

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra ochrany rostlin**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv teploty na negativní účinky fungicidů na včely**

**Diplomová práce**

**Bc. Dominika Komárková**

**Zemědělství a rozvoj venkova: Ekologické zemědělství**

**Vedoucí práce: RNDr. Jan Raška, Ph.D.**

© 2024 ČZU v Praze



## **Čestné prohlášení**

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

V Praze dne 21.04.2024

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Janu Raškovi, Ph.D za odborné vedení, cenné rady a neobyčejně přátelský přístup. Děkuji také svým přátelům a spolužákům, kteří mi byli po celou dobu studia velkou oporou a učinili pro mě tato studentská léta výjimečnými. V neposlední řadě patří mé velké díky rodině za poskytnuté vzdělání a nepomíjející podporu v průběhu celého studia.

# Vliv teploty na negativní účinky fungicidů na včely

## Souhrn

Pesticidní přípravky představují základní nástroj v boji proti škůdcům a chorobám v zemědělství, avšak jejich intenzivní používání může mít vážné důsledky na životní prostředí a biodiverzitu, včetně včelích populací. Včely medonosné, jako klíčoví opylovači, jsou zvláště citlivé na účinky pesticidů, které mohou způsobit nejen mortalitu, ale i subletální efekty, jako je narušená schopnost pohybu či snížený příjem potravy. Tato práce se zaměřuje na studium toxicity fungicidních přípravků Pictor (s účinnými látkami boskalid a dimoxystrobin) a Prosaro (s účinnými látkami tebuconazol, prothiokonazol) na včely medonosné za různých teplotních podmínek. V návaznosti na snazší pochopení problematiky těchto fungicidních přípravků na včely medonosné byl proveden experiment orální toxicity podle standardizovaného postupu dle OECD, který byl následně sledován po dobu 96 hodin. Tento časový rámec umožnil zachytit letální/subletální účinky fungicidů na experimentální jedince včely medonosné. To bylo klíčové pro pochopení komplexních interakcí mezi účinky pesticidů a vlivem teploty na včelí kolonie. Na základě získaných dat jsem zjišťovala zda, a případně jak teplota působí na účinky použitých fungicidů. Experiment potvrdil rozdílnou toxicitu mezi fungicidy Pictor a Prosaro, kde Pictor vykazoval nižší úroveň mortality než Prosaro. Významný rozdíl v účincích teploty na mortalitu včel medonosných byl zaznamenán nultý den experimentu, kdy nejvyšší úroveň mortality dosahovala teplota 27 °C ve srovnání s teplotami 19 °C a 23 °C. Naopak čtvrtý den byl významný pro teplotu 19 °C, která byla spojena s vyšší mortalitou v porovnání s teplotou 23 °C.

**Klíčová slova:** Apis mellifera, opylovači, pesticidy, toxicita, včela medonosná

# Effect of temperature on negative effects of fungicides on bees

## Summary

Pesticides are an essential tool in the fight against pests and diseases in agriculture, but their intensive use can have serious consequences for the environment and biodiversity, including bee populations. Honey bees, as key pollinators, are particularly vulnerable to the effects of pesticides, which can cause not only mortality but also sub-lethal effects such as impaired mobility or reduced food intake. This work focuses on the study of the toxicity of the fungicide products Pictor (with the active substances boscalid, dimoxystrobin) and Prosaro (with the active substances tebuconazole and prothioconazole) on honey bees under different temperature conditions. In order to facilitate the understanding of these fungicidal products on honey bees, an oral toxicity experiment was conducted according to the standardized OECD procedure and subsequently monitored for 96 hours. This time frame allowed the lethal/sublethal effects of the fungicides on the experimental honey bee individuals to be captured. This was critical for understanding the complex interactions between the effects of pesticides and the effects of temperature on honey bee colonies. Based on the data collected, I investigated whether, and if so how, temperature affects the effects of the fungicides used. The experiment confirmed the different toxicity between the fungicides Pictor and Prosaro, with Pictor showing lower levels of mortality than Prosaro. A significant difference in the effects of temperature on honey bee mortality was observed on day zero of the experiment, with the highest mortality levels at 27 °C compared to 19 °C and 23 °C. Conversely, on the fourth day, the temperature of 19 °C was significant and was associated with higher mortality compared to 23 °C.

**Keywords:** *Apis mellifera*, pollinators, pesticides, toxicity, honey bee

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b> .....	<b>4</b>
<b>3.1</b>	<b>Biologie včel a jejich role v ekosystému</b> .....	<b>4</b>
3.1.1	Role včel ve vztahu k diverzitě rostlin .....	4
3.1.2	Role včel v lidské společnosti a ekonomice .....	5
3.1.3	Role včel jako bioindikátorů změn v životním prostředí .....	5
3.1.4	Důsledky intenzivního zemědělství na zdraví včel .....	6
<b>3.2</b>	<b>Včela medonosná</b> .....	<b>6</b>
<b>3.3</b>	<b>Negativní účinky pesticidních přípravků na včelu medonosnou</b> .....	<b>7</b>
3.3.1	Mechanismy expozičního rizika včely medonosné vůči pesticidům .....	8
3.3.2	Možnosti ochrany včely medonosné před pesticidy .....	9
3.3.3	Vliv teploty na včely medonosné a dalšího hmyzu k pesticidům .....	11
<b>3.4</b>	<b>Nejrizikovější skupiny pesticidů pro včelí opylovače</b> .....	<b>13</b>
3.4.1	Zoocidy .....	13
3.4.2	Herbicidy .....	14
3.4.3	Fungicidy .....	15
3.4.4	Pesticidy použité v praktické části .....	17
3.4.4.1	Pictor .....	18
3.4.4.2	Prosaro .....	18
3.4.4.3	Mospilan .....	19
<b>4</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>Získávání živého materiálu a fungicidů</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2</b>	<b>Průběh testování</b> .....	<b>20</b>
<b>4.3</b>	<b>Zpracování statistické analýzy dat</b> .....	<b>24</b>

<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>25</b>
<b>5.1</b>	<b>Analýza zkonsumovaného množství podaného roztoku</b> .....	<b>25</b>
<b>5.2</b>	<b>Mortalita 0 Den</b> .....	<b>26</b>
5.2.1	Analýza moribundních včel medonosných v nultém dni .....	26
5.2.2	Porovnání účinků pesticidů na mortalitu včel medonosných .....	26
5.2.3	Srovnání teploty a její vliv na mortalitu včel medonosných .....	26
<b>5.3</b>	<b>Mortalita 1 Den</b> .....	<b>27</b>
5.3.1	Porovnání účinků pesticidů na mortalitu včel medonosných .....	27
5.3.2	Srovnání teploty a její vliv na mortalitu včel medonosných .....	27
<b>5.4</b>	<b>Mortalita 2 Den</b> .....	<b>27</b>
5.4.1	Porovnání účinků pesticidů na mortalitu včel medonosných .....	27
5.4.2	Srovnání teploty a její vliv na mortalitu včel medonosných .....	28
<b>5.5</b>	<b>Mortalita 4 Den</b> .....	<b>28</b>
5.5.1	Srovnání účinků pesticidů s negativní kontrolní skupinou na mortalitu včel medonosných .....	28
5.5.2	Porovnání účinků pesticidů na mortalitu včel medonosných .....	28
5.5.3	Srovnání teploty s pesticidy a její vliv na mortalitu včel medonosných ...	28
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>36</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>37</b>
<b>9</b>	<b>Seznam obrázků, tabulek a grafů</b> .....	<b>57</b>
<b>9.1</b>	<b>Seznam Obrázků</b> .....	<b>57</b>
<b>9.2</b>	<b>Seznam Tabulek</b> .....	<b>57</b>
<b>9.3</b>	<b>Seznam Grafů</b> .....	<b>57</b>



# 1 Úvod

Je známo, že volně žijící a chovné včely přinášejí lidem značné výhody, neboť opylují plodiny a planě rostoucí rostliny, čímž přispívají k udržení zdraví a funkčnosti rostlinných ekosystémů a potravinové bezpečnosti (Potts et al. 2016). V řadě oblastí světa byl zaznamenán úbytek volně žijících a domestikovaných opylovačů (Zattara & Aizen 2021). Tento úbytek přímo ohrožuje mnoho aspektů lidského blahobytu prostřednictvím ztrát opylovacích služeb. Pozoruhodné je, že produkce potravin je na opylování hmyzem velmi závislá, neboť přibližně 75 % hlavních druhů plodin pěstovaných po celém světě je do určité míry na opylovačích přímo závislých, pokud jde o množství a kvalitu jejich výnosů (Klein et al. 2007). Produktivita těchto plodin závislých na opylovačích, mezi něž patří většina ovoce, semen a ořechů je obzvláště důležitá pro vyváženou lidskou výživu, jelikož většina těchto plodin je primárním zdrojem nutričních mikroprvků (Eilers et al. 2011). Globální zemědělství se v posledních desetiletích značně rozšířilo, přičemž výrazně vzrostl rozsah pěstování plodin vysoce závislých na opylovačích (Aizen et al. 2008). Ačkoli se celosvětová závislost na opylovačích zvyšuje, mnoho moderních zemědělských postupů nadále ohrožuje včely a jejich opylovací služby (Aizen et al. 2019). Vzhledem k rostoucí lidské populaci, která by měla do roku 2037 dosáhnout devíti miliard lidí (Zeifman et al. 2022), se zvýšení udržitelné produkce potravin při minimalizaci možných negativních dopadů na životní prostředí stalo jednou z největších výzev 21. století. Klíčovou prioritou pro dosažení udržitelné globální produkce potravin je nalezení rovnováhy mezi účinnou ochranou zemědělských rostlin před škůdci a chorobami a zachováním zdravých populací opylovačů (Godfray et al. 2010). V moderním zemědělství se pesticidy intenzivně používají ke zmírnění přímého dopadu škůdců nebo plevelů na výnos plodin (Kudsk et al. 2018). Bohužel současné používání těchto přípravků může ohrozit ekosystémové služby poskytované hmyzími opylovači tím, že je vystavuje škodlivým chemickým látkám (Johnson 2015). Konkrétně insekticidy představují pro včelí populace největší riziko, protože jsou určeny k hubení hmyzu (Sanchez-Bayo & Goka 2014). Herbicidy jsou považovány za méně rizikové, nicméně mohou včelám uškodit buď přímo orální nebo kontaktní expozicí (Sharma et al. 2018), nebo nepřímo tím, že snižují rozmanitost a početnost kvetoucích rostlin, které jsou důležitým zdrojem potravy opylovačů (Bretagnolle & Gaba 2015). Oproti tomu je v současné době velmi málo informací o tom, zda fungicidy, jejichž aplikace v celosvětovém měřítku převyšují používání insekticidů a herbicidů, představují riziko pro včely a další hmyzí opylovače (Cullen et al. 2019).

Z důvodu rostoucího povědomí o komplexnosti interakcí mezi fungicidy a včelami, je proto zásadní zkoumat faktory, které mohou modulovat jejich negativní účinky. Jedním z těchto faktorů může být závislost toxicity na teplotě, a to prostřednictvím různých mechanismů, jako je například metabolismus včel (DesJardins et al. 2021). Teplota prostředí může hrát klíčovou roli při reakcích včelího organismu na chemické látky, přičemž nízké teploty mohou snižovat metabolické procesy, a naopak zvýšená teplota může tyto procesy urychlovat (Saleem et al. 2020). V rámci diplomové práce, se proto budeme zaměřovat na to, zda a jakým způsobem teplota ovlivňuje reakce včel medonosných na expozici fungicidům, a zda existuje interakce mezi teplotou a mechanismy, které ovlivňují účinky fungicidů na metabolické procesy u těchto opylovačů.

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

- Vyhodnotit míru negativních účinků pesticidů na opylovače.
- Shrnout dosavadní poznatky o rozdílné toxicitě dvou běžně používaných fungicidů Pictor a Prosaro.
- Specifikovat vliv teploty během podání fungicidů na včelu medonosnou.

Vědecká hypotéza bude systematicky ověřována v rámci pečlivě navržených a standardizovaných laboratorních experimentů, aby poskytla hlubší pochopení komplexních faktorů, které ovlivňují bezpečnost včel v souvislosti s používáním fungicidů v zemědělství. Bude testovány možné účinky fungicidů na včelu medonosnou v závislosti na teplotě v návaznosti na možné ovlivňující mechanismy jako je metabolismus včel.

- $H_0$  = Teplota nemá žádný významný vliv na negativní účinky fungicidů na včelu medonosnou.
- $H_A$  = Teplota má významný vliv na negativní účinky fungicidů na včelu medonosnou.

### **3 Literární rešerše**

Literární rešerše této diplomové práce se zabývá komplexním přehledem relevantní literatury a studií, které pomáhají konceptualizovat, interpretovat naše vlastní výsledky praktické části a přispět k hlubšímu porozumění problematice mezi pesticidy a zdravím včel.

#### **3.1 Biologie včel a jejich role v ekosystému**

Opylovači jsou živočichové, kteří přenášejí pyl ze samčích pohlavních orgánů rostlin na samičí pohlavní orgány rostlin, čímž umožňují oplození rostlin a následné reprodukční procesy. Dominantní skupinami opylovačů jsou hmyzí zástupci jako jsou včely, vosy, čmeláci, pestřenky, motýli, brouci a další druhy létajícího hmyzu (Hradská 2016). Včely jsou skupinou hmyzích opylovačů, která patří do řádu Hymenoptera nadčeledi Apoidea. Tato nadčeď zahrnuje několik různých čeledí, včetně podskupiny Anthophila. Do této podskupiny řadíme čeledi Andrenidae, Apidae, Colletidae, Halictidae, Megachilidae, Melittidae a Stenotritidae (Straka et al. 2007).

Včely (Anthophila) jsou všeobecně považovány za klíčovou skupinu opylovačů, jejichž úloha je nezastupitelná při procesu opylování, což je základní ekosystémová služba pro biodiverzitu rostlin, kvalitu polních plodin, zeleniny a ovoce. Kromě toho jsou konkrétně včely medonosné a jejich produkty cennými bioindikátory znečišťujících látek, jako jsou prachové částice v ovzduší, těžké kovy a pesticidy (Papa et al. 2022).

##### **3.1.1 Role včel ve vztahu k diverzitě rostlin**

Ekosystémy podporují lidský život poskytováním řady služeb a přínosů, které se dělí na zásobovací (např. potraviny, voda a suroviny), regulační (např. procesy regulující klima, povodně, nemoci a opylování) a kulturní (např. cestovní ruch, rekreace, mystika) (World Health Organization 2005). Služby a přínosy poskytované ekosystémy jsou ovlivněny také podpůrnými službami, které přináší člověku nepřímý užitek, jako je koloběh živin, tvorba půdy, udržování biologické rozmanitosti (Papa et al. 2022). Opylování hmyzem je jedna ze služeb, kterou ekosystém poskytuje zcela zdarma. Opylování způsobené hmyzem se týká stovek druhů rostlin, které hmyz navštěvuje a hledá v nich nektar či pyl. Hmyz, který se živí nektarem a pylem, může při hledání potravy neúmyslně přenést pylová zrna na květní stélku, čímž usnadní oplodnění (Fleming & Muchhala 2008).

Vzhledem k tomu, že opylování a interakce mezi rostlinami a opylovači mají zásadní význam pro reprodukční úspěch a produkci plodů kvetoucích rostlin, podporuje tato ekosystémová služba zachování biologické rozmanitosti rostlin a je úzce spjata se všemi podpůrnými, regulačními a zásobovacími službami, které vyplývají ze suchozemské vegetace (Ollerton 2017). Opylování je nejen přímo zodpovědné za udržení a šíření kvetoucích druhů, ale také podporuje existenci dalších členů ekosystému, kteří jsou závislí na rostlinných zdrojích (Potts et al. 2006). Květy představují také klíčová mikrostaniště pro řadu bezobratlých živočichů, kteří zde hledají místa k odpočinku či k páření (Wardhaugh et al. 2012). Předpokládá se, že kvetoucí rostliny také podpořily šíření různých linií obratlovců, bezobratlých živočichů a epifytických rostlin v tropických deštných lesích (Boyce & Lee 2010). Vzhledem k mimořádně vysokým transpiračním schopnostem hrají krytosemené rostliny klíčovou roli v mikro a makro klimatu a přispívají k vlhkému klimatu a srážkám, které jsou hlavními faktory tropické biodiverzity (Papa et al. 2022).

### **3.1.2 Role včel v lidské společnosti a ekonomice**

Volně žijící a domestikované včely jsou nejdůležitější skupinou opylovačů a úloha, kterou hrají v přírodě a agrosystémech, je stále patrnější a uznávanější (Földesi et al. 2021). Hmyzí opylovači poskytují své opylovací služby více než 70 % světových plodin (Ollerton et al. 2011) a ve druhé polovině minulého století pomohli svou bezplatnou regulační službou zvýšit celosvětovou produkci potravin o 15 až 30 % (Papa et al. 2022). Osmdestát procent celosvětových zemědělských opylovacích služeb připadá na včely medonosné (Breeze et al. 2011), ekonomicky nejcennějšího opylovače několika světových monokultur plodin. Včely jsou snadno ovladatelné a přepravitelné a příjmy, které včela medonosná poskytuje díky poskytování mnoha jejích produktů, u ní učinily nejcennějšího opylovače využívaného ke zvýšení zemědělské produkce již od starověku (Liv et al. 2020).

### **3.1.3 Role včel jako bioindikátorů změn v životním prostředí**

Včely, jakožto široce dostupný bioindikátor, mohou poskytovat užitečné informace pro účely monitoringu (Prosser & Hebert 2017), které lze využít k hodnocení a sledování změn kvality zemědělských ekosystémů (Quigley et al. 2019). Při přechodu z květu na květ přichází do styku s velkým množstvím škodlivin. Včely mohou hromadit škodlivé látky mnoha způsoby. Během letu a při sběru potravy shromažďují vzdušné částice a prachové usazeniny na povrchu, na kterém přistanou (Capitani et al. 2021).

Škodlivé látky se mohou hromadit v medu, vosku, propolisu nebo jiných včelích produktech. Kontaminanty se mohou také koncentrovat na těle larev nebo dospělců (González-al Caraz et al. 2020). Platnost včel jako biologických indikátorů byla prokázána pro agrochemikálie, těžké kovy, polycyklické aromatické uhlovodíky, radionuklidy, polychlorované bifenyly a pevné částice (de Oliveira et al. 2016). Včela se tak stává platným nástrojem pro identifikaci způsobu použití látek s rizikem toxicity a upozorňuje na možné nesprávné použití pesticidů v reálném čase (Zioga et al. 2020).

#### **3.1.4 Důsledky intenzivního zemědělství na zdraví včel**

Používání insekticidů a jimi zamořené prostředí je považováno za hlavní faktor ovlivňující včelstva, nejčastěji prostřednictvím květů, se kterými přijdou dělnice do kontaktu při obstarávání potravy (Watson & Stallins 2016). Je známo, že včely mají ve srovnání s jiným hmyzem omezený počet detoxikačních hormonů, proto je jejich citlivost na pesticidy o poznání větší (Claudianos et al. 2006). Molekuly pesticidů, pokud nezpůsobí bezprostřední smrt včel, mohou negativně ovlivnit jejich orientaci a schopnost letu, což včelám ztěžuje návrat do kolonie. V případě, že se včelám podaří přece jen návrat do hnízda, často sebou přináší i produkty kontaminované pesticidy, což následně může způsobit oslabení nebo v krajním případě i úhyn celé kolonie (Tosi & Nieh 2017). Používání chemických molekul, tedy insekticidů, herbicidů, fungicidů a akaricidů se významně zvýšilo zejména s rozvojem světového zemědělství (Carvalho 2017). Vývoj a používání těchto molekul usnadňuje řízení hospodaření s plodinami, zlepšuje jejich kvalitu a zvyšuje produkci potravin. Negativní faktorem, který je třeba vzít v úvahu je právě dopad na opylovače. Studie ukazují, že k prvnímu snížení počtu včel došlo mezi 40. a 60. lety, což se shoduje s nárůstem intenzivní zemědělské výroby a zvýšeným použitím zemědělských vstupů do prostředí (Grixti et al. 2009). Od této doby se množství výzkumů týkajících se používání pesticidů ve vztahu k opylovačům zvýšilo (Abati et al. 2021).

### **3.2 Včela medonosná**

Včely medonosné patří do hmyzího řádu blanokřídlých, který zahrnuje mimo jiné pilatky, vosy, mravence a včely. Blanokřídlí vykazují haplodiploidní určování pohlaví, kdy samci vznikají z neoplozených haploidních vajíček a samice z oplozených diploidních vajíček (Morse & Calderone 2000). Haplodiploidie má ve srovnání s jinými organismy odlišné mechanismy určování pohlaví, protože blanokřídlí postrádají pohlavní chromozomy (Beye et al. 2003).

Rozmanitost včelího života přináší jedinečné životní cykly a sociální struktury, které tvoří jejich kolonie. Rozdělení na královny a dělnice probíhá prostřednictvím hormonálně zprostředkovaných programů genové exprese, které jsou založeny na výživě a přinášejí dramatické rozdíly v morfologii, fyziologii a chování (Evans & Wheeler 2001).

Královny, obvykle tedy jedna na včelstvo, mají desetkrát delší život než dělnice, většinou tedy 1 až 2 roky (Page & Peng 2001), kladou až 2000 vajíček denně a uchovávají sperma po celé roky, aniž by ztratilo životaschopnost. Dělnice, kterých je v každé kolonii několik tisíc, mají sofistikované kognitivní schopnosti, přestože jejich mozek obsahuje pouze jeden milion neuronů (Witthöft 1967). To je o pět řádů méně, než má lidský mozek a pouze čtyřikrát více než mozek octomilky, která má mnohem jednodušší chování. Dělnice dokáží spojovat barevnost, tvar, vůni nebo umístění květu s potravní odměnou, což zvyšuje efektivitu při hledání potravy (Menzel 2001). Fascinujícím jevem je přezimování poslední generace dělnic, která přežívá chladné zimní měsíce, což je klíčový moment pro zachování a obnovení včelí kolonie v novém roce. Nová včelí královna se vyvíjí z larvy, která je krmena speciální potravou obsahující bílkoviny. Tento proces podtrhuje význam stravy pro determinaci osudu larvy a vytváření důležité role královny v kolonii. Během období rojení dochází k jevu, kdy stávající královna opouští kolonii s několika dělnicemi, zatímco nová královna zůstává a přebírá vedení kolonie. Dělnice a jejich práce představuje klíčový aspekt pro fungování celé kolonie. Jejich povinnosti zahrnují sběr a přenášení pylu, což je základní faktor pro přežití kolonie, ale také pro výrobu včelích produktů (Skalka 2009).

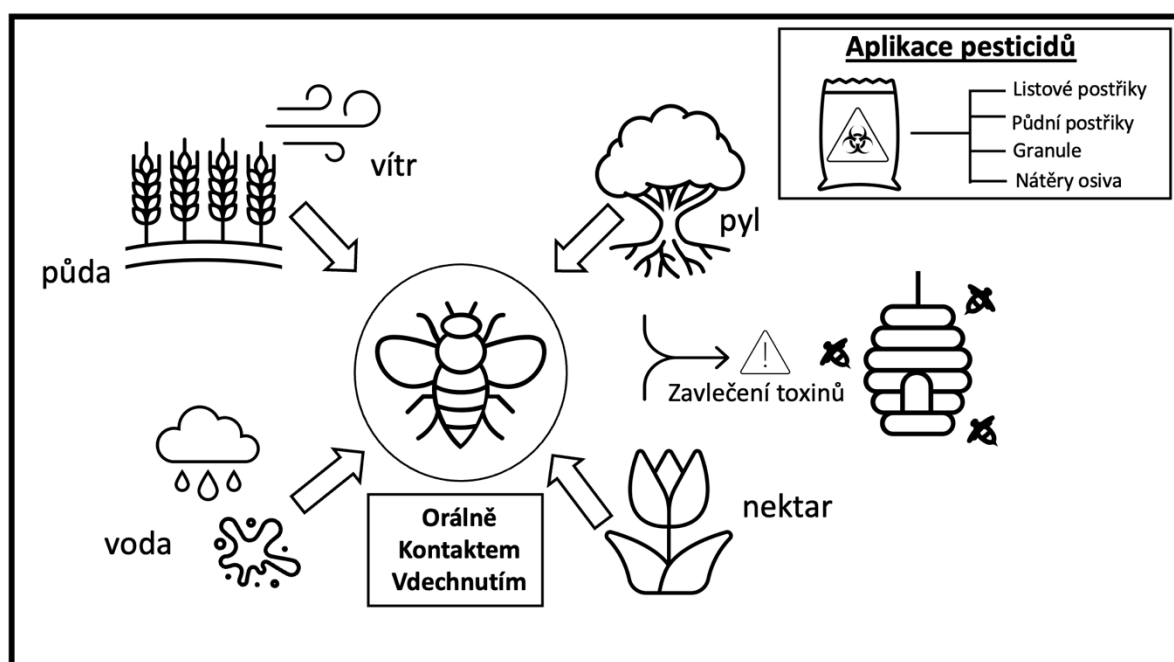
Včely medonosné jsou klíčovými opylovači, kteří hrají zásadní roli při udržování ekologické rovnováhy (Hung et al. 2018). Jsou důležité nejen pro zemědělskou produkci, ale mají také významnou úlohu při monitorování ekologického znečištění, ve farmaceutickém průmyslu a při poskytování kulturních a ekosystémových služeb (Covaci et al. 2023). Proto je pozorovaný úbytek včel medonosných v různých částech světa stále větším problémem vzhledem k jejich ekologickému, socioekonomickému a sociokulturnímu významu (Abati et al. 2021). Mezi hlavní příčiny, které mohou přispívat k úbytku včel řadíme nemoci, odlesňování, požáry, neadekvátní zásahy chovatelů včel, fragmentace lesů, pesticidy a roztoči, jako například *Varroa* (Kinoshita et al. 2006).

### **3.3 Negativní účinky pesticidních přípravků na včelu medonosnou**

Pesticidy zahrnují širokou škálu chemických látek určených k potlačení škodlivých organismů. Jedná se o přípravky, které mají za cíl hubit rostlinné a živočišné škůdce a tím chránit rostliny (Mahmood et al. 2016).

### 3.3.1 Mechanismy expozičního rizika včely medonosné vůči pesticidům

K vystavení opylovačů kontaminantům z prostředí může dojít buď orálně, kontaktem, nebo v menší míře vdechováním odpařených částic ve vzduchu (viz Obr. 1) (Stanley & Preetha 2016). Pravděpodobnost expozice hmyzích opylovačů reziduím pesticidů úzce souvisí s tím, jak a kdy je pesticid aplikován, s jakou látkou a s jakými dalšími chemickými látkami interaguje (Boyle et al. 2019). Pesticidy mohou být aplikovány jako listové postřiky, jako půdní postřiky nebo granule zapracované do půdy nebo jako nátěry osiva (Zubrod et al. 2019). Při postřiku plodin pesticidy mohou být kapičky unášeny z místa aplikace větrem, mohou dopadnout přímo na opylovače, kteří hledají potravu nebo létají v blízkosti ošetřených plodin (Sanchez-Bayo & Goka 2016).



Obrázek 1: Možné mechanismy rizika expozice pesticidy pro včely medonosné (upraveno dle Johnson 2015)

Odnos postřiku může také kontaminovat blízké zdroje potravy a hnízdění, jako jsou divoké květiny, půda a voda (Zubrod et al. 2019). To může vést jak k požití kontaminovaného pylu a nektaru, tak k přímé kontaktní expozici necílových organismů, kteří přistanou na kontaminovaném povrchu, jako je půda, trávníky, květy, listy a další přírodní nebo umělé hnízdní materiály (Gradish et al. 2019). Rostliny rostoucí v blízkosti zemědělských plodin ošetřených systémovými pesticidy mohou také přijímat malá množství reziduí, která se rozptýlí v okolní půdě bočním prouděním vody, nebo se mohou kontaminovat v důsledku přestřiku (Main et al. 2020).



Jedním z nejčastěji uváděných způsobů expozice včel medonosných pesticidům je požití kontaminovaného nektaru, pylu, vody a trávících tekutin (Godfray et al. 2014). Ke kontaminaci květních zdrojů může dojít také u okrasných rostlin, protože mnohé z nich jsou krátce před prodejem ošetřeny systémovými fungicidy a insekticidy (Lentola et al. 2017). Hladiny a biologická dostupnost pesticidů, a to jak v pylu, tak na povrchu rostlin, se po zaschnutí postřiků obvykle snižují (Tong et al. 2018), ale hladiny reziduí mohou několik dní po aplikaci stále představovat mírné nebo nepřijatelné riziko (Rundlöf & Lundin 2019). U včel medonosných jsou pyl a nektar dopravovány do včelstva a následně zpracovávány na včelí chléb a med. V těchto zásobách potravy mohou po značnou dobu zůstat rezidua pesticidů, kterými jsou krmeny larvy a královny (Mullin et al. 2010). Kromě nektaru a pylu dělnice včely medonosné aktivně sbírají vodu z blízkých rybníků, vlhkého listí, rosy a povrchové vody z vlhké půdy, aby ochladily úl, připravily potravu pro larvy a pro vlastní metabolismus (Schmaranzer 2000). Tato voda může být znečištěna pesticidy uvolněnými z vegetace po dešti, odnosem z postřiků nebo splachem na kontaminovaný povrch půdy (Cutler et al. 2014). Kromě častého výskytu pesticidů v závlahové vodě, potocích a řekách (Zubrod et al. 2019) byla rezidua pesticidů nalezena také v kalužích povrchové vody, které se vytvořily na kukuřičných polích po dešti (McCune et al. 2021).

### **3.3.2 Možnosti ochrany včely medonosné před pesticidy**

Většina moderního zemědělství se při ochraně úrody spoléhá na pesticidy (Willer et al. 2024). Ačkoli tedy pesticidy mohou mít negativní dopady na životní prostředí, jsou v současnosti nedílnou součástí pro zajištění dostatečné globální produkce potravin (Crowder & Illan 2021). Přestože se pozornost kolem negativních dopadů pesticidů na životní prostředí soustředí na vyřazení látek z používání (Goulson 2018), pokrok je omezený zejména kvůli nedostatku dostupných alternativních možností, jak zachovat zemědělskou produkci (Beckie et al. 2020). Je pravděpodobné, že ke snížení škod na životním prostředí způsobených pesticidy bude zapotřebí různých metod (Straw & Stanley 2023). Mnoho států vyvíjí značné úsilí o upuštění od plošného používání pesticidů, a to prostřednictvím pokynů a nátlaku na zemědělce (Environmental Protection Agency 2023). Jedním z příkladů je strategie Evropské unie Farm to Fork, jejímž cílem je snížit používání pesticidů a rizika s nimi spojená o 50 % do roku 2030. Vzhledem k tomu, že pesticidy jsou a v dohledné budoucnosti budou součástí našeho systému produkce potravin, je na místě se zabývat myšlenkou omezení použití toxických látek v zemědělství (Straw & Stanley 2023).

Způsob používání pesticidů je rozhodující pro určení jejich toxicity pro životní prostředí. Například pesticid aplikovaný v době květu může být pro opylovače vysoce škodlivý, zatímco aplikace mimo období květu nemusí způsobit žádné nebo jen minimální škody (Havstad et al. 2019). Teoreticky je tedy možné, že dopad pesticidů na životní prostředí lze alespoň částečně omezit od jejich používání zavedením zmírňujících opatření. Zmírňující opatření jsou přijatá opatření, která snižují potencionální negativní účinky aplikace pesticidů a zároveň aplikaci umožňují. Patří mezi ně například používání trysek s nízkým úletem nebo aplikace pesticidů pouze za určitých povětrnostních podmínek. Mnohá zmírňující opatření jsou již povinně uvedena na etiketě pesticidních přípravků nebo ve vládních pokynech. Přinejmenším v Evropské unii je dodržování těchto opatření zákonným požadavkem, za jehož nedodržení hrozí sankce. Zemědělci v rámci Evropské unie musí rovněž zaznamenávat míru použití pesticidů v rámci své zemědělské produkce (Straw & Stanley 2023). V řadě případů mohou být opatření navrhována jako součást poradenství nebo pokynů poskytovaných zemědělcům kromě toho, co je uvedeno v pokynech na etiketách pesticidních přípravků. Několik významných opatření zahrnuje volitelnou aplikaci pesticidů mimo dobu potravní aktivity opylovačů a zavedení praktických opatření na ochranu včel, jako je zakrytí včelstev během aplikace toxických látek (Moffett et al. 1981). Vzhledem k rozsahu a dopadu používání pesticidů je důležité, aby použitá opatření byla účinná (Randall et al. 2015). Stávajícím zmírňujícím opatřením, které se používá u mnoha insekticidů, je aplikace jen v určité růstové fázi plodiny. Obvykle se jedná o omezení postřiku ve fázi kvetení nebo krátce před ním. Bylo zjištěno, že aplikace neonikotinoidního insekticidu během kvetení jetele vedla k mnohem vyššímu počtu detekce pozitivních případů intoxikace u čmeláků, než když byla stejná aplikace provedena před květem (Havstad et al. 2019). Další zmírňující opatření souvisí se zavlažováním po aplikaci pesticidů. Zavlažování se používá k udržení dobré závlahy plodin, nicméně může také způsobit přesun reziduí do půdy. Bylo zjištěno, že zavlažování okrasných rostlin po aplikaci neonikotinoidů snížilo reprodukci a potravní aktivitu opylovačů (Cecala & Wilson Rankin 2021). Na etiketách insekticidů se často doporučuje odstranit kvetoucí plevely z postřikové plochy, aby se zabránilo přímému postřiku necílových organismů (Straw 2022). Jednou z možností je také použití herbicidů k odstranění kvetoucích plevelů (McDougall et al. 2021).

### 3.3.3 Vliv teploty na včely medonosné a dalšího hmyzu k pesticidům

Hmyzí opylovači jsou rozšířeni v širokém geografickém měřítku se značně rozdílnými klimatickými podmínkami (Ruttner 1998). Změna klimatu a intenzifikace zemědělství vystavují hmyzí opylovače extrémním teplotám a zvyšují používání pesticidů. Tepelná tolerance se navíc může mezi populacemi opylovačů pocházejícími z různých prostředí výrazně lišit (Käfer et al. 2020), což platí i pro expozici pesticidům (Hawkins et al. 2018). Přesto dosud není známa přesná kvantifikace toho, jak teplota modeluje účinky pesticidů na opylovače (Kenna et al. 2023). Stejně jako ostatní ektotermové jsou i včely medonosné závislé na teplotě prostředí, která je nezbytná pro jejich růst, vývoj a rozmnožování (Deutsch et al. 2008). Vystavení vysokým teplotám obecně zvyšuje metabolickou aktivitu hmyzu, což ovlivňuje rychlost vývoje a celkové fyziologické fungování (González-Tokman et al. 2020). Tyto účinky jsou doprovázeny zvýšením energetického výdeje (Brown et al. 2004), což vede k mobilizaci a spotřebě uložených metabolických zdrojů (Storey & Storey 2004), které v konečném důsledku ovlivňují velikost těla, životnost a plodnost (Zhang et al. 2015). Řada studií ukazuje, že tepelný stres zvyšuje vyčerpání tukových tělesných zásob (Fliszkiewicz et al. 2012). Tukové těleso hraje klíčovou roli nejen při ukládání a uvolňování energie v reakci na metabolické požadavky, ale také při fungování významných fyziologických procesů, hormonální regulace a imunitní reakce (Skowronek et al. 2021). Pro mnoho organismů včetně včel medonosných je tedy teplota důležitou proměnou prostředí, která může ovlivňovat fyziologické mechanismy na enzymatické a buněčné úrovni, což vede ke změnám rychlosti metabolismu (Willming et al. 2013). Tyto teplotní vlivy mohou modifikovat schopnost organismu detoxikovat xenobiotika tím, že mění rychlost příjmu, vylučování nebo biotransformace kontaminantů (Hooper et al. 2013), což v konečném důsledku ovlivňuje toxikokinetické a toxikodynamické procesy a toxicitu. Například je známo, že některé organofosfátové insekticidy vykazují zvýšenou toxicitu při zvýšených teplotách, zatímco u pyretroidních insekticidů byla prokázána zvýšená toxicita při expozici nižším teplotám (Harwood et al. 2009). Vzhledem k tomu, že toxicita některých zemědělských chemických látek je prokazatelně závislá na teplotě, je posouzení interakcí mezi teplotou a kontaminantem u těchto látek zásadní. Většina studií však tuto závislost stanovila na základě expozice při sérii neměnných teplot. Takové konstantní teplotní režimy nemusí nutně odrážet realitu v jednotlivých ekosystémech, kde teploty vykazují denní výkyvy. Tyto výkyvy mohou působit jako dodatečný stresor a vnést do odhadů ekologických rizik značnou variabilitu při posouzení toxicity kontaminantů (Willming et al. 2013).

Teplota v hnízdě včelích opylovačů se obvykle pohybuje okolo 35 °C, ale mnoho studií toxicity pesticidů se provádí při pokojové teplotě 25 °C. V této souvislosti je tedy možné, že vyšší odolnost včel při teplotě podobné té v hnízdě souvisí s vyšší adaptací včel na tuto teplotu v porovnání s nižšími teplotami (Li et al. 2016). Důvodem může být to, že jejich detoxikační enzymy vykazují při této teplotě nejvyšší aktivitu (Albacete et al. 2023). Existuje několik studií, které zkoumaly účinky různých pesticidů při mnoha různých teplotách (11-35 °C) na včelí opylovače, nicméně jen málo studií porovnávalo toxicitu stejného pesticidu u včelích opylovačů při různých teplotních podmínkách. Je tedy možné, že stejný pesticid může vykazovat odlišnou toxicitu pro včely medonosné při různých teplotách (Saleem et al. 2020). Podle jedné studie zabývající se sezónními rozdíly v citlivosti včel medonosných jsou včely v zimním období méně citlivé na fungicid (imidazol) a insekticid (pyrethroid) (Meled et al. 1998). Další výzkum ukazuje vyšší citlivost na thiamethoxam a clothianidin na jaře po skončení zimy (Baines et al. 2017), což může být dáno rozdílnými generacemi včel v letních a zimních měsících (Kešnerová et al. 2020). Studie publikovaná v roce 2020 zjišťovala účinky dvou insekticidů (imidakloprid a thiamethoxam) při třech různých teplotách (35 °C, 24 °C a proměnlivé teplotě) a sledovala vliv teploty na přežívání včel medonosných. Bylo zjištěno, že včely byly mnohem citlivější na pesticidy imidakloprid a thiamethoxan při konstantní teplotě 24 °C nebo při proměnlivé teplotě (noční 13 °C a denní 24 °C) ve srovnání s teplotou 35 °C. (Saleem et al. 2020). Letální účinky thiamethoxamu a klothianidinu byly prokázány při teplotě 29 °C (Wood et al. 2019). Jiná studie se zabývala toxicitou karbamátových insekticidů pro dělnice včely medonosné, kdy byla zkoumána toxicita při teplotách 16 °C, 27 °C, 32 °C. Všechny látky vykazovaly záporný teplotní koeficient toxicity, což znamená, že látky byly toxicitější při nižší teplotě. Při teplotě 16 °C došlo k výraznějšímu zvýšení mortality, a to až do 16 hodin po aplikaci insekticidů. Míra detoxikace je u včel medonosných zřejmě nižší při 16 °C než při vyšších teplotách, takže čistá toxicita je vyšší při nižších teplotách. Dále tato studie prováděla aplikaci pesticidního synergisty piperonylbutoxidu, který zvýšil toxicitu karbamátů na úroveň zhruba odpovídající jejich vlastní toxicitě a snížil vliv teploty po aplikaci na toxicitu. Výsledky této studie naznačují, že u včel medonosných existuje mechanismus detoxikace karbamátů citlivých na teplotu a působení piperonylbutoxidu (Georghiou & Atkins 1964).

Studie zabývající se vzájemným vztahem mezi teplotou prostředí a reakcí včely medonosné na imidakloprid při třech různých teplotách (26 °C, 32 °C, 38 °C) zaznamenala averzi příjmu podané potravy s obsahem této látky při teplotách 26 °C a 32 °C. Včely se při těchto dvou okolních teplotách vyhýbaly sirupu s imidaklopridem a konzumovaly výrazně více nekontaminovaný kontrolní sirup (Alburaki et al. 2023).

### **3.4 Nejrizikovější skupiny pesticidů pro včelí opylovače**

#### **3.4.1 Zoocidy**

Zoocidy jsou pesticidy určené k ochraně rostlin před škůdci, kteří mohou způsobit ekonomicky závažné poškození zejména zemědělských plodin. Využívání zoocidů tvoří jednu z hlavních složek chemických metod ochrany rostlin. Zoocidy se dělí na různé typy a to podle škůdců, na které působí. Patří sem arkaricidy používané proti roztočům, nematocidy proti škůdcům z kmene Nematoda, moluskocidy proti měkkýšům, rodenticidy proti hlodavcům a v neposlední řadě insekticidy používané proti hmyzu (Szwejsda & Nawrocka 2000).

Insekticidy jsou chemické látky používané k hubení hmyzu, a proto není překvapivé, že mnohé insekticidy mohou škodit i včelám medonosným (Johnson 2015). Různé třídy insekticidů, jako jsou neonikotinoidy, pyretroidy, chlorantraniliprol, spinosad, flupyradifuron a sulfoxaflor, nejenže negativně ovlivňují růst a vývoj včel medonosných, snižují jejich potravní aktivitu, opylovací služby, schopnost letu, letové návyky, ale také v nejhorším případě letální účinek (Zhao et al. 2022). Včely medonosné se brání škodlivým účinkům insekticidů prostřednictvím exprese genů souvisejících s imunitou, metabolismem a detoxikačními drahami (Zhang et al. 2021). Insekticidy, které přitahují největší pozornost, pokud jde o nepříznivé vedlejší účinky na užitečný hmyz, jsou neonikotinoidy (Mitchell et al. 2017). Jsou strukturně podobné nikotinu a cílí na postsynaptické excitační nikotinové acetylcholinové receptory hmyzu a způsobují paralýzu v důsledku nadměrné stimulace neuronů (Millar & Denholm 2007). Při konzumaci neonikotinoidů mohou mít včely mimo jiné závažné problémy s motorickým chováním (Tosi & Nieh 2017), s orientací a letovou výkonností (Jiang et al. 2018). Jejich četné negativní účinky byly zaznamenány na řadě organismů včetně ptáků a savců (Annabi et al. 2019).

Neonikotinoidy nejsou jednotnou chemickou skupinou. Strukturně je lze rozlišit na dva typy, kdy první je nitroguanidinová a druhá kyanoamidinová. První skupina obsahuje ve své struktuře N-nitroskupiny, které obsahují atomy kyslíku, díky čemuž jsou polárnější a reaktivnější. Do této skupiny patří imidakloprid, klotianidin a thiamethoxam. Pro včely jsou obecně toxickejší než neonikotinoidy druhé skupiny, do které patří acetamiprid a thiakloprid. Ty obsahují ve svých částicích místo nitroskupiny kyanoamidinové skupiny. Protože kyanoamidinová skupina neobsahuje atomy kyslíku, jsou méně reaktivní, a tudíž méně toxické (Buszewski et al. 2019).

Pyretroidy jsou druhou nejdůležitější třídou insekticidů. Působí na sodíkové kanálky v membránách nervových buněk (David et al. 2016), což vede k trvalé depolarizaci membrány axonu. Aplikace pyretroidů způsobuje hyperexcitativní příznaky, paralýzu (Kiljanek et al. 2016). Vzhledem k tomu, že pyretroidy jsou u hmyzu rychle metabolizovány, obecně se má za to, že pro včely nepředstavují vysoké riziko (Johnson 2015). Na druhou stranu mají ve srovnání s neonikotinoidy relativně vyšší hodnoty LD50 pro hmyz a mají podobné subletální účinky na včely (Zhou et al. 2011). Mezi typické pyretroidní insekticidy lze zařadit tau-fluvalinát, cyfluthrin, lambda-cyhalothrin a alfa-cypermethrin, deltamethrin (Baron et al. 2014).

### 3.4.2 Herbicidey

Herbicidey jsou pesticidy používané k regulaci plevelů v různých odvětvích, včetně železnic, běžných terénních úprav a také v zemědělství (Qu et al. 2021). Tyto chemické látky používané v zemědělství se neustále rozvíjí a jejich počet narůstá (Dos Santos Araújo et al. 2023). Bylo zjištěno, že herbicid na bázi atrazinu způsobuje četné ekotoxikologické účinky na včelu medonosnou. Například bylo prokázáno, že akutní expozice atrazinu snižuje spotřebu pylu

a sacharózy, narušuje regulaci imunitního systému (Wang et al. 2023) a zvyšuje aktivitu cytochromu P450 (Fellows et al. 2022). Vystavení komerčním přípravkům s atrazinem navíc vede ke snížení hladin  $\beta$ -karotenu a all-trans-retinolu (Helmer et al. 2015). Proto je nezbytné dosáhnout posouzení rizik pro včely medonosné u nových přípravků s herbicidey, které obsahují atrazin. Jediná známá zpráva o ekotoxikologických účincích způsobených kombinací mezotrionu a atrazinu naznačila, že akutní vystavení tomuto složení herbicidu vedla k nepříznivým změnám v chování včel (neschopnost letu či pohybu). Nicméně přesný dopad tohoto herbicidu na včely medonosné zůstává doposud neznámý (Dos Santos Araújo et al. 2021).

U dalšího herbicidu, glyfosátu, který je nejprodávanejší agrochemikálií na světě, byly rovněž zjištěny různé negativní dopady na včely medonosné (Motta et al. 2020). Mezi jeho účinky patří poruchy kognitivních a smyslových schopností (Farina et al. 2019), snížení aktivity tykadel (Vázquez et al. 2020). Dále bylo zjištěno, že glyfosát vyvolává změny v buněčné struktuře hypofaryngeální žlázy (Faita et al. 2018) a mění proteinový profil mateří kašičky (Faita et al. 2022). Kromě toho je známo, že glyfosát způsobuje poškození střevní mikroflóry (Dai et al. 2018) a mění aktivitu antioxidantních a detoxikačních enzymů i expresi genů souvisejících s detoxikací (Chen et al. 2022). Tyto zjištění ukazují, že herbicidy mohou ovlivňovat včely medonosné různými způsoby a zdůrazňují význam studia účinků agrochemikálií na tento hmyz (Dos Santos Araújo et al. 2023).

### **3.4.3 Fungicidy**

Fungicidy jsou pesticidy používané k ochraně rostlin před houbovými chorobami. Často se aplikují v době květu, takže s nimi včely přicházejí do přímého kontaktu při sběru potravy (Schuhmann et al. 2022). Vzhledem k tomu, že houbové choroby ohrožují celou řadu potravinářských plodin (Zubrod et al. 2019), je používání fungicidů považováno za zásadní pro celosvětovou potravinovou bezpečnost (Strange & Scott 2005). Fungicidy již dnes tvoří více než 35 % celosvětového trhu s pesticidy a předpokládá se, že jejich používání bude v budoucnu nadále narůstat (Rondeau & Raine 2022). Často se fungicidy používají preventivně a u některých plodin se mohou aplikovat až desetkrát za sezónu (Reilly et al. 2012). V důsledku toho se včely hledající potravu v zemědělském prostředí setkávají s fungicidy častěji než s insekticidy (Mullin et al. 2010), i proto, že jsou považovány za bezpečnější pro včely a lze je stříkat i v době, kdy kvetou plodiny atraktivní pro hmyz (Favaro et al. 2019). Velká část fungicidů má systémové vlastnosti, což znamená, že jsou velmi dobře rozpustné ve vodě a mohou být rostlinou přijímány a zároveň transportovány po celých stoncích a listech. Mohou být obsaženy v pylu, nektaru i v gutační vodě rostlin (Rondeau & Raine 2022). V návaznosti na to jsou rezidua fungicidů běžně detekována ve včelstvech a v jejich bezprostředním okolí, což včely vystavuje potencionálně vysokému riziku expozice (David et al. 2016). Riziko fungicidů spočívá v jejich schopnosti narušit rovnováhu mikrobiální komunity ve včelstvu, zejména v mykobiomu (Schuhmann et al. 2022), který je zodpovědný za fermentační proces přeměny pylu na včelí chléb (Anderson et al. 2014).

Tato mikrobiální komunita není důležitá jen z hlediska správné výživy včel, ale také poskytuje přirozenou imunitní ochranu včelstvu (Bernauer et al. 2015). Aplikace fungicidů může vyvolat poruchy v této rovnováze, což má potenciál negativně ovlivnit nejen včelí jedince, ale i celá včelstva a další opylující hmyz včetně jejich životního prostředí (Yoder et al. 2011).

Vystavení včel fungicidům v terénu bylo také spojeno s řadou subletálních poruch, včetně špatného odchovu včelstva, výměny matek, oslabení včelstva a zvýšeného výskytu chorob (Schuhmann et al. 2022). Na základě akutních laboratorních studií jsou fungicidy pro opylovače považovány za neškodné, protože mají nízkou akutní toxicitu při požití nebo kontaktu se včelami (Ladurner et al. 2005). Standardní testy toxicity však často neberou v úvahu subletální účinky (Desneux et al. 2007). Subletální účinky fungicidů mohou včelám způsobit silný stres (Simon-Delso et al. 2014). Expozice fungicidům může například vést k negativním účinkům na spotřebu potravy, imunitní reakci a metabolismus hmyzích opylovačů (Cullen et al. 2019). Například u fungicidu Pristine, kde je hlavní složkou boskalid a pyraklostrobin, byl prokázán silný negativní účinek na rozpoznávací schopnosti včel medonosných (DesJardins et al. 2021). Stejný fungicid v jiné studii zkrátil délku života a vedl k dřívějšímu nástupu shánění potravy (Fisher et al. 2021). Další studie zjistila, že fungicidy, které tvoří inhibitory sterolové biosyntézy, zkráceně SBI zvyšují akutní toxicitu pro dospělé dělnice včely medonosné v závislosti na dávce. Tento efekt je přisuzován inhibici aktivity enzymu cytochromu P450 monooxygenázy (Johnson et al. 2013).

Tyto příklady naznačují, že fungicidy mohou mít na včely podobné účinky jako neonikotinoidy, ačkoli jejich způsob účinku je zcela odlišný. Kromě toho by fungicidy mohly mít na včely ještě další účinky. Například některé druhy včel žijí v mutualistickém vztahu s houbou, která je nezbytná pro vývoj jejich larev. Fungicidy by mohly tuto pro ně nezbytnou houbu poškodit (Paludo et al. 2018). Další variantou, jak by fungicidy mohly ovlivnit opylovače, je tedy to, že narušují dýchací řetězce hmyzu. To by mohlo vést k nedostatečnému zásobování energií pro různé činnosti, což by mělo za následek subletální účinky (DesJardins et al. 2021).

Přestože nám stále chybí informace o možných vedlejších účincích většiny fungicidů na včely medonosné i divoké, hromadí se důkazy o tom, že některé fungicidy mohou mít zvláštní aditivní nebo synergické účinky na včely, pokud jsou aplikovány společně s neonikotinoidy (Piggot et al. 2015). K aditivnímu účinku dochází tehdy, když se kumulativní účinek fungicidu a insekticidu rovná součtu jednotlivých účinků každé látky, zatímco synergický účinek znamená výrazně větší účinek, než je součet jednotlivých účinků (Al Nagggar & Paxton 2021).



Plodiny jsou obvykle ošetřovány proti různým škůdcům, takže existuje velká pravděpodobnost, že fungicidy a insekticidy budou aplikovány společně v jedné směsi nebo jen s krátkým časovým odstupem mezi nimi (Thompson et al. 2014). Jednou z kritických kombinací je směs neonikotinoidů nebo pyretroidů s azolovými fungicidy, protože ty inhibují dráhu biosyntézy sterolů (Iverson et al. 2019). Kombinace těchto pesticidů tak může vyvolat synergické účinky, a tím zvýšit jejich toxicitu pro včely (Iwasa et al. 2004). Například klotianidin a thiamethoxam se stal pro včely významně toxicitější ve společnosti fungicidu s hlavní účinnou látkou boskalid (Tsvetkov et al. 2017). Z velkého množství fungicidů je boskalid jedním z nejčastěji detekovaných fungicidů ve včelích produktech v Německu a Polsku (Pohorecka et al. 2017). Dalšími častými fungicidy ve včelím chlebu jsou azoxystrobin, tebukonazol, protiokonazol a dimoxystrobin (Reilly et al. 2012). Při krmení včelích dělnic cukerným roztokem obsahujícím buď propikonazol, nebo klotianidin, nebo kombinovanou směs, bylo zaznamenáno výrazně nižší krmení u kombinované směsi. Analýza mortality pak vykazovala významnou interakci pro směs propikonazolu s klotianidinem ve čtvrtý den od podání roztoku (Sgolastra et al. 2018). Synergická toxicita byla prokázána v případě smíchání fungicidu fenbukonazol s běžně používanými neonikotinoidními insekticidy (Biddinger et al. 2013).

#### **3.4.4 Pesticidy použité v praktické části**

V rámci moderního zemědělství se kladou rostoucí nároky na ekologickou a bezpečnou produkci potravin, což vedlo k posílenému zájmu o neisekticidní pesticidy. Praktická část této diplomové práce se proto zaměřuje na působení neisekticidních pesticidů, konkrétně fungicidů (Cullen et al. 2019). Fungicidy nejsou z hlediska toxicity dostatečně prozkoumány, protože se nepředpokládá škodlivý vliv na hmyz (Schuhmann et al. 2022). Některé dosavadní studie naznačují, že fungicidy mohou mít subletální účinky na chování a fyziologii včel, což může negativně ovlivnit jejich schopnost opylování a přežití (DesJardins et al. 2021). Například při posouzení negativních účinků azoxystrobinu na zdraví včel bylo zjištěno, že způsobuje subletální účinky azoxystrobinu ve středním střevě včely medonosné (Serra et al. 2023). Je důležité zmínit, že látka azoxystrobin je strukturně blízce podobná dimoxystrobinu, jenž je hlavní účinnou látkou přípravku Pictor použitého v praktické části k testování toxicity. Již starší studie zjistili, že pesticidy mohou snižovat úspěšnost hledání potravy a přežití včel medonosných (Henry et al. 2012). Tyto studie posilují argumentaci o potencionálních rizicích používání fungicidů v moderním zemědělství a zdůrazňují potřebu dalšího výzkumu k ochraně včelstev a dalších opylovačů.

#### 3.4.4.1 Pictor

Přípravek Pictor představuje synergii dvou hlavních účinných složek boskalidu a dimoxystrobinu. Boskalid je fungicidní látka, která poskytuje pevný základ pro efektivní ochranu před hlavními chorobami řepky olejné (Schuhmann & Scheiner 2023). Jeho schopnost potlačit napadení řepky formovou hnilobou a významně tak snižovat ztráty způsobené tímto patogenem byla potvrzena nezávislými studiemi. Dimoxystrobin je strobilurinová látka, která působí zejména proti listovým skvrnitostem (Pineaux et al. 2023). Má schopnost snižovat klíčení spor a potlačovat růst mycelia. Přestože přípravek Pictor prokazuje vynikající účinnost v ochraně plodin, otázka jeho toxicity k necílovým organismům, zejména včelám a dalším opylovačům, vyžaduje pečlivé zkoumání (Lau et al. 1995). Studie zaměřené na boskalid, jako jednu z hlavních účinných složek přípravku Pictor, naznačují, že tato látka by mohla mít toxický vliv na opylovače. Obecně jsou látky jako dimoxystrobin a boskalid ve standardních dávkách hodnoceny jako šetrné pro necílové organismy. Nicméně je třeba vzít v úvahu možné kumulativní a synergické účinky těchto látek při opakovaných expozicích (Schuhmann & Scheiner 2023).

#### 3.4.4.2 Prosaro

Prosaro 250 EC je širokospektrální fungicid používaný k ochraně rostlin proti houbovým chorobám. Byl uveden na trh v roce 2009 společností Bayer CropScience. Přípravek Prosaro 250 EC je registrován k ochraně zejména obilných kultur. Přípravek obsahuje účinnou látku tebuconazol a prothiokonazol (Rafika et al. 2022). Oba triazoly mají schopnost drasticky snižovat houbovou infekci rostlin, jak prokázaly četné polní pokusy v průběhu několika let. Přípravek je aplikován ve formě rozpustného koncentrátu. Aplikuje se povrchově, a to do 30 dnů před sklizní (Gomes et al. 2021). Studie zaměřená na zkoumání letální dávky pesticidů na včely medonosné zjistila, že tebuconazol vykazuje nižší akutní orální LD50 hodnotu (83 µg /včelu) ve srovnání s boskalidem (166 µg/ včelu). To naznačuje, že včely vykazují nižší citlivost na boscalid než na tebuconazol (Kadlikova et al. 2021).

#### 3.4.4.3 Mospilan

Přípravek Mospilan 20 SP je vysoce efektivní insekticid s dlouhodobým reziduálním účinkem, který se stává klíčovým prvkem v integrovaném přístupu k ochraně rostlin v moderním zemědělství. Tento insekticid působí na všechna vývojová stadia škůdců jako dotykový a požerový jed, což z něj dělá víceúčelový přípravek pro boj s různými hmyzími hrozbami (Matsuda & Takahashi 1996). Insekticid lze aplikovat postříkem nebo rosením, avšak při použití je nezbytné dodržovat bezpečnostní opatření a ochranná pásma s cílem minimalizovat potencionální toxické účinky na necílové organismy. Hlavní účinnou látkou přípravku Mospilan 20 SP je acetamiprid, patřící do skupiny neonicotinoidů. Acetamiprid je neurotoxin působící na centrální nervovou soustavu hmyzu jako agonista acetylcholinu v nikotinových acetylcholinových receptorech, což vede k neustálému toku iontů a neurotoxických účinků (Węgorzek et al. 2009).

## 4 Metodika


### 4.1 Získávání živého materiálu a fungicidů

V rámci této práce byly jako subjekty experimentu použity mladé dospělé dělnice včely medonosné (*apis mellifera*) s předchozí známou historií a známým fyziologickým stavem od soukromého včelaře, pana Vladimíra Rašky z Libřic (50°17'16" s. š., 15°57'50" v.d.) v České republice. Včely odebrané od včelaře byly následně ubytovány nejpozději druhý den po odběru z úlu v nylonové kleci o velikosti 90x60x60 cm a uchovávány v testovacích podmínkách. Včely byly k testování odebírány z nylonové klece dvě hodiny před testem, přičemž některé byly použity k testování až po třech týdnech. Včely byly sbírány a testovány v období květena až července 2023, kdy mají stálou fyziologii. Pravidelně bylo odebíráno přibližně 300 včel z rámků bez oddělků do již zmíněné nylonové klece. Součástí klece byly dvě Petriho misky s vodou a dvě Petriho misky naplněné 50 % roztokem sacharózy (hmotnostní poměr 1:1), včetně nádoby s pláství pro obohacení prostředí. Četnost doplňování vody a sacharózy byla uzpůsobena tak, aby včely měly přístup ad libitum k vodě i cukru.

### 4.2 Průběh testování

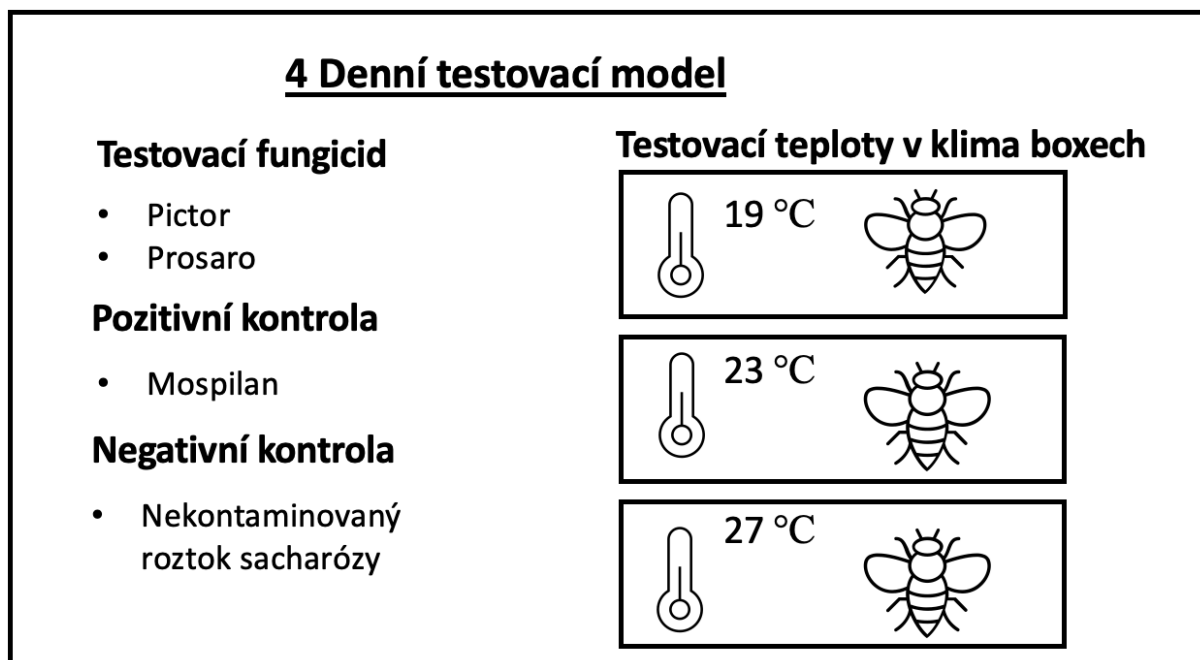
Dospělé dělnice byly vystaveny různým dávkám testovaných látek rozptýlených v roztoku sacharózy při různé teplotě prostředí. Následně byly včely krmeny pouze roztokem sacharózy bez obsahu testované látky. Úmrtnost včel se zaznamenávala nultý, první, druhý a čtvrtý experimentální den. Celkově tedy byla hodnocena mortalita za dobu 96 hodin. Aby se test dal považovat za platný, nesměla průměrná úmrtnost včel v kontrole překročit 10 %. Každý čtyřdenní testovací pokus obnášel řadu pracovních úkonů (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Harmonogram průběhu práce v jednotlivých dnech testovacího pokusu.

 Harmonogram průběhu práce v jednotlivých dnech testovacího pokusu		
Den 0	8:30-9:30	Náhodné rozřazení včel po deseti kusech do předem připravených plastových krabic s filtračním papírem a Petriho miskami s vodou.
	10:30-11:30	Předložení pokusného roztoku v množství 0,2 ml včelám na nízké Petriho misce do krabic.
	16:30-17:30	Odebrání pokusného roztoku z krabic a jeho uchování pro následné vážení. Předložení předem zváženého čistého roztoku (krmiva) v množství 7 ml včelám na Petriho misce do krabic. Předložení předem zváženého čistého roztoku (krmiva) v množství 7 ml včelám na Petriho misce do krabic. Zaznamenání počtu mrtvých a zblblých včel
Den 1	16.00-18:00	Odebrání Petriho misky s cukerným roztokem (krmivem) a následné zvážení. Vložení nové předem zvážené Petriho misky s cukerným roztokem v množství 7 ml. Zaznamenání počtu mrtvých a zblblých včel.
	16:00-18:00	Odebrání Petriho misky s cukerným roztokem (krmivem) a následné zvážení. Vložení nové předem zvážené Petriho misky s cukerným roztokem v množství 12 ml. Zaznamenání počtu mrtvých a zblblých včel. Doplnění čisté vody včelám.
Den 3		Bez zásahu
Den 4	15:00-18:00	Odebrání a zvážení Petriho misek s cukerným roztokem. Zaznamenání počtu mrtvých a zblblých včel. Vypuštění zblblých včel a následné vymytí krabic a Petriho misek.

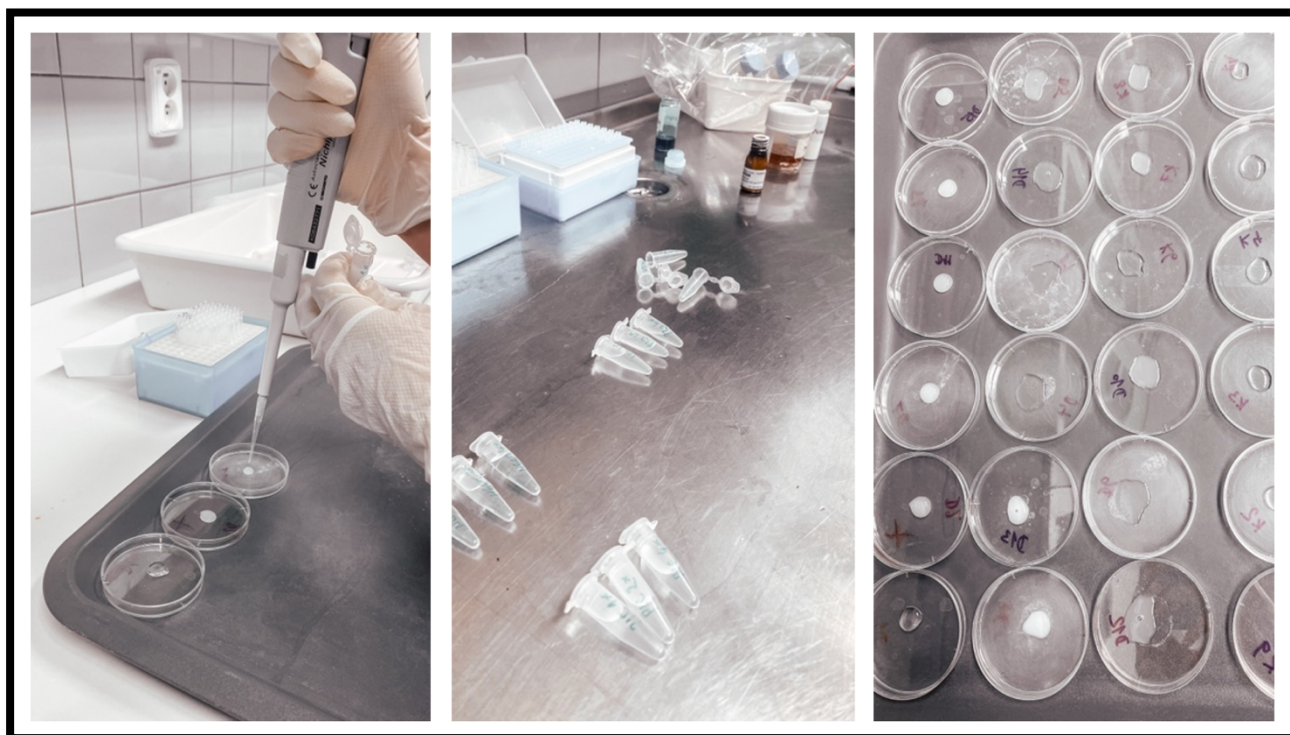
Na začátku každého testování byly pokusné včely nejprve náhodně umístěny do předem připravených a upravených plastových krabic vybavených filtračním papírem a Petriho miskami s vodou. Krabice byly konstruovány s ohledem na jednoduchou čistitelnost a optimální větrání, s manuálně vytvořenými otvory pro udržení kvalitního vzduchu. Velikost krabice byla pečlivě zvolena tak, aby poskytovala dostatečný prostor, byla efektivní a zároveň bezpečná pro uskladnění deseti pokusných včel. Shromážděné včely, které byly náhodně rozděleny do testovacích krabic, náhodně označeny a rozmístěny v pokusných místnostech byly před zahájením testu až dvě hodiny vyhladovělé z důvodu zvýšení a standardizace potravní motivace. Moribundní včely, byly před zahájením testu vyřazeny a nahrazeny zdravými.

Každé testovací skupině včel byla podávána dávka 200  $\mu$ l 50% roztoku sacharózy ve vodě, který obsahoval testovací fungicid v odpovídající koncentraci. Množství zkonsumované stravy na skupinu pokusných včel bylo pečlivě sledováno, prostřednictvím vážení sušiny zbylého množství roztoku, který byl vždy během pěti až šesti následujících hodin z krabice odstraněn a nahrazen pouze čistým roztokem sacharózy. Pokusný vzorek s testovací látkou a sacharózou byl vždy před podáním a následně po vyjmutí z krabice pečlivě zvážen, pro přehlednost zkonsumovaného množství podaného pokusného vzorku či čistého roztoku sacharózy. Včely byly umístěny v pokusných místnostech v klima boxech, které umožnily definovat danou testovací teplotu. Pokusné testovací teploty byly v klima boxech nastaveny na 19 °C, 23 °C a 27 °C, což simulovalo různé klimatické podmínky (viz Obrázek 2).



Obrázek 2: Pokusné testovací teploty v klima boxech pro jednotlivé testovací pesticidy (©Dominika Komárková).

Mortalita pokusných včel byla v průběhu testu pravidelně zaznamenávána, včetně abnormálních projevů chování některých pokusných včel během testování, jako například snížený příjem potravy nebo narušená schopnost pohybu. Veškeré testovací údaje byly vždy shrnuty do tabulky, která pro každou testovací skupinu včel uváděla počet použitých pokusných včel, úmrtnost v každém okamžiku pozorování a počet včel s nežádoucím chováním. Vliv testovaných fungicidů (Pictor, Prosaro) byl srovnáván s pozitivní kontrolou (Mospilan) a také s negativní kontrolou (nekontaminovaný roztok sacharózy). Údaje o úmrtnosti byly dále analyzovány pomocí vhodných statistických metod pro objasnění vlivu testovaných látek na chování a mortalitu včel medonosných (viz Obrázek 3 a 4).



Obrázek 3: Fotodokumentace průběhu experimentu z praktické části (a,b,c) (©Dominika Komárková).



Obrázek 4: Fotodokumentace průběhu experimentu z praktické části (d,e,f) (©Dominika Komárková).

### 4.3 Zpracování statistické analýzy dat

V této fázi praktické části byly zpracovány výstupy z experimentů, které byly provedeny za účelem posouzení letálních účinků neisekticidních pesticidů na včely za různých teplot. Pro analýzu a interpretaci těchto dat byl použit statistický software R ve verzi 3.6.3 (R Foundation for Statistical Computing 2020).

Pro analýzu zkonsumovaného množství podaného roztoku s daným pesticidem byla použita metoda General Linear Model (LM). Na rozdíl od analýzy mortality, která vyžadovala zohlednění korelace mezi proměnnými, toto měření bylo provedeno pro každou jednotlivou krabici zvlášť s normálním rozdělením dat. V analýze byly použity dvě vysvětlující (nezávislé) proměnné pesticid a teplota.

K posouzení účinků použitých pesticidů byla použita metoda Generalized Estimating Equations (GEE) s balíčkem geepack (Hojsgaard et al. 2006). Tato metoda, která je rozšířením generalizovaných lineárních modelů (GLM) s binomickým rozdělením, zahrnuje korelaci jednotlivých měření v rámci jedné experimentální krabice. Ve formulaci našich modelů jsme porovnávali testované pesticidy mezi sebou, zkonsumované množství krmné dávky s daným pesticidem, mortalitu a vliv teploty.

Prostřednictvím párového srovnání byly hodnoceny účinky testovaných druhů fungicidů na mortalitu včel medonosných. Výsledky testovaných fungicidů Pictor a Prosaro byly srovnávány s pozitivní kontrolou insekticidem Mospilan, a pro názornější interpretaci statistických výsledků bylo provedeno srovnání i s negativní kontrolou (roztok sacharózy), a to konkrétně čtvrtý experimentální den. V předchozích testovacích dnech nebylo možné srovnání s negativní kontrolou použít z důvodu nízké variability při kontrolních měření.

Párové srovnání bylo použito i v případě hodnocení vlivu teploty (19 °C, 23 °C, 27 °C) na toxické účinky testovaných pesticidů. Tato metoda se v předběžných analýzách ukázala být výrazně úspornější než použití polynomické regrese, což bylo vyjádřeno kvaziinformačním kritériem. Kvaziinformační kritérium (QIC) je v metodě GEE analogem Akaikeho informačního kritéria (AIC). Předběžné analýzy ukázaly, že vliv teploty nebyl lineární, z tohoto důvodu byly jednotlivé teplotní úrovně převedeny z numerických na kategoričké a následně analyzovány.

Grafy znázorňující výsledky statistické analýzy byly vytvořeny v programu Excel, který nám poskytl prostředky pro názornou interpretaci účinků testovaných pesticidů při dané teplotě na mortalitu, jež jsou zahrnuty do kapitoly výsledků



## 5 Výsledky

Výsledky statistické analýzy vlivu pesticidů (viz Graf 1) a teplotních podmínek (19 °C, 23 °C, 27 °C) na mortalitu včely medonosné v průběhu čtyřdenního experimentu (viz Graf 2), byly detailně vyhodnoceny pro nultý, první, druhý a čtvrtý experimentální den zvlášť (viz Tabulka 2).

Tabulka 2: Souhrn výsledných p-hodnot statistické analýzy vlivu pesticidů a teplotních podmínek včely medonosné.

<b>Souhrn výsledků statistické analýzy vlivu pesticidů a teplotních podmínek</b>			
<b>Vliv pesticidů na výskyt zblblých včel 0 den</b>		<b>Vliv teploty na účinky pesticidů a výskyt zblblých včel 0 den</b>	
Pictor vs. Prosaro	0,0003	T19 vs. T23	0,4293
Pictor vs. Mospilan	0,0026	T19 vs. T27	0,2568
Prosaro vs. Mospilan	0,6990	T23 vs. T27	0,1010
<b>Vliv pesticidů na mortalitu včel 0 den</b>		<b>Vliv teploty na účinky pesticidů a mortalitu včel 0 den</b>	
Pictor vs. Prosaro	0,2396	T19 vs. T23	0,4293
Pictor vs. Mospilan	0,2239	T19 vs. T27	0,2568
Prosaro vs. Mospilan	0,0117	T23 vs. T27	0,1010
<b>Vliv pesticidů na mortalitu včel 1 den</b>		<b>Vliv teploty na účinky pesticidů a mortalitu včel 1 den</b>	
Pictor vs. Prosaro	0,5330	T19 vs. T23	0,4293
Pictor vs. Mospilan	0,0630	T19 vs. T27	0,2568
Prosaro vs. Mospilan	0,2330	T23 vs. T27	0,1010
<b>Vliv pesticidů na mortalitu včel 2 den</b>		<b>Vliv teploty na účinky pesticidů a mortalitu včel 2 den</b>	
Pictor vs. Prosaro	0,1850	T19 vs. T23	0,4293
Pictor vs. Mospilan	0,0077	T19 vs. T27	0,2568
Prosaro vs. Mospilan	0,1742	T23 vs. T27	0,1010
<b>Vliv pesticidů na mortalitu včel 4 den</b>		<b>Vliv teploty na účinky pesticidů a mortalitu včel 4 den</b>	
Pictor vs. Prosaro	0,0727	T19 vs. T23	0,4293
Pictor vs. Mospilan	0,0041	T19 vs. T27	0,2568
Prosaro vs. Mospilan	0,1976	T23 vs. T27	0,1010

### 5.1 Analýza zkonsumovaného množství podaného roztoku

Analýza lineární regrese ukázala, že vliv pesticidů na spotřebu podaného roztoku nebyl statisticky významný (GLM, contrasts,  $p = 0,2128$ ). Stejně tak teplota neměla vliv na množství zkonsumovaného pokusného roztoku nultý den (GLM, contrasts,  $p = 0,6139$ ) (viz Graf 3 a 4).

## 5.2 Mortalita 0 Den

### 5.2.1 Analýza moribundních včel medonosných v nultém dni

Nultý den experimentu byl pozorován statisticky významný rozdíl na výskyt takzvané moribundních jedinců (dezorientovaných, neschopných pohybu apod.) včely medonosné v důsledku účinků testovaných pesticidů při dané testovací teplotě. Byl zjištěn statisticky významný rozdíl na moribundní účinky mezi fungicidním přípravkem Pictor a insekticidem Mospilan (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0026$ ). Statisticky průkazný rozdíl byl pozorován i při srovnání mezi fungicidními přípravky Pictor a Prosaro (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0003$ ). Statisticky nevýznamný rozdíl byl pozorován mezi přípravky Mospilan a Prosaro (GEE-b, contrasts,  $p = 0,699$ ). V návaznosti na účinky testovaných pesticidů byl analyzován teplotní faktor na moribundnos včel medonosných. Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi teplotami 19 °C a 27 °C (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0257$ ). Statisticky nevýznamné rozdíly byly zjištěny mezi teplotami 19 °C a 23 °C (GEE-b, contrasts,  $p = 0,4293$ ) a teplotami 23 °C a 27 °C (GEE-b, contrasts,  $p = 0,1010$ ).

### 5.2.2 Porovnání účinků pesticidů na mortalitu včel medonosných

Rozdíl mezi fungicidními přípravky Prosaro a Pictor nebyl statisticky významný (GEE-b, contrasts,  $p = 0,2396$ ). Srovnání těchto dvou fungicidů nultý den neprokázalo signifikantní rozdíl v účincích na mortalitu včel medonosných. Statisticky signifikantní rozdíl v účincích na mortalitu včel nebyl prokázán ani mezi insekticidem Mospilan a fungicidem Pictor (GEE-b, contrasts,  $p = 0,2239$ ). Statistická analýza ukázala významný rozdíl mezi insekticidem Mospilan a fungicidem Prosaro (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0117$ ), přičemž Mospilan vykazoval statisticky významně větší vliv na mortalitu včel medonosných než přípravek Pictor.

### 5.2.3 Srovnání teploty a její vliv na mortalitu včel medonosných

Teplotní podmínky v rámci nultého dne experimentu vykazovaly statisticky významné rozdíly v účinku pesticidů na mortalitu včel. Statisticky významný rozdíl byl sledován mezi teplotami 19 °C a 27 °C (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0004$ ), s vyšší mortalitou včel při teplotě 27 °C. Stejně tak byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl mezi teplotami 23 °C a 27 °C (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0480$ ), opět s vyšší mortalitou včel při teplotě 27 °C. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi teplotami 19 °C a 23 °C (GEE-b, contrasts,  $p = 0,8290$ ).

## **5.3 Mortalita 1 Den**

### **5.3.1 Porovnání účinků pesticidů na mortalitu včel medonosných**

Při srovnání účinků pesticidů na včely medonosné první den experimentu nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl mezi insekticidním přípravkem Mospilan a fungicidním přípravkem Pictor (GEE-b, contrasts,  $p = 0,063$ ). Statisticky významný rozdíl nebyl prokázán ani mezi fungicidy Prosaro a Pictor (GEE-b, contrasts,  $p = 0,533$ ). Podobně tomu bylo při srovnání insekticidu Mospilan a fungicidu Prosaro, kde také nebyl statisticky průkazný rozdíl (GEE-b, contrasts,  $p = 0,233$ ) v účincích na mortalitu včel. Celkově v rámci prvního dne experimentu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi účinky testovaných pesticidů ve vztahu k mortalitě včel medonosných.

### **5.3.2 Srovnání teploty a její vliv na mortalitu včel medonosných**

Teplotní podmínky v rámci prvního dne experimentu nevykazovaly statisticky významné rozdíly v účinku pesticidů na mortalitu včel. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi teplotami 19 °C a 23 °C (GEE-b, contrasts,  $p = 0,1450$ ). Statisticky průkazný rozdíl nebyl zjištěn ani mezi teplotami 19 °C a 27 °C (GEE-b, contrasts,  $p = 0,6160$ ). Podobně tomu bylo i při srovnání mezi teplotami 23 °C a 27 °C (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0750$ ), kde taktéž nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl.

## **5.4 Mortalita 2 Den**

### **5.4.1 Porovnání účinků pesticidů na mortalitu včel medonosných**

V rámci druhého dne experimentu nebyl statisticky významný rozdíl mezi fungicidními přípravky Prosaro a Pictor (GEE-b, contrasts,  $p = 0,185$ ). Mezi pesticidními přípravky Mospilan a Prosaro nebyl taktéž zjištěn signifikantní rozdíl (GEE-b, contrasts,  $p = 0,1742$ ). Naopak rozdíl mezi insekticidem Mospilan a fungicidem Pictor byl zjištěn jako statisticky průkazný (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0077$ ).

#### **5.4.2 Srovnání teploty a její vliv na mortalitu včel medonosných**

Při srovnání teploty a jejího vlivu na mortalitu včel ve vztahu k účinkům testovaných pesticidů druhý den pokusu byl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi teplotami 19 °C a 23 °C (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0216$ ), kdy vyšší teplota 23 °C byla spojena s vyšší mortalitou včel medonosných. Statisticky významný rozdíl nebyl pozorován mezi teplotami 23 °C a 27 °C (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0833$ ). Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ani mezi teplotami 19 °C a 27 °C (GEE-b, contrasts,  $p = 0,4873$ ).

### **5.5 Mortalita 4 Den**

#### **5.5.1 Srovnání účinků pesticidů s negativní kontrolní skupinou na mortalitu včel medonosných**

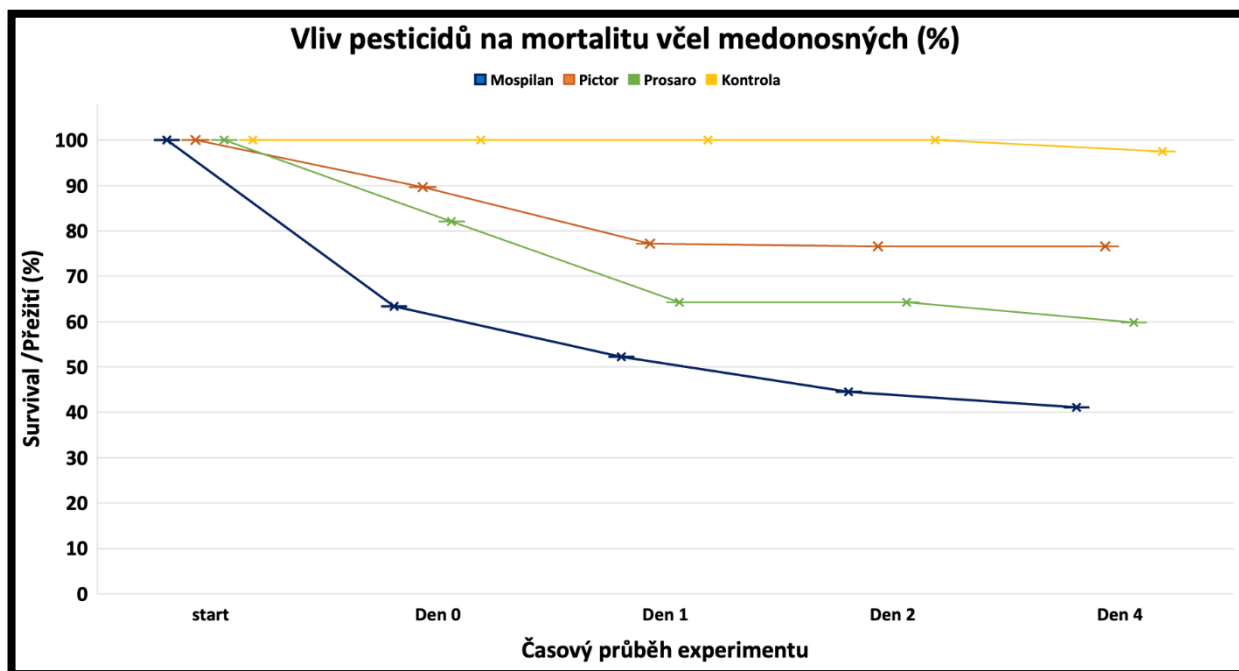
Čtvrtý experimentální den byl z hlediska statistických výsledků nejzásadnější. Byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi fungicidním pesticidem Prosaro a negativní kontrolou (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0103$ ), insekticidním pesticidem Mospilan a negativní kontrolou (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0009$ ), které měly statisticky průkazný vliv na mortalitu včel medonosných. Fungicid Pictor při srovnání s negativní kontrolou nevykazoval statisticky průkazný rozdíl (GEE-b, contrasts,  $p = 0,053$ ).

#### **5.5.2 Porovnání účinků pesticidů na mortalitu včel medonosných**

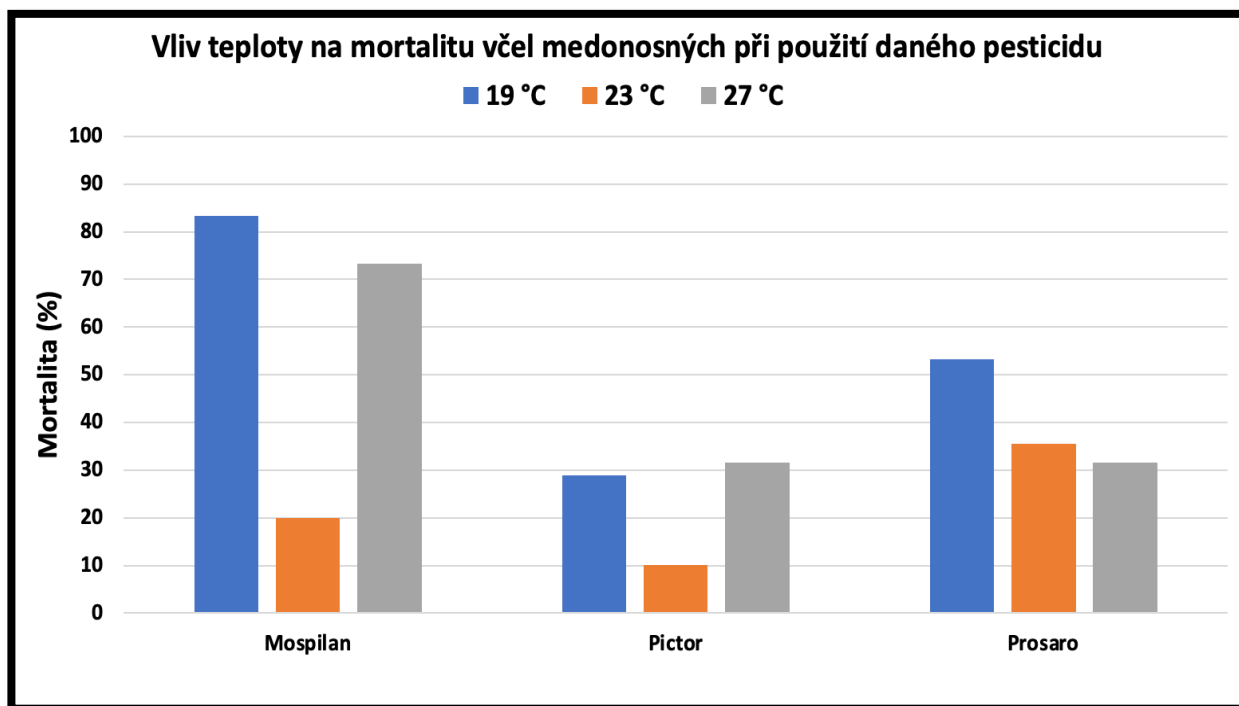
Srovnání účinků pesticidů na mortalitu včel čtvrtý experimentální den bylo následující. Insekticid Mospilan ve srovnání s fungicidem Pictor prokázal statisticky významný rozdíl (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0041$ ). Rozdíl mezi fungicidem Prosaro a fungicidem Pictor nebyl zjištěn jako statisticky významný (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0727$ ). Stejně tak mezi přípravky Prosaro a Mospilan nebyl pozorován statisticky průkazný rozdíl (GEE-b, contrasts,  $p = 0,1976$ ).

#### **5.5.3 Srovnání teploty s pesticidy a její vliv na mortalitu včel medonosných**

Významný statistický rozdíl byl v rámci čtvrtého dne zaznamenán mezi teplotami 19 °C a 23 °C (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0142$ ), kdy nižší teplota 19 °C byla spojena s vyšší mortalitou včel medonosných. Statisticky významný rozdíl nebyl zjištěn mezi teplotami 19 °C a 27 °C (GEE-b, contrasts,  $p = 0,3424$ ). Stejně tak nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi teplotami 23 °C a 27 °C (GEE-b, contrasts,  $p = 0,0853$ ). Absence srovnání teploty s negativní kontrolou je způsobena nízkou variabilitou testovaných teplot u kontrolního měření.



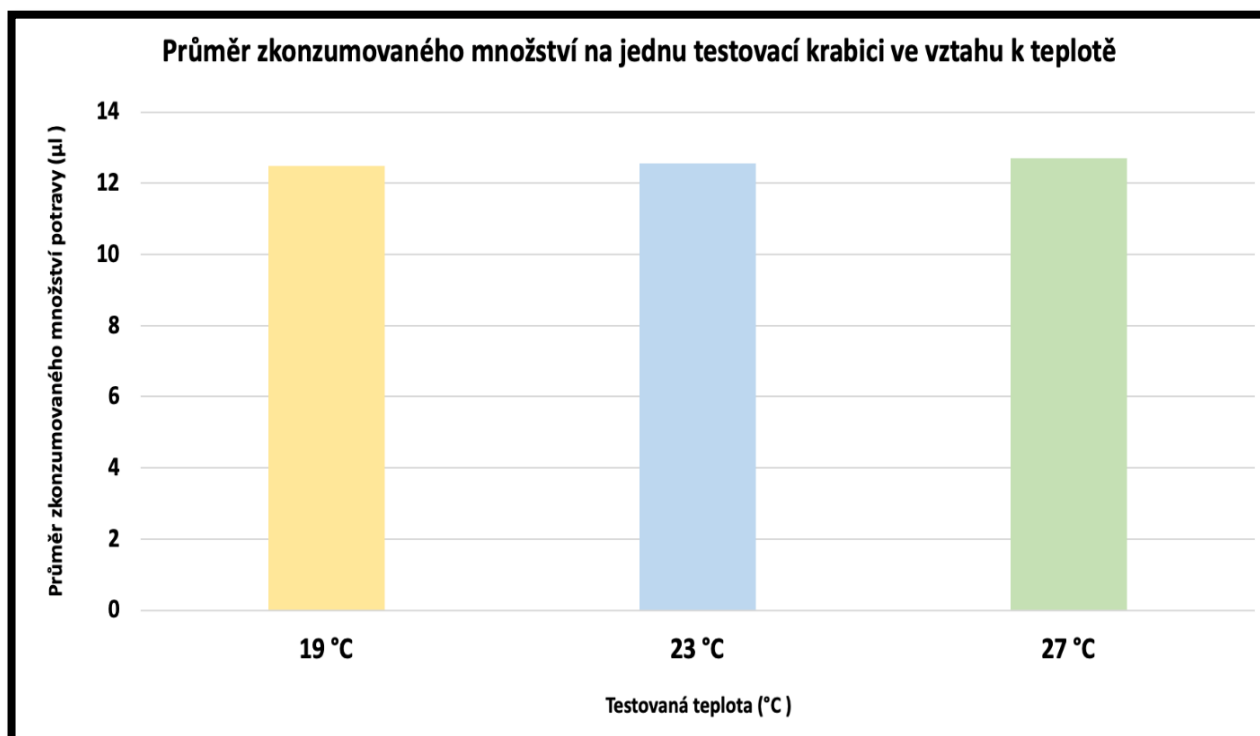
Graf 1: Hodnocení vlivu testovaných pesticidů na mortalitu včel medonosných.



Graf 2: Hodnocení vlivu teploty na mortalitu včel medonosných při použití daného pesticidu.



Graf 3: Průměr zkonsumovaného množství podané potravy na jednu testovací krabici ve vztahu na testovaný pesticid.



Graf 4: Průměr zkonsumovaného množství podané potravy na jednu testovací krabici ve vztahu k teplotě.

## 6 Diskuze

V průběhu čtyřdenního experimentu jsme sledovali vliv pesticidů a teplotních podmínek na mortalitu včel medonosných. Naše výsledky naznačují, že různé typy pesticidních přípravků mohou mít rozdílný vliv na mortalitu včel, jakožto necílových organismů na tyto rezidua v závislosti na jejich složení a účincích.

Výsledky ukázaly, že testované pesticidy Mospilan, Pictor a Prosaro neměly významný vliv na spotřebu potravy včel medonosných ve srovnání s negativní kontrolou, která dostávala 50% cukerný roztok. Přesto studie hodnotící repelentní účinky pesticidů zjistila, že zejména přípravek Prosaro vykazuje vysokou míru odpudivosti na opylovače (Kazda & Volková 2016). Svou roli na množství zkonsumované potravy mohlo v našem pokusu sehrát i počáteční dvou hodinové vyhladovění včelích dělnic před podáním pokusného pesticidu, a ovlivnit tak spotřebu podané potravy s pokusným vzorkem testovaného pesticidu. Tento časový interval měl za cíl zajistit, že včely budou v době podání potravy s pokusným pesticidem aktivní a dostatečně motivovány k její konzumaci. Tímto způsobem se minimalizovalo riziko, že by experimentální včelí dělnice nedostatečně vnímaly podaný pokusný roztok. Navzdory tomu je taky možné, že tento časový interval vyhladovění mohl vést k podobným výsledkům ve spotřebě potravy ve všech testovacích skupinách.

V důsledku účinků testovaných pesticidů byly zaznamenány rozdíly v počtu identifikovaných moribundních včelích jedinců. Konkrétně byl zaznamenán rozdíl mezi fungicidním přípravkem Pictor a insekticidem Mospilan, což ukazuje, že fungicidy a insekticidy mohou vyvolávat odlišné reakce na necílové organismy (Walker et al. 2022). To může být způsobeno různými mechanismy účinků těchto látek na včely medonosné, jako je jejich interakce s nervovým systémem nebo metabolismem (DesJardins et al. 2021).

Insekticid Mospilan prokázal vysokou toxicitu pro včely medonosné bezprostředně po požití pokusného roztoku, což se projevilo významně vyšší mortalitou ve srovnání s fungicidními přípravky Pictor a Prosaro. Průkazně vyšší toxicita Mospilanu je v souladu s předchozími studiemi, které upozorňovaly na negativní dopad určitých insekticidů (Reiß et al., 2023), včetně neonicotinoidů kam řadíme i hlavní účinnou látku acetamiprid přípravku Mospilan (Zhao et al. 2022).

První hodiny experimentu nepřinesly významné statistické rozdíly mezi účinky testovaných pesticidů na mortalitu včel medonosných. Tento výsledek naznačuje, že účinky pesticidů na mortalitu včel se mohou lišit v průběhu času a že prvních 24 hodin nemusí být nejvhodnější pro identifikaci toxických účinků na včely medonosné (Tosi et al. 2021). Další hodiny experimentu již potvrdili statisticky významný rozdíl mezi insekticidem Mospilan a fungicidem Pictor, což ukazuje na variabilitu pesticidních účinků v průběhu času našeho experimentu. Fungicidy Pictor a Prosaro prokázaly nižší míru mortality, což ukazuje na jejich relativně nižší toxicitu pro opylovače v porovnání s insekticidem Mospilan, podobně jako ve dřívější studii, která porovnávala rozdíl expozice fungicidů s insekticidy na larvy a dospělce včely medonosné (Wade et al. 2019).

Celkově nejnižší úroveň mortality ze všech testovaných pesticidních látek vykazoval fungicidní přípravek Pictor, který se projevil jako méně škodlivý a relativně bezpečný vzhledem k porovnání s ostatními testovanými látkami. Na základě našeho výsledku by mohl být fungicid Pictor zajímavým objektem pro další výzkum v oblasti pesticidů a jejich vlivu na včely. Budoucí studie by se mohly zaměřit na detailnější zkoumání mechanismů tohoto fungicidu na včely a jeho potencionální dlouhodobé účinky na včelstva a ekosystém jako celek.

V rámci výsledků naší praktické části diplomové práce, lze fungicid Pictor považovat za pozitivního protagonistu hodnocení vlivu negativních účinků na experimentální jedince včel medonosných. Z hlediska bezpečnosti pro včely medonosné z našich výsledků vyplývá, že také fungicid Prosaro má určitý potenciál způsobovat menší škody ve včelích koloniích. Při porovnání těchto dvou testovaných fungicidů vykazoval Pictor nižší míru mortality včelích dělnic než přípravek Prosaro. Přesto se u přípravku Prosaro jednalo o stále nižší hodnoty toxicity než v případě insekticidního Mospilanu.

Fungicidy i přes nižší míru rizika, vykazují potenciál ohrožit přežití včel a narušit jejich normální biologické chování (Fisher et al. 2021). Studie zkoumající subletální účinky fungicidů zjistila, že konzumace pylu obsahujícího fungicidní přípravek Pristine s účinnými látkami boskalid a pyraklostrobin snížila výkonnost čichového asociačního učení včel medonosných (DesJardins et al. 2021). Toto zjištění může poukazovat na možné negativní dopady na navigační schopnosti a schopnost nalezení potravy u včel (Belsky & Joshi 2020).



V naší práci jsme se zabývali pesticidními účinky fungicidu Pictor, který obsahuje kromě dimoxystrobinu také účinnou látku Boskalid (Schuhmann & Scheiner 2023). Bylo by zajímavé provést laboratorní srovnání těchto dvou chemikálií na subletální účinky a kognitivní funkce včel. Takový výzkum by mohl přispět k lepšímu porozumění rizik spojených s použitím fungicidů pro včely.

Největší obavy při posuzování expozice vyvolávají širokospektrální fungicidy, které sice nepřekračují prahové hodnoty toxicity a nepředstavují akutní riziko, nicméně nelze na základě dostupných výzkumů vyloučit jejich chronické hrozby pro včely a jiné opylovače (Christen et al. 2019). Při posuzování rizika vlivu fungicidů na opylovače by se měl brát v úvahu také společný výskyt s jinými pesticidy, protože výskyt fungicidů s insekticidy a dalšími agrochemikáliemi sebou nese riziko škodlivých synergických účinků (Raimets et al. 2017). Je tedy důležité při plánování zemědělských postupů zvážit nejen samotnou účinnost jednotlivých pesticidů proti škůdcům, ale také jejich toxické synergické účinky na necílové organismy (Hashimi et al. 2020).

Součástí našeho testovacího experimentu bylo pozorování vlivu teploty na mortalitu včel medonosných vystavených daným testovacím pesticidům. Významné statistické rozdíly na úrovni mortality byly pozorovány při 19 °C a 27 °C v porovnání s mortalitou při teplotě 23 °C. Tyto rozdíly by mohly být důsledkem variace metabolické aktivity včel při různých teplotách (Ma et al. 2019). Je taky důležité si uvědomit, že v přirozeném prostředí mohou být dospělé včely vystaveny širokému rozmezí teplot. Od přibližně 15 °C, kdy včelí dělnice vylétávají z úlu za potravou, do 35 °C ve včelích úlech nebo i více ve venkovním horkém podnebí (Medrzycki et al. 2013). Tento fakt může mít zásadní dopad na interpretaci našich výsledků, protože mnoho dosavadních studií toxicity pesticidů s ohledem na teplotu se provádělo při standardizovaných teplotních podmínkách okolo 25 °C. Takové studie mohou vést k nepřesnému odrazu reálných podmínek, kterým jsou včely vystaveny v přírodě. Při vyšších teplotách, jako je 35 °C může docházet k rychlejšímu rozkladu pesticidů nebo k jejich aktivaci v jiných formách, což může ovlivnit jejich účinnost a potenciál toxicity (Kenna et al. 2023).

Svou roli mohou hrát i změny chování včel při různých teplotních podmínkách (Corbet et al. 1993). Například při vyšších teplotách se mohou včely více věnovat sběru potravy s ohledem na rychlejší metabolismus (Tautz et al. 2003), který zvyšuje potravní aktivitu (Schippers et al. 2006), což by mohlo zvýšit jejich expozici pesticidům.

V rámci naší shromážděné literární rešerše, která se zaměřovala na vztah mezi teplotou a účinky pesticidů na opylovače, jsme naráželi na omezený počet studií zabývajících se touto specifickou problematikou. Tento fakt podtrhuje existující nesrovnalosti v dosavadních studiích o tom, jak teplota a teplotní výkyvy zvyšují toxicitu pesticidů. Kromě toho, je důležité zdůraznit, že jen velmi málo studií přímo porovnává účinky stejného pesticidu na opylovače při různých teplotách, což ztěžuje získání komplexního pochopení toho, jak různé teploty působí na účinky daného pesticidu.

Dřívější studie zkoumající účinky karbamátů naznačuje, že nižší teploty ( $16\text{ }^{\circ}\text{C} > 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) mohou zvyšovat toxicitu pesticidů pro opylovače (Georghiou & Atkins 1964), zatímco jiná studie používající insekticidy imidacloprid a thiamethoxam ukazuje opačný trend, kde vyšší teploty ( $32\text{ }^{\circ}\text{C} > 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) mohou mít podobný účinek (Saleem et al. 2020). Podobnost mezi naším výzkumem a předchozími studii spočívá v potvrzení variabilních účinků teploty na včelu medonosnou v kontextu expozice pesticidům. Stejně jako v jiných studiích i u nás byla zjištěna závislost mezi teplotou a mortalitou včel (Verheyen & Stoks 2019), což naznačuje, že teplotní podmínky mohou hrát důležitou roli při určování citlivosti opylovačů jakožto necílových organismů na toxické látky jejich v přirozeném prostředí (DesJardins et al. 2021).

Na základě našich zjištění je nanejvýš důležité provést další výzkum, který by podrobněji zkoumal interakci mezi teplotou a účinky pesticidů na opylovače. Přestože, jsme se snažili co nejpřesněji simulovat reálné podmínky prostředí, v některých případech mohly naše experimentální podmínky nereálně ovlivnit reakci včelích dělnic na pesticidy. I přes opatření ke standardizaci metodických postupů měření se mohly vyskytnout chyby při sběru a hodnocení dat, které mohly ovlivnit výsledné hodnoty. Například chyby při identifikaci moribundních včel v rámci experimentu mohly být způsobeny subjektivním hodnocením při pozorování. Dále je třeba zohlednit, že některé výsledky mohly být ovlivněny stresovými faktory, které mohly způsobit změny metabolické aktivity v reakci na nepříznivé podněty z prostředí (Even et al. 2012). Celkově je důležité brát v úvahu tyto možné nedokonalosti a budoucí výzkum směřovat k dalšímu zdokonalení a kontroly stresových faktorů, které by mohly ovlivnit interakci mezi teplotou a účinky pesticidů u včel medonosných.

Komplexnější pohled na dlouhodobé trendy mortality včel medonosných, by mohlo poskytnout také delší sledování toxicity pesticidních přípravků, než tomu bylo v našem případě. Náš experiment trval 96 hodin, což může být relativně krátká doba na plné projevení dlouhodobých účinků pesticidů a teplotních podmínek na necílové organismy (Rondeau et al. 2014), vzhledem k tomu, že naše výsledky a trend mortality, každým dnem narůstal. Například dřívější studie (Alburaki et al. 2023) zkoumala dobu expozice až v 15denním časovém intervalu, což umožnilo lepší pochopení postupné akumulace účinků pesticidů a jejich dlouhodobý vliv na zdraví a vitalitu včelích kolonií.

V závislosti na ochraně opylovačů v důsledku intenzivního používání přípravků na ochranu rostlin je nezbytné pokračovat v dalším výzkumu a rozšiřovat vědomosti v problematice negativních účinků různých druhů pesticidů včetně fungicidů. Fungicidy i přes nižší míru rizika, vykazují potenciál ohrozit přežití včel a narušit jejich normální biologické chování (Fisher et al. 2021). Ochrana opylovačů a udržitelnost agronomického ekosystému vyžaduje integrovaný přístup, který zohledňuje komplexní interakce mezi pesticidy, opylovači a jejich prostředím. To vyžaduje spolupráci mezi vědci, zemědělci, ochranáři přírody a regulačními orgány s cílem minimalizovat negativní dopady pesticidních přípravků na necílové organismy a zajistit dlouhodobou udržitelnost zemědělských systémů.

## 7 Závěr

Na základě shromážděných studií v literární rešerši a výsledků praktické části diplomové práce na téma „Vliv teploty na negativní účinky fungicidů na včely“ můžeme vyvodit několik klíčových závěrů týkajících se vlivu fungicidů a teploty na mortalitu včelích dělnic.

Při zkoumání fungicidů jsme zaznamenali rozdíly v úrovni toxicity. Bylo zjištěno, že fungicidy Pictor a Prosaro vykazovaly rozdílnou úroveň toxicity na včely medonosné. Zatímco Pictor vykazoval nejnižší úroveň mortality, Prosaro bylo mírně toxičtější, ale stále méně než pozitivní kontrola insekticidu Mospilan.

Teplota měla statisticky významný vliv na mortalitu včel medonosných, zejména nultý experimentální den při teplotě 27 °C ve srovnání s teplotami 19 °C a 23 °C. Zatímco čtvrtý den prokázal nejvyšší mortalitu při teplotě 19 °C v porovnání s 23 °C. Tyto výsledky podporují hypotézu, že teplota a metabolické procesy v těle včel mohou ovlivňovat jejich citlivost na fungicidy.

Další výzkum zaměřený na interakci mezi teplotou, fungicidy a metabolickými procesy v těle včel by mohl zajistit větší validitu výsledků a poskytnout důležité poznatky pro ochranu včelstev a zachování biodiverzity. Další pokusy a studie by měly být navrženy tak, aby detailněji zkoumaly interakce mezi fungicidy a dalšími stresovými faktory, případně synergické účinky fungicidů s jinými pesticidy.

## 8 Literatura

Abati R, Sampaio AR, Maciel RMA, Colombo FC, Libardoni G, Battisti L, Potrich M. 2021. Bees and pesticides: The research impact and scientometrics relations. *Environmental Science and Pollution Research* **28**:32282-32298.

Aizen MA, Aguiar S, Biesmeijer JC, Garibaldi LA, Inouye DW, Jung Ch, Martins DJ, Medel R, Morales CL, Ngo H, Pauw A, Paxton RJ, Sáez A, Seymour CL. 2019. Global agricultural productivity is threatened by increasing pollinator dependence without a parallel increase in crop diversification. *Global change biology* **25**: 3516-3527.

Aizen MA, Garibaldi LA, Cunningham SA, Klein AM. 2008. Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. *Current biology* **18**:1572-1575.

Al Naggari Y, Paxton RJ. 2021. The novel insecticides flupyradifurone and sulfoxaflor do not act synergistically with viral pathogens in reducing honey bee (*Apis mellifera*) survival but sulfoxaflor modulates host immunocompetence. *Microbial biotechnology* **14**: 227-240.

Albacete S, Sancho G, Azpiazu C, Rodrigo A, Molowny-Horas R, Sgolastra F, Bosch J. 2023. Bees exposed to climate change are more sensitive to pesticides. *Global Change Biology* **29**: 6248-6260.

Alburaki A, Madella S, Cook SC. 2023. Non-optimal ambient temperatures aggravate insecticide toxicity and affect honey bees *Apis mellifera* L. gene regulation. *Scientific Reports* **13**: 3931.

Anderson KE, Carroll MJ, Sheehan TIM, Mott BM, Maes P, Corby-Harris V. 2014. Hive-stored pollen of honey bees: many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Molecular ecology* **23**: 5904-5917.

Annabi E, Ben Salem I, Abid-Essefi S. 2019. Acetamiprid, a neonicotinoid insecticide, induces cytotoxicity and genotoxicity in PC12 cells. *Toxicology mechanisms and methods* **29**: 580-586.

Baines D, Wilton E, Pawluk A, de Gorter M, Chomistek N. 2017. Neonicotinoids act like endocrine disrupting chemicals in newly-emerged bees and winter bees. *Scientific reports* (e10979) DOI: 10.1038/s41598-017-10489-6.

Baron GL, Raine NE, Brown MJF. 2014. Impact of chronic exposure to a pyrethroid pesticide on bumblebees and interactions with a trypanosome parasite. *Journal of Applied Ecology* **51**: 460-469.

Beckie HJ, Flower KC, Ashworth MB. 2020. Farming without glyphosate?. *Plants* **9**: 96.

Belsky J, Joshi NK. 2020. Effects of fungicide and herbicide chemical exposure on Apis and non-Apis bees in agricultural landscape. *Frontiers in Environmental Science* **8** (522888) DOI: 10.3389/fenvs.2020.00081.

Bernauer OM, Gaines-Day HR, Steffan SA. 2015. Colonies of bumble bees (*Bombus impatiens*) produce fewer workers, less bee biomass, and have smaller mother queens following fungicide exposure. *Insects* **6**: 478-488.

Beye M, Hasselmann M, Fondrk MK, Page RE, Omholt SW. 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* **114**: 419-429.

Biddinger DJ, Robertson JL, Mullin C, Frazier J, Ashcraft SA, Rajotte EG, Vaughn M. 2013. Comparative toxicities and synergism of apple orchard pesticides to *Apis mellifera* (L.) and *Osmia cornifrons* (Radoszkowski). *PloS one* **8** (e72587) DOI: 10.1371/journal.pone.0072587.

Boyce CK, Lee JE. 2010. An exceptional role for flowering plant physiology in the expansion of tropical rainforests and biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **277**: 3437-3443.

Boyle NK, Pitts-Stinger TL, Abbott J, Alix A, Cox-Foster DL, Hinarejos S, Lehmann DM, Morandin L, O'Neill B, Raine NE, Singh R, Thompson HM, Williams NM, Steeger T. 2019. Workshop on pesticide exposure assessment paradigm for non-Apis bees: foundation and summaries. *Environmental entomology* **48**: 4-11.

- Breeze TD, Bailey AP, Balcombe KG, Potts SG. 2011. Pollination services in the UK: How important are honeybees?. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **142**: 137-143.
- Bretagnolle V, Gaba S. 2015. Weeds for bees? A review. *Agronomy for sustainable development* **35**: 891-909.
- Brown JH, Gillooly JF, Allen AP, Savage VM, West GB. 2004. Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology* **85**: 1771-1789.
- Buszewski B, Bukowska M, Ligor M, Staneczko-Baranowska I. 2019. A holistic study of neonicotinoids neuroactive insecticides-properties, applications, occurrence, and analysis. *Environ Sci Pollut Res* **26**: 34723-34740.
- Capitani G, Papa G, Pellicchia M, Negri I. 2021. Disentangling multiple PM emission sources in the Po Valley (Italy) using honey bees. *Heliyon*. Available from [https://www.cell.com/heliyon/pdf/S2405-8440\(21\)00299-1.pdf](https://www.cell.com/heliyon/pdf/S2405-8440(21)00299-1.pdf) (accessed October 25, 2023).
- Carvalho FP. 2017. Pesticides, environment, and food safety. *Food and energy security* **6**: 48-60.
- Cecala JM, Wilson Rankin EE. 2021. Pollinators and plant nurseries: how irrigation and pesticide treatment of native ornamental plants impact solitary bees. *Proceedings of the Royal Society B* **288** (20211287) DOI: 10.1098/rspb.2021.1287.
- Christen V, Krebs J, Fent K. 2019. Fungicides chlorothanolin, azoxystrobin and folpet induce transcriptional alterations in genes encoding enzymes involved in oxidative phosphorylation and metabolism in honey bees (*Apis mellifera*) at sublethal concentrations. *Journal of Hazardous Materials* **377**: 215-226.
- Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, Oakeshott HG. 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect molecular biology* **15**: 615-636.
- Corbet SA, Fussell M, Ake R, Fraser A, Gunson C, Savage A, Smith K. 1993. Temperature and the pollinating activity of social bees. *Ecological entomology* **18**: 17-30.

Covaci B, Brejea R, Covaci M. 2023. Sweeteners World Trade and Behaviour in the Pandemic. Evidence from Honey Remedies Nexus Mountain Apis Mellifera Product. *Sugar Tech* **25**: 938-949.

Crowder DW, Illan JG. 2021. Expansion of organic agriculture. *Nature Food* **2**: 324-325.

Cullen MG, Thompson LJ, Carolan JC, Stout JC, Stanley DA. 2019. Fungicides, herbicides and bees: a systematic review of existing research and methods. *PLoS ONE* **14**: 1-17.

Cutler GC, Purdy J, Giesy JP, Solomon KR. 2014. Risk to pollinators from the use of chlorpyrifos in the United States. Ecological risk assessment for chlorpyrifos in terrestrial and aquatic systems in the United States **231**: 219-265.

Dai P, Yan Z, Ma S, Yang Y, Wang Q, Hou C, Diao Q. 2018. The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry* **66**: 7786-7793.

David A, Botías C, Abdul-Sada A, Nicholls E, Rotheray EL, Hill EM, Goulson D. 2016. Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. *Environment international* **88**: 169-178.

de Oliveira RC, do Nascimento Queiroz SC, da Luz CFP, Porto RS, Rath S. 2016. Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide contamination. *Chemosphere* **163**: 525-534.

DesJardins NS, Fisher A, Ozturk C, Fewell JH, DeGrandi-Hoffman G, Harrison JF, Smith BH. 2021. A common fungicide, Pristine®, impairs olfactory associative learning performance in honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Pollution* **288** (117720) DOI: 10.1016/j.envpol.2021.117720.

Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual review of entomology* **52**: 81-106.



Deutsch CA, Tewksbury JJ, Huey RB, Sheldon KS, Ghalambor CK, Haak DC, Martin PR. 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 6668-6672.

Dos Santos Araújo R, Bernardes RC, Martins GF. 2021. A mixture containing the herbicides Mesotrione and Atrazine imposes toxicological risks on workers of *Partamona helleri*. *Science of the Total Environment* **763** (142980) DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142980.

Dos Santos Araújo R, Viana TA, Botina LL, Bastos DSS, da Silva Alves BC, Machado-Neves M, Martins GF. 2023. Investigating the effects of mesotrione/atrazine-based herbicide on honey bee foragers. *Science of The Total Environment* **898** (165526) DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.165526.

Eilers EJ, Kremen C, Greenleaf SS, Garber AK, Klein AM. 2011. Contribution of pollinator-mediated crops to nutrients in the human food supply. *PLoS one* **6** (e21363) DOI: 10.1371/journal.pone.0021363.

Environmental Protection Agency. 2023. Integrated Pest Management (IPM) Principles. Available from <https://www.epa.gov/safepestcontrol/integrated-pest-management-ipm-principles> (accessed February 19, 2024).

Evans JD, Wheeler DE. 2001. Gene expression and the evolution of insect polyphenisms. *Bioessays* **23**: 62-68.

Even N, Devaud JM, Barron AB. 2012. General stress responses in the honey bee. *Insects* **3**: 1271-1298.

Faita MR, de Medeiros Oliveira E, Júnior VVA, Orth AI, Nodari RO. 2018. Changes in hypopharyngeal glands of nurse bees (*Apis mellifera*) induced by pollen-containing sublethal doses of the herbicide Roundup®. *Chemosphere* **211**: 566-572.

Faita MR, Chaves A, Corrêa CCG, Silveira V, Nodari RO. 2022. Proteomic profiling of royal jelly produced by *Apis mellifera* L. exposed to food containing herbicide-based glyphosate. *Chemosphere* **292** (133334) DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.133334.

Farina WM, Balbuena MS, Herbert LT, Mengoni Goñalons C, Vázquez DE. 2019. Effects of the herbicide glyphosate on honey bee sensory and cognitive abilities: Individual impairments with implications for the hive. *Insects* **10**: 354.

Favaro R, Bauer LM, Rossi M, D'Ambrosio L, Bucher E, Angeli S. 2019. Botanical origin of pesticide residues in pollen loads collected by honeybees during and after apple bloom. *Frontiers in physiology* **10**: 1069.

Fellows CJ, Anderson TD, Swale DR. 2022. Acute toxicity of atrazine, alachlor, and chlorpyrifos mixtures to honey bees. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **188** (105271) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105271>.

Fisher A, DeGrandi-Hoffman G, Smith BH, Johnson M, Kaftanoglu O, Cogley T. 2021. Colony field test reveals dramatically higher toxicity of a widely-used mito-toxic fungicide on honey bees (*Apis mellifera*). *Environmental Pollution* **269** (115964) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115964>.

Fleming TH, Muchhala N. 2008. Nectar-feeding bird and bat niches in two worlds: Pantropical comparisons of vertebrate pollination systems. *Journal of Biogeography* **35**: 764-780.

Fliszkiewicz M, Giejdasz K, Wasielewski O, Krishnan N. 2012. Influence of winter temperature and simulated climate change on body mass and fat body depletion during diapause in adults of the solitary bee, *Osmia rufa* (Hymenoptera: Megachilidae). *Environmental Entomology* **41**:1621-1630.

Földesi R, Howlett BG, Grass I, Batáry P. 2021. Larger pollinators deposit more pollen on stigmas across multiple plant species—A meta analysis. *Journal of Applied Ecology* **58**: 699-707.

Georghiou GP, Atkins Jr EL. 1964. Temperature coefficient of toxicity of certain n-methylcarbamates against honeybees, and the effect of the synergist piperonyl butoxide. *Journal of Apicultural Research* **3**: 31-35.

Godfray HCJ, Blacquiere T, Field LM, Hails RS, Petrokofsky G, Potts SG, Raine NE, Vanbergen AJ, McLean AR. 2014. A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **281** (20140558) DOI: 10.1098/rspb.2014.0558.

Godfray HCHJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C. 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* **327**: 812-818.

Gomes SIL, Ammendola A, Casini S, Amorim MJB. 2021. Toxicity of fungicides to terrestrial non-target fauna-Formulated products versus active ingredients (azoxystrobin, cyproconazole, prothioconazole, tebuconazole) – A case study with *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta). *Science of the total environment* **754**: (142098) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142098>.

González-Alcaraz MN, Malheiro C, Cardoso DN, Prodana M, Morgado RG, van Gestel M, Loureiro S. 2020. Bioaccumulation and toxicity of organic chemicals in terrestrial invertebrates. *Bioavailability of organic Chemicals in Soil and Sediment* 149-189.

González-Tokman D, Córdoba-Aguilar A, Dáttilo W, Lira-Noriega A, Sánchez-Guillén RA, Villalobos F. 2020. Insect responses to heat: Physiological mechanisms, evolution and ecological implications in a warming world. *Biological Reviews* **95**: 802-821.

Goulson D, 232 Signatories. 2018. Call to restrict neonicotinoids. *Science* **360**: 973-973.

Gradish AE, Van Der Steen J, Scott-Dupree CD, Cabrera AR, Cutler GC, Goulson D, Klein O, Lehmann DM, Lückmann J, O'Neill B, Raine NE, Sharma B, Thompson H. 2019. Comparison of pesticide exposure in honey bees (Hymenoptera: Apidae) and bumble bees (Hymenoptera: Apidae): implications for risk assessments. *Environmental Entomology* **48**:12-21.

Grixti JC, Wong LT, Cameron SA, Favret C. 2009. Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. *Biological conservation* **142**: 75-84.

Hamilton WD. 1964. The genetical evolution of social behaviour. u I and II. *Journal of Theoretical Biology* **7**: 1-52.

Harwood AD, You J, Lydy MJ. 2009. Temperature as a toxicity identification evaluation tool for pyrethroid insecticides: Toxicokinetic confirmation. *Environmental toxicology and chemistry* **28**: 1051-1058.

Hashimi MH, Hashimi R, Ryan Q. 2020. Toxic effects of pesticides on humans, plants, animals, pollinators and beneficial organisms. *Asian plant research journal* **5**: 37-47.

Havstad LT, Øverland JI, Valand S, Aamlid TS. 2019. Repellency of insecticides and the effect of thiacloprid on bumble bee colony development in red clover (*Trifolium pratense* L.) seed crops. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B – Soil & Plant Science* **69**: 439-451.

Helmer SH, Kerbaol A, Aras P, Jumarie C, Boily M. 2015. 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* **22**: 8010-8021.

Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Decourtye A. 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* **336**: 348-350.

Hooper MJ, Ankley GT, Cristol DA, Maryoung LA, Noyes PD, Pinkerton KE. 2013. Interactions between chemical and climate stressors: a role for mechanistic toxicology in assessing climate change risks. *Environmental toxicology and chemistry* **32**: 32-48.

Hradská I. 2016. Naši opylovači, aneb nejen včely mají zásluhy. Available from <https://otik.uk.zcu.cz/bitstream/11025/29374/1/Nashi%20opylovači.pdf> (accessed March 28, 2024).

Hung KLJ, Kingston JM, Albrecht M, Holway DA, Kohn JR. 2018. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **285** (20172140) DOI: 10.1098/rspb.2017.2140.

Chen Y, Xu J, Zheng X, Zhang Q, Wang B, Zhao M, Lu X. 2022. Effects of glyphosate herbicide Roundup® on antioxidant enzymes activity and detoxification-related gene expression in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* **62**: 1145-1152.

Iverson A, Hale C, Richardson L, Miller O, McArt S. 2019. Synergistic effects of three sterol biosynthesis inhibiting fungicides on the toxicity of a pyrethroid and neonicotinoid insecticide to bumble bees. *Apidologie* **50**: 733-744.

Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM. 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* **23**: 371-378.

Jiang X, Wang Z, He Q, Liu Q, Li X, Yu L, Cao H. 2018. The effect of neonicotinoid insecticide and fungicide on sugar responsiveness and orientation behavior of honey bee (*Apis mellifera*) in semi-field conditions. *Insects* **9**: 130.

Johnson RM, Dahlgren L, Siegfried BD, Ellis MD. 2013. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). *PloS one* **8** (e54092) DOI: 10.1371/journal.pone.0054092.

Johnson RM. 2015. Honey bee toxicology. *Annual review of entomology* **60**: 415-434.

Kadlikova K, Vaclavikova M, Halesova T, Kamler M, Markovic M, Erban T. 2021. The investigation of honey bee pesticide poisoning incidents in Czechia. *Chemosphere* **263**: 128056.

Kazda J, Volková M. 2016. Repelence či atraktivita vybraných pesticidních přípravků, aplikovaných do řepky, pro opylovače. Available from [http://konference.agrobiologie.cz/2016-1206/24\\_Volkova\\_Kazda\\_REPELENCE\\_CI\\_ATRAKTIVITA\\_VYBRANYCH\\_PESTICIDNICH\\_PRIPRAVKU\\_APLIKOVANYCH\\_DO\\_REPKY\\_PRO\\_OPYLOVACE.pdf](http://konference.agrobiologie.cz/2016-1206/24_Volkova_Kazda_REPELENCE_CI_ATRAKTIVITA_VYBRANYCH_PESTICIDNICH_PRIPRAVKU_APLIKOVANYCH_DO_REPKY_PRO_OPYLOVACE.pdf) (accessed April 2023).

Kešnerová L, Emery O, Troilo M, Liberti J, Erkosar B, Engel P. 2020. Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. *The ISME journal* **14**: 801-814.

Kenna D, Graystock P, Gill RJ. 2023. Toxic temperatures: Bee behaviours exhibit divergent pesticide toxicity relationships with warming. *Global Change Biology* **29**: 2981-2998.

Kiljanek T, Niewiadowska A, Posyniak A. 2016. Pesticide poisoning of honeybees: a review of symptoms, incident classification, and causes of poisoning. *Journal of Apicultural Science* **60**: 5-24.

Kinoshita LS, Torres RB, Forni-Martins ER, Spinelli T, Ahn YJ, Constâncio SS. 2006. Composição florística e síndromes de polinização e de dispersão da mata do Sítio São Francisco, Campinas, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **20**: 313-327.

Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B: biological sciences* **274**: 303-313.

Kudsk P, Jørgensen LN, Ørum JE. 2018. Pesticide Load—A new Danish pesticide risk indicator with multiple applications. *Land Use Policy* **70**:384-393.

Ladurner E, Bosch J, Kemp WP, Maini S. 2005. Assessing delays and acute toxicity of five formulated fungicides to *Osmia lignaria* Say and *Apis mellifera*. *Apidologie* **36**: 449-460.

Lau CO, Tan CH, Li QT, Ng FH, Yuen R, Khoo HE. 1995. Bioactivity and mechanism of action of *Lophozymus pictor* toxin. *Toxicon* **33**: 901-908.

Lentola A, David A, Abdul-Sada A, Tapparo A, Goulson D, Hill EM. 2017. Ornamental plants on sale to the public are a significant source of pesticide residues with implications for the health of pollinating insects. *Environmental Pollution* **287**:297-304.

Li Z, Huang ZY, Sharma DB, Xue Y, Wang Z, Ren B. 2016. Drone and worker brood microclimates are regulated differentially in honey bees, *Apis mellifera*. *PloS one* **11** (e0148740) DOI: 10.1371/journal.pone.0148740.

- Ma W, Li X, Shen J, Du Y, Xu K, Jiang Y. 2019. Transcriptomic analysis reveals *Apis mellifera* adaptations to high temperature and high humidity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **184**: 109599.
- Mahmood I, Imadi SR, Shazadi K, Gul A, Hakeem KR. 2016. Effects of pesticides on environment. *Plant, soil and microbes* **1**: 253-269.
- Main AR, Webb EB, Goyne KW, Mengel D. 2020. Reduced species richness of native bees in field margins associated with neonicotinoid concentrations in non-target soils. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **287** (106693) DOI: 10.1016/j.agee.2019.106693.
- Matsuda M, Takahashi H. 1996. Mospilan®(acetamiprid, NI-25)-a new systemic insecticide.
- McCune F, Samson-Robert O, Rondeau S, Chagnon M, Fournier V. 2021. Supplying honey bees with waterers: a precautionary measure to reduce exposure to pesticides. *Environmental Science and Pollution Research* **28**:17573-17586.
- McDougall R, DiPaola A, Blaauw B, Nielsen AL. 2021. Managing orchard groundcover to reduce pollinator foraging post-bloom. *Pest Management Science* **77**: 3554-3560.
- Medrzycki P, Tosi S, Bogo G, Porrini C. 2013. Influence of temperature on honey bee susceptibility to pesticides. In *Proceedings of American Bee Research Conference, Hershey, PA, 2013*. 3-4.
- Meled M, Thrasyvoulou A, Belzunces LP. 1998. Seasonal variations in susceptibility of *Apis mellifera* to the synergistic action of prochloraz and deltamethrin. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal* **17**: 2517-2520.
- Menzel R. 2001. Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learning & memory* **8**: 53-62.
- Millar NS, Denholm I. 2007. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invertebrate Neuroscience* **7**: 53-66.

Mitchell EAD, Mulhauser B, Mulot M, Mutabazi A, Glauser G, Aebi A. 2017. A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science* **358**: 109-111.

Moffett JO, Stoner A, Standifer LN, Wardecker AL. 1981. Effect of Moving, Confinement to Ramadas, and Wardecker Waterers on Mortality of honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Exposed to Insecticides Sprayed on Cotton. *Journal of the Kansas Entomological Society* **54**: 381-386.

Motta EV, Mak M, De Jong TK, Powell JE, O'Donnell A, Suhr KJ, Moran NA. 2020. Oral or topical exposure to glyphosate in herbicide formulation impacts the gut microbiota and survival rates of honey bees. *Applied and environmental microbiology* **86** (e01150-20) DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-20>.

Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, VanEngelsdorp D, Pettis JS. 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PloS one* **5** (e9754) DOI: 10.1371/journal.pone.0009754.

Ollerton J, Winfree R, Tarrant S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals?. *Oikos* **120**:321-326.

Ollerton J. 2017. Pollinator diversity: distribution, ecological function, and conservation. *Annual review of ecology, evolution, and systematics* **48**:353-376.

Page RE, Peng CY. 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental gerontology* **36**:695-711.

Paludo CR, Menezes C, Silva-Junior EA, Vollet-Neto A, Andrade-Dominguez A, Pishchany G, Pupo MT. 2018. Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. *Scientific reports* **8**: 1122.

Papa G, Maier R, Durazzo A, Lucarini M, Karabagias IK, Plutino M, Bianchetto E, Aromolo R, Pignatti G, Ambrogio A, Pellecchia G, Ambrogio A, Pellecchia M, Negri I. 2022. The Honey Bee *Apis mellifera*: An Insect at the interface between Human and Ecosystem Health. *Biology* **11**:233.



- Piggott JJ, Townsend CR, Matthae CD. 2015. Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. *Ecology and evolution* **5**: 1538-1547.
- Pineaux M, Gâteau S, Lirand T, Aupinel P, Richard FJ. 2023. Honeybee queen exposure to a widely used fungicide disrupts reproduction and colony dynamic. *Environmental Pollution* **322**: 121131.
- Pohorecka K, Szczesna T, Witek M, Miszczak A, Sikorski P. 2017. The exposure of honey bees to pesticide residues in the hive environment with regard to winter colony losses. *Journal of Apicultural Science* **61**: 105-125
- Potts SG, Imperatriz-Fonseca V, Ngo HT, Aizen MA, Biesmeijer JC, Breeze TD, Dicks LV, Garibaldi LA, Hill R, Settele J, Vanbergen AJ. 2016. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature* **540**: 220-229.
- Potts SG, Petanidou T, Roberts S, O'Toole C, Hulbert A, Willmer P. 2006. Plant-pollinator biodiversity and pollination services in a complex Mediterranean landscape. *Biological conservation* **129**: 519-529.
- Prosser SW, Hebert PD. 2017. Rapid identification of the botanical and entomological sources of honey using DNA metabarcoding. *Food Chemistry* **214**: 183-191.
- Qu RY, He B, Yang JF, Lin HY, Yang WC, Wu QY, Yang GF. 2021. Where are the new herbicides?. *Pest Management Science* **77**: 2620-2625.
- Quigley TP, Amdam GV, Harwood GH. 2019. Honey bees as bioindicators of changing global agricultural landscapes. *Current opinion in insect science* **35**: 132-137.
- Rafika D, Fadila K, Nedjoud G, Hana B, Nouredine G, Abdelhak G. 2022. Triazole fungicide Prosaro EC 250-induced Hematological and Biochemical Alterations in Male Rabbits (*Oryctolagus Cuniculus*). *Journal of Bioresource Management* **9**: 9.

Raimets R, Karise R, Mänd M, Kaart T, Ponting S, Song J, Cresswell JE. 2017. 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* **74**: 541-546.

Randall NP, Donnison LM, Lewis PJ, James KL. 2015. How effective are onfarm mitigation measures for delivering an improved water environment? A systematic map. *Environmental Evidence* **4**: 1-15.

Reiß F, Schuhmann A, Sohl L, Thamm M, Scheiner R, Noll M. 2023. Fungicides and insecticides can alter the microbial community on the cuticle of honey bees. *Frontiers in Microbiology* **14** (1271498) DOI: 10.3389/fmicb.2023.1271498.

Reilly TJ, Smalling KL, Orlando JL, Kuivila KM. 2012. Occurrence of boscalid and other selected fungicides in surface water and groundwater in three targeted use areas in the United States. *Chemosphere* **89**: 228-234.

Rondeau G, Sánchez-Bayo F, Tennekes HA, Decourtye A, Ramírez-Romero R, Desneux N. 2014. Delays and time-cumulative toxicity of imidacloprid in bees, ants and termites. *Scientific reports* **4**: 5566.

Rondeau S, Raine NE. 2022. Fungicides and bees: a review of exposure and risk. *Environment International* **165** (107311) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107311>.

Rundlöf M, Lundin O. 2019. Can costs of pesticide exposure for bumblebees be balanced by benefits from a mass-flowering crop?. *Environmental Science & Technology* **53**:14144-14151.

Ruttner F. 1998. Morphometric analysis and classification. *Biogeography and taxonomy of honeybees* 66-78.

Saleem MS, Huang ZY, Milbrath MO. 2020. Neonicotinoid pesticides are more toxic to honey bees at lower temperatures: implications for overwintering bees. *Frontiers in Ecology and Evolution* **8** DOI: 10.3389/fevo.2020.556856.

Sanchez-Bayo F, Goka K. 2014. Pesticide residues and bees-a risk assessment. *PloS one* **9**: (e94482) DOI: 10.1371/journal.pone.0094482.

Sanchez-Bayo F, Goka K. 2016. Impacts of pesticides on honey bees. *Beekeeping and bee conservation-advances in research* **4**:77-97.

Serra RS, Martínez LC, Cossolin JFS, Santos de Resende MTC, Carneiro LS, Fiaz M, Serrão JE. 2023. The fungicide azoxystrobin causes histopathological and cytotoxic changes in the midgut of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology* **32**: 234-242.

Sgolastra F, Arnan X, Cabbri R, Isani G, Medrzycki P, Teper D, Bosch J. 2018. Combined exposure to sublethal concentrations of an insecticide and a fungicide affect feeding, ovary development and longevity in a solitary bee. *Proceedings of the Royal Society B* **285** (20180887) DOI: 10.1098/rspb.2018.0887.

Sharma A, Jha P, Reddy GV. 2018. Multidimensional relationships of herbicides with insect-crop food webs. *Science of the total environment* **643**:1522-1532.

Schippers MP, Dukas R, Smith RW, Wang J, Smolen K, McClelland GB. 2006. Lifetime performance in foraging honeybees: behaviour and physiology. *Journal of experimental biology* **209**: 3828-3836.

Schmaranzer S. 2000. Thermoregulation of water collecting honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* **46**:1187-1194.

Schuhmann A, Scheiner R. 2023. A combination of the frequent fungicides boscalid and dimoxystrobin with the neonicotinoid acetamiprid in field-realistic concentrations does not affect sucrose responsiveness and learning behavior of honeybees. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **256** (114850) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114850>.

Schuhmann A, Schmid AP, Manzer S, Schulte J, Scheiner R. 2022. Interaction of insecticides and fungicides in bees. *Frontiers in Insect Science* **1** (808335) DOI: 10.3389/finsc.2021.808335.

Simon-Delso N, Martin GS, Bruneau E, Minsart LA, Mouret C, Hautier L. 2014. Honeybee colony disorder in crop areas: the role of pesticides and viruses. *PLoS ONE* **9** (e103073) DOI: 10.1371/journal.pone.0103073.

Skalka P. 2009. *Zoologický slovník*. Nakladatelství Plot, Praha.

Skowronek P, Wójcik Ł, Strachecka A, Brivio F. 2021. Fat body multifunctional insect tissue. *Insects* **12**:547.

Stanley J, Preetha G. 2016. Pesticide toxicity to fishes: exposure, toxicity and risk assessment methodologies. Pesticide toxicity to non-target organisms: Exposure, toxicity and risk assessment methodologies DOI: 10.1007/978-94-017-7752-0\_7.

Storey KB, Storey JM. 2004. Metabolic rate depression in animals: Transcriptional and translational controls. *Biological Reviews* **79**: 207-233.

Straka J, Bogusch P, Přidal A. 2007. Apoidea: Apiformes (včely). Annotated checklist of the Aculeata (Hymenoptera) of the Czech Republic and Slovakia. Komentovaný seznam žahadlových blankokřídlných (Hymenoptera: Aculeata) České republiky a Slovenska. *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae, Supplementum* **11**: 1–300.

Strange RN, Scott PR. 2005. Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 83-116.

Straw EA, Stanley DA. 2023. Weak evidence base for bee protective pesticide mitigation measures. *Journal of Economic Entomology* **116**: 1604-1612.

Straw EA. 2022. A brief Note on Pollinator Exposure to Co-Formulants and Adjuvants. *Environmental Toxicology and Chemistry* **41**: 1584-1585.

Szwejda J, Nawrocka B. 2000. Zoocides used in pest control on vegetable crops in last 40 years. *Progress in Plant Protection* **40**: 132-137.

Tautz J, Maier S, Groh C, Rössler W, Brockmann A. 2003. Behavioral performance in adult honey bees is influenced by the temperature experienced during their pupal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 7343-7347.

Thompson HM, Fryday SL, Harkin S, Milner S. 2014. Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. *Apidologie* **45**: 545-553.

Tong Z, Duan J, Wu Y, Liu Q, He Q, Shi Y, Yu L, Cao H. 2018. Evaluation of highly detectable pesticides sprayed in *Brassica napus* L.: Degradation behavior and risk assessment for honeybees. *Molecules* **23**:2482.

Tosi S, Nieh JC. 2017. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, alters honey bee activity, motor functions, and movement to light. *Scientific reports* **7**:15132.

Tosi S, Nieh JC, Brandt A, Colli M, Fourrier J, Giffard H, Hernández-López J, Malagnini V, Williams GR, Simon-Delso N. 2021. Long-term field-realistic exposure to a next-generation pesticide, flupyradifurone, impairs honey bee behaviour and survival. *Communications biology* **4**: 805.

Tsvetkov M, Samson-Robert O, Sood K, Patel HS, Malena DA, Gajiwala PH, Zayed A. 2017. Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science* **356**: 1395-1397.

Vázquez DE, Balbuena MS, Chaves F, Gora J, Menzel R, Farina WM. 2020. Sleep in honey bees is affected by the herbicide glyphosate. *Scientific Reports* **10**: 10516.

Verheyen J, Stoks R. 2019. Current and future daily temperature fluctuations make a pesticide more toxic: Contrasting effects on life history and physiology. *Environmental Pollution* **248**: 209-218.

Wade A, Lin CH, Kurkul C, Regan ER, Johnson RM. 2019. Combined toxicity of insecticides and fungicides applied to California almond orchards to honey bee larvae and adults. *Insects* **10**: 20.

Walker EK, Brock GN, Arvidson RS, Johnson RM. 2022. Acute toxicity of fungicide-insecticide-adjuvant combinations applied to almonds during bloom on adult honey bees. *Environmental Toxicology and Chemistry* **41**: 1042-1053.

Wang K, Cai M, Sun J, Chen H, Lin Z, Wang Z, Niu Q, Ji T. 2023. Atrazine Exposure Dysregulates the Immune System and Increases Mortality Due to Opportunistic Pathogens in Honeybees. Available from [https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract\\_id=4326395](https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=4326395) (accessed October 10, 2023).

Wardhaugh CW, Stork NE, Edwards W, Grimbacher PS. 2012. The Overlooked Biodiversity of Flower-Visiting Invertebrates. *PLoS ONE* **7** (e45796) DOI: 10.1371/journal.pone.0045796.

Watson K, Stallins JA. 2016. Honey bees and colony collapse disorder. A pluralistic reframing. *Geography Compass* **10**: 222-236.

Węgorzek P, Drożdżyński D, Mrówczyński M, Zamojska J. 2009. Dynamics of acetamiprid disappearance in oilseed rape plant tissues in connection with its toxic action against pollen beetle (*Meligethes seneus* F.) and its influence on ecological aspect of oilseed rape chemical protection. *Ecological Chemistry and Engineering* **16**: 83-90.

Willer H, Trávníček J, Schlatter S. 2024. The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2024 1-352.

Willming MM, Qin G, Maul JD. 2013. Effects of environmentally realistic daily temperature variation on pesticide toxicity to aquatic invertebrates. *Environmental toxicology and chemistry* **32**: 2738-2745.

Witthöft W. 1967. Absolute Anzahl und Verteilung der Zellen im Hirn der Honigbiene. *Z Morph Tiere*. External Resources Crossref **61**: 160-184.

Wood SC, Kozii IV, Medici de Mattos I, de Carvalho Macedo Silva r, Klein CD, Dvylyuk I, Simko E. 2019. Chronic High-Dose Neonicotinoid Exposure Decreases Overwinter Survival of *Apis mellifera* L. *Insects* **11**: 30.

World Health Organization. 2005. Ecosystems and human well-being. Health Synthesis. Island Press, Washington, DC. Available from [https://www.unioviado.es/ranadon/Ricardo\\_Anadon/docencia/DoctoradoEconomia/Millenium%20Eco%20Assesment%2005%20Health.pdf](https://www.unioviado.es/ranadon/Ricardo_Anadon/docencia/DoctoradoEconomia/Millenium%20Eco%20Assesment%2005%20Health.pdf) (accessed October 25, 2023).

Zattara EE, Aizen MA. 2021. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth* **4**:114-123.

Zeifman L, Hertog S, Kantorova V, Wilmoth J. 2022. A world of 8 bilion. Available from [https://www.un.org/development/desa/dpad/wpcontent/uploads/sites/45/publication/PB\\_140.pdf](https://www.un.org/development/desa/dpad/wpcontent/uploads/sites/45/publication/PB_140.pdf) (accessed March 28, 2024).

Zhang W, Chang XQ, Hoffmann AA, Zhang S, Ma CS. 2015. Impact of hot events at different developmental stages of a moth: The closer to adult stage, the less reproductive output. *Scientific Reports* **5**: 1-9.

Zhang Y, Cai T, Ren Z, Liu Y, Yuan M, Cai Y, Yu Ch, Shu R, He S, Li J, Wong ACN, Wan H. 2021. Decline in symbiont-dependent host detoxification metabolism contributes to increased insecticide susceptibility of insects under high temperature. *The ISME Journal* **15**: 3693-3703.

Zhao H, Li G, Cui X, Wang H, Liu Z, Yang Y, Xu B. 2022. Review on effects of some insecticides on honey bee health. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **188** (105219) DOI: 10.1016/j.pestbp.2022.105219.

Zhou T, Zhou W, Wang Q, Dai PL, Liu F, Zhang YL, Sun JH. 2011. Effects of pyrethroids on neuronal excitability of adult honeybees *Apis mellifera*. *Pesticide biochemistry and physiology* **100**: 35-40.

Zioga E, Kelly R, White B, Stout JC. 2020. Plant protection product residues in plant pollen and nectar: A review of current knowledge. *Environmental research* **189** (109873) DOI: 10.1016/j.envres.2020.109873.

Zubrod JP, Bundschuh M, Arts G, Brühl CA, Imfeld G, Knäbel A, Payraudeau S, Rasmussen JJ, Rohr J, Scharmüller A, Smalling K, Stehle S, Schulz R, Schäfer RB. 2019. Fungicides: an overlooked pesticide class?. *Environmental science & technology* **53**: 3347-3365.



## 9 Seznam obrázků, tabulek a grafů

### 9.1 Seznam Obrázků

<b>Obrázek 1: Možné mechanismy rizika expozice pesticidy pro včely medonosné (upraveno dle Johnson 2015).....</b>	<b>8</b>
<b>Obrázek 2: Pokusné testovací teploty v klima boxech pro jednotlivé testovací pesticidy (©Dominika Komárková).....</b>	<b>21</b>
<b>Obrázek 4: Fotodokumentace průběhu experimentu z praktické části (d,e,f) (©Dominika Komárková).....</b>	<b>23</b>
<b>Obrázek 3: Fotodokumentace průběhu experimentu z praktické části (a,b,c) (©Dominika Komárková).....</b>	<b>23</b>

### 9.2 Seznam Tabulek

<b>Tabulka 1: Harmonogram průběhu práce v jednotlivých dnech testovacího pokusu. ...</b>	<b>20</b>
<b>Tabulka 2: Souhrn výsledných p-hodnot statistické analýzy vlivu pesticidů a teplotních podmínek včely medonosné.....</b>	<b>25</b>

### 9.3 Seznam Grafů

<b>Graf 1: Hodnocení vlivu testovaných pesticidů na mortalitu včel medonosných. ....</b>	<b>29</b>
<b>Graf 2: Hodnocení vlivu teploty na mortalitu včel medonosných při použití daného pesticidu. ....</b>	<b>29</b>
<b>Graf 3: Průměr zkonzumovaného množství podané potravy na jednu testovací krabici ve vztahu na testovaný pesticid. ....</b>	<b>30</b>
<b>Graf 4: Průměr zkonzumovaného množství podané potravy na jednu testovací krabici ve vztahu k teplotě.....</b>	<b>30</b>



