

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie



Barbora Weingartová

Vliv neonicotinoidů na hmyzí společenstva se zaměřením na včely

Influence of neonicotinoids on insect communities with focus on bees

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Tomáš Erban, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis:

Abstrakt

Bakalářská práce je zaměřena na pesticidy a jejich vliv na životní prostředí. Prostředky na ochranu rostlin musí procházet složitým hodnocením, které zahrnuje i vliv na necílové organismy. Negativní účinky pesticidů se nehodnotí pouze pro člověka a jiné obratlovce, ale také pro bezobratlé živočichy. Důležitou skupinou, na které je prováděno hodnocení rizik pesticidů, jsou opylovači, kteří hrají nezastupitelnou roli v ekosystémech. Zaměření této práce je na určitou skupinu pesticidů zvanou neonicotinoidy, z nichž některé jsou zakázané v některých zemích. Jsou uvedeny druhy neonicotinoidů, jejich toxicita a účinky na opylovače, které byly vyzkoušeny. Důležité je přehodnocení zákazu neonicotinoidů, díky kterému si můžeme udělat ucelený obraz na to, zda byl jejich zákaz správný.

Klíčová slova: pesticidy, neonicotinoidy, opylovači, včela medonosná, čmeláci, syndrom zhroucení včelstev

Abstract

The bachelor thesis is focused on pesticides and their impact on the environment. Plant protection products must undergo a comprehensive assessment involving the impact on nontarget organisms. Negative effects of pesticides are not only assessed in humans and other vertebrates but also in invertebrates. Pollinators that play a vital role in ecosystems are an important group for evaluation. This thesis specializes in a group of pesticides called neonicotinoids, some of which are currently banned in some countries. This thesis mentions array of neonicotinoids, their toxicity and effects on pollinators that were observed. Reassessment is crucial in order to make a comprehensive picture of whether the ban was correct.

Keywords: pesticides, neonicotinoids, pollinators, honeybees, bumblebees, colony collapse disorder

Obsah

1. Úvod	1
2. Pesticidy	2
2.1. Výhody spojené s používáním pesticidů	3
2.2. Rizika spojená s použitím pesticidů	4
2.3. Klasifikace pesticidů	5
2.4. Nejvíce používané pesticidy	5
2.5. Případy zakázaných pesticidů před neonicotinoidy	6
3. Vliv pesticidů na hmyz	7
3.1. Opylovači	8
3.1.1. Rod včela (<i>Apis</i>)	10
3.1.2. Colony collapse disorder (CCD)	11
4. Neonicotinoidy	13
4.1. Charakteristika neonicotinoidů	13
4.2. Druhy neonicotinoidů	14
4.3. Zákaz neonicotinoidů	15
4.4. Zhodnocení zákazu neonicotinoidů	17
5. Závěr	20
6. Seznam použité literatury	22

1. Úvod

V dnešní době je používání přípravků na ochranu rostlin pro člověka prakticky nutností. Bez nich by výnos zemědělských plodin nebyl na takové úrovni, jakou dnešní svět vyžaduje. Mimo příznivé vlivy, které používání pesticidů přináší, jsou tu i negativa. Mohou mít negativní vliv na životní prostředí, správnou funkci ekosystémů, ovlivňovat druhy rostlin a živočichů či jejich stanoviště. Jednou zásadní skupinou živočichů, která je pro fungování ekosystémů nezbytná, jsou opylovači, na kterých bývají účinky pesticidů sledovány nejvíce. Opylovači se s pesticidy dostanou do kontaktu zejména skrze ošetřené plodiny a tímto způsobem si je mohou někteří opylovači, jako například včely nebo čmeláci donést do úlu. Tímto způsobem se pesticidy objevují i ve včelích produktech jako je pyl, med, propolis či mateří kašička, kterou jsou následně krmeny matky a larvy. Může docházet ve větší míře k úmrtnosti včel, nebo také k jevu, který se nazývá syndrom zhroucení včelstev, anglicky colony collapse disorder (CCD).

V souvislosti s úhynem včel jsou často spojovány neonikotinoidy, což jsou pesticidy, které byly v poslední době jedny z nejvíce používaných. Objevily se však studie, které poukázaly na možné negativní vlivy jejich používání, spojených i s již zmíněnými opylovači. Na základě těchto studií se Evropská komise rozhodla od roku 2013 pozastavit používání imidaklopridu, klothianidinu, thiamethoxamu v zemích Evropské unie. Zákaz byl Evropskou komisí potvrzen v roce 2018. Důležité je však přehodnotit, zda byl tento zákaz správný. Zajímá nás správnost rozhodnutí zákazu neonikotinoidů a jaké změny toto nařízení přineslo. Jelikož to byly hojně využívané pesticidy, muselo dojít k rychlé náhradě za jiné látky, které se musejí aplikovat ve větších dávkách než neonikotinoidy, s tím je spojena větší zátěž životního prostředí. Tato změna mohla ovlivnit také zemědělský výnos, tedy i ekonomiku jednotlivých zemí.

2. Pesticidy

Pesticidy, označované jinak jako přípravky na ochranu rostlin (POR), jsou hojně využívány v oblastech zemědělství, lesnictví a používají je i zahrádkáři na nezemědělských půdách. Jejich hlavní úlohou je zvýšit výnosy a kvalitu produkce rostlin, ale mají také zásadní vliv na vzhled zemědělských plodin. Pesticidy se používají k ničení či odolnosti rostlin před škůdci, včetně hmyzu, hlodavců, hub a plevelů. (Official Journal of the European Union 2009).

Pesticidy se na trh uvádějí v tzv. formulacích, které se skládají z účinné látky a také pomocných látek. Účinné látky jsou chemikálie, které odpuzují nebo ničí škůdce. POR obsahují alespoň jednu účinnou látku a další přidané látky jsou pomocné. Pomocné látky mohou působit jako rozpouštědlo, zajistit přilnavost pesticidu, prodloužit životnost výrobku a chránit pesticid před možnou degradací např. vlivem slunečního záření. Vedlejší účinky nemusí mít pouze aktivní látka, ale i formulace, jejichž působení je v praxi zásadní. Může se stát, že je daný pesticid škodlivější pro necílové organismy než aktivní látka samotná, proto se vždy zvažuje možný negativní vliv obou variant (NASDA 2014).

Před uvedením na trh a použitím v zemědělských i nezemědělských oblastech musí projít pesticidy registračním procesem (European Communities, 1996; Monaco et al., 2002; EPA, 2009). Registrace určuje, které POR mohou být používány, jak a pro jaké účely, také provádějí kontrolu kvality, míry využití a rozhodují o označení a balení POR. Než se může začít jakýkoliv pesticid používat komerčně, musí se provést několik testů, které určí, zda může mít nepříznivé účinky na člověka, živočichy a jiné necílové organismy včetně ohrožených druhů, nebo zda nemají předpoklad kontaminovat povrchové a podzemní vody. Registrace pesticidů je značně složitý proces, který vyžaduje čas, finanční zdroje a odborné znalosti (World Health Organization 2010). Může se však stát, že u pesticidu, který dříve splňoval všechna kritéria, jsou v pozdější době odhalena nová rizika, díky novým vědeckým pokrokům a moderním analytickým přístrojům (NASDA 2014).

Ve většině zemí musí být pesticidy před prodejem a použitím schváleny vládní agenturou. V USA je za regulaci pesticidů odpovědná Environmental Protection Agency (EPA), která se řídí zákony Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA) a Food Quality Protection Act (FQPA) (NASDA 2014). V rámci Evropské unie (EU) musí být nejdříve schválena účinná látka, teprve potom může v jednotlivých členských státech začít schvalovací proces přípravku. Mezi organizace odpovědné za regulaci pesticidů v EU patří Evropská komise (EC), Evropská agentura pro chemické látky (ECHA) a Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) (European Food Safety Authority (EFSA) 2018h).

Moderní POR se začaly vyvíjet od roku 1940, kdy v Evropě nebyl dostatek potravin v důsledku druhé světové války a ochrana úrody měla mnohem větší význam. Největší posun však nastal od roku 1970, kdy bylo zapotřebí mnohonásobně zvýšit produkci potravin a také bylo potřeba zajistit bezpečnost lidí, potravin a životního prostředí (ANON. 2013).

2.1. Výhody spojené s používáním pesticidů

Poslední dobou bývají pozitivní účinky pesticidů opomíjeny a jsou zmiňována zejména ta negativa (Erban 2018b). Rizika by samozřejmě neměla být přehlížena, ale především je potřeba usilovat o jejich minimalizaci za pomoci přísné regulace a proškolení jejich uživatelů. Důležité je jejich správné používání. Význam jejich používání je ochrana před škůdci, ta je ale především potřebná v rozvojových zemích, kde je se zemědělskými ztrátami spojen hlad a podvýživa. S používáním pesticidů je spojen vyšší výnos plodin a díky tomu je větší dostupnost potravin po celý rok (Cooper a Dobson 2007).

Bez pesticidů by produkce potravin výrazně klesla a ceny potravin vzrostly (Popp et al. 2013). Více potravin umožňuje lidem se lépe a zdravěji stravovat (Cooper a Dobson 2007). Pesticidy mohou také zlepšit kvalitu produkce, včetně její bezpečnosti (Kolbe 1982). Rostliny napadené chorobami či patogeny, které jsou původci onemocnění, mohou produkovat toxické chemikálie (Cooper a Dobson 2007). Pokud nejsou rostliny chráněny fungicidy, tedy pesticidy zaměřeny na boj s houbovými nákazami, může se objevit vyšší obsah mykotoxinů v potravinách. Mykotoxiny jsou metabolity hub, které pro člověka a zvířata představují zdravotní riziko (Bruns 2003).

Kontrola škůdců při pěstování plodin, zabraňuje jejich možné invazi do jiných zemí. Zavlečení škůdců představuje riziko pro nepůvodní země, jelikož se v novém prostředí nevyskytují přirození nepřátelé daného škůdce (Neuenschwander 2001). Mimo to jsou některé pesticidy využívány proti invazním druhům, které představují hrozbu pro ekologii daného regionu. Zavlečení invazního druhu na určité stanoviště může mít destruktivní účinek pro místní faunu. Pesticidy se tak mohou v některých případech a při správném použití podílet na ochraně biologické rozmanitosti (Cooper a Dobson 2007). Pesticidy určené k hubení škodlivého hmyzu, tedy insekticidy, jsou ochranou i proti vektorům, které jsou přenašeči různých chorob (Townson et al. 2005). Dále chrání budovy před poškozením termity či jiným hmyzem, tím jsou sníženy náklady na údržbu a je zvýšena bezpečnost a životnost budov (Cooper a Dobson 2007).

2.2. Rizika spojená s použitím pesticidů

Zvyšující se zemědělská produkce a politika snižování ztrát ze sklizní vedla k vyšší spotřebě pesticidů. Lidé se stali závislí na jejich používání (DORES a DE-LAMONICA-FREIRE 1999). Zvýšilo se množství využívaných pesticidů, zemědělci používají silnější koncentrace, dávkují více aplikací nebo dokonce míchají několik různých druhů. Snaží se tak bojovat se stále častějším problémem rezistence škůdců vůči pesticidům (WRI 1999). Může se stát, že se populace škůdců dostane nad úroveň před používáním pesticidů, to bývá zapříčiněno vyhubením jejich přirozených predátorů (Pimentel et al. 1992).

Pesticidy nemusí ovlivňovat pouze škůdce, proti kterým jsou určeny, ale mohou negativně působit i na řadu necílových organismů. V terestrickém prostředí mohou mít negativní vliv na člověka (Wilson 1999), volně žijící savce (White et al., 1982; Carlson, 1993), ptáky (Stickel et al., 1984; Lundholm, 1987), ale i na bezobratlé živočichy jako hmyz, žížaly a prvoky (Pimentel et al. 1992). Použití pesticidů může ovlivňovat také hospodářská a domácí zvířata (Beasley a Trammel 1989). Ve vodních ekosystémech mají pesticidy negativní dopad na ryby (Pimentel a Greiner 1997), obojživelníky (Hayes et al. 2006) i vodní druhy hmyzu (Cerejeira et al. 2003).

Příkladem necílového organismu, který bývá často zmiňován v souvislosti s riziky pesticidů je včela medonosná, která je důležitá pro opylení mnoha rostlin a plodin včetně ovoce a zeleniny. Mnoho studií poukazuje na nebezpečí kontaminace životního prostředí. Pesticidy se dostanou snadno do půdy, kde jsou toxické pro členovce, žížaly, houby či mikroorganismy, tak může být narušen správný chod ekosystému (Pimentel et al. 1992). Snadno se dostanou i do vodního prostředí odtokem vody, erozí půdy, louhováním nebo větrem. Pro ryby bývají toxické i běžné aplikační dávky (Pimentel a Greiner 1997). Mimo to některé pesticidy přetrvávají déle v ekosystémech. Perzistentní pesticidy představují velké riziko pro životní prostředí. Patří mezi ně například organochlorové insekticidy, které byly v povrchových vodách detekovatelné i dvacet let po zákazu používání (Larson et al. 1997).

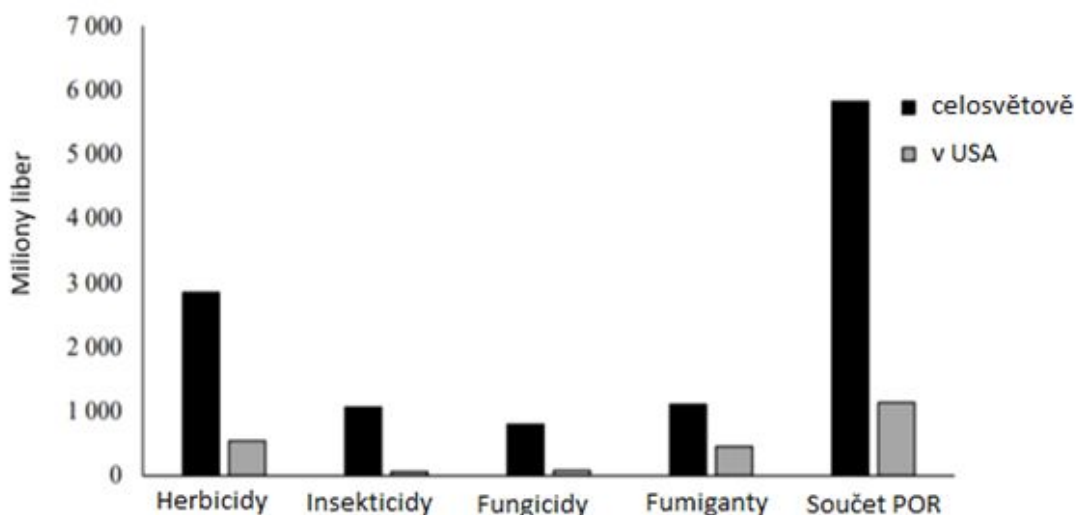
Pesticidy se podílí se také na znečištění okolního ovzduší (Borras et al., 2011; Raepel et al., 2014). Je to jeden ze způsobů, díky kterým je populace vystavena nepříznivým účinkům pesticidů, jejichž toxické vlastnosti mají negativní vliv na lidské zdraví. Nejcitlivější skupinou jsou děti a kojenci (Marks et al., 2010; London et al., 2012). Další způsoby mimo inhalace ovzduší, kterými můžeme přijít do kontaktu s pesticidy, je požití potravin s jejich rezidui, pitná voda a dermální expozice (Coscollà et al. 2017). Nebezpečí pro zdraví představují zejména karcinogenní, reprodukční, neurologické, imunologické a jiné nepříznivé účinky, které nejčastěji způsobují respirační problémy, vyrážky na kůži, deprese či potíže s pamětí (Grisolia CK 2005).

2.3. Klasifikace pesticidů

Jedním ze způsobů rozdělení pesticidů je podle škodlivého činitele, proti kterému jsou určeny. Herbicidy se používají k hubení plevelu, fungicidy jako ochrana před houbovými chorobami a zoocidy chrání rostliny před živočichy. Do skupiny zoocidů patří insekticidy, které se používají k hubení hmyzu, akaricidy jako ochrana proti roztočům a moluskocidy proti slimákům. Existuje však ještě mnoho druhů zoocidů, uvedeny jsou pouze ty nejznámější z nich (NASDA 2014). Další typ dělení je podle chemického složení pesticidů na organochlorové deriváty, organofosfáty, karbamáty, pyrethroidy, fenoxalkanové pesticidy, pesticidy na bázi močoviny, triazinové a diazinové pesticidy, pesticidy na bázi kovů a řada dalších. Dělí se i podle způsobu jejich působení na ošetřený organismus. Prvním typem jsou kontaktní pesticidy, kdy účinná látka zůstává pouze na povrchu a neproniká do rostlinné tkáně. Druhým typem jsou systémové pesticidy, které pronikají kutikulou rostliny dále do buněk a putují cévním systémem. Systémové pesticidy jsou více náchylné ke vzniku rezistence. Kombinované přípravky jsou spojením kontaktní a systémové látky (ALS 2015).

2.4. Nejvíce používané pesticidy

V níže uvedeném grafu je uvedena spotřeba pesticidů ve Spojených státech (USA) a celosvětově v roce 2012. Hodnoty jsou rozděleny podle typu pesticidů. V grafu lze vidět, že nejvíce používané jsou herbicidy, dále fumiganty, které jsou aplikovány ve formě par či plynů, insekticidy a poslední skupinou jsou fungicidy.



Graf č.1: Spotřeba pesticidů v roce 2012 ve světě a USA podle jejich typu (Atwood a Paisley-Jones 2017)

Tabulka níže porovnává deset nejvíce používaných pesticidů v USA a České republice (ČR) v letech 2007, 2012 a 2013. Jsou viditelné značné rozdíly mezi USA a ČR, tedy členským státem EU. V roce 2007 se shodují používáním dvou pesticidů, a to konkrétně glyfosátem a acetochlorem. V porovnání roku 2012 a 2013 je shoda pouze u glyfosátu. Acetochlor se v těchto letech v ČR již nepoužíval, jelikož byl v roce 2012 v zemích EU zakázán, oproti tomu v USA patřil v té době mezi nejpoužívanější pesticidy (Atwood a Paisley-Jones 2017).

	Účinné látky USA 2007	Účinné látky ČR 2007	Účinné látky USA 2012	Účinné látky ČR 2013
1.	Glyfosát	Glyfosát	Glyfosát	Glyfosát
2.	Atrazin	Chlormekvát-chlorid	Atrazin	Chlormekvát-chlorid
3.	Metam sodium	Acetochlor	S-metolachlor	Tebukonazol
4.	S-metolachlor	Isoproturon	Dichlorprop-P	Chlorpyrifos
5.	Acetochlor	Alachlor	2,4-D	Prochloraz
6.	Dichlorprop-P	Chlormekvát	Metam sodium	Metazachlor
7.	2,4-D	Mankozeb	Acetochlor	Pendimethalin
8.	Methyl bromid	Terbuthylazin	Metam potassium	Pethoxamid
9.	Chlorpikrin	Chlorpyrifos	Chlorpikrin	Terbutylazin
10.	Pendimethalin	Metazachlor	Chlorthalonil	Chlorotoluron

Tabulka č.1 porovnává nejvíce používané pesticidy v USA a ČR z let 2007, 2012 a 2013 (Atwood a Paisley-Jones, 2017; ALS, 2015)

2.5. Případy zakázaných pesticidů před neonikotinoidy

Nejznámějším případem zakázaného pesticidu je DDT, který patří mezi organochlorové pesticidy. Byl poprvé syntetizován v roce 1874 (Hayes a Laws 1991), ale rozsáhlé průmyslové používání začalo od roku 1943. Používal se ke kontrole zemědělských a lesních škůdců, ale také ke kontrole přenašečů malárie a tyfu (Dunlap 1981). Bylo zjištěno, že je toxický pro sladkovodní a mořské mikroorganismy, ryby, obojživelníky, ptáky (WHO 1989). U dravých ptáků měl vliv na ztenčení vaječné skořápky, čímž snížil jejich reprodukční úspěch (Ratcliffe 1967). V lednu roku 1970 bylo Švédsko první zemí, která zakázala používání DDT (WHO 1989). V ostatních zemích bylo DDT zakázáno v roce 1972 nebo krátce poté (Hayes a Laws 1991). Nyní je tento insekticid regulován na základě Stockholmské úmluvy a může být použit pro kontrolu vektorů nemocí (ONU 2009). Dnes se insekticid DDT stále používá v některých oblastech Jižní Afriky pro boj s vektorem malárie (LSDI 2003). Biologický rozklad DDT je pomalý, je perzistentní v životním prostředí, hromadí se v potravinových řetězcích a ve tkáních živých organismů, kde se nejvíce akumuluje v tukách (Hayes a Laws 1991). Má řadu nepříznivých účinků na lidské zdraví a na životní prostředí, včetně zhoršení reprodukce (Beard a Collaboration 2006), narušení endokrinního systému (Turusov et al. 2002). DDT a některé jeho metabolity jsou mutagenní a karcinogenní (Robison et al. 1985). Rozsáhlé, intenzivní a nekontrolované používání má za následek

celosvětové znečištění (WHO 1989). V současné době by měly být hledány účinné pesticidy, které by mohly plně nahradit DDT, ale bez negativních vlastností (Turusov et al. 2002).

Zakázané POR se v EU a USA liší. Příkladem je herbicid acetochlor, u kterého studie dokázaly řadu toxických účinků na reprodukční, endokrinní a kardiovaskulární systém (Jiang et al., 2015; Yang et al., 2016). Některé publikace naznačují, že je pro člověka karcinogenní a může být i genotoxický (Ribas et al., 1997; Hurley et al., 1998; Green et al., 2000). Největším spotřebitelem acetochloru byla Čína a je nadále využíván v řadě zemích světa (Ye 2003). V USA se v roce 2012 zařadil mezi nejčastěji používané POR (Atwood a Paisley-Jones 2017) naproti tomu je v EU od roku 2012 zakázán (European Commission 2011). Dalším takovým příkladem je herbicid alachlor, který byl jedním z nejvíce používaných v USA. Bylo zjištěno, že ovlivňuje funkci štítné žlázy (Wilson et al. 1996), způsobuje tvorbu karcinomu nosu (Genter et al. 2000) a žaludku u potkanů (Thake et al. 1995). Studie ukázaly zvýšená rizika kolorektálního karcinomu a leukémie u pracovníků vyrábějících alachlor (Acquavella et al., 1996; Leet et al., 1996). V EU je od roku 2006 zakázáno jeho použití (European Commission 2006).

3. Vliv pesticidů na hmyz

Lidská činnost má značný podíl na ztrátě celosvětové biodiversity. Na konci 20. století tyto zásahy do přírodních ekosystémů dosahovaly 30 – 50 % (Vitousek et al. 1997). Ke snižování biodiversity nedochází pouze u obratlovců, ale také u zástupců bezobratlých, zejména hmyzu. (Dirzo et al. 2014). Biologická rozmanitost hmyzu je nezbytná pro správnou funkci všech ekosystémů. Zaručují nám službu opylování, ochranu proti škůdcům, dekompozici a také jsou přirozeným zdrojem potravy pro mnohé obratlovce (Davis et al., 2004; Kreuzweiser et al., 2007; Aizen et al., 2009).

Jedním z činitelů, který má svůj podíl na snižování celosvětové biodiversity je používání hnojiv a pesticidů (Tilman et al. 2001). Pesticidy by měly být selektivně toxické pro škůdce pro které jsou určeny, mohou však negativně ovlivňovat i necílové organismy. Pro hmyz jsou nejvíce toxické insekticidy, druhé v pořadí fungicidy a za nejméně toxické jsou považovány herbicidy (Sanchez-Bayo a Goka, 2014; Mulé et al., 2017). Herbicidy, ale také snižují biologickou rozmanitost vegetace v okolí zemědělských plodin, na kterých je řada zástupců hmyzu závislá (Egan et al. 2014). Příkladem úbytku zástupců hmyzu vlivem pesticidů je druh mola ve Spojeném království (Hahn et al. 2015), opylovačů (Brittain et al. 2010) či snížené populace motýlů a berušek v zahradách a sadech (Krischik et al. 2015).

U sladkovodních ekosystémů je pokles biodiversity obzvláště závažný (Dudgeon et al., 2006; Vörösmarty et al., 2010; McLellan et al., 2012). Antropogenní znečištění se do tekoucích vod dostává z povodí a nadměrný přísun živin snižuje vhodnost stanoviště pro mnoho sladkovodních organismů

(Smith et al. 1999). K necílovým zástupcům hmyzu ve sladkovodních ekosystémech se pesticidy dostávají odtokem, driftem nebo louhováním ze sousedních zemědělských oblastí (Cerejeira et al., 2003; Schulz, 2004). Ve sladkých vodách žije především mnoho larev hmyzu z řádu *Diptera* (Ferrington 2007), *Ephemeroptera* (Barber-James et al. 2007), *Trichoptera* (Fochetti a De Figueroa 2007) a *Plecoptera* (De Moor a Ivanov 2007). Larvy jsou zdrojem potravy pro ryby, obojživelníky, ptáky a zároveň slouží jako bioindikátory sladkovodního prostředí (McCafferty 1983). Insekticidy zhoršují životaschopnost larev, způsobují akutní a chronickou toxicitu vodnímu hmyzu, čímž snižují jejich početnost (Katagi a Tanaka 2016). Dalším příkladem druhu, jehož populace v posledních letech klesají, je druh vážky *Sympetrum spp.*, která se vyskytuje v Japonsku na rýžových polích. Pro zemědělství jsou nepostradatelné, jelikož jsou hlavními predátory škůdců rýže. Aplikace insekticidu fipronilu má za následek pokles počtu nymf vážek (Jinguji et al. 2018).

Pesticidy mohou mít vliv i na imunitní systém, díky tomu se stávají náchylnější vůči různým patogenům a infekčním onemocněním (Collison et al. 2016). Dle studií insekticidimidakloprid zvyšuje houbové patogeny u termitů, tím dále ovlivňuje jejich schopnost sociální péče (Ramakrishnan et al. 1999). Podobně by to mohlo být i u včel medonosných (*Apis mellifera*) s patogeny rodu *Nosema* (James a Xu 2012).

3.1. Opylovači

Opylovači mají pro člověka nedocenitelnou hodnotu, protože se podílí na udržování zdravého a funkčního ekosystému, reprodukci volně rostoucích rostlin, produkci plodin a zajišťování potravin (Potts et al. 2016). Zlepšují a stabilizují výnosy přibližně 75 % rostlinných plodin na světě (Klein et al. 2006). Zemědělská plocha závislá na opylení se od roku 1961 mnohonásobně zvětšila a s tím se i trojnásobně zvýšila poptávka po opylení hmyzem (Aizen a Harder 2009). Není možné, aby se na tom podílel pouze jeden druh *A. mellifera*. Na opylení se podílí také třeba čmeláci, samotářské včely, vosy, brouci, motýli a můry (Garibaldi et al. 2011).

Za posledních padesát let byl zaznamenán úbytek druhové bohatosti volně žijících včel a jiných opylovačů, několik druhů dokonce vyhynulo (Goulson et al. 2015). Používání pesticidů je považováno za jeden z nejrizikovějších faktorů, který má vliv na úbytek opylovačů (Scott-Dupree et al., 2009; Cresswell, 2011; Gill et al., 2012). Biodiversita divokých včel a motýlů bývá nižší v krajinách více zatížených pesticidy s vyšším rizikem expozice (Brittain et al. 2010). Pokles druhů divokých včel byl pozorován ve Velké Británii, Nizozemsku (Biesmeijer et al. 2006) a USA (ANON. 2015b). Regionální hodnocení Červeného seznamu pro Evropu naznačuje, že je ohroženo 9 % druhů včel (Niето et al. 2014) a 9 % druhů motýlů (McLellan et al. 2010). Podíl pro včely může být podstatně vyšší, protože

není dostatek údajů pro některé druhy. V současné době není hodnoceno 57 % evropských druhů. Pro několik evropských zemí jsou k dispozici Červené seznamy, které ukazují ohrožení 50 % včelích druhů na národní úrovni (Nieto et al. 2014).

Stupeň rizika se odvíjí od kombinace toxicity pesticidů a úrovně expozice. Záleží na biologii a fyziologii daného druhu, například na schopnosti metabolizovat toxiny nebo na strategii krmení. Rozdíl je také mezi chemickými sloučeninami pesticidů, hospodařením s půdou (Godfray et al., 2014; Van Der Sluijs et al., 2015), interakcí s jinými stresory (Vanbergen a Initiative, 2013; Collison et al., 2016) či krajinnou infrastrukturou (Park et al. 2015). Herbicidy představují nepřímé riziko, protože snižují rozmanitost a hojnost kvetoucích rostlin, které poskytují opylovačům nektar (Gabriel a Tschardt 2007).

V experimentálních podmínkách byla pro pesticidy, hlavně insekticidy, prokázána řada letálních a subletálních účinků na opylovače. Terénní studie hodnotící účinky reálné expozice pesticidů na opylovače však poskytuje rozdílné důkazy o jejich účinku na základě zkoumaných druhů a použitých pesticidů (Godfray et al. 2014). Například polní experiment prokázal sníženou schopnost přežití a reprodukci divokých včel po skutečné expozici neonikotinoidů (Rundlöf et al. 2015).

Společenské včely spoléhají na vzájemnou spolupráci mnoha jedinců, kteří vykonávají úkony, aby zajistili správný chod kolonie. Krmení je jedním ze základních úkonů, protože růst kolonií je závislý na nepřetržitém zásobení potravou. Proto všechny faktory, které negativně ovlivňují krmení, mohou mít vážné důsledky pro přežití kolonií a reprodukci (Gill et al., 2012; Bryden et al., 2013). Laboratorní a polní studie včel naznačují, že vystavení reálným koncentracím pesticidů v terénu může ovlivnit motorické funkce (Williamson et al. 2013), schopnost učení (Decourtye et al., 2005; Williamson a Wright, 2013), komunikaci (Eiri a Nieh 2012), a zhoršit schopnost hledání potravy (Yang et al., 2008; Mommaerts et al., 2010; Henry et al., 2012; Schneider et al., 2012; Fischer et al., 2014) .

Většina studií je však zaměřena na behaviorální účinky, které následují po akutní expozici, tedy do 48 hodin od expozice. Ale opylovači jsou v terénu vystaveni reziduím pesticidů po delší dobu (Garthwaite et al. 2012). I přes nedostatek důkazů o účincích pesticidů, by měla být eliminována rizika pro opylovače a další necílové organismy. Správné posouzení rizik všech složek pesticidů a následná regulace sníží ohrožení životního prostředí pesticidy v celostátním měřítku (Fischer a Moriarty 2014). Hodnocení vlivu pesticidů se provádí především pro *A. mellifera*. Na jiné druhy opylovačů mohou mít pesticidy jiné účinky, proto by bylo vhodné testovat i jiné druhy. Je to jeden ze způsobů, jak snížit riziko negativních dopadů (Vanbergen a Initiative 2013).

3.1.1. Rod včela (*Apis*)

Do rodu včela (*Apis*) patří kromě nejznámějšího druhu *A. mellifera* ještě druh včela východní (*Apis cerana*), včela sundská (*Apis koschevnikovi*), včela celebeská (*Apis nigrocincta*), včela sabašská (*Apis nuluensis*), včela květná (*Apis florea*), včela trpasličí (*Apis andreniformis*), včela obrovská (*Apis dorsata*) a další (Oldroyd et al. 1998). *A. mellifera* je společenský hmyz, který žije v koloniích, kde mají jednotlivé včely speciální úkoly. Kolonii zakládá menší skupina včel spolu s matkou. Dospělé včelstvo čítá několik tisíc až desítky tisíc jedinců. Matka produkuje oplozená a neoplozená vajíčka.

Z neoplozených vajíček se rodí trubci, jejichž jediným úkolem je oplodnit nové královny. Z oplozených vajíček se rodí dělnice nebo královny. Většinu jedinců v úlu tvoří dělnice, které vykonávají všechny činnosti nezbytné pro udržení a přežití kolonie (Fairbrother et al. 2014). Historie včelařství sahá až do období, které předcházelo zemědělství (Dams, 1978; Pattinson, 2012). Poskytují nám neocenitelnou ekosystémovou službu jako primární opylovači divokých i zemědělských rostlin. Včely nám umožňují využívat včelí produkty jako med, propolis a mateří kašičku. Ty dále používáme ve farmakologii (Banskota et al., 2001; Jull et al., 2015), vědě, technologii (Srinivasan 2011), gastronomii a mají pro nás kulturní hodnotu (Jensen et al. 2019).

V posledních desetiletích se objevil celosvětový fenomén CCD (Kluser et al., 2010; vanEngelsdorp a Meixner, 2009). Jednou z pravděpodobných příčin úhynů včelstev je používání pesticidů (Klein et al., 2006; Potts et al., 2010; Nakasu et al., 2014). Včelstva bývají vystaveny působení akaricidů, například tauluvalinátu a coumaphosu, které se využívaly pro kontrolu roztoče kleštíka zhoubného nebo včelího (*Varroa destructor*). Jsou to lipofilní sloučeniny, které se hromadí ve vosku a mohou se dostat i do ostatních složek jako je med, pyl a mateří kašička (Wallner, 1999; Kochansky et al., 2003; Tremolada et al., 2011). Potravinové zdroje, které byly kontaminovány akaricidy, mohou u larev a dospělých jedinců vyvolat subletální účinky. Expozice těmto sloučeninám přispívá ke zhoršené schopnosti přežití matky nebo ke stresu dělnic (Oliver a Lost 2009). Přítomnost coumaphosu a taufluvalinátu ve včelím vosku může snížit přežití plodu (Medici et al. 2012) a zvýšit mortalitu včel (Johnson et al., 2009; 2013). Trubci, kteří jsou vystaveni akaricidům v době vývoje, mohou mít v dospělosti nižší tělesnou hmotnost a nižší počet spermií (Rinderer et al. 1999).

V pylu byl detekován i fungicid chlorothalonil, který může mít za následek kontaminaci pylu a úhyny včelstev (vanEngelsdorp et al. 2009). Fungicidy v uloženém pylu mohou inhibovat růst pro včely prospěšných hub, což může snižovat nutriční hodnotu pylu (Zhu et al. 2014). V minulosti již byly zaznamenány negativní vlivy pesticidů na včely. Konkrétně v letech 1966 až 1979 a způsobila to expozice karbamátu, pyrethroidu, organochlorovým a organofosforovým pesticidům (Johnson et al.

2010). Organofosforové insekticidy byly spojovány s otravami včel (Fletcher a Barnett 2003). Výše uvedené pesticidy byly nahrazeny novými insekticidy, konkrétně neonicotinoidy a fenylpyrazoly (Johnson et al. 2010). V poslední době vzniklo mnoho studií, které se zabývají možnými negativními účinky neonicotinoidů na včely. V laboratorních a terénních studiích se zvýšil počet důkazů o tom, že by používání neonicotinoidů mohlo vést k úbytku volně žijících populací včel (Woodcock et al. 2016). Existuje mnoho možných způsobů expozice včel neonicotinoidy. Existují různé způsoby expozice včel neonicotinoidy. Mohou se s nimi setkat při příjmu potravy, přímým kontaktem s postřikem a prachem během aplikace insekticidu, kontaktem s ošetřenými rostlinami, půdou, vodou, použitím chladicí vody v úlu a inhalací kontaminovaného vzduchu (Van der Sluijs et al. 2013). Sběrem a přepravou kontaminovaného pylu do úlu může být celá kolonie vystavena pesticidům (Villa et al. 2000). V podobě vosku, medu a mateří kašičky jsou pesticidy uchovávány v úlu a potom se dále krmením dostávají k larvám i matce (Beekman a Ratnieks, 2000; Steffan-Dewenter a Kuhn, 2003). Možné negativní vlivy neonicotinoidů na opylovače jsou blíže popsány v kapitole Zákaz neonicotinoidů.

3.1.2. Colony collapse disorder (CCD)

Pojem CCD je charakterizován rychlým vymizením populace dělnic ze včelstev *A. mellifera*, ve kterých zůstal zdravý plod a dostatek potravy (Evans et al. 2009). Počet zmizelých dělnic neodpovídá počtu mrtvých, které se nacházejí v úlu nebo v jeho blízkosti. Dělnice, které v úlu zůstaly, nejsou schopny postarat se o nenarozené plody a matku, proto zbylí jedinci i s matkou umírají a dochází k úhynu včelstva (Dainat et al. 2012).

Od roku 2006 byly hlášeny vysoké ztráty kolonií včelstev v Evropě i v Severní Americe, ale jejich příčiny nebyly známy. Úmrtnost kolonií je zdokumentovaná z USA v zimních měsících na přelomu roku 2006/2007 odpovídala 32 % (Vanengelsdorp et al. 2007), 2007/2008 36 % (Hayes Jr et al. 2008) a 2008/2009 29 % (vanEngelsdorp et al. 2010). Výzkumy prokázaly, že v minulosti již došlo k regionálním poklesům populací včel, není však jisté, zda se jednalo přímo o CCD (Underwood a Vanengelsdorp 2007). V médiích byly často za viníky ztrát včelstev označovány mobilní telefony, nyní však víme, že to není pravda (Ratnieks a Carreck 2010). Existuje mnoho možných příčin, které by mohly stát za tímto jevem, ale chybí dostatek důkazů, které by to mohly jednoznačně prokázat.

Jedním z možných vysvětlení, kromě pesticidů je napadení včel parazity. Roztoč *V. destructor* je ektoparazit, který se živí hemolymfou včel, přenáší virová onemocnění a má vliv na zdraví včelstva (Oldroyd 1999). Většina včelařů, ale své včelstvo ošetřuje proti *Varroa*, aby tak mohli předejít možným ztrátám. *Varroa* sám o sobě není považován za příčinu CCD (Oldroyd 2007). Dalším parazitem je roztočik včelí (*Acarapis woodi*), což je endoparazit, který žije ve vzdušnicích včel a vysává jim

hemolymfu. Může přenášet patogeny oslabující včelstva (Rennie 1921). Hmyzomorka včelí (*Nosema apis*) a *N. ceranae* jsou vnitrobuněčné parazitické houby (mikrosporidie). Parazitují v cytoplasmě včel, způsobují poškození zažívacího ústrojí a vystavují svého hostitele bakteriím a virům (Watanabe 2008). Není pravděpodobné, že by *N. apis* byla přímou příčinou CCD, jelikož u včelstev, která bývají na jaře infikována tímto parazitem, nedochází ke kolapsu kolonií (Stanimirović et al. 2019). Druh *N. ceranae* pochází původem z asijských včel (Fries et al. 1996) a poměrně nově se rozšířil do Evropy a USA, vědci se domnívají, že mohl přispět k CCD (Paxton 2010).

Další možnou příčinou CCD může být expozice pesticidům. *A. mellifera* jsou neustále v kontaktu s plodinami ošetřenými pesticidy (Evans et al. 2009). V matricích úlu byla zjištěna různorodá škála pesticidů (Martel et al., 2007; Nguyen et al., 2009; Mullin et al., 2010). Laboratorní a terénní studie, které hodnotí vliv pesticidů na včely, identifikovaly řadu různých účinků. Jednak účinky smrtící, tedy přímou úmrtnost plodu a včel v úlu, ale také subletálních, například špatné navigační schopnosti vedoucí k další úmrtnosti či zhoršené schopnosti dospělých jedinců v důsledku expozice při vývoji plodu (Thompson 2003). CCD nemusí způsobit jeden pesticid, spíše se bude jednat o synergický účinek několika chemikálií nebo jejich metabolitů, spousta jich bylo nalezeno ve vosku, pylu a nektaru (Watanabe 2008).

S CCD bývá především spojována skupina pesticidů neonikotinoidy (Lundin et al., 2015; Simon-Delso et al., 2015). I malé množství těchto látek může zapříčinit zhoršenou orientaci, oslabení imunitního systému a snížení aktivity včel. Při vyšších dávkách způsobují paralýzu a smrt (Krupke a Long 2015). V nedávné době byly poskytnuty důkazy o jejich negativním vlivu na včely s pomocí polních experimentů (Woodcock et al., 2017; Tsvetkov et al., 2017). Expozice subletálním koncentracím prokázala zhoršení imunitního systému u včel, které zvyšuje možnou infekci různými viry či patogeny (Sánchez-Bayo et al. 2016). Neonikotinoidy jsou podrobněji popsány v následující kapitole.

Stále nemůžeme s jistotou tvrdit, co přesně způsobuje CCD. Může to mít na svědomí pouze jeden faktor nebo se může jednat o kombinaci několika výše zmíněných faktorů dohromady (Ratnieks a Carreck, 2010; Watson a Stallins, 2016). Je důležité zjistit strůjce kolapsu kolonií, abychom se do budoucna mohli možným ztrátám včelstev vyhnout. S rostoucí zemědělskou produkcí se zvyšuje i počet potřebných kolonií k opylování. Pokud by tento jev pokračoval, můžeme do budoucna očekávat nedostatek opylovačů. Jen od roku 1947 klesl počet kolonií včelstev produkujících med v USA o 61 % (vanEngelsdorp a Meixner 2010).

4. Neonikotinoidy

4.1. Charakteristika neonikotinoidů

Neonikotinoidy patří mezi systémové insekticidy využívané v zemědělství. Byly vyvinuty v období devadesátých let jako náhrada širokospektrálních pesticidů, které byly do té doby preferovány (Fairbrother et al. 2014). V následujících dvou desetiletích začalo jejich používání prudce stoupat. Nejpreferovanějším zástupcem skupiny neonikotinoidů se stal imidakloprid, který byl nejvíce prodávaným insekticidem a druhým mezi pesticidy v roce 2010 (Pollak 2011). Byl také registrován k použití ve 140 zemích a pro 120 různých druhů plodin (Jeschke et al. 2011). Díky tomu můžeme říct, že neonikotinoidy patřily mezi nejvíce využívané pesticidy s rozšířením po celém světě a možností aplikace na různé druhy rostlin.

Neonikotinoidy jsou syntetickou obdobou nikotinu, který je běžně používán jako insekticid. Řadí se mezi neurotoxické látky, které napadají nervovou soustavu hmyzu, mohou mu způsobit paralýzu či smrt (Fairbrother et al. 2014). Působí jako agonisté na nikotinových acetylcholinových receptorech (nAChR) a jsou odlišně toxické pro hmyz a savce (Matsuda et al. 2001). To je zapříčiněno rozdílným počtem nikotinových receptorů, přičemž obratlovci jich mají méně oproti hmyzu, proto představují větší riziko pro bezobratlé živočichy (Tomizawa a Casida 2004). Působí na specifický typ neuronových buněk (Kenyon cell) vyskytující se v mozku včel. Tyto buňky zprostředkovávají interakci, učení a paměť (Heisenberg 2003). Nutno upozornit, že v případě imidaklopridu bylo prokázáno na čmelácích, že kromě vlivu na nAChR potlačuje také syntézu mastných kyselin a mevalonátovou cestu (Erban et al. 2019). Název neonikotinoidy se běžně používá pro několik sloučenin, to ale neznamená, že jsou všichni zástupci této skupiny identičtí ve svých účincích. Bylo popsáno, že imidakloprid, thiamethoxam a klothianidin mají výraznou vazbu na nikotinové acetylcholinové receptory (Tomizawa a Casida 2000). Působí na specifický typ neuronových buněk (Kenyon cell) vyskytující se v mozku včel. Tyto buňky zprostředkovávají interakci, učení a paměť (Heisenberg 2003). Proto se předpokládá, že když se tyto sloučeniny dostanou do mozku za pomoci perorální expozice, tak mohou ovlivňovat kognitivní funkce včel (Blacquièere et al. 2012).

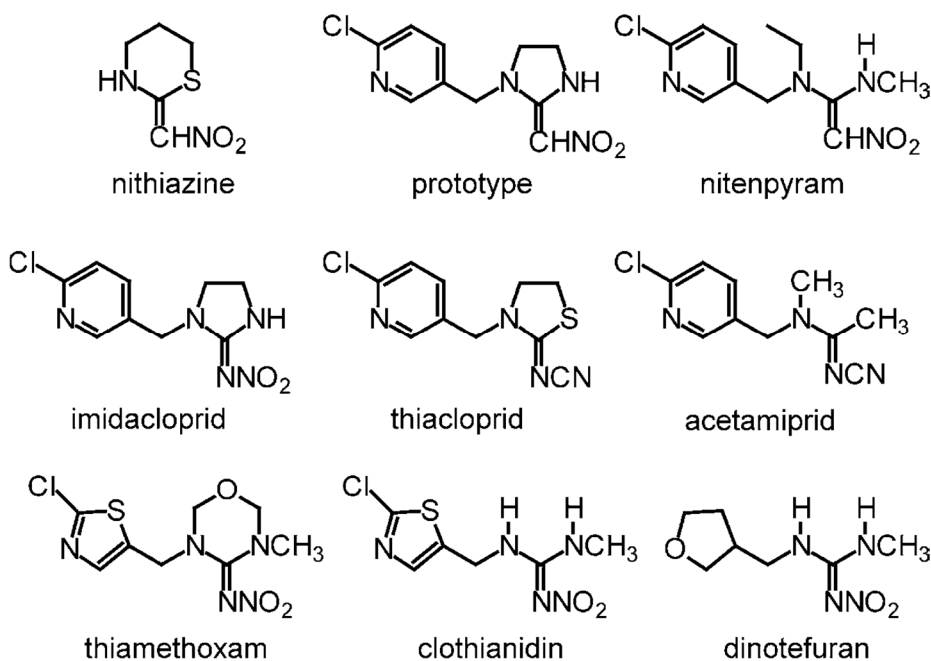
Neonikotinoidy se používají jako ochrana před savým hmyzem jako jsou mšice či molice, ale také před různými druhy brouků a jejich larev. Kromě využití v zemědělství se používají na lidské a zvířecí parazity, například na štěnice či blechy (Bass a Field 2018).

Aplikace na plodiny se provádí pomocí ošetření semen mořením nebo postřikem listů či půdy. Ošetření semen systémovými pesticidy je účinnější varianta ochrany rostlin před možnými škůdci či patogeny (Tansey et al. 2009). Po aplikaci vstupuje látka do všech rostlinných tkání a díky tomu se

stává toxickou pro kterýkoliv hmyz či jiný organismus živící se rostlinou. Rostlina je tedy přímo chráněna před býložravým hmyzem a nepřímo před rostlinnými viry, které jsou hmyzem přenášeny (Tomizawa a Casida 2011). Jedny z hlavních zemědělských plodin, na které se používají neonikotinoidní insekticidy, je řepka olejná (*Brassica napus*), kukuřice setá (*Zea mays*) a slunečnice (*Helianthus*) (Jeschke et al. 2011). Toxicita je proměnlivá v závislosti na rostlině, v potaz je brána růstová fáze nebo množství aplikovaného pesticidu. Fyzikální a chemické vlastnosti neonikotinoidů umožňují výskyt ve všech složkách životního prostředí, jako je voda, půda či ovzduší (Simon-Delso et al. 2015).

4.2. Druhy neonikotinoidů

Prvním uvedeným neonikotinoidem na trh s pesticidy se stal roku 1977 nithiazin. V současné době je celosvětově v zemědělském průmyslu využíváno sedm samostatných neonikotinoidních sloučenin. Patří mezi ně imidaklopid, thiaclopid, klothianidin, thiamethoxam, acetamiprid, nitenpyram a dinotefuran (Tomizawa a Casida 2004). Dále je tu osmá sloučenina sulfoxaflor (Zhu et al. 2011), která již vstoupila na trh v Číně. Čína je jedna z hlavních zemí, která vyvíjí a testuje nové druhy neonikotinových sloučenin. Příkladem je guadipyr či huanyanglin, které by se v budoucnu měly uvést na trh (Shao et al. 2013b). Nově vyvíjené formy jsou převážně izomery neonikotinoidů. To znamená, že mají kyanoskupiny či nitroskupiny v orientaci *cis*, nikoli *trans*. Izomery se proto mohou výrazně lišit ve svých vlastnostech nebo toxicitě (Shao et al. 2013a).



Obrázek č.1: Strukturální vzorce neonikotinoidů (Tomizawa a Casida 2004)

Akutní toxicita se vyjadřuje pomocí letální dávky, při které 50 % testovaných včel (LD₅₀) zemře do 24 nebo 48 hodin po expozici, ale může to být i déle, záleží na typu prováděného testu (OECD 1998).

Neonikotinoidy jsou pro včely vysoce toxické, a to při perorálním podání i při kontaktu (Laurino et al. 2011). Jsou vysoce toxické i pro jiné druhy opylovačů, například pro čmeláky (rod *Bombus*), samotářské včely rodu *Osmia* a čalounici vojtěškovou (*Megachile rotundata*) (Abbott et al., 2008; Scott-Dupree et al., 2009; Gradish et al., 2010; Mommaerts et al., 2010b).

	Akutní orální toxicita (LD ₅₀)	Akutní kontaktní toxicita (LD ₅₀)
Acetamidrid	14,53 µg/včela	8,01 µg/včela
Klothianidin	0,00379 µg/včela	0,04426 µg/včela
Imidakloprid	0,0037 µg/včela	0,081 µg/včela
Thiakloprid	17,32 µg/včela	38,82 µg/včela
Thiamethoxam	0,005 µg/včela	0,024 µg/včela

Tabulka č.2: Hodnoty akutní toxicity neonikotinoidů pro včely (Výzkumný ústav včelařský 2013)

4.3. Zákaz neonikotinoidů

V roce 2012 byly publikovány dvě studie s vysokým profilem, které ukázaly, že expozice neonikotinoidy v pylu a nektaru by mohla mít vážný vliv na schopnost navigace a přežití *A. mellifera* (Henry et al. 2012a) a na produkci matky a vývoj jedinců *Bombus terrestris* (Whitehorn et al. 2012). Evropská komise reagovala v květnu roku 2013 na rostoucí počet publikací o vlivu neonikotinoidů vydáním nařízení (EC) č. 485/2013, které stanovuje omezení použití tří druhů neonikotinoidů, do té doby využívaných k ošetření plodin (European Food Safety Authority (EFSA), 2013). Toto omezení se vztahovalo na imidakloprid, klothianidin, thiamethoxam a byl k nim přidán ještě insekticid fipronil, který nespadá mezi neonikotinoidy (European Food Safety 2013). Fipronil se řadí do skupiny fenylypyrazolů a s neonikotinoidy ho spojují podobné fyzikální a chemické vlastnosti, toxicita a doba setrvání v životním prostředí (Simon-Delso et al. 2015). Patří také mezi neurotoxiny a v nervové soustavě působí na receptory kyseliny γ-aminomáselné (GABA) (Law a Lightstone 2008).

Zákaz platí pro používání na kvetoucích plodinách, se kterými by mohly včely přijít do styku, jsou tu však i jisté výjimky. Využívat se mohou v uzavřených sklenících nebo mimo období kvetení. Do dvou let od zákazu musela Evropská komise začít s přezkumem nových vědeckých publikací, které zkoumaly vliv neonikotinoidů na opylovače (Gross 2013). Evropská komise nakonec zákaz potvrdila v únoru roku 2018 nařízeními č. 2018/783-785, která zcela zakazují venkovní používání tří zmíněných neonikotinoidů a fipronilu (European Commission, 2018c; European Commission, 2018a; European Commission, 2018b). Nařízení EC č. 1107/2009 stanovuje podle článku 53 nařízení o pesticidech, umožňuje povolit v mimořádných situacích používání zakázaných pesticidů tzv. „nouzové povolení“. To

znamená, že neonikotinoidy mohou být povoleny pouze pokud existuje nebezpečí pro rostlinnou produkci nebo pro ekosystémy (European Parliament 2009). Důvodem nouzového povolení může být i nedostatek pesticidů nahrazujících neonikotinoidy k zabránění invazi škůdců. Příkladem zemí, které si o používání neonikotinoidů opakovaně zažádaly, je Bulharsko (European Food Safety Authority (EFSA) 2018a), Estonsko (European Food Safety Authority (EFSA) 2018b), Finsko (European Food Safety Authority (EFSA) 2018c), Lotyšsko (European Food Safety Authority (EFSA) 2018d), Litva (European Food Safety Authority (EFSA) 2018e), Rumunsko (European Food Safety Authority (EFSA) 2018f) a Maďarsko (European Food Safety Authority (EFSA) 2018g). O používání neonikotinoidů si zažádalo i Česko z důvodu přetrvávajícího sucha (ANON. 2015a). Neonikotinoidy jsou široce používány mimo EU, například v USA a v ostatních státech se jejich využívání nadále zvyšuje (National Water-Quality Assessment (NAWQA) 2017). Ve světě v roce 2015 představovaly 25 % celkového trhu s insekticidy (Bass et al. 2015).

Název neonikotinoidy se běžně používá pro řadu sloučenin, to ale neznamená, že jsou všichni zástupci této skupiny identičtí ve svých účincích. Bylo popsáno, že imidaklopid, thiamethoxam a klothianidin mají výraznou vazbu na nikotinové acetylcholinové receptory (Tomizawa a Casida 2000). Proto se předpokládá, že když se tyto sloučeniny dostanou do mozku za pomoci perorální expozice, tak mohou ovlivňovat kognitivní funkce včel (Blacquière et al. 2012).

V roce 2002 byly ve Francii odebrány vzorky pylu včel, z nichž 69 % obsahovalo zbytky imidaklopidu a jeho metabolitů (Chauzat et al. 2006). V systému odběru vzorků, který probíhal po dobu tří let na pěti lokalitách byl imidaklopid nalezen ve 40,5 % pylu a 21,8 % medu (Chauzat et al., 2009; Chauzat et al., 2011). Ztráty včelstev byly zdokumentovány v Itálii, Německu, Rakousku a Slovinsku, vlivem akutní intoxikací neonikotinoidů při kontaktu s prachem ze secích přístrojů (Gross, 2008; Sgolastra et al., 2012). Zlepšily se předpisy a technika setí, která se stala povinnou v celé Evropě (The European Commission 2010). I přes to jsou emise prachu stále značné a pro včely představují značné riziko (Girolami et al., 2012; Sgolastra et al., 2012; Tapparo et al., 2013). Akutní letální účinky neonikotinoidů ve vzduchu podporuje zvýšená vlhkost, která zvyšuje úmrtnost včel (Girolami et al. 2012).

Při nízkých koncentracích neonikotinoidů se mohou objevit subletální účinky. Ty zahrnují změny chování a fyziologie včel, nezpůsobují přímo smrt jedince nebo kolonie, ale může zapříčinit zvýšenou citlivost kolonie, která může přispět k jejímu kolapsu. Subletální účinky neonikotinoidů mají vliv na neurofyziologii, imunologii, plodnost, poměr pohlaví, mobilitu, navigaci a orientaci v prostoru, larvální vývoj, dožitý věk dospělců, stravování a učení (Desneux et al. 2007).

Důležité jsou také synergické účinky několika druhů pesticidů. K synergii dochází, když je účinek kombinace stresorů vyšší než součet účinků každého stresoru zvlášť. Při kombinaci neonikotinoidů s některými fungicidy nebo jinými POR se může zvyšovat toxicita vlivem jejich kombinace (Iwasa et al., 2004; Krohn et al., 2008). Silný synergický účinek byl zjištěn při kombinaci fungicidu triflumizolu s thiaklopridem, který byl pro včely akutně toxický o 1141 krát více (Iwasa et al. 2004). Neonikotinoidy mají synergické účinky i s infekčními patogeny. Dlouhodobé vystavení neletální dávce neonikotinoidů a fipronilu má za následek vyšší citlivost vůči infekci mikrosporidii *N. ceranae* (Aufauvre et al., 2012; Pettis et al., 2012).

Fipronil je s největší pravděpodobností viník masové úmrtnosti *A. mellifera*, která byla pozorována ve Francii v devadesátých letech (Maxim a Van Der Sluijs 2010). Oproti imidaklopridu má silnější účinky při dlouhodobé expozici (Holder et al. 2018). Ze subletálních dopadů se projevily škodlivé účinky na intenzitu krmení a schopnost navigace (Decourtye et al. 2011), což by mohlo urychlit selhání kolonií. Podobná masová úmrtnost, která podporuje hypotézu o negativním vlivu fipronilu, byla pozorována v roce 2014 ve Švýcarsku, kdy se i navzdory zákazu používal v sadech v blízkosti včelstev (Holder et al. 2018). Byly zjištěny synergické účinky fipronilu s *N. ceranae*.

Včelstva, které byly dříve infikovány *N. ceranae* a jsou vystaveny subletálními dávkami fipronilu, mají vyšší mortalitu (Vidau et al. 2011). Funguje to i opačným způsobem, kdy včely po subletální expozici fipronilu jsou méně rezistentní vůči parazitovi (Franzen a Müller, 2001; Didier, 2005; Didier a Weiss, 2011), .

4.4. Zhodnocení zákazu neonikotinoidů

Možná hrozba neonikotinoidních insekticidů aplikovaných na kvetoucí rostliny byla předmětem rozsáhlé diskuse (Henry et al., 2012; Whitehorn et al., 2012; Cresswell et al., 2012; Rundlöf et al., 2015; Budge et al., 2015; Woodcock et al., 2016). Ze studií byly prokázány četné účinky neonikotinoidů na včely. Jiné studie naopak neprokázaly žádné účinky (Cutler et al., 2014; Christopher Cutler a Scott-Dupree, 2014). Prvotní důkazy o škodlivosti neonikotinoidních insekticidů pocházely z laboratorních studií, kde byly *A. mellifera* a *Bombus spp.* krmeny nebo lokálně ošetřeny insekticidem. Tyto experimenty ukázaly, že použité hladiny neonikotinoidů by mohly snížit produkci kolonií (Whitehorn et al. 2012), počet jedinců v kolonii a produktivitu (Gill et al. 2012), nebo zhoršit schopnost navigace (Henry et al. 2012a). Většina důkazů o subletálních účincích neonikotinoidů, které se přiklání k jejich zákazu pochází z laboratorních studií. Laboratorní studie, ale nemusí odrážet podmínky v terénu. Dříve byly zkoumány účinky expozice přes pyl a nektar s dávkováním hladin pesticidů pod úrovní, která by představovala nebezpečí (Blacquièrè et al. 2012). Proto takové studie

neprokázaly negativní vlivy pesticidů. Naopak většina studií, která uváděla negativní účinky, použila pro svá hodnocení koncentrace a dávky mnohem vyšší, než jaká je realistická expozice opylovačů v terénu (Walters 2013). Dále byly jednotlivé včely vystaveny insekticidu v jedné dávce, než aby jim byly vystaveny postupně, tak jak by včela ve volném prostředí sbírala nektar po mnoho dní (Carreck a Ratnieks, 2014; Henry et al., 2012a). Za potřebí jsou terénní studie, které hodnotí včelstva na plodinách ošetřených neonikotinoidy. Rozdílné výsledky studií mohou být zapříčiněny také použitím odlišného druhu neonikotinu, druhu včely nebo plodiny (Ratnieks et al. 2018).

Mezi využívané metody patří terénní studie, kdy jsou volně žijící kolonie *A. mellifera* a *Bombus sp.* krmeny cukernatým roztokem s realistickými koncentracemi pesticidů (Faucon et al., 2005; Dively et al., 2015). Dávkování i doba trvání studií zachycují široký rozsah možných expozičních koncentrací, včetně nejhorších možných případů (Dively et al. 2015). Příkladem je studie, kdy byly třem různě početným koloniím *A. mellifera* podávány dávky cukernatého roztoku s imidaklopridem o koncentracích 10, 20, 50, 100 ng g⁻¹ v nektaru. Byl pozorován negativní vliv na rychlost snášení vajíček u královen a na hygienické návyky. Při koncentraci 10 ng g⁻¹ již bylo možné pozorovat tyto negativní účinky (Wu-Smart a Spivak 2016). Kdyby byla tato studie prováděna s koncentracemi od 0 po 10 ng g⁻¹, tak by byla považována za relevantní, protože tento rozsah zahrnuje i průměrnou realistickou koncentraci 2 ng g⁻¹ v nektaru (Godfray et al. 2014). V tomto případě jsou však použité koncentrace mnohem vyšší, proto výsledky této studie nelze považovat za důkaz o škodlivosti neonikotinoidů vůči opylovačům v jejich přirozeném prostředí (Blacquièrre a van der Steen 2017).

Hodnocení účinků pesticidů se provádí především u *A. mellifera*, mohou se testovat i jiné druhy opylovačů, například *Bombus spp.* nebo samotářské včely. Hodnotí se akutní orální a kontaktní a chronická orální a kontaktní toxicita, dále se sledují účinky pesticidů v potravě, která je určena larvám. Toxicita však může být odlišná, záleží na tom, jak rychle daná včelstva dokáží přeměnit pesticidy na rozkladné produkty. Jsou i jiné metody k hodnocení vlivu pesticidů, například sledování srdeční aktivity a životaschopnost spermií nebo různé molekulární metody (Erban 2018b). Výzkumný ústav rostlinné výroby v Praze a kolektiv vyvinuli novou metodiku hodnocení vlivu xenobiotik na včely v průběhu ontogeneze metodami proteomické, metabolické a genomické analýzy. Tato metodika využívá analýzy moderními OMICS technologiemi, které poskytují velké množství informací ze vzorků. Analyzují stádia včel, která nepřijímají potravu a díky tomu poskytují informace o vlivu pesticidů na celé včelstvo. Důležitý je vliv na potomstvo, když je poškozen plod a poté se líhnou poškozené včely, může být ohrožena budoucnost celého včelstva (Erban 2018a). Další novou metodou, která stojí za zmínku je pozorování účinků pesticidů v hníždě čmeláků za pomoci kamerového monitorování. Tato metoda vystavila čmeláky realistickým úrovním imidaklopridu v nektaru. Byla zjištěna změna sociální a prostorové dynamiky v hníždě v závislosti na denní době. V noci se jejich aktivita výrazněji snížila než

ve dne (Crall et al. 2018). Po potvrzení zákazu tří neonikotinoidů Evropskou komisí v roce 2018 byl na molekulární úrovni proteomickými metodami prokázán negativní vliv na metabolické dráhy a související endokrinně disruptivní účinek imidaklopridu (Erban et al. 2019). Ve světle této studie se v případě imidaklopridu jeho zákaz jeví tedy jako správný.

I přes to, že existuje řada nových vědeckých publikací, které uvádějí informace o škodlivosti neonikotinoidů vůči opylovačům, především tedy pro včely a čmeláky, jednoznačné důkazy zatím stále chybí. Při porovnání s pesticidem DDT, acetochlorem, alachlorem, nejsou neonikotinoidy tak perzistentní v životním prostředí, proto by během pár let mohl být zhodnocen efekt jejich zákazu (Erban 2018b).

Po zákazu neonikotinoidů nebyly v některých zemích EU dostupné alternativy ošetření semen insekticidy, proto museli zemědělci přejít na neošetřená semena. Především tedy v Česku, Německu a Anglii spoléhali na ošetření listů. Nahradily je insekticidy pyrethroidy, které se aplikují postřikem (Kathage et al. 2018). V některých zemích se, ale u řady populací škůdců objevila rezistence vůči pyrethroidům, to vedlo k poškození plodin (Heimbach a Müller 2013). Příkladem je Spojené království, kde se na podzim roku 2014 a 2015 zvýšilo používání pesticidů 2,5krát. Problém by mohlo představovat i rozšíření zákazu, které se vztahuje na všechny polní plodiny, především tedy pro pěstitele cukrové řepy a obilovin, kteří jsou v současné době závislí na používání neonikotinoidů ke kontrole mšic a vektorových onemocnění plodin. Mšice jsou rezistentní vůči mnoha druhům insekticidů, proto bude jejich kontrola obtížnější (Bass a Field 2018). Docházelo i ke změnám v dobách setí, vyšší hustotě výsevu a většího výskytu škůdců. Díky tomu se většina zemědělců shodla na tom, že vzrostly náklady a požadavky na ochranu plodin. Průzkum údajů o výnosech za vegetační období před a po zákazu neonikotinoidů, ukázal malé nebo významnější změny v některých zkoumaných regionech, některé ovšem zůstaly beze změny. Alternativní ošetření semen vnímala většina zemědělců jako méně účinnou variantu než ošetření semen neonikotinoidy (Kathage et al. 2018). Zákaz neonikotinoidů ovlivňuje i spotřebu vody. S aplikací pyrethroidních postřiků bude zapotřebí více vody, tím pádem vzrostou i náklady. Kvůli zhoršeným výnosům bez použití neonikotinoidních insekticidů bude zapotřebí rozšířit ornou půdu na místo přírodních stanovišť, díky čemuž se sníží biologická diversita. S rozšířením orné půdy se zvýší i skleníkové plyny, konkrétně oxid uhličitý (CO₂) (HFFA Research 2016).

Další náhradou by mohly být nově vznikající insekticidy na bázi sulfoximinu (Brown et al. 2016). V mnoha zemích světa jsou již licencované, včetně Číny (Simon-Delso et al. 2015), Kanady (Pest Management Regulatory Agency 2016) a Austrálie (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority 2013). Studie, která hodnotila expozici včel v ekvivalentních dávkách sulfoxafloru, zjistila, že tento produkt může představovat značné riziko pro opylovače. Projevily se vážné subletální účinky na

kolonie *B. terrestris*. Kolonie produkovaly podstatně méně pracovníků a méně potomků schopných reprodukce (Siviter et al. 2018). Proto je důležité vyhodnotit jejich potencionální účinky na opylovače a vyhnout se tak dalším možným sporům, jako u neonikotinoidních insekticidů (Brown et al. 2016).

5. Závěr

Nelze jednoznačně tvrdit, zda byl zákaz používání imidaklopridu, klothianidinu a thiamethoxamu od roku 2013 v zemích EU správným rozhodnutím. Studie, které byly publikovány před zákazem a díky, kterým se omezilo používání neonikotinoidních insekticidů, prováděly výzkumy v laboratorních podmínkách krmením či lokálním ošetřením *A. mellifera* nebo *Bombus spp.* Tyto experimenty ukázaly, že použité hladiny neonikotinoidů by mohly snížit produkci kolonií, počet jedinců v kolonii a produktivitu, nebo zhoršit schopnost navigace. Studie použily pro svá hodnocení koncentrace a dávky většinou vyšší, než jaká je realistická expozice opylovačů v terénu. Dále byly jednotlivé včely vystaveny insekticidu v jedné dávce, než aby jim byly vystaveny dlouhodobě, tak jak by včela ve volném prostředí sbírala nektar anebo pyl. Z toho důvodu nelze považovat tyto studie za relevantní. Po omezení neonikotinoidů se objevovaly publikace dvojího typu. Prvním typem byly studie, které neprokázaly žádné subletální účinky na včely a druhý typ naopak pozoroval negativní účinky. Některé studie druhého typu byly již prováděny v terénních podmínkách, ale opět se používaly vyšší koncentrace neonikotinoidů v nektaru. Aby mohlo být jednoznačně určeno, zda neonikotinoidní insekticidy představují hrozbu pro opylovače, je zapotřebí více terénních studií s realistickou koncentrací a dávkou a s delší dobou expozice. V poslední době se vyvíjí nové metody hodnocení rizik pesticidů. Jednou z nich je hodnocení vlivu xenobiotik na včely v průběhu ontogeneze metodami proteomické, metabolické a genomické analýzy. Tato metodika využívá analýzy moderními OMICS technologiemi. Díky této metodě byl na molekulární úrovni proteomickými metodami prokázán negativní vliv na metabolické dráhy a související endokrinně disruptivní účinek imidaklopridu u *B. terrestris*. Další novou metodou je pozorování účinků pesticidů v hnízdě čmeláků za pomoci kamerového monitorování. Tato metoda vystavila čmeláky realistickým úrovním imidaklopridu v nektaru. Byla zjištěna změna sociální a prostorové dynamiky v hnízdě v závislosti na denní době. Na základě těchto studií lze tvrdit, že v případě imidaklopridu se jeho zákaz jeví jako správný. Tyto metodiky by v budoucnu mohly najít uplatnění v mezinárodním hodnocení rizik pesticidů na opylovače a mohly by poskytnout nové výsledky ke kauze s neonikotinoidními insekticidy. Stále však chybí více informací o možných negativních vlivech klothianidinu a thiamethoxamu na opylovače.

Neonikotinoidy byly spojovány také s jevem CCD, pro který je charakteristické rychlé vymizení populace dělnic z kolonií druhu *A. mellifera*, ve kterých zůstaly zdravé plody a dostatek potravy. Nebylo

prokázáno, že by neonikotinoidy či jiné pesticidy způsobovaly CCD, stále však není jisté, co přesně stojí za tímto jevem. Může to mít na svědomí pouze jeden faktor nebo se může jednat o synergický účinek několika faktorů dohromady. Mezi možné příčiny CCD patří roztok *V. destructor* a *A. woodi*, parazitické houby *N. apis* a *N. ceranae* či expozice pesticidů. Je důležité zjistit příčinu CCD, aby bylo možné v budoucnu předejít dalším úhynům včelstev.

Jelikož byly neonikotinoidy jedny z nejvíce používaných insekticidů, bylo obtížné najít za ně náhradu. Nejčastěji bývají po zákazu používány pyrethroidy, které se aplikují postřikem na listy rostlin. Aby byly plodiny zbaveny co nejvíce škůdců, musí se aplikovat mnohem větší dávky. To sebou přináší negativa v podobě spotřeby většího množství vody, vyšších finančních výdajů, větší zátěže na životní prostředí a více stráveného času na polích. V některých zemích byly dokonce pozorovány nižší zemědělské výnosy oproti období používání neonikotinoidů. Dalším negativem je rozšiřování zemědělské plochy, snižování biodiversity či vypouštění více CO₂ do ovzduší. Existují ještě jiné možné náhrady, například pesticidy na bázi sulfoximinu, ale je ještě zapotřebí mnoho testů, aby bylo prokázáno, zda nebudou mít negativní vliv na opylovače, aby se tak mohlo předejít dalším zpětným zákazům pesticidů.

6. Seznam použité literatury

Abbott, V. A., Nadeau, J. L., Higo, H. A., & Winston, M. L. (2008). Lethal and sublethal effects of imidacloprid on *Osmia lignaria* and clothianidin on *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(3), 784-796.

Acquavella, J. F., Riordan, S. G., Anne, M., Lynch, C. F., Collins, J. J., Ireland, B. K., & Heydens, W. F. (1996). Evaluation of mortality and cancer incidence among alachlor manufacturing workers. *Environmental health perspectives*, 104(7), 728-733.

Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., & Klein, A. M. (2009). How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of botany*, 103(9), 1579-1588.

Aizen, M. A., & Harder, L. D. (2009). The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. *Current biology*, 19(11), 915-918.

ALS, (2015). ALS Pesticidy.

Anon. (2013). Registering plant protection products in the EU.

Anon. (2015a). *Emergency authorisation on Czech Republic for Thiamethoxam in 2015*.

Anon. (2015b). *Status of Pollinators in North America*.

Atwood, D., & Paisley-Jones, C. (2017). Pesticides industry sales and usage: 2008–2012 Market Estimates. *Washington, DC: US Environmental Protection Agency*.

Aufauvre, J., Biron, D. G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., ... & Blot, N. (2012). Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Scientific Reports*, 2, 326.

Australian pesticides and veterinary medicines authority (2013). *Gazette No. 13*

Authority, European Food Safety (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance fipronil. *EFSA Journal*. B.m.: Wiley Online Library, 11(5), 3158.

Banskota, A. H., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15(7), 561-571.

- Barber-James, H. M., Gattolliat, J. L., Sartori, M., & Hubbard, M. D. (2007). Global diversity of mayflies (Ephemeroptera, Insecta) in freshwater. In *Freshwater Animal Diversity Assessment* (pp. 339-350). Springer, Dordrecht.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S., & Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *121*, 78-87.
- Bass, C. & Field, L. M. (2018). *Neonicotinoids*. 2018.
- Beard, J., & Australian Rural Health Research Collaboration. (2006). DDT and human health. *Science of the total environment*, *355*(1-3), 78-89.
- Beasley, V. R., & Trammel, H. (1989). Insecticides. *Current Veterinary Therapy: Small Animal Practice*. WB Saunders, Philadelphia, PA, 97-107.
- Beekman, M., & Ratnieks, F. L. W. (2000). Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Functional Ecology*, *14*(4), 490-496.
- Biesmeijer, J. C., Roberts, S. P., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T., ... & Settele, J. (2006). Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, *313*(5785), 351-354.
- Blacquièrre, T., Smagghe, G., Van Gestel, C. A., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, *21*(4), 973-992.
- Blacquièrre, T., & van der Steen, J. J. (2017). Three years of banning neonicotinoid insecticides based on sub-lethal effects: can we expect to see effects on bees?. *Pest Management Science*, *73*(7), 1299-1304.
- Borras, E., Sanchez, P., Munoz, A., & Tortajada-Genaro, L. A. (2011). Development of a gas chromatography–mass spectrometry method for the determination of pesticides in gaseous and particulate phases in the atmosphere. *Analytica Chimica Acta*, *699*(1), 57-65.
- Brittain, C. A., Vighi, M., Bommarco, R., Settele, J., & Potts, S. G. (2010). Impacts of a pesticide on pollinator species richness at different spatial scales. *Basic and Applied Ecology*, *11*(2), 106-115.
- Brown MJF, Dicks LV, Paxton RJ, Baldock KCR, Barron AB, Chauzat M, Freitas BM, Goulson D, Jepsen S, Kremen C, Li J, Neumann P, Pattermore DE, Potts SG, Schweiger O, Seymour CL, Stout JC. 2016. A horizon scan of future threats and opportunities for pollinators and pollination. *PeerJ* *4*:e2249
- Bruns, H. A. (2003). Controlling aflatoxin and fumonisin in maize by crop management. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, *22*(2-3), 153-173.

- Bryden, J., Gill, R. J., Mitton, R. A., Raine, N. E., & Jansen, V. A. (2013). Chronic sublethal stress causes bee colony failure. *Ecology Letters*, *16*(12), 1463-1469.
- Budge, G. E., Garthwaite, D., Crowe, A., Boatman, N. D., Delaplane, K. S., Brown, M. A., ... & Pietravalle, S. (2015). Evidence for pollinator cost and farming benefits of neonicotinoid seed coatings on oilseed rape. *Scientific Reports*, *5*, 12574.
- Carlson, G. A. (1993). Pesticides and pest management. *Agriculture and Environmental Economics*, 268-318.
- Carreck, N. L., & Ratnieks, F. L. (2014). The dose makes the poison: have “field realistic” rates of exposure of bees to neonicotinoid insecticides been overestimated in laboratory studies?. *Journal of Apicultural Research*, *53*(5), 607-614.
- Cerejeira, M. J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valério, M. J., ... & Silva-Fernandes, A. M. (2003). Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Research*, *37*(5), 1055-1063.
- Chauzat, M. P., Carpentier, P., Martel, A. C., Bougeard, S., Cougoule, N., Porta, P., ... & Faucon, J. P. (2009). Influence of pesticide residues on honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. *Environmental Entomology*, *38*(3), 514-523.
- Chauzat, M. P., Faucon, J. P., Martel, A. C., Lachaize, J., Cougoule, N., & Aubert, M. (2006). A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *Journal of Economic Entomology*, *99*(2), 253-262.
- Chauzat, M. P., Martel, A. C., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., ... & Faucon, J. P. (2011). An assessment of honeybee colony matrices, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *30*(1), 103-111.
- Cutler, G. C., & Scott-Dupree, C. D. (2014). A field study examining the effects of exposure to neonicotinoid seed-treated corn on commercial bumble bee colonies. *Ecotoxicology*, *23*(9), 1755-1763.
- Collison, E., Hird, H., Cresswell, J., & Tyler, C. (2016). Interactive effects of pesticide exposure and pathogen infection on bee health—a critical analysis. *Biological Reviews*, *91*(4), 1006-1019.
- Cooper, J., & Dobson, H. (2007). The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection*, *26*(9), 1337-1348.

- Coscollà, C., López, A., Yahyaoui, A., Colin, P., Robin, C., Poinson, Q., & Yusà, V. (2017). Human exposure and risk assessment to airborne pesticides in a rural French community. *Science of the Total Environment*, 584, 856-868.
- Crall, J. D., Switzer, C. M., Oppenheimer, R. L., Versypt, A. N. F., Dey, B., Brown, A., ... & de Bivort, B. L. (2018). Neonicotinoid exposure disrupts bumblebee nest behavior, social networks, and thermoregulation. *Science*, 362(6415), 683-686.
- Cresswell, J. E. (2011). A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*, 20(1), 149-157.
- Cresswell, J. E., Page, C. J., Uygun, M. B., Holmbergh, M., Li, Y., Wheeler, J. G., ... & Tyler, C. R. (2012). Differential sensitivity of honey bees and bumble bees to a dietary insecticide (imidacloprid). *Zoology*, 115(6), 365-371.
- Cutler, G. C., Scott-Dupree, C. D., Sultan, M., McFarlane, A. D., & Brewer, L. (2014). A large-scale field study examining effects of exposure to clothianidin seed-treated canola on honey bee colony health, development, and overwintering success. *PeerJ*, 2, e652.
- Dainat, B., vanEngelsdorp, D., & Neumann, P. (2012). Colony collapse disorder in Europe. *Environmental Microbiology Reports*, 4(1), 123-125.
- Dams, L. R. (1978). Bees and honey-hunting scenes in the Mesolithic rock art of eastern Spain. *Bee World*, 59(2), 45-53.
- Davis, A. L., Scholtz, C. H., Dooley, P. W., Bham, N., & Kryger, U. (2004). Scarabaeine dung beetles as indicators of biodiversity, habitat transformation and pest control chemicals in agro-ecosystems. *South African Journal of Science*, 100(9-10), 415-424.
- De Moor, F. C., & Ivanov, V. D. (2007). Global diversity of caddisflies (Trichoptera: Insecta) in freshwater. In *Freshwater Animal Diversity Assessment* (pp. 393-407). Springer, Dordrecht.
- Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Cluzeau, S., & Pham-Delegue, M. H. (2005). Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(2), 242-250.

- Decourtye, A., Devillers, J., Aupinel, P., Brun, F., Bagnis, C., Fourrier, J., & Gauthier, M. (2011). Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology*, *20*(2), 429-437.
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review Entomology*, *52*, 81-106.
- Didier, E. S. (2005). Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica*, *94*(1), 61-76.
- Didier, E. S., & Weiss, L. M. (2011). Microsporidiosis: not just in AIDS patients. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *24*(5), 490.
- Dirzo, R., Young, H. S., Galetti, M., Ceballos, G., Isaac, N. J., & Collen, B. (2014). Defaunation in the Anthropocene. *Science*, *345*(6195), 401-406.
- Dively, G. P., Embrey, M. S., Kamel, A., Hawthorne, D. J., & Pettis, J. S. (2015). Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. *PLoS One*, *10*(3), e0118748.
- de Carvalho Dores, E. F. G., & Naria De-lamonica-freire, E. (1999). Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: Vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, *9*, 1-18.
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z. I., Knowler, D. J., Lévêque, C., ... & Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, *81*(2), 163-182.
- Dunlap, T. R. (1981). DDT: Scientists, Citizens, and Public Policy (Princeton: Princeton Univ. Press, 1981).
- European Food Safety Authority. (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam. *EFSA Journal*, *11*(1), 3067.
- European Food Safety Authority. (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin. *EFSA Journal*, *11*(1), 3066.
- Egan, J. F., Bohnenblust, E., Goslee, S., Mortensen, D., & Tooker, J. (2014). Herbicide drift can affect plant and arthropod communities. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *185*, 77-87.
- Eiri, D. M., & Nieh, J. C. (2012). A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing. *Journal of Experimental Biology*, *215*(12), 2022-2029.
- EPA, 2009. *Registering Pesticides*.

Erban, T., Sopko, B., Talacko, P., Harant, K., Kadlikova, K., Halesova, T., ... & Pekas, A. (2019). Chronic exposure of bumblebees to neonicotinoid imidacloprid suppresses the entire mevalonate pathway and fatty acid synthesis. *Journal of proteomics*, 196, 69-80.

Erban, T., (2018a). Nová metodika hodnocení rizik pesticidů na včely pro 21. století *Úroda*, 66(8), 2018, 40-42

Erban, T., (2018b). Pro a proti používání pesticidů : potřeba nové metodiky hodnocení. *Úroda*, 66(7), 2018, 32–34.

EUROPEAN COMMISSION, 2006. *COMMISSION DECISION of 18 December 2006*. 2006.

EUROPEAN COMMISSION, 2011. *COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) No 1372/2011 of 21 December 2011*.

EUROPEAN COMMISSION, Directorate-General for Health and Food Safety, 2018a. COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2018/783 of 29 May 2018 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance imidacloprid.

EUROPEAN COMMISSION, Directorate-General for Health and Food Safety, 2018b. COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2018/784 of 29 May 2018 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance clothianidin.

EUROPEAN COMMISSION, Directorate-General for Health and Food Safety, 2018c. COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2018/785 of 29 May 2018 amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance thiamethoxam.

European Communities, (1996). Commission Directive 96/46/EC of 16 July 1996 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. *Official Journal of the European Communities* L. 214, 18–24.

European Food Safety Authority. (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid. *EFSA Journal*, 11(1), 3068.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2018a. *Evaluation of the emergency authorisations granted by Member State Bulgaria for plant protection products containing clothianidin, imidacloprid or thiamethoxam*.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2018b. *Evaluation of the emergency authorisations granted by Member State Estonia for plant protection products containing clothianidin or thiamethoxam.*

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2018c. *Evaluation of the emergency authorisations granted by Member State Finland for plant protection products containing clothianidin or thiamethoxam.*

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2018d. *Evaluation of the emergency authorisations granted by Member State Latvia for plant protection products containing clothianidin or thiamethoxam.*

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2018e. *Evaluation of the emergency authorisations granted by Member State Lithuania for plant protection products containing clothianidin or thiamethoxam.*

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2018f. *Evaluation of the emergency authorisations granted by Member State Romania for plant protection products containing clothianidin, imidacloprid or thiamethoxam.*

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2018g. *Evaluation of the emergency authorisations granted by the Member State Hungary for plant protection products containing clothianidin, imidacloprid or thiamethoxam.*

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), 2018h. *How pesticides are regulated in the EU. EFSA and the assessment of active substances.*

EUROPEAN PARLIAMENT, 2009. *REGULATION (EC) No 1107/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 21 October 2009.*

Evans, J. D., Donovall, L., Mullin, C., Frazier, M., Frazier, J., Tarpy, D. R., ... & Pettis, J. S. (2009). "Entombed Pollen": A new condition in honey bee colonies associated with increased risk of colony mortality. *Journal of invertebrate pathology*, 101(2), 147-149.

Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., ... & Tarpy, D. R. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One*, 4(8), e6481.

Fairbrother, A., Purdy, J., Anderson, T., & Fell, R. (2014). Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(4), 719-731.

- Faucon, J. P., Aurières, C., Drajnudel, P., Mathieu, L., Ribière, M., Martel, A. C., ... & Aubert, M. F. (2005). Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, *61*(2), 111-125.
- Ferrington, L. C. (2007). Global diversity of non-biting midges (Chironomidae; Insecta-Diptera) in freshwater. In *Freshwater Animal Diversity Assessment* (pp. 447-455). Springer, Dordrecht.
- Fischer, D., & Moriarty, T. (Eds.). (2014). *Pesticide risk assessment for pollinators*. John Wiley & Sons.
- Fischer, J., Mueller, T., Spatz, A. K., Greggers, U., Gruenewald, B., & Menzel, R. (2014). Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PLoS One*, *9*(3), e91364.
- Fletcher, M. A. R. K., & Barnett, L. (2003). Bee pesticide poisoning incidents in the United Kingdom. *Bulletin of Insectology*, *56*(1), 141-145.
- Fochetti, R., & De Figueroa, J. M. T. (2007). Global diversity of stoneflies (Plecoptera; Insecta) in freshwater. In *Freshwater Animal Diversity Assessment* (pp. 365-377). Springer, Dordrecht.
- Francis L. W. Ratnieks, Nicholas J. Balfour & Norman L. Carreck (2018) Review: Have suitable experimental designs been used to determine the effects of neonicotinoid insecticides on bee colony performance in the field?, *Journal of Apicultural Research*, *57*:4, 586-592
- Franzen, C., & Müller, A. (2001). Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes and Infection*, *3*(5), 389-400.
- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S. B., & Pieniazek, N. J. (1996). *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, *32*(3), 356-365.
- Gabriel, D., & Tschardt, T. (2007). Insect pollinated plants benefit from organic farming. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *118*(1-4), 43-48.
- Garibaldi, L. A., Steffan-Dewenter, I., Kremen, C., Morales, J. M., Bommarco, R., Cunningham, S. A., ... & Holzschuh, A. (2011). Stability of pollination services decreases with isolation from natural areas despite honey bee visits. *Ecology Letters*, *14*(10), 1062-1072.
- Garthwaite, D. G., Hudson, S., Barker, I., Parrish, G., Smith, L., Pietravalle, S., ... & Hutton, S. (2012). Pesticide Usage Survey Reports 250. *Arable Crops in the United Kingdom*.
- Genter, M. B., Burman, D. M., Dingeldein, M. W., Clough, I., & Bolon, B. (2000). Evolution of alachlor-induced nasal neoplasms in the Long-Evans rat. *Toxicologic Pathology*, *28*(6), 770-781.

- Gill, R. J., Ramos-Rodriguez, O., & Raine, N. E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. *Nature*, *491*(7422), 105-108.
- Girolami, V., Marzaro, M., Vivian, L., Mazzon, L., Greatti, M., Giorio, C., ... & Tapparo, A. (2012). Fatal powdering of bees in flight with particulates of neonicotinoids seed coating and humidity implication. *Journal of Applied Entomology*, *136*(1-2), 17-26.
- Godfray, H. C. J., Blacquière, T., Field, L. M., Hails, R. S., Petrokofsky, G., Potts, S. G., ... & McLean, A. R. (2014). A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *281*(1786), 20140558.
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, *347*(6229), 1255957.
- Gradish, A. E., Scott-Dupree, C. D., Shipp, L., Harris, C. R., & Ferguson, G. (2010). Effect of reduced risk pesticides for use in greenhouse vegetable production on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Management Science*, *66*(2), 142-146.
- Green, T., Lee, R., Moore, R. B., Ashby, J., Willis, G. A., Lund, V. J., & Clapp, M. J. L. (2000). Acetochlor-induced rat nasal tumors: further studies on the mode of action and relevance to humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *32*(1), 127-133.
- Grisolia, C. K. (2005). Agrotóxicos: mutações, reprodução e câncer. In *Agrotoxicos: mutacoes, reproducao e cancer*. UNB.
- Gross, M. (2008). Pesticides linked to bee deaths, *Current Biology*, *18*(16), R684.
- Gross, M. (2013). EU ban puts spotlight on complex effects of neonicotinoids. *Current Biology*, *23*(11), R462-R464.
- Hahn, M., Schotthöfer, A., Schmitz, J., Franke, L. A., & Brühl, C. A. (2015). The effects of agrochemicals on Lepidoptera, with a focus on moths, and their pollination service in field margin habitats. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *207*, 153-162.
- Hayes Jr, J., Underwood, R. M., & Pettis, J. (2008). A survey of honey bee colony losses in the US, fall 2007 to spring 2008. *PLoS One*, *3*(12), e4071.
- Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., ... & Tsui, M. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?. *Environmental Health Perspectives*, *114*(Suppl 1), 40-50.

- Hayes, W. J., & Laws, E. R. (1991). Handbook of pesticide toxicology. In *Handbook of Pesticide Toxicology*. Academic Press.
- Heimbach, U., & Müller, A. (2013). Incidence of pyrethroid-resistant oilseed rape pests in Germany. *Pest Management Science*, *69*(2), 209-216.
- Heisenberg, M. (2003). Mushroom body memoir: from maps to models. *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(4), 266-275.
- Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J. F., Aupinel, P., ... & Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, *336*(6079), 348-350.
- HFFA research, 2016. *Economic and environmental impacts of banning neonicotinoids in the EU*.
- Holder, P. J., Jones, A., Tyler, C. R., & Cresswell, J. E. (2018). Fipronil pesticide as a suspect in historical mass mortalities of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, *115*(51), 13033-13038.
- Hurley, P. M. (1998). Mode of carcinogenic action of pesticides inducing thyroid follicular cell tumors in rodents. *Environmental Health Perspectives*, *106*(8), 437-445.
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J. T., & Roe, R. M. (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*, *23*(5), 371-378.
- James, R. R., & Xu, J. (2012). Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*, *109*(2), 175-182.
- Jensen, A. B., Evans, J., Jonas-Levi, A., Benjamin, O., Martinez, I., Dahle, B., ... & Foley, K. (2019). Standard methods for *Apis mellifera* brood as human food. *Journal of Apicultural Research*, *58*(2), 1-28.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2010). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(7), 2897-2908.
- Jiang, J., Wu, S., Liu, X., Wang, Y., An, X., Cai, L., & Zhao, X. (2015). Effect of acetochlor on transcription of genes associated with oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption in the early life stage of zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *40*(2), 516-523.
- Jinguji, H., Ohtsu, K., Ueda, T., & Goka, K. (2018). Effects of short-term, sublethal fipronil and its metabolite on dragonfly feeding activity. *PloS one*, *13*(7), e0200299.

- Johnson, R. M., Dahlgren, L., Siegfried, B. D., & Ellis, M. D. (2013). Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS One*, *8*(1), e54092.
- Johnson, R. M., Ellis, M. D., Mullin, C. A., & Frazier, M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity—USA. *Apidologie*, *41*(3), 312-331.
- Johnson, R. M., Pollock, H. S., & Berenbaum, M. R. (2009). Synergistic interactions between in-hive miticides in *Apis mellifera*. *Journal of Economic Entomology*, *102*(2), 474-479.
- Jull, A. B., Cullum, N., Dumville, J. C., Westby, M. J., Deshpande, S., & Walker, N. (2015). Honey as a topical treatment for wounds. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *6*(3), CD005083.
- Katagi, T., & Tanaka, H. (2016). Metabolism, bioaccumulation, and toxicity of pesticides in aquatic insect larvae. *Journal of Pesticide Science*, D15-064.
- Kathage, J., Castañera, P., Alonso-Prados, J. L., Gómez-Barbero, M., & Rodríguez-Cerezo, E. (2018). The impact of restrictions on neonicotinoid and fipronil insecticides on pest management in maize, oilseed rape and sunflower in eight European Union regions. *Pest Management Science*, *74*(1), 88-99.
- Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2006). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *274*(1608), 303-313.
- Kluser, S., Neumann, P., Chauzat, M. P., Pettis, J. S., Peduzzi, P., Witt, R., ... & Theuri, M. (2010). Global honey bee colony disorders and other threats to insect pollinators.
- Kochansky, J., Wilzer, K., & Feldlaufer, M. (2001). Comparison of the transfer of coumaphos from beeswax into syrup and honey. *Apidologie*, *32*(2), 119-125.
- Kolbe, W. (1982). Effect of different crop protection programmes on yield and quality of apples. II. 1967-1981. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*.
- Kreutzweiser, D., Good, K., Chartrand, D., Scarr, T., & Thompson, D. (2007). Non-target effects on aquatic decomposer organisms of imidacloprid as a systemic insecticide to control emerald ash borer in riparian trees. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *68*(3), 315-325.
- Krischik, V., Rogers, M., Gupta, G., & Varshney, A. (2015). Soil-applied imidacloprid translocates to ornamental flowers and reduces survival of adult *Coleomegilla maculata*, *Harmonia axyridis*, and *Hippodamia convergens* lady beetles, and larval *Danaus plexippus* and *Vanessa cardui* butterflies. *PLoS One*, *10*(3), e0119133.
- Krohn, P. W., Becker, R. C., & Hungenberg, H. (2008). *U.S. Patent Application No. 11/793,763*.

- Krupke, C. H., & Long, E. Y. (2015). Intersections between neonicotinoid seed treatments and honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, *10*, 8-13.
- Larson, S. J., Capel, P. D., & Majewski, M. S. (1997). Pesticides in Surface Waters. Distribution, Trends, and Governing Factors. Chelsea, Michigan. *Ann Arbor Press, Inc*, *3*, 373.
- Laurino, D., Porporato, M., Patetta, A., & Manino, A. (2011). Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. *Buletin of Insectology* , *64*(1), 107-13.
- Law, R. J., & Lightstone, F. C. (2008). Gaba receptor insecticide non-competitive antagonists may bind at allosteric modulator sites. *International Journal of Neuroscience*, *118*(5), 705-734.
- Leet, T., Acquavella, J., Lynch, C., Anne, M., Weiss, N. S., Vaughan, T., & Checkoway, H. (1996). Cancer incidence among alachlor manufacturing workers. *American Journal of Industrial Medicine*, *30*(3), 300-306.
- London, L., Beseler, C., Bouchard, M. F., Bellinger, D. C., Colosio, C., Grandjean, P., ... & Meijster, T. (2012). Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. *Neurotoxicology*, *33*(4), 887-896.
- LSDI, 2003. Lubombo Spatial Development Initiative: Malaria Control Programme.
- Lundholm, E. (1987). Thinning of eggshells in birds by DDE: mode of action on the eggshell gland. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, *88*(1), 1-22.
- Lundin, O., Rundlöf, M., Smith, H. G., Fries, I., & Bommarco, R. (2015). Neonicotinoid insecticides and their impacts on bees: a systematic review of research approaches and identification of knowledge gaps. *PLoS One*, *10*(8), e0136928.
- Marks, A. R., Harley, K., Bradman, A., Kogut, K., Barr, D. B., Johnson, C., ... & Eskenazi, B. (2010). Organophosphate pesticide exposure and attention in young Mexican-American children: the CHAMACOS study. *Environmental Health Perspectives*, *118*(12), 1768-1774.
- Martel, A. C., Zeggane, S., Aurières, C., Drajnudel, P., Faucon, J. P., & Aubert, M. (2007). Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar or Asuntol 50. *Apidologie*, *38*(6), 534-544.
- Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M., & Sattelle, D. B. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, *22*(11), 573-580.

- Maxim, L., & van der Sluijs, J. P. (2010). Expert explanations of honeybee losses in areas of extensive agriculture in France: Gaucho® compared with other supposed causal factors. *Environmental Research Letters*, 5(1), 014006.
- McCafferty, W. P. (1983). *Aquatic entomology: the fishermen's and ecologists' illustrated guide to insects and their relatives*. Jones & Bartlett Learning.
- McLellan, R., Grooten, M., & Almond, R. (2012). Living planet report 2012: biodiversity, biocapacity and better choices.
- Medici, S. K., Castro, A., Sarlo, E. G., Marioli, J. M., & Eguaras, M. J. (2012). The concentration effect of selected acaricides present in beeswax foundation on the survival of *Apis mellifera* colonies. *Journal of Apicultural Research*, 51(2), 164-168.
- Meixner, M. D. (2010). A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S80-S95.
- Mommaerts, V., Reynders, S., Boulet, J., Besard, L., Sterk, G., & Smagghe, G. (2010). Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology*, 19(1), 207-2015.
- Monaco, J. T., Weller, S. C., & Ashton, F. M. (2002). Herbicide registration and environmental impact. *Weed Science: Principles and Practices, 4th ed.*; Monaco, TJ, Weller, SC, Ashton, FM, Eds.
- Mulé, R., Sabella, G., Robba, L., & Manachini, B. (2017). Systematic review of the effects of chemical insecticides on four common butterfly families. *Frontiers in Environmental Science*, 5, 32.
- Mullin, C. A., Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R., & Pettis, J. S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One*, 5(3), e9754.
- Nakasu, E. Y., Williamson, S. M., Edwards, M. G., Fitches, E. C., Gatehouse, J. A., Wright, G. A., & Gatehouse, A. M. (2014). Novel biopesticide based on a spider venom peptide shows no adverse effects on honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1787), 20140619.
- NASDA, 2014. Pesticide application procedures. In: *National Pesticide Applicator Certification Core Manual*.
- NATIONAL WATER-QUALITY ASSESMENT (NAWQA), 2017. *Program Annual Pesticides Use Maps*.
- Neuenschwander, P. (2001). Biological control of the cassava mealybug in Africa: a review. *Biological Control*, 21(3), 214-229.

- Nguyen, B. K., Saegerman, C., Pirard, C., Mignon, J., Widart, J., Thirionet, B., ... & Haubruge, E. (2009). Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality?. *Journal of Economic Entomology*, 102(2), 616-623.
- Nieto, Ana & Roberts, Stuart & Kemp, James & Rasmont, Pierre & Kuhlmann, Michael & García Criado, Mariana & Biesmeijer, Jacobus & Bogusch, Petr & H. Dathe, Holger & De la Rúa, Pilar & De Meulemeester, Thibaut & Dehon, Manuel & Alexandre, Dewulf & Ortiz-Sanchez, Francisco & Lhomme, Patrick & Pauly, Alain & Potts, Simon & Praz, Christophe & Quaranta, Marino & Michez, Denis. (2014). European Red List of Bees. 10.2779/77003.
- OECD (1998), *Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris
- OFFICIAL JOURNAL OF EUROPEAN UNION, 2009. Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC.
- Oldroyd, B. P. (1999). Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(8), 312-315.
- Oldroyd, B. P., Clifton, M. J., Parker, K., Wongsiri, S., Rinderer, T. E., & Crozier, R. H. (1998). Evolution of mating behavior in the genus *Apis* and an estimate of mating frequency in *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 91(5), 700-709.
- Oldroyd, B. P. (2007). What's killing American honey bees?. *PLoS Biology*, 5(6), e168.
- OLIVER, Randy a Paradise LOST, 2009. The Synthetic Miticides@ Scientific Beekeeping.
- ONU, 2009. *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs)*.
- Park, M. G., Blitzer, E. J., Gibbs, J., Losey, J. E., & Danforth, B. N. (2015). Negative effects of pesticides on wild bee communities can be buffered by landscape context. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1809), 20150299.
- Pattinson, D. (2012). Pre-modern beekeeping in China: a short history. *Agricultural History*, 86(4), 235-255.
- Paxton, R. J. (2010). Does infection by *Nosema ceranae* cause "Colony Collapse Disorder" in honey bees (*Apis mellifera*)?. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 80-84.
- Pest management regulatory agency, 2016. *Registration Decision RD2016–12, Sulfoxaflor*.

- Pettis, J. S., Johnson, J., & Dively, G. (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*, *99*(2), 153-158.
- Pimentel, D., Acquay, H., Biltonen, M., Rice, P., Silva, M., Nelson, J., ... & D'amore, M. (1992). Environmental and economic costs of pesticide use. *BioScience*, *42*(10), 750-760.
- Pimentel, D., & Greiner, A. (1997). Environmental and socio-economic costs of pesticide use. *Techniques for reducing pesticide use: Economic and environmental benefits*, 51-78.
- Pollak, P. *Fine Chemicals—The Industry and the Business*, (2011).
- Popp, J., Petó, K., & Nagy, J. (2013). Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for sustainable development*, *33*(1), 243-255.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in ecology & evolution*, *25*(6), 345-353.
- Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H. T., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., ... & Raepel, C., Fabritius, M., Nief, M., Appenzeller, B. M., & Millet, M. (2014). Coupling ASE, sytilation and SPME–GC/MS for the analysis of current-used pesticides in atmosphere. *Talanta*, *121*, 24-29.
- Ratcliffe, D. A. (1967). Decrease in eggshell weight in certain birds of prey. *Nature*, *215*(5097), 208.
- Ratnieks, F. L., & Carreck, N. L. (2010). Clarity on honey bee collapse?. *Science*, *327*(5962), 152-153.
- Rennie, J. (1921). (4) Isle of Wight Disease in Hive Bees—Acarine Disease: The Organism associated with the Disease—*Tarsonemus woodi*, n. sp. *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, *52*(4), 768-779.
- Ramakrishnan, R., Suiter, D. R., Nakatsu, C. H., Humber, R. A., & Bennett, G. W. (1999). Imidacloprid-enhanced *Reticulitermes flavipes* (Isoptera: Rhinotermitidae) susceptibility to the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology*, *92*(5), 1125-1132.
- Ribas, G., Carbonell, E., Creus, A., Xamena, N., & Marcos, R. (1997). Genotoxicity of humic acid in cultured human lymphocytes and its interaction with the herbicides alachlor and maleic hydrazide. *Environmental and molecular mutagenesis*, *29*(3), 272-276.
- RINDERER, T E, L I DE GUZMAN, V A LANCESTER, G T DELATTE a J A STELZER, 1999. Control of *Varroa jacobsoni* with bottom board traps in honey bee hives. *American Bee Journal*.

- Robison, A. K., Schmidt, W. A., & Stancel, G. M. (1985). Estrogenic activity of DDT: Estrogen-receptor profiles and the responses of individual uterine cell types following o, p'-DDT administration. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 16(3-4), 493-508.
- Rundlöf, M., Andersson, G. K., Bommarco, R., Fries, I., Hederström, V., Herbertsson, L., ... & Smith, H. G. (2015). Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. *Nature*, 521(7550), 77.
- Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees—a risk assessment. *PloS one*, 9(4), e94482.
- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., & Desneux, N. (2016). Are bee diseases linked to pesticides?—A brief review. *Environment international*, 89, 7-11.
- Schneider, C. W., Tautz, J., Grünewald, B., & Fuchs, S. (2012). RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PloS one*, 7(1), e30023.
- Schulz, R. (2004). Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution. *Journal of Environmental Quality*, 33(2), 419-448.
- Scott-Dupree, C. D., Conroy, L., & Harris, C. R. (2009). Impact of currently used or potentially useful insecticides for canola agroecosystems on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae), *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae), and *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of Economic Entomology*, 102(1), 177-182.
- Sgolastra, F., Renzi, T., Draghetti, S., Medrzycki, P., Lodesani, M., Maini, S., & Porrini, C. (2012). Effects of neonicotinoid dust from maize seed-dressing on honey bees. *Bulletin of Insectology*, 65(2), 273-280.
- Shao, X., Liu, Z., Xu, X., Li, Z., & Qian, X. (2012). Overall status of neonicotinoid insecticides in China: production, application and innovation. *Journal of Pesticide Science*, D12-037.
- Shao, X., Swenson, T. L., & Casida, J. E. (2013). Cycloxyprid insecticide: nicotinic acetylcholine receptor binding site and metabolism. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(33), 7883-7888.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., ... & Goulson, D. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 5-34.
- Siviter, H., Brown, M. J., & Leadbeater, E. (2018). Sulfoxaflor exposure reduces bumblebee reproductive success. *Nature*, 561(7721), 109.

Smith, V. H., Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental pollution*, 100(1-3), 179-196.

Srinivasan, M. V. (2011). Honeybees as a model for the study of visually guided flight, navigation, and biologically inspired robotics. *Physiological reviews*, 91(2), 413-460.

Stanimirović, Z., Glavinić, U., Ristanić, M., Aleksić, N., Jovanović, N., Vejnović, B., & Stevanović, J. (2019). Looking for the causes of and solutions to the issue of honey bee colony losses. *Acta Veterinaria*, 69(1), 1-31.

Steffan-Dewenter, I., & Kuhn, A. (2003). Honeybee foraging in differentially structured landscapes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1515), 569-575.

Stickel, W. H., Stickel, L. F., Dyrland, R. A., & Hughes, D. L. (1984). DDE in birds: lethal residues and loss rates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 13(1), 1-6.

Tansey, J. A., Dosedall, L. M., & Keddie, B. A. (2009). Phyllotreta cruciferae and Phyllotreta striolata responses to insecticidal seed treatments with different modes of action. *Journal of Applied Entomology*, 133(3), 201-209.

Tapparo, A., Giorio, C., Soldà, L., Bogialli, S., Marton, D., Marzaro, M., & Girolami, V. (2013). UHPLC-DAD method for the determination of neonicotinoid insecticides in single bees and its relevance in honeybee colony loss investigations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(2-3), 1007-1014.

Thake, D. C., Iatropoulos, M. J., Hard, G. C., Hotz, K. J., Wang, C. X., Williams, G. M., & Wilson, A. G. (1995). A study of the mechanism of butachlor-associated gastric neoplasms in Sprague-Dawley rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 47(2-3), 107-116.

THE EUROPEAN COMMISSION, 2010. *Commission Directive 2010/21/EU amending Annex I to Council Directive 91/414/EEC as regards the specific provisions relating to clothianidin, thiamethoxam, fipronil and imidacloprid*. 2010.

Thompson, H. M. (2003). Behavioural effects of pesticides in bees—their potential for use in risk assessment. *Ecotoxicology*, 12(1-4), 317-330.

Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., ... & Swackhamer, D. (2001). Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science*, 292(5515), 281-284.

Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 247-268.

- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2011). Neonicotinoid insecticides: highlights of a symposium on strategic molecular designs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2883-2886.
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2000). Imidacloprid, thiacloprid, and their imine derivatives up-regulate the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor in M10 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 169(1), 114-120.
- Townson, H., Nathan, M. B., Zaim, M., Guillet, P., Manga, L., Bos, R., & Kindhauser, M. (2005). Exploiting the potential of vector control for disease prevention. *Bulletin of the World Health Organization*, 83, 942-947.
- Tremolada, P., Bernardinelli, I., Rossaro, B., Colombo, M., & Vighi, M. (2011). Predicting pesticide fate in the hive (part 2): development of a dynamic hive model. *Apidologie*, 42(4), 439-456.
- Tsvetkov, N., Samson-Robert, O., Sood, K., Patel, H. S., Malena, D. A., Gajiwala, P. H., ... & Zayed, A. (2017). Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science*, 356(6345), 1395-1397.
- Turusov, V., Rakitsky, V., & Tomatis, L. (2002). Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks. *Environmental health perspectives*, 110(2), 125-128.
- Underwood, R. M., & Vanengelsdorp, D. (2007). 1 Colony collapse disorder: have we seen this before?. *Bee Culture*, 35, 13-18.
- Van der Sluijs, J. P., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Van Lexmond, M. B., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., ... & Girolami, V. (2015). Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 148-154.
- Van der Sluijs, J. P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J. M., & Belzunces, L. P. (2013). Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 5(3-4), 293-305.
- Van Swaay, C., Cuttelod, A., Collins, S., Maes, D., Munguira, M. L., Šašić, M., ... & Wiemers, M. (2010). *European red list of butterflies*. Publications Office of the European Union.
- Vanbergen, A. J. (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540(7632), 220-229.
- Vanbergen, A. J., & Initiative, T. I. P. (2013). Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 11(5), 251-259.

- vanEngelsdorp, D., Hayes Jr, J., Underwood, R. M., & Pettis, J. S. (2010). A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 7-14.
- Vanengelsdorp, D., Underwood, R., Caron, D., & Hayes Jr, J. (2007). Estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: A report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *American Bee Journal*.
- Vidau, C., Diogon, M., Aufauvre, J., Fontbonne, R., Viguès, B., Brunet, J. L., ... & Belzunces, L. P. (2011). Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One*, 6(6), e21550.
- Villa, S., Vighi, M., Finizio, A., & Serini, G. B. (2000). Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen. *Ecotoxicology*, 9(4), 287-297.
- Vitousek, P. M., Mooney, H. A., Lubchenco, J., & Melillo, J. M. (1997). Human domination of Earth's ecosystems. *Science*, 277(5325), 494-499.
- Vörösmarty, C. J., McIntyre, P. B., Gessner, M. O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., ... & Davies, P. M. (2010). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, 467(7315), 555-561.
- VÝZKUMNÝ ÚSTAV VČELAŘSKÝ, 2013. *Závěrečná zpráva o plnění úkolů vyplývajících ze smlouvy o dílo č. 553/2013-17221 k úkolu č. 110048 A uzavřené mezi MZe ČR a VÚVČ v Dole k provedení analýzy rozsahu a vlivu používání vysoce rizikových insekticidů ze skupiny neonicotinoidů pro včely.*
- Wallner, K. (1999). Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*, 30(2-3), 235-248.
- Walters, K. (2013). Data, data everywhere but we don't know what to think? Neonicotinoid insecticides and pollinators. *Outlooks on Pest Management*, 24(4), 151-155.
- Watanabe, M. E. (2008). Colony collapse disorder: many suspects, no smoking gun. *Bioscience*, 58(5), 384-388.
- Watson, K., & Stallins, J. A. (2016). Honey bees and colony collapse disorder: A pluralistic reframing. *Geography Compass*, 10(5), 222-236.
- White, D. H., Mitchell, C. A., Wynn, L. D., Flickinger, E. L., & Kolbe, E. J. (1982). Organophosphate insecticide poisoning of Canada geese in the Texas Panhandle. *Journal of Field Ornithology*, 53(1), 22-27.
- Whitehorn, P. R., O'connor, S., Wackers, F. L., & Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336(6079), 351-352.

- Williamson, S. M., Moffat, C., Gomersall, M., Saranzewa, N., Connolly, C., & Wright, G. A. (2013). Exposure to acetylcholinesterase inhibitors alters the physiology and motor function of honeybees. *Frontiers in Physiology*, 4, 13.
- Williamson, S. M., & Wright, G. A. (2013). Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *Journal of Experimental Biology*, 216(10), 1799-1807.
- Wilson, A. G., Thake, D. C., Heydens, W. E., Brewster, D. W., & Hotz, K. J. (1996). Mode of action of thyroid tumor formation in the male Long–Evans rat administered high doses of alachlor. *Fundamental and Applied Toxicology*, 33(1), 16-23.
- Wilson, C. (1999). *Cost and policy implications of agricultural pollution, with special reference to pesticides* (Doctoral dissertation, University of St Andrews).
- Woodcock, B. A., Bullock, J. M., Shore, R. F., Heard, M. S., Pereira, M. G., Redhead, J., ... & Peyton, J. (2017). Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. *Science*, 356(6345), 1393-1395.
- Woodcock, B. A., Isaac, N. J., Bullock, J. M., Roy, D. B., Garthwaite, D. G., Crowe, A., & Pywell, R. F. (2016). Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England. *Nature Communications*, 7, 12459.
- World Health Organization. (1989). DDT and its derivatives: environmental aspects.
- World Health Organization. (2010). *International code of conduct on the distribution and use of pesticides: Guidelines for the Registration of Pesticides* (No. WHO/HTM/NTD/WHOPES/2010.7). Geneva: World Health Organization.
- WRI, 1999. *World Resources 1998-1999: Environmental change and human health*. 1999. B.m.: World Resources Institute, UNEP, UNDP, The World Bank.
- Wu-Smart, J., & Spivak, M. (2016). Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Scientific reports*, 6, 32108.
- Yang, E. C., Chuang, Y. C., Chen, Y. L., & Chang, L. H. (2008). Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(6), 1743-1748.
- Yang, M., Hu, J., Li, S., Ma, Y., Gui, W., & Zhu, G. (2016). Thyroid endocrine disruption of acetochlor on zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Journal of Applied Toxicology*, 36(6), 844-852.

Ye, C. (2003). Environmental behavior of the herbicide acetochlor in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71(5), 919-923.

Zhu, W., Schmehl, D. R., Mullin, C. A., & Frazier, J. L. (2014). Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PLoS One*, 9(1), e77547.

Zhu, Y., Loso, M. R., Watson, G. B., Sparks, T. C., Rogers, R. B., Huang, J. X., ... & Nugent, B. M. (2010). Discovery and characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide targeting sap-feeding pests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2950-2957.