

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2013-02/5



ZAKLJUČNO POROČILO CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	V1-1129
Naslov projekta	Kumulativni in sinergijski učinki različnih kemikalij na čebele
Vodja projekta	11169 Janko Božič
Naziv težišča v okviru CRP	3.01.03 Kumulativni in sinergijski učinki različnih kemikalij na čebele
Obseg raziskovalnih ur	722
Cenovni razred	A
Trajanje projekta	10.2011 - 09.2012
Nosilna raziskovalna organizacija	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	105 Nacionalni inštitut za biologijo 1360 KMETIJSKO GOZDARSKA ZBORNICA SLOVENIJE 1540 KMETIJSKO GOZDARSKI ZAVOD NOVA GORICA Univerza v Novi Gorici
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	1 NARAVOSLOVJE 1.03 Biologija 1.03.01 Zoologija in zoofiziologija
Družbeno-ekonomski cilj	02. Okolje

2. Raziskovalno področje po šifrantu FOS¹

Šifra	1.06
- Veda	1 Naravoslovne vede
- Področje	1.06 Biologija

3. Sofinancerji

Sofinancerji					
1.	<table border="1"> <tr> <td>Naziv</td> <td>Ministrstvo za kmetijstvo in okolje</td> </tr> <tr> <td>Naslov</td> <td>Dunajska 22, 1000 Ljubljana</td> </tr> </table>	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo in okolje	Naslov	Dunajska 22, 1000 Ljubljana
Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo in okolje				
Naslov	Dunajska 22, 1000 Ljubljana				

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

4. Povzetek raziskovalnega projekta²

SLO

Pregled virov jasno kaže na realno interakcijo posameznih kemičnih snovi v delovanju na čebelo in čebeljo družino. V problem se poleg pesticidov iz kmetijstva vključujejo tudi sredstva za zatiranje čebeljih bolezni, predvsem varoe in same čebelje bolezni, tako virusna, bakterijska, glivična obolenja, kot tudi zajedavec. Predvsem so izpostavljeni virusi, varoa in *Nosema cerana*. Imamo več novejših raziskav, tudi domačih, o interakciji kemikalij in čebeljih bolezni, vendar z še ne zanesljivimi in jasnimi mehanizmi delovanja. Podobna je zgodba tudi o sinergističnih učinkih kemikalij, kjer je jasnih načinov delovanja relativno malo. Najmočnejši znani sinergijski učinki se pojavijo takrat, ko je blokiran sistem za razgradnjo strupov (P450) z relativno nestrupeno snovjo, ki povzroči učinkovito delovanje drugega strupa neposredno na njegovo osnovno tarčo. Zaenkrat obstoječa znanja dopuščajo le oceno prisotnosti sinergističnega delovanja, ki pa jo je potrebno pri vsaki vrsti posebej preverjati. Medonosna čebela je tako poseben primer, poleg tega pa tudi niso izključene posebnosti med posameznimi podvrstami medonosne čebele. Tako se pod vprašaj postavljajo že osnovne raziskave čistih snovi ali posameznih FFS pripravkov na strupenost za čebele. Posebej so zanimivi zaključki obdelave patentnih raziskav, ki kažejo na zavedanje proizvajalcev o sinergističnih učinkih, vendar le ti niso posebej preverjeni na neciljnih organizmih, še zlasti ne v običajni rabi v kmetijstvu in čebelarstvu. To zahteva posebno previdnost tako pri dajanju dovoljenja za promet, kot tudi pri delo svetovalne službe za uporabo FFS. Za uspešnejše preprečevanje morebitnih sinergističnih učinkov kemikalij predlagamo okrepitev kontrole izvajanja preventivnih ukrepov in pravilne rabe FFS v kmetijstvu in kemikalij v čebeljih panjih, večjo previdnost pri registracijskih postopkih, okrepitev monitoringa okolja ter povečanje število raziskav.

ANG

Overview of sources clearly shows the real interaction of individual chemical substances in the operation action to the bee and the bee family. In addition to the problem of pesticides in agriculture, research includes means of bee diseases control, especially varroa itself and by viral, bacterial, fungal diseases, as well other parasites. We have several recent studies, including domestic, of the interaction of chemicals and bee diseases, but the mechanisms of action are not reliable and clear. A similar story is also about the synergistic effects of chemicals, where clear modes are relatively few. The strongest known synergistic effects occur when the system is blocked for the detoxification by P450 with a relatively non-toxic substance that causes the effective operation of another poison directly to its principal target. So far existing knowledge permits only the evaluation of the presence of synergistic effect. Honey Bee is a special case, but the specificities between honeybees' subspecies cannot be excluded. Especially interesting conclusions processing patent research, showing an awareness of producers of synergistic effects, but they are not specifically reviewed on non-target organisms, especially not in common use in agriculture and beekeeping. This requires special care in providing such authorization, as well as the work of advisory services for

pesticides use.

To effectively prevent the potential synergistic effects of chemicals we suggest the increase of the control of the implementation of preventive measures and proper use of pesticides in agriculture and chemicals in hives, greater caution in registration procedures, strengthening the environmental monitoring and the increase the amount of research.

5. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu³

Delo je potekalo po štirih fazah. V prvi fazi smo zbirali primarne in sekundarne vire in iskali možnosti klasifikacije in rangiranja ugotovljenih učinkov. V drugi fazi smo kodirali zbrane raziskave za zapis v skupno bazo zbranih rezultatov. V tretji fazi smo po pregledu podatkov ugotovili premajhno ujemanje metod dela in podanih rezultatov, da bi podali klasično meta analizo. Rezultati so povzeti in tabelarično predstavljeni in ovrednoteni. Priprava zaključnega poročila in ureditev zbirk podatkov je bila zadnja faza projekta.

Primarne in sekundarne vire smo zbirali z Google scholar in v manjši meri tudi z drugimi iskalniki (WebOfScience,...). Zbrane vire smo skupaj urejali s programskim orodjem Zotero. Delne povzetke in pripravo teksta za osnutek končnega poročila smo zbirali v skupnem internetnem delovišču preko sistema elektronske učilnice in uporabo wikijev (Moodle) in razpredelnice s pomočjo GoogleDocs. Ker so raziskave sinergističnih učinkov na čebelah relativno redke, smo raziskavo razširili tudi na druge nevretenčarje, predvsem insekte, da smo evidentirali možne mehanizme in jih interpolirali na medonosno čebelo.

Posebej so bile obdelane patentne objave z orodjem PatentScope na WIPO portalu. Po pričakovanju ni patentov, ki bi se nanašali na sinergističen negativen učinek pesticidov na čebele, zato pa smo posebej analizirali patente, ki obravnavajo zatiranje žuželk.

Tekom projekta smo zbrali blizu 400 znanstvenih prispevkov s projektnega področja ter še enkrat toliko navezujočih prispevkov. Podrobna analiza patentov je izločila 286 patentov po letu 1981, ki se nanašajo na sinergistično delovanje pri žuželkah, s tem, da gre za sinergistično delovanje, ki vključuje tudi kemikalije le za okoli 80 patentov, posebej pa so izvzeti patenti, ki bi lahko pomenili tudi grožnjo za čebelo in posebej tisti, ki so relevantni glede na sredstva, ki so dovoljena v Sloveniji ali vsaj EU.

Pregled virov jasno kaže na realno interakcijo posameznih kemičnih snovi v delovanju na čebelo in čebeljo družino. Rezultate povzemamo po posameznih poglavjih. V problem se poleg pesticidov iz kmetijstva (poglavje Poljske kemikalije) vključujejo tudi sredstva za zatiranje čebeljih bolezni (poglavje Panjske kemikalije), predvsem varoe in same čebelje bolezni, tako virusna, bakterijska, glivična obolenja, kot tudi zajedavec. Med pansjkimi kemikalijami so posebej izpostavljeni akaricidi, ki se uporabljajo za zatiranje varoje. Zaradi možnih primerjav smo posebej obdelali mehanizme delovanj kemikalij pri nevretenčarjih in posebej pri čebelah. Preučili smo možne sinergijske učinke kemikalij, kakor tudi vlogo bolezni in parazitov. Predvsem smo izpostavili viruse, varojo in nosemo (*Nosema cerrana*). Imamo več novejših raziskav, tudi domačih, o interakciji kemikalij in čebeljih bolezni, vendar z še ne zanesljivimi in jasnimi mehanizmi delovanja. Podobna je zgodba tudi o sinergističnih učinkih kemikalij, kjer je jasnih načinov delovanja relativno malo. Najmočnejši znani sinergijski učinki se pojavijo takrat, ko je blokiran sistem za razgradnjo strupov (P450) z relativno nestrupeno snovjo, ki

povzroči učinkovito delovanje drugega strupa neposredno na njegovo osnovno tarčo. Zaenkrat obstoječa znanja dopuščajo le oceno prisotnosti sinergističnega delovanja, ki pa jo je potrebno pri vsaki vrsti posebej preverjati. Medonosna čebela je tako poseben primer, poleg tega pa tudi niso izključene posebnosti med posameznimi podvrstami medonosne čebele. Tako se pod vprašaj postavljajo že osnovne raziskave čistih snovi ali posameznih FFS pripravkov na strupenost za čebele. Posebej so zanimivi zaključki obdelave patentnih raziskav, ki kažejo na zavedanje proizvajalcev o sinergističnih učinkih, vendar le ti niso posebej preverjeni na neciljnih organizmih, še zlasti ne v običajni rabi v kmetijstvu in čebelarstvu. To zahteva posebno previdnost tako pri dajanju dovoljenja za promet, kot tudi pri delu svetovalne službe za uporabo FFS.

Že prvi pregled virov je nakazoval, da so sinergistični učinki različnih kemikalij pri čebelah relativno slabo raziskani. Znanstvena radovednost je pripomogla, da so se raziskovalci spustili v različne vidike medsebojnih mehanizmov. Tudi, ko pogledamo širše na vse žuželke, dobimo skromen nabor poznanih in pojasnjenih mehanizmov sinergističnega delovanja. Lahko bi rekli, da se v teh raziskavah odseva tudi podedovanost napak raziskav posameznih aktivnih snovi in njihove interpretacije. V veliko pomoč pri doslednem zbiranju toksikoloških podatkov so skupni standardi in navodila, ki lahko pripomorejo k zadostnemu telesu rezultatov po primerljivi metodologiji, da so mogoče tudi meta analize. Naš pregled virov in povzetki podpirajo tudi večino zaključkov H.M.Thompson (2012). Zaradi relativno skromnega nabora raziskav potencialnih sinergističnih učinkov, smo raziskavo razširili še na druge nevretenčarje. To je lažje pripeljalo do identifikacije mehanizmov za sinergistično delovanje kemikalij. Posebej smo podrobno predstavili mesta delovanja pri čebeli, predvsem pesticidov, ki lahko prizadanejo živčni sistem (priloga A). Nekoliko širše so predstavljena poglavja o sinergizmu pri čebelah (priloga B). Z analizo patentov smo opozorili na zavedanje proizvajalcev FFS, da so možne različne interakcije, ki pripeljejo do različne stopnje sinergizma. Tudi skozi patente se vidi velika vrstna specifičnost, kar onemogoča postavljanja splošnih pravil. To pa zahteva tako večjo previdnost pri izdajanju dovoljen, kakor tudi pri svetovanju rabe FFS. V praksi se še vedno pojavlja tako napačna raba FFS in sredstev za zdravljenje čebel, kakor tudi uporaba nedovoljenih in praviloma tudi nevarnih kemikalij, kar vsako leto na novo spoznavamo ob podrobnih analizah primerov zastrupitve čebel. Akutne situacije je še možno kolikor toliko pojasniti, kronično izpostavitve različnim kemičnim snovem ob prisotnosti čebeljih bolezni in vplivu podnebnih ter pašnih pogojev pa je težje identificirati.

Za uspešnejše preprečevanje morebitnih sinergističnih učinkov kemikalij predlagamo 4 sklope priporočil:

a) Okrepitev kontrole izvajanja preventivnih ukrepov in pravilne rabe FFS v kmetijstvu in kemikalij v čebeljih panjih.

Žal inšpekcijski pregledi in analize le ob zastrupitvah čebel ne morejo bistveno vplivati na večino uporabnikov. Prevetriti je potrebno tudi sistem izobraževanja tako uporabnikov FFS kot tudi čebelarjev. Relativno pogoste kršitve, ki so bile zaznane ob inšpekcijskih pregledih nakazujejo na to, da izobraževanje ne doseže zadostne praktične vrednosti. Večji delež sonaravnega kmetijstva in čebelarstva bi tudi pripomogel k splošno previdnejši rabi kemičnih sredstev.

b) Večja previdnost v registracijskih postopkih

V registracijskih postopkih preverjati ali so testirali morebitne možne interakcije z drugimi sredstvi in posledično povečana strupenost za netarčne organizme. Možnost uporabe patentnih baz za zahtevo posebnih deklaracij ali

ustreznih testiranj. Proizvajalci bi morali preveriti tudi možne interakcije z drugimi sredstvi in delovanje na netarčne organizme. Čebela je eden od nujnih netarčnih organizmov, ki morajo biti vključeni v taka testiranja

c) Okrepiti monitoring okolja

Nadaljevati z monitoringom okolja z vzorčevanjem peloda in drugih čebeljih pridelkov. Monitoring s čebelami je potrebno spraviti v večkratno funkcionalnost. Gre za splošno varstvo okolja, zdravje ljudi in zdravje čebel.

d) Raziskave

Uvesti raziskave sinergističnih učinkov kemikalij, ki se dejansko pojavljajo v okolju na netarčne organizme kot del monitoringa stanja v okolju. Poiskati možnosti za spodbujanje bazičnih raziskav mehanizmov sinergističnega delovanja in preučiti morebitne posebnosti kranjske čebele proti drugim podvrstam.

6. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

Tekom projekta smo uspeli obdelati pričakovani volumen znanstvenih in patentnih objav. Glede na naravo rezultatov objavljenih v pregledanih virih smo ugotovili, da ne bo mogoča klasična meta analiza rezultatov, ker niso reprezentirani v zadostni meri v primerljivih oblikah. Vseeno smo uspeli s primerjavo virov pripraviti širše strokovno poročilo, ki obsega 37 strani teksta vključno s tabelami. Poleg tega smo pripravili še dva dodatka, prilogi, ki posebej pojasnjujeta sinergistične procese pri čebeli in posebej mehanizme delovanja na žuželke, predvsem na centralni živčni sistem. V času projekta je bil tudi zagovarjano doktorsko delo sodelavca na projektu Danila Bevka, ki se je navezovalo na vsebino projekta. Ključna so štiri priporočila, ki smo jih navedli v zgornjem poročilu. Kljub številnim tujim zbirnim poročilom, ki so bila objavljena proti koncu izvajanja našega projekta, smo z našim pregledom dodali nekoliko večjo širino, poleg tega pa opozorili na pomembno sprenevedanje proizvajalcev ob hkratnem patentiranju sinergističnih učinkov na škodljivih žuželkah, podobnih učinkov pa niso preverili na čebelah. Pri registraciji pesticidov je tako potrebno uvesti posebne previdnostne ukrepe vezane na potencialne sinergistične učinke.

7. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁵

Sodelavka na projektu Jasna Kralj je žal zaradi hude bolezni nas zapustila v drugi polovici izvajanja projekta. Njeno delo so na Nacionalnem inštitutu za biologijo uspešno prevzela Danilo Bevk in Špela Schrader. Tako je nakako tudi naše delo izvenelo kot posvetilo naši raziskovalki čebel. Ne glede na dogajanje v projektni sestavi pa nismo spreminjali vsebine projekta, kakor tudi ne načina dela.

8. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	2503759	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Izgube gospodarskih čebeljih družin v Kanadi, Kitajski, Evropi, Izraelu in Turčiji, za zimi 2008-9 in 2009-10
		<i>ANG</i>	Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and

		Turkey, for the winters of 2008-9 and 2009-10
Opis	SLO	V splošnem svetovnem poročilu so podani tudi podatki za Slovenijo, ki jih je zbrala in prispevala Jasna Kralj.
	ANG	In general World report are posted also data from Slovenia, which were collected and contributed by Jasna Kralj.
Objavljeno v		Bee Research Association; Journal of Apicultural Research; 2012; Vol. 51, no. 1; str. 100-114; Impact Factor: 1.531; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.185; WoS: IY; Avtorji / Authors: van der Zee Romée, Kralj Jasna
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	2500175 Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Kumafos vpliva na prenos hrane med delavkami medonosne čebele
	ANG	Coumaphos affects food transfer between workers of honeybee Apis mellifera
Opis	SLO	V prispevku so prikazani inovativni pristopi poskusov izmenjave hrane med čebelami v kletkah, ki so omogočili ugotavljanje subletalnih učinkov dobro poznane akaricida za zatiranje varoje. Zmanjšan prenos je bil zaznan v območju koncentracij, ki se pojavljajo v panju.
	ANG	In the paper are reported innovative experiments for trophalaxis. They found out sublethal effects of well know acaricide on reduction of food transference in the concentration range found in the hive.
Objavljeno v		Institut National de la Recherche Agronomique; Arbeitsgemeinschaft der Institute für Bienenforschung e.V; Apidologie; 2012; Vol. 43, no. 4; str. 465-470; Impact Factor: 2.266; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.185; A': 1; WoS: IY; Avtorji / Authors: Bevk Danilo, Kralj Jasna, Čokl Andrej
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
3.	COBISS ID	2351867 Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Fotokatalitična degradacija z imobiliziranim TiO ₂ treh izbranih neonicotinoidov
	ANG	Photocatalytic degradation with immobilised TiO [sub] 2 of three selected neonicotinoid insecticides
Opis	SLO	Prispevek je pomemben s stališča možnosti razgradnje ostankov neonicotinoidov in njihove usode v naravi.
	ANG	Contribution is important for potential degradation and fate of neonicotinoids in environment.
Objavljeno v		Pergamon Press.; Chemosphere; 2012; Vol. 89, iss. 3; str. 293-301; Impact Factor: 3.206; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.978; A': 1; WoS: JA; Avtorji / Authors: Žabar Romina, Komel Tilen, Fabjan Jure, Bavcon Kralj Mojca, Trebše Polonca
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
4.	COBISS ID	2465019 Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Primerjalna strupenost imidakloprida in njegovega transformiranega produkta 6-kloronikotinska kislina na netarčne vodne organizme
	ANG	Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms
Opis	SLO	Poznavanje delovanja na netarčne organizme, še zlasti morebitnih razgradnih produktov je lahko v širši uporabi insekticida pomembno za morebitne ukrepe za varovanje naravnega okolja
		Knowledge of non target activity is important in the case of potential

		ANG	impact of insecticide or degradable products to prepare proper environmental protection measures.
	Objavljeno v		Academic Press.; Pesticide biochemistry and physiology; 2012; Vol. 104, issue 3; str. 178-186; Impact Factor: 1.713;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.185; A': 1; WoS: CQ, IY, UM; Avtorji / Authors: Malev Olga, Sauerborn Klobučar Roberta, Fabbretti Elsa, Trebše Polonca
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
5.	COBISS ID	3525242	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Vedenjski odziv kopenskih izopodov na piretroide v prsti in hrani
		ANG	Behavioural response of terrestrial isopods (Crustacea:Isopoda) to pyrethrins in soil or food
	Opis	SLO	Prispevek pokaže na vplive piretroidov na netarčne organizme, izopode. Pomemben je za razumevanje mehanizmov delovanja
		ANG	Contribution showed non target effect of pyrethrins on terrestrial animals. It is important for understanding mechanisms of action.
	Objavljeno v		Gauthier-Villars; European Journal of Soil Biology; 2012; Vol. 51; str. 51-55; Impact Factor: 1.578;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.44; WoS: GU, XE; Avtorji / Authors: Zidar Primož, Hribar Monika, Žižek Suzana, Štrus Jasna
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek

9.Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁷

	Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID	758903	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Vpliv akaricida kumafosa na pašno dejavnost, socialno vedenje in učenje medonosne čebele Apis mellifera L.
		ANG	Effect of acaricide coumaphos on foraging activity, social behavior and learning of honeybee.
	Opis	SLO	Doktorsko delo je nastajalo vzporedno s projektom. V njem so prikazani različni možni mehanizmi delovanj kumafosa na čebelo.
		ANG	PhD study was developed along of our research project. Some mechanism of coumaphos action was clarified in this work.
	Šifra	D.09 Mentorstvo doktorandom	
	Objavljeno v	[D. Bevk]; 2012; X, 83 f.; Avtorji / Authors: Bevk Danilo	
	Tipologija	2.08 Doktorska disertacija	

10.Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

Člani projektne skupine smo tudi aktivno sodelovali v različnih delovnih telesih ministrstva za kmetijstvo in okolje v zvezi s strokovnim delovanjem v čebelarstvu.

11.Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

11.1.Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

S projektom smo povezali več raziskovalnih laboratorijev v skupno analizo znanj na področju

sinergističnih učinkov kemikalij na čebele. S skupnim delom so nastali tudi sinergistični učinki v našem delovanju in razumevanju problematike. Zaradi različnih osnovnih temeljnih znanj smo tako pridobivali nova znanja in poglede. Vrednost samih zbranih rezultatov pa je v načrtovanju novih poskusov, ki bodo lahko postopoma razložili različne identificirane potencialne mehanizme sinergističnega delovanja kemikalij na čebele. Tovrstne raziskave sicer dajo neposredne odgovore za problem odmiranja čebel, po drugi strani pa so raziskovani mehanizmi širše prisotni v živem svetu in ne na koncu deloma tudi navezujejo na zdravje človeka.

Sodelavci na projektni skupini so v minulem letu objavili več odmevnih znanstvenih prispevkov. Jasna Kralj, Danilo Bevk in Nadrej Čokl so neposredno prispevali z objavama k prepoznavanju znanstvene utemeljenosti problematike odmiranja čebel. Sodelavki Bavcon Kralj Mojca in Trebše Polonca sta prispevali nova spoznanja k razgradnji kemikalij v naravi, sodelavec Primož Zidar pa k razumevanju delovanja piretroidov na kopenske živali.

Tekom tekočega leta pričakujemo, da bomo skupaj objavili še prispevke, ki se bodo neposredno navezali na zbrane rezultate v enoletnem projektu in tako dodatno opozorili znanstvenike na problematiko neraziskanosti specifičnosti sinergističnih učinkov pri čebeli.

ANG

Project connected several labs in joint analysis of knowledge in the field of synergistic effects of chemical on honey bees. Joint work also generated synergistic effects in our way of work and scientific view of the topic. We achieved new facts and views of research problem due to different foundations in knowledge. Value of obtained results is in generation of new research in a way to further better explain synergistic effects, especially to deliver direct evidences for mechanisms of action.. This type of research is trying to explain honeybee lose, but on the other hand investigated mechanisms are present in wider animal world even important for human health.

Members of project team have been published several research reports connected with research topic of the project. They contributed new bids to the knowledge of honey bee losses as well to the mechanism of action of pesticides in general.

We are planning additional joint scientific contributions based on the results of the project during current year.

11.2.Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

Projekt je bil namenjen k pojasnitvi možnih sinergističnih učinkov na čebelo in možnost obstoja le teh v naši domači praksi rabe kemikalij v kmetijstvu in čebelarstvu. Glede na široko paleto možnih sinergističnih učinkov, dejansko obstaja takega delovanja na čebele. V sklepnem poglavju predlagamo 4 ukrepe, ki lahko bistveno pripomorejo k zmanjšanju zastrupljanja čebel. S poročilom smo dali možna izhodišča za pripravo tako ustreznih pravnih ukrepov, kakor tudi podpore za bodoče raziskave. Ključno sporočilo je, da se mora država zavzeti za ustrežnejše postopke registracije zaščitnih sredstev in zdravil in najti način za možnost posebnega previdnostnega načela v kolikor obstaja utemeljen sum na možnost sinergističnega delovanja. Pomemben predlog ukrepov je tudi usmerjen v monitoring okolja s čebelami, ki je lahko ključen element splošnega monitoringa okolja tako s stališča zdravja ljudi kot nadzora dogajanja v naravi.

ANG

The main goal of the project was explanation of potential synergistic effects of chemical on honeybee and potential existence of such effects in our practice of use of chemicals in agriculture and beekeeping. There are several such potential effects. Due to findings we proposed 4 measures to reduce poisoning of honeybees. We posted proper foundations to establish adequate legislative measures for reduction of honeybee poisoning. The main message of our findings is that the State has to be more careful during registration of new pesticides in agriculture. The main problem is that when is a reasonable doubt for honeybee safety due to potential synergistic effect, such effect have to be tested in different conditions

which mimics natural situation of honeybee colony. The second very important message is that we need to establish effective monitoring of environment with bees, which is also important for general monitoring as well for human health.

12. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine.

12.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v domačih znanstvenih krogih
- pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?¹²

Čebelarska zveza Slovenije

12.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v mednarodnih znanstvenih krogih
- pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:¹³

COLLOS – EU mrež raziskovalcev za raziskave izgub čebeljih družin. (NIB)

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:¹⁴

1. znanstveni dosežek

13. Izjemni dosežek v letu 2012¹⁵

13.1. Izjemni znanstveni dosežek

van der Zee Romée, Kralj Jasna et. al, Managed honey bee colony losses in... Journal of Apicultural Research; 2012; Vol. 51; str. 100-114
Jasna Kralj je sodelovala pri pripravi povzetka raziskav odmiranja čebeljih družin na različnih kontinentih. Delo je bilo objavljeno v času, ko se je s težavo prebijala iz dneva v dan v boju s svojo boleznijo, a vseeno zavzeto skrbela za potek našega projekta o sinergističnih učinkih kemikalij na čebele. Tudi širša svetovna raziskava odmiranj je opozarjala na dodatne faktorje poleg čebeljih bolezni, ki prispevajo k odmiranju čebel v novejši zgodovini. Jasnino znanstveno delo se je začelo v Ljubljani, nato pa se je kalilo v tujih laboratorijih Kanade, ZDA in Nemčija. Žal ji je bolezen preprečila nadaljevati dobro zastavljeno raziskovanje mehanizmov odmiranja čebel, ki pa jih sedaj uspešno raziskuje njen doktorant Danilo Bevk. Skozi odkrivanje skrivnostnega sveta življenja čebel bomo še naprej ohranjali lep spomin na Jasno.

13.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe

ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS

- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat na zgoščenki (CD), ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Biotehniška
fakulteta

Janko Božič

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana	14.3.2013
-----------	-----------

Oznaka prijave: ARRS-CRP-ZP-2013-02/5

¹ Opredelite raziskovalno področje po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science). Prevajalna tabela med raziskovalnimi področji po klasifikaciji ARRS ter po klasifikaciji FOS 2007 (Fields of Science) s kategorijami WOS (Web of Science) kot podpodročji je dostopna na spletni strani agencije (<http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/preslik-vpp-fos-wos.asp>). [Nazaj](#)

² Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku). [Nazaj](#)

³ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁶ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

⁷ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 8 in 9 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁹ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹¹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹² Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹³ Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁴ Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁵ Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2012 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot prilonko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/> [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2013-02 v1.00

B4-40-E0-98-8B-DA-34-C2-53-0A-E2-BE-43-8B-D4-74-2A-95-3F-90

Kumulativni in sinergijski učinki različnih kemikalij na čebele¹

Cumulative and synergistic effects of different chemicals to honeybees

– vsebinsko poročilo projekta CRP V1-1129

Avtorji:

Mojca Bavcon Kralj^{KGZ,R}, Gregor Belušič^{BF,C}, Danilo Bevk^{NIB,R}, Janko Božič^{BF,V},
Andrej Čokl^{NIB,C}, Kralj Jasna^{NIB,R}, Gordana Glavan^{BF,R}, Špela Schrader^{NIB,R}, Polonca
Trebše^{UNV,R} in Primož Zidar^{BF,R}

Uredil: Janko Božič^{BF,V}

Ljubljana, 28. 9. 2012

BF - Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana

NIB - Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

UNV - Univerza v Novi Gorici, Nova Gorica

KGZ – Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica, Nova Gorica

Vloge na projektu: V- vodja projekta, R – raziskovalec, raziskovalno delo in poročanje,
C- raziskovalec, svetovanje

Vsebina:

Abstract (ENG):.....	2
Povzetek.....	3
Uvod.....	4
Poljske kemikalije - čebele.....	4
Panjske kemikalije.....	6
Pregled akaricidov.....	6
Mehanizmi delovanja - nevretenčarji.....	10
Mehanizmi delovanja - čebele.....	14
Sinergizem pri čebelah.....	19
Sinergistični in kumulativni učinki kemikalij na žuželke v patentnih bazah.....	23
Drugo.....	26
Viri.....	27
Spisek citiranih virov.....	28

1- poglavja povzeta iz strani: <http://pouk.bf.uni-lj.si/course/view.php?id=174> (Schem2Bee internetno delovišče projektne skupine, ključ za vpis »carnica«)

Abstract (ENG):

The work was done in four phases. In the first phase, we collected primary and secondary sources and looking for potential classification and ranking of the observed effects. In the second phase, we coded the collected findings to be stored in a common **database** of collected results. In the third phase, we reviewed the data found. Insufficient matching methods and results did not allow us to perform a classical meta-analysis. The results are summarized and presented in tables and evaluated. Preparation of the final report and layout databases is the last phase of the project.

Primary and secondary sources were collected with the Google Scholar and to a lesser extent, in other search engines (WebOfScience, ...). Collected sources were edited together with bibliographic tool Zotero. Partial summary and preparation of the text of the draft and final report were collected in a common internet site via electronic classrooms and the use of wikis (Moodle) and tables using GoogleDocs. Since research synergistic effects on honeybees are relatively rare, we have expanded our research on other invertebrates, especially insects, we recorded potential mechanisms and interpolated on honey bee.

In particular, there have been treated patents published by the WIPO with tool PatentScope. As expected, there are no patents that are related to the synergistic negative impact of pesticides on bees, so the patents dealing with insect control were especially analyzed. During the project we collected almost 400 scientific papers from the project area and twice as many posts which are linked. After detailed analysis of patents dated after 1981, 286 patents related to the synergistic effect in insect were eliminated, taking in consideration that there is a synergistic effect, which includes chemicals for only about 80 patents, especially patents are excluded, which may constitute a threat to the bee, and especially those that are relevant in terms of resources that are allowed in Slovenia or at least in the EU.

Overview of sources clearly shows the real interaction of individual chemical substances in the operation action to the bee and the bee family. In addition to the problem of pesticides in agriculture, research includes means of bee diseases control, especially varroa itself and by viral, bacterial, fungal diseases, as well other parasites. We have several recent studies, including domestic, of the interaction of chemicals and bee diseases, but the mechanisms of action are not reliable and clear. A similar story is also about the synergistic effects of chemicals, where clear modes are relatively few. The strongest known synergistic effects occur when the system is blocked for the detoxification by P450 with a relatively non-toxic substance that causes the effective operation of another poison directly to its principal target. So far existing knowledge permits only the evaluation of the presence of synergistic effect. Honey Bee is a special case, but the specificities between honeybees' subspecies cannot be excluded. Especially interesting conclusions processing patent research, showing an awareness of producers of synergistic effects, but they are not specifically reviewed on non-target organisms, especially not in common use in agriculture and beekeeping. This requires special care in providing such authorization, as well as the work of advisory services for pesticides use.

To effectively prevent the potential synergistic effects of chemicals we suggest the increase of the control of the implementation of preventive measures and proper use of pesticides in agriculture and chemicals in hives, greater caution in registration procedures, strengthening the environmental monitoring and the increase the amount of research.

Key words: honey bee, colony loss, CCD, pesticides, plant protection products, hive chemicals, bee diseases, parasites, environment effect, synergism, interaction

Povzetek

Delo je potekalo po štirih fazah. V prvi fazi smo zbirali primarne in sekundarne vire in iskali možnosti klasifikacije in rangiranja ugotovljenih učinkov. V drugi fazi smo kodirali zbrane raziskave za zapis v skupno bazo zbranih rezultatov. V tretji fazi smo po pregledu podatkov ugotovili premajhno ujemanje metod dela in podanih rezultatov, da bi podali klasično meta analizo. Rezultati so povzeti in tabelarično predstavljeni in ovrednoteni. Priprava zaključnega poročila in ureditev zbirk podatkov je zadnja faza projekta.

Primarne in sekundarne vire smo zbirali z Google scholar in v manjši meri tudi z drugimi iskalniki (WebOfScience,...). Zbrane vire smo skupaj urejali s programskim orodjem Zotero. Delne povzetke in pripravo teksta za osnutek končnega poročila smo zbirali v skupnem internetnem delovišču preko sistema elektronske učilnice in uporabo wikijev (Moodle) in razpredelnice s pomočjo GoogleDocs. Ker so raziskave sinergističnih učinkov na čebelah relativno redke, smo raziskavo razširili tudi na druge nevretenčarje, predvsem insekte, da smo evidentirali možne mehanizme in jih interpolirali na medonosno čebelo.

Posebej so bile obdelane patentne objave z orodjem PatentScope na WIPO portalu. Po pričakovanju ni patentov, ki bi se nanašali na sinergističen negativen učinek pesticidov na čebele, zato pa je smo posebej analizirali patente, ki obravnavajo zatiranje žuželk.

Tekom projekta smo zbrali blizu 400 znanstvenih prispevkov s projektnega področja ter še enkrat toliko navezujočih prispevkov. Podrobna analiza patentov je izločila 286 patentov po letu 1981, ki se nanašajo na sinergistično delovanje pri žuželkah, s tem, da gre za sinergistično delovanje, ki vključuje tudi kemikalije le za okoli 80 patentov, posebej pa so izvzeti patenti, ki bi lahko pomenili tudi grožnjo za čebelo in posebej tisti, ki so relevantni glede na sredstva, ki so dovoljena v Sloveniji ali vsaj EU.

Pregled virov jasno kaže na realno interakcijo posameznih kemičnih snovi v delovanju na čebelo in čebeljo družino. V problem se poleg pesticidov iz kmetijstva vključujejo tudi sredstva za zatiranje čebeljih bolezni, predvsem varoe in same čebelje bolezni, tako virusna, bakterijska, glivična obolenja, kot tudi zajedavec. Predvsem so izpostavljeni virusi, varoa in *Nosema cerrana*. Imamo več novejših raziskav, tudi domačih, o interakciji kemikalij in čebeljih bolezni, vendar z še ne zanesljivimi in jasnimi mehanizmi delovanja. Podobna je zgodba tudi o sinergističnih učinkih kemikalij, kjer je jasnih načinov delovanja relativno malo. Najmočnejši znani sinergijski učinki se pojavijo takrat, ko je blokiran sistem za razgradnjo strupov (P450) z relativno nestrupeno snovjo, ki povzroči učinkovito delovanje drugega strupa neposredno na njegovo osnovno tarčo. Zaenkrat obstoječa znanja dopuščajo le oceno prisotnosti sinergističnega delovanja, ki pa jo je potrebno pri vsaki vrsti posebej preverjati. Medonosna čebela je tako poseben primer, poleg tega pa tudi niso izključene posebnosti med posameznimi podvrstami medonosne čebele. Tako se pod vprašaj postavljajo že osnovne raziskave čistih snovi ali posameznih FFS pripravkov na strupenost za čebele. Posebej so zanimivi zaključki obdelave patentnih raziskav, ki kažejo na zavedanje proizvajalcev o sinergističnih učinkih, vendar le ti niso posebej preverjani na neciljnih organizmih, še zlasti ne v običajni rabi v kmetijstvu in čebelarstvu. To zahteva posebno previdnost tako pri dajanju dovoljenja za promet, kot tudi pri delu svetovalne službe za uporabo FFS.

Za uspešnejše preprečevanje morebitnih sinergističnih učinkov kemikalij predlagamo okrepitev kontrole izvajanja preventivnih ukrepov in pravilne rabe FFS v kmetijstvu in kemikalij v čebeljih panjih, večjo previdnost pri registracijskih postopkih, okrepitev monitoringa okolja ter povečanje število raziskav.

Uvod

V tem tekstu so zbrani povzetki raziskav različnih virov, ki so bila večinoma zbrana na skupnem internetnem delovišču (glej zgoraj). Ta tekst je delovna verzija zaključnega poročila, ki bo združen s posebnim poročilom, ki ga je pripravila sodelavka iz NIBa Špela Schrader in predstavitev mehanizmov delovanja, ki jih predstavila sodelavka Oddelka za biologijo, Gordana Glavan. Pričakujem, da bomo poleg združevanja tekstov v celovito poročilo še dodali informacije in analize, ki bodo utrdili relevantnost naših zaključkov glede na dejansko rabo kemikalij v kmetijstvu in čebelarstvu.

Poljske kemikalije - čebele

Občutljivost čebel na insekticide je definirana in razvrščena v štiri skupine: visoko strupeni (LD50 0,001 - 1,99 ug/čebelo), strupeni (LD50 2,0 - 10,99 ug/čebelo) in relativno nestrupeni (LD50 > 11,0 ug/čebelo) (EPA)

Med tem, ko so čebele nedvomno izpostavljene različnim poljskim pesticidom, je njihova relativna občutljivost na FFS-je v primerjavi z ostalimi žuželkami predmet razprav (Hardstone in Scott 2010). V študiji so preučili 62 insekticidov, katerih učinke so primerjali glede na vrsto žuželke. Čebele delavke se niso izkazale kot posebno občutljivejše, čeprav se po skupinah insekticidov kaže določena dovzetnost.

V primeru karbamatov beležijo enako občutljivost *A. mellifera* v primerjavi z drugimi vrstami, čeprav so čebele najbolj občutljive na bendiocarb, s povprečnim LD50 za 2,64 večjim (razpon 1,00-4,28) ug/g v primerjavi s povprečno LD50 od 24,3 (razpon 8,09-52,2) ug/g pri drugih treh vrstah. Najmanj občutljive na karbamate so se izkazale vrste kot so hišna muha (*Musca domestica L.*) in mačja bolha (*Ctenocephalides felis Bouche*). V skupini neonikotinooidov se je *A. mellifera* v treh primerih (dinotefuran, imidakloprid in nikotin) od petih aktivnih snovi izkazala kot najbolj občutljiva vrsta. Najmanj občutljiva vrsta se je izkazala v primeru organoklorovih insekticidov, kjer *A. mellifera* kaže najmanjšo dovzetnost na endosulfan in metoksiklor. Za endosulfan je LD50 za čebele 120 ug/g, za ostale žuželke pa v povprečju 1,83 ug/g, v primeru metoksiklora pa LD50 za čebele 236 ug/g, za ostale žuželke pa v povprečju 11,4 ug/g. V primeru organofosfatov se je največja občutljivost izkazala v primeru azinfos-metila in forata; najmanjša pa v primeru bromofosa, mipafoksa, naleda in sulprofosa. Sicer pa je občutljivost čebel v primeru organofosfatov primerljiva z občutljivostjo ostalih vrst žuželk. Enako opažajo v primeru piretroidov. Večjo dovzetnost čebel se kaže v primeru novejših insekticidov, kot je spinosad (Hardstone in Scott 2010).

Laboratorijske študije odmerka in odziva nam običajno povedo občutljivost organizma na kemikalijo v različnih enotah v odvisnosti od načina aplikacije (kontaktno, oralno,...). Za čebele je vrednost LD50 običajno v enotah ug/čebelo ali ug/g (masa čebele). V starejši študiji iz leta 1994 (Helson, Barber, in Kingsbury 1994) so proučevali občutljivost posameznih vrst čebel (*Apis mellifera* (delavke), *Andrena erythronii* (ženske), *Megachile rotundata* (ženske), in *Bombus terrestris* (delavke)) na 6 insekticidov (permetrin, mexacarbate, aminocarb, fenitrotion, karbaril in triklorfon). Vse insekticide so površinsko nanašali na prsni koš čebel. Občutljivost čebel na insekticide je bila po sledečem vrstnem redu od najbolj strupenega proti najmanj: permetrin, meksakarb, aminokarb, fenitrotion, karbaril in triklorfon. Prav tako so se vrste razlikovale od najbolj občutljive proti najmanj *A. mellifera*, *A. erythronii*, *M. rotundata*, in *B. terrestris*.

V kombinirani študiji strupenosti fungicidov na čebele so preučevali razliko v strupenosti glede na način apliciranja, oralno ali kontaktno (Ladurner idr. 2005). Kontaktna in oralna izpostavljenost

A. mellifera in *O. lignaria* benomilu in iprodionu ni imela bistvenega učinka na smrtnost obeh vrst. Propikonazol je akutno strupen in povzroča zapoznele učinke strupenosti na obe vrsti. Kaptan močno ogroža vrsto *O. lignaria* (Ladurner idr. 2005).

Poleg različne vrstne in podvrstne občutljivosti na kemikalije, obstajajo velike razlike tudi v občutljivosti glede na razvojni stadij čebele. Vpliv na larve, njihov razvojni stadij in ostale zapoznele učinke so študirali v primeru dimetoata in fenoksikarba (Aupinel idr. 2007).

V splošnem se pri insekticidu računa razmerje med LD50 za škodljiv organizem in LD50 za čebele, ki naj bi bilo čim manjše, kar bi posledično pomenilo čim manjši vpliv na koristne organizme. To ne velja za diafentiuoron, saj že pri koncentraciji, ki povzroča 1% smrtnost čebel, povzroča vedenjske motnje pri iskanju hrane in doma (Stanley idr. 2010). Študija akutne strupenosti (laboratorijski testi) spinosada na čebele, kaže, da je spinosad zelo strupen za čebele delavke le v najslabšem možnem scenariju. V terenskih študijah ugotavljajo, da so ostanki spinosada varni pri pašnih čebelah delavkah kot tudi ni neželenih učinkov na preživetje matic (Miles 2003). V iskanju aktivne snovi, ki bi bila za čebele najmanj nevarna pa so se avtorji (Li idr. 2010) usmerili tudi v študij strupenosti optično aktivnih kemikalij, vendar pa v primeru fipronila (kiralni fenilpirazolni insekticid) ne ugotavljajo statističnih razlik med enantiomerami in racematom.

Zadnjih nekaj let se študije usmerjajo v sinergijske učinke poljskih pesticidov. Sinergija je namreč opredeljena kot dokazano večja strupenost zmesi komponent, kot je vsota strupenosti posamezne komponente. Že dvajset let je znano, da mešanice piretroidnih insekticidov in fungicidov izzovejo sinergijske učinke pri čebelah (Colin in Belzunces 1992; Edward D Pilling in Jepson 1993). Če se mešanice uporabljajo za cvetoče rastline, lahko kaj kmalu prizadenejo tudi čebele. Podoben poskus so izvedli v Veliki Britaniji (H. Thompson in Wilkins 2003), kjer so testirali sinergizem v kombiniranih kemijskih zmesih, ki vsebujejo dva običajna piretroida alfa-cipermetrin in lambda-cihalotrin ter 6 fungicidov (iprodion, karbendazim, prokloraz, klorotalonil, flusilazol, difenkonazol, propikonazol in tebukonazol). Najvišje povišanje toksičnosti (znižanje LD50) je bilo opaženo v kombinaciji lambda-cihalotrina in prokloraza, ki je kar 6.7 – krat povišano strupenost. Šest od osmih fungicidov so povišali toksičnost lambda-cihalotrina in trije alfa-cipermetrina. Sinergizem so študirali tudi v kombinaciji neonikotinoidi in fungicidi (Iwasa idr. 2004). DMI-fungicidi v laboratorijskih študijah močno povečajo strupenost acetamiprida in tiakloprida in to največ kar za 1.141-krat. Poleg tega so primerjali strupenost nitro-substituiranih neonikotinoidov z ciano-substituiranimi. Laboratorijski testi kažejo največjo strupenost nitro-substituiranih neonikotinoidov z LD50: 18 ng / čebelo za imidakloprid, 22 ng za klotianidin 30 ng za tiametoksam, 75 ng za dinotefuran in 138 ng za nitenpyram. Ciano-substituirani neonikotinoidi so pokazali precej nižjo stopnjo strupenosti z LD50: 14,6 mg / čebela za acetamiprid in 7,1 za tiakloprid. Piperonyl butoksid, triflumizol in propikonazol povečajo strupenost acetamiprida 6,0-,244- in 105-krat; tiakloprida 154-, 1.141- in 559-krat; vendar imajo minimalen vpliv na imidakloprid (1.70, 1.85 in 1.52-krat). Strupenost imidakloprida pa so študirali tudi v kombinaciji z njegovimi razpadnimi produkti {Suchail, 2001}. Izmerjena akutna toksičnost (LD50) imidakloprida je bila 60 ng / čebelo po 48 urah in 40 ng / čebelo po 72 in 96 h. Od šestih razpadnih produktov imidakloprida sta le dva pokazala strupenost primerljivo imidaklopridu (5-hidroxyimidacloprid in olefin) (Suchail, Guez, in Belzunces 2001).

Testiranje sinergističnih učinkov poljskih kemikalij se vsaj delno pokriva tudi z opisi v patentih (glej poglavje Analiza patentov...)

O posameznih skupinah pesticidov, njihovih razgradnih produktih ter morebitni strupenosti le teh, lahko preberete v zbranih virih še posebej pa priporočamo:

Primer meta-analize za imidakloprid: (Cresswell 2011).

Blacquièrè idr. (2012) izèrpen povzetek o neonikotinoidih: realne koncentracije, toksiène doze, subletalni uèinki, ocena tveganja.

Panjske kemikalije

Splošno - [pregled akaricidov](#)

Konec sedemdesetih let prejšnjega stoletja se je v evropskih èebelnjakih pojavila zajedalska pršica *Varroa destructor*. Moèno okužene družine so začele umirati. Proti koncu osemdesetih je postala dostopna zadovoljljiva kontrola varoe s pomoèjo razliènih akaricidov, ki so se izkazali z moèno strupenostjo za pršico ter nizko strupenostjo za èebele (Rosenkranz, Aumeier, in Ziegelmann 2010).

Pripravke so sprva vnašali v panje v obliki prahu, sprejev ali aerosola, vendar je bilo njihovo delovanje izjemno kratkotrajno, saj so jih pregovorno èiste èebele iz panja èimprej odstranile; enkratno škropljenje tudi ni doseglo velikega deleža varoj, ki so se razvijale v pokriti zalegi (Koeniger in Fuchs 1988). Kasneje so razvili pripravke v obliki obloženih plastiènih trakov, ki jih èebelarji namestijo v panju in iz katerih se aktivna snov počasi izloèa več tednov. Nekaj tedenska terapija je uèinkovitejša, saj prizadene mlade varoje, ki prihajajo iz celic mladih èebel, preden se uspejo ponovno razmnožiti. Na ta naèin lahko v mesecu in pol zdesetkamo populacijo varoj. V takšni obliki èebelarji uporabljajo pripravek Apivar z uèinkovino [amitraz](#), sintetièna piretroida [tau-fluvalinat](#) v pripravku Apistan (v Ameriki najbolj uporabljan akaricid, pri nas ni dovoljen) in [flumetrin](#) v pripravku Bayvarol, ter organofosfatni insekticid [kumafos](#) v pripravku Check mite +. Uporablja se tudi pripravke v obliki raztopin, ki se pošèropijo po satju. V kmalu so se razvile varoe, ki so bile na posamiène sintetiène akaricide odporne, kar je bistveno zmanjšalo njihovo uporabnost (Milani 1999). Prilagoditev sicer ni popolnoma pojasnjena ali gre dejansko za genetsko prilagoditev ali zgolj fenotipsko spremembo zaradi prisotnosti ostankov sredstev v panju.

Panjski pesticidi se v panju nalagajo v vosku, medu in cvetnem prahu, zato so jim èebele izpostavljene kronièno v vseh fazah razvoja. Raziskave subletalnih toksiènih uèinkov na èebele (Rinderer idr. 1999; Sylvester idr. 1999; Weick in Thorn 2002; Haarmann idr. 2002; Jeffery S. Pettis idr. 2004; Collins idr. 2004; Burley, Fell, in Saacke 2008) in sinergistiènih vplivov (Johnson, Pollock, in Berenbaum 2009; Mao, Schuler, in Berenbaum 2011) zbujajo sum, da so èebelarski pesticidi eden od pomembnih faktorjev slabše kondicije èebeljih družin in njihovega poveèanega umiranja (glej tudi Wu (2010).

Tako zaradi odpornosti varoj kot tudi zaradi ostankov sintetiènih akaricidov, ki se nabirajo v èebelarskih izdelkih se vedno bolj spodbuja uporaba akaricidnih eteriènih olj ([timol](#)) in [organskih kislin](#) (mravljinèna kislina, oksalna kislina).

Pregled akaricidov

Akaricidi:

- [AMITRAZ](#) 200µg/kg (v pripravku Apivar) **amidin**; èeprav ni topen v maščobah se v èebeljih pripravkih razgradi in ga ni najti. V 30 % slovenskih medov so našli razgradne produkte amitraza v nizkih koncentracijah. Deluje kot **agonist α 2adrenoreceptorja** (ojaèa adrenergièen odziv) in inhibira monoamin oksidazo (ta razgrajuje serotonin, norepinefrin, epinefrin..).
- [KUMAFOS](#) 100µg/kg (coumaphos) (v pripravkih Perizin, Check-Mite+) organofosfat,

inhibira delovanje Ach esteraze.

- **TAU-FLUVALINAT** (fluvalinate) je **sintetični piretroid** (v pripravku Apistan); piretroidi ohranjajo Na kanalčke na nevronih odprte in tako povzročijo paralizo; enostavno prehajajo skozi kutikulo žuželk; sesalci imajo dovolj encimov, da jih sprti razgradijo, so pa toksični za koristne žuželke in različne vodne organizme - tako nevretenčarje kot ribe; novejši so vedno bolj toksični tudi za sesalce. Čeprav v Sloveniji ni registriran, prisoten v 10% testiranih medov (Kandolf in Auguštin 2008). V med zaide le pri dolgotrajni oziroma premočni uporabi.
- **Flumetrin** (v pripravku Bayvarol) **sintetični piretroid**.
- **Timol** (thymol) (pripravki: Apilife VAR, Apiguard (Slo), dovoljen pripravek v ekološkem čebelarjenju) - **monoterpenski fenol** pridobljen iz eteričnega olja timijana. Deluje na GABA receptorje in spreminja lastnosti celične membrane {Priestley, 2003}.
- Mlečna kislina
- Mravljična kislina EKO, učinkovitost odvisna od časa uporabe, lahko presega 90%, škoduje zalegi in čebelarjem; ob tretiranju spomladi spremeni okus medu.
- Oksalna kislina EKO, učinkovita, kadar ni zalege; čebelarjem lahko v večjih koncentracijah škoduje, v medu se koncentracija ne poveča nad naravno prisotne koncentracije

AMITRAZ

Spada v skupino formamidinov. Deluje kot **agonist $\alpha 2$ - adrenoreceptorja** (ojača adrenergičen odziv) in **inhibira monoamin oksidazo** (ta razgrajuje serotonin, norepinefrin, epinefrin..) in **sintezo prostaglandinov** (Tarallo idr. 2009). Kot delni agonist naj bi deloval na na G-protein vezane receptorje, ki so občutljivi na oktopamin (Chen et al., 2007 po Meyer idr. 2012).

V čebelarstvu se uporablja amitraz v pripravku Apivar 200 μ g/kg za zatiranje varoje in trahealnih pršic *Acarapis woodi* (Rennie).

LD₅₀ 2,55 ug/čebelo, LC₅₀ 1636 ug/l (Santiago idr. 2000).

Vandenberg in Shimanuki (1990) sta opisala nizko učinkovitost amitraza v obliki aerosola in na plastičnih trakovih pri uničevanju trahealnih pršic ter njegovo visoko toksičnost za čebele. Floris idr. (2001) so opisali 70 - 87% učinkovitost proti varoji in minimalno povečano smrtnost čebel le v prvem od šestih tednov terapije.

Amitraz sproži programirano celično smrt v epitelnih celicah srednjega črevesa čebeljih ličink (A Gregorc in Bowen 2000). Opisana je povečana smrtnost 1 - 3 dni starih ličink čebele (Bath, 1999, po »A Review of Treatment Options for Control of Varroa Mite in New Zeland, 2001«).

Poročajo odpornost varoj na Amitraz (Elzen idr. 2000).

V veterinarstvu se proti klopm in ušem uporablja pripravek s kombinacijo amitraza in metaflumizona (Tarallo idr. 2009) («case report» in reference). Metaflumizin je semikarbazonski insekticid in zavira prehodnost natrijevih kanalčkov podobno kot pirazolinski insekticidi (wikipedija). Nekateri čebelarji so v preteklosti sami pripravljali lističe na osnovi pripravkov Mitac

in Tactic. Zaradi umika v uporabi kot FFS (med drugim zaradi karcinogenosti), je sedaj amitraz težje dostopen (v letu 2009 je bil najden na mrtvicah čebel pri inšpekcijskem pregledu).

Kumafos

Kumafos je organosfosfatni insekticid, ki so ga sprva uporabljali proti klopom na govedu in ovcah . 1985 so ga v preparatu Perezin prilagodili za uporabo v panjih proti pršicam iz rodu *Varroa* (Ritter 1985), ki napadajo medonosno čebelo *Apis mellifera*. Perezin se sistemsko širi po panju s pomočjo trofilakse in je malo toksičen za čebele. Pomrle naj bi le tiste čebele, ki pesticid pojedjo kot prve in so zato izpostavljene veliko večjim odmerkom, kot je priporočeno.

LD₅₀ za tri dni stare čebele je približno 6 ug, medtem ko je za 8 ali 14 dni stare čebele pol manjša (približno 3 ug) (Buren idr. 1992). Bistveno večjo količino kumafosa čebele prenesjo ob kroničnem hranjenju z blago raztopino Perezina, saj ga razgrajujejo s pomočjo encimov za detoksifikacijo (Buren idr. 1992). Detoksifikacija poteka s pomočjo encimov citokrom P450 oksigenaz. Dokazano je sinergistično delovanje kumafosa s fluvalinatom, ki ga razgrajujejo isti encimi (Claudianos idr. 2006; Mao, Schuler, in Berenbaum 2011) ([Sinergizem pri čebelah](#)).

Weick in Thorn (2002) nista odkrila subletalnih učinkov kumafosa na zaznavo vonja in olfaktorno učenje čebel delavk ob nanosu 0,1%, 1% ali 10% raztopine kumafosa na kutikulo, niti ob injekciji 0,07% raztopine kumafosa v heksanu v glavino kapsulo².

Zato pa kumafos škodi razvoju matic in trotov. Če so matičniki izpostavljeni kumafosu, jih čebele uničijo ali pa se v njih razvijejo manjše matice z manjšimi jajčniki (Haarmann idr. 2002). Matičniki so zgrajeni iz novega voska, zato se v njih med terapijo akumulira še več kumafosa. Če je v vosku 100 mg kumafosa na kg voska, kar je mejna dovoljena koncentracija v Ameriki, čebele zavrnejo polovico vseh matičnikov (Jeffery S. Pettis idr. 2004). Matice, ki so vzgojene v takšnem okolju, so lažje (Collins idr. 2004). Le tretjina takšnih matic po šestih mesecih še vedno vodi družino. Če so priporočeni terapiji kumafosa med razvojem izpostavljeni troti, so njihove semenčice slabše viabilne od samega začetka, drastično njihova uporabnost upade po šestih tednih shranjevanja (Burley, Fell, in Saacke 2008). Pri ličinkah čebel, ki jih hranijo s kumafosom, se poveča delež celic podvrženih načrtovani ali nekrotični celični smrti (Ales Gregorc in Ellis 2011).

Koncentracije kumafosa v vosku:

Wallner 1999: 2 -15 mg/kg voska v Evropi (citirano po Collins idr. (2004)

Nasr in Wallner 2003: 23 - 45 mg/kg voska v Severni Ameriki (Collins idr. 2004)

Chauzat in Faucon (2007) povprečno 793 ug/kg; max. 4113 ug/kg (Francija, 2002/2003)

Van Buren idr. (1992) opisuje,

(a) kaj se zgodi s kumafosom, ko ga čebele pojedjo. 2-3% zaužite količine se po štirih urah znajde v hemolimfi, slaba polovica se izloči, dobra polovica pa se 15 minut po hranjenju nahaja v medenem želodčku in se lahko preko trofilakse (medsebojnega hranjenja čebel) razširi v družini. Po kateri poti kumafos vstopa v hemolimfo ni znano. Če vstopa čez steno medenega želodčka, se izogne detoksificirajočim encimom v srednjem črevesu.

(b) Količina hemolimfe je pri čebelah, ki so jedle kumafos, večja.

(c) Kot starejšo raziskavo o kronični toksičnosti več pesticidov za čebele navajajo Fiedler (1987).

Več o detoksifikaciji v (Johnson, Pollock, in Berenbaum 2009; Mao, Schuler, in Berenbaum 2011)

² Glej doktorsko disertacijo Danila Bevka (2012), kjer je ugotovil tudi vpliv na učenje, pašno aktivnost in izmenjavo hrane. Glej tudi razpravo spodaj pri »Sinergizem med pesticidi in boleznimi oziroma paraziti«.

(e) Ker kumafos očitno vpliva na vzdrževanje homeostaze v srednjem črevesu, so preverili, ali so z Nosemo okužene čebele občutljivejše na kumafos. Takšnega sinergističnega učinka ob relativno blagi nose mavosti niso zaznali. Nose mavost lahko močno poveča občutljivost na druge pesticide, kot sta pokazala Alaux idr. (2010) za imidakloprid in Aufauvre idr. (2012) za fipronil in thiacloprid. Drugače pa prisotnost kumafosa poveča obolevnost za nose mavost Wu idr. (2012).

Tau-fluvalinat

Tau-fluvalinat je piretroidni insekticid:

www.epa.gov/opprrd1/REDs/taufuvalinate_red.pdf

V Ameriki je bil prvič registriran 1983, 1990 pa prvič za uporabo v čebelnjakih. 1994 se iz fluvalinata preimenuje v tau fluvalinat, ko od 4 stereoizomer začno uporabljati le eno, ki izkaže insekticidno aktivnost. Od 1997 je registracija v lasti Wellmark International. Priporočena terapija obsega 1 trak Apistana na pet satnic za 6 do 8 tednov. Po začetku uporabe v čebelnjakih so se pojavile na fluvalinat odporne varoe (Milani 1999; Trouiller 1998).

LD₅₀ (akutna, 48 ur) 12 ug/čebelo

(<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/en/Reports/608.htm#none>).

LD₅₀ 9,45 ug/čebelo (<http://www.beecdcap.uga.edu/documents/CAPArticle2.html>)

LD₅₀ 0,97ug/čebelo; LC₅₀ 1601 ug/l (Santiago idr. 2000)

V raziskavi J S Pettis idr. (1991) niso zaznali negativnih vplivov tau-fluvalinata v pripravku Apistan na preživetje delavk in matic, niti na prezimitveno uspešnost matic. Povečala se je smrtnost delavk - spremljevalk matice.

Tau fluvalinat dokazano vpliva na razvoj spolnih osebkov. Matice, ki so gojene med terapijo s priporočenimi odmerki fluvalinata, se razvijajo normalno, medtem ko so odrasle matice pri višjih odmerkih manjše (Haarmann idr. 2002), pri zelo visokih odmerkih pa se sploh ne razvijejo (Collins idr. 2004). Ker se fluvalinat akumulira v vosku, so čebele tekom razvoja lahko izpostavljene precej večjim količinam, kot je terapevtsko predpisano. Pri koncentraciji 1000mg tau-fluvalinata/kg voska le približno četrtnina matic uspešno zaključi razvoj. Tiste, ki dorastejo, so normalno velike. Pri ličinkah, ki so jih krmili s fluvalinatom, se poveča delež celic, ki so podvržene programirani ali nekrotični celični smrti v srednjem črevesu. Povečanje ni zelo veliko in obstaja možnost, da je reverzibilno in ne vpliva na smrtnost ličink (Ales Gregorc in Ellis 2011).

Tudi smrtnost med troti, ki so tekom razvoja izpostavljeni terapiji s tau-fluvalinatom, je večja kot v kontrolnih družinah, vendar manjša kot v družinah, ki so močno okužene z varojo (De Guzman idr. 1999). Troti so manjši kot v kontrolnih družinah. Merjenje teže semenskih veziklov in števila spermatozoev ni dalo konsistentnih rezultatov. Priporočena uporaba tau fluvalinata ne vpliva na viabilnost semenčic trotov, ki so jo kontrolirali še šest tednov po odvzemu (Burley, Fell, in Saacke 2008), niti na paritveno uspešnost trotov (Sylvester idr. 1999).

Relativno nizko toksičnost tau-fluvalinata za čebele pripisujejo uspešni detoksifikaciji s pomočjo citokrom P450 oksigenaz (Johnson idr. 2006) in sicer poddružine CYP9Q teh encimov (Mao, Schuler, in Berenbaum 2011). Če se čebela istočasno kot s tau-fluvalinatom srečuje z drugimi pesticidi, ki se razgrajujejo s pomočjo istih encimov, pride lahko do [sinergizma pri čebelah](#).

Flumetrin

Flumetrin je sintetični piretroid z znatno manjšo toksičnostjo za čebelo kot za pršico in se je začel uporabljati kot panjski akaricid zelo zgodaj.

LD₅₀ 0,05 ug/čebelo, LC₅₀ 46,87 ug/l (Santiago idr. 2000)

Timol

Način delovanja timola ni povsem pojasnjen. Spreminjal naj bi lastnosti celičnih membran in deloval na povečeval odzivnost GABA receptorjev na osnovni transmitter GABA podobno, kot to počno mnogi analgetiki ([Mehanizmi delovanja - nevretenčarji](#)). Timol se uporablja v pripravku Apiguard in je najpomembnejša učinkovina pripravka ApiLife VAR.

Timol je močno toksičen za varoo že pri koncentraciji 5ul/l zraka, medtem ko je za čebele toksičen pri koncentracijah višjih od 15ul/l zraka (Imdorf idr. 1995). Količina učinkovine, ki evaporira, je močno odvisna od temperature, zato je doziranje zelo zapleteno. Nekatere raziskave poročajo povečano smrtnost odraslih čebel, druge za izključno odkrito zalego (Mattila idr. 2000).

Uporaba pripravka ApiLife VAR v priporočenih odmerkih med razvojem trotov ne vpliva na viabilnost semenčic (Burley, Fell, in Saacke 2008).

Mehanizmi delovanja - nevretenčarji

Splošni mehanizmi delovanja insekticidov

Pregledni članek Raymond-Delpech idr. (2005) sistematično prikaže ionotropične [receptorske beljakovine](#), [ionske kanalčke](#) in acetilholin esterazo (encim, ki uravnava količino živčnega prenašalca Acetilholin), ki so tarče različnih skupin insekticidov. Neonikotinoidni insekticidi delujejo na niktinske (holinergične) receptorje (nAChR). Povzročajo dolgotrajno aktivacijo niktinskih receptorjev, kar lahko vodi v povečano vzdraženost živčnih celic in smrt. nAChR blokira tudi cartap in spinozad.

Fenilpirazolni pesticidi se vežejo na receptorje za živčni prenašalec γ -amino maslena kislina (GABA), ki so klorovi kanalčki in blokirajo vezavo endogene GABA ter s tem njihovo aktivacijo, kar lahko vodi v povečano vzdraženost živčnih celic in smrt (Gunasekara idr. 2007). Inhibira tudi Cl⁻ kanalčke, ki jih odpira glutamat (Raymond-Delpech idr. 2005). Delno blokira tok, ki ga povzroča acetilholin (deluje na nAChR?) (Barbara idr. 2005).

Tudi timol, monoterpenski fenol iz timijanovega eteričnega olja, deluje na GABA receptorje. Pri nizkih koncentracijah potencira delovanje GABA na ionotropične GABA receptorje žuželk. Veže se na še neznano vezavno mesto na receptorju in s tem spremeni njegovo alosterično strukturo. Tako omogoči močnejši učinek nizkih koncentracij GABA. Maksimalnega odgovora na GABA ne spremeni. Pri visokih koncentracijah timol deluje kot agonist GABA. Njegovo delovanje je neodvisno od drugih znanih ligandov GABA receptorja (benzodiazepini, β -karbolini (?), barbiturati, propofol, loreclezole in steroidi), sinergističnega učinka niso odkrili (Priestley idr. 2003).

Timol tudi spremeni lastnosti celične membrane, npr. njeno stabilnost (Singh, 1980; Manabe et al., 1987 - citirano po Priestley idr., 2003) in prepustnost (Doliwa et al., 2001 - citirano po Priestley idr., 2003).

DDT, piretrini in sintetični piretroidi, delujejo predvsem na napetostno odvisne natrijeve kanalčke žuželk v membranah živčnih celic (Davies idr. 2007). Pravilno delovanje teh kanalčkov je bistvenega pomena za normalen prenos živčnih impulzov. Po vezavi insekticidov je ta proces moten, kar vodi v paralizo in morebitno smrt.

Piretrini in sintetični piretroidi spremenijo delovanje napetostno odvisnih Na^+ kanalčkov tako, da se upočasni tako aktivacija kot deaktivacija kanalčka. Podaljša se čas trajanja natrijevega toka v celico skozi prizadete kanalčke. Če čas podaljšanja toka skozi prizadete kanalčke zadošča, da se pri neprizadetih kanalčkih že konča refraktarna faza, lahko podaljšani tok sproži nov akcijski potencial - tako nastanejo vlaki akcijskih potencialov. V hiperekscitabilnem stanju lahko celica nekaj časa deluje relativno normalno. Ko Na-K črpalka ne zmore več, se membranski potencial postopno zniža (Ray in Fry 2006). Električna aktivnost zamre. Tako piretroidi povzročijo začetno povečano vzdražnost v živčnih tkivih, ki ji sledi paraliza oz. neodzivnost.

Podaljšanje časovne konstante kanalčka (normalno 0,5 ms) je lahko krajše (<10 ms) pri piretrinih in sintetičnih piretroidih iz I. razreda ali daljše (> 10 ms) pri sintetičnih piretroidih iz II. razreda, kar močno vpliva na učinek učinkovitost pesticida (Ray in Fry 2006). Piretrini in sintetični piretroidi že pri zelo nizkih koncentracijah (10^{-13}M) vplivajo na fosforilacijo proteinov, ki je lahko eden izmed načinov delovanja na Na^+ in druge kanalčke. Poleg napetostno odvisnih Na^+ kanalčkov piretroidni insekticidi lahko modulirajo tudi delovanje napetostno odvisnih Ca^{2+} (Soderlund in Bloomquist 1989) in vplivajo na mnoge druge procese v organizmu; kateri od teh vplivov so neposredni še ni povsem jasno.

Piretroidi zavirajo tudi delovanje GABA receptorjev, ionotropne glutamatne receptorje in napetostno odvisne Ca^{2+} kanalčke (Narahashi idr. 2007). Vplivajo tudi na delovanje ATPaz ter znotrajceličnih signalnih poti z modulacijo fosforilacije proteinov, kar lahko vodi do programirane celične smrti (Enan in Matsumura 1993; Desai in idr. 1975; Rashatwar in Matsumura 1985).

Za piretroid tipa II deltametrin so ugotovili, da neposredno spodbuja aktivnost protein kinaze C / fosfoinozididne znotrajcelične signalne poti pri podgani pri zelo nizkih koncentracijah. To povzroči povečanje znotrajcelične koncentracije inozitol 1,4,5-trifosfata (IP3) ter kalcija, kakor tudi povečanje splošne in specifične proteinske fosforilacije v sinapsah (Enan in Matsumura 1993). Deltametrin pri miškah povzroča tudi povečanje sproščanja neurotransmiterjev, kot je dopamin, skupaj s povečanim intrasinaptosomalnim kalcijem in povečano fosforilacijo proteinov. Vse te ugotovitve nakazujejo, da so beljakovine, ki vplivajo na sinaptičen prenos ter so uravnane s kalcijem, glavni cilji delovanja piretroidov tipa II.

Piretroidi delujejo tudi na holinergični sistem, saj posredno vplivajo na nivo acetilholinesteraze. Predlagan mehanizem: Deltametrin aktivira G protein, ki aktivira PI-PLC (glycosyl phosphatidylinozitol-specific phospholipase C), ki spreminja na membrano vezano AChEsterazo v prosto (Badiou, Meled, in Belzunces 2008).

Cypermethrin povzroči hipoglikemijo; možno da preko spremenjenega izločanja neuro-hormonov (Bendahou, Fleche, in Bounias 1999). Predlagan potek dogodkov:

- => spremenjena električna aktivnost preko Na kanalčkov
- => indukcija izločanja nevrohormonov iz organa corpora allata
- => spremenjen metabolizem lipidov (pomembno tudi za imunsko kompetenco)
- => spremenjeno razmerje sladkorjev; aktivnost ATPaz in AchEsteraz.

Tudi amidinski insekticidi delujejo na napetostno odvisne Na kanalčke. Vežejo se na isto vezavno mesto, kot mnogi lipofilni nevrotoksini. Davies idr. (2007) navaja možne sinergistične učinke med amidinskimi insekticidi, piretroidnimi in dihidropirazolnimi insekticidi (Zlotkin 1999). Tudi oxadiazini povzročijo blokado Na⁺ kanalčkov na analogen način, kot tetrodotoksin, vendar se na kanalček vežejo na drugo mesto (Raymond-Delpech idr. 2005).

Organofosforni in karbamatni insekticidi inhibirajo acetilholinesterazo (AChE), encim, ki katalizira hidrolizo živčnega prenašalca acetilholin (ACh) (Fukuto 1990). Ker je AChE glavna sestavina večine sinaptičnih prenosov v žuželkah, lahko njeno zaviranje povzroči splošne motnje v delovanju vseh organskih sistemov (Desneux, Decourtye, in Delpuech 2007; Kreissl in Bicker 1989).

Fenitrothion (organofosfat) povzroči hipoglikemijo in zmanjšano ATPazno aktivnost (Bendahou, Fleche, in Bounias 1999). Tudi tu je predlagano sistemsko delovanje preko nevrohormonov.

Oksalat - nastanek kisikovih radikalov (predvsem v mitohondrijih), aktivacija PLA2, kar sproži kaskado lipidne signalizacije, posledica katere je hitra sprememba delovnja mitohondrijev (poskusi na celični kulturi ledvic psa (Cao idr. 2004). Prisotna tudi arahidonska ksl idr. maščobne kisline - pomembni igralci v imunskem odzivu.

Vpliv pesticidov na biokemijo žuželk

Metabolna odpornost žuželk na pesticide

Metabolna odpornost žuželk na pesticide je posledica delovanja treh večjih skupin encimov: P450 monooksigenaz, karboksilesteraz in glutation S-transferaz (GSTs).

P540 monooksigenaze lahko metabolizirajo številne substrate in katalizirajo več oksidativnih reakcij. Obstaja veliko različnih izooblik encimov P450, ki sodelujejo pri presnovi različnih substratov. Monooksigenaze žuželk imajo veliko funkcij, med drugim vplivajo na rast, razvoj, hranjenje in varovanje pred ksenobiotiki (snovi tujega izvora), vključno z odpornostjo na pesticide in toleranco do rastlinskih toksinov. Monooksigenaze žuželk metabolizirajo endogene snovi kot so juvenilni hormon, ekdisteroidi, feromoni ter njihovi analogi ter eksogene snovi kot so rastlinske alelokemikalije (snovi, ki jih rastlina sprošča v okolje), insekticidi in promutageni. Detoksifikacija s strani monooksigenaz P-450 je eden od pomembnejših mehanizmov za rezistenco žuželk na insekticide (Claudianos idr. 2006).

Glutation transferaze (GST) metabolizirajo insekticide s katalizo dehidrokloriranja ali s konjugacijo z reduciranim glutationom (Enayati, Ranson, in Hemingway 2005). Pri konjugaciji z reduciranim glutationom GST katalizira reakcijo konjugacije: ena molekula reduciranega glutationa in ena molekula drugega substrata se združita v tioester. Ta konjugacija ščiti celične komponente, še posebej DNK., nastanejo pa tudi vodotopni produkti, ki se lažje izločijo iz telesa.

Dehidrokloriranje je pomemben mehanizem za odstranjevanje toksičnosti DDT-ja. Po odstranitvi kloridnih atomov iz DDT-ja nastane manj toksičen DDE. Ostali organokloridni insekticidi npr. Lindan, se metabolizirajo s konjugacijo z reduciranim glutationom. Glutation transferaze so vključene tudi v znotrajcelični transport, biosintezo hormonov in zaščito pred oksidativnim stresom. Poleg tega sodelujejo pri odstranjevanju različnih strupenih kisikovih prostih radikalov, ki nastanejo zaradi delovanja pesticidov. Povišano aktivnost glutation transferaz povezujejo z rezistenco proti vsem skupinam insekticidov. Virusne okužbe modulirajo aktivnost GST, istočasno lahko

izpostavljenost pesticidom poveča ekspresijo teh encimov, kar kaže na možno stičišče za metabolno sinergijsko delovanje parazitov in pesticidov (Gui idr. 2009).

Esteraze metabolizirajo insekticide, ki vsebujejo esterske vezi, kot so piretroidi, karbamati, organofosfati in analogi juvenilnega hormona (Sogorb in Vilanova 2002). Esteraze delujejo tako, da hidrolizirajo estrske vezi. Dve glavni skupini esteraz, ki sodelujejo pri hidrolizi organofosfatov so fosfotriesteraze in karboksilesteraze.

Imunski sistem

Povezava na povzetek iz knjige [Nancy E. Beckage: Insect immunology](#)

Imunski sistem nevretenčarjev je preprost. Sestavljen je iz fagocitioznih celic, celic, ki so podobne naravnim ubijalkam (NK celicam), ter humoralne imunosti (molekule vnetnega odziva: citokini idr. informacijske molekule, protibakterijski proteini..), nimajo pa "učljiivega" imunskega sistema, ki ga pri vretenčarjih predstavljajo limfociti. Kljub relativni preprostosti se kompleksno odziva na motnje v notranji homeostazi, saj je podvržen živčni in hormonalni regulaciji, slednja pa je močno vezana na reproduktivni cikel nevretenčarjev in na prehranjenost.

Kemikalije iz okolja lahko na imunski sistem vplivajo neposredno kot inhibitorji encimov, ki omogočajo delovanje imunskih celic, kot modulatorji prenosa informacij znotraj imunskega sistema ali povzročajo oksidativno škodo imunskim celicam. Posredno lahko vplivajo na imunski sistem preko spremenjenega delovanja živčnega sistema ali preko kronično spremenjenega metabolizma (T. Galloway in Handy 2003). Pri tem lahko pride do močnejšega ali do oslabiljenega odziva imunskega sistema. Zato imunotoksičnost definirata kot negativni vpliv na imunski sistem ali njegove dele ne glede na to, ali je le ta zaznaven kot zmanjšanje odpornosti živali na patogene.

Raziskave na nevretenčarjih povzemata T. S. Galloway in Depledge (2001). V raziskavah so zastopane predvsem ekonomsko zanimive morske školjke, tunikati, polži, tudi raki, od kopenskih nevretenčarjev pa deževniki. Merjeni parametri so: število celomskih celic oz. število celic v hemolimfi, aktivnost serinskih proteaz, lizosomska aktivnost, citotoksična aktivnost NK- podobnih celic, fagocitoza, sinteza protibakterijskih peptidov, sinteza citotoksičnih proteinov, nastajanje prostih radikalov, kot tudi odziv na okužbe z bakterijami, opazovanje celjenja ran ali zavračanje tujih vsadkov.

Girón-Pérez (2010) povzemata vpliv onesnaženja na funkcije imunskega sistema pri školjkah. Različni viri onesnaženja povzročajo včasih nasprotujoče si spremembe v imunskem sistemu. Raziskani vpliv pesticidov se kaže v povečani smrtnosti hemocit in v zmanjšani fagocitozni aktivnosti ter zmanjšani produkciji protibakterijskih encimov pri preostalih hemocitah (Gagnaire idr. 2006, 2007, po Giron-Perez 2010).

Mehanizem imunotoksičnosti organofosfatnih pesticidov sta povzela T. Galloway in Handy (2003). Primarna tarča organofosfatov je encim acetilholin esteraza, ki spremeni delovanje živčnega sistema in posredno vpliva na imunski sistem. Prav tako so tarče organofosfatov serinske hidrolaze in različne esteraze. Organofosfati so reaktivne in labilne molekule, ki lahko direktno poškodujejo celične membrane, proteine ali DNK.

Aktivacija imunskega sistema je sama po sebi energetsko drag proces. Tudi če se imunski odziv sproži z za žival neškodljivimi agensi, lahko ob pomanjkanju hrane že sama aktivacija imunskega sistema povzroči močno povečano smrtnost - čmrlji (Moret in Schmid-Hempel 2000). Zunanji

paraziti delujejo zaviralno na imunski sistem. Pri čebele s hudo okužbo z varojami je pogosta močna okužba z DWV (deformed wing virus), ki je pri polovici varoznih čebel že simptomatsko prisotna z okvarjenimi krili. Druga polovica varoznih čebel je izredno dovzetna za nadaljne okužbe in ima znižano ekspresijo proteinov, ki sodelujejo v imunskem odzivu (Yang in Cox-Foster 2007).

Mehanizmi delovanja - čebele³

Splošno Mehanizmi delovanja - nevretenčarji

Dejavniki, ki vplivajo na toksičnost pesticidov na čebele

Čeprav v splošnem velja, da so medonosne čebele zelo občutljive na insekticide, so pri njih precejšnje razlike v toleranci do posameznih insekticidov (Johnson idr. 2006). Na primer širok spekter toksičnosti različnih piretroidnih spojin za čebele je še vedno v veliki meri nepojasnen, vendar gre verjetno za iste mehanizme, ki povzročajo odpornost škodljivcev na piretroide. Ti mehanizmi vključujejo različne vedenjske odgovore, stopnjo penetracije skozi kutikulo, občutljivost tarčnega mesta delovanja pesticida in / ali metabolno detoksifikacijo.

Gilbert in Wilkinson sta predlagala, da na občutljivost medonosne čebele na insekticide vpliva tudi njihova telesna zgradba. V delu prebavil, ki mu pravimo medna golša, ki služi za zbiranje zaužite medicne, primanjkuje mikrosomalnih oksidaz. Zato lahko skupaj s hrano zaužiti insekticidi prodrejo skozi stene prebavil v notranjost telesa, ne da bi prišli v stik z encimi za detoksifikacijo (Gilbert in Wilkinson 1974). Poleg tega odrasle čebele ne vsebujejo veliko maščob. Ker je za telesne maščobe znano, da igrajo pomembno vlogo pri razstrupljanju kot tudi pri privzemanju insekticidov, je lahko izredno nizek nivo maščobe delno odgovoren za visoko občutljivost čebel na insekticide (S.J. Yu, Robinson, in Nation 1984).

Trditve o posebni občutljivosti čebel so spodbudile avtorja Hardstone in Scott (2010) k sistematičnemu primerjanju razpoložljivih toksikoloških podatkov za 62 pesticidov. Ugotovila sta, da so čebele podobno občutljive na pesticide kot druge žuželke - na nekatere pesticide občutljivejše, na druge manj občutljive (glej članek v mapi *Poljske kemikalije*).

Vpliv pesticidov na biokemijo medonosne čebele (*Apis mellifera*)

Vpliv pesticidov na fiziologijo čebel so največkrat raziskovali preko ugotavljanja aktivnosti posameznih encimov v čebelah, bodisi po ali med izpostavljanjem pesticidom (Desneux, Decourtye, in Delpuech 2007). Gre za encime, ki so neposredno ali posredno povezani z biokemičnim mehanizmom delovanja posameznega pesticida.

Bendahou, Fleche, in Bounias (1999) navajajo vpliv cypermethrina (piretroid) in fenitrothiona (organofosfat) na presnovo sladkorjev. Injekcija obeh pesticidov sproži v čebeli znižanje nivoja krvnih sladkorjev (glukoze predvsem pri cypermethrinu, trehaloze pri obeh - v obeh primerih z različnim časovnim potekom (različen mehanizem?)), kar je lahko za čebelo nabiralko usodno. Sprememba je drugotne narave, saj do nje verjetno pride preko (pri obeh substancah) različnega vpliva na živčno signalizacijo, posledično spremenjeno delovanje nevrosekretornih celic in spremenjeno hormonsko regulacijo. Nasproten učinek imajo razgradnji produkti amitraza (Cascino idr. 1989).

Učinki pesticidov na čebele in encimi za detoksifikacijo

³ Mehanizmi delovanja pesticidov na čebel, predvsem centralni živčni sistem so še posebej predstavljeni v prispevku Gordane Glavan (priloga A)

Učinek pesticidov na čebele ugotavljajo tudi preko nivoja encimov za metabolno detoksifikacijo v čebeli (Johnson idr. 2006).

Podatki v literaturi v zvezi s sposobnostjo detoksifikacije pesticidov pri medonosni čebeli so pomanjkljivi in včasih celo nasprotujoči. Rezultati genske analize medonosne čebele *Apis mellifera* kažejo, da imajo le-te za približno polovico manj genskih zapisov za encime P450 monooksigenaze, karboksilesteraze in glutation S-transferaze, kot jih našli pri vrstah vinska mušica *Drosophila melanogaster* in komarju *Anopheles gambiae* (Claudianos idr. 2006). Ker so to najpomembnejši encimi za detoksifikacijo pesticidov, avtorji domnevajo, da je lahko njihova manjša pestrost vzrok za relativno veliko občutljivost medonosne čebele na insekticide. Po drugi strani pa je Yu s sodelavci pokazal, da je aktivnost encimov za detoksifikacijo, kot so glutation S-transferaze, esteraze, epoksid hidrolaze, DDT-dehidroklorinaze, v črevesju medonosne čebele na podobni ravni v primerjavi z ostalimi žuželkami, razen mikrosomalnega encima citokrom P-450, ki obstaja pretežno v neaktivni obliki P-250 (S.J. Yu, Robinson, in Nation 1984). Zato domnevajo, da kapaciteta detoksifikacije pri medonosni čebeli verjetno ni razlog za visoko občutljivost na insekticide.

Insekticidi povečujejo aktivnost različnih detoksifikacijskih encimov, vključno z mikrosomalnimi oksidazami, glutation S-transferazami, karboksil esterazami in DDT dehidroklorinazami (Terriere 1984; Simon J Yu in Hsu 1993; Hanson idr. 2002). Povečajo lahko tudi gensko ekspresijo detoksificirajočih encimov, npr. piretroid fluvalinat poveča ekspresijo določenih oblik citokrom P450 oksigenaz (Mao, Schuler, in Berenbaum 2011).

Po hranjenju čebel s subletalnimi odmerki različnih insekticidov v laboratorijskih pogojih, je samo piretroidni insekticid (akaricid) permetrin bistveno povečal aktivnost glutathione S-transferaze v medonosni čebeli, na druge pomembne encime pa ni imel učinka (S.J. Yu, Robinson, in Nation 1984). Ker je ta transferaza pomembna za razstrupljanje organofosfornih insekticidov, bi povečanje aktivnosti tega encima pri čebelah v naravnem okolju lahko izboljšalo preživetje čebel. Po drugi strani pa so ugotovili, da izpostavljenost čebel subletalnim odmerkom organofosfatnega insekticida malationa zavira aktivnost esteraz v črevesju čebel, kar lahko povzroči da so čebele bolj dovzetne do nekaterih insekticidov. To se predvsem tisti, ki vsebujejo esterske vezi, kot so piretroidi, organofosfati in analogi juvenilnega hormona in jih esteraze lahko hidrolizirajo. Insekticidi metoksiklor, karbaril in diflubenzuron v subletalnih odmerkih niso imeli nobenega vpliva na aktivnost omenjenih encimov. Relativno slaba odzivnost detoksifikacijskih encimov na insekticide bi lahko bil eden izmed razlogov za večjo občutljivost medonosne čebele na insekticide, res pa je, da vseh insekticidov niso testirali. Čeprav v splošnem velja, da so medonosne čebele zelo občutljive na insekticide, so precejšnje razlike v toleranci do posameznih piretroidnih insekticidov

Piretroidi, kot so ciflutrin in lambda-cihalotrin, so zelo strupeni za čebele, toksičnost tau - fluvalinata pa je dovolj nizka, da upravičuje njeno uporabo za nadzor parazitske pršice. Zakaj pride do teh razlik so preverili na nivoju encimov za detoksifikacijo (Johnson idr. 2006). Znano je, da encimi iz vseh treh pomembnih skupin encimov za detoksifikacijo, citokrom P450 monooksigenaze, karboksilesteraze ali glutation S-transferaze, razgrajujejo piretroidne insekticide. V raziskavi so uporabili inhibitor encimov citokrom P450 monooksigenaz piperonilbutoksid (PBO), inhibitor encimov karboksilesteraz *S,S,S*-tributilfosforotritioat (DEF) in inhibitor encimov glutation S-transferaz dietil maleat (DEM). Preverili so vpliv omenjenih inhibitorjev na toksičnost treh piretroidnih insekticidov ciflutrin, lambda-cihalotrin in tau - fluvalinata na medonosno čebelo z uporabo testa LD50. Ugotovili so, da pretretiranje čebel z inhibitorjem encimov citokrom P450 monooksigenaz piperonilbutoksidom (PBO) močno poveča toksičnost vseh treh piretroidnih insekticidov, medtem ko sta imela ostala dva inhibitorja DEF in DEM manjši učinek na toksičnost omenjenih insekticidov. PBO je izjemno povečal toksičnost tau - fluvalinata, kar kaže na čebele tolerirajo tau - fluvalinat zaradi močne sposobnosti detoksifikacije s pomočjo encimov citokrom

P450 monoooksigenaz. Raziskava je vsekakor pokazala, da so najpombnejši encimi za detoksifikacijo piretroidnih insekticidov v medonosni čebeli citokrom P450 monoooksigenaze. Pomembnost citokrom P450 monoooksigenaz za detoksifikacijo piretroidnega insekticida lambda-cihalotrina v čebelah so pokazali tudi preko uporabe inhibitorja mikrosomalnih monoooksigenaz P-450 fungicida proklaza ter analize metabolitov lambda-cihalotrina (Edward D Pilling idr. 1995).

Iwasa idr. (2004) ugotavlja, da so neonikotinoidni insekticidi z nitro skupino (npr. imidacloprid) za čebele bistveno bolj strupeni kot tisti s ciano skupino (npr. acetamiprid ali thiacloprid). Strupenost slednjih se močno poveča ob dodatku inhibitorjev P-450 oksidaz, kar kaže na to, da relativno neobčutljivost čebel nanje posledica oksidativne detoksifikacije s pomočjo P-450 oksidaz. Inhibitorji esteraz in glutation transferaz nimajo opaznega vpliva na strupenost neonikotinoidnih insekticidov, zato je vloga teh encimov pri detoksifikaciji neonikotinoidnih insekticidov manj verjetna.

Vpliv pesticidov na fiziološke funkcije čebele

Pogosto so ciljno mesto pesticidov vzdružna tkiva žuželk, kjer se vežejo na [receptorske beljakovine](#), [ionske kanalčke](#) ali motijo delovanje encima acetyl-holin esteraza.

Patch-clamp meritve disociiranih nevronov iz možgan odrasle čebele delavke so pokazale manjše Na⁺ tokove in znižanje vzdružnosti celic po uporabi piretroidnih insekticidov fluvalinata, deltametrina ali bifentrina. Matice, ki so jedle bifentrin, so zalegale neurejeno in po več jajčec v isto celico (Zhou idr. 2011).

Papaefthimiou in Theophilidis (2001) predlagata sočasno delovanje piretroidnega insekticida deltametrina na treh mestih: 1. vpliva na sproščanje oktopamina iz živčnih končičev (preko Ca²⁺ kanalčkov??), 2. odpre natrijeve kanalčke, 3. blokira presledkovne stike (gap junctions). Ob aplikaciji deltametrina (0,01 - 1 uM) na in vitro preparat srca čebele so zaznali tri časovno ločene spremembe v ritmu in zmanjšano moč kontrakcije. Velikost vseh sprememb je bila odvisna od doze deltametrina.

Spremembe v frekvenci bitja srca:

1. Frekvenco bitja srca se je takoj povečala. To bi bilo lahko posledica sprostitve oktopamina iz sinaptičnih končičev, ki oživčujejo srce čebele.
2. Znotrajcelični potencial miokardialnih celic se po nekaj minutah zmanjša z -55 mV na -40 mV, kar sovpada z dodatnim povečanjem frekvence srčne aktivnosti. Povečano depolarizacijo membrane pripisujejo povečani prepustnosti za Na⁺ ione. Deltametrin naj bi učinkoval na manjšo skupino natrijevih kanalčkov, ki jih potem vzdržuje v spremenjenem odprtem stanju.
3. Po približno 5 minutah se frekvenca za 10 do 15 minut zniža, nakar se pojavijo aritmije, ki so lahko posledica slabega prenašanja signalov zaradi blokade presledkovnih stikov. Učinek je odvisen od doze. Frekvenca srca se skoraj normalizira, če deltametrin speremo s preparata.

Prvo predlagano tarčno mesto za deltametrin so tako Na kanalčki. Drugo predlagano tarčno mesto deltametrina so od Ca odvisni proteini, ki v sinapsah sodelujejo prenašanju signalov, tretje GABA receptorji. (ni podatkov za čebelo, v diskusiji kot možna dodatna tarča, reference na lignje in vretenčarske preparate). Četrto predlagano mesto so presledkovni stiki.

Moč srčnih kontrakcij čebel se po zastrupitvi z deltametrinom za kratek čas poveča, potem pa

ireverzibilno zniža. Povečanje moči srčnih kontrakcij lahko pojasnimo z vplivom oktopamina, medtem ko blokada presledkovnih stikov lahko povzroči asinhrono krčenje miokardialnih vlaken in šibkejše delovanje srca.

Učinek azolnega fungicida prochloraz na delovanje srca je še močnejši. Moč srčnih kontrakcij se ireverzibilno zmanjša, frekvenca srčnih utripov se močno zmanjša, ob odstranitvi prochloraza ponovno nekoliko poveča, vendar ostane neenakomerna. Takšen učinek na in vitro preparat čebeljega srca pripišejo blokadi komunikacije med miokardialnimi celicami preko presledkovnih stikov. Isto tarčno mesto deltametrina in prochloraza pojasnjuje tudi močno sinergistično delovanje obeh substanc na in vitro preparat čebeljega srca.

Velika toksičnost prochloraza za ta preparat se ne sklada z majhno toksičnostjo za cel organizem. Očitno zadostne količine kemikalije v normalnih razmerah ne dosežejo srčne mišice.

2,4 - dichlorophenoxyacetilna kislina (2,4 D = sintetični avksin; herbicid) prav tako zmanjša frekvenco bitja srca in moč krčenja mišičnih vlaken, ter vpliva na sinhronizacijo aktivnosti srčnih vlaken. Predlaganih mehanizmov delovanja pri različnih organizmih: motnje ionskega transporta, celičnega dihanja in metabolizma, ter spremenjeno strukturo celičnih membran. Papaefthimiou idr. (2002) poleg tega, predlagajo tudi vpliv na presledkovne stike.

Histološke spremembe pod vplivi pesticidov

Delovanje pesticidov lahko zaznamo s pomočjo imunohistoloških tehnik.

Tako insekticidi in akaricidi (fluvalinat, imidacloprid, kumafos, klorpirifos, amitraz, oksalna in mravljična kislina ter rotenon), kot tudi fungicidi (myclobutanil, chlorothalonil) in herbicidi (simazine, glyphosate), povzročijo povečano celično smrt celic v hitro obnavljajočih se tkivih čebeljih ličink - v srednjem črevesu, jajčnikih in hipofaringealnih žlezah (A Gregorc in Bowen 2000; Aleš Gregorc, Pogacnik, in Bowen 2004; Aleš Gregorc in Smodiš Škerl 2007; Ales Gregorc in Ellis 2011).

Z metodo histokemijskega citokrom-oksidadnega barvanja, ki se uporablja za ugotavljanje aktivnosti posameznih regij centralnega živčnega sistema, so uporabili za študijo vpliva nikotinoida imidakloprida na možgansko aktivnost medonosne čebele (Armengaud idr. 2000). Ugotovili so, da visoka koncentracija imidakloprida aktivira določene predele možganov čebele, za katere je znano, da vsebujejo nikotinske receptorje.

Acetilholin ter acetilholin esteraza pri čebelah ter kemikalije, ki nanjo delujejo

Acetilholinesteraza (AChE) je pomemben encim, odgovoren za hitro hidrolizo acetilholina v holinergičnih sinapsah, kar omogoča natančen nadzor in moduliranje sinaptičnega prenosa. Večina AChE pri čebelah je prisotna v glavi je predvsem v sestavljenem očesu in očescih (Karl Kral 1980; K. Kral in Schneider 1981). Čebelja AChE, kot pri drugih žuželkah, se pojavlja v dveh ločenih molekularnih oblikah, hidrofilni in amfifilni, ki predstavljata 3-6 % oziroma 94-97 % celotne možganske aktivnosti AChE. Pogostejša amfifilna oblika je pripeta na celično membrano preko glikofosfatidilinozitol, na katerega deluje fosfatidilinozitol specifična fosfolipaza C in tako amfifilno AChE spremeni v topno, hidrofilno obliko (L P Belzunces, Toutant, in Bounias 1988).

Acetilholin (ACh) je nevrottransmitter, ki je prisoten v večjem delu možgan čebel *Apis mellifera*. Poskusi acetilholinesteraznega histokemičnega barvanja so pokazali, da se encim AChE nahaja v različnih regijah možganov vključno z optičnimi lobusi, antenalnimi lobuli, interhemisfernimi povezavami, alfa - lobuli in kaliksi gobastih teles (Kreissl in Bicker 1989).

Biokemijska identifikacija nikotinskih holinergičnih receptorjev (nAChR) opravljenih na homogenatu možgan čebele kaže na visoko afiniteto vezave antagonista nikotinskih receptorjev bungarotoksina (BTX) (Zhi-Yong Huang in Knowles 1990). Vezavne študije z BTX in

imunocitokemijske študije so pokazale lokalizacijo nAChRs in AChE v istih možganskih regijah (Kreissl in Bicker 1989; Scheidler idr. 1990). Injekcije antagonista nikotinskih receptorjev mekamilamina v možgane čebel so pokazale, da je holinergični sistem vključen v spominske procese pri čebelah. Injekcije povzročijo različne vedenjske učinke, ki so odvisne od mesta injiciranja (Cano Lozano et al., 1996, 2001). Vbrizganje mekamilamina v kaliks gobastih teles je povzročilo močno oslabitev sposobnosti vohalnega učenja. Po injiciranju omenjenega antagonista v alfa - lobul gobastih teles je prišlo do motenj priklica vohalnega spomina, kar kaže vpletenost nAChR v nastanek in priklic spomina (V. C. Lozano idr. 1996; V. Lozano, Armengaud, in Gauthier 2001). Poleg tega je nikotinski holinergični sistem vključen tudi v proces habituacije pri refleksu iztegovanja jezička (proboscis refleks) pri čebelah (David Guez idr. 2001; D. Guez, Belzunces, in Maleszka 2003).

Ugotovili so, da aktivnost AchE ne zmanjšujejo samo organofosfatni ter karbamatni insekticidi, ki neposredno inhibirajo AchE, ampak posredno tudi piretroidi.

Pokazali so, da piretroid deltametrin posredno zmanjšuje membransko obliko in poveča topno obliko AchE pri čebelah, saj ima omenjeni učinek le *in vivo*, *in vitro* pa tega učinka nima (Badiou, Meled, in Belzunces 2008). Znano je, da piretroidi modulirajo signalne poti (Rossignol 1991), med drugim se lahko vežejo na podenote G proteinov in uravnavajo njihovo interakcijo z drugimi podenotami istih G proteinov. Pri čebelah *Apis mellifera* je AChE zasidrana v membrano preko glikozil fosfatidilinozitol (GPI), ki pa je občutljiva na delovanje od glikozil fosfatidilinozitol specifične fosfolipaze C (GPI – PLC), ki pretvarja membranski encim v hidrofilnega (Luc P. Belzunces idr. 1990). Domnevajo, da deltametrin vpliva na razmerje topna/membranska oblika AchE z neposrednim vplivom na znotrajcelične signalne poti (Badiou, Meled, in Belzunces 2008).

Za deltametrin so ugotovili, da neposredno spodbuja aktivnost protein kinazne C / fosfoinozidne znotrajcelične signalne poti pri podgani pri zelo nizkih koncentracijah. To povzroči povečanje znotrajcelične koncentracije inozitol 1,4,5 -trifosfata (IP3) ter kalcija, kakor tudi povečanje splošne in specifične proteinske fosforilacije v sinapsah (Enan in Matsumura 1993).

Deltametrin pri miškah povzroča tudi povečanje sproščanja neurotransmiterjev, kot je dopamin, skupaj s povečanim intrasinaptosomalnim kalcijem in povečano fosforilacijo proteinov (Kirby, Castagnoli, in Bloomquist 1999). Vse te ugotovitve nakazujejo, da so beljakovine, ki vplivajo na sinaptičen prenos ter so uravnavane s kalcijem, glavni cilji delovanja piretroidov tipa II (Enan in Matsumura 1993).

Sinergizem pri čebelah

SINERGIEM MED PESTICIDI

Uspeli smo najti le 17 primarnih člankov o sinergističnih vplivih pri medonosni čebeli na zelo različnih pesticidih in izvedb poskusov. Pestra narava znanstvenih prispevkov je tako onemogočila statistično izvedbo meta-analize, zato so poskusi podani opisno in med seboj primerjani predvsem glede možnih mehanizmov. Nekaj zgodnjih referenc (od 1929 dalje), ki opredeljujejo sinergistično delovanje pesticidov, je navedenih v članku Colin in Belzunces (1992).

Učinkovitost pesticidov ob hkratnem delovanju se lahko večkratno poveča, kadar dva različna pesticida razgrajujejo isti encimi. Opisan je bil tudi navidezni sinergizem med pyperonil butoxidom in piretroidnimi insekticidi, ko ena snov vpliva na uspešnost vnosa toksične snovi v organizem, ter ne na njeno učinkovitost znotraj organizma. Druga možnost sinergističnega delovanja je, da dva različna pesticida v organizmu delujeta na isto tarčno mesto na drugačen način.

Na možno sinergistično delovanje insekticidov in fungicidov v koncentracijah, ki se uporabljajo na poljščinah kot cisternske mešanice, opozarja nemško poročilo iz leta 1985 (Kuhn, Reinhilde 1985), ki ugotavlja močno povečano toksičnost in znatno smrtnost čebel v vseh preizkušeni kombinacijah.

V svoji disertaciji Chaney ni ugotovil sinergizma med permethrinom in fluvalinatom {(Chaney 1988), medtem ko so Ellis, Siegfried, in Spawn (1997) pokazali znižano LD50 pri kombinaciji fluvalinata in sintetičnega piretroidnega insekticida bifentrina (faktor 2), medtem ko povečanje smrtnosti ob sočasni uporabi fluvalinata in carbarila ali fluvalinata in metil parathiona ni bilo statistično značilno. Možno dolgotrajno sinergistično delovanje opisujejo tudi avtorji, ki raziskujejo prisotnost ostankov tako panjskih kot poljskih pesticidov v satju in njihov negativni vpliv na razvoj čebel ter njihovo življenjsko dobo (Wu, Anelli, in Sheppard 2011).

Največ poročil o sinergizmu pri čebelah pripisujejo preobremenjenosti detoksifikacijskih encimov citokrom P-450 monooksigenaznega sistema.

Sinergizmi med različnimi pesticidi lahko pri čebelah potekajo preko inhibicije encimov za detoksifikacijo. Tak sinergizem so ugotovili za imidazolni fungicid prokloraz, za katerega je znano, da inhibira encime P-450, in povečuje toksičnost piretroidnega insekticida lambda-cihalotrina (Edward D Pilling idr. 1995). V študiji so uporabili *in vitro* preparate čebeljega črevesja, ki so ga inkubirali z radioaktivno označenim piretroidom lambda-cihalotrinom. Analiza je pokazala, da je iz lambda-cihalotrina nastal prevsem metabolni produkt, ki nastane po delovanju mikrosomalnih monooksigenaz P-450. Po tretiranju čebeljega s fungicidom proklorazom so ugotovili, da je iz lambda-cihalotrina nastal predvsem metabolit, ki ne nastaja zaradi delovanja mikrosomalnih monooksigenaz P-450. Sklepali so, da prokloraz inhibira encime monooksigenaze P-450. Z *in vivo* poskusi na čebelah pa so pokazali odsotnost pričakovanih metabolitov lambda-cihalotrina v izločkih čebel, če so čebelam dajali prokloraz. Tako so dokazali, da prokloraz z inhibicijo encimov monooksigenaz P-450 podaljša metabolizem, detoksifikacijo ter izločanje lambda-cihalotrina ter tako poveča toksičnost piretroidov v čebelah.

Izmerjeni podatki kot modelski izračuni kažejo, da verjetno obstaja interakcija sinergistov tudi na drugem nivoju.

1. Za 75% povečano smrtnost čebel ob sočasni uporabi drugače subletalnih koncentracij fungicida prochloraz in piretroidnega insekticid deltametrina opišeta Colin in Belzunces (1992). V kolikor škropijo z eno substanco pred drugo, je smrtnost v primerjavi s posamično substanco povečana, vendar bistveno manjša kot ob sočasni uporabi. Podatki ne podpirajo

- predpostavke, da je glavni vzrok za sinergizem oviran metabolizem deltametrina.
2. Na podlagi modela izračunajo, da teorija o zaviralnem delovanju prokloraza na metabolizem deltametrina ne pojasni eksperimentalno izmerjenih podatkov o smrtnosti čebel (Chalvet-Monfray idr. 1996).
 3. Imidazolni fungicid prokloraz zavre metabolizem, detoksifikacijo in ekskrecijo piretroidnega insekticida lambda cihalotrin tako, da inhibira "mikrosomalno oksidacijo" (Edward D Pilling idr. 1995). Drugi preiskušeni azolni fungicidi so izkazali manjši sinergistični učinek (E. D Pilling 1992).
 4. Sintetični piretroidni akaricid [tau-fluvalinat](#) deluje močno sinergijo z inhibitorjem P-450 oksidaze PBO, medtem ko blokada esteraz ali glutation S-transferaz ne poveča njegove strupenosti. Iz tega sklepajo, da je nizka strupenost tau-fluvalinata odvisna od P-450 oksidazne detoksifikacije (Johnson idr. 2006).
 5. Za čebele, ki so bile predhodno izpostavljene organofosfatnemu insekticidu [kumafos](#), je [tau-fluvalinat](#) 2.1x - 32x bolj toksičen. Če so predhodno izpostavljene fluvalinatu, je kumafos 3 - 4x bolj toksičen (Johnson, Pollock, in Berenbaum 2009). Ker je toksičnost fluvalinata odvisna od aktivnosti P-450 oksidaz, sklepajo, da le te sodelujejo tudi pri detoksifikaciji kumafosa.
 6. [Tau-fluvalinat](#) razgrajujejo encimi iz družine CYP9Q citokrom P450 oksigenaz. [Kumafos](#) se veže v isti katalitični žep, čeprav na nekoliko drugo mesto (Mao, Schuler, in Berenbaum 2011). Fluvalinat lahko tudi spodbudi ekspresijo ene izmed oblik encima CYP9Q. Takšna sprememba ekspresije encimov iz skupine P450 oksigenaz je bila opisana pri več žuželkah, ki so razvile odpornost na piretroidne insekticide. Posebno pri polinatorjih je to naravni odgovor organizma na aktivne snovi rastlin, ki jih oprašujejo, in so po zgradbi lahko podobne insekticidom.

Analiza skupne količine ostankov kumafosa in fluvalinata v vosku satov mrtvih in še živih družin, je pokazala, da je imelo le 3,5% živih družin skupno koncentracijo večjo od 3500 ppb, medtem ko je bilo tako močno onesnaženih 40% satov odmrlih družin (Wu 2010). Ta raziskava kvalificira sinergistično delovanje panjskih pesticidov, ki preobremenijo sistem detoksifikacije, kot enega možnih pomembnih vzrokov za propad čebeljih družin.

Raziskava strupenosti večjega števila neonikotinoidnih insekticidov (acetamiprid, thiacloprid s ciano skupino in imidacloprid, nitenpyram clothianidin, dinotefuran ter thiamethoxam z nitro skupino) je pokazala večjo strupenost neonikotinoidov z nitro skupino. Vendar se strupenost neonikotinoidi s ciano skupino izredno poveča ob dodatku azolnih fungicidov in PBO, ki inhibira P-450 oksidazo. Iz tega sklepajo, da je oksidacija s pomočjo encimov citokrom P-450 oksidaz pomembna za proces detoksifikacije neonikotinoidov s ciano skupino (Iwasa idr. 2004) {}.

Z detoksifikacijo so povezani tudi membranski transportni proteini. Omogočajo prehajanje pesticidov čez celične membrane s pomočjo ATP. ABC transporterji so najbolj raziskana skupina takšnih molekul in so udeleženi v izločanje kumafosa, tau-fluvalinata in treh različnih neonikotinoidnih pesticidov (imidakloprida, acetamiprida in thiacloprida). Toksičnost vseh se poveča ob blokadi transportnih molekul z zdravilom verpamil, toksičnost kumafosa in tau-fluvalinata pa tudi ob aplikaciji antibiotika oksitetraciklina, ki se v ZDA uporablja za zdravljenje čebel (Hawthorne in Dively 2011).

Ob sočasni uporabi fungicidov procloraza in difenokonazola drugače neučinkovite koncentracije piretroidnega insekticida deltametrina močno zmanjšajo zmožnost čebel, da uravnavajo telesno temperaturo (Vandame in Belzunces 1998). Avtorja domnevata, da je pri tem bistven proces na nivoju možgan, manj verjetno pa motnja na nivoju koordinacije letalnega mišičja.

Tudi raziskava učinka piretroidnega insekticida deltamethrina in azolnega fungicida prochloraz na delovanje izoliranega srca čebele (*in vitro*), je pokazala sinergistično delovanje obeh substanc. Toksičnost deltamethrina se ob prisotnosti prochloraza poveča več kot 100x, medtem ko se toksičnost prochloraza ob prisotnosti deltamethrina poveča 10x. Avtorji kot možen mehanizem sinergističnega delovanja utemeljujejo blokado presledkovnih stikov v srcu (Papaeftimiou in Theophilidis 2001), saj so bili prav ti dokazano tarčno mesto obeh substanc pri različnih živalih in na različnih preparatih. Presledkovni stiki so ključni za sinhronizacijo električne aktivnosti srca, tako pri žuželkah kot tudi pri vretenčarjih⁴.

Sinergizem med pesticidi in boleznimi oziroma paraziti

Pesticidi povečajo občutljivost čebel za infekcije s paraziti. Možna je tako večja občutljivost okuženih čebel za pesticide, kot tudi povečana dovzetnost pesticidom izpostavljenih čebel za infekcije.

Drescher in Schneider (1988) sta raziskovala vpliv zajedanja pršice varoje na maščobno telesce, ter sinergistični vpliv varoje in Thiodana (endosulfan), varoje in Perizina (kumafos) ter varoje in obeh pesticidov skupaj. Zimske čebele, ki jih v času preobrazbe zajedajo pršice, imajo ob izleganju manjše celice v maščobnem telesu in v njih je manj proteinskih zrn. Kot odrasle čebele so bolj občutljive na Thiodan, medtem ko Perezin v preiskušani koncentraciji ni prispeval k povišani smrtnosti niti v kontrolni niti v poskusni (zajedani) skupini. Sočasna aplikacija obeh pesticidov je dodatno povečala smrtnost v obeh skupinah. Poskus potrjuje navedbe Wahl in Ulm (1983), ki sta raziskovala vpliv podhranjenosti na občutljivost na pesticide.

Čebele, ki so okužene z virusom CPV (chronic paralysis virus), so bolj občutljive na sintetični piretroid cypermethrin (LD_{50} 0,06 ug/č CPV okužene čebele kronično proti 0,21 akutno - neokužene čebele) (Bendahou, Bounias, in Fleche 1997). CPV je za čebele problematičen v zgodnjem poletju, ko se zmanjša vsebnost lipidov v čebelah, spremeni se sestava celičnih membran in virusi lažje prodrejo iz črevesja v hemolimfo ter do centralnega živčnega sistema. Avtorji postavijo hipotezo, da cypermethrin dodatno poveča prehodnost membran in tako ojača učinek okužbe. Istočasno piretroidi suprimirajo imunski odziv, saj zmanjšajo koncentracijo lizosomov in zmožnost fagocitoze.

Čebele, ki so okužene z Nosemo- znotrajceličnim praživalskim parazitom - pomrejo pri nižjih koncentracijah pesticidov DDT ali organofosfata trichlorfon (Ladas 1972). Okužene čebele so podvržene energetskemu stresu in potrebujejo več hrane (Mayack in Naug 2009). Učinek se še poveča, če so iztočasno izpostavljene pesticidom neonikotinskemu insekticidu imidaklopridu (Alaux idr. 2010), tiaclopridu (Vidau idr. 2011) ali fenilpirazolnemu insekticidu fipronilu (Aufauvre idr. 2012). V kombinaciji nosestavost in subletalne količine pesticidov povečujejo smrtnost čebel, ne glede na to, kateremu stresorju so izpostavljene najprej. Pri relativno blagi nosestavosti in izpostavljenosti kumafosu van Buren idr. (1992) niso zaznali sinergijskega delovanja.

Jeffery S Pettis idr. (2012) so za več tednov čebelje družine izpostavili subletalnim količinam imidakloprida. Zalega iz teh družin je v laboratoriju v veliko večjem obsegu zbolela za nosestavostjo, kot kontrolne čebele. Vendar na terenu v izvornih družinah izpostavljene družine niso postale bolj okužene. V terenskem poskusu so Wu idr. (2012) zaznali večjo nosestavost čebel, ki so se razvijale v satju z več pesticidnimi ostanki. Dodatna inokulacija s sporami noseme ni imela

⁴ Več o raziskavah na srcu glej zgoraj v »Vpliv pesticidov na fiziološke funkcije čebele«

vpliva na razširjenost nose mavosti. Nose mavost tako odslikava zdravstveno kondicijo čebel.

Kot možen mehanizem povečane smrtnosti čebel, ki so izpostavljene pesticidom in okužbi z Nosemo, so Alaux idr. (2010) Alaux raziskovali vpliv nose mavosti na stanje imunskega sistema. Število hemocit se ni razlikovalo med različnimi skupinami, iz česar sklepajo, da niti imidakloprid, niti nose mavost, niti oboje skupaj niso prizadeli celične imunosti čebel. (V preglednem članku Holmstrup idr. (2010) je imidakloprid omenjen v skupini redkih pesticidov, ki ne prizadanejo imunskega sistema.) Tudi aktivnost encima fenoloksidaza, ki je ključni encim v nevretenčarskem imunskem odgovoru, je ostala nespremenjena. Spremenila se je aktivnost encima oksidaza glukoze. Ta encim iz podžrelnih žlez pripravlja peroksid iz glukoze, s katerim čebele razkužujejo hrano za ličinke in med, kar prispeva k sterilizaciji hrane za družino in preprečuje širjenje bolezni na nivoju družine.

VPLIV OKOLJA NA OBČUTLJIVOST NA PESTICIDE

Holmstrup idr. (2010) (obsežen pregledni članek v mapi *Drugo*), ki obravnava sinergizme med naravnimi stresorji (vročina, mraz, suša, pomanjkanje kisika, LAKOTA, OKUŽBE) in kemikalijami, vendar ne omenja čebel. Posebej za čebele relevantni podpoglavji LAKOTA in OKUŽBE navaja kot izredno slabo raziskani. Vpliv na imunski sistem je prisoten zelo pogosto. Iz istega evropskega projekta NoMiracle izhaja tudi meta analiza podatkov iz 61 raziskav o vplivu okoljskih faktorjev na toksičnost različnih polutantov, ter na njihov medsebojni vpliv (Holmstrup idr. 2010). Približno v vsakem drugem primeru zunanji parametri vplivajo na toksični učinek na organizme.

Wahl in Ulm (1983) opisujeta vpliv okolja, kvalitete hrane in prehranjenosti, starosti in sezone na občutljivost čebel na pesticide. Izbrala sta pesticide, tako herbicide kot fungicide in insekticide, ki so deklarirani kot neproblematični za čebele, in preverjala smrtnost v različnih skupinah, kot tudi LD₅₀ v posamičnih primerih. Ugotovita, da:

- količina in kvaliteta peloda, ki ga čebela zaužije v prvih dneh po izleganju vpliva na življenjsko dobo in na občutljivost na pesticide;
- občutljivost čebel je največja v zgodnji pomladi in se kasneje v letu zmanjšuje;
- občutljivost mladih čebel je večja, kot občutljivost starejših čebel;
- na občutljivost vpliva fiziološko stanje čebele, ki je odvisno od razmer v bivališču (prisotnost zalege...).

Ugotavljata, da kvalitetna preskrba s proteini v zgodnji odrasli dobi zmanjša občutljivost na pesticide. Pesticidi, ki v priporočenih odmerkih običajno ne povzročajo povečane smrtnosti čebel, so lahko pri slabše prehranjenih čebelah vzrok pomorov (npr. možnost pri fungicidu Cupravit, ter pri insekticidu Thiodan 35). Posebej skrbni bi morali biti pri spomladanskem tretiranju polj, saj so takrat čebele najbolj občutljive.

Medrzycki idr. (2010) so ugotavljali vpliv temperature na občutljivost čebel na organofosfatni pesticid dimethoat. Ličinke se pri nižji temperaturi razvijejo na videz normalno. Če jih izpostavijo dimethoatu, le ta nanje deluje počasneje, LD₅₀ za podhlajene ličinke je 28x višji. Iz podhlajenih ličink se izleže enako število odraslih čebel, kot iz ličink, ki so gojene ob normalni temperaturi 34,5 st. C. Vendar so te odrasle čebele nevitale in imajo izrazito skrajšano življenjsko dobo. Zelo so dovzetne za zastrupitev z dimethoatom. Drugi avtorji so ugotavljali negativni učinek nižje temperature tekom razvoja na razvoj v bubi, ples čebel, spomin in učenje.

Sinergistični in kumulativni učinki kemikalij na žuželke v patentnih bazah

Raziskava je bila narejena s pomočjo WIPO baze in orodjem PatentScope (<http://patentscope.wipo.int/search/en>). Pri preizkušanju gesel za iskanje, se je najbolje obnesla kombinacija besed »sinergistic effect insect« na osnovni strani patenta, v povzetku in trditvah. Z izločitvijo besede »effect« smo dobili še nekaj relevantnih zadetkov. Med zbranimi 288 zadetki od leta 2081 do danes smo identificirali 138 relevantnih patentov, med njimi smo posebej analizirali 73 patentov, ki se nanašajo na žuželke in 4 kot primer, ki se nanašajo samo na glive. Dodatne podrobnosti o aktivnih snoveh smo najprej preverjali na:

http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=activesubstance.selection&a=1
(EU baza),

nato pa relevantnost za Slovenijo na:

<http://spletni2.furs.gov.si/FFS/REGSR/index.htm>

Dodatno smo si pomagali glede zgradbe in delovanja kemikalij s:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>

in <http://www.alanwood.net/pesticides/>.

Splošne informacije smo iskali tudi s splošnim iskalnikom (Google).

Rezultati pregleda patentov:

Večina patentov je pri svetovnem patentnem uradu PCT (126), velik del še pri evropske m uradu (EPO, 78). Večino patentov ima v lasti BASF (78, +16 povezane družbe), na drugem mestu je Bayer Cropscience z 18 patenti.

V začetni fazi so bili patenti povezani s kombinacijami s piperonil butoksidom (PBO), kasneje še snovi s podobnim delovanjem, postopoma pa kombinacije različnih pesticidov, ki se medsebojno dopolnjujejo, oziroma povečujejo učinkovitost. Veliko je kombinacij, ki vključujejo različne fungicide in različne insekticide. Kot primeri delovanja so najpogosteje navedeni neonicotinoidi ali drugi insekticidi, ki delujejo na AChH sistem. V patentih smo posebej iskali največji sporočen sinergistični učinek, ki je imel v testu več kot 50% učinek. Poročanja učinkovitosti niso povsem dosledna in nekatere tabele nakazujejo celo na grobo oceno in ne na izmerjene vrednosti. Opaziti je, da pri vlaganju patentov ne sledijo priporočilom o testiranjih, ampak bolj utečeni praksi preverjanja obstoja sinergističnih učinkov. Večinoma sinergizem računajo po Colby {1967}. Formula je postavljena na predpostavki da drugo sredstvo deluje na preživelem deležu in tako doda k celoviti učinkovitosti. Pričakovan skupen učinek je tako: $X+Y - X*Y/100$ (vrednosti izražene v %). Niso redki primeri, ko posamične snovi v preizkušanih koncentracijah nimajo smrtnega učinka, ob mešanju pa propade več kot 50% osebkov. Povečanje smrtnosti pri sinergijskem delovanju smo zabeležili kot faktor povečanja glede na izračunano učinkovitost. V kolikor je bila izračunana učinkovitost 0%, smo za sinergistični učinek v tabeli navedli faktor 99 (matematično neskončno povečanje).

V literaturi sicer pogosto navajajo povečanje učinkovanja insekticida kot razmerje med koncentracijo brez sinergizma in koncentracijo s sinergizma ob primerljivi učinkovitosti. Tudi tu ni prave doslednosti. Za jasnejšo razlago bi potrebovali širše testiranje različnih koncentracij snovi, ki lahko delujejo sinergistično. Seveda tudi ni vseeno kateri je tarčni organizem. Pri nekaterih pride sinergizem bolj do izraza kot pri drugih. Največji učinki so zabeleženi za listne uši. Izumitelji v patentih ne podajajo morebitnega sinergijskega učinka na netarčne organizme kot je medonosna čebela.

Tabela 1: PatentScope analiza za področje A01N (fitofarmacevtska sredstva):

Countries		Date	No
Name	No		
PCT	126	2002	14
European Patent Office	78	2003	6
Mexico	17	2004	4
Republic of Korea	15	2005	3
Israel	13	2006	11
South Africa	11	2007	16
Russian Federation	3	2008	34
ARIPO	1	2009	28
Japan	1	2010	26
Kenya	1	2011	18
		2012	13

Main Applicant		No
Name		
BASF SE		76
BA YER CROPS SCIENCE AG		18
SYNGENTA PARTICIPATIONS AG		10
THE DOW CHEMICAL COMPANY		6
JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.		6
BASF AKTIENGESELLSCHAFT		6
BASF CORPORATION		5
BASF Aktiengesellschaft		5
COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIA		4
AMERICAN CYANAMID COMPANY		4

Podatki iz patentov nas opozarjajo, da je potrebno natančno preiskati možnosti sinergizma za ključne netarčne organizme, predvsem za snovi, ki se dejansko pojavljajo hkrati v okolju. Pri tem je potrebno opozoriti, da zaenkrat večinoma proizvajalci ne kombinirajo kemičnih snovi za hkratno tretiranje glivičnih obolenj in škodljivih žuželk, je pa pogosta praksa mešanja sredstev v škropilnih napravah. Pričakovati je, da povečano delovanje na račun sinergizma tako insekticidov kot fungicidov, spodbudi uporabnike k tovrstni praksi, predvsem zaradi večje ekonomske učinkovitosti. Poudarjeni pripravki v tabeli (zadnja kolona s komentarji) so potencialno najbolj resna grožnja v našem okolju. Seveda pa ne poznamo dejansko sinergijskih učinkov na čebele. Ni izključno, da se bodo pojavile še nove kombinacije. Novejši patenti že nakazujejo usmerjenost v bolj specifične insekticide in kombinacije za sinergijsko delovanje, kar bo lahko tudi zmanjšalo strupenost za netarčne organizme. Kot smo zapisali drugje, je mogoča za določene receptorske mehanizme razviti zelo specifične agoniste ali antagonistov, ki prizadanejo le specifične vrste organizmov. Zanimivi so tudi patenti, ki kombinirajo rabo FFS z gensko spremenjenimi organizmi, kar tudi poveča specifičnost za tarčne organizme preko prehrane. Posebej je še poudariti Bayerjev patent, ki vključuje tudi nestrupene snovi (n.p. olja), ki lahko bistveno povečajo učinkovitost osnovnega sredstva, predvsem na račun olajšanja dostopa do tarčnih mest. Glavno sporočilo iz patentov pa je, da proizvajalci FFS poznajo možnost sinergijskih učinkov na katere pa posebej ne opozarjajo, še manj pa jih ne testirajo za netarčne organizme.

Tabela 2: Izbrani primeri obdelanih patentov

Vrsta	i/f	Osnovni	Dodatni1	Dodatni2	Patenti	Leto	Sinl	Opombe
<i>Spodoptera eridania</i>	i	benzoyl urea	piperonyl-butoxide		EP0091756	1983	600	
	i	Avermectin	piperonyl butoxide		EP0125155	1984		
	i	pyrethroid	piperonyl-butoxide		WO1986003374	1986		
	i	neuronal sodium channel antagonist	arylpyrrole		WO2000054592	2000	5,6	arylpyrroli niso dovoljeni
<i>Ostrinia nubilalis</i>	i	protein	cry protein		WO2001000841	2000	4,4	
<i>Aphis gossypii</i>	i	pyridaben	Kresoxim-methyl		WO2001022818	2001	1,4	
<i>Helico verpa zea</i>	i	Bt toxin	nucleopolyhedrosis virus		WO2001050865	2001		
	i	fenoxycarb	lufenuron		EP1642501	2006		fenoxycarb nima SI dovoljenja, v postopku
<i>Diabrotica undecimpun</i>	i	1 -arylpyrazole	flonicamid		WO2006045522	2006		flonicamid za uši, arylpyrazole je lahko tudi fipronil (v postopku!)
	i, f	carbamate	1 -arylpyrazole		EP1696728	2006		širok patent BASF
<i>Diabrotica virgifera</i>	i	clothianidin	fipronil		WO2006100227	2006	3	fipronil v postopku v SI
	i	x hidrazone	insekticidi		WO2006128863	2006	9	veliko variant
<i>Anthonomus grandis</i>	i	imidacloprid	anthranilamid		WO2007017433	2007	999	anthranilamid dela na ryanodine receptor, notrajcelični Ca kanali, Coragen (chlorantraniliprole)
	i	insecticides	malonodinitrile		WO2007122163	2007	999	veliko variant, ni podatkov o načinu delovanja, širok spekter organizmov (metabolizem?)
<i>Heliothis virescens</i>	i	x triazid	alpha-cypermethrin		EP1893020	2007	11,5	sicer več variant, a-cipermetrin strupen za čebele, triazid je sintetični piretroid
<i>Myzus persicae</i>	i	X-sulfonamid	fipronil		WO2008031712	2007	999	več kombinacij, tudi cipermetrin
<i>Anthonomus grandis</i>	i	anthranilamid	prochloraz	pyraclostrobin	WO2008034787	2007	999	Coragen (malo strupen za čebele), prochloraz (Octave, monilija), pyrac.Bellis, fungicid
<i>Pyrenophora teres</i>	f	clothianidin	Fluoxastrobin		WO2008092819	2008	999	fluox. Ni v slo
<i>Ceratitis capitata</i>	i	clothianidin	Metaflumizone		WO2008095870	2008	999	na krompirju! BASF Alverde (Metaflum izone)
<i>Myzus persicae</i>	i	aminothiazole	thiamethoxam	fipronil	WO2008104503	2008	999	
<i>Spodoptera frugiperda</i>	i	Fenamidone	clothianidin	x	EP2096918	2009	99	fenamidone gre iz prometa (za vinograde – perinospora)
<i>Myzus persicae</i>	i	aminothiazole	neonicotinoids	x	WO2009118297	2009	99	nove kombinacije in preference
	i	neonicotinoidi	olja etc.	x	WO2009123907	2009		Bayer, že navadne oljne kisline do 5%
<i>Plutella xylostella</i>	i	fosetyl-AI	thiacloprid	x	EP2250899	2010	30	Fosetyl na bučah in hmelju, thiacloprid (Biscaya) na ogrščici, krompirju, žita
		propamocarb-fosetyl-ate	thiacloprid	x	EP2250899	2010	3,2	p.f. Ni registriran
<i>Spodoptera exigua</i>	i	thiacloprid	propamocarb-HCl	fosetyl-AI	EP2319322	2011	6	
<i>Spodoptera exigua</i>	i	Propamocarb	Clothianidin, imidacloprid	thiamethoxam	EP2338341	2011	999	propamocarb, infinito (s fositilom) za krompir
	i,f	boscalid	x		EP2363023	2011		succinate dehydrogenase inhibitors, boscalid je v Bellisu (hruške)
<i>Myzus persicae</i>	i	steroid	bifenthrin	Abamectin	WO2011147952	2011	999	
<i>Altemaria solani</i>	f	steroid	Pyraclostrobin		WO2011147953	2011		

Drugo

Podatkovna baza, http://www.pesticideinfo.org/Search_Ecotoxicity.jsp nam omogoča vpogled v strupenost posameznih pesticidov (aktivnih snovi) po skupinah insektov. Podatki so zbrani kot LC50. Skupine so organizirane v podenote, kot so: dvoživke (caudata (močeradi in pupki), Anura (žabe in krastače); Apoda (črvi); skupina Annelida (segmentirani črvi, vključno z deževniki in njihovi sorodniki, pijavke, morski črvi, ogorčice); vodne rastline (vse razen fitoplanktona), skupina Cnidaria, ki vključuje meduze, korale in vetrnice; skupina Crustacea, ki vključuje rakce in kozice; skupina Echinoderm (morski nevretenčarji, morske zvezde, kumare in ježki), skupina rib; skupina Nematodes (ogorčice, trakulje, gliste); skupina Fungi (glive); skupina Insekti (večina žuželk); poleg tega pa še zooplankton, fitoplankton, školjke, ... Podatkovna baza je primerna za iskanje podatkov o strupenosti posameznih snovi ne pa tudi sinergističnih učinkov. Iz samih podatkov o strupenosti ne moramo sklepati na sinergistične učinke. Nekoliko več podatkov lahko pridobimo z iskanjem v sledečih bazah:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>

in <http://www.alanwood.net/pesticides/>.

Teh baz smo se posluževali tudi pri vrednotenju patentov.

Razprava in priporočila

Že prvi pregled virov je nakazoval, da so sinergistični učinki različnih kemikalij pri čebelah relativno slabo raziskani. Znanstvena radovednost je pripomogla, da so se razsikovanci spustili v različne vidike medsebojnih mehanizmov. Tudi, ko pogledamo širše na vse žuželke, dobimo skromen nabor poznanih in pojasnenih mehanizmov sinergističnega delovanja. Lahko bi rekli, da se v teh raziskavah odseva tudi podedovanost napak raziskav posameznih aktivnih snovi in njihove interpretacije (Standeven 2012). V veliko pomoč pri doslednem zbiranju toksikoloških podatkov so skupni standardi in navodila (Anon. 2010a, Anon. 2010b), ki lahko pripomorejo k zadostnemu telesu rezultatov po primerljivi metodologiji, da so mogoče tudi meta analize. Naš pregled virov in povzetki podpirajo tudi večino zaključkov H. M. Thompson (2012). Zaradi relativno skromnega nabora raziskav potencialnih sinergističnih učinkov, smo raziskavo razširili še na druge nevretenčarje. To je lažje pripeljalo do identifikacije mehanizmov za sinergistično delovanje kemikalij. Posebej smo podrobno predstavili mesta delovanja pri čebeli, predvsem pesticidov, ki lahko prizadanejo živčni sistem (priloga A). Nekoliko širše so predstavljena poglavja o sinergizmu pri čebelah (priloga B). Z analizo patentov smo opozorili na zavedanje proizvajalcev FFS, da so možne različne interakcije, ki pripeljejo do različne stopnje sinergizma. Tudi skozi patente se vidi velika vrstna specifičnost, kar onemogoča postavljanja splošnih pravil. To pa zahteva tako večjo previdnost pri izdajanju dovoljen, kakor tudi pri svetovanju rabe FFS. V praksi se še vedno pojavlja tako napačna raba FFS in sredstev za zdravljenje čebel, kakor tudi uporaba nedovoljenih in praviloma tudi nevarnih kemikalij, kar vsako leto na novo spoznavamo ob podrobnih analizah primerov zastrupitve čebel. Akutne situacije je še možno kolikor toliko pojasniti, kronično izpostavitve različnim kemičnim snovem ob prisotnosti čebeljih bolezni in vplivu podnebnih ter pašnih pogojev pa je težje identificirati.

Za uspešnejše preprečevanje morebitnih sinergističnih učinkov kemikalij predlagamo 4 sklope priporočil:

a) Okrepitev kontrole izvajanja preventivnih ukrepov in pravilne rabe FFS v kmetijstvu in kemikalij v čebeljih panjih

Žal inšpekcijski pregledi in analize le ob zastrupitvah čebel ne morejo bistveno vplivati na večino uporabnikov. Prevetriti je potrebno tudi sistem izobraževanja tako uporabnikov FFS kot tudi čebelarjev. Relativno pogoste kršitve, ki so bile zaznane ob inšpekcijskih pregledih nakazujejo na to, da izobraževanje ne doseže zadostne praktične vrednosti. Večji delež sonaravnega kmetijstva in čebelarstva bi tudi pripomogel k splošno previdnejši rabi kemičnih sredstev.

b) Večja previdnost v registracijskih postopkih

V registracijskih postopkih preverjati ali so testirali morebitne možne interakcije z drugimi sredstvi in posledično povečana strupenost za netarčne organizme. Možnost uporabe patentnih baz za zahtevo posebnih deklaracij ali ustreznih testiranj. Proizvajalci bi morali preveriti tudi možne interakcije z drugimi sredstvi in delovanje na netarčne organizme. Čebela je eden od nujnih netarčnih organizmov, ki morajo biti vključeni v taka testiranja

c) Okrepiti monitoring okolja

Nadaljevati z monitoringom okolja z vzorčevanjem peloda in drugih čebeljih pridelkov. Monitoring s čebelami je potrebno spraviti v večkratno funkcionalnost. Gre za splošno varstvo okolja, zdravje ljudi in zdravje čebel.

d) Raziskave

Uvesti raziskave sinergističnih učinkov kemikalij, ki se dejansko pojavljajo v okolju na netarčne organizme kot del monitoringa stanja v okolju. Poiskati možnosti za spodbujanje bazičnih raziskav mehanizmov sinergističnega delovanja in preučiti morebitne posebnosti kranjske čebele proti drugim podvrstam.

Viri:

Pripadajoča dokumentacija je dosegljiva na spletu v spodaj navedenih spletnih aplikacijah.

Dostop do dokumentacije je omejen na sodelujoče partnerje v projektu.

Dodeljevanje dostopa je v pristojnosti vodje projekta Janka Božiča.

– podatkovni bazi citirane literature Schem2Bee v spletni aplikaciji Zotero;

– na spletni strani Biotehniške fakultete ePouk <http://pouk.bf.uni-lj.si/> → S2Bee v spletni aplikaciji Moodle so članki v pdf formatu in s hiperlinki povezana besedila (wiki-ji), ki povzemajo relevantno vsebino člankov;

Zbrana so tudi vmesna poročila in drafti sodelavcev na projektu. Med drugim:

A) Shema delovanja pesticidov na medonosno čebelo *Apis mellifera* (pripravila Gordana Glavan)

B) Kumulativni in sinergijski učinki različnih kemikalij na čebele (prispevek pripravila Špela Schrader – NIB).

Spisek citiranih virov:

- Alaux, Cédric, Jean-Luc Brunet, Claudia Dussaubat, Fanny Mondet, Sylvie Tchamitchan, Marianne Cousin, Julien Brillard, Aurelie Baldy, Luc P Belzunces, in Yves Le Conte. 2010. „Interactions Between Nosema Microspores and a Neonicotinoid Weaken Honeybees (*Apis Mellifera*)“. *Environmental Microbiology* 12 (3) (march 1): 774–782. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x.
- Anon. 2010. „PP 1/170 (4): Side-effects on honeybees“. *EPPO Bulletin* 40 (3): 313–319. doi:10.1111/j.1365-2338.2010.02418.x.
- Armengaud, Catherine, Nicolas Causse, Jamila Aït-Oubah, Aurélien Ginolhac, in Monique Gauthier. 2000. „Functional cytochrome oxidase histochemistry in the honeybee brain“. *Brain Research* 859 (2) (march 24): 390–393. doi:10.1016/S0006-8993(00)02016-3.
- Aufauvre, Julie, David G Biron, Cyril Vidau, Régis Fontbonne, Mathieu Roudel, Marie Diogon, Bernard Viguès, Luc P Belzunces, Frédéric Delbac, in Nicolas Blot. 2012. „Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee“. *Scientific reports* 2: 326. doi:10.1038/srep00326.
- Aupinel, Pierrick, Dominique Fortini, Bruno Michaud, Franck Marolleau, Jean-Noël Tasei, in Jean-François Odoux. 2007. „Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new in vitro standardized feeding method“. *Pest Management Science* 63 (11) (november): 1090–1094. doi:10.1002/ps.1446.
- Badiou, A., M. Meled, in L.P. Belzunces. 2008. „Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase—A biomarker to detect deltamethrin exposure“. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69 (2) (february): 246–253. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.11.020.
- Barbara, Guillaume, Christina Zube, Jürgen Rybak, Monique Gauthier, in Bernd Grünewald. 2005. „Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, <i>Apis mellifera</i>“. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 191 (9): 823–836. doi:10.1007/s00359-005-0007-3.
- Belzunces, L P, J P Toutant, in M Bounias. 1988. „Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head. Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by Triton X-114 phase separation“. *Biochemical Journal* 255 (2) (oktober 15): 463–470.
- Belzunces, Luc P., Magali Theveniau, Patrick Masson, in Michel Bounias. 1990. „Membrane acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head solubilized by phosphatidylinositol-specific phospholipase C interacts with an anti-CRD antibody“. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 95 (3): 609–612. doi:10.1016/0305-0491(90)90029-S.
- Bendahou, Najib, Michel Bounias, in Cecile Fleche. 1997. „Toxicity of Cypermethrin and Fenitrothion on Honeybees (*Apis mellifera mellifera*) according to age, formulations and (chronic paralysis virus)/insecticide interaction“. *Journal of Environmental Biology* 18 (1): 55–65.
- Bendahou, Najib, Cecile Fleche, in Michel Bounias. 1999. „Biological and Biochemical Effects of Chronic Exposure to Very Low Levels of Dietary Cypermethrin (Cymbush) on Honeybee Colonies (Hymenoptera: Apidae)“. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44 (2) (oktober): 147–153. doi:10.1006/eesa.1999.1812.
- Blacquièrre, Tjeerd, Guy Smagghe, Cornelis van Gestel, in Veerle Mommaerts. 2012. „Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment“. *Ecotoxicology* 21 (4): 973–992. doi:10.1007/s10646-012-0863-x.
- Buren, NICOLETTE W. M. van, Adriana G. H Mariën, Rob C. H. M Oudejans, in Hayo H. W Velthuis. 1992. „Perizin, an Acaricide to Combat the Mite *Varroa Jacobsoni*: Its Distribution

- in and Influence on the Honeybee *Apis Mellifera*“. *Physiological Entomology* 17 (3) (september 1): 288–296. doi:10.1111/j.1365-3032.1992.tb01024.x.
- Burley, Lisa M., Richard D. Fell, in Richard G. Saacke. 2008. „Survival of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Spermatozoa Incubated at Room Temperature from Drones Exposed to Miticides“. *Journal of Economic Entomology* 101 (4) (avgust): 1081–1087. doi:10.1603/0022-0493(2008)101[1081:SOHBHA]2.0.CO;2.
- Cao, Lu-Cheng, Thomas W Honeyman, Rachel Cooney, Lori Kennington, Cheryl R Scheid, in Julie A Jonassen. 2004. „Mitochondrial dysfunction is a primary event in renal cell oxalate toxicity“. *Kidney International* 66 (5) (november): 1890–1900. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00963.x.
- Cascino, P, M Nectoux, G Guiraud, in M Bounias. 1989. „The formamidine amitraz as a hyperglycemic alpha-agonist in worker honeybees (*Apis mellifera mellifera* L.) in vivo“. *Biomedical and Environmental Sciences: BES* 2 (2) (junij): 106–114.
- Chalvet-Monfray, K., P. Auger, L. P. Belzunces, C. Fléché, in P. Sabatier. 1996. „Modelling based method for pharmacokinetic hypotheses test“. *Acta Biotheoretica* 44 (3-4) (november): 335–348. doi:10.1007/BF00046537.
- Chaney, E. 1988. „The Effect of Synthetic Pyrethroid Insecticides on Honey Bees in Indiana: Laboratory Studies and a Survey of Beekeepers and Pesticide Applicators. Thesis.“ Purdue University, West Lafayette, IN, USAw.
- Chauzat, Marie-Pierre, in Jean-Paul Faucon. 2007. „Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France“. *Pest Management Science* 63 (11): 1100–1106. doi:10.1002/ps.1451.
- Claudianos, C., H. Ranson, R. M Johnson, S. Biswas, M. A Schuler, M. R Berenbaum, R. Feyereisen, in J. G Oakeshott. 2006. „A Deficit of Detoxification Enzymes: Pesticide Sensitivity and Environmental Response in the Honeybee“. *Insect Molecular Biology* 15 (5) (oktober 1): 615–636. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00672.x.
- Colin, Marc-Edouard, in Luc P Belzunces. 1992. „Evidence of Synergy Between Prochloraz and Deltamethrin in *Apis Mellifera* L.: a Convenient Biological Approach“. *Pesticide Science* 36 (2) (januar 1): 115–119. doi:10.1002/ps.2780360206.
- Collins, Anita M., Jeffery S. Pettis, Reg Wilbanks, in Mark F Feldlaufer. 2004. „Performance of honey bee, *Apis mellifera*, queens reared in beeswax cells impregnated with coumaphos“. *International Bee Research Association* 43 (3): 128–134.
- Cresswell, James. 2011. „A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees“. *Ecotoxicology* 20 (1) (januar 1): 149–157–157.
- Davies, T. G. E, L. M Field, P. N. R Usherwood, in M. S Williamson. 2007. „DDT, Pyrethrins, Pyrethroids and Insect Sodium Channels“. *IUBMB Life* 59 (3) (januar 1): 151–162. doi:10.1080/15216540701352042.
- Desaiah, D., L.K. Cutkomp, E.V. Veja, in R.B. Koch. 1975. „The effect of three pyrethroids on ATPases of insects and fish“. *General Pharmacology: The Vascular System* 6 (1) (marec): 31–34. doi:10.1016/0306-3623(75)90008-7.
- Desneux, Nicolas, Axel Decourtye, in Jean-Marie Delpuech. 2007. „The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods“. *Annual Review of Entomology* 52 (1): 81–106. doi:10.1146/annurev.ento.52.110405.091440.
- Drescher, W., in P. Schneider. 1988. „The effect of the Varroa mite uon the fat body of worker bees and their tolerance of pesticides.“ *V Africanized honey bees and bee mites*, 452–456. 1st iz. Ellis Horwood Limited.
- Ellis, M. D., B. D. Siegfried, in B. Spawn. 1997. „The effect of Apistan[®] on honey bee (*Apis mellifera* L). Responses to methyl parathion, carbaryl and bifenthrin exposure“. *Apidologie* 28 (3-4): 123–127. doi:10.1051/apido:19970303.

- Elzen, Patti J., James R. Baxter, Marla Spivak, in William T. Wilson. 2000. „Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos“. *Apidologie* 31 (3): 5. doi:10.1051/apido:2000134.
- Enan, Essam, in Fumio Matsumura. 1993. „Activation of phosphoinositide/protein kinase C pathway in rat brain tissue by pyrethroids“. *Biochemical Pharmacology* 45 (3) (februar 9): 703–710. doi:10.1016/0006-2952(93)90146-N.
- Enayati, A A, H Ranson, in J Hemingway. 2005. „Insect glutathione transferases and insecticide resistance“. *Insect molecular biology* 14 (1) (januar): 3–8. doi:10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x.
- Floris, Ignazio, Alberto Satta, Vincenzo Luigi Garau, Marinella Melis, Paolo Cabras, in Naima Aloul. 2001. „Effectiveness, persistence, and residue of amitraz plastic strips in the apiary control of *Varroa destructor*“. *Apidologie* 32 (6): 9. doi:10.1051/apido:2001145.
- Fukuto, T R. 1990. „Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides.“ *Environmental Health Perspectives* 87 (julij): 245–254.
- Galloway, Tamara, in Richard Handy. 2003. „Immunotoxicity of Organophosphorous Pesticides“. *Ecotoxicology* 12 (1): 345–363. doi:10.1023/A:1022579416322.
- Galloway, Tamara S., in Michael H. Depledge. 2001. „Immunotoxicity in Invertebrates: Measurement and Ecotoxicological Relevance“. *Ecotoxicology* 10 (1): 5–23. doi:10.1023/A:1008939520263.
- Gilbert, M.D., in C.F. Wilkinson. 1974. „Microsomal oxidases in the honey bee, *Apis mellifera* (L.)“. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 4 (1) (marec): 56–66. doi:10.1016/0048-3575(74)90084-4.
- Girón-Pérez, Manuel I. 2010. „Relationships between innate immunity in bivalve molluscs and environmental pollution“. *ISJ - Invertebrate Survival Journal* 7: 149–156.
- Gregorc, A, in I D Bowen. 2000. „Histochemical characterization of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus* larvae, Amitraz and Oxytetracycline“. *Cell Biology International* 24 (5): 319–324. doi:10.1006/cbir.1999.0490.
- Gregorc, Ales, in James D. Ellis. 2011. „Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides“. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99 (2) (februar): 200–207. doi:10.1016/j.pestbp.2010.12.005.
- Gregorc, Aleš, Azra Pogacnik, in Ivor D. Bowen. 2004. „Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid“. *Apidologie* 35 (5): 8. doi:10.1051/apido:2004037.
- Gregorc, Aleš, in Maja Ivana Smodiš Škerl. 2007. „Toxicological and immunohistochemical testing of honeybees after oxalic acid and rotenone treatments“. *Apidologie* 38 (3) (junij 14): 296–305. doi:10.1051/apido:2007014.
- Guez, D., L.P. Belzunces, in R. Maleszka. 2003. „Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development“. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 75 (1) (april): 217–222. doi:10.1016/S0091-3057(03)00070-4.
- Guez, David, Séverine Suchail, Monique Gauthier, Ryszard Maleszka, in Luc P. Belzunces. 2001. „Contrasting Effects of Imidacloprid on Habituation in 7- and 8-Day-Old Honeybees (*Apis mellifera*)“. *Neurobiology of Learning and Memory* 76 (2) (september): 183–191. doi:10.1006/nlme.2000.3995.
- Gui, Zhongzheng, Chengxiang Hou, Ting Liu, Guangxin Qin, Muwang Li, in Byungrae Jin. 2009. „Effects of insect viruses and pesticides on glutathione S-transferase activity and gene expression in *Bombyx mori*“. *Journal of Economic Entomology* 102 (4) (avgust): 1591–1598.
- Gunasekara, Amrith S, Tresca Truong, Kean S Goh, Frank Spurlock, in Ronald S Tjeerdema. 2007. „Environmental fate and toxicology of fipronil“. *Journal Of Pesticide Science* 32 (3): 189–

199. doi:10.1584/jpestics.R07-02.
- De Guzman, L.I., T.E. Rinderer, VA Lancaster, GT Delatte, in A. Stelzer. 1999. „Varroa in the Mating Yard: III. The Effects of Formic Acid Gel-Formulation on Drone Production“. *American bee journal* 139: 304–307.
- Haarmann, Timothy, Marla Spivak, Daniel Weaver, Binford Weaver, in Tom Glenn. 2002. „Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations“. *Journal of Economic Entomology* 95 (1) (februar): 28–35.
- Hanson, Mark L., Paul K. Sibley, Scott A. Mabury, Keith R. Solomon, in Derek C.G. Muir. 2002. „Trichloroacetic acid (TCA) and trifluoroacetic acid (TFA) mixture toxicity to the macrophytes *Myriophyllum spicatum* and *Myriophyllum sibiricum* in aquatic microcosms“. *Science of The Total Environment* 285 (1-3) (februar 21): 247–259. doi:10.1016/S0048-9697(01)00955-X.
- Hardstone, Melissa C, in Jeffrey G Scott. 2010. „Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects?“ *Pest Management Science* 66 (11): 1171–1180. doi:10.1002/ps.2001.
- Hawthorne, David J, in Galen P Dively. 2011. „Killing them with kindness? In-hive medications may inhibit xenobiotic efflux transporters and endanger honey bees“. *PloS one* 6 (11): e26796. doi:10.1371/journal.pone.0026796.
- Helson, B. V., K. N. Barber, in P. D. Kingsbury. 1994. „Laboratory toxicology of six forestry insecticides to four species of bee (Hymenoptera: Apoidea)“. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27 (1): 107–114.
- Holmstrup, Martin, Anne-Mette Bindesbøl, Gertie Janneke Oostingh, Albert Duschl, Volker Scheil, Heinz-R Köhler, Susana Loureiro, idr. 2010. „Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review“. *The Science of the Total Environment* 408 (18) (avgust 15): 3746–3762. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.10.067.
- Imdorf, A., V. Kilchenmann, S. Bogdanov, B. Bachofen, in C. Beretta. 1995. „Toxizität von Thymol, Campher, Menthol und Eucalyptol auf *Varroa jacobsoni* Oud und *Apis mellifera* L im Labortest Toxic effects of thymol, camphor, menthol and eucalyptol on *Varroa jacobsoni* Oud and *Apis mellifera* L in a laboratory test“. *Apidologie* 26 (1): 5. doi:10.1051/apido:19950104.
- Iwasa, Takao, Naoki Motoyama, John T. Ambrose, in R. Michael Roe. 2004. „Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*“. *Crop Protection* 23 (5) (maj): 371–378. doi:10.1016/j.cropro.2003.08.018.
- Johnson, Reed M, Henry S Pollock, in May R Berenbaum. 2009. „Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*“. *Journal of Economic Entomology* 102 (2) (april): 474–479.
- Johnson, Reed M., Zhimou Wen, Mary A. Schuler, in May R. Berenbaum. 2006. „Mediation of Pyrethroid Insecticide Toxicity to Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) by Cytochrome P450 Monooxygenases“. *Journal of Economic Entomology* 99 (4): 1046–1050. doi:doi:10.1603/0022-0493-99.4.1046.
- Kirby, Michael L, Kay Castagnoli, in Jeffrey R Bloomquist. 1999. „In Vivo Effects of Deltamethrin on Dopamine Neurochemistry and the Role of Augmented Neurotransmitter Release“. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 65 (3) (november): 160–168. doi:10.1006/pest.1999.2440.
- KOENIGER, N., in S. FUCHS. 1988. „CONTROL OF VARROA JACOBSONI OUD. IN HONEYBEE COLONIES CONTAINING SEALED BROOD CELLS“. *Apidologie* 19 (2): 13. doi:10.1051/apido:19880202.
- Kral, K., in L. Schneider. 1981. „Fine structural localisation of acetylcholinesterase activity in the compound eye of the honeybee (*Apis mellifica* L.)“. *Cell and tissue research* 221 (2).

<http://www.springerlink.com/index/W7337761P8357J32.pdf>

- Kral, Karl. 1980. „Acetylcholinesterase in the ocellus of *Apis mellifica*“. *Journal of Insect Physiology* 26 (12): 807–809. doi:10.1016/0022-1910(80)90096-7.
- Kreissl, Sabine, in Gerd Bicker. 1989. „Histochemistry of Acetylcholinesterase and Immunocytochemistry of an Acetylcholine Receptor-like Antigen in the Brain of the Honeybee“. *The Journal of Comparative Neurology* 286 (1) (August 1): 71–84. doi:10.1002/cne.902860105.
- Kuhn, Reinhilde. 1985. „Toxizitäts-test mit einzeln und kombiniert appliziertent Insektiziden und Fungiziden an Larven und Imagines der Honigbiene.“ V *Apidologie*, 16:201–203. Bonn, Germany.
- Ladas, Anastasios. 1972. „DER EINFLUSS VERSCHIEDENER KONSTITUTIONS- UND UMWELTFAKTOREN AUF DIE ANFÄLLIGKEIT DER HONIGBIENE (*APIS MELLIFICA* L.) GEGENÜBER ZWEI INSEKTIZIDEN PFLANZENSCHUTZMITTELN“. *Apidologie* 3 (1): 55–78. doi:10.1051/apido:19720103.
- Ladurner, E., J. Bosch, W. P Kemp, in S. Maini. 2005. „Assessing delayed and acute toxicity of five formulated fungicides to *Osmia lignaria* Say and *Apis mellifera*“. *Apidologie* 36 (3): 449.
- Li, Xiqing, Chen Bao, Daibin Yang, Mingqi Zheng, Xuefeng Li, in Shu Tao. 2010. „<title> Toxicities of fipronil enantiomers to the honeybee *Apis mellifera* L. and enantiomeric compositions of fipronil in honey plant flowers </title>“. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29 (1) (Januar): 127–132. doi:10.1002/etc.17.
- Lozano, V., C. Armengaud, in M. Gauthier. 2001. „Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybee“. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 187 (4): 249–254.
- Lozano, V. C., E. Bonnard, M. Gauthier, in D. Richard. 1996. „Mecamylamine-induced impairment of acquisition and retrieval of olfactory conditioning in the honeybee“. *Behavioural brain research* 81 (1): 215–222.
- Mao, Wenfu, Mary A. Schuler, in May R. Berenbaum. 2011. „CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*)“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (31): 12657–12662. doi:10.1073/pnas.1109535108.
- Mattila, H. R., G. Otis, J. Daley, in T. Schulz. 2000. „Trials of Apiguard, a thymol-based miticide. 2. Non-target effects on honey bees.“ *American Bee Journal* 140 (1): 68–70.
- Mayack, Christopher, in Dhruva Naug. 2009. „Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection“. *Journal of Invertebrate Pathology* 100 (3) (Marec): 185–188. doi:10.1016/j.jip.2008.12.001.
- Medrzycki, Piotr, Fabio Sgolastra, Laura Bortolotti, Gherardo Bogo, Simone Tosi, Erica Padovani, Claudio Porrini, in Anna Gloria Sabatini. 2010. „Influence of brood rearing temperature on honey bee development and susceptibility to poisoning by pesticides“. *Journal of Apicultural Research* 49 (1) (Januar 1): 52–59. doi:10.3896/IBRA.1.49.1.07.
- Meyer, Jason M., Karin F. K. Ejendal, Larisa V. Avramova, Elisabeth E. Garland-Kuntz, Gloria I. Giraldo-Calderón, Tarsis F. Brust, Val J. Watts, in Catherine A. Hill. 2012. „A “Genome-to-Lead” Approach for Insecticide Discovery: Pharmacological Characterization and Screening of *Aedes aegypti* D1-like Dopamine Receptors“. *PLoS Negl Trop Dis* 6 (1) (Januar 24): e1478. doi:10.1371/journal.pntd.0001478.
- Milani, Norberto. 1999. „The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides.“ *Apidologie* 30 (2-3): 229–234. doi:10.1051/apido:19990211.
- Miles, M. 2003. „The effects of spinosad, a naturally derived insect control agent to the honeybee“. *Bulletin of Insectology* 56: 119–124.
- Moret, Yannick, in Paul Schmid-Hempel. 2000. „Survival for Immunity: The Price of Immune

- System Activation for Bumblebee Workers“. *Science* 290 (5494) (oktober 11): 1166–1168. doi:10.1126/science.290.5494.1166.
- Narahashi, T, X Zhao, T Ikeda, K Nagata, in J Z Yeh. 2007. „Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity“. *Human & Experimental Toxicology* 26 (4) (april): 361–366. doi:10.1177/0960327106078408.
- Papaefthimiou, Chrisovalantis, Vasiliki Pavlidou, Ales Gregorc, in George Theophilidis. 2002. „The action of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid on the isolated heart of insect and amphibia“. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11 (2) (marec): 127–140. doi:10.1016/S1382-6689(01)00113-2.
- Papaefthimiou, Chrisovalantis, in George Theophilidis. 2001. „The Cardiotoxic Action of the Pyrethroid Insecticide Deltamethrin, the Azole Fungicide Prochloraz, and Their Synergy on the Semi-Isolated Heart of the Bee *Apis mellifera macedonica*“. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 69 (2) (februar): 77–91. doi:10.1006/pest.2000.2519.
- Pettis, J S, W T Wilson, H. Shimanuki, in P D Teel. 1991. „Fluvalinate Treatment Of Queen And Worker Honey-Bees (*Apis-Mellifera* L) And Effects On Subsequent Mortality, Queen Acceptance And Supersedure“. *Apidologie* 22 (1): 1–7.
- Pettis, Jeffery S, Dennis Vanengelsdorp, Josephine Johnson, in Galen Dively. 2012. „Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*“. *Die Naturwissenschaften* 99 (2) (februar): 153–158. doi:10.1007/s00114-011-0881-1.
- Pettis, Jeffery S., Anita M. Collins, Reg Wilbanks, in Mark F Feldlaufer. 2004. „Effects of coumaphos on queen rearing in the honey bee, *Apis mellifera*“. *Apidologie* 35: 605–610.
- Pilling, E. D. 1992. „Evidence for pesticide synergism in the honeybee (*Apis mellifera*).“ *Aspects of Applied Biology* 31: 43–47.
- Pilling, Edward D, K.A.C. Bromleychallenor, C.H. Walker, in Paul C Jepson. 1995. „Mechanism of Synergism between the Pyrethroid Insecticide -Cyhalothrin and the Imidazole Fungicide Prochloraz, in the Honeybee *Apis mellifera* L.“. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 51: 1–11.
- Pilling, Edward D, in Paul C Jepson. 1993. „Synergism Between EBI Fungicides and a Pyrethroid Insecticide in the Honeybee (*Apis Mellifera*)“. *Pesticide Science* 39 (4) (januar 1): 293–297. doi:10.1002/ps.2780390407.
- Priestley, Caroline M, Elizabeth M Williamson, Keith A Wafford, in David B Sattelle. 2003. „Thymol, a Constituent of Thyme Essential Oil, Is a Positive Allosteric Modulator of Human GABAA Receptors and a Homo-oligomeric GABA Receptor from *Drosophila Melanogaster*“. *British Journal of Pharmacology* 140 (8) (december 1): 1363–1372. doi:10.1038/sj.bjp.0705542.
- Rashatwar, Subhash S., in Fumio Matsumura. 1985. „Interaction of DDT and pyrethroids with calmodulin and its significance in the expression of enzyme activities of phosphodiesterase“. *Biochemical Pharmacology* 34 (10) (maj 15): 1689–1694. doi:10.1016/0006-2952(85)90635-5.
- Ray, David E, in Jeffrey R Fry. 2006. „A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides“. *Pharmacology & Therapeutics* 111 (1) (julij): 174–193. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.10.003.
- Raymond-Delpech, Valérie, Kazuhiko Matsuda, Benedict M. Sattelle, James J. Rauh, in David B. Sattelle. 2005. „Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides“. *Invertebrate Neuroscience* 5 (3-4) (september 20): 119–133. doi:10.1007/s10158-005-0004-9.
- Rinderer, T.E., LI DeGuzman, V.A. Lancaster, G.T. Delatte, in J.A. Stelzer. 1999. „Varroa in the mating yard: I. The effects of *Varroa jacobsoni* and Apistan (R) on drone honey bees“. *American bee journal* 139 (2): 134–139.
- Ritter, Wolfgang. 1985. „Bekaempfung der varroatose mit Perizin (liquid), einem neuen

- systemischen medikament.“ *V Apidologie*, 16:219–220. Bonn, Germany.
- Rosenkranz, Peter, Pia Aumeier, in Bettina Ziegelmann. 2010. „Biology and control of *Varroa destructor*“. *Journal of Invertebrate Pathology* 103, Supplement (januar): S96–S119. doi:10.1016/j.jip.2009.07.016.
- Rossignol, Daniel P. 1991. „Binding of a photoreactive pyrethroid to β subunit of GTP-binding proteins“. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 41 (2) (oktober): 121–131. doi:10.1016/0048-3575(91)90066-U.
- Santiago, G.P., G. Otero-Colina, D.M. Sánchez, M.E.R. Guzmán, in R. Vandame. 2000. „Comparing effects of three acaricides on *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) using two application techniques“. *Florida Entomologist*: 468–476.
- Scheidler, Angelika, Peter Kaulen, Gerold Brüning, in Joachim Erber. 1990. „Quantitative autoradiographic localization of [125 I] α -bungarotoxin binding sites in the honeybee brain“. *Brain Research* 534 (1–2) (november 26): 332–335. doi:10.1016/0006-8993(90)90152-2.
- Soderlund, D M, in J R Bloomquist. 1989. „Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides“. *Annual Review of Entomology* 34: 77–96. doi:10.1146/annurev.en.34.010189.000453.
- Sogorb, Miguel A, in Eugenio Vilanova. 2002. „Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis“. *Toxicology Letters* 128 (1–3) (marec 10): 215–228. doi:10.1016/S0378-4274(01)00543-4.
- Standeven, Matthew. 2012. „Inherent Uncertainty of Risk Assessment: How Pesticide Residue Tolerances Fall Short on Safety, The“. *Journal of Health Care Law & Policy* 15: 227.
- Stanley, Johnson, Subramanian Chandrasekaran, Gnanadhas Preetha, in Sasthakutty Kuttalam. 2010. „Toxicity of diafenthion to honey bees in laboratory, semi-field and field conditions“. *Pest Management Science* 66 (5) (maj): 505–510. doi:10.1002/ps.1900.
- Suchail, S., D. Guez, in L. P Belzunces. 2001. „Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*“. *Environmental toxicology and chemistry* 20 (11): 2482–2486.
- Sylvester, H.A., R.P. Watts, L.I. Guzman, J.A. Stelzer, in T.E. Rinderer. 1999. „*Varroa* in the mating yard. II. The effects of *Varroa* and fluvalinate on drone mating competitiveness“. *American bee journal* 139: 225–227.
- Tarallo, Viviana D, Riccardo P Lia, Mariateresa Sasanelli, Claudia Cafarchia, in Domenico Otranto. 2009. „Efficacy of Amitraz plus Metaflumizone for the treatment of canine demodicosis associated with *Malassezia pachydermatis*“. *Parasites & Vectors* 2 (marec 5): 13. doi:10.1186/1756-3305-2-13.
- Terriere, L C. 1984. „Induction of Detoxication Enzymes in Insects“. *Annual Review of Entomology* 29 (1) (januar): 71–88. doi:10.1146/annurev.en.29.010184.000443.
- Thompson, H., in S. Wilkins. 2003. „Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures“. *Bulletin of Insectology* 56 (1): 131–134.
- Thompson, Helen M. 2012. „Interaction between pesticides and other factors in effects on bees“. *EFSA Supporting Publications* 2012 EN (340) (september 14): 204.
- Trouiller, Jérôme. 1998. „Monitoring *Varroa jacobsoni* resistance to pyrethroids in western Europe“. *Apidologie* 29 (6): 10. doi:10.1051/apido:19980606.
- Vandame, Rémy, in Luc P Belzunces. 1998. „Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation“. *Neuroscience Letters* 251 (1) (julij 17): 57–60. doi:10.1016/S0304-3940(98)00494-7.
- Vandenberg, J.D., in H. Shimanuki. 1990. „Effect of amitraz treatments on honey bees and on the honey bee tracheal mite“. *Apidologie* 21 (3): 5. doi:10.1051/apido:19900309.
- Vidau, Cyril, Marie Diogon, Julie Aufauvre, Régis Fontbonne, Bernard Viguès, Jean-Luc Brunet, Catherine Texier, idr. 2011. „Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid

- Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*“. *PLoS ONE* 6 (6) (junij 28): e21550. doi:10.1371/journal.pone.0021550.
- Wahl, Oscar, in Kurt Ulm. 1983. „Influence of pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*“. *Oecologia* 59 (1) (avgust): 106–128. doi:10.1007/BF00388082.
- Weick, J., in R.S. Thorn. 2002. „Effects of acute sublethal exposure to coumaphos or diazinon on acquisition and discrimination of odor stimuli in the honey bee (Hymenoptera: Apidae)“. *Journal of economic entomology* 95 (2): 227–236.
- Wu, Judy Y. 2010. „Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bees (*Apis mellifera* L.)“. MSc in Entomology, Washington State University, Department of Entomology.
- Wu, Judy Y, Matthew D Smart, Carol M Anelli, in Walter S Sheppard. 2012. „Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection“. *Journal of Invertebrate Pathology* 109 (3) (januar 20): 326–329. doi:10.1016/j.jip.2012.01.005.
- Wu, Judy Y., Carol M. Anelli, in Walter S. Sheppard. 2011. „Sub-Lethal Effects of Pesticide Residues in Brood Comb on Worker Honey Bee (*Apis mellifera*) Development and Longevity“. *PLoS ONE* 6 (2) (februar 23): e14720. doi:10.1371/journal.pone.0014720.
- Yang, X, in D Cox-Foster. 2007. „Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge“. *Parasitology* 134 (Pt 3) (marec): 405–412. doi:10.1017/S0031182006000710.
- Yu, S.J., F.A. Robinson, in J.L. Nation. 1984. „Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L.“. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 22 (3) (december): 360–368. doi:10.1016/0048-3575(84)90029-4.
- Yu, Simon J, in Err L Hsu. 1993. „Induction of Detoxification Enzymes in Phytophagous Insects: Role of Insecticide Synergists, Larval Age, and Species“. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 24 (1) (januar 1): 21–32. doi:10.1002/arch.940240103.
- Zhi-Yong Huang, in Charles O. Knowles. 1990. „Nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in honey bee (*Apis mellifera*) brain“. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 97 (2): 275–281. doi:10.1016/0742-8413(90)90141-U.
- Zhou, Ting, Wei Zhou, Qiang Wang, Ping-Li Dai, Feng Liu, Yi-Li Zhang, in Ji-Hu Sun. 2011. „Effects of pyrethroids on neuronal excitability of adult honeybees *Apis mellifera*“. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 100 (1) (maj): 35–40. doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.001.
- Zlotkin, Eliahu. 1999. „THE INSECT VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNEL AS TARGET OF INSECTICIDES“. *Annual Review of Entomology* 44 (1) (januar): 429–455. doi:10.1146/annurev.ento.44.1.429.