropem z dodatkiem imidakloprydu (insektycyd z grupy neonikotynoidów), glifosatu i/ lub difeconazolu (fungicyd triazolowy) odnotowano zmiany aktywności ALP w tkance jelita (najczęściej wzrost), jednak tylko w przypadku grupy pszczoł otrzymujących połączenie imidakloprydu z glifosatem w stężeniu 0,1 ppb zmiana ta była istotna statystycznie [45]. Nie wykazano zmian w aktywności ALP ekstrahowanej z jelit pszczoł zbieraczek (w wieku powyżej 21 dni) po ekspozycji kontaktowej na tiametoksam (insektycyd z grupy neonikotynoidów) w dawce równej LD<sub>50</sub> (51,16 ng na pszczołę lub niższej 5,12 ng i 2,56 ng na pszczołę w porównaniu do grupy kontrolnej [51]).

Glifosat w badaniach własnych przy stężeniu 7200 ppb nie wpłynął istotnie na aktywność żadnego z analizowanych enzymów (tab. 13.). W zależności od stężenia, sposobu aplikacji i wieku pszczoł herbicyd ten może wpływać na poziom wskaźników antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych pszczoły miodnej [46, 146]. W badaniach Almasri i wsp. [45] u pszczoł zimujących skarmianych syropem z dodatkiem glifosatu w stężeniu 0,1 i 1 ppb odnotowano zmiany aktywności ALP w tkance jelita (najczęściej wzrost, jednak zmiany te nie były istotne statystycznie. U zimujących pszczoł glifosat podawany w stężeniu 0,1 i 1 ppb zwiększał aktywność GST, a przy stężeniu 1 ppb wpłynął również na aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej [45]. Z kolei aplikowany kontaktowo w stężeniu 1 217 500 ppb, nie wpłynął na aktywność GST u pszczoł jednodniowych [44]. W stężeniu 0,8 ppb [178] i 2 500 ppb [136, 144] zmienił poziom ekspresji genów kodujących enzymy detoksykacyjne u larw. Tebukonazol w badaniach własnych podawany pszczołom w stężeniu 147 ppb obniżył aktywność enzymów GGTP i ALP w porównaniu do grupy kontrolnej.

Wpływ fungicydów, w tym również triazolowych, na poziom wskaźników fizjologicznych pszczoły miodnej jest zagadnieniem, który nadal nie został zbadany [9]. Choć fungicydy triazolowe mogą zwiększać toksyczność insektycydów wobec pszczoły miodnej [157–161], badania własne nie potwierdziły tego efektu. Interakcje między

poszczególnymi substancjami aktywnymi ŚOR są przedmiotem niewielu badań, jednak zwykle wskazują na możliwość odmiennego ich działania po połączeniu [44, 45, 124, 179].

Nie tylko ŚOR mają wpływ na aktywność enzymatyczną hemolimfy pszczoły miodnej, ponieważ wykazano, że akarycyd bromfenwinfos spowodował zmniejszenie aktywności ALP, ALT i AST w hemolimfie pszczół powyżej 7 dnia życia. U pszczół jednodniowych aktywność enzymów nie różniła się od grupy kontrolnej [49]. Antybiotyk amfoterycyna B spowodował znaczny spadek aktywności ALT, ALP, AST w hemolimfie pszczół robotnic w wieku 7, 14 i 21 dni (wyj. ALP 7 dni – wzrost). U pszczół jednodniowych nie zaobserwowano podobnego efektu, aktywność enzymów nie różniła się od grupy kontrolnej [48]. Podawanie jednodniowym pszczołom kofeiny spowodowało wzrost aktywności ALP, ALT, AST w hemolimfie [177]. U pszczół otrzymujących koenzym Q10 aktywność AST i ALP wzrastała do 26 dnia, a ALT do 30 dnia. W grupie kontrolnej aktywność AST i ALP wzrastała do 22 dnia, a ALT do 26 dnia. Po tym czasie zaobserwowano spadek aktywności enzymów w hemolimfie pszczół robotnic [38]. Pszczoły otrzymujące kurkuminę cechowały się wzmożoną aktywnością ALT, ALP i AST w hemolimfie w porównaniu do grupy kontrolnej [39].

Obniżona aktywność enzymów obserwowana w hemolimfie pszczół miodnych spowodowana niekorzystnymi lub szkodliwymi czynnikami może oznaczać, że uwalnianie AST, ALT, ALP i GGTP było stłumione (supresja lub że szkodliwe czynniki je blokowały, w ten sposób bezpośrednio zmniejszając ich aktywność (hamowanie lub jedno i drugie) [35, 47]. Niższa aktywność tych enzymów u pszczół może zaburzać cykl Krebsa, syntezę ATP, fosforylację oksydacyjną,  $\beta$ -oksydację [180], a także może wskazywać na obecność w diecie zbyt małej ilości białka, które jest niezbędne m.in. w procesie tworzenia tkanek [181].

### 5.2.2 Nieenzymatyczne antyoksydanty (mocznik, kwas moczowy, kreatynina, albuminy)

Z badań, w których analizowano poziom mocznika w hemolimfie pszczoł wynika, że u zdrowych pszczoł do 14 dnia życia poziom mocznika wzrasta, a następnie maleje, średnio wynosi 0,1-2,2 mmol/L [38, 39, 49]. W badaniach własnych stężenie mocznika w hemolimfie pszczoł z grupy kontrolnej wyniosło 0,44 mmol/L (tab. 13.). W badaniach analizujących poziom kwasu moczowego w hemolimfie pszczoł poziom tego wskaźnika wynosił od 51,27 do 1 079  $\mu\text{mol/L}$  [38, 39, 177]. W grupie kontrolnej w badaniach własnych stężenie kwasu moczowego wyniosło 56,67  $\mu\text{mol/L}$ . Analizując literaturę fachową, można stwierdzić, że poziom albumin w hemolimfie pszczoł wynosi 0,2-0,5 g/L i spada wraz z wiekiem [38, 39, 64, 177]. W badaniach własnych stężenie albumin w grupie kontrolnej wyniosło 1,17 g/L. Poziom kreatyniny wzrasta wraz z wiekiem pszczoły miodnej i mieści się w zakresie 33-89  $\mu\text{mol/L}$  [38, 39, 64, 177]. W badaniach własnych stężenie kreatyniny w grupie kontrolnej wyniosło 54,95  $\mu\text{mol/L}$ .

Bardzo istotnym elementem badań własnych była ocena aktywności nieenzymatycznych antyoksydantów. Wykazano, że acetamipryd w stężeniu 250 ppb podawany rodzinom pszczelim nie spowodował statystycznie istotnych zmian w poziomie większości nieenzymatycznych antyoksydantów (tab. 13.). Wyjątek stanowił poziom mocznika, który był istotnie niższy w porównaniu do grupy kontrolnej (o 54,5%). Niestety, nie ma możliwości porównania uzyskanych wyników z danymi literaturowymi ponieważ nie ma dostępnych obecnie informacji na temat wpływu acetamiprydu na poziom nieenzymatycznych antyoksydantów. Natomiast wykazano, że poziom mocznika zmienia się pod wpływem leków weterynaryjnych i substancji stymulujących. W badaniach Stracheckiej i wsp. [49] poziom mocznika u pszczoł narażonych na bromfenwinfos obniżył się istotnie (trzykrotnie w hemolimfie pszczoł powyżej 7 dnia życia. U pszczoł jednodniowych poziom mocznika nie różnił się od kontroli [49]. Po podaniu substancji stymulujących (koenzym Q10, kofeina, kurkumina), stężenie mocznika w hemolimfie również uległo obniżeniu, odpowiednio u pszczoł powyżej 2, 4 i 7 dnia życia. U pszczoł jednodniowych poziom mocznika nie różnił się od kontroli [38, 39, 177]. Z kolei u pszczoł pod wpływem stresu związanego ze zbyt wysoką temperaturą poziom mocznika wzrósł [54]. Glifosat w badaniach własnych w stężeniu 7200 ppb nie wpłynął istotnie na poziom żadnego z analizowanych wskaźników. W badaniach Helmet i wsp. [152] pszczoły otrzymujące syrop z dodatkiem z glifosatu (1,25; 2,50 i 5,0 ng/pszczołę) cechowały się obniżoną zawartością  $\beta$ -karotenu mającego działanie

antyoksydacyjne [152]. Tebukonazol w badaniach własnych podawany pszczołom w stężeniu 147 ppb spowodował niemalże dwukrotny wzrost stężenia kwasu moczowego w hemolimfie robotnic pszczoły miodnej oraz obniżył poziom kreatyniny i mocznika w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio o 21,5% i 40,9%). Odmienne wyniki uzyskano w badaniach Stracheckiej i wsp. [38, 39, 186] - poziom kwasu moczowego w hemolimfie pszczół wzrósł pod wpływem kurkuminy, kofeiny i koenzymu Q10. Z kolei stężenie albumin istotnie obniżyło się pod wpływem kurkuminy u pszczół skarmianych syropem z dodatkiem tej substancji powyżej 7 dni. Poziom albumin spadł również u pszczół otrzymujących kofeinę (bez względu na wiek oraz koenzym Q10 (u pszczół skarmianych powyżej 2 dni [38, 39, 177]. Poziom kreatyniny w hemolimfie pszczół spadł pod wpływem bromfenwinfosu, kurkuminy, koenzymu Q10 i kofeiny [38, 39, 49, 177].

W badaniach własnych mieszaniny dwuskładnikowe oraz mieszanina trójskładnikowa ŚOR nie wpłynęły istotnie na poziom żadnego z analizowanych nieenzymatycznych antyoksydantów.

Zaburzony poziom kreatyniny może oznaczać zwiększoną pracę mięśni lub wzmożony metabolizm białek [182]. Kreatynina jest produktem rozpadu fosfokreatyny występującej w tkance mięśniowej. Wskaźnik ten charakteryzuje wzmożoną aktywność organizmu i jest uwalniany w stałym tempie. Kwas moczowy, podobnie jak mocznik, jest produktem końcowym metabolizmu azotu [61]. Dowiedziono, że u niektórych owadów mogą również powstawać jako produkty końcowe metabolizmu białek, a ich poziom może zostać zaburzony w wyniku niedożywienia czy głodu [183, 184].

### 5.2.3 TAS

Działanie enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów sumuje się, co stanowi o całkowitym potencjale antyoksydacyjnym ustroju organizmu [185]. Jedną z miar antyoksydacyjnych zdolności organizmu jest całkowity status antyoksydacyjny (TAS) [36]. TAS nie różnił się statystycznie istotnie pomiędzy grupą pszczół narażonych na ŚOR a grupą kontrolną (tab. 13.). W większości grup ŚOR spowodowały spadek TAS, jedynie w grupie T można zauważyć wzrost w porównaniu z grupą kontrolną.

## 6. Podsumowanie

Pszczoła miodna przemierzając środowisko w poszukiwaniu źródeł pokarmu, wystawiana jest na wiele zagrożeń, w tym na działanie środków ochrony roślin, patogenów, pasożytów, drapieżników czy pola elektromagnetycznego [30, 34]. Część z tych stresorów zagraża jedynie zbieraczkom w środowisku, a część z nich może być przez nie transportowana do ula i oddziaływać na całą rodzinę pszczelą. Gdy ŚOR zostanie przeniesiony do ula, jego wpływ na społeczność pszczelą w dużym stopniu zależy od budowy chemicznej, substancji aktywnej czy stężenia. Badania własne przeprowadzono z wykorzystaniem bardzo niskich stężeń, które realnie zagrażają pszczole miodnej w środowisku podczas pobierania nektaru czy pyłku. Interesujący jest fakt, że przy tak niskich stężeniach ŚOR, jakie zostały wykorzystane w pracy, odnotowano zmiany. Pierwsze oznaki oddziaływania tych substancji są trudne do zaobserwowania, ponieważ badane ŚOR i ich mieszaniny nie wpłynęły na analizowane parametry kondycyjne i wydajnościowe rodzin pszczelich, a uwidoczniły się w zmianie aktywności lub poziomie wskaźników biochemicznych. Ocena zarówno wpływu pojedynczych ŚOR, jak i ich mieszanin na rodziny pszczoły pokazała, że reakcja poszczególnych społeczności pszczelich oraz ich tolerancja na substancje toksyczne jest bardzo zróżnicowana. Środki ochrony roślin po połączeniu wykazywały odmienne działanie. Zauważyć można, że w wielu przypadkach zmiana poziomu wskaźników biochemicznych różniła się istotnie statystycznie między pojedynczymi środkami a ich mieszaninami (tab. 13., wyk. 2-10). Substancje aktywne w zależności od połączenia wpłynęły odmiennie na poziom analizowanych wskaźników. Glifosat w mieszaninie z acetamiprydem zwiększył aktywność ALP i GGTP, natomiast w połączeniu z tebukonazolem zmniejszył (wyk. 3. i 4). Z kolei tebukonazol w połączeniu z acetamiprydem zmniejszył aktywność AST, a zwiększył w połączeniu z glifosatem (wyk. 2. i 4.).

Literatura wskazuje negatywny wpływ insektycydów, które stwarzają największe zagrożenie dla pojedynczych osobników oraz rodzin pszczelich, ponieważ są przeznaczone do likwidowania owadów. Obecne, choć nie w tak szerokim zakresie, jak w przypadku insektycydów, są również badania dotyczące herbicydów. Pszczoły miodne mogą być narażone na ich działanie podczas pracy na roślinach kwitnących podczas oprysków [9]. Wyniki badań zarówno w przypadku insektycydów, jak i herbicydów, różnią się w zależności od ich rodzaju (badania laboratoryjne lub polowe) [10, 11, 99, 118]. W literaturze nie są dostępne dane na temat wpływu fungicydów na analizowane w badaniach własnych wskaźniki. Zakłada się, że pszczoły są narażone na ŚOR z tej grupy w niewielkim stopniu, choć badania pozostałości



ŚOR w pyłku i nektarze wskazują na ich obecność [17–19, 21, 22]. Dodatkowo, wiele fungicydów, w tym z grupy chemicznej triazoli, do której należy badany w niniejszej pracy tebukonazol, jest uznawana za nietoksyczne względem pszczoły miodnej [186]. Badania pozostałości tebukonazolu w tkankach pszczoły miodnej sugerują jednak, że może on przenikać przez kutikulę i oddziaływać na fizjologię organizmu owada [161]. Badania własne wykazały, że tebukonazol wpłynął na zmiany aktywności lub poziomie wskaźników biochemicznych, co stwarza przestrzeń do dalszych badań w tym zakresie. Okazuje się, że badanie wpływu fungicydów, obok insektycydów i herbicydów, jest również ważnym elementem oceny zagrożeń w środowisku życia pszczoły miodnej. Wyniki badań własnych uzupełniają lukę dotyczącą badania porównawczego wpływu pojedynczych substancji oraz ich mieszanin z trzech najpopularniejszych grup pestycydów (fungicydów, herbicydów i insektycydów). Badania własne skłaniają do dalszego analizowania wpływu ŚOR w takim układzie doświadczalnym przy zastosowaniu innych stężeń oraz ŚOR, które występują w źródłach pokarmu pszczoły miodnej. Wyniki badań z wykorzystaniem niskich stężeń ŚOR podkreślają, jak ważne jest przestrzeganie przepisów oraz wytycznych i ograniczeń dotyczących stosowania ŚOR.

## 7. Wnioski

- I. Środki ochrony roślin w niskich stężeniach stosowane pojedynczo oraz ich mieszaniny, spowodowały zmiany w poziomie lub aktywności badanych wskaźników biochemicznych robotnic, jednak nie odnotowano ich wpływu na zmianę kondycji rodzin pszczoł.
- II. Środki ochrony roślin zastosowane pojedynczo oraz w mieszaninach charakteryzowały się odmiennym wpływem na poziom i aktywność badanych wskaźników biochemicznych hemolimfy pszczoł.
- III. Tebukonazol (fungicyd) zastosowany pojedynczo spowodował zmiany w poziomie lub aktywności większości badanych wskaźników biochemicznych hemolimfy pszczoł.
- IV. Acetamipryd (insektycyd) zastosowany pojedynczo wpłynął istotnie jedynie na obniżenie poziomu mocznika w hemolimfie pszczoł robotnic.
- V. Glifosat (herbicyd) zastosowany pojedynczo nie wpłynął istotnie na poziom lub aktywność żadnego z analizowanych wskaźników biochemicznych.
- VI. Substancje aktywne w zależności od połączenia w mieszaninie wpłynęły odmiennie na poziom analizowanych wskaźników:
  - glifosat w mieszaninie z acetamiprydem zwiększył aktywność fosfatazy alkalicznej i gamma-glutamylotranspeptydazy, a w połączeniu z tebukonazolem zmniejszył ich aktywność,
  - tebukonazol w połączeniu z acetamiprydem zmniejszył aktywność aminotransferazy asparaginowej, a zwiększył jej aktywność w połączeniu z glifosatem.

## 8. Spis piśmiennictwa

Numeracja pozycji w spisie piśmiennictwa według kolejności cytowania w tekście.

- [1] Yadav I, Devi N. Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. 2017.
- [2] Peshin R, Bandral RS, Zhang W, Wilson L, Dhawan AK. Integrated Pest Management: A Global Overview of History, Programs and Adoption. In: Integrated Pest Management: Innovation-Development Process. Dordrecht: Springer Netherlands; 2009. p. 1–49. doi:10.1007/978-1-4020-8992-3\_1
- [3] Razaq M, Shah FM, Ahmad S, Afzal M. Pest Management for Agronomic Crops. In: Agronomic Crops. Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 365–384. doi:10.1007/978-981-32-9783-8\_18
- [4] Carlile B. Pesticide selectivity, health and the environment. Cambridge University Press; 2006.
- [5] Diamand E. Breaking the pesticide chain. Pesticide Outlook. 2003;14(4):153. doi:10.1039/b308493k
- [6] Allsopp MH, de Lange WJ, Veldtman R. Valuing Insect Pollination Services with Cost of Replacement. PLoS ONE. 2008;3(9):e3128. doi:10.1371/journal.pone.0003128
- [7] Paleolog J, Wilde J, Miszczak A, Gancarz M, Strachecka A. Antioxidation Defenses of *Apis mellifera* Queens and Workers Respond to Imidacloprid in Different Age-Dependent Ways: Old Queens Are Resistant, Foragers Are Not. Animals. 2021;11(5):1246. doi:10.3390/ani11051246
- [8] Paleolog J, Wilde J, Siuda M, Bąk B, Wójcik Ł, Strachecka A. Imidacloprid markedly affects hemolymph proteolysis, biomarkers, DNA global methylation, and the cuticle proteolytic layer in western honeybees. Apidologie. 2020;51(4):620–630. doi:10.1007/s13592-020-00747-4
- [9] Iwasaki JM, Hogendoorn K. Non-insecticide pesticide impacts on bees: A review of methods and reported outcomes. Agriculture, Ecosystems & Environment. 2021;314:107423. doi:10.1016/j.agee.2021.107423

- [10] Yang Y, Ma S, Liu F, Wang Q, Wang X, Hou C, Wu Y, Gao J, Zhang L, Liu Y, et al. Acute and chronic toxicity of acetamiprid, carbaryl, cypermethrin and deltamethrin to *Apis mellifera* larvae reared *in vitro*. *Pest Management Science*. 2020;76(3):978–985. doi:10.1002/ps.5606
- [11] Battisti L, Potrich M, Sampaio AR, de Castilhos Ghisi N, Costa-Maia FM, Abati R, dos Reis Martinez CB, Sofia SH. Is glyphosate toxic to bees? A meta-analytical review. *Science of The Total Environment*. 2021;767:145397. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145397
- [12] Medrzycki P, Giffard H, Aupinel P, Belzunces LP, Chauzat MP, Claßen C, Colin ME, Dupont T, Girolami V, Johnson R, et al. Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 2013;52(4). doi:10.3896/IBRA.1.52.4.14
- [13] Tang FHM, Lenzen M, McBratney A, Maggi F. Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nature Geoscience*. 2021;14(4):206–210. doi:10.1038/s41561-021-00712-5
- [14] Bonmatin JM, Moineau I, Charvet R, Fleche C, Colin ME, Bengsch ER. A LC/APCI-MS/MS Method for Analysis of Imidacloprid in Soils, in Plants, and in Pollens. *Analytical Chemistry*. 2003;75(9):2027–2033. doi:10.1021/ac020600b
- [15] Schmuck R, Schöning R, Stork A, Schramel O. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Management Science*. 2001;57(3):225–238. doi:10.1002/ps.270
- [16] Decourtye A, Devillers J. Ecotoxicity of Neonicotinoid Insecticides to Bees. 2010. p. 85–95. doi:10.1007/978-1-4419-6445-8\_8
- [17] Vargas-Valero Azucena, Reyes-Carrillo José, Moreno-Reséndez Alejandro, Véliz-Deras Francisco, Gaspar-Ramírez Octavio, Rodríguez-Martínez Rafael. Residuos de plaguicidas en miel y cera de colonias de abejas de La Comarca Lagunera. *Abanico Veterinario*. 2020;10(1). doi:10.21929/abavet2020.7
- [18] Saitta M, di Bella G, Fede MR, lo Turco V, Potorti AG, Rando R, Russo MT, Dugo G. Gas chromatography-tandem mass spectrometry multi-residual analysis of contaminants in Italian honey samples. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2017 Feb 20:1–9. doi:10.1080/19440049.2017.1292054
- [19] Beyer M, Lenouvel A, Guignard C, Eickermann M, Clermont A, Kraus F, Hoffmann L. Pesticide residue profiles in bee bread and pollen samples and the survival of honeybee

colonies—a case study from Luxembourg. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018;25(32):32163–32177. doi:10.1007/s11356-018-3187-4

[20] Berg CJ, King HP, Delenstarr G, Kumar R, Rubio F, Glaze T. Glyphosate residue concentrations in honey attributed through geospatial analysis to proximity of large-scale agriculture and transfer off-site by bees. *PLOS ONE*. 2018;13(7):e0198876. doi:10.1371/journal.pone.0198876

[21] Sanchez-Bayo F, Goka K. Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e94482. doi:10.1371/journal.pone.0094482

[22] El-Nahhal Y. Pesticide residues in honey and their potential reproductive toxicity. *Science of The Total Environment*. 2020;741:139953. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139953

[23] Karise R, Raimets R, Bartkevics V, Pugajeva I, Pihlik P, Keres I, Williams IH, Viinalass H, Mänd M. Are pesticide residues in honey related to oilseed rape treatments? *Chemosphere*. 2017;188:389–396. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.09.013

[24] Calatayud-Vernich P, Calatayud F, Simó E, Picó Y. Pesticide residues in honey bees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure. *Environmental Pollution*. 2018;241:106–114. doi:10.1016/j.envpol.2018.05.062

[25] Zioga E, Kelly R, White B, Stout JC. Plant protection product residues in plant pollen and nectar: A review of current knowledge. *Environmental Research*. 2020;189:109873. doi:10.1016/j.envres.2020.109873

[26] Friedle C, Wallner K, Rosenkranz P, Martens D, Vetter W. Pesticide residues in daily bee pollen samples (April–July) from an intensive agricultural region in Southern Germany. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021;28(18):22789–22803. doi:10.1007/s11356-020-12318-2

[27] Wu JY, Anelli CM, Sheppard WS. Sub-Lethal Effects of Pesticide Residues in Brood Comb on Worker Honey Bee (*Apis mellifera*) Development and Longevity. *PLoS ONE*. 2011;6(2):e14720. doi:10.1371/journal.pone.0014720

[28] Pettis J. Overview of the Honey Bee. In: *Pesticide Risk Assessment for Pollinators*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2014. p. 3–4. doi:10.1002/9781118852408.ch2

- [29] Farooqui T. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. *Neurochemistry International*. 2013;62(1):122–136. doi:10.1016/j.neuint.2012.09.020
- [30] Genersch E. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;87(1):87–97. doi:10.1007/s00253-010-2573-8
- [31] de la Rúa P, Jaffé R, Dall’Olio R, Muñoz I, Serrano J. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*. 2009;40(3):263–284. doi:10.1051/apido/2009027
- [32] Migdał P, Murawska A, Strachecka A, Bieńkowski P, Roman A. Changes in the Honeybee Antioxidant System after 12 h of Exposure to Electromagnetic Field Frequency of 50 Hz and Variable Intensity. *Insects*. 2020;11(10):713. doi:10.3390/insects11100713
- [33] Vanbergen AJ, Initiative the IP. Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 2013;11(5):251–259. doi:10.1890/120126
- [34] Strachecka A, Łoś A, Filipczuk J, Schulz M. Individual and social immune mechanisms of the honey bee. *Medycyna Weterynaryjna*. 2018;74(7):426–433. doi:10.21521/mw.6013
- [35] Łoś A, Strachecka A. Fast and Cost-Effective Biochemical Spectrophotometric Analysis of Solution of Insect “Blood” and Body Surface Elution. *Sensors*. 2018;18(5):1494. doi:10.3390/s18051494
- [36] Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 2004;37(4):277–285. doi:10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015
- [37] Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 1996;239(1):70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292
- [38] Strachecka A, Olszewski K, Paleolog J, Borsuk G, Bajda M, Krauze M, Merska M, Chobotow J. Coenzyme Q10 treatments influence the lifespan and key biochemical resistance systems in the honeybee *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 2014;86(3):165–179. doi:10.1002/arch.21159

- [39] Strachecka A, Olszewski K, Paleolog J. Curcumin Stimulates Biochemical Mechanisms of *Apis Mellifera* Resistance and Extends the Apian Life-Span. *Journal of Apicultural Science*. 2015;59(1):129–141. doi:10.1515/jas-2015-0014
- [40] Migdał P, Roman A, Strachecka A, Murawska A, Bieńkowski P. Changes of selected biochemical parameters of the honeybee under the influence of an electric field at 50 Hz and variable intensities. *Apidologie*. 2020;51(6):956–967. doi:10.1007/s13592-020-00774-1
- [41] Farjan M, Dmitryjuk M, Lipiński Z, Biernat-Łopieńska E, Żółtowska K. Supplementation of the honey bee diet with vitamin C: The effect on the antioxidative system of *Apis mellifera carnica* brood at different stages. *Journal of Apicultural Research*. 2012;51(3):263–270. doi:10.3896/IBRA.1.51.3.07
- [42] Feng M, Ramadan H, Han B, Fang Y, Li J. Hemolymph proteome changes during worker brood development match the biological divergences between western honey bees (*Apis mellifera*) and eastern honey bees (*Apis cerana*). *BMC Genomics*. 2014;15(1):563. doi:10.1186/1471-2164-15-563
- [43] Chan QWT, Howes CG, Foster LJ. Quantitative Comparison of Caste Differences in Honeybee Hemolymph. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2006;5(12):2252–2262. doi:10.1074/mcp.M600197-MCP200
- [44] Zhu YC, Yao J, Adamczyk J, Luttrell R. Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PLOS ONE*. 2017;12(5):e0176837. doi:10.1371/journal.pone.0176837
- [45] Almasri H, Tavares DA, Pioz M, Sené D, Tchamitchian S, Cousin M, Brunet J-L, Belzunces LP. Mixtures of an insecticide, a fungicide and a herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020;203:111013. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111013
- [46] Almasri H, Tavares DA, Diogon M, Pioz M, Alamil M, Sené D, Tchamitchian S, Cousin M, Brunet J-L, Belzunces LP. Physiological effects of the interaction between *Nosema ceranae* and sequential and overlapping exposure to glyphosate and difenoconazole in the honey bee *Apis mellifera*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021;217:112258. doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112258
- [47] Bounias M, Dujin N, Popesković DS. Sublethal effects of a synthetic pyrethroid, deltamethrin, on the glycemia, the lipemia, and the gut alkaline phosphatases of honeybees.

Pesticide Biochemistry and Physiology. 1985;24(2):149–160. doi:10.1016/0048-3575(85)90124-5

[48] Bajda M, Łoś A, Merska M. Effect of amphotericin B on the biochemical markers in the haemolymph of honey bees. *Medycyna Weterynaryjna*. 2014;70(12):766–769.

[49] Strachecka A, Olszewski K, Paleolog J. Varroa treatment with bromfenvinphos markedly suppresses honeybee biochemical defence levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2016;160(1):57–71. doi:10.1111/eea.12451

[50] Renzi MT, Amichot M, Pauron D, Tchamitchian S, Brunet J-L, Kretzschmar A, Maini S, Belzunces LP. Chronic toxicity and physiological changes induced in the honey bee by the exposure to fipronil and *Bacillus thuringiensis* spores alone or combined. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2016;127:205–213. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.01.028

[51] Badiou-Bénéteau A, Carvalho SM, Brunet J-L, Carvalho GA, Buleté A, Giroud B, Belzunces LP. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2012;82:22–31. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.05.005

[52] Shimamura Y, Takeuchi I, Terada H, Makino K. Therapeutic Effect of GGsTop, Selective Gamma-glutamyl Transpeptidase Inhibitor, on a Mouse Model of 5-Fluorouracil-induced Oral Mucositis. *Anticancer Research*. 2019;39(1):201–206. doi:10.21873/anticancer.13098

[53] Sugeçti Serkan KB. Effects of Oxfendazole on Metabolic Enzymes in Hemolymph of *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera: Pyralidae) Larvae Reared on Artificial Diet. *Karaelmas Science & Engineering Journal* . 2018;8(2).

[54] Şapcaliu A, Pavel C, Savu V, Căuia E, Matei M, Rădoi I. Biochemical and Cytological Investigations on Haemolymph of *Apis Mellifera* Carpathica Bee in Stressful Conditions. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*. 2010;67(2).

[55] Lee D-H, Jacobs DR. Is serum gamma-glutamyltransferase a marker of exposure to various environmental pollutants? *Free Radical Research*. 2009;43(6):533–537. doi:10.1080/10715760902893324



- [56] Zhang H, Forman HJ. Redox Regulation of  $\gamma$ -Glutamyl Transpeptidase. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2009;41(5):509–515. doi:10.1165/rcmb.2009-0169TR
- [57] Pompella A, Corti A, Paolicchi A, Giommarelli C, Zunino F.  $\gamma$ -Glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance. *Current Opinion in Pharmacology*. 2007;7(4):360–366. doi:10.1016/j.coph.2007.04.004
- [58] Perry IJ, Wannamethee SG, Shaper AG. Prospective Study of Serum  $\gamma$ -Glutamyltransferase and Risk of NIDDM. *Diabetes Care*. 1998;21(5):732–737. doi:10.2337/diacare.21.5.732
- [59] Dominici S, Paolicchi A, Lorenzini E, Maellaro E, Comporti M, Pieri L, Minotti G, Pompella A.  $\gamma$ -Glutamyltransferase-dependent prooxidant reactions: A factor in multiple processes. *BioFactors*. 2003;17(1–4):187–198. doi:10.1002/biof.5520170118
- [60] Dominici S, Paolicchi A, Corti A, Maellaro E, Pompella A. Prooxidant Reactions Promoted by Soluble and Cell-Bound  $\gamma$ -Glutamyltransferase Activity. 2005. p. 484–501. doi:10.1016/S0076-6879(05)01029-3
- [61] Bursell E. The Excretion of Nitrogen in Insects. *Advances in Insect Physiology*. 1967:33–67. doi:10.1016/S0065-2806(08)60207-6
- [62] Cochran DG. Nitrogen Excretion in Cockroaches. *Annual Review of Entomology*. 1985;30(1):29–49. doi:10.1146/annurev.en.30.010185.000333
- [63] Wyatt GR. The biochemistry of insect hemolymph. *Annual review of entomology*. 1961;6:75–102.
- [64] Migdał P, Murawska A, Bieńkowski P, Strachecka A, Roman A. Effect of the electric field at 50 Hz and variable intensities on biochemical markers in the honey bee's hemolymph. *PLOS ONE*. 2021;16(6):e0252858. doi:10.1371/journal.pone.0252858
- [65] Suljević D, Muhić A, Islamagić E, Fočak M. Temporal dependence between hibernation and post-hibernation period according to biochemical profile of hemolymph in *Helix pomatia* Linnaeus, 1758. *Acta Biologica Szegediensis*. 2017;61(2):29–134.
- [66] Goblirsch M, Warner JF, Sommerfeldt BA, Spivak M. Social Fever or General Immune Response? Revisiting an Example of Social Immunity in Honey Bees. *Insects*. 2020;11(8):528. doi:10.3390/insects11080528

- [67] Fratini F, Cilia G, Turchi B, Felicioli A. Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016;9(9):839–843. doi:10.1016/j.apjtm.2016.07.003
- [68] El-Seedi H, Abd El-Wahed A, Yosri N, Musharraf SG, Chen L, Moustafa M, Zou X, Al-Mousawi S, Guo Z, Khatib A, et al. Antimicrobial Properties of *Apis mellifera*'s Bee Venom. *Toxins*. 2020;12(7):451. doi:10.3390/toxins12070451
- [69] Didaras NA, Karatasou K, Dimitriou TG, Amoutzias GD, Mossialos D. Antimicrobial Activity of Bee-Collected Pollen and Beebread: State of the Art and Future Perspectives. *Antibiotics*. 2020;9(11):811. doi:10.3390/antibiotics9110811
- [70] Israili ZH. Antimicrobial Properties of Honey. *American Journal of Therapeutics*. 2014;21(4):304–323. doi:10.1097/MJT.0b013e318293b09b
- [71] Bastos EMAF, Simone M, Jorge DM, Soares AEE, Spivak M. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2008;97(3):273–281. doi:10.1016/j.jip.2007.10.007
- [72] Bienefeld K, Zautke F, Gupta P. A novel method for undisturbed long-term observation of honey bee (*Apis mellifera*) behavior – illustrated by hygienic behavior towards varroa infestation. *Journal of Apicultural Research*. 2015;54(5):541–547. doi:10.1080/00218839.2016.1174465
- [73] Royce LA, Rossignol PA. Epidemiology of honey bee parasites. *Parasitology Today*. 1990;6(11):348–353. doi:10.1016/0169-4758(90)90411-V
- [74] Baracchi D, Fadda A, Turillazzi S. Evidence for antiseptic behaviour towards sick adult bees in honey bee colonies. *Journal of Insect Physiology*. 2012;58(12):1589–1596. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.09.014
- [75] Zhang ZY, Li Z, Huang Q, Zhang XW, Ke L, Yan WY, Zhang LZ, Zeng ZJ. Deltamethrin Impairs Honeybees (*Apis mellifera*) Dancing Communication. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2020;78(1):117–123. doi:10.1007/s00244-019-00680-3
- [76] Tudi M, Daniel Ruan H, Wang L, Lyu J, Sadler R, Connell D, Chu C, Phung DT. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment.

International Journal of Environmental Research and Public Health. 2021;18(3):1112.  
doi:10.3390/ijerph18031112

[77] Fishel FM, Ferrell JA. Managing Pesticide Drift 1. EDIS. 2010.

[78] Kaur R, Mavi GK, Raghav S, Khan I. Pesticides Classification and its Impact on Environment. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2019;8(03):1889–1897. doi:10.20546/ijcmas.2019.803.224

[79] Kim K-H, Kabir E, Jahan SA. Exposure to pesticides and the associated human health effects. Science of The Total Environment. 2017;575:525–535. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.09.009

[80] Naumann K. Synthetic Pyrethroid Insecticides: Chemistry and Patents. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1990. doi:10.1007/978-3-642-74852-3

[81] Popp J, Petó K, Nagy J. Pesticide productivity and food security. A review. Agronomy for Sustainable Development. 2013;33(1):243–255. doi:10.1007/s13593-012-0105-x

[82] FAO. World Summit on Food Security Declaration Of The World Summit On Food Security. 2009.

[83] Oerke E. Crop losses to pests. The Journal of Agricultural Science. 2006;144(1):31–43. doi:10.1017/S0021859605005708

[84] Dai J, Dong H. Intensive cotton farming technologies in China: Achievements, challenges and countermeasures. Field Crops Research. 2014;155:99–110. doi:10.1016/j.fcr.2013.09.017

[85] FAO. FAOSTAT Analytical Brief 16 Pesticides use Global, regional and country trends. 1990.

[86] Sparks TC, Bryant RJ. Crop protection compounds – trends and perspective. Pest Management Science. 2021;77(8):3608–3616. doi:10.1002/ps.6293

[87] Gianessi LP, Reigner N. The importance of fungicides In U.S. Crop Production September 2005. Outlooks on Pest Management. 2006;17(5):209–213. doi:doi:10.1564/17oct06

[88] Gianessi L, Reigner N. The value of herbicides in U.S. crop production. Weed Technology. 2006;21(2):559–566. doi:doi:10.1614/WT-06-130.1

- [89] Dworżańska D, Moores G, Zamojska J, Strażyński P, Węgorzek P. The influence of acetamiprid and deltamethrin on the mortality and behaviour of honeybees (*Apis mellifera carnica* Pollman) in oilseed rape cultivations. *Apidologie*. 2020;51(6):1143–1154. doi:10.1007/s13592-020-00792-z
- [90] Wen X, Ma C, Sun M, Wang Y, Xue X, Chen J, Song W, Li-Byarlay H, Luo S. Pesticide residues in the pollen and nectar of oilseed rape (*Brassica napus* L.) and their potential risks to honey bees. *Science of The Total Environment*. 2021;786:147443. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.147443
- [91] Wang Y, Zhu YC, Li W. Interaction patterns and combined toxic effects of acetamiprid in combination with seven pesticides on honey bee (*Apis mellifera* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020;190:110100. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.110100
- [92] Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delègue M-H. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2004;57(3):410–419. doi:10.1016/j.ecoenv.2003.08.001
- [93] Migdał P, Roman A, Popiela-Pleban E, Kowalska-Góralaska M, Opaliński S. The Impact of Selected Pesticides on Honey Bees. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2018;27(2):787–792. doi:10.15244/pjoes/74154
- [94] Grünewald B, Siefert P. Acetylcholine and Its Receptors in Honeybees: Involvement in Development and Impairments by Neonicotinoids. *Insects*. 2019;10(12):420. doi:10.3390/insects10120420
- [95] Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J-F, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science*. 2012;336(6079):348–350. doi:10.1126/science.1215039
- [96] Yang EC, Chuang YC, Chen YL, Chang LH. Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*. 2008;101(6):1743–1748. doi:10.1603/0022-0493-101.6.1743
- [97] Bortolotti L, Montanari R, Marcelino J, Medrzycki P, Maini S, Porrini C. Effects of sublethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology*. 2003;56(1):63–67.

- [98] Shi J, Yang H, Yu L, Liao C, Liu Y, Jin M, Yan W, Wu XB. Sublethal acetamiprid doses negatively affect the lifespans and foraging behaviors of honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. *Science of The Total Environment*. 2020;738:139924. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139924
- [99] Abdel-Kader SAS, M.F. Abdel-Lateef, A.E. Abdelmonem, A.D.M. Yousif. Effect of Sub-Lethal Concentrations of the Insecticides Imidacloprid, Acetamiprid, Thiametoxam and Deltamethrin on the Foraging Behavior of Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Middle East Journal of Agriculture Research*. 2017;06(02):323–329.
- [100] Dai P-L, Wang Q, Sun J-H, Liu F, Wang X, Wu Y-Y, Zhou T. Effects of sublethal concentrations of bifenthrin and deltamethrin on fecundity, growth, and development of the honeybee *Apis mellifera ligustica*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2010;29(3):644–649. doi:10.1002/etc.67
- [101] Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test. OECD. 1998. doi:https://doi.org/10.1787/20745761
- [102] Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. OECD; 1998. doi:10.1787/9789264070165-en
- [103] EPPO. Efficacy evaluation of plant protection products. Side-effects on honeybees. *Bulletin OEPP/EPPO*. 2000;40:313–319.
- [104] OECD. Guidance Document on the Honey Bee (*Apis Mellifera*. L.) Brood test Under Semi-field Conditions. 2007.
- [105] Faucon J-P, Aurières C, Drajnudel P, Mathieu L, Ribière M, Martel A-C, Zeggane S, Chauzat M-P, Aubert MF. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Pest Management Science*. 2005;61(2):111–125. doi:10.1002/ps.957
- [106] Jeschke P, Nauen R. Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science*. 2008;64(11):1084–1098. doi:10.1002/ps.1631
- [107] Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*. 2004;23(5):371–378. doi:10.1016/j.cropro.2003.08.018

- [108] Pereira NC, Diniz TO, Takasusuki M. Sublethal effects of neonicotinoids in bees: a review. *Scientific Electronic Archives*. 2020;13(7):142. doi:10.36560/13720201120
- [109] Gawel M, Kiljanek T, Niewiadowska A, Semeniuk S, Goliszek M, Burek O, Posyniak A. Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2019;282:36–47. doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.003
- [110] Gierer F, Vaughan S, Slater M, Thompson HM, Elmore JS, Girling RD. A review of the factors that influence pesticide residues in pollen and nectar: Future research requirements for optimising the estimation of pollinator exposure. *Environmental Pollution*. 2019;249:236–247. doi:10.1016/j.envpol.2019.03.025
- [111] Pohorecka K, Skubida P, Miszczak A, Semkiw P, Sikorski P, Zagibajło K, Teper D, Kołtowski Z, Skubida M, Zdańska D, et al. Residues of Neonicotinoid Insecticides in Bee Collected Plant Materials from Oilseed Rape Crops and their Effect on Bee Colonies. *Journal of Apicultural Science*. 2012;56(2):115–134. doi:10.2478/v10289-012-0029-3
- [112] Fischer J, Müller T, Spatz A-K, Greggers U, Grünewald B, Menzel R. Neonicotinoids Interfere with Specific Components of Navigation in Honeybees. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e91364. doi:10.1371/journal.pone.0091364
- [113] Kessler SC, Tiedeken EJ, Simcock KL, Derveau S, Mitchell J, Softley S, Radcliffe A, Stout JC, Wright GA. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature*. 2015;521(7550):74–76. doi:10.1038/nature14414
- [114] Badawy MEI, Nasr HM, Rabea EI. Toxicity and biochemical changes in the honey bee *Apis mellifera* exposed to four insecticides under laboratory conditions. *Apidologie*. 2015;46(2):177–193. doi:10.1007/s13592-014-0315-0
- [115] Brunet J-L, Badiou A, Belzunces LP. In vivo metabolic fate of [14C]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Pest Management Science*. 2005;61(8):742–748. doi:10.1002/ps.1046
- [116] Shi J, Liao C, Wang Z, Zeng Z, Wu X. Effects of sublethal acetamiprid doses on the lifespan and memory-related characteristics of honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie*. 2019;50(4):553–563. doi:10.1007/s13592-019-00669-w

- [117] Shi J, Zhang R, Pei Y, Liao C, Wu X. Exposure to acetamiprid influences the development and survival ability of worker bees (*Apis mellifera* L.) from larvae to adults. *Environmental Pollution*. 2020;266:115345. doi:10.1016/j.envpol.2020.115345
- [118] Chen L, Yan Q, Zhang J, Yuan S, Liu X. Joint Toxicity of Acetamiprid and Co-Applied Pesticide Adjuvants on Honeybees under Semifield and Laboratory Conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2019;38(9):1940–1946. doi:10.1002/etc.4515
- [119] Schmuck R, Stadler T, Schmidt H-W. Field relevance of a synergistic effect observed in the laboratory between an EBI fungicide and a chloronicotinyl insecticide in the honeybee (*Apis mellifera* L, Hymenoptera). *Pest Management Science*. 2003;59(3):279–286. doi:10.1002/ps.626
- [120] el Hassani AK, Dacher M, Gary V, Lambin M, Gauthier M, Armengaud C. Effects of Sublethal Doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the Behavior of the Honeybee (*Apis mellifera*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2008;54(4):653–661. doi:10.1007/s00244-007-9071-8
- [121] Thany S, Bourdin C, Graton J, Laurent A, Mathé-Allainmat M, Lebreton J, le Questel J-Y. Similar Comparative Low and High Doses of Deltamethrin and Acetamiprid Differently Impair the Retrieval of the Proboscis Extension Reflex in the Forager Honey Bee (*Apis mellifera*). *Insects*. 2015;6(4):805–814. doi:10.3390/insects6040805
- [122] Takeda K. Classical conditioned response in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*. 1961;6(3):168–179. doi:10.1016/0022-1910(61)90060-9
- [123] Aliouane Y, el Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M, Gauthier M. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2009;28(1):113. doi:10.1897/08-110.1
- [124] Christen V, Bachofer S, Fent K. Binary mixtures of neonicotinoids show different transcriptional changes than single neonicotinoids in honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Pollution*. 2017;220:1264–1270. doi:10.1016/j.envpol.2016.10.105
- [125] Richmond ME. Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. *Journal of Environmental Studies and Sciences*. 2018;8(4):416–434. doi:10.1007/s13412-018-0517-2

- [126] Green JM. The rise and future of glyphosate and glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science*. 2018;74(5):1035–1039. doi:10.1002/ps.4462
- [127] van Bruggen AHC, He MM, Shin K, Mai V, Jeong KC, Finckh MR, Morris JG. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of The Total Environment*. 2018;616–617:255–268. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.10.309
- [128] Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*. 2016;28(1):3. doi:10.1186/s12302-016-0070-0
- [129] Gill JPK, Sethi N, Mohan A, Datta S, Girdhar M. Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*. 2018;16(2):401–426. doi:10.1007/s10311-017-0689-0
- [130] Meftaul Imd, Venkateswarlu K, Dharmarajan R, Annamalai P, Asaduzzaman M, Parven A, Megharaj M. Controversies over human health and ecological impacts of glyphosate: Is it to be banned in modern agriculture? *Environmental Pollution*. 2020;263:114372. doi:10.1016/j.envpol.2020.114372
- [131] Odemer R, Alkassab AT, Bischoff G, Frommberger M, Wernecke A, Wirtz IP, Pistorius J, Odemer F. Chronic High Glyphosate Exposure Delays Individual Worker Bee (*Apis mellifera* L.) Development under Field Conditions. *Insects*. 2020;11(10):664. doi:10.3390/insects11100664
- [132] Thompson HM, Levine SL, Doering J, Norman S, Manson P, Sutton P, von Mérey G. Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (*Apis mellifera*) development using glyphosate as an example. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 2014;10(3):463–470. doi:10.1002/ieam.1529
- [133] Thompson TS, van den Heever JP, Limanowka RE. Determination of glyphosate, AMPA, and glufosinate in honey by online solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2019;36(3):434–446. doi:10.1080/19440049.2019.1577993
- [134] Abraham J, Benhotons GS, Krampah I, Tagba J, Amissah C, Abraham JD. Commercially formulated glyphosate can kill non-target pollinator bees under laboratory conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2018;166(8):695–702. doi:10.1111/eea.12694



- [135] Dai P, Yan Z, Ma S, Yang Y, Wang Q, Hou C, Wu Y, Liu Y, Diao Q. The Herbicide Glyphosate Negatively Affects Midgut Bacterial Communities and Survival of Honey Bee during Larvae Reared in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66(29):7786–7793. doi:10.1021/acs.jafc.8b02212
- [136] Vázquez DE, Iliina N, Pagano EA, Zavala JA, Farina WM. Glyphosate affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. *PLOS ONE*. 2018;13(10):e0205074. doi:10.1371/journal.pone.0205074
- [137] Farina WM, Balbuena MS, Herbert LT, Mengoni Goñalons C, Vázquez DE. Effects of the Herbicide Glyphosate on Honey Bee Sensory and Cognitive Abilities: Individual Impairments with Implications for the Hive. *Insects*. 2019;10(10):354. doi:10.3390/insects10100354
- [138] Herbert LH, Vazquez DE, Arenas A, Farina WM. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *Journal of Experimental Biology*. 2014 Jan 1. doi:10.1242/jeb.109520
- [139] Hernández J, Riveros AJ, Amaya-Márquez M. Sublethal doses of glyphosate impair olfactory memory retention, but not learning in the honey bee (*Apis mellifera scutellata*). *Journal of Insect Conservation*. 2021;25(4):683–694. doi:10.1007/s10841-021-00335-6
- [140] Balbuena MS, Tison L, Hahn M-L, Greggers U, Menzel R, Farina WM. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *Journal of Experimental Biology*. 2015;218(17):2799–2805. doi:10.1242/jeb.117291
- [141] Zgurzynski M, Lushington G, Zgurzynski MI, Lushington GH. Glyphosate impact on *Apis mellifera* navigation: a combined behavioral and chemioinformatics study. *EC Pharmacology and Toxicology*. 2019:806–824.
- [142] Mengoni Goñalons C, Farina WM. Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honey bees. *Journal of Experimental Biology*. 2018;221(7). doi:10.1242/jeb.176644
- [143] Luo Q-H, Gao J, Guo Y, Liu C, Ma Y-Z, Zhou Z-Y, Dai P-L, Hou C-S, Wu Y-Y, Diao Q-Y. Effects of a commercially formulated glyphosate solutions at recommended concentrations on honeybee (*Apis mellifera* L.) behaviours. *Scientific Reports*. 2021;11(1):2115. doi:10.1038/s41598-020-80445-4

- [144] Vázquez DE, Latorre-Estivalis JM, Ons S, Farina WM. Chronic exposure to glyphosate induces transcriptional changes in honey bee larva: A toxicogenomic study. *Environmental Pollution*. 2020;261:114148. doi:10.1016/j.envpol.2020.114148
- [145] Zhao H, Li G, Guo D, Wang Y, Liu Q, Gao Z, Wang H, Liu Z, Guo X, Xu B. Transcriptomic and metabolomic landscape of the molecular effects of glyphosate commercial formulation on *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *Science of The Total Environment*. 2020;744:140819. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140819
- [146] Faita MR, Cardozo MM, Amandio DTT, Orth AI, Nodari RO. Glyphosate-based herbicides and *Nosema sp.* microsporidia reduce honey bee (*Apis mellifera* L.) survivability under laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research*. 2020;59(4):332–342. doi:10.1080/00218839.2020.1736782
- [147] Motta EVS, Moran NA. Impact of Glyphosate on the Honey Bee Gut Microbiota: Effects of Intensity, Duration, and Timing of Exposure. *mSystems*. 2020;5(4). doi:10.1128/mSystems.00268-20
- [148] Castelli L, Balbuena S, Branchiccela B, Zunino P, Liberti J, Engel P, Antúnez K. Impact of Chronic Exposure to Sublethal Doses of Glyphosate on Honey Bee Immunity, Gut Microbiota and Infection by Pathogens. *Microorganisms*. 2021;9(4):845. doi:10.3390/microorganisms9040845
- [149] Blot N, Veillat L, Rouzé R, Delatte H. Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. *PLOS ONE*. 2019;14(4):e0215466. doi:10.1371/journal.pone.0215466
- [150] Motta EVS, Raymann K, Moran NA. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(41):10305–10310. doi:10.1073/pnas.1803880115
- [151] Jumarie C, Aras P, Boily M. Mixtures of herbicides and metals affect the redox system of honey bees. *Chemosphere*. 2017;168:163–170. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.10.056
- [152] Helmer SH, Kerbaol A, Aras P, Jumarie C, Boily M. Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Science and Pollution Research*. 2015;22(11):8010–8021. doi:10.1007/s11356-014-2879-7

- [153] Chaves A, Faita MR, Ferreira BL, Poltronieri AS, Nodari RO. Effects of glyphosate-based herbicide on royal jelly production of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in field conditions. *Journal of Apicultural Research*. 2021;60(2):277–279. doi:10.1080/00218839.2020.1844463
- [154] Faita MR, Chaves A, Corrêa CCG, Silveira V, Nodari RO. Proteomic profiling of royal jelly produced by *Apis mellifera* L. exposed to food containing herbicide-based glyphosate. *Chemosphere*. 2022;292:133334. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.133334
- [155] Vázquez DE, Balbuena MS, Chaves F, Gora J, Menzel R, Farina WM. Sleep in honey bees is affected by the herbicide glyphosate. *Scientific Reports*. 2020;10(1):10516. doi:10.1038/s41598-020-67477-6
- [156] Roszko MŁ, Kamińska M, Szymczyk K, Jędrzejczak R. Levels of Selected Persistent Organic Pollutants (PCB, PBDE) and Pesticides in Honey Bee Pollen Sampled in Poland. *PLOS ONE*. 2016;11(12):e0167487. doi:10.1371/journal.pone.0167487
- [157] Johnson RM, Dahlgren L, Siegfried BD, Ellis MD. Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*. 2013;8(1):e54092. doi:10.1371/journal.pone.0054092
- [158] Pilling ED, Jepson PC. Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee *Apis mellifera*. *Pesticide Science*. 1993;39(4):293–297. doi:10.1002/ps.2780390407
- [159] Raimets R, Karise R, Mänd M, Kaart T, Ponting S, Song J, Cresswell JE. Synergistic interactions between a variety of insecticides and an ergosterol biosynthesis inhibitor fungicide in dietary exposures of bumble bees *Bombus terrestris* L.). *Pest Management Science*. 2018;74(3):541–546. doi:10.1002/ps.4756
- [160] Willow J, Silva A, Veromann E, Smagghe G. Acute effect of low-dose thiacloprid exposure synergised by tebuconazole in a parasitoid wasp. *PLOS ONE*. 2019;14(2):e0212456. doi:10.1371/journal.pone.0212456
- [161] Thompson HM, Fryday SL, Harkin S, Milner S. Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. *Apidologie*. 2014;45(5):545–553. doi:10.1007/s13592-014-0273-6

- [162] Song Y, Shi J, Xiong Z, Shentu X, Yu X. Three antimicrobials alter gut microbial communities and causing different mortality of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2021;174:104806. doi:10.1016/j.pestbp.2021.104806
- [163] Muñoz-Leoz B, Ruiz-Romera E, Antigüedad I, Garbisu C. Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. *Soil Biology and Biochemistry*. 2011;43(10):2176–2183. doi:10.1016/j.soilbio.2011.07.001
- [164] Raimets R, Naudi S, Mänd M, Bartkevičs V, Smagghe G, Karise R. Translocation of Tebuconazole between Bee Matrices and Its Potential Threat on Honey Bee (*Apis mellifera* Linnaeus) Queens. *Insects*. 2021;13(1):45. doi:10.3390/insects13010045
- [165] Migdał P, Murawska A, Roman A. A Modified Standardized Method to Extract and Store Insect Hemolymph with Use of a Glass Capillary. *Journal of Apicultural Science*. 2020;64(1):165–168. doi:10.2478/jas-2020-0004
- [166] Strona internetowa Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej PiB, <https://meteo.imgw.pl/> [dostęp 18.05.2022].
- [167] Komunikat Biura Prasowego IMGW-PIB, <https://www.imgw.pl/index.php/wydarzenia/imgw-pib-charakterystyka-wybranych-elementow-klimatu-w-polsce-we-wrzesniu-2021-r> [dostęp 18.05.2022].
- [168] Komunikat Biura Prasowego IMGW-PIB, <https://www.imgw.pl/index.php/wydarzenia/charakterystyka-wybranych-elementow-klimatu-w-polsce-w-sierpniu-2021-podsumowanie-sezonu> [dostęp 18.05.2022].
- [169] Komunikat Biura Prasowego IMGW-PIB, <https://www.imgw.pl/wydarzenia/imgw-pib-raport-klimat-w-polsce-lipiec-2021> [dostęp 18.05.2022].
- [170] Komunikat Biura Prasowego IMGW-PIB, <https://www.imgw.pl/index.php/wydarzenia/imgw-pib-charakterystyka-wybranych-elementow-klimatu-w-polsce-w-marcu-2022-roku>, [dostęp, 18.05.2022].
- [171] Komunikat Biura Prasowego IMGW-PIB, <https://www.imgw.pl/wydarzenia/imgw-pib-charakterystyka-wybranych-elementow-klimatu-w-polsce-w-grudniu-2021-roku> [dostęp 18.05.2022].

- [172] Komunikat Biura Prasowego IMGW-PIB, <https://www.imgw.pl/wydarzenia/imgw-pib-charakterystyka-wybranych-elementow-klimatu-w-polsce-w-styczniu-2022-roku> [dostęp 18.05.2022].
- [173] Komunikat Biura Prasowego IMGW-PIB, [https://imgw.pl/sites/default/files/2022-03/imgw\\_0315-charakterystyka-elementow-klimatu-w-polsce-w-lutym-2022-r.-podsumowanie-sezonu-zimowego.pdf](https://imgw.pl/sites/default/files/2022-03/imgw_0315-charakterystyka-elementow-klimatu-w-polsce-w-lutym-2022-r.-podsumowanie-sezonu-zimowego.pdf) [dostęp 18.05.2022].
- [174] Shi J, Zhang R, Pei Y, Liao C, Wu X. Exposure to acetamiprid influences the development and survival ability of worker bees (*Apis mellifera* L.) from larvae to adults. *Environmental Pollution*. 2020;266:115345. doi:10.1016/j.envpol.2020.115345
- [175] Thompson HM, Levine SL, Doering J, Norman S, Manson P, Sutton P, von Mérey G. Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (*Apis mellifera*) development using glyphosate as an example. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 2014;10(3):463–470. doi:10.1002/ieam.1529
- [176] Fisher A, DeGrandi-Hoffman G, Smith BH, Johnson M, Kaftanoglu O, Cogley T, Fewell JH, Harrison JF. Colony field test reveals dramatically higher toxicity of a widely-used mitotoxic fungicide on honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Pollution*. 2021;269:115964. doi:10.1016/j.envpol.2020.115964
- [177] Strachecka A, Krauze M, Olszewski K, Borsuk G, Paleolog J, Merska M, Chobotow J, Bajda M, Grzywnowicz K. Unexpectedly strong effect of caffeine on the vitality of western honeybees (*Apis mellifera*). *Biochemistry (Moscow)*. 2014;79(11):1192–1201. doi:10.1134/S0006297914110066
- [178] Tomé HVV, Schmehl DR, Wedde AE, Godoy RSM, Ravaiano S v., Guedes RNC, Martins GF, Ellis JD. Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. *Environmental Pollution*. 2020;256:113420. doi:10.1016/j.envpol.2019.113420
- [179] Yao J, Zhu YC, Adamczyk J. Responses of Honey Bees to Lethal and Sublethal Doses of Formulated Clothianidin Alone and Mixtures. *Journal of Economic Entomology*. 2018;111(4):1517–1525. doi:10.1093/jee/toy140
- [180] Nation JL. *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press; 2008. doi:10.1201/9781420061789

- [181] Mardani-Talae M, Rahimi V, Zibae A. Effects of host plants on digestive enzymatic activities and some components involved in intermediary metabolism of *Chrysodeixis chalcites* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Entomological and Acarological Research*. 2014;46(3):96. doi:10.4081/jear.2014.3224
- [182] Shemesh O, Golbetz H, Kriss JP, Myers BD. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney International*. 1985;28(5):830–838. doi:10.1038/ki.1985.205
- [183] Burcombe J v., Hollingsworth MJ. The total nitrogen, protein, amino acid and uric acid content of ageing *Drosophila*. *Experimental Gerontology*. 1970;5(3):247–255. doi:10.1016/0531-5565(70)90045-8
- [184] Motoyuki S, Yuuichi Y, Yukio T, Junji S, Morio O, Hajime M, Fujiyoshi M. changes in urea in the haemolymph of the silkworm, *bombyx mori* in the fourth and the fifth larval instars and effect of starvation in th fifth instar on the level of urea in the pharate adults. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 1990;97(3):373–379. doi:10.1016/0300-9629(90)90626-4
- [185] Jówko E. Czynniki determinujące status oksydacyjno-antyoksydacyjny i jego odpowiedź na wysiłek fizyczny. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*. 2020;329:793–805.
- [186] Rouabhi R. Introduction and Toxicology of Fungicides. In: *Fungicides* . 2010. doi:10.13140/RG.2.1.2099.9125

## 9. Spis aktów prawnych

- 1) Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE Nr 1107/2009 z dnia 21 października 2009 r, dotyczące wprowadzania do obrotu środków ochrony roślin i uchylające dyrektywy Rady 79/117/EWG i 91/414/EWG (Dz, Urz, UE L 309 z 24,11,2009, str, 1 z późn, zm)
- 2) Rozporządzenie Komisji (UE Nr 546/2011 z dnia 10 czerwca 2011 r, wykonującym rozporządzenie (WE nr 1107/2009 Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do jednolitych zasad oceny i udzielania zezwolenia na środki ochrony roślin (Dz, Urz, L 155 z 11,06,2011, s, 127)
- 3) Rozporządzenie Komisji (UE Nr 283/2013 z dnia 1 marca 2013 r, ustanawiające wymogi dotyczące danych dla substancji czynnych, zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (WE nr 1107/2009 w odniesieniu do wymogów dotyczących danych dla środków ochrony roślin (Dz, Urz, L 155 z 11,06,2011, s, 67)
- 4) Rozporządzenie Komisji (WE nr 440/2008 z dnia 30 maja 2008 r, ustalające metody badań zgodnie z rozporządzeniem (WE nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie rejestracji, oceny, udzielania zezwoleń i stosowanych ograniczeń w zakresie chemikaliów)

## 10.Załączniki

Załącznik 1. Przykładowa karta ulowa

Nr ula						
Data oceny	Jaja (tak/nie)	Matka (tak/nie)	Czerw zwarty (tak/nie)	Liczba ramek obsiadanych „na czarno”	Co zrobiono? (+węza, susz itd.)	Uwagi



