



národní
úložiště
šedé
literatury

Nový přístup hodnocení suspektních otrav včel pesticidy

Erban, Tomáš; Kamler, Martin; Kadlíková, Klára; Markovič, Martin; Titěra, Dalibor;
Seifrtová, Marcela; Halešová, Taťána
2018

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-384948>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 17.04.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní nusl.cz .



Tomáš Erban a kol.

Nový přístup hodnocení suspektních otrav včel pesticidy

CERTIFIKOVANÁ METODIKA



© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i.

2018



Nový přístup hodnocení suspektních otrav včel pesticidy

Tomáš Erban a kolektiv

Autorský tým:

Tomáš Erban^Φ, 

Martin Kamler^l

Klára Kadlíková^{Φ,Θ}

Martin Markovič^Φ

Dalibor Titěra^{l,Θ}

Marcela Seifrtová^G

Taťána Halešová^G

^ΦVýzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Drnovská 507/73, Praha 6-Ruzyně, 161 06

^lVýzkumný ústav včelařský, s. r. o., Máslovice-Dol 94, p. Libčice nad Vltavou, 252 66

^GALS Czech Republic, s. r. o., Na Harfě 336/9, Praha 9-Vysočany, 190 00

^ΘČeská zemědělská univerzita v Praze, FAPPZ, Kamýcká 129, Praha 6-Suchdol, 165 21

 RNDr. Tomáš Erban, Ph.D., arachnid@centrum.cz; erban@vurv.cz; tel.: +420 702087626

Oponenti:

Mgr. Hana Kubátová-Hiršová, Ph.D. – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno

Doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D. – Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Praha

Ing. Michal Bednář – Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Brno

Ing. Petr Krejčík – Oddělení včelařství a rybařství, Ministerstvo zemědělství, Praha

Vydal:

© Výzkumný ústav rostlinné výroby, v. v. i., Praha, 2018

ISBN 978-80-7427-252-3

Vydání 1.



Financování:

Tato certifikovaná metodika je výsledkem projektu TA ČR č. TA04020267 s názvem „Minimalizace rizik spojených s dopadem výskytu chemických látek v životním prostředí na užitečné organismy: metodiky hodnocení znečištění životního prostředí pesticidy zejména ve vztahu k opylovatelům, především včele medonosné“ řešeného v období 2014–2017.

Určení pro využití v praxi:

Metodika je určena širokému okruhu zájemců. Cílovou skupinu představují zejména odborní pracovníci Státní veterinární správy (SVS), Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ) a pracovníci v oboru toxikologie a kontaminace životního prostředí. Využití metodiky vidíme také ve výuce a budoucí praxi oborů přírodovědných, veterinárních, chemických i lékařských na českých vysokých školách. V neposlední řadě ji využije i široká včelařská veřejnost jak pro vzdělávání, tak i pro praktické postupy při řešení případů otrav včel.

Certifikace:

Certifikované metodice bylo uděleno osvědčení MZe ČR čj. 72956/2017–MZE–16232.

O uplatnění metodiky je uzavřena smlouva č. TA04020267/Nmet2 podle ustanovení § 1746 odst. 2 zákona č. 89/2012 Sb., občanského zákoníku.

Prohlášení:

Předkladatel metodiky prohlašuje, že zpracovaná metodika nezasahuje do práv jiných osob z průmyslového nebo jiného duševního vlastnictví.

Poděkování:

Autoři děkují Státní veterinární správě a včelařům za spolupráci při odběrech vzorků suspektních otrav včel pesticidy. Poděkování dále patří Mgr. Julii Chalupníkové za technickou pomoc. V neposlední řadě děkuje autorský tým také recenzentům metodiky za podnětné a cenné připomínky.



Anotace

Včelstva jsou vystavena účinkům stovek různých přípravků na ochranu rostlin, které jsou zejména při nesprávném použití potenciálním zdrojem otrav včelstev. Metodika uvádí čtenáře do problematiky včetně současné legislativy a přispívá novými aspekty do indikace a hodnocení suspektních otrav včel, které jsou v Česku každoročně vyšetřovány Státní veterinární správou (SVS) a Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským (ÚKZÚZ). V metodice je uveden postup identifikace otravy včel, čeho je třeba si všimnout pro možné záměny otrav včel s chorobami, a postup, jak se má v takovém případě včelař zachovat a koho kontaktovat pro ohlášení suspektní otravy. Některé body metodiky mají inovativní doporučující aspekty pro zlepšení hodnocení otrav včel včetně rozsahu kontaminace včelstva. Tato metodika je k užitku státní správě, samotným včelařům a také pro vědecké a výukové účely.

Title

A new approach for assessing the suspected pesticide poisonings of honeybees

Annotation

Honeybee colonies are exposed to hundreds of plant protection products, which are especially due to improper use possible source of honeybee poisoning. The methodology introduces to the issue of honeybee poisoning including legislation and contributes with novel aspects to the indication and evaluation of the suspected honeybee poisonings, which are annually investigated by the State Veterinary Administration and the Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture in Czechia. The methodology provides instructions to identify honeybee poisoning and notification of that finding. Moreover, possible confusions of the poisonings with honeybee diseases are highlighted. Some sections of the methodology provide innovative recommendations for improvement of honeybee poisoning assessing including determination of the extent of colony contamination. The present methodology is useful for the state administration, beekeepers, scientific and educational purposes.



Obsah

1. Cíl.....	- 1 -
2. Úvod do problematiky používání přípravků na ochranu rostlin	- 1 -
3. Význam a rizika chovu včely medonosné.....	- 3 -
4. Vliv pesticidů na včelstva	- 4 -
5. Sledování pesticidů ve včelách a studie o otravách včel	- 5 -
6. Vlastní popis metodiky	- 5 -
7. Srovnání novosti metodiky	- 13 -
8. Uplatnění metodiky.....	- 13 -
9. Ekonomické zhodnocení metodiky.....	- 14 -
10. Obrazová příloha.....	- 15 -
11. Publikace, které předcházely metodice	- 16 -
12. Seznam literatury	- 16 -



1. Cíl

Cílem této metodiky je přispět novými aspekty do indikace a hodnocení suspektních (podezřelých) otrav včel, které jsou každoročně v řadě případů vyšetřovány Státní veterinární správou (SVS). Metodika je cílena nejen na odborníky, ale z významné části i na samotné včelaře, a proto obsahuje také návod, jak indikovat suspektní otravu včel včelařem, čeho by si měl včelař všimnout a postup, jak se v takovém případě zachovat. Tato metodika poskytuje nové aspekty pro indikaci otravy včel a v literárním úvodu uvádí čtenáře do problematiky.

Stávající metodologie hodnocení suspektních otrav zohledňuje analýzu včel vykazujících otravu, tedy uhynulých nebo hynoucích jedinců před úlem a analýzu zdroje otravy, resp. podezřelého porostu, na který byl aplikován přípravek na ochranu rostlin. Hranice mezi dávkou potřebnou pro vyvolání akutní otravy se liší někdy až o dva řády včelstvo od včelstva a rozdíly existují i mezi jedinci. Zásadní pro včelstvo a včelaře je přežití společenstva, a tak je důležité zvažovat nejen otravu včel se symptomy otravy, ale i případnou kontaminaci celého včelstva. Tato metodika oproti stávajícím postupům zvažuje také analýzu zásob a úlových včel sbíraných především z plodového plástu pro zjištění kontaminace včelstva jako celku, což se může v konečném důsledku projevit na celých včelstvech se zpožděním jako subletální efekt, a nikoliv pouze na hrstce mrtvých včel před úlem. Důležitým aspektem je také odběr vzorků při řešení podezřelých otrav. Problematickým faktem je, že otravy způsobují poměrně často postřiky pesticidů, které jsou hodnocené jako málo toxické pro včely, a zde se zřejmě projevuje synergický efekt pesticidů a formulací, ve kterých jsou aplikovány. Tato metodika je v souladu s potřebou hodnocení rizik pesticidů, ať už akutně letálních nebo subletálních dávek pesticidů na včely.

2. Úvod do problematiky používání přípravků na ochranu rostlin

Pesticidy jsou hojně používány nejen ve většině sektorů zemědělské produkce, ale i zahrádkáři, v lesnictví a také na nezemědělské půdě, a to především k prevenci ztrát na rostlinných produktech způsobovaných škůdci a plevele. Používání pesticidů je spojeno se zvyšováním výnosů, s kvalitou produkce a také s vlivem na celkový vzhled plodin, který je důležitý pro většinu spotřebitelů. Veřejnosti je však častěji zdůrazňován negativní vliv pesticidů na různé složky životního prostředí, než jejich pozitivní vliv na produkci potravin [1]. Seriózní pohled na problematiku by však měl zohlednit přínosy i negativa používání pesticidů.



Intenzifikace zemědělství je od 50. let 20. století spojena s užíváním mnoha látek, které mohou mít negativní vliv na necílové organismy [2]. Toto riziko je minimalizováno tím, že každý přípravek určený na ochranu rostlin musí dle platné legislativy Evropské unie (EU) projít poměrně náročným schvalovacím procesem, který vychází z jednotných zásad pro hodnocení a povolování přípravků na ochranu rostlin [3]. Podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 [4] musí jednotné zásady pro hodnocení a povolování přípravků na ochranu rostlin zahrnovat požadavky podle přílohy VI směrnice 91/414/EHS ze dne 15. července 1991 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh [5]. Nutno upozornit, že v roce 2011 byla směrnice 91/414/EHS zrušena a požadavky, jak jsou stanoveny v příloze VI směrnice 91/414/EHS, byly převzaty do nařízení Evropské komise č. 546/2011 [3]. Jednotné zásady pro hodnocení a povolování přípravků na ochranu rostlin podle čl. 29 odst. 6 nařízení (ES) č. 1107/2009 platné od 14. 6. 2011 jsou tedy stanoveny v příloze nařízení Evropské komise č. 546/2011 [3]. Podle těchto zásad se musí při posouzení přípravků na ochranu rostlin zohlednit interakce mezi účinnou látkou, safenery, synergenty a formulačními přísadami. Ve zkratce lze shrnout, že se při hodnocení rizik zvažuje účinnost na cílový organismus, negativní účinek na rostliny a rostlinné produkty, vliv aplikací a reziduí z nich plynoucí na zdraví lidí, zvířat a životní prostředí, dále je zvažován také osud a distribuce účinné látky a případných metabolitů v životním prostředí. Součástí posouzení je hodnocení dopadu těchto látek na necílové organismy a dle nařízení Evropské komise č. 546/2011 [3] se bere při hodnocení v úvahu především toxicita pro nejcitlivější relevantní testovaný organismus. Při hodnocení je zvažován i vědecký pokrok a použité analytické metody, dále také fyzikální a chemické vlastnosti přípravku zahrnující např. stabilitu a obsah účinné látky.

I přes důkladné prověřování rizik pesticidů se vyskytují případy, kdy se i po mnohaletém používání prokáže negativní vliv pesticidu na životní prostředí. Jako příklady lze uvést notoricky známý a dnes v řadě zemí světa zakázaný pesticid DDT [6] nebo chloracetanilidové herbicidy alachlor a acetochlor zakázané v EU [7] pro teratogenní a karcinogenní účinky [8–10]. Velmi aktuálním tématem posledních let je používání neonikotinových insekticidů a fipronilu, proti nimž se v podstatě obrátila jejich původní výhoda, a to systémový účinek, který umožňuje ochranu rostliny proti škůdcům v průběhu vegetační doby [11]. Negativní vliv těchto systémových insekticidů je zdůrazňován především vzhledem k opylovačům, kteří se mohou na úrovni jedince, ale především na úrovni populace, intoxikovat z nektaru a pylu [12–16]. Na základě mnoha publikací a vědecké zprávy Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA; anglicky European



Food Safety Authority) [17] bylo Evropskou komisí kvůli environmentálním rizikům vzhledem k opylovačům, a zejména včelám, nejprve pozastaveno používání třech neonikotinoidů (imidaklopridu, klothianidinu a thiamethoxamu) po dobu dvou let od 1. prosince 2013 [18] a záhy poté přibyl k těmto třem neonikotinoidům z obdobných důvodů také fipronil [19]. Právě případ neonikotinoidů a fipronilu je důkazem, že negativní vliv na necílový organismus může vést k prohibici pesticidů, a to dokonce i v jejich subletálních dávkách, které mají v případě včely medonosné v konečném důsledku zásadní vliv na přežití celého včelstva [20–22]. Ačkoliv je tato metodika zaměřena především na otravy včel, které jsou spojeny zejména s akutním účinkem pesticidů, přináší nové aspekty hodnocení suspektních otrav včel včetně možné kontaminace včelstva, které se v současnosti při suspektních otravách nevyšetřuje.

3. Význam a rizika chovu včely medonosné

Včela medonosná, *Apis mellifera* L., je nejdůležitější opylovač z hlediska opylování mnoha volně rostoucích rostlin i kulturních zemědělských plodin [23]. Dále je významná produkcí unikátních včelích produktů: medu, vosku, jedu, propolisu, pylu a mateří kašičky. Tyto produkty jsou nezbytné pro fungování včelstva, ale mají také ekonomický význam pro člověka [24]. Včely jsou také fascinující organismy poutající pozornost široké veřejnosti a včelařství je také kulturním dědictvím po celém světě [25]. Včelaření je však ohrožováno opakovanými ztrátami včelstev [26], které mají za důsledek odrazování včelařů od včelaření, ať už jej provozují formou hobby aktivity nebo profesionálně. Včely jsou exponované mnoha různým stresorům včetně velkého množství přípravků na ochranu rostlin, které jsou považované za důležité faktory ztrát včel hned vedle řady včelích patogenů (viry, bakteriální choroby, *Nosema*) a parazitů (*Varroa*, *Lotmaria passim*). Navíc je nutné zdůraznit možnou interakci mezi různými stresory navzájem [27]. Protože jsou včely díky navštěvování hospodářských plodin běžně exponované přípravkům na ochranu rostlin, jsou také důležitým objektem při hodnocení rizik pesticidů ve spojení s registracemi v různých zemích [28, 29]. Hodnocením rizik pesticidů na necílové organismy se zabývá také metodika využívající moderní vědecké přístupy a analýzy různých vývojových stádií včel, zejména ve stádiu metamorfózy [30]. Je nutno zdůraznit, že i přes existenci přísných předpisů pro aplikace přípravků na ochranu rostlin se každoročně vyskytují poměrně četné otravy včel. Z tohoto důvodu je předcházení otrav velmi aktuálním tématem.



4. Vliv pesticidů na včelstva

Včely mohou být exponovány přípravkům na ochranu rostlin různými způsoby [31], ale klíčové je to, zda se s nimi setkají kontaktním způsobem během aplikace přípravků nebo zda si nosí pesticidy jako součást potravních zdrojů v nektaru a pylu do úlu z již ošetřených rostlin a k otravě tak dochází až při zpracování těchto zásob ve včelstvu. Ve včelstvu existuje kromě dělení na kasty také dělba práce u dělnic v průběhu ontogeneze na uklízečky, krmičky, kojičky, stavitelky, přejímatelky, strážkyně česna a nejstarší létavky. Za transport potravních zdrojů pylu, nektaru a vody do včelstva jsou odpovědné létavky [25]. A právě létavky mohou být exponovány účinku pesticidů po aplikaci přípravku jako první z celého včelstva. Teoreticky tak uhynou ve většině případů již v místě aplikace či jeho okolí. V závislosti na množství a času expozice přípravku pak některé létavky hynou v blízkosti včelstva [32, 33]. Takový způsob otravy včel nazýváme akutní otravou. V druhém případě nejsou včely létavky vystaveny tak velké koncentraci pesticidů kontaktním způsobem na ošetřených rostlinách, aby je rychle usmrtily. Dochází tedy k tomu, že včely donášejí kontaminovaný pyl, nektar, případně i vodu do úlů, kde dochází k jejich zpracování a ukládání ve formě medu a plástového pylu. Včelstvo je tak pesticidy intoxikováno při zpracování kontaminovaných zásob [33]. Tato druhá možnost je označována jako subletální toxický efekt a je z pohledu celého včelstva horší variantou, neboť je účinkem pesticidů ovlivněno prakticky celé společenstvo z dlouhodobého hlediska. Pravděpodobně nejzásadnější je případný vliv na vývoj plodu, reprodukci, dlouhověkost včel a matku [34, 35].

Výsledky různých studií prokázaly vliv subletálních dávek přípravků na ochranu rostlin a zejména systémových pesticidů neonikotinoidů a fipronilu na chování včel [15, 33, 36–38]. Subletální účinek pesticidů je o to významnější, že je spojován s různými stresory oslabujícími včelstvo [39, 40]. Interakce mezi různými pesticidy navzájem mají synergický efekt na fitness včelstva [34, 41–44]. Včely s imunitním systémem ovlivněným pesticidy mohou být náchylnější k parazitům *Nosema ceranae* [45–47] a k virovým infekcím [48, 49]. Pesticidy mohou také ovlivnit imunitní systém včel skrze pozměněný střevní mikrobiom [50]. Nutno zdůraznit, že subletální účinky pesticidů jsou spojeny s potenciální přeměnou samotné účinné látky v přípravcích na ještě nebezpečnější a toxičtější metabolity pro včely. Jako příklad může sloužit imidaklopid-olefin, který je více toxickým metabolitem účinné látky imidaklopidu [51]. Tento nebezpečný metabolit vzniká jak v samotných včelách [52], tak i např. v řepce olejce [53], která je jednou z cílových plodin pro aplikaci přípravku. Z těchto důvodů je skutečně významné sledování osudu



a transformace přípravků na ochranu rostlin. V neposlední řadě je vhodné poznamenat, že také formulace přípravků na ochranu rostlin může být významným faktorem účinku konkrétních pesticidů na včely [54].

5. Sledování pesticidů ve včelách a studie o otravách včel

Různé studie se zabývají sledováním reziduí pesticidů ve včelách a ve včelích matricích (pyl, med či vosk) a výsledky detekovaného spektra pesticidů jsou spojovány se zdravím včel (např. [34, 46, 47, 55–61]). V menším počtu studií byly vyšetřovány vzorky ze včelstev vykazujících ztráty nebo případy úhynů [62, 63]. Zde je však nutno zdůraznit, že takovéto hodnocení výsledků je problematické vzhledem k multifaktoriálním příčinám ztrát a úhynů [63]. Autoři některých studií se pokusili shrnout nebezpečí výskytu pesticidů vzhledem k toxicitě na včely. Konkrétně Johnson a kol. [29] poukázali na výskyt pesticidů ve vosku, pylu, medu a včelách ve Spojených státech (USA) [29]. Blacquièere a kol. [64] se ve svém review zaměřili na neonikotinoidy [64].

Otravy včel jsou velmi aktuální a případy otrav jsou navíc v některých zemích legislativně kontrolovány. Relevantní studie zabývající se otravami včel jsou však poměrně vzácné. Výzkumníci z Polska [65] nedávno sumarizovali ve své práci otravy včel. Obdobným tématem se předtím zabývaly dvě studie ze Spojeného království, kde byly otravy včel shrnuty pro různé roky [66, 67]. Další studie informuje o otravách včel způsobených abrazivem pesticidu z ošetřených semen při setí kukuřice v Německu na jaře 2008 [68]. Další reporty se týkají otrav včel způsobených neonikotinoidy z let 2007–2012 [69], suspektních otrav konkrétního včelstva důsledkem desikace v Česku [70] a také zmínky o největším případě otravy v Česku v důsledku použití přípravku Regent WP 50 s aktivní složkou fipronilem [71]. Pro účely této metodiky jsme vyšetřovali suspektní otravy včel v Česku v letech 2015 a 2016 a získané zkušenosti a výsledky vedly k tvorbě této metodiky.

6. Vlastní popis metodiky

6.1. Současný stav legislativy

Předpisy v Česku vycházejí z předpisů EU. Problematiku ochrany včel v Česku upravuje zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů v aktuálním znění [72], který byl novelizován zákonem č. 299/2017 Sb. [73], a vyhláška č. 327/2012 Sb., o ochraně včel, zvěře, vodních organismů a dalších necílových organismů při použití přípravků na ochranu



rostlin v aktuálním znění [74], kterou změnila vyhláška č. 428/2017 Sb. [75]. Z platné legislativy vyplývají pro zemědělce i pro včelaře některé důležité náležitosti. Novelou č. 428/2017 Sb., která vešla v platnost 11. 12. 2017 a nabyla účinnosti 26. 12. 2017, byly zrušeny § 7 a § 8 vyhlášky č. 327/2012 Sb., podle kterých bylo nutno písemně oznámit každoročně do konce února umístění trvalých stanovišť včelstev včetně identifikace chovatele a místa umístění. Naproti tomu dle zákona č. 299/2017 Sb. se v § 79c zákona č. 326/2004 Sb. na konci odstavce 1 doplnilo písmeno h, které zní: „h) jako chovatel včel neoznámí místně příslušnému. Tudiž pokud chovatel neoznámí podle plemenářského zákona pověřené osobě údaje k umístění stanovišť včelstev, dopustí se podle § 51 odst. 5 zákona č. 326/2004 Sb. přestupku. Dle § 51 odst. 2 zákona č. 326/2004 Sb. má profesionální uživatel povinnost před aplikací přípravků nebezpečných nebo zvláště nebezpečných pro včely zjistit prostřednictvím evidence hospodářství podle objektů určených k chovu evidovaných zvířat podle zákona o zemědělství (č. 252/1997 Sb. [76]) informace k umístění stanovišť včelstev v dosahu alespoň 5 km od hranice pozemku, na němž má být aplikace provedena, a minimálně 48 hodin před provedením aplikace oznámit dotčeným chovatelům včel aplikaci přípravku [72]. Pro aplikace pesticidů platí dle § 3 vyhlášky č. 327/2012 Sb., v aktuálním znění, že přípravek, který je podle rozhodnutí o jeho povolení označen jako zvláště nebezpečný pro včely, nesmí být aplikován na porost navštěvovaný včelami a na stromy a keře v květu, při výskytu medovice nebo mimokvětního nektaru, které navštěvují včely [74]. Dle aktuálního znění § 4 vyhlášky č. 327/2012 Sb. smí být přípravek označený jako nebezpečný pro včely podle rozhodnutí o jeho povolení aplikován na porost navštěvovaný včelami pouze po ukončení denního letu včel, a to nejpozději do dvacáté třetí hodiny příslušného dne. Denní let včel je ukončen hodinu po západu slunce. Před ukončením denního letu včel smí být přípravek aplikován na porost navštěvovaný včelami pouze poté, kdy teplota vzduchu klesne a zůstane pod 12 °C [74]. Dle § 5 vyhlášky č. 327/2012 Sb. je třeba při aplikacích nebezpečných a zvláště nebezpečných přípravků pro včely respektovat možné úlety, a to s ohledem na způsob aplikace a povětrnostní podmínky. Toto platí také pro výsev osiva nebo sázení sadby ošetřených přípravkem, který je podle rozhodnutí o jeho povolení označen jako nebezpečný nebo zvláště nebezpečný pro včely. Dle § 5 odst. 2 je za nebezpečné považována aplikace biocidních přípravků nebo látek používaných podle jiného právního předpisu, v případě, kdy může včelám škodit, tj. hrozí-li nebezpečí zasažení porostů navštěvovaných včelami, létajících včel nebo stanovišť včelstev [74]. Dále, je-li dle § 5a aplikován přípravek, směs přípravků nebo směs přípravku s pomocným prostředkem nebo hnojivem, musí být mezi dvěma aplikacemi



dodržení minimální interval 12 hodin. Minimální interval 12 hodin mezi dvěma aplikacemi nemusí být dodrženo, je-li aplikován pouze přípravek, který podle rozhodnutí o jeho povolení není označen jako nebezpečný nebo zvlášť nebezpečný pro včely [74].

Pokud je včelař informován o aplikaci přípravku, má možnost ochránit včely. V opačných případech může dojít k otravě včel v důsledku použití přípravku, která se dle § 51 odst. 6 zákona č. 326/2004 Sb. [72] neprodleně oznámí krajské veterinární správě (KVS). Po ohlášení otravy včel se uplatňuje § 14 vyhláška č. 327/2012 Sb. týkající se způsobu odběru vzorku při šetření příčin úhynu včel [74]. K vyšetření příčiny úhynu včel odebírá krajská veterinární správa vzorek uhynulých včel v počtu nejméně 500 jedinců a Ústav vzorek rostlin z ošetřeného porostu o hmotnosti nejméně 200 gramů. Vzorky musí být označeny a zabaleny v prodyšném pevném obalu a neprodleně přemístěny k uchování při teplotě -18 °C a nižší do doby doručení stejnému státnímu ústavu pro veterinární laboratorní diagnostiku k provedení analýzy [74]. Otrava případnou aplikací přípravku na ochranu rostlin je prokázána, pokud dojde ke shodě pesticidů použitých při ošetření domnělého porostu a včel.

Pozn.: Dle § 15 vyhlášky č. 327/2012 Sb. se přípravky vzhledem k nebezpečnosti vůči včelám označují dle dosavadních právních předpisů následně: „Přípravek pro včely toxický“ se rozumí označení „Přípravek zvlášť nebezpečný pro včely“, b) „Přípravek pro včely škodlivý“ se rozumí označení „Přípravek nebezpečný pro včely“, c) „Pro včely relativně neškodný“ se rozumí, že „Přípravek nevyžaduje klasifikaci z hlediska ochrany včel“ [74].

6.2. Indikace otravy včel, postup včelaře při podezření na otravu včel a navrhované změny

V následujícím textu je uveden postup, jak indikovat podezření na otravu včel a jak se v takových případech zachovat. Některé následující body mají inovativní doporučující aspekty pro zlepšení hodnocení otrav včel. Včelař pomocí tohoto návodu dokáže: (i) sám indikovat, zda se může jednat o otravu včel; (ii) oznámit případnou otravu včel příslušným orgánům státní správy – viz bod 2; (iii) určit další důležitá fakta související s úhynem včel, např. indikovat, zda jsou včelami hynoucími před česnem létavky nebo úlové včely, což je důležité pro určení potenciální kontaminace celého včelstva pesticidy. Tato metodika je jako celek k užítku samotným včelařům, kteří se rozhodnou v případě, že není možné šetření Státní veterinární správou z důvodu otravy zjistit příčinu úhynu včel samostatně a na vlastní náklady a podobně je k využití pro výzkumné



účely. Body 4–7 jsou především doporučující pro zlepšení hodnocení otrav včel a je na budoucím zvážení zákonodárců, zda budou tato fakta brána v potaz pro případnou legislativní změnu.

1. Podezření na otravu

Základním indikátorem podezření na otravu je náhlé nepřírozené hromadění uhynulých včel před česnem (obr. 1A, B). Dalším indikátorem je změna v chování včel, kdy včely mohou být zmatené, mohou jevit známky agresivnějšího chování (vyšší bodavost) a mohou být nelétavé a chodit v blízkosti úlu. Otrávené včely jsou také často v křečích a mají vysunutý sosák (proboscis) (obr. 1C). Je nutné upozornit, že obdobné projevy může mít účinek virů nebo i jiných patogenů. Bakteriální choroby mor včelího plodu a hniloba včelího plodu jsou spolehlivě identifikovatelné kultivačními a zejména molekulárními metodami. Indikuje je typický zápach, mezerovitý plod a hynoucí larvy [77–79]. Nosematóza se identifikuje mikroskopicky anebo molekulárními metodami [80]. Typickým projevem je pokálené česno. Pokud by docházelo k úhynu vlivem varroázy, byl by ve včelstvu zvýšený počet roztočů *Varroa* a typickým projevem by byly včely s projevy viru deformovaných křídel, a pak by i hynoucí včely měly tuto typickou deformaci křídel. Příznaky uvedených chorob včel lze poměrně snadno rozpoznat již při zběžné prohlídce včelstva, avšak při výskytu virů napadajících nervový systém je situace poměrně složitá, neboť příznaky mohou být podobné jako při akutních otravách včel, tj. vyplazený jazyk a křeče. Konkrétně se jedná např. o virus akutní paralýzy, izraelský virus akutní paralýzy a kašmírský virus. Nutno podotknout, že v přenosu těchto, ale i dalších virů a v jejich patogenезi se významně uplatňuje roztoč *Varroa*, a tudíž jejich projevy jsou spojeny se zvýšenou infestací roztočů *Varroa* [81].

! Je třeba si uvědomit, že populace roztoče *Varroa* ve včelstvu kulminuje ke konci léta a v tomto období bývají otravy včel pesticidy jen velmi zřídka. V jarním období, kdy je velký rozvoj včelstev a vyskytuje se nejvíce případů otrav včel pesticidy, je výskyt roztoče *Varroa* ve včelstvu obvykle malý.

2. Ohlášení a šetření otravy včel

Dle platného znění § 14 vyhlášky č. 327/2012 Sb. [74] musí být vzorky uchované při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a nižší doručeny odbornému ústavu k provedení analýzy. Podezření na otravu včel je potřeba hlásit co nejrychleji, aby mělo šetření orgány státní správy pro postih toho, kdo přípravek aplikoval, oporu v zákonech. V § 51 zákona č. 326/2004 Sb. [72] je uvedeno, že zjistí-li chovatel, že došlo k úhynu včel v důsledku použití přípravku, oznámí to neprodleně příslušné



Krajské veterinární správě (KVS). Pro účely úspěšného prokázání otrav včel jsou za tímto účelem zřízeny tzv. krizové linky SVS, které jsou v jarním období dostupné 24 hodin denně. Včelař tak může kontaktovat krizovou linkou příslušné KVS, jejíž telefonní číslo je uvedeno na odkazu: <https://www.svscr.cz/statni-veterinari-sprava/krizove-linky/>. Veterinární lékař KVS provede místní šetření na stanovišti včel. Veterinární správa kontaktuje rostlinolékaře ÚKZÚZ, který provede místní šetření u zemědělců obhospodařující pole v okolí stanoviště včelstev s podezřením otravy včel. Má-li veterinář pochybnosti o příčině úhynu v souvislosti s použitím přípravku po vyloučení jiných příčin úhynu (např. úmyslná otrava, varroáza, bakteriální choroby mor včelího plodu a hniloba včelího plodu), zajistí odběr vzorků způsobem stanoveným prováděcím právním předpisem, jejich vyšetření odborným ústavem a informování chovatele včel o výsledku tohoto vyšetření. Záznam o výsledku místního šetření a výsledek vyšetření vzorků poskytne veterinář ÚKZÚZ a chovatelům včel, pokud jsou tyto osoby důsledky použití přípravků dotčené. Rostlinolékař ÚKZÚZ určí, zda došlo k porušení zákona č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči [72].

3. Období úhynu včel a znalost okolí stanoviště

Pro včelaře platí pravidlo, že pokud jsou v doletu včel na daném stanovišti kvetoucí plodiny, je zvýšené nebezpečí otravy spojené s případnou aplikací přípravků na ochranu rostlin. Včelař by si měl všimnout, jaké plodiny jsou pěstovány v doletu včel. Díky znalosti plodin v okolí dokáže včelař dobře indikovat potenciální zdroj otrav včel. Tyto informace mohou být nápomocné orgánům státní správy při šetření podezření na otravu (viz ad 2). V souvislosti s podezřením na otravy je třeba brát v úvahu období, ve kterém se objevily příznaky suspektní otravy. Nejčastější úhyny včel jsou v době, kdy se ošetřují kvetoucí plodiny, zejména velké plochy řepky, hořčice, slunečnice atd. Z tohoto důvodu je klíčovým obdobím pro otravy včel duben a květen a s menší významností červen. V období letních prázdnin, tedy červenec až srpen, je z pohledu potenciálních otrav významná např. slunečnice. Nutno podotknout, že zdrojem otrav pro včely může být také postřík aplikovaný na nekvetoucí porost, a to zejména desikace [70, 82].

4. Jsou uhynulé včely létavky nebo úlové včely?

Důležitou informací při hodnocení úhynu včel je, zda jsou uhynulými nebo hynoucími včelami létavky nebo úlové včely. Včely létavky jsou nejstaršími dělnicemi ve včelstvu a jejich rolí je sběr a transport pylu, nektaru, ale i vody. V případě, že na účinky pesticidů



hynou pouze létavky, je poměrně malé riziko, že by byly ve větší míře kontaminovány zásoby a tak i celé včelstvo včetně plodu. V případě, že účinky pesticidů ovlivnily i úlové včely, které zpracovávají zásoby, existuje větší riziko kontaminace zásob, a tedy i celého včelstva (více viz bod 7). Pokud jsou hynoucími včelami čerstvě vylíhlé mladušky, může existovat podezření na ovlivnění ontogeneze včel, které může být, kromě řady jiných možností, v důsledku subletálního dlouhodobého účinku pesticidů [30]. Vodítkem k rozpoznání včel létavek od úlových včel je míra ochlupení na hrudi a zadečku. Nejvíce ochlupené, v důsledku toho i světlejší, jsou čerstvě vylíhlé mladušky, které postupem času chloupky ztrácejí důsledkem aktivit ve včelstvu. Nejstarší létavky jsou v podstatě holé a tmavě hnědě až černě zbarvené. Spolehlivým indikátorem létavek je také přítomnost pylových rousků na zadních nohách, ale tento identifikační znak platí pouze pro ty včely létavky, které se specializují na sběr pylu. V neposlední řadě je samotná barva rouskovaného pylu nápomocným vodítkem při identifikaci potenciálního zdroje otravy.

! V případě výskytu viróz způsobujících paralýzu včely ztrácejí ochlupení, a tak z tohoto pohledu i nemocné úlové včely mohou na první pohled vypadat jako méně ochlupené létavky. Jak je uvedeno v bodu 1, klinické příznaky viróz jsou obvykle spojeny s větším výskytem roztoče *Varroa* ve včelstvu, a proto je identifikace stupně infestace klíčovým prvkem při vyšetřování suspektních otrav.

! Ačkoliv identifikace úlových včel a včel létavek není zakotvena v platné legislativě, je nepochybně důležitým prvkem nejen pro včelaře, ale i případnou kontrolu ze strany orgánů státní správy při hlášené otravě. V případě, že jsou hynoucími včelami úlové včely, je vhodné provést analýzu vzorku včel a pylu z plodového plástu (viz bod 7).

5. Počet uhynulých včel nemusí být směrodatný

Při vyšetřování příčiny uhynutí včel se podle vyhlášky č. 327/2012 Sb. kromě minimálního množství 200 gramů porostu odebírá vzorek uhynulých včel, a to v počtu nejméně 500 jedinců [74] (obr. 1D). Je třeba si uvědomit i následující fakta: (i) pokud byly včely létavky přímo vystaveny aplikaci přípravku, hyne jejich podstatná část již v místě aplikace anebo mají negativně ovlivněny navigační schopnosti a jen málo dělnic létavek se tak dostane zpět k mateřskému včelstvu; (ii) čím smrtelnější dávkou pesticidů byly včely zasaženy, tím méně se jich hypoteticky vrátí zpět do úlu; (iii) minimální počet 500 jedinců uhynulých včel potřebných pro odběr může být na jednu stranu poměrně malý ve srovnání se silným včelstvem



čítajícím 30 tis. a více jedinců a na druhou stranu dosti veliký v případě např. oddělků s 5 tis. jedinci. Z těchto důvodů by bylo vhodné pro odběr vzorků při suspektních otravách zvážit úpravu minimálního počtu uhynulých včel potřebných pro analýzu na nižší počet a případně korigovat požadovaný počet vzhledem k aktuální síle včelstva, např. 100 včel na včelami plně obsazený typický a v Česku nejrozšířenější nástavek 39×24 cm. Vzorek 100 včel bohatě postačuje na spolehlivou reprezentativní analýzu pesticidů pomocí LC-MS/MS instrumentace.

6. Určení cesty zasažení včel

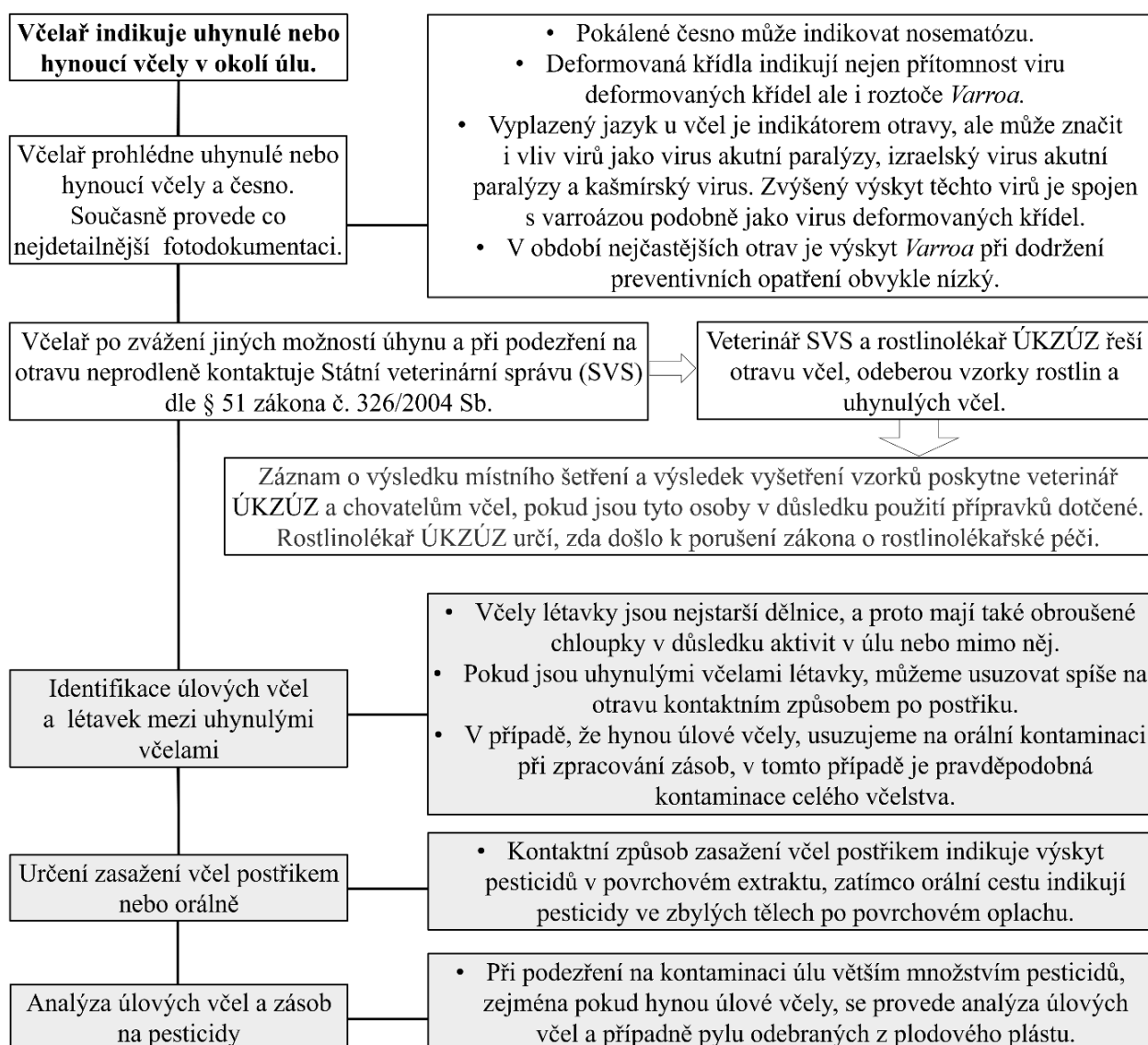
Z hlediska identifikace cesty otravy včel je důležité zjištění, zda došlo k otravě kontaktním způsobem nebo perorální cestou. K tomuto rozlišení se aplikuje postup oplachu včel rozpouštědlem. Analýza vnějšího oplachu včel slouží k prokázání otravy uhynulých včel postříkem, zatímco analýza extraktu homogenizovaných jedinců slouží k prokázání orální otravy včel [70]. Příklad provedení je následující. Včely jsou po zvážení opláchnuty v 1,2 ml acetonitrilu (čistota LC-MS) na 1 včelu po dobu 15 min a jsou lehce vortexovány 2×30 s. Tento acetonitrilový extrakt je následně po filtraci přes $0,45 \mu\text{m}$ filtr regenerované celulózy použit při LC-MS/MS analýze na pesticidy. Zbylé včely po povrchové extrakci jsou homogenizovány ve skleněném Potter-Elvehjem homogenizéru v poměru 1,2 ml acetonitrilu na 1 včelu [70]. Extrakt je zpracován metodou QuEChERS [83] a analyzován pomocí LC-MS/MS.

7. Analýza úlových včel a zásob na pesticidy

Vliv pesticidů na včelstvo není pouze akutní. V současnosti je zvýrazňován jako významnější efekt subletální a dlouhodobý, a proto je vhodné analyzovat na kontaminaci také včelstvo uvnitř úlu. Zvláštní opodstatnění pro prokázání kontaminace včelstva je v případě, kdy jsou hynoucími nebo uhynulými včelami v blízkosti úlu úlové včely nebo dokonce mladušky (viz bod 4). Odběr vzorku úlových včel je nejvhodnější provést oklepem alespoň 100 jedinců z plodového plástu do plastového pytlíku a včely následně okamžitě zamrazit (nejlépe na suchém ledu nebo v mrazícím boxu) a zároveň tak usmrtit, aby nedocházelo k nežádoucím degradacím sledovaných látek v čase. Včely z plodového plástu nejlépe reprezentují stav kontaminace včelstva, neboť je zde nejvíce včel krmiček, které krmí plod (jsou staré přibližně 4–10 dnů). Pro zjištění kontaminace včelstva je taktéž možný odběr pylu z plodového plástu. Je však třeba brát v potaz, že včely při zpracování potravy pesticidy metabolizují, a tak je v nich již snížený obsah pesticidů.

Pozn.: Dotčení včelaři mohou sami odebrat vzorky a dát je vyšetřit na své náklady v příslušné analytické laboratoři. Validované metody pro kvantitativní analýzu klíčových pesticidů ve včelách a plástovém pylu nabízí např. ALS Czech Republic, s. r. o., (<https://www.alsglobal.cz>). Pro zprostředkování analýz lze kontaktovat např. autora této metodiky Dr. Tomáše Erbana (kontakt viz soupis autorů). Pro analýzu je vhodné uvést potenciální zdroj kontaminace a přípravky, které mohly kontaminaci způsobit. Je třeba si uvědomit, že analýza vzorků, které nebyly úředně odebrány, nemusí být brány v potaz při řešení náhrad škody soudní cestou.

6.3. Schématické znázornění metodiky





7. Srovnání novosti metodiky

Doposud nebyla realizovaná metodika shrnující postup při řešení otrav včel. Tato metodika zahrnuje identifikaci otravy včel, čeho je třeba si všímat pro možné záměny otrav včel s chorobami, a postup, jak se má v takovém případě včelař zachovat a koho kontaktovat pro ohlášení suspektní otravy. Jedním z inovačních aspektů této metodiky je rozlišení úlových včel a létavek mezi uhynulými nebo hynoucími včelami. Toto rozlišení, ač není exaktní, je klíčové pro určení rozsahu otravy včel, neboť uhynulé úlové včely indikují otravu při zpracování zásob a následné možné ovlivnění plodu a celého včelstva z dlouhodobého hlediska. Otrava létavek naopak indikuje zejména kontaktní způsob otravy při aplikaci přípravku. Dalším inovačním aspektem je zvažování počtu uhynulých nebo hynoucích včel potřebných pro určení otravy. Pro počet jedinců uhynulých včel potřebných pro analýzu otravy by měla být dle této metodiky respektována aktuální síla včelstva. Posledním inovačním aspektem je analýza úlových včel a pylu z plodového plástu. Aplikace tohoto postupu je důležitá zejména v případě, že uhynulými nebo hynoucími včelami jsou úlové včely. Výsledek analýzy úlových včel a pylu z plodového plástu poskytuje významnou informaci z hlediska otravy celého včelstva. Pokud je v těchto vzorcích nalezen zvýšený obsah pesticidů, tak existuje reálné riziko subletálního dlouhodobého vlivu na včelstvo.

8. Uplatnění metodiky

Metodika je určena pro praktické profesionální i zájmové včelaře, odborné pracovníky Státní veterinární správy (SVS) a Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského (ÚKZÚZ), pracovníky diagnostických a analytických laboratoří, které se zabývají zdravím včel a ekotoxikologií. Věříme, že metodické postupy by mohly být využívány do jisté míry také mezinárodními organizacemi jako EEA (European Environment Agency; Evropská agentura pro životní prostředí), EPA (United States Environmental Protection Agency; Agentura pro ochranu životního prostředí USA) či EFSA (European Food Safety Authority; Evropský úřad pro bezpečnost potravin) řešícími hodnocení rizik na včely a jiné opylovače. Předkládaná metodika má souvislosti vzhledem k nařízením komise ES týkající se hodnocení a povolování přípravků na ochranu rostlin.



9. Ekonomické zhodnocení metodiky

SVS každým rokem řeší otravy včel z důvodu aplikace prostředků na ochranu rostlin. Mapy prokázaných stanovišť, ale i ostatních případů šetření hromadných úhynů včelstev, jsou k dispozici na webových stránkách <https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/vcely-ostatni/>. V řadě případů však nejsou otravy prokázány, protože řešené případy analyzují jen látky, které se v nejbližším okolí aplikovaly do plodin. Námi předložená metodika dokáže analyticky prokázat několik účinných látek současně, což může vést ke správnému prokázání otravy i jejího viníka. Ztráty v důsledku otrav včel se pohybují v širokém rozmezí od cca 3 až do 10 tisíc Kč za 1 včelstvo (zahrnují škody jak na samotném včelstvu, tak i v důsledku ztrát medu a dalších včelích produktů). Při otravách jsou zpravidla postižena v různé míře všechna včelstva na stanovišti a škody tak mohou být až v řádu deseti tisíc korun. V případě, kdy je aplikován analytický přístup zjištění kontaminace, se cena jedné LC-MS/MS analýzy v současnosti pohybuje v rozpětí od 2 až 4 tis. Kč. Celkový, a ne zcela snadno vyčíslitelný přínos této metodiky, je také v exaktnosti prokazování příčin otravy včel a také v prokazování cesty intoxikace včel.

10. Obrazová příloha

Obr. 1. Hynoucí včely na včelnici v květnu. **A)** Indikace hynoucích včel před úlem.; **B)** Detail hynoucích včel před úlem. Některé včely mají rousky žlutého pylu na zadních nohách. Pyl může indikovat zdroj otravy, v tomto případě řepku. Jelikož v blízkosti včelnice byl proveden postřik řepky insekticidem thiaklopridem a fungicidem, je zdroj této suspektní otravy zřejmý.; **C)** Detail létavky s pylovými rousky na zadních nohách.; **D)** Uhynulé včely odebrané do pytlíku složí pro prokázání podetření na zdroj otravy. Shoda účinných látek ve včelách s podezřelým porostem prokazuje zdroj otravy.





11. Publikace, které předcházely metodice

- Erban T. 2013. Mohou pesticidy za úmrtí včel? Včelařství 66 (11): 366–367.
- Erban T., Halešová T., Seifrtová M., Kamler M., Titěra D. 2016. Způsob určení vlivu xenobiotika/xenobiotik na plod včely, zejména včely medonosné, v průběhu její metamorfózy. Přihláška patentu číslo PV 2016-654 podaného dne 19. 10. 2016, č. j. E274567. Úřad průmyslového vlastnictví (ÚPV), Praha, Česko.
- Erban T., Harant K., Hubalek M., Vitamvas P., Kamler M., Poltronieri P., Tyl J., Markovic M., Titera D. 2015. In-depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. Sci. Rep. 5: 13907. DOI: 10.1038/srep13907.
- Erban T., Kamler M., Šulcová K., Titěra D., Seifrtová M., Riddellová K., Hubert J., Hortová B., Halešová T. 2016. Hodnocení vlivu xenobiotik na včely v průběhu ontogeneze metodami proteomické, metabolické a genomické analýzy: certifikovaná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby (VÚRV), Praha, Česko. URL: <https://www.vurv.cz/sites/File/Publications/ISBN978-80-7427-210-3.pdf>
- Erban T., Trojakova L., Kamler M., Titera D. 2017. Detection of the desiccant and plant growth regulator chlormequat in honeybees and comb pollen. Vet. Med. Czech 62 (11): 596–603.
- Matušková L., Erban T. 2013. Desikace je možný zdroj otravy včel. Včelařství 66 (12): 406–407.
- Seifrtova M., Halesova T., Sulcova K., Riddellova K., Erban T. 2016. Distributions of imidacloprid, imidacloprid-olefin and imidacloprid-urea in green plant tissues and roots of rapeseed (*Brassica napus*) from artificially contaminated potting soil. Pest Manag. Sci. 73 (5): 1010–1016.

12. Seznam literatury

1. Cooper J., Dobson H. 2007. The benefits of pesticides to mankind and the environment. Crop Prot. 26 (9): 1337–1348.
2. Wheeler W. B. 2002. Role of research and regulation in 50 years of pest management in agriculture. Prepared for the 50th anniversary of the Journal of Agricultural and Food Chemistry. J. Agric. Food Chem. 50 (15): 4151–4155.
3. EK. 2011. Nařízení Komise (EU) č. 546/2011 ze dne 10. června 2011, kterým se provádí nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009, pokud jde o jednotné zásady pro hodnocení a povolování přípravků na ochranu rostlin, text s významem pro EHP. Úřední věstník Evropské unie, L 155/127, 11. 6. 2011. URL: <http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2011/546/oj>
4. EP, Rada ES. 2009. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 ze dne 21. října 2009 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh a o zrušení směrnic Rady 79/117/EHS a 91/414/EHS. Úřední věstník Evropské unie, L 309/1, 24. 11. 2009. URL: <http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1107/oj>
5. Rada EHS. 1991. Směrnice Rady 91/414/EHS ze dne 15. července 1991 o uvádění přípravků na ochranu rostlin na trh. Úřední věstník Evropských společenství, L 230, 19. 8. 1991. URL: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=OJ:L:1991:230:TOC>



6. UNEP. 2001. Stockholm convention on persistent organic pollutants. Secretariat of the Stockholm Convention. United Nations Environmental Programme (UNEP) chemicals. Geneva, Switzerland.
7. EK. 2013. Nařízení Komise (EU) č. 73/2013 ze dne 25. ledna 2013, kterým se mění přílohy I a V nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 689/2008 o vývozu a dovozu nebezpečných chemických látek. Úřední věstník Evropské unie, L 26/11, 26. 1. 2013. URL: <http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2013/73/oj>
8. Ashby J., Kier L., Wilson A. G. E., Green T., Lefevre P. A., Tinwell H., Willis G. A., Heydens W. F., Clapp M. J. L. 1996. Evaluation of the potential carcinogenicity and genetic toxicity to humans of the herbicide acetochlor. *Hum. Exp. Toxicol.* 15 (9): 702–735.
9. Heydens W. F., Wilson A. G. E., Kier L. D., Lau H., Thake D. C., Martens M. A. 1999. An evaluation of the carcinogenic potential of the herbicide alachlor to man. *Hum. Exp. Toxicol.* 18 (6): 363–391.
10. Crump D., Werry K., Veldhoen N., Van Aggelen G., Helbing C. C. 2002. Exposure to the herbicide acetochlor alters thyroid hormone-dependent gene expression and metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Environ. Health Perspect.* 110 (12): 1199–1205.
11. Elbert A., Becker B., Hartwig J., Erdelen C. 1991. Imidacloprid – ein neues systemisches Insektizid. *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer* 44 (2): 113–136.
12. Rortais A., Arnold G., Halm M.-P., Touffet-Briens F. 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie* 36 (1): 71–83.
13. Halm M.-P., Rortais A., Arnold G., Taséi J. N., Rault S. 2006. New risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). *Environ. Sci. Technol.* 40 (7): 2448–2454.
14. Krischik V. A., Landmark A. L., Heimpel G. E. 2007. Soil-applied imidacloprid is translocated to nectar and kills nectar-feeding *Anagyrus pseudococci* (Girault) (Hymenoptera: Encyrtidae). *Environ. Entomol.* 36 (5): 1238–1245.
15. Aliouane Y., El Hassani A. K., Gary V., Armengaud C., Lambin M., Gauthier M. 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (1): 113–122.
16. Dively G. P., Kamel A. 2012. Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. *J. Agric. Food Chem.* 60 (18): 4449–4456.
17. EFSA. 2013. EFSA identifies risks to bees from neonicotinoids: press release, 16 January 2013. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. URL: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/130116>
18. EK. 2013. Prováděcí nařízení Komise (EU) č. 485/2013 ze dne 24. května 2013, kterým se mění prováděcí nařízení (EU) č. 540/2011, pokud jde o podmínky schválení účinných látek klothianidin, thiamethoxam a imidacloprid, a kterým se zakazuje použití a prodej osiva ošetřeného přípravky na ochranu rostlin obsahujícími uvedené účinné látky, text s významem pro EHP. Úřední věstník Evropské unie, L 139/12, 25. 5. 2013. URL: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?qid=1484755697880&uri=CELEX:32013R0485>



19. EFSA. 2013. EFSA assesses risks to bees from fipronil: press release, 27 May 2013. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. URL: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/130527>
20. Doublet V., Labarussias M., de Miranda J. R., Moritz R. F. A., Paxton R. J. 2015. Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environ. Microbiol.* 17 (4): 969–983.
21. Mengoni Goñalons C., Farina W. M. 2015. Effects of sublethal doses of imidacloprid on young adult honeybee behaviour. *PLoS One* 10 (10): e0140814. DOI: 10.1371/journal.pone.0140814.
22. Wu-Smart J., Spivak M. 2016. Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Sci. Rep.* 6: 32108. DOI: 10.1038/srep32108.
23. Klein A.-M., Vaissière B. E., Cane J. H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S. A., Kremen C., Tscharntke T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Biol. Sci.* 274 (1608): 303–313.
24. Schmidt J. O. 1997. Bee products: chemical composition and application. *In: Mizrahi A., Lensky Y. (eds.) Bee products.* Springer, Boston, MA, USA, pp. 15–26.
25. Tautz J. 2016. Fenomenální včely: biologie včelstva jako superorganismu. Vydání v češtině třetí. Brázda, Praha, Česko.
26. Neumann P., Carreck N. L. 2010. Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 49 (1): 1–6.
27. vanEngelsdorp D., Evans J. D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B. K., Frazier M., Frazier J., Cox-Foster D., Chen Y., Underwood R., Tarry D. R., Pettis J. S. 2009. Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* 4 (8): e6481. DOI: 10.1371/journal.pone.0006481.
28. Desneux N., Decourtye A., Delpuech J.-M. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52: 81–106.
29. Johnson R. M., Ellis M. D., Mullin Ch. A., Frazier M. 2010. Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie* 41 (3): 312–331.
30. Erban T., Kamler M., Šulcová K., Titěra D., Seifrtová M., Riddellová K., Hubert J., Hortová B., Halešová T. 2016. Hodnocení vlivu xenobiotik na včely v průběhu ontogeneze metodami proteomické, metabolomické a genomické analýzy: certifikovaná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby (VÚRV), Praha, Česko. URL: <https://www.vurv.cz/sites/File/Publications/ISBN978-80-7427-210-3.pdf>
31. Krupke Ch. H., Hunt G. J., Eitzer B. D., Andino G., Given K. 2012. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS One* 7 (1): e29268. DOI: 10.1371/journal.pone.0029268.
32. Marzaro M., Vivian L., Targa A., Mazzon L., Mori N., Greatti M., Petrucco Toffolo E., Di Bernardo A., Giorio Ch., Marton D., Tappararo A., Girolami V. 2011. Lethal aerial powdering of honey bees with neonicotinoids from fragments of maize seed coat. *Bull. Insectol.* 64 (1): 119–126.
33. Henry M., Béguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J.-F., Aupinel P., Aptel J., Tchamitchian S., Decourtye A. 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* 336 (6079): 348–350.



34. Wu J. Y., Anelli C. M., Sheppard W. S. 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. PLoS One 6 (2): e14720. DOI: 10.1371/journal.pone.0014720.
35. Kairo G., Poquet Y., Haji H., Tchamitchian S., Cousin M., Bonnet M., Pelissier M., Kretzschmar A., Belzunces L. P., Brunet J.-L. 2017. Assessment of the toxic effect of pesticides on honey bee drone fertility using laboratory and semifield approaches: A case study of fipronil. Environ. Toxicol. Chem. 36 (9): 2345–2351.
36. El Hassani A. K., Dacher M., Gauthier M., Armengaud C. 2005. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). Pharmacol. Biochem. Behav. 82 (1): 30–39.
37. Schneider Ch. W., Tautz J., Grünewald B., Fuchs S. 2012. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. PLoS One 7 (1): e30023. DOI: 10.1371/journal.pone.0030023.
38. Thompson H. M. 2003. Behavioural effects of pesticides in bees—their potential for use in risk assessment. Ecotoxicology 12 (1–4): 317–330.
39. Booton R. D., Iwasa Y., Marshall J. A. R., Childs D. Z. 2017. Stress-mediated Allee effects can cause the sudden collapse of honey bee colonies. J. Theor. Biol. 420: 213–219.
40. Wegener J., Ruhnke H., Milchreit K., Kleebaum K., Franke M., Mispagel S., Bischoff G., Kamp G., Bienefeld K. 2016. Secondary biomarkers of insecticide-induced stress of honey bee colonies and their relevance for overwintering strength. Ecotoxicol. Environ. Saf. 132: 379–389.
41. Pilling E. D., Bromley-Challenor K. A. C., Walker C. H., Jepson P. C. 1995. Mechanism of synergism between the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and the imidazole fungicide prochloraz, in the honeybee (*Apis mellifera* L.). Pestic. Biochem. Physiol. 51 (1): 1–11.
42. Pilling E. D., Jepson P. C. 1993. Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*). Pestic. Sci. 39 (4): 293–297.
43. Johnson R. M., Dahlgren L., Siegfried B. D., Ellis M. D. 2013. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). PLoS One 8 (1): e54092. DOI: 10.1371/journal.pone.0054092.
44. Johnson R. M., Pollock H. S., Berenbaum M. R. 2009. Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. J. Econ. Entomol. 102 (2): 474–479.
45. Pettis J. S., vanEngelsdorp D., Johnson J., Dively G. 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. Naturwissenschaften 99 (2): 153–158.
46. Pettis J. S., Lichtenberg E. M., Andree M., Stitzinger J., Rose R., vanEngelsdorp D. 2013. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. PLoS One 8 (7): e70182. DOI: 10.1371/journal.pone.0070182.
47. Wu J. Y., Smart M. D., Anelli C. M., Sheppard W. S. 2012. Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. J. Invertebr. Pathol. 109 (3): 326–329.
48. Simon-Delso N., San Martin G., Bruneau E., Minsart L.-A., Mouret C., Hautier L. 2014. Honeybee colony disorder in crop areas: the role of pesticides and viruses. PLoS One 9 (7): e103073. DOI: 10.1371/journal.pone.0103073.



49. DeGrandi-Hoffman G., Chen Y., Simonds R. 2013. The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insects* 4 (1): 71–89.
50. Kakumanu M. L., Reeves A. M., Anderson T. D., Rodrigues R. R., Williams M. A. 2016. Honey bee gut microbiome is altered by in-hive pesticide exposures. *Front. Microbiol.* 7: 1255. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01255
51. Suchail S., Guez D., Belzunces L. P. 2001. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (11): 2482–2486.
52. Suchail S., Debrauwer L., Belzunces L. P. 2004. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Manag. Sci.* 60 (3): 291–296.
53. Seifrtova M., Halesova T., Sulcova K., Riddellova K., Erban T. 2016. Distributions of imidacloprid, imidacloprid-olefin and imidacloprid-urea in green plant tissues and roots of rapeseed (*Brassica napus*) from artificially contaminated potting soil. *Pest Manag. Sci.* 73 (5): 1010–1016.
54. Mullin Ch. A., Chen J., Fine J. D., Frazier M. T., Frazier J. L. 2015. The formulation makes the honey bee poison. *Pestic. Biochem. Physiol.* 120: 27–35.
55. Chauzat M.-P., Carpentier P., Martel A.-C., Bougeard S., Cougoule N., Porta P., Lachaize J., Madec F., Aubert M., Faucon J.-P. 2009. Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environ. Entomol.* 38 (3): 514–523.
56. Chauzat M.-P., Faucon J.-P. 2007. Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France. *Pest Manag. Sci.* 63 (11): 1100–1106.
57. Mullin Ch. A., Frazier M., Frazier J. L., Ashcraft S., Simonds R., vanEngelsdorp D., Pettis J. S. 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One* 5 (3): e9754. DOI: 10.1371/journal.pone.0009754.
58. Herrera López S., Lozano A., Sosa A., Hernando M. D., Fernández-Alba A. R. 2016. Screening of pesticide residues in honeybee wax comb by LC-ESI-MS/MS. A pilot study. *Chemosphere* 163: 44–53.
59. Ravoet J., Reybroeck W., de Graaf D. C. 2015. Pesticides for apicultural and/or agricultural application found in Belgian honey bee wax combs. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94 (5): 543–548.
60. Bargańska Z., Ślebioda M., Namieśnik J. 2014. Determination of pesticide residues in honeybees using modified QUEChERS sample work-up and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Molecules* 19 (3): 2911–2924.
61. Łozowicka, B. 2013. The development, validation and application of a GC-dual detector (NPD-ECD) multi-pesticide residue method for monitoring bee poisoning incidents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 97: 210–222.
62. Porrini C., Sabatini A. G., Girotti S., Fini F., Monaco L., Celli G., Bortolotti L., Ghini S. 2003. The death of honey bees and environmental pollution by pesticides: the honey bees as biological indicators. *Bull. Insectol.* 56 (1): 147–152.
63. Kasiotis K. M., Anagnostopoulos Ch., Anastasiadou P., Machera K. 2014. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: reported death incidents in honeybees. *Sci. Total Environ.* 485–486: 633–642.



64. Blacquièrè T., Smagghe G., van Gestel C. A. M., Mommaerts V. 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21 (4): 973–992.
65. Kiljanek T., Niewiadowska A., Posyniak A. 2016. Pesticide poisoning of honeybees: a review of symptoms, incident classification, and causes of poisoning. *J. Apic. Sci.* 60 (2): 5–24.
66. Fletcher M., Barnett L. 2003. Bee pesticide poisoning incidents in the United Kingdom. *Bull. Insectol.* 56 (1): 141–145.
67. Barnett E. A., Charlton A. J., Fletcher M. R. 2007. Incidents of bee poisoning with pesticides in the United Kingdom, 1994–2003. *Pest Manag. Sci.* 63 (11): 1051–1057.
68. Pistorius J., Bischoff G., Heimbach U., Stähler M. 2009. Bee poisoning incidents in Germany in spring 2008 caused by abrasion of active substance from treated seeds during sowing of maize. *In: Oomen P. A., Thompson H. M. (eds.) Hazards of pesticides to bees: 10th International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group, Bucharest (Romania), October 8–10, 2008. Julius-Kühn-Institut, Quedlinburg, Germany, pp. 118–126.*
69. Cutler G. Ch., Scott-Dupree C. D., Drexler D. M. 2014. Honey bees, neonicotinoids and bee incident reports: the Canadian situation. *Pest Manag. Sci.* 70 (5): 779–783.
70. Erban T., Trojakova L., Kamler M., Titera D. 2017. Detection of the desiccant and plant growth regulator chlormequat in honeybees and comb pollen. *Vet. Med. Czech* 62 (11): 596–603.
71. Modrá H., Svobodová Z. 2009. Incidence of animal poisoning cases in the Czech Republic: current situation. *Interdiscip. Toxicol.* 2 (2): 48–51.
72. ČR. 2004. Zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů. Sbírka zákonů ČR, částka 106/2004, 31. 5. 2004. URL: http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_zakon-2004-326-viceoblasti.html
73. ČR. 2017. Zákon č. 299/2017 Sb. Zákon, kterým se mění zákon č. 326/2004 Sb., o rostlinolékařské péči a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a další související zákony. Sbírka zákonů ČR, částka 104/2017, 16. 8. 2017. URL: <http://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/ViewFile.aspx?type=c&id=38292>
74. MZe ČR. 2012. Vyhláška č. 327/2012 Sb., o ochraně včel, zvěře, vodních organismů a dalších necílových organismů při použití přípravků na ochranu rostlin. Sbírka zákonů ČR, částka 119/2012, 3. 10. 2012. URL: http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-2012-327.html
75. MZe ČR. 2017. Vyhláška č. 428/2017 Sb., kterou se mění vyhláška č. 327/2012 Sb., o ochraně včel, zvěře, vodních organismů a dalších necílových organismů při použití přípravků na ochranu rostlin. Sbírka zákonů ČR, částka 152/2017, 4. 12. 2017. URL: http://eagri.cz/public/web/mze/ministerstvo-zemedelstvi/legislativa/chronologicky-prehled-pravnich-predpisu/_obsah_cz_mze_ministerstvo-zemedelstvi_legislativa_Legislativa-MZe_puvodni-zneni_vyhlaska-2017-428-novela-327-2012.html
76. ČR. 1997. Zákon č. 252/1997 Sb., o zemědělství. Sbírka zákonů ČR, částka 85/1997, 24. 9. 1997. URL: http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_zakon-1997-252-viceoblasti.html



77. Hubert J., Hortová B., Nesvorná M., Haltufová K., Kamler M., Titěra D., Erban T. 2016. Využití nové generace sekvencování pro diagnostiku původce moru včelího plodu *Paenibacillus larvae*: certifikovaná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby (VÚRV), Praha, Česko. URL: <https://www.vurv.cz/sites/File/Publications/ISBN%20978-80-7427-205-9.pdf>
78. Erban T., Hubert J., Hortová B., Nesvorná M., Kamler M., Tyl J., Titěra D. 2017. Využití kombinace laboratorních metod pro včasnou diagnostiku hniloby včelího plodu (původce *Melissococcus plutonius*): certifikovaná metodika. Výzkumný ústav rostlinné výroby (VÚRV), Praha, Česko & Výzkumný ústav včelařský (VÚVč), Dol, Česko. URL: <https://www.vurv.cz/sites/File/Publications/ISBN%20978-80-7427-212-7.pdf>
79. Alippi A. 2016. Chapter 2.2.2: American foulbrood of honey bees (infection of honey bees with *Paenibacillus larvae*). In: OIE (ed.) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2017. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France. URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.02_AMERICAN_FOULBR_OOD.pdf
80. Fries I. 2013. Chapter 2.2.4: nosemosis of honey bees. In: OIE (ed.) Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2017. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France. URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.02.04_NOSEMOSIS_FINAL.pdf
81. Erban T., Harant K., Hubalek M., Vitamvas P., Kamler M., Poltronieri P., Tyl J., Markovic M., Titera D. 2015. In-depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. Sci. Rep. 5: 13907. DOI: 10.1038/srep13907.
82. Matušková L., Erban T. 2013. Desikace je možný zdroj otravy včel. Včelařství 66 (12): 406–407.
83. Anastassiades M., Lehotay S. J., Štajnbaher D., Schenck F. J. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. J. AOAC Int. 86 (2): 412–431.

T A

Č R

Technologická
agentura
České republiky

Program **Alfa**



Otravy včel pesticidy



ISBN 978-80-7427-252-3