

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra agroekologie a rostlinné produkce**



**Subletální efekt neonicotinoidů na bezobratlé**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Anna Jelínková**

**Obor studia: Speciální chovy**

**Vedoucí práce: doc. Mgr. Stanislav Korenko, Ph.D.**

©2019 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Subletální efekt neonikotinoidů na bezobratlé" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Mgr. Stanislavu Korenkovi Ph.D. za jeho pomoc při psaní této bakalářské práce.

# Subletální efekt neonikotinoidů na bezobratlé

## Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá nejčastějšími subletálními účinky neonikotinoidových insekticidů na hospodářsky významné bezobratlé jako jsou především včely medonosné (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) a čmeláci zemní (*Bombus terrestris* Linnaeus, 1758). Zaměřuje se nejen na jednotlivce těchto druhů, ale i na celé jejich kolonie. Zároveň je v této práci upozorněno na nedostatky ve výzkumech. Neonikotinoidy mohou mít velmi negativní dopad na všechny druhy bezobratlých a tím i na celý ekosystém. Bohužel subletální účinky neonikotinoidů ještě nejsou řádně prozkoumány na všech druzích, a proto se stále v mnoha zemích hojně používají. V Evropské unii je jejich používání již zakázáno, což ale podle mého názoru neznamená, že by se měly přestat dále zkoumat.

**Klíčová slova:** insekticid, včela medonosná, neonikotinoid, subletální účinek, necílové organismy

# Sublethal effects of neonicotinoids on invertebrates

## Summary

This bachelor's thesis is about the most common sublethal effects of neonicotinoid insecticides on invertebrates that are agriculturally important, such as honeybees (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) and bumblebees (*Bombus terrestris* Linnaeus, 1758). Thesis is not only talking about the specific individuals of the species, but about the whole colonies aswell. At the same time this thesis is warning about insufficiencies of our research. Neonicotinoids can have severely negative impact on all species of invertebrates and therefore the whole ecosystem. Unfortunately the sublethal effects of neonicotinoids are not yet fully explored on all species, and they are still commonly used in many countries. In European Union their use is already forbidden, but in my opinion that does not mean, that their research should be abandoned.

**Keywords:** insecticide, honeybee, neonicotinoid, sublethal effect, nontarget organisms

<b>1</b>	<b>Obsah</b>	
<b>2</b>	<b>Úvod</b>	<b>- 1 -</b>
<b>3</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>- 2 -</b>
<b>4</b>	<b>Neonikotinoidy</b>	<b>- 3 -</b>
<b>4.1</b>	<b>Vlastnosti</b>	<b>- 4 -</b>
4.1.1	Poločas rozpadu	- 5 -
4.1.2	Hazard quotient	- 5 -
<b>4.2</b>	<b>Kontaminace necílových organismů</b>	<b>- 7 -</b>
4.2.1	Prach	- 8 -
4.2.2	Půda	- 8 -
4.2.3	Voda	- 9 -
4.2.4	Potrava	- 10 -
<b>4.3</b>	<b>Účinek na nervovou soustavu</b>	<b>- 10 -</b>
<b>4.4</b>	<b>Použití</b>	<b>- 11 -</b>
<b>5</b>	<b>Subletální účinky neonikotinoidů</b>	<b>- 12 -</b>
<b>5.1</b>	<b>Opylovači</b>	<b>- 13 -</b>
5.1.1	Včela medonosná	- 15 -
5.1.2	Čmelák	- 21 -
<b>5.2</b>	<b>Ostatní bezobratlí</b>	<b>- 25 -</b>
5.2.1	Žížaly	- 27 -
<b>6</b>	<b>Závěr</b>	<b>- 29 -</b>
<b>7</b>	<b>Literatura</b>	<b>- 31 -</b>

## 2 Úvod

Neonikotinoidy jsou relativně nové systémové insekticidy, které působí toxicky na nervovou soustavu hmyzu. Jednou z jejich hlavních výhod je právě vysoká selektivita pro hmyz (nejsou příliš toxické pro obratlovce) a proto jsou používány především k ochraně rostlin před hmyzími škůdci (Tomizawa & Casida 2005; Jeschke & Nauen 2008; Bonmatin et al. 2015; Pisa et al. 2015). Patří mezi nejpoužívanější pesticidy na světě. Pouze imidacloprid je používán na 140 různých druhů rostlin ve 120 zemích (Easton & Goulson 2013). Kvůli jejich vysoké toxicitě a širokému použití mají negativní dopad na životní prostředí (Tomizawa & Casida 2005; Jeschke & Nauen 2008; Bonmatin et al. 2015; Pisa et al. 2015).

Mnoho počátečních a nynějších výzkumů zkoumajících dopad neonikotinoidových insekticidů na bezobratlé používá imidacloprid, který začal být komerčně používán jako první. Celkově je množství výzkumů provedených s ostatními neonikotinoidy relativně nižší než s imidaclopridem (Cloyd a Bethke 2010).

### **3 Cíl práce**

Cílem práce je shrnout nejčastější subletální účinky, které mohou neonikotinoidy mít na různé druhy bezobratlých živočichů a tím poukázat na jejich škodlivost pro životní prostředí. Vzhledem k tomu, že účinky neonikotinoidů ještě nejsou zcela prozkoumány na všech druzích bezobratlých, bude se tato práce zabývat hlavně hmyzem, a to především hospodářsky významným.



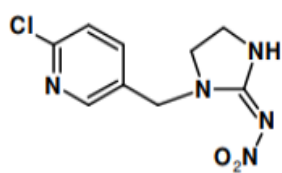
## 4 Neonikotinoidy

Objevení neonikotinoidů jako insekticidů můžeme označit jako důležitý milník v agrochemickém průmyslu. Neonikotinoidy byly vyvinuty v 80. letech 20. století a první komerčně prodávanou sloučeninou byl imidacloprid (Nauen & Denholm 2005; Jeschke & Nauen 2008; Goulson 2013). Dnes neonikotinoidy reprezentují nejrychleji se vyvíjející třídu insekticidů uvedenou na trh od doby komercializace pyrethroidů (Nauen & Denholm 2005; Jeschke & Nauen 2008).

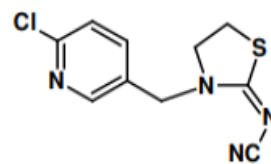
V Evropě jsou všechny druhy pesticidy testovány podle směrnic EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) (Mommaerts et al. 2010).

Jejich popularita je vysoká díky jejich vysoké toxicitě pro cílové bezobratlé, jednoduchosti a flexibilitě při aplikaci, dlouhotrvajícímu účinku a systémové povaze, která zajišťuje rozšíření aktivní látky po celé rostlině (Bonmatin et al. 2015; Tomizawa & Casida 2005; Jeschke & Nauen 2008). Poté co jsou nasáty kořeny rostliny, kolují rostlinnými pletivy, především díky xylému, a zajišťují ochranu proti mnohým, bodavě-sacím škůdcům (Bonmatin et al. 2015).

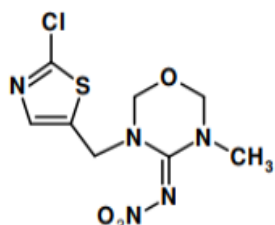
Běžné názvy používaných neonikotinoidů jsou imidacloprid, acetamiprid, dinotefuran, nitenpyram, thiacloprid, clothianidin a thiamethoxam (Tomizawa & Casida 2005). S ohledem na složení molekuly můžeme těchto sedm volně dostupných neonikotinoidů rozdělit na sloučeniny s otevřeným řetězcem a na cyklické neonikotinoidy, nebo na pěti a šestičlenné sloučeniny (Jeschke & Nauen 2008). Všechny neonikotinoidové insekticidy mají podobnou chemickou strukturu (viz obr. 1) a způsob fungování (Nauen & Denholm 2005; Cloyd & Bethke 2010). Neonikotinoidy jsou relativně malé molekuly rozpustné ve vodě. Rozpustnost neonikotinoidů ve vodě závisí na mnoha faktorech jako je teplota vody, pH a na skupenství ve kterém se insekticid nachází při aplikaci (Bonmatin et al. 2015). Jsou neionizovatelné a obtížně hydrolyzovatelné při fyziologických hodnotách pH (Jeschke & Nauen 2008).



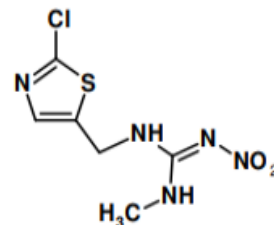
**Imidacloprid**



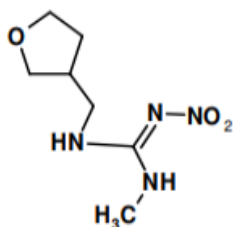
**Thiacloprid**



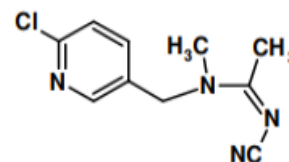
**Thiamethoxam**



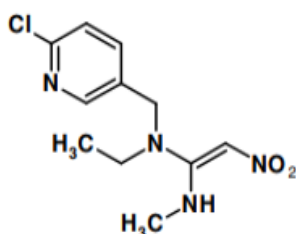
**Clothianidin**



**Dinotefuran**



**Acetamiprid**



**Nitenpyram**

Obr. 1: Strukturální vzorce sedmi komerčně používaných neonikotinoidů podle Nauena & Denholma (2005).

## 4.1 Vlastnosti

Ačkoli neonikotinoidy, jako chemická skupina, mají podobnou chemickou strukturu, velmi se liší v určitých charakteristikách ovlivňujících jejich vniknutí do rostliny, které zahrnují rozpustnost ve vodě, pH, poločas rozpadu v půdě a lipofilii sloučeniny. Lipofilie je schopnost sloučeniny rozpustit se v tukách. Absorpce kořeny je větší, čím je sloučenina

lipofilnější. Další potenciálně důležitý rozdíl může být v tom, jaký dopad mají neonikotinoidy na necílové organismy jako jsou například přirození nepřátelé škůdců (predátoři a parazitoidi) nebo opylovači (Cloyd & Bethke 2010). Neonikotinoidy obsahující nitro skupinu jako například imidacloprid a thiamethoxam způsobují největší škody pro necílové organismy. Zatímco neonikotinoidy s kyano skupinou jako je např. thiacloprid mají aktivitu nižší. (Jones et al. 2006; Pisa et al. 2015). Zároveň je třeba brát v úvahu že komerčně prodávané insekticidy často obsahují pomocné látky, které pozměňují chování aktivní složky použitého přípravku (Bonmatin et al. 2015).

#### **4.1.1 Poločas rozpadu**

Rychlost rozkladu neonikotinoidů v půdě závisí na mnoha faktorech jako jsou: textura půdy a obsah organických látek v ní, ultrafialové záření (pro rozklad na povrchu), vlhkost, teplota a pH. Kvůli tomu se rychlost rozkladu liší místo od místa. Ve středních a vysokých zeměpisných šířkách bývá poločas rozpadu obecně vyšší než na rovníku, především kvůli teplotě a délce slunečního svitu (Bonmatin et al. 2015).

Poločas rozpadu (DT50) imidaclopridu se pohybuje mezi 100-1 230 dny po aplikaci. Poločas rozpadu clothianidinu v půdě má ještě větší rozpětí než u imidaclopridu, pohybuje se od 148 až do 7 000 dní. Avšak rozklad na povrchu je rychlejší díky UV záření. Poločas rozpadu u acetamipridu je 31-450 dní, u dinotefuranu 75-82 dní, u nitenpyramu kolem 8 dní, u thiaclopridu 3,4-1 000dní a u thiamethoxamu 7-335 dní (Bonmatin et al. 2015).

Poločas rozpadu acetamipridu silně závisí na půdních podmínkách. Za sucha je poločas rozpadu (150,5 dní) až 10× vyšší než za mokra (16 dní). Tato skutečnost poukazuje na to, že poločas rozpadu souvisí s mikrobiální aktivitou, která je při suchu silně redukována. Zároveň nižší koncentrace neonikotinoidů v půdě s dostatkem vody může být také způsobena jejich zředěním (Bonmatin et al. 2015).

Poločas rozpadu je také závislý na teplotě. Při laboratorních výzkumech na imidaclopridu se poločas rozpadu zkrátil z 547 dní (při teplotě 5 °C) až na 85 dní (při teplotě 25 °C). I při polních experimentech byly zjištěny podobné výsledky (Bonmatin et al. 2015).

#### **4.1.2 Hazard quotient**

Riziko aktivních látek pro životní prostředí se posuzuje pomocí koeficientu nebezpečnosti (hazard quotient, HQ). Tato metoda odhaduje, zda mohou nastat škodlivé

účinky kontaminace porovnáváním předpokládané koncentrace v prostředí (Predicted Environmental Concentrations-PEC) a předpokládané koncentrace bez škodlivých efektů (Predicted No Effect Concentration-PNEC) (Bonmatin et al. 2015).

Nyní je při výpočtu HQ pro včely medonosné (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) brán v úvahu: 1. způsob nakažení (požřením, dotykem, inhalací), 2. vystavení neonikotinoidům v úlu což zahrnuje potravu (med a pyl), úl jako takový (vosk a propolis) a ostatní včelí produkty a 3. vystavení neonikotinoidům mimo úl, kde figuruje voda, rostliny, gutace, vzduch, prach a půda. Stejná metoda může být použita na ostatní druhy živící se pylem a/nebo nektarem (Bonmatin et al. 2015).

Mnoho studií používá k výpočtům právě HQ. Je ale potřeba poukázat na fakt, že standartní HQ počítaný jako PEC/ LD50, kdy LD50 je letální dávka pro 50 % testovaných organismů, neudává přesnou míru rizika, protože neukazuje pravděpodobnost, s jakou nebezpečí nastane. K odhadnutí rizika pro včely konzumující kontaminovaný pyl nebo nektar je nezbytné vzít v úvahu frekvenci s jakou nalézáme rezidua v potravě. Při započítání této frekvence Sanchez-Bayo & Goka (2014) zjistili, že riziko vážného postižení při kontaktu s rezidui v pylu je obecně nižší než v nektaru. Vysoké hodnoty v pylu vycházely pro thiamethoxam, imidacloprid a clothianidin a také při kombinaci s fungicidy, které fungují jako synergisté s thiaclopridem. Dinotefuran představuje střední riziko, stejně tak thiamethoxam, imidacloprid a clothianidin při konzumaci pylu. Extrémně vysoké riziko při pravidelné konzumaci reziduí v medu zjistili u thiamethoxamu, clothianidinu a imidaclopridu, které primárně postihují včelí sběračky a sekundárně larvy. Také je třeba vzít v potaz, že riziko pro čmeláky (*Bombus* sp. Latreille, 1802) může být až 3× vyšší než pro včely (*Apis* sp. Linnaeus, 1758) kvůli různé citlivosti na neonikotinoidy. Zároveň je důležité podotknout, že toxicita systémových insekticidů je vyšší při požití než při kontaktu.

Poněvadž toxicita je důležitý faktor ovlivňující riziko, pak kombinace synergistických látek jako jsou fungicidy a neonikotinoidy s kyano skupinou je velmi znepokojující. Vlastní toxicita jednotlivých látek je vysoká a když se jejich účinky navzájem posílí, stanou se jejich jednotlivě bezpečné koncentrace náhle nebezpečnými. Avšak lze předpokládat, že ne všechen pyl kontaminovaný neonikotinoidy je vždy zároveň kontaminovaný i synergistickými fungicidy (Sánchez-Bayo & Goka 2014).

Jedním z hlavních problémů při stanovení rizika je variabilita měřených dat, která závisí na dávce a způsobu použití neonikotinoidů, studovaném druhu rostliny, ročním období, místu, půdě, počasí, včelách/čmelácích, poměru kontaminované potravy pro včely/čmeláky

ku nekontaminované, vzdálenosti ošetřených rostlin od úlu atd. Další zdroj variability je různorodost záznamových protokolů a měřících metod (Bonmatin et al. 2015).

I přes tuto variabilitu Sanchez-Bayo & Goka (2014) ukázali, že systémové insekticidy patří mezi jedny z nejrizikovějších chemikálií pro včely a čmeláky a je u nich pravděpodobnější než u jiných insekticidů, že mohou způsobit dlouhodobé toxické účinky u dělnic a larev čmeláků i včel.

## 4.2 Kontaminace necílových organismů

Vlastnosti, díky kterým jsou neonikotinoidy hojně používány, také zvyšují pravděpodobnost kontaminace prostředí a vystavení jejich účinkům necílové organismy. Ke kontaminaci dochází mnoha cestami například: prachem, který vzniká při seti potahovaných semen, akumulací látek v úrodné půdě a půdní vodě, jejich odtoku do podzemní vody a nasáním insekticidů necílovými rostlinami, nebo usazením prachu na listech (Van der Sluijs et al. 2013; Bonmatin et al. 2015). Jsou důkazy, že půda, voda a rostliny v zemědělském prostředí a v jejich sousedství jsou kontaminovány různým množstvím neonikotinoidů a jejich metabolitů. Je tak mnoho způsobů, jak mohou být necíloví živočichové vystaveni těmto látkám. Studie na včelách prokázaly, že jejich kolonie jsou pravidelně vystavovány neonikotinoidům a jejich metabolitům společně s dalšími pesticidy, z nichž některé jsou synergisté neonikotinoidů. Necílové organismy navíc bývají vystaveny více druhům pesticidů (insekticidům, herbicidům a několika fungicidům) najednou nebo v průběhu času, navíc mohou být kontaminovány několika různými způsoby (Bonmatin et al. 2015).

K vystavení necílových organismů neonikotinoidům může dojít dotykem, orálně, nebo inhalací. Existuje mnoho možností, jak k němu může dojít: 1. potrava obsahující rezidua, 2. materiál, ze kterého je hnízdo (vosk, kontaminovaná půda, listy, kmeny stromů, ...), 3. přímý kontakt se spreji, nebo prachem při aplikaci, 4. kontakt s kontaminovanými rostlinami, půdou a vodou, 5. používání kontaminované vody k ochlazení úlu, 6. vdechování kontaminovaného vzduchu. Nejlépe prozkoumané je vystavení včel medonosných (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) neonikotinoidům prostřednictvím potravy. Potrava může být ještě rozdělena na prvotní potravu, kterou si včely samy nasbírají (nektar, pyl, voda, gutační kapky vyloučené rostlinou, medovice, ...), na potravu vytvořenou v úlu (med a mateří kašička) a na náhradní potravu podávanou člověkem (sirup, voda se sacharózou, pylová náhražka, cukr atd.) (Van der Sluijs et al. 2013).

#### 4.2.1 Prach

Potahování semen je hlavní aplikační metoda v zemědělství po celém světě. Tato metoda byla zpočátku považována za bezpečnější kvůli sníženému dopadu na necílové organismy, ale zjistilo se, že při použití neonikotinoidů k potahování semen se pouze 1,6-20% aktivní látky skutečně dostane do rostliny, zbytek pouze znečistí prostředí. Obavy týkající se kontaminovaného prachu ze semen ošetřených neonikotinoidy vznikly až po hlášení o atypickém množství ztrát včel v několika zemích, které následovaly po jarním sázení ošetřené kukuřice. Ve všech případech bylo nalezeno velké množství mrtvých nebo umírajících včel u vchodu do úlu. Většina z těchto včel byly včely létavky, ale v několika případech zemřelo také mnoho včelích krmiček. Neonikotinoidy použité k ošetření semen byly nalezeny také v pylu uloženém v těchto úlech (Van der Sluijs et al. 2013; Bonmatin et al. 2015).

Kontaminace vzduchu a okolního prostředí je důsledek abraze a separace insekticidu od potahovaných semen během sázení a následného vyloučení částic do prostředí díky ventilátoru sázecího stroje. V okolí sázecího stroje tak vzniká toxický mrak prachu, kde koncentrace insekticidu je vyšší než  $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , což je koncentrace dostatečná k zabití včely při jediném průletu (Bonmatin et al. 2015).

Neonikotinoidy kontaminovaný prach je pohyblivý a představuje riziko pro necílové organismy z několika hledisek. Odrolené částičky insekticidu usazené na okolní vegetaci mohou kontaminovat kvetoucí rostliny, které využívají opylovači jako zdroj potravy. Například rezidua clothianidinu byla nalezena v pampeliškách (*Taraxacum officinale* Wiggers, 1780), což je klíčový zdroj potravy pro včely na začátcích kvetoucí sezóny, kdy jsou jiné zdroje potravy omezené. Riziko také způsobuje přímý kontakt s neonikotinoidy ať už jde o prachový mrak sám o sobě nebo o usazeniny prachu na rostlinách. Avšak koncentrace neonikotinoidů v pylu a nektaru ošetřených rostlin je pod úrovní akutní toxicity pro včely (Krupke et al. 2012; Bonmatin et al. 2015).

Polní experimenty ukázaly, že ani alternativní metody potahování semen ani modifikace sázecího stroje neeliminuje umírání včel během setí ošetřených semen (Bonmatin et al. 2015).

#### 4.2.2 Půda

Koncentrace neonikotinoidů v půdě po aplikaci rapidně poklesne díky mikrobiálnímu rozkladu, UV záření, nasátí rostlinami, sorpci půdních částic a vyluhováním do půdní vody. Avšak za určitých půdních podmínek může koncentrace neonikotinoidů přetrvávat a případně

se i akumulovat měsíce až roky. Přetrvávání je vyšší při nízkých teplotách a vysokém suchu (Bonmatin et al. 2015). Krupke et al. (2012) zjistili, že clothianidin zůstává ve svrchní vrstvě půdy ještě dlouho po sázení ošetřených semen. Nasbírané vzorky obsahovaly clothianidin i v případě, že na místě nebyla sázena ošetřená semena po dvě sezóny. Tyto přetrvávající látky mohou po nasátí rostlinou vystavit riziku další necílové organismy (Bonmatin et al. 2015).

Nezávisle na příjmu rostlin nebo na mikrobiálním rozkladu, se může koncentrace neonikotinoidů v půdě změnit díky jejich pohybu. Tento pohyb podmiňují dva hlavní faktory: koncentrace a totožnost rozpuštěných molekul v půdním roztoku a schopnost sorpce půdních částic. Pohyb neonikotinoidů tvoří potenciální riziko kontaminace půdních a povrchových vod (Bonmatin et al. 2015).

Pesticidy v půdě mohou způsobovat jak akutní či chronickou toxicitu pro organismy tak i mnoho subletálních efektů ovlivňujících chování a vztahy mezi organismy a tím narušit celkovou rovnováhu ekosystému (Edwards 2002; Bonmatin et al. 2015).

#### **4.2.3 Voda**

Další možností vystavení se neonikotinoidům může být použití kontaminované vody. Například včely medonosné (*Apis mellifera*) používají vodu v úlech k ochlazování a k přípravě potravy pro potomstvo. Při extrémních vedrech mohou včely sbírat vodu i z míst vzdálených až 2 km od jejich úlu. Mohou sbírat vodu z povrchových vod, jako jsou jezera, rybníky nebo řeky, ale i z louží či listů rostlin (Van der sluijs et al. 2013; Bonmatin et al. 2015).

Neabsorbované aktivní látky po aplikaci sprejů zůstávají na povrchu listů nebo se sloučí s epikutikulárními vosky. Případně mohou být díky své rozpustnosti ve vodě znovu rozpuštěny v gutačních kapkách nebo v ranní rose čímž jsou opět k dispozici pro další bezobratlé (Bonmatin et al. 2015).

Přetrvávání systémových insekticidů ve vodním prostředí rovněž závisí na různých podmínkách, které zahrnují: sluneční záření, pH, teplotu, složení mikrobiální kultury a také množství pesticidů a způsob jejich aplikace (Bonmatin et al. 2015).

#### 4.2.4 Potrava

Neonikotinoidové insekticidy jsou přijímány kořeny či listy rostliny (záleží na způsobu aplikace) a díky jejich systémové povaze jsou transportovány xylémem a floémem do všech částí rostliny včetně květů, pylu a nektaru. Proto nezáleží na tom, kterou část ošetřené rostliny škůdce nebo necílový organismus napadne, v každém případě je vysoce pravděpodobné že přijde do kontaktu s použitým insekticidem. Vystavení necílových organismů neonikotinoidům kontaktem s ošetřenou rostlinou závisí na druhu rostliny, aplikační metodě a době, která uplynula od ošetření (Bonmatin et al. 2015).

Hlavní složku potravy včel tvoří pyl a nektar, který může být sbírán i z ošetřených nebo jiným způsobem kontaminovaných květů. Pyl a nektar také představuje zdroj potravy pro mnohé další necílové organismy, které nemají tak velký hospodářský význam. Kontaminace pylu a nektaru bývá měřena především pro včely a čmeláky. Avšak tato měření mohou také představovat užitečný start pro posuzování rizika pro ostatní necílové druhy, protože podobné vystavení neonikotinoidům může být předpokládáno i u ostatních méně studovaných opylovačů a dalších bezobratlých (Bonmatin et al. 2015).

### 4.3 Účinek na nervovou soustavu

Neonikotinoidy se chovají jako agonisté nikotin-acetylcholinových receptorů (nAChR), které jsou jejich cílovým místem. Obsazují vazebná místa nAChR, na která se pak nemůže navázat přirozený agonista-acetylcholin, a ničí nervový systém hyperexcitací, po které následuje paralýza. Acetylcholin (ACh) je hlavní excitační neurotransmitter cholinového nervového systému u bezobratlých, který zprostředkovává rychlý synaptický přenos a hraje roli v mnoha kognitivních procesech. U bezobratlých se nAChR nacházejí převážně v oblasti centrální nervové soustavy a hrají důležitou roli v procesech učení, paměti, při zpracovávání čichových a zrakových signálů a signálů z mechanoreceptorů. (Tomizawa & Casida 2003; Jones et al. 2006; Yang et al. 2008; Yang et al. 2012). Navíc Jones et al. (2006) zjistili, že např. Včely medonosné (*Apis mellifera*) mají velké množství nAChR podtypů, díky kterým na ně mají neonikotinoidy s kyano skupinou nižší účinky. Také uvádějí, že různé podtypy ovlivňují různé procesy, některé ovlivňují spíše krátkodobou paměť některé zase spíše dlouhodobou paměť atp. Zároveň každý podtyp je citlivější na jiné látky.

Bezpečnost a účinnost neonikotinoidů je připisována jejich vysoké selektivitě na nAChR bezobratlých a jejich rychlému proniknutí do centrální nervové soustavy, ale obvykle



nízké selektivitě vůči savcům ptákům a rybám. Tato selektivita vůči bezobratlým ale ne vůči savcům je základní vlastností neonikotinoidů. Kvůli tomu mají nAChR bezobratlých míru senzitivity na neonikotinoidy a vztah mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou stejnou u všech druhů bezobratlých (Tomizawa & Casida 2003; Tomizawa & Casida 2005; Jeschke & Nauen 2008).

Hodnotíme-li neonikotinoidy na základě jejich chronické toxicity pak thiacloprid a thiamethoxam mají nejnižší hodnoty, ale i tak jsou hodnoceny jako pravděpodobné karcinogeny pro lidi. Střední hodnoty byly zjištěny u acetamipridu, clothianidinu a imidaclopridu, zatímco nejvyšší hodnoty má dinotefuran. Acetamiprid, imidacloprid a thiacloprid jsou nejvíce toxické pro ptáky a thiacloprid i pro ryby (Tomizawa & Casida 2005).

#### **4.4 Použití**

Neonikotinoidy jsou málo efektivní jako kontaktní insekticidy a proti larvám řádu Lepidoptera. Primárně se používají na semena, do půdy nebo na listy odkud jsou transportovány do rostoucích špiček kde poskytují dlouhotrvající ochranu proti hmyzu (Tomizawa & Casida 2005). Nahrazují organofosfáty a methykarbamáty, které mají nižší efektivitu způsobenou rezistencí hmyzu, nebo omezeným použitím kvůli zdravotní zavadnosti pro lidi (Tomizawa & Casida 2003). Také jsou vysoce efektivní proti blechám a klíšťatům u koček a psů. Obvykle nemají vysokou akutní toxicitu vůči savcům, ptákům a rybám, ale mohou vykazovat některé chronické účinky u savců (Tomizawa & Casida 2005; Pisa et al. 2015).

Systémové insekticidy mají široké uplatnění také ve vnitřních prostorech jako jsou skleníky, zimní zahrady a interiéry. Používají se obdobně jako na polích k vypořádání se s mnohým hmyzem živícím se pletivy rostlin jako jsou mšice, molice a vlnatky. Systémové insekticidy mohou být aplikovány ve formě spreje na listy, kde aktivní složka proniká rostlinnými pletivy, nebo do půdy jako roztok či granule, kde se látka absorbuje kořeny a následně je transportována systémem cév do celého těla rostliny. Během krmení hmyz nasaje aktivní látku a je zabit, jakmile je její koncentrace dostatečná (Cloyd & Bethke 2010).

Mohou být také použity jako návnada pro domácí použití proti švábům a mravencům, nebo jako granule k ošetřování pastvin a luk proti půdním škůdcům. Lze je aplikovat také jako roztok do půdy nebo přímo do vody při zavlažování k ošetření vytrvalých rostlin jako je například vinná réva, nebo mohou být vpraveny injekčně přímo do určité rostliny což se

používá především u stromů kdy je jim jednorázovou aplikací poskytnuta ochrana až na několik let (Goulson 2013).

Neonikotinoidy zajistily zemědělské produkci nový neocenitelný prostředek k vypořádání se se světově nejdestruktivnějšími škůdci plodin především z řádů Hemiptera a Coleoptera, které zahrnují druhy s historicky dlouhou odolností vůči dříve používaným skupinám insekticidů (Jeschke & Nauen 2008).

## **5 Subletální účinky neonikotinoidů**

Insekticidy mohou způsobovat letální nebo subletální účinky po akutním, nebo chronickém vystavení se těmto látkám (Van der Sluijs et al. 2013). Mnoho studií se zaměřuje především na letální účinky, zatímco subletálním účinkům je věnována menší pozornost (Mommaerts et al. 2010). Akutní letální toxicita bývá vyjádřena jako LD50 což je letální dávka při které 50 % jedinců zemře do 48 h. Letální účinky při chronické toxicitě se vyskytují až po dlouhodobém vystavování se neonikotinoidům (Van der Sluijs et al. 2013). Při nižší dávce, než je LD50 mohou nastat subletální účinky, které mohou být pro necílové organismy stejně tak škodlivé, jako účinky letální (Mommaerts et al. 2010; Gill et al. 2012). Subletální účinky zahrnují změny chování a fyziologie (např. imunitního systému). Nezpůsobují přímo smrt jedince, nebo kolaps kolonie, ale v průběhu času se mohou stát letálními a/nebo mohou způsobit větší citlivost kolonie k nepříznivým podmínkám a větší náchylnost k nemocem, což může následně vyústit v kolaps. Například jedinci s poškozenou pamětí a orientací mohou mít problémy s návratem do hnízda a zemřít hlady a zimou. Toto není zahrnuto do standartních testů pesticidů, které se zaměřují na mortalitu při akutní toxicitě. Akutní subletální účinky se objevují do několika hodin až pár dnů po jednorázovém vystavení organismů neonikotinoidům. Chronické subletální účinky se objevují do několika dní po častějším vystavování organismů neonikotinoidům (např. každých 24 hodin po 10 dní). (Henry et al. 2012; Van der Sluijs et al. 2013).

V praxi se hodnota LD50 těchto látek pro včely pohybuje ve velkém rozsahu v závislosti na biotických a abiotických podmínkách (Schmuck et al. 2001; Yang et al. 2008). Toto kolísání hodnot můžeme pozorovat nejen mezi různými koloniemi ale i mezi včelami v rámci jedné samostatné kolonie. Pozorovaná odchylka z velké části vyplývá z rozdílu mezi kontaminací způsobenou kontaktem nebo požitím těchto látek. Kontaktní letální dávka bývá zpravidla vyšší než orální. Při sběru potravy je častý kontakt s kontaminovanými částmi rostlin což nemusí být při laboratorních testech zohledněno. Dalším zdrojem variability může

být rozdílnost ekologických faktorů během testování nebo vlastní rozdílnost kondice mezi jednotlivými testovanými včelami (Yang et al. 2008; Pisa et al. 2015).

K dosažení požadovaného účinku na škůdce se neonikotinoidy mohou používat v daleko menším množství oproti ostatním insekticidům, tudíž by měly méně znečišťovat prostředí. Avšak důležité není množství, ale jejich schopnost způsobit škody, která pramení z jejich toxicity a toxicity jejich metabolitů, doby přetrvávání v prostředí a z dostupnosti pro mnoho necílových organismů (Van der Sluijs et al. 2013; Pisa et al. 2015).

## 5.1 Opylovači

I přes velké množství druhů opylovačů, jsou včely stále nejdůležitějšími z nich. A proto je mnoho studií zaměřeno především na domestikovaný druh včelu medonosnou (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) (Van der Sluijs et al. 2013). Mimo jejich produkci medu a kulturní hodnotu jsou včely velmi učenlivým druhem opylovačů a jsou důležité při produkci zemědělských plodin (Pisa et al. 2015).

Opylování rostlin, zajišťují nejen včely medonosné (*Apis mellifera*), ale také divoké a samotářské druhy včel a čmeláků. Rovněž mouchy, motýli, vosy, mûry, brouci a další bezobratlí, někdy i obratlovci (netopýři, kaloni, veverky, ptáci, a někteří primáti) jsou známí jako opylovači (Chagnon et al. 2015). Velmi dobře prostudovaní jsou i čmeláci zemní (*Bombus terrestris* Linnaeus, 1758), kteří jsou také důležití opylovači. Zároveň tvoří menší kolonie tudíž se lépe pozorují. (Gill et al. 2012; Sánchez-Bayo & Goka 2014). Mezi samotářské včely, které jsou využívány v zemědělském prostředí patří například čalounice vojtesšková (*Megachile rotundata* Fabricius, 1784); ploskočelka *Nomia melanderi* Cockerell, 1906; zednice *Osmia lignaria* Say, 1837 nebo *Osmia cornifrons* Radoszkowski, 1887. Tyto a další druhy spolu se čmelákem zemním mívají menší rádius sběru potravy než včely medonosné a často si hnízda staví v zemi. Z toho důvodu mívají k dispozici méně různých zdrojů potravy a druhy s hnízdem v zemi mohou být navíc vystaveny neonikotinoidům v půdě. Protože mnoho druhů samotářských včel bývá menších než včely medonosné, přijímají tak větší dávku neonikotinoidů v poměru k jejich tělu oproti včelám medonosným (Pisa et al. 2015). Obecně však lze říci, že je jen velmi málo informací o vlivu neonikotinoidů na jiné necílové organismy, než jsou včely medonosné (Easton & Goulson 2013). Přestože jsou studie zaměřené především na včely medonosné, výsledky jsou důležité i pro ostatní opylovače, kteří sbírají potravu na polích a v jejich blízkém okolí (Krupke et al. 2012).

Výzkumy týkající se pouze včely medonosné ale nemusí přesně odrážet riziko, které představují neonicotinoidy pro divoké druhy včel. Především z důvodu, že tyto druhy mohou být na neonicotinoidy jinak citlivé. Scott-Dupree et al. (2009) porovnávali citlivost na pesticidy u tří různých druhů opylovačů. Použili čmeláky (*Bombus impatiens* Cresson, 1863), čalounice vojtěškové (*Megachile rotundata*) a zednice (*Osmia lignaria*). Z neonicotinoidů použili imidacloprid a clothianidin. Pozorovali přímý dopad kontaktu s těmito látkami a porovnávali účinky mezi vybranými druhy. Zjistili, že čmeláci i čalounice jsou citlivější na clothianidin než na imidacloprid, naopak Zednice jsou citlivější na imidacloprid. Obecně nejcitlivější na neonicotinoidy byly čalounice, po nich zednice a nejméně citliví byli čmeláci (Scott-Dupree et al. 2009).

Neonicotinoidy, především při použití sprejů, mají dopad také na motýly a můry, avšak je složité rozlišit vliv insekticidů od jiných prostředků používaných v zemědělství (např. hnojiva), nebo od úprav krajiny. Neonicotinoidy mohou také pozměnit kvalitu půdy a tím ovlivnit larvy a kukly. Většina studií na motýly a můry je ale zaměřena především na ty druhy, jejichž larvy škodí zemědělským plodinám (Pisa et al. 2015).

Neonicotinoidy mohou mít na některé opylovače odpuzující účinky. Díky nim by mohly být tyto druhy ve větším bezpečí než opylovači, kteří je rozpoznat nedovedou. Aby zjistili repelentní účinky neonicotinoidů nastražili Easton & Goulson (2013) na zem pasti na opylovače s různými koncentracemi imidaclopridu rozpuštěného ve vodě. Do pastí se chytilo mnoho různých členovců. Velká většina (87 %) patřila do řádu Dvoukřídlí (Diptera), který zahrnuje například Pestřenky (Syrphidae), Pakomáry (Chironomidae), Vrtule (Tephritidae), Kuklice (Tachinidae) a Bzučivky (Calliphoridae). Mezi dalšími chycenými živočichy byli Pavouci (Areneae) a Brouci (Coleoptera). Množství chycených dvoukřídlých se lišilo v závislosti na koncentraci imidaclopridu v pasti. Nízká koncentrace imidaclopridu (0,01 µg/l) neměla žádný repelentní účinek na brouky a pavouky, do těchto pastí se jich chytilo stejné množství jako do kontrolních bez imidaclopridu. Z toho vyplývá, že členovci jsou citliví na tyto sloučeniny, které na ně mají repelentní účinek i v relativně malých dávkách. Tento účinek může být způsobený přirozenou selekcí zapříčiněnou častým používáním neonicotinoidů. Důležitá otázka ale je, nakolik jsou opylovači odpuzováni, když jsou neonicotinoidy v pylu a nektaru. Nektar svou vůní může tyto látky překrýt, navíc je sladký, což může opylovače motivovat ke sbírání. Podle Van der Sluijse et al. (2013) nemá imidacloprid při koncentracích běžně se nacházejících na poli na včely medonosné žádný repelentní účinek. V některých přípravcích se k neonicotinoidům přimíchávají látky s repelentním účinkem na včely, ale neonicotinoidy vydrží v prostředí déle než repelentní

látky a jejich systémové vlastnosti se liší. Kromě toho by včely neopylovaly takto ošetřené rostliny což by způsobilo velký zemědělský problém.

### 5.1.1 Včela medonosná

Včela medonosná (*Apis mellifera*) patří mezi jeden z nejužitečnějších druhů hmyzu především kvůli jejich důležité roli při opylování rostlin, na které se podílí z 80 % (Jones et al. 2006; Gill et al. 2012). Kolonie včel závisí na kolektivní spolupráci mnoha samostatných dělnic. Ačkoli pesticidy v koncentraci, ve které se běžně vyskytují na poli mohou mít subletální účinky na jednotlivé včely, není úplně známo, kdy se tyto účinky za přirozených podmínek nahromadí a ovlivní tak celou kolonii. (Gill et al. 2012). Vytvoření přesné studie je složité, především proto, že včely mohou při sbírání potravy mít rádius až 9 km okolo úlu, v němž bude vždy různorodé prostředí a faktory, které nelze ovlivnit (klíma, další stresory, kombinace rostlin atraktivních pro včely, ...). Je potřeba počítat s tím, že včely jsou v přírodě vystaveny více pesticidům zároveň. Například příměstské oblasti se staly sídlem některých druhů divokých včel díky hojnosti květů v zahradách a parcích. Právě v těchto místech mohou být včely vystaveny větší koncentraci mnoha systémových insekticidů, které jsou často používány na zahradní květiny, zeleninu, nebo na okrasné stromy (Van der Sluijs et al. 2013).

Jedno z nejdůležitějších chování pro včely je hledání a sbírání potravy, protože určuje dostupnost potravy pro celou kolonii a tím rozhoduje o jejím přežití. Avšak neonikotinoidy mohou toto chování svými subletálními účinky ovlivnit různými způsoby (Pisa et al. 2015). Yang et al. (2008) měřili časový interval mezi návštěvami stejného krmítka a zjistili, že cestu do úlu a zpět ke krmítku za normálních podmínek včely stihnou do 300 sekund. Avšak tento interval se prodlužoval, nebo se včely úplně ztratily, pokud jim byl orálně podáván roztok cukru s imidaclopridem. Míra zpoždění byla závislá na koncentraci imidaclopridu v potravě. Nejnižší naměřená koncentrace, která včelu ovlivní je 50 µg/l což odpovídá 41,6 ppb. Pokus byl koncipován následovně. Včely byly naučeny sbírat potravu z umělého krmítka tak, že používaly stále stejnou trasu. Krmítko bylo umístěno přibližně 35 m od jejich úlu, a bylo naplněno 50% roztokem sacharózy, takže se k němu včely chodily krmít pravidelně. Časový interval byl definován jako doba mezi tím, kdy nakrmená včela odletěla od krmítka, a chvíli kdy opět navštívila toto krmítko. Včelám byl jednorázově podán roztok s imidaclopridem a následně opět čistý roztok sacharózy. Takto bylo několik skupin včel vystaveno různým dávkám imidaclopridu od 50 po 6000 µg/l. Již při koncentraci 50 µg/l se jejich časový

interval začal prodlužovat a při koncentraci 600 µg/l se začaly ztrácet, při koncentraci nad 4000 µg/l se ztratily všechny. Avšak včely, které byly vystaveny nižší koncentraci než 1600 µg/l se druhý den vrátily ke krmítku plně zotavené. Při vyšší koncentraci se mnohé včely nevrátily vůbec. Jejich schopnost zotavit se klesala, čím větší dávce byly včely vystaveny. Navíc i některé ze včel, co se druhý den vrátily, se přestaly objevovat u krmítka pravidelně jako před požitím imidaclopridu. Výsledky také ukázaly, že i doba, za kterou se projeví účinky imidaclopridu, je závislá na dávce, které byly včely vystaveny. Při nižší koncentraci se účinky nemusí projevit ihned po požití, ale při vyšší koncentraci je většina včel ovlivněna okamžitě (Yang et al. 2008). Tyto výsledky ukázaly, že i subletální dávky imidaclopridu mohou ovlivnit chování včel.

Také gutační kapky mohou být pro včely nebezpečné. Girolami et al. (2009) sbírali gutační kapky vyloučené rostlinami kukuřice (*Zea mays* Linnaeus, 1753), která vyrostla ze semen potahovaných imidaclopridem, clothianidinem nebo thiamethoxamem. Následně zavřeli jednotlivé včely do klíček a podali jim tyto gutační kapky. Měřili dobu od napití po objevení se dvou pozorovaných symptomů, které nastávají vždy před smrtí. Jedná se o paralýzu létacích svalů a následnou nevratnou neschopnost letu. Gutační kapky s jednotlivými neonikotinoidy způsobily zablokování křídel do 2-9 min. Toxicita je závislá na koncentraci neonikotinoidů, tudíž při použití nižších koncentrací se příznaky neobjevily, nebo se objevily, ale do 24 h zase zmizely a včely přežily (Girolami et al. 2009).

Imidacloprid dále narušuje pohyblivost včel což se odráží na běhání a chůzi a prodlužuje to dobu, po kterou jsou včely v klidu. Medrzycki et al. (2003) podávali včelám imidacloprid v roztoku sacharózy ve dvou různých koncentracích (100 ppb a 500 ppb). Obě koncentrace podávali jak jednorázově, tak dlouhodobě. Každé z variant byly vystaveny 3 skupiny po 10 včelách. Účinky se začaly objevovat po 1-2 h od podání imidaclopridu, ale po několika hodinách opět vymizely. Ve všech skupinách byly včely znatelně méně aktivní, oproti kontrolní skupině méně a pomaleji chodily a běhaly, místo toho byly více v klidu. Včely se také chovaly více nezávisle na zbytku skupiny. Zatímco v kontrolní kolonii byla vždy většina včel v pohybu, nebo většina včel v klidu, tak u nakažených včel tomu tak nebylo. Může to být důsledek poškozené komunikace mezi včelami a tím i narušení sociálního chování v kolonii (Medrzycki et al. 2003).

Učení a paměť jsou základními funkcemi spojenými s interakcemi jedinců s okolím a jsou rozhodujícími pro reagování včel na požadavky kolonie v průběhu života. Aliouane et al. (2009) ve své studii zkoumali dlouhodobé účinky thiamethoxamu (po dávkách 1 a 0,1 ng/včela) a acetamipridu (po dávkách 1 a 0,1 µg/ včela) na chování včel. Za laboratorních

podmínek denně podávali mladým včelám subletální dávky těchto látek. Vystavovali včely neonicotinoidů orálně i kontaktně a pozorovali jejich senzorycké vnímání vody a cukru, pohyb, učení pomocí čichu a paměťovou kapacitu. Orálně jim podávali roztok sacharózy s rozpuštěnou látkou. Kontaktně jim aplikovali dávku na hrud'. Po 11 dnech podávání neonicotinoidů testovali pohybovou aktivitu, reakci na vodu a cukr a schopnost učení jednotlivých včel. Pozorovali reflexní natažení sosáku při podráždění tykadel vodou nebo roztokem cukru jako reakci na vodu a na cukr. Pomocí čichu učili včely poznávat pachy a paměť hodnotili podle schopnosti vyhledat určitý pach. Pohybovou aktivitu analyzovali pomocí několika parametrů: doby, po kterou byla včela neaktivní, vzdálenosti, kterou včela překonala a doby, po kterou létala ve vyšších částech klece. V žádné ze skupin vystavovaných thiamethoxamu a acetamipridu nezpozorovali výraznější subletální účinky na pohybovou aktivitu. Pouze orálně podávaný thiamethoxam v dávce 1 ng/včela snížil reakce na cukr. Naopak kontaktně podávaný acetamiprid v dávce 1 µg/včela způsobil mírně zvýšené reakce na cukr. Nezaznamenali žádné výraznější účinky na reakci na vodu a její zkonsumované množství. Kontaktně podávaný thiamethoxam v dávce 1 ng/včela snížil schopnost učení. Při paměťovém testu prováděném 24 h po učení měly včely vystavované thiamethoxamu horší výsledky než kontrolní skupina, ale při testu po 48 h již byly jejich výsledky shodné, tudíž dlouhodobá paměť poškozená nebyla. Účinky acetamipridu se na učení a paměti neprojevily. Ukázalo se, že neonicotinoidy mají negativní účinky na motoriku, čichové vnímání a kognitivní funkce u včel. Tyto funkce jsou velmi důležité především pro včelí sběračky.

Také Decourtye et al. (2003) zkoumali schopnost učení včel vystavovaných neonicotinoidům. Podávali letním a zimním tzv. dlouhověkým včelám dávky imidaclopridu o různých koncentracích a pozorovali jejich úmrtnost a schopnost učení na základě čichu. Rozdělili včely do skupin po 20 a podávali jim roztok cukru s imidaclopridem. Následně prováděli test, při kterém dráždili tykadla včel roztokem cukru a sledovali jejich reflexní natažení sosáku. U letních včel se úmrtnost začala oproti kontrolní kolonii zvyšovat až při koncentraci 96 mg/kg, zatímco u zimních včel už při koncentraci 48 mg/kg. To naznačuje, že letní včely jsou méně vnímavé k letálním účinkům imidaclopridu. Při koncentraci 48 mg/kg a vyšší se reflexní odpověď u letních včel snížila, zatímco u zimních včel nebyl patrný žádný rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou. Což naznačuje, že imidacloprid u zimních včel nenarušuje senzorycké ani motorické dráhy, potřebné při tomto pokusu. Imidacloprid dále vyvolává snížené učení pomocí čichu. U letních včel se tato porucha začala projevovat už při koncentraci 12 mg/kg, zatímco u zimních včel až při koncentraci 48 mg/kg. Koncentrace imidaclopridu vyvolávající chronickou toxicitu byla u letních včel nižší než u zimních včel.

Dlouhodobé vystavení zimních včel imidaclopridu zvyšuje jejich úmrtnost, ale letní včely jsou vůči němu tolerantnější. Naopak letní včely mají zhoršenou schopnost učení (Decourtye et al. 2003).

Včelí sběračky sbírají potravu mimo úl, tudíž jsou v častém kontaktu s rostlinami, které mohou být kontaminovány neonicotinoidy. Nasbíraný kontaminovaný pyl a nektar donesou do úlu kde je dále zpracován na potravu pro ostatní včely v úlu. Zpracovanou kontaminovanou potravou potom včelí krmičky krmí larvy, což může narušit jejich vývoj. Ontogenetický vývoj je rozhodující období, které určuje fyziologickou a funkční ucelenost dospělých jedinců. Neonicotinoidy mohou působit na vývoj larev, to má pak dopad na dospělé. Yang et al. (2012) pozorovali larvy včel v úlu denně krmené různými dávkami imidaclopridu. V tomto testu byly larvy po většinu času ponechány v úlu. Tato metoda tím pádem byla co možná nejbližší přirozeným podmínkám včelí kolonie, kdy je přežití larvy ovlivněno jejím vývojem, ale i hygienou úlu. Krmičky mají mimo jiné za úkol i odstraňování nemocných a uhynulých larev. Proto také při vyšší dávce přežilo méně larev. Účinky subletálních dávek podávaných larvám se projevily především v dospělosti. Při využití stejného testu jako Decourtye et al. (2003) zjistili, že dospělci, kteří byli v larválním stádiu vystaveni imidaclopridu v dávce větší než 0,25 µg/l mají poškozené čichové vnímání, což může ovlivnit přežití celé kolonie. Larvy mají obecně větší toleranci k imidaclopridu než dospělci, protože imidacloprid se váže přednostně na určité podtypy nAChR. Včely mají 11 různých podtypů, které se projevují rozdílně v různých fázích vývoje. Vyšší tolerantnost larev může být způsobena nedostatkem podtypů nAChR, ke kterým má imidacloprid u dospělců větší afinitu. Larvy sice jsou tolerantnější k imidaclopridu, ale jejich vývoj může být i tak narušen. Neumí si v dospělosti zapamatovat místo kde našly potravu, nebo cestu zpět do úlu. Kvůli tomu nejsou schopny se vrátit a tím klesá množství potravy v úlu i velikost kolonie. Výsledkem může být CCD (Yang et al. 2012).

V Americe a v dalších rozvinutých zemích má zvláštní význam syndrom zhroucení včelstev (colony collapse disorder-CCD), jehož příčina ještě stále není zcela pochopena. Konkrétní příčina ještě není identifikována, ale většina vědců se přiklání k mnohapříčinovému původu. Pokusy vysvětlující tento syndrom se zaměřují dvěma hlavními směry: 1. biologické choroby zahrnující viry, parazity a houby; 2. pesticidy zahrnující nejen insekticidy a akaricidy, ale i fungicidy či herbicidy. Pesticidy v přírodě můžou působit jako stresor, který činí včely náchylnější k chorobám. Jako hlavní viníci byly označeny především systémové insekticidy jako je fipronil a právě neonicotinoidy. Neonicotinoidové insekticidy zesilují účinky patogenů, ale způsob, jakým pozměňují imunitní systém je stále nejasný (Di Prisco et



al. 2013; Sanchez-Bayo & Goka 2014). Di Prisco et al. (2013) zjistili, že clothianidin negativně moduluje NF- $\kappa$ B (nukleární faktor kappa B), což je skupina transkripčních faktorů, které ovlivňují expresi genů důležitých pro imunitu a zánětlivou odpověď včelího organismu. Pro hmyz je identifikován negativní modulátor (inhibitor) aktivace NF- $\kappa$ B, kterým je opakující se protein bohatý na leucin. Po vystavení se clothianidinu se zesílí transkripce genu, který dekoduje tento inhibitor. Ten následně snižuje imunitní reakci a podporuje replikaci viru deformovaných křídel (deformed wing virus-DWV), který potom včela v úlu dále přenáší. Tato imunosuprese je podobně vyvolána také imidaclopridem. Zvýšený výskyt viru deformovaných křídel vyvolaný subletálními dávkami neonikotinoidu naznačuje, že tyto látky mohou mít negativní dopad na celé zemědělství. Dále tímto výzkumem poukázali na to, že neonikotinoidy se mohou chovat jako další stresor, který negativním ovlivněním NF- $\kappa$ B zhoršuje dopad na imunitu včel vystavených Kleštíku včelímu (*Varroa destructor*) roznášejícímu DWV. Navíc tato změna vrozené imunity vyvolaná neonikotinoidy může ovlivnit i střevní mikrobiální patogeny (Di Prisco et al. 2013).

Schopnost přizpůsobit se může být považována za velmi důležitou, protože umožňuje jedinci minimalizovat jeho odpověď a díky tomu neplýtvá energií na nedůležité stimuly. Avšak imidacloprid může poškodit i tuto schopnost. Guez et al. (2001) zkoumali účinky kontaktně podávaného imidaclopridu na schopnost přizpůsobit se opakovanému dráždění tykadla. K pokusu použili včely staré 7 a 8 dní. Po aplikaci imidaclopridu na hrud' opakovaně dráždili včelám jedno tykadlo 40% roztokem cukru vždy jen na pár sekund. Odpovědí na toto dráždění bylo reflexní natažení sosáku. Za normálních okolností potřebují včely staré 8 dní 2× více opakování, aby se tomuto dráždění přizpůsobily, než včely staré 7 dní. Po podráždění opačného tykadla 60% roztokem cukru se reflex opět obnovil. Po aplikaci imidaclopridu se množství opakování potřebných k přizpůsobení u mladších včel zvýšilo, ale u starších včel se naopak snížilo. Tento odlišný účinek na různě staré včely může být rovněž způsoben různými podtypy nAChR. (Guez et al. 2001).

Přesná navigace je klíčová pro sběračky a tím i pro celé včelstvo (Pisa et al. 2015). Henry et al. (2012) ukázali, že subletální dávky thiamethoxamu mohou ovlivnit schopnost návratu do úlu u včel, což má negativní důsledky na stabilitu celé kolonie. V této studii Henry et al. (2012) ukázali, že včely po pozření subletální dávky thiamethoxamu mají nižší šanci najít svůj úl než včely z kontrolní skupiny, které neonikotinoid nepozřely. Včely po pozření thiamethoxamu společně s kontrolními včelami vypustili 1 km od úlu, kde si byli jisti že včely již alespoň jednou byly a pomocí radiolokátoru sledovali jejich návrat do úlu. Tento pokus zopakovali, ale vypustili včely, které na tomto místě ještě nebyly. V obou

případech se vrátilo znatelně méně včel krmených thiamethoxamem oproti včelám z kontrolních kolonií. Účinky byly ještě větší u včel, které v místě vypuštění nikdy nebyly. Z toho vyplývá, že vystavení včel thiamethoxamu v dávkách, které běžně potkávají na poli, může nepřímo ovlivnit jejich přežití a vést až ke kolapsu celého včelstva. Avšak je třeba podotknout, že dávka, které byly jednotlivé včely vystaveny, byla vyšší, než by včela sama snědla při jednom krmení (Henry et al. 2012).

Avšak při dřívějších analýzách Schmuck et al. (2001) neobjevili v pylu ani v nektaru slunečnic (*Helianthus* sp. Linnaeus, 1753), které vyrostly z ošetřených semen na poli žádná rezidua ani metabolity imidaclopridu. Rezidua a metabolity ale detekovali v listech těchto rostlin. Zároveň s analýzou provedli také pokus, při kterém byly kolonie včel umístěny na pole s kvetoucí slunečnicí. Každá kolonie měla pomocí gázy ohraničený prostor a veškeré anomálie v chování jako nekoordinované pohyby, třas, neschopnost letu či apatie byly pečlivě zaznamenávány. Také sledovali intenzitu sběru potravy a úmrtnost, ale žádné dopady na chování související s kontaminací imidaclopridem, zvýšená úmrtnost ani snížený sběr potravy na včelách sbírajících pyl a nektar z těchto slunečnic nevyozorovali. Nejistili ani nižší aktivitu při stavbě úlu ani sníženou dlouhověkost. I velikost kolonií a úlů byla shodná s kontrolními koloniemi. Také množství nakladených vajíček bylo ve výsledku stejné. Z toho vyplývá, že rezidua imidaclopridu v medu až do 0,020 mg/kg včely neovlivňuje. Podle těchto výsledků Schmuck et al. (2001) tvrdí, že jelikož množství imidaclopridu v pylu a nektaru ošetřených slunečnic bylo pod hranicí detekovatelnosti, je velmi nepravděpodobné, že by používání imidaclopridu na ošetřování semen slunečnice, nebo při sázení slunečnic do půdy obsahující rezidua negativně ovlivňovalo kolonie včel. Tento závěr je podpořen faktem, že při pokusech nepozorovali žádné subletální účinky na kolonie včel vystavených slunečnicím ošetřených imidaclopridem.

Ani Cutler & Scott-Dupree (2007) nezjistili žádné subletální účinky neonikotinoidů na včely. Při svém pokusu umístili včely doprostřed kvetoucího pole řepky (*Brassica napus* Linnaeus, 1753), která vyrostla ze semen ošetřených clothianidinem. Použili nejvyšší možné množství clothianidinu, které se k ošetření semen smí použít. Zároveň v okolí nebylo pro včely mnoho alternativní potravy. Včely zůstaly na poli až do konce kvetení řepky. Použili 32 včelích kolonií z toho polovina byla kontrolní. Pravidelně kontrolovali úmrtnost a množství potomstva a odebírali vzorky medu vosku a nasbíraného pylu. U vzorků kontrolovali množství reziduí clothianidinu. Po odkvětu řepky převezli včely do laboratoře a dále pozorovali. Zvážili množství medu, který včely nasbíraly, spočítali potomstvo a následně nechali včely zazimovat. Z původních 32 kolonií jich 7 nepřežilo zimu, z toho 4 byly

kontrolní. U zbylých kolonií spočítali potomstvo. Celý pokus trval 130 dní a během něj nezpozorovali žádný výrazný rozdíl mezi koloniemi vystavenými clothianidinu a kontrolními koloniemi. Všechny kolonie měly stejnou úmrtnost, množství medu i množství potomstva před a po přezimování. Clothianidin neměl účinek na dlouhověkost včel ani na velikost kolonií. Ve vzorcích pylu a medu objevili rezidua, ale v množství menším než 0,5 ppb, ve vosku žádná rezidua nebyla. Tyto výsledky ukázaly, že dlouhodobé vystavení včel clothianidinu nemá na kolonii efekt (Cutler & Scott-Dupree 2007).

Tato rozdílnost výsledků může být vysvětlena tím, že včely nenavštěvují tak často kontaminovanou potravu, když mají i jiné možnosti, nebo tím, že neonikotinoidy nemají vliv na kolonii za podmínek při daném pokusu (Pisa et al. 2015).

### 5.1.2 Čmelák

Čmeláci (*Bombus* sp. Latreille, 1802) jsou důležití opylovači volně rostoucích rostlin, a i v moderním zemědělství jsou používáni jako spolehliví opylovači zeleniny a ovoce (Mommaerts et al. 2010). Navíc tvoří menší kolonie díky čemuž se na nich dají dobře pozorovat subletální efekty jak na individuální úrovni, tak na úrovni celé kolonie, proto se někdy používají při testování čmeláci místo včel (Gill et al. 2012). Avšak včely a čmeláci jsou velmi odlišní ve svém chování, a tak i experimenty pro posouzení subletálních účinků pesticidů na chování včel nejsou vždy plně vyhovující pro čmeláky (Mommaerts et al. 2010).

Dělnice čmeláka *Bombus terrestris* Linnaeus, 1758 obvykle potkají několik různých druhů pesticidů během sbírání potravy na poli, což je potencionálně vystavuje velké škále nakombinovaných efektů. Gill et al. (2012) zkoumali subletální účinky různých pesticidů na kolonie čmeláků (*Bombus terrestris*). Při pokusu vystavili 10 kolonií čmeláků imidaclopridu (I) o koncentraci 10 ppb, 10 kolonií  $\lambda$ -cyhalotrinu ve spreji (z řady pyrethroidů) ( $\lambda$ C), 10 kolonií obojímu najednou (M) a 10 kolonií bylo kontrolních. Přímo v úlu měli k dispozici roztok sacharózy, který byl ošetřen daným pesticidem či jejich kombinací. Současně si museli sami shánět na poli pyl, protože ten jim podáván nebyl. Pokus trval 4 týdny. Imidaclopridu vystavené dělnice byly méně výkonné při sbírání pylu, vracely se s menším množstvím pylu a cesta i sběr jim trvali déle. Kolonie vystavené dvěma pesticidům trpěly nejvíce. Tyto kolonie měly vyšší úmrtnost a větší ztráty při hledání potravy než kolonie vystavené jen jednomu z pesticidů. Kolonie vystavené imidaclopridu v koncentraci, která se může nacházet v pylu a nektaru kvetoucích rostlin, způsobuje snížení výkonnosti při sbírání potravy což vede k nedostatku potravy v úlu a nutnosti vysílat za potravou více dělnic. Avšak

i s vyšším počtem dělnic sbírajících potravu, nebyly kolonie vystavené imidaclopridu (I i M) schopné nasbírat tolik potravy jako kontrolní kolonie. Kvůli nedostatku potravy a následně nedostatku dělnic, které by se staraly o larvy byl ovlivněn i vývoj potomstva. Snížením počtu larev se také snížilo množství nových dělnic, což jen zhoršilo problém s oslabenou pracovní silou v kolonii. Kolonie při pokusu ovlivněné dvěma pesticidy měly dvakrát větší ztráty dělnic (úmrtnost i ztráta při hledání potravy) než zdravé kontrolní kolonie a dvě z těchto kolonií zkolabovaly úplně.

Z mnoha laboratorních testů vyplývá, že neonicotinoidy poškozují paměť a orientační schopnosti včel, avšak stále chybí testy v reálných podmínkách. Whitehorn et al. (2012) studovali čmeláka *B. terrestris* v polopřirozených podmínkách. Simulovali vystavení 25 kolonií čmeláků rostlinám řepky olejky ošetřených imidaclopridem v laboratoři při použití reálné koncentrace (6 ppb v pylu a 0,7 ppb v nektaru). Kolonie byly následně 6 týdnů ponechány přirozeně se rozvíjet na poli a shánět si potravu samy. V porovnání s kontrolními koloniemi měly menší hnízda a jejich královny měly menší produkci vajíček. Tato studie a studie Gill et al. (2012) poskytují doplňující evidenci o tom, že snížená výkonnost v hledání potravy po vystavení reálnému množství imidaclopridu může mít následně účinek na celou kolonii. Což může mít dlouhodobý dopad na celou populaci čmeláků. Avšak při obou studiích byla kontaminovaná potrava umístěna přímo do hnízda a v případě Whitehorn et al. (2012), nebyla ve fázi kontaminace poskytnuta žádná alternativa, tudíž si nemůžeme být jistí, zda daná dávka odpovídá množství, které by čmeláci zkonzumovali v přirozených podmínkách.

Feltham et al. (2014) použili 6 kolonií čmeláka *B. terrestris* (z toho 3 kontrolní) k výzkumu účinků imidaclopridu v dávkách, které se běžně vyskytují na poli. Nejprve jim byl po 14 dní ad libitum podáván pyl a roztok cukru s imidaclopridem. Potom vypustili čmeláky na pole, aby si sbírali potravu 4 týdny sami. Čmeláky pozorovali pomocí radiolokátoru. U vchodu do úlu bylo čtecí zařízení, které kontrolovalo příchod a odchod jednotlivých čmeláků a pokaždé je při odchodu zvažilo a potom znovu při příchodu do úlu. Tímto způsobem zjistili dobu, po kterou jsou jednotlivé dělnice mimo úl a sbírají potravu a kolik potravy přinesou do úlu. Porovnáním kolonií, které konzumovaly imidacloprid s kontrolními koloniemi zjistili, že dělnice z kontaminovaných kolonií nosily do úlu méně potravy a strávily delší dobu mimo úl. Také se častěji stávalo, že se vracely do úlu bez potravy. Výsledkem bylo, že kolonie krmené imidaclopridem jsou následně méně výkonné oproti kontrolním koloniím. Avšak je potřeba brát v úvahu, že použili příliš málo kolonií na to, aby vytvořili smysluplnou statistickou analýzu a že při krmení čmeláků imidaclopridem jim nedali k dispozici jinou alternativní potravu (Feltham et al. 2014).

Laycock et al. (2012) zkoumali demografický dopad neonikotinoidů a testovali účinky stopového množství imidaclopridu v potravě na plodnost čmeláků zemních (*Bombus terrestris*). Vystavili skupiny vždy po 4 čmeláčích bez královny imidaclopridu v různých dávkách (0- 159 ppb). Imidacloprid jim podávali denně přimíchaný ve sladkém sirupu. Pokus byl zaměřen na plodnost a vývoj vaječníků u čmeláků. Když v kolonii chybí královna začnou se u dělnic vyvíjet vaječníky a po 7 dnech mohou klást vajíčka. Denně sledovali úmrtnost čmeláků, množství zkonsumované potravy a množství nově nakladených vajíček. Po 14 dnech všechny dospělé jedince usmrtili a spočítali množství vajíček a larev. Vypreparovali vaječníky dospělců a porovnávali jejich velikost s vaječníky dělnic nekrmených imidaclopridem a dělnic z kompletních kolonií. Také porovnávali velikost nakladených vajíček. Z výsledků vyplynulo, že plodnost dělnic byla nižší, čím vyšší byla koncentrace imidaclopridu v potravě. Stejně tak množství zkonsumované potravy bylo nižší při vyšší koncentraci imidaclopridu. Naopak vývoj vaječnicků nebyl přímo závislý na množství imidaclopridu. Všechny dělnice použité v pokusu, vyjma kolonií s nejvyšší použitou koncentrací, měly větší vaječníky než dělnice z kompletních kolonií s královnou. Kolonie vystavené nejvyšší dávce (159 ppb) neměly vaječníky dostatečně vyvinuté, a tudíž nenakladly žádná vajíčka. Naopak při dávce 25,4 ppb měly dělnice stejně velké vaječníky jako kontrolní kolonie. Zároveň během pokusu nezaznamenali žádnou úmrtnost. Kolonie, které konzumovaly více potravy, měly i více potomstva. Je proto možné že nižší plodnost není přímo způsobena imidaclopridem, ale menším množstvím přijaté potravy. K potvrzení této myšlenky je potřeba více výzkumů účinků neonikotinoidů v potravě na plodnost čmeláčích královn (Laycock et al. 2012).

Mommaerts et al. (2010) zkoumali v laboratorních podmínkách dopad subletálních dávek neonikotinoidů na chování čmeláčích dělnic při hledání potravy. Test se skládal z více částí. Nejprve byly dělnice umístěny do dvou umělých hnízd spojených trubkou, která měřila 20 cm. Použity byly 5členné mikro kolonie bez královny. V každém úlu se jedna z dělnic stala dominantní a převzala roli královny, jelikož nebyla oplozena tak její potomci byli vždy haploidní samci. V prvním hnízdě si dělnice stavěly úl a ve druhém jim byla podávána potrava (roztok cukru a pyl). Nejdříve se dělnice naučily chodit sbírat neošetřenou potravu do níž bylo následně přidáno určité množství neonikotinoidu, kterému byly takto vystavovány po 11 týdnů. Byl vybrán imidacloprid (v koncentracích 200; 20; 2 a 0,2 ppm a 20 a 10 ppb), thiamethoxam (100; 10; 1; 0,5; 0,2; 0,1 ppm a 10 ppb) a thiacloprid (120; 60; 12; 1,2; 0,12 ppm a 12 ppb) v koncentracích, ve kterých se mohou vyskytovat na polích. Kontrolní kolonie byly krmeny čistým roztokem cukru. Každé z uvedených koncentrací byly vystaveny 4 úly a

pokus byl 2× zopakován. V této části sledovali úmrtnost, množství odchovaných larev, velikost postaveného úlu, chování při sběru potravy a denní množství zkonsumovaného roztoku, ze kterého pak spočítali množství zkonsumovaného roztoku na čmeláka. V úlech, které byly vystaveny imidaclopridu o koncentraci 0.2 ppm a více naměřili Mommaerts et al. (2010) 100% úmrtnost do 8 týdnů. Při koncentraci 20 ppb zemřela polovina dělnic do 8 týdnů, ale při nižší koncentraci nezaznamenali žádnou úmrtnost. Ve všech úlech bylo nižší množství odchovaných larev oproti kontrolní skupině a dělnice měly menší sklon sbírat potravu, krmit sebe i larvy a stavět si úl. Taktéž jejich čas potřebný k nalezení potravy a donesení jí do úlu byl delší než u kontrolní kolonie. Při srovnání s dalšími testovanými neonikotinoidy byl thiametoxam nejtoxičtější a thiacloprid nejméně toxický. Při požití thiametoxamu o koncentraci 0.5 ppm a vyšší zemřely všechny dělnice do 3 týdnů, avšak u thiaclopridu byla 100% úmrtnost pouze při koncentraci 120 ppm. Při nižších koncentracích byla i úmrtnost nižší. Zároveň bylo mnohem menší množství odchovaných larev oproti kontrolní kolonii. Až při koncentraci 10 ppb u thiametoxamu a 1,2 ppm u thiaclopridu bylo množství odchovaných larev stejné jako u kontrolní kolonie (Mommaerts et al. 2010).

V další části testu Mommaerts et al. (2010) pozorovali kolonie s 25 dělnicemi a královnou, které umístili do skleníku. Použili tři různé koncentrace imidaclopridu (20, 10 a 2 ppb), který byl rozpuštěn v roztoku cukru. Potravu (roztok cukru a imidaclopridem nenakažený pyl) umístili vždy 3 m od úlu. Každé z uvedených koncentrací byly vystaveny 3 úly a pokus byl 2× zopakován. Sledovali úmrtnost, množství potomstva, velikost postaveného úlu, spotřebu roztoku cukru a množství uhynulých larev. Zároveň sledovali sběr potravy, kdy počítali množství dělnic, které vstupovaly do úlu a které ho opouštěly. Pokus trval 2 týdny. Při koncentracích 20 a 10 ppb byly po dvou týdnech ovlivněni všichni čmeláci, více než polovina zemřela a zbytek byl úplně apatický bez jakéhokoliv náznaku pohybu nebo snahy o sbírání potravy, zároveň byla v těchto úlech velmi nízká až žádná reprodukce. Také je potřeba zmínit, že při koncentraci 20 ppb byly téměř všechny mrtvé dělnice nalezeny v blízkosti potravy, zatímco při koncentraci 10 ppb byly všechny mrtvé dělnice v úlu. Z toho vyplývá, že při nižší koncentraci byly dělnice ještě schopny doletět zpět do svého úlu. Při koncentraci 2 ppb nebyla zaznamenána téměř žádná úmrtnost a ani žádný ze sledovaných subletálních účinků nebyl pozorován, kolonie se chovaly stejně jako kontrolní (Mommaerts et al. 2010).

Těmito experimenty Mommaerts et al. (2010) ukázali, že koncentrace, která se používá na polích může negativně ovlivnit sbírání potravy čmeláků což snižuje opylovací schopnost kolonie a její reprodukci a může vést až k úhynu celé kolonie kvůli nedostatku potravy.

Zároveň neonikotinoidy mohou způsobovat mnohé další subletální účinky, které při testu nebyly, případně při daných podmínkách ani nemohly být pozorovány. Například schopnost najít a navštívit více různých zdrojů potravy a následně trefit zpět do úlu. Navíc za přirozených podmínek musí čmeláci sbírat potravu z daleko větší vzdálenosti (267 až 800 m) než je 20 cm nebo 3 m.

Podobné subletální účinky byly pozorovány i u jiných druhů čmeláků jako je *Bombus occidentalis* a *Bombus impatiens*. Tyto výsledky jsou podobné s výsledky pokusů na včelách (Mommaerts et al. 2010).

## 5.2 Ostatní bezobratlí

I přes to, že pouze škůdci jsou cílem insekticidů, mohou jimi být ovlivněni jak škůdci, tak jejich přirození nepřátelé. Často se dokonce škůdci díky své strategii zotaví rychleji než jejich predátoři. Mnoho z těchto predátorů patří také mezi hmyz a kvůli tomu jsou stejně citliví na neonikotinoidové insekticidy. Predátoři (včetně parasitoidů) bezobratlých škůdců mohou být považováni za důležitou složku ekosystému často nazývanou jako biologická kontrola. (Chagnon et al. 2015). Způsob aplikace neonikotinoidů může ovlivnit přirozené nepřátele různými způsoby. Zaprvé, neonikotinoidy mohou snížit životaschopnost při přímém kontaktu, ke kterému dochází, když přímo sprej nebo rezidua zabijí přirozeného nepřítele, nebo v případě parasitoidů zabijí hostitele, ve kterém se jedinci vyvíjí. Zadruhé, insekticidy mohou snížit počty přirozených nepřátel zabitím značného množství vhodných hostitelů, nebo kořisti. Zatřetí predátoři se mohou kontaminovat pozřením škůdců (např. kobyly a mšice), kteří předtím napadli ošetřenou rostlinu. Obecně je aplikace neonikotinoidů sprejem pro přirozené nepřátele pravděpodobně škodlivější, ale všechny typy aplikace mohou vyústit v subletální účinky na reprodukci, hledání potravy, chování, plodnost a délku života. Subletální účinky mohou také utlumit schopnost přirozených nepřátel vytvořit populace, potlačují schopnost využití hostitele, mají dopad na úspěšnost při hledání potravy, snižují délku života a produkci potomků, redukují dostupnost hostitelů a kořisti, omezují schopnost rozpoznat hostitele, nebo kořist a ovlivňují poměr pohlaví. Systémové neonikotinoidy aplikované do půdy můžou mít minimální efekt na predátory nad zemí, ačkoli mohou mít efekt, pokud je úmrtnost kořisti vyšší než 90 %, tím pádem se sníží dostupnost životaschopné kořisti a/nebo hostitelů sloužících jako zdroj potravy pro predátory a parasitoidy. Například, aplikací do půdy můžeme zabít velké množství škůdců, které jejich přirození nepřátelé využívají jako zdroj potravy a tím jim znesnadníme hledání zbývajících škůdců, ačkoli to může být závislé

na jejich efektivnosti při vyhledávání potravy. Navíc takto můžeme snížit množství dostupných životaschopných škůdců, nebo zhoršit jejich kvalitu, tudíž nejsou vhodné jako zdroj potravy pro predátory, nebo do nich samičky parasitoidů nemohou klást vajíčka. Přirození nepřátelé krmící se škůdci, kteří pozřeli část rostlin ošetřených aktivními látkami, mohou být jimi také ovlivněni. Přirození nepřátelé živící se i pylem či nektarem rostlin mohou stejně jako škůdci pozřít aktivní látky. Nakonec, přirození nepřátelé vyhledávající potravu na povrchu rostlin mohou být vystaveni neonikotinoidům, které rostlina vyloučí gutací, a to ať už jsou neonikotinoidy aplikovány do půdy či pomocí sprejů. (Cloyd & Bethke 2010; Pisa et al. 2015). Kromě způsobu kontaminace existují další faktory, které ovlivňují dopad neonikotinoidů na přirozené nepřátele. Předpokládá se, že obě metody (laboratorní a polní) a vývojová stadia ovlivňují úroveň mortality. (Cloyd & Bethke 2010).

Při ochraně proti škůdcům je důležité určit, které insekticidy jsou kompatibilní s klíčovými predátory a parasitoidy těchto škůdců a posoudit možný rušivý účinek na prospěšné organismy. Bohužel průzkumy kompatibility insekticidu s prospěšnými organismy jsou často založené na nekompletních údajích. Často bývají přehlíženy tyto tři faktory: 1. testuje se přímé vystavení neonikotinoidům, ale ne vystavení nepřímé (když predátor pozře kontaminovanou kořist), 2. často se testuje pouze jedno vývojové stadium a to dospělec, 3. pozoruje se pouze úmrtnost nikoliv subletální účinky. Stapel et al. (2000) sledovali účinky imidaclopridu na schopnost lumčíka (*Microplitis croceipes* Cresson, 1872) najít hostitele. Krmili samičky lumčíků nektarem ze sprejem ošetřené bavlny (*Gosypium* sp. Linnaeus, 1753). Pouze 23,5 % samic lumčíků krmených nektarem nasbíraným 2 dny po ošetření reagovaly na pach hostitele v aerodynamickém tunelu. Oproti tomu z kontrolní skupiny reagovalo 79,2 % samic. Z toho plyne, že neonikotinoidy mohou být nebezpečné i pro kolonie parasitoidů (Stapel et al. 2000).

Řád Brouků je často používán jako bioindikátor díky citlivosti na změny v životním prostředí. Například trávník ošetřený imidaclopridem snižuje pohyblivost kvapníka (*Harpalus pennsylvanicus* Degeer, 1774) a ten je pak bezbranný proti mravencům (Pisa et al. 2015).

Druh mravence *Acromyrmex subterraneus subterraneus* Forel, 1893 si vyvinul různé obranné mechanismy proti patogenům, a především proti houbám. Jedním z nejdůležitějších mechanismů je očišťování svého těla pomocí nohou. Galvanho et al. (2013) zjistili, že toto chování je ovlivněno subletálními dávkami imidaclopridu. Jednorázově vystavili mravence kontaktně podané dávce imidaclopridu a po 4 h sledovali jejich chování. Vypozorovali, že jedinci vystavení neonikotinoidu se čistili méně často a po kratší dobu. Tento efekt může mít



dopad nejen na jednotlivce, kteří jsou následně náchylnější k nákazám, ale i na celou kolonii mravenců.

I bezobratlí žijící ve vodě mohou být vystaveni neonikotinooidům. Alexander et al. (2008) zkoumali účinky imidaclopridu na dva rody jepic (*Baetis* spp. Leach, 1815 a *Epeorus* spp. Eaton, 1881). Imidacloprid pomocí pumpy přimíchávali do vody po 12 h nebo 20 dní. Při obou typech kontaminace byly larvy žijící ve vodě menší než kontrolní skupina. Také v dospělosti byli tito jedinci menší. Avšak tyto účinky zaznamenali pouze u samců obou rodů, samice zůstaly neovlivněné (Alexander et al. 2008).

Ačkoli existuje pár zpráv a několik studií naznačuje, že neonikotinoidy mohou mít efekt na měkkýše a na celý vodní ekosystém, tak studie, které by zjistily přesný dopad, chybí (Chagnon et al. 2015). Rodrick (2008) demonstroval vystavení ústřic viržinských (*Crassostrea virginica* Gmelin, 1791) imidaclopridu. Následkem byla snížená fagocytóza bílých krvinek a tím i snížená imunita vůči bakteriím a jiným patogenům. Účinek byl větší, když byly ústřice zároveň vystavené dalším stresorům jako je změna salinity nebo teploty vody (Rodrick 2008).

### 5.2.1 Žížaly

Mnoho pesticidů v půdě zabíjí organismy přímo, akutní toxicitou. Mohou mít také nepřímý účinek na půdní organismy kontaminací jejich potravy, nebo ovlivněním jejich reprodukce. Většina studií se zabývá především akutní toxicitou případně vlivem na reprodukci převážně jen u několika vybraných druhů živočichů a často jen v laboratorních podmínkách. Dále mohou mít neonikotinoidy vliv na růst a vývoj, dlouhověkost a na chování jedinců včetně chování potravního. Tím ovlivňují věk, velikost, poměr pohlaví a strukturu celé populace i interakce mezi jednotlivými populacemi. Avšak tyto účinky ještě nejsou dostatečně prozkoumány i přes to, že aktivita půdních organismů a interakce mezi nimi udržují ekosystém v rovnováze (Edwards 2002). Například žížaly mají důležitou funkci půdních rozkladačů. Rozkládají odumřelá těla rostlin na jednodušší organické sloučeniny lépe dostupné pro další organismy, čímž zúrodňují půdu. Zároveň svými chodbičkami převrstvují a provzdušňují půdu a tím umožňují lepší proudění nejen vzduchu ale i vody a živin. Na komplexním půdním ekosystému se ale podílí i mnoho jiných organismů jako jsou další bezobratlí, bakterie a houby (Chagnon et al. 2015).

Neonikotinoidy se také mohou do půdy dostat při podzimním opadávání listů. Uсыhající listy padající z neonikotinoidy ošetřených stromů mohou vystavit půdní

rozkladače, případně vodní organismy, riziku vystavení se těmito látkám. Kreutzweiser et al. (2008) zjistili účinky imidaclopridu v koncentraci, která se nachází v listech ošetřených stromů na půdní rozkladače. Použili listy z Javorů cukrových (*Acer saccharum* Marshall, 1785), které byly injekčně ošetřeny imidaclopridem a z neošetřených stromů, sloužící jako kontrolní. Tyto listy vložili do připraveného půdního a vodního prostředí při laboratorních podmínkách. Měřili úmrtnost a rychlost zpracování listů u vodního hmyzu rozkládajícího odumřelé části rostlin. U půdních rozkladačů, kterými byly žížaly (*Dendrobaena octaedra* Savigny, 1826), měřili úmrtnost, rychlost zpracování listů, velikost žížal a produkci kokonů s vajíčky. Během 35 dní, po které pokus trval, nezaznamenali žádnou zvýšenou mortalitu, ale subletální účinky zaznamenány byly. Žížaly měly menší hmotnost, a i jejich rozkládací činnost byla pomalejší. Na druhou stranu produkce kokonů ovlivněna nebyla (Kreutzweiser et al. 2008).

Pokud byl snížený příjem krmení způsoben tím, že kontaminované listy měly odpuzující účinek, pak by po nabídnutí nekontaminované potravy ji žížaly preferovaly. Ale pokud byl příčinou subletální účinek neonikotinoиду pak budou žížaly pomaleji rozkládat jakoukoliv potravu (Kreutzweiser et al. 2008).

Aby posoudili tento potenciální účinek dali Kreutzweiser et al. (2009) žížalám, za jinak stejných podmínek jako v předchozím pokusu, k dispozici kontaminované i nekontaminované listy a měřili jejich úmrtnost a množství zkonsumované potravy u obou typů. Předpokládali, že žížaly poznají kontaminované listy a budou raději konzumovat nekontaminované. Tato schopnost by snížila nepříznivé účinky na necílové organismy a tím i na celý ekosystém. To se však nestalo. Zjistili, že i když mají žížaly k dispozici i nekontaminovanou potravu, tak ji nepreferují a konzumují ji ve stejné míře jako kontaminovanou. Z toho vyplývá, že žížaly nerozpoznají kontaminovanou potravu od nekontaminované a menší příjem potravy a její pomalejší zpracování je způsobeno neonikotinoidy obsaženými v listech.

Tyto studie ukazují, že imidaclopridem ošetřené stromy mohou na podzim způsobovat riziko snížení rozkládací činnosti a tím ovlivnit koloběh živin (Kreutzweiser et al. 2008; Kreutzweiser et al. 2009). Míra rizika pro půdní rozkladače závisí na míře vystavení se neonikotinoidům. Imidacloprid v koncentraci, která se běžně nachází v listech ošetřených stromů může způsobit snížení rozkládací činnosti. Pokud je vysoká pravděpodobnost, že žížala přijde do kontaktu s velkým množstvím kontaminovaných listů, potom budou i nepříznivé účinky na rozkládací procesy ekologicky významnější (Kreutzweiser et al. 2009).

## 6 Závěr

Velký výskyt těchto sloučenin v prostředí naznačuje, že všechny necílové organismy jim jsou nějakým způsobem vystavené. Případ se včelami je velmi ilustrativní, protože jim jsou vystaveny několika různými cestami (Bonmatin et al. 2015). Ale jak můžeme vidět v této práci, včely nejsou jediné, na koho mají neonicotinoidy účinek.

Existuje velká mezera v oblasti znalostí dopadů neonicotinoidů na velkou většinu bezobratlých, z nichž mnozí mají klíčovou roli ve fungování ekosystému. I data o několika necílových druzích, se kterými se dělaly pokusy nejsou kompletní (Pisa et al. 2015). Hlavní nevýhodou již existujících studií je použití malých kolonií a malé vzdálenosti mezi úlem a potravou. Kvůli těmto nedostatkům tyto studie nevyjadřují přesný dopad neonicotinoidů na testované živočichy, který je v reálných podmínkách nižší, podávají informace pouze o určitých situacích, ve kterých byly živočichové testováni. (Van der Sluijs et al. 2013). Dalším nedostatkem je nepřesné pochopení způsobu, jakým chronická toxicita, z pravidelného vystavování se reziduíům v potravě, ovlivňuje mortalitu jednotlivých včel a tím růst a reprodukci celé kolonie. Tyto účinky nezahrnují pouze subletální efekty, ale i zpožděnou úmrtnost (Sanchez-Bayo & Goka 2014). Pokusy se čmeláky prokázaly, že letální účinky neonicotinoidů nelze hodnotit pouze na základě dat o akutní toxicitě (Mommaerts et al. 2010). Abychom lépe porozuměli dopadům malého, ale pravidelně konzumovaného množství neonicotinoidů, je potřeba použít jiné metody, ve kterých bude hrát roli doba vystavení živočichů těmto látkám (Sanchez-Bayo & Goka 2014). Velký potenciál pro důležité testy nabízí pokusy na poli, ale výsledky byly smíšené a mnoho studií se zaměřovalo na orientaci včel při létání ke zdroji potravy a od něj (Pisa et al. 2015). Vytvoření přesné, kompletní studie je složité z mnoha ohledů (Van der Sluijs et al. 2013). Avšak i přes náročnost tohoto typu výzkumu, je jisté, že by přinesl cenné informace, které jsou potřeba k přesnému pochopení účinků neonicotinoidů na životní prostředí, a především na necílové organismy (Pisa et al. 2015).

Nakonec je potřeba zmínit, že na základě hodnocení Evropské agentury pro bezpečnost potravin (EFSA) z roku 2013 o škodlivosti neonicotinoidů pro včely, Evropská komise uvalila částečný zákaz a omezila užívání třech nejběžnějších neonicotinoidních účinných látek – clothianidin, imidacloprid a thiamethoxam – na kvetoucí rostliny (zejména kukuřici, slunečnice, řepku, jablka či okurky), aby chránila včely. Nadále se však mohly užívat na plodiny, které nebyly „atraktivní“ pro včely (například cukrová řepa) a také na plodiny pěstované ve sklenících. Členské státy EU si mohly vyjednat výjimku na jejich používání.

Česko tak však neučinilo. Přezkum Vědecké poradní rady Evropské akademie (EASAC) v roce 2015 ukázal, že užívání neonikotinoidů pro zemědělské účely ovlivňuje nejen včely, ale také čmeláky nebo motýly či dravý hmyz, ať už se nacházejí na poli, v půdě nebo ve vodě. Spolu s postřiky plodin jsou tak hrozbou pro včely. Kvůli těmto a dalším hodnocením proto Evropská komise navrhla v březnu 2017 zakázat výše zmíněné neonikotinoidy úplně, kromě jejich užití ve sklenících. V únoru 2018 ještě Evropská agentura pro bezpečnost potravin (EFSA) aktualizovala své hodnocení z roku 2013 a znovu potvrdila vysoké nebezpečí neonikotinoidních pesticidů pro včely a nedostatečná opatření EU na jejich ochranu. To byl také podnět pro členské státy k hlasování, které rozhodlo, že používání neonikotinoidových pesticidů, které mají negativní účinek na včely a další opylovače, bude na zemědělských polích v EU zcela zakázáno. Členské státy se na tom shodly 27. dubna 2018. Zákaz by měl začít platit ještě do konce roku 2018, nebo na počátku roku 2019. Nejde ovšem o kompletní omezení. Zákaz se nebude vztahovat na užívání neonikotinoidů ve sklenících s požadovaným trvalým pěstováním rostlin po celou dobu jejich vegetačního cyklu. Zakázané neonikotinoidy se navíc budou moci nahradit těmi méně nebezpečnými. Čtyři další neonikotinoidy, které často nahrazují ty zakázané, se totiž nadále mohou v EU užívat bez omezení. Jedná se o acetamiprid, thiacloprid, sulfoxaflor a flupyradifuron. Podpora členských států však nebyla jednotná. Šestnáct z nich včetně Francie, Německa, Itálie a Spojeného království podpořilo návrh Komise pro zákaz neonikotinoidů, osm se jich zdrželo a čtyři členské státy – Česko, Maďarsko, Rumunsko a Dánsko – hlasovaly proti. Důvodem nesouhlasného stanoviska těchto zemí je význam daných pesticidů pro pěstování určitých plodin na jejich území – zejména cukrové řepy, pro jejichž mořidla podle českého ministerstva zemědělství neexistuje adekvátní náhrada. ČR proto usilovala o vyjednání výjimky pro cukrovou řepu, aby tak mohla nadále užívat tři účinné látky z řady neonikotinoidů. Zklamání z výsledku hlasování vyjádřila společnost Bayer, která je jedním z výrobců zakázaných pesticidů. Páteční hlasování označila za „smutný den pro zemědělce“. Dosažená dohoda je podle ní pro Evropu špatná, neboť výsledkem bude návrat k některým překonaným pesticidům a omezená škála nástrojů zvyšuje riziko vzniku rezistence škůdců (Hosnedlová 2018).

## 7 Literatura

- Alexander AC, Heard KS, Culp JM. 2008. Emergent body size of mayfly survivors. *Freshwater biology* **53**: 171-180.
- Aliouane Y, El Hassani AK, Gary V, Armengaud C, Lambin M, Guthier M. 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: Effects on behavior. *Environmental toxicology and chemistry* **28**: 113-122.
- Bonmatin JM, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser DP, Krupke C, Liess M, Long E, Marzaro M, Mitchell EAD, Noome DA, Simon-Delso N, Tapparo A. 2015. Environmental fate and exposure, neonicotinoids and fipronil. *Environmental science and pollution research* **22**: 35-67.
- Cloyd RA, Bethke JA. 2010. Impact of neonicotinoid insecticides on natural enemies in greenhouse and interiorscape environments. *Pest management science* **67**: 3-9.
- Cutler GCh., Scott-Dupree CD. 2007. Exposure to clothianidin seed-treated canola has no long-term impact on honeybees. *Journal of economic entomology* **100**: 765-772.
- Decourtye A, Lacassie E, Delégue MHP. 2003. Learning performances of honey bees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest management science* **59**: 269-278.
- Di Prisco G, Cavaliere V, Annoscia D, Varricchio P, Caprio E, Nazzi F, Gargiulo G, Pennacchio F. 2013. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Pnas* **110**: 18466-18471.
- Easton AH, Goulson D. 2013. The neonicotinoid insecticide imidacloprid repels pollinating flies and beetles at field-realistic concentrations. *Plos one* (e0054819) DOI: 10.1371/journal.pone.0054819
- Edwards CA. 2002. Assessing the effects of environmental pollutants on soil organisms, communities, processes and ecosystems. *European journal of soil biology* **38**: 225-231
- Feltham H, Park K, Goulson D. 2014. Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. *Ecotoxicology* **23**: 317-323.
- Galvanho JP, Carrera MP, Moreira DDO, Erthal M, Silva CP, Samuels RI. 2013. Imidacloprid inhibits behavioral defences of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of insect behavior* **26**: 1-13.

- Gill RJ, Ramos- Rodriguez O, Raine NE. 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony- level traits in bees. *Nature* **491**: 105-108.
- Girolami V, Mazzon L, Squartini A, Mori N, Marzaro M, Di Bernardo A, Greatti M, Giorio C, Tapparo A. 2009. Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *Journal of economic entomology* **102**: 1808-1815.
- Goulson D. 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of applied ecology* **50**: 977-987.
- Guez D, Suchail S, Gauthier M, Maleszka R, Belzunces L. P. 2001. Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7 and 8 day old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiology of learning and memory* **76**: 183-191.
- Henry M, Béguin M, Requier F, Rollin O, Odoux JF, Aupinel P, Aptel J, Tchamitchian S, Decourtye A. 2012. A common pesticide decreases foraging success and survival in honeybees. *Science* **336**: 348-350.
- Hosnedlová P. 2018. EU zakáže pesticidy nebezpečné pro včely- Česko nesouhlasí, obává se ztráty cukrové řepy. Euractiv. Available from [https://euractiv.cz/section/evropske-finance/news/eu-zakaze-pesticidy-nebezpecne-pro-vcely-cesko-nesouhlasí-obava-se-ztraty-cukrove-repy/?fbclid=IwAR2K1\\_pQp-alCzui8Lz1YQW10pj7dmQWSm0PIKD0nMu3bet2AMxuRZKSQK4](https://euractiv.cz/section/evropske-finance/news/eu-zakaze-pesticidy-nebezpecne-pro-vcely-cesko-nesouhlasí-obava-se-ztraty-cukrove-repy/?fbclid=IwAR2K1_pQp-alCzui8Lz1YQW10pj7dmQWSm0PIKD0nMu3bet2AMxuRZKSQK4) (accessed May 2018).
- Chagnon M, Kreutzweiser D, Mitchell EAD, Morrissey A, Noome DA, Van der Sluijs JP. 2015. Risk of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. *Environmental science and pollution research* **22**: 119-134.
- Jeschke P, Nauen R. 2008. Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest management science* **64**: 1084-1098.
- Jones AK, Raymond – Delpech V, Thany SH, Gauthier M, Sattelle DB. 2006. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the bee, *Apis mellifera*. *Genome research* **16**: 1422-1430.
- Kreutzweiser DP, Good KP, Chartrand DT, Scarr TA, Thompson DG. 2008. Are leaves that fall from imidacloprid-treated maple trees to control asian longhorned beetles toxic to non-target decomposer organisms? *Journal of environmental quality* **37**: 639-646.

- Kreutzweiser DP, Thompson DG, Scarr TA. 2009. Imidacloprid in leaves from systemically treated trees may inhibit litter breakdown by non-target invertebrates. *Ecotoxicology and environmental safety* **72**: 1053-1057.
- Krupke ChH, Hunt GJ, Eitzer BD, Andino G, Given K. 2012. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *Plos one* (e0029268) DOI: 10.1371/journal.pone.0029268.
- Laycock I, Lenthall KM, Barratt A, Cresswell JE. 2012. Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumblebees (*Bombus terrestris*). *Ecotoxicology* **21**: 1937-1945.
- Medrzycki P, Montanari R, Bortolotti L, Sabatini AG, Maini S, Porrini C. 2003. Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour laboratory tests. *Bulletin of insectology* **56**: 59-62.
- Mommaerts V, Reynders S, Boulet J, Besard L, Sterk G, Smagghe G. 2010. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology* **19**: 207-215.
- Nauen R, Denholm I. 2005. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: durrent status and future prospects. *Archives of insect biochemistry and physiology* **58**: 200-215.
- Pisa LW, et al. 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environmental science and pollution research* **22**: 68-102.
- Rodrick GB. 2008. Effects of temperature, salinity and pesticides on oyster hemocyte activity. *Florida water resources journal* **86**: 4-14.
- Sanchez-Bayo F, Goka K. 2014. Pesticide residues and bees- a risk assessment. *Plos one* (e0094482) DOI: 10.1371/journal.pone.0094482
- Scott-Dupree CD, Conroy L, Harris CR. 2009. Impact of currently used or potentially useful insecticides for canola agroecosystems on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae), *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae), and *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of economic entomology* **102**: 177-182.
- Schmuck R, Schöning R, Stork A, Schramer O. 2001. Risk posed to honey bees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing sunflowers. *Pest management science* **57**: 225-238.

- Stapel JO, Cortesero AM, Lewis WJ. 2000. Disruptive sublethal effects of insecticides on biological control: altered foraging ability and life span of a parasitoid after feeding on extrafloral nectar of cotton treated with systemic insecticides. *Biological control* **17**: 243-249.
- Tomizawa M, Casida JE. 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology* **48**: 339-364.
- Tomizawa M, Casida JE. 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* **45**: 247-268.
- Van der Sluijs JP, Simon-Delso N, Goulson D, Maxim L, Bonmatin JM, Belzunces LP. 2013. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current opinion in environmental sustainability* **5**: 293-305.
- Whitehorn PR, O'Connor S, Wackers FL, Goulson D. 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science* **336**: 351-352.
- Yang EC, Chuang YC, Chen YL, Chang LH. 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of economic entomology* **101**: 1743-1748.
- Yang ECh, Chang HCh, Wu WY, Chen YW. 2012. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *Plos one* (e0049472) DOI: 10.1371/journal.pone.0049472