



Bjelovarski sajam

HRVATSKI PČELARSKI SAVEZ
PČELARSKI SAVEZ BBŽ



10. MEĐUNARODNI PČELARSKI SAJAM



Medno!

8. i 9. 11. 2014.

SAJAMSKI PROSTOR GUDOVAC

ZBORNİK RADOVA - POPIS IZLAGAČA

PROGRAM 10. MEĐUNARODNOG PČELARSKOG SAJMA

Sajamski prostor Gudovac, 8. i 9. veljače 2014. godine

Subota, 8. veljače 2014.

10:00 Svečano otvaranje 10. međunarodnog pčelarskog sajma (Paviljon 4)

10:45 **Dr. sc. Maja Smodiš Škerl, dr.med.vet. (Slovenija)**
Osobitosti matica kranjske pčele značajne za uzgoj

11:45 **Igor Petrović, dipl.ing.agr. (Hrvatska)**
Proizvodnja sortnog meda

12:30 **Dr. sc. Daniela Laurino, DVM, Ph.D. (Italija)**
Otrovnost neonicotinoidnih insekticida za pčelinje zajednice

13:30 **Dario Frangen, prof. (Hrvatska)**
Razlike između ekološkog i konvencionalnog pčelarenja

Nedjelja, 9. veljače 2014.

10:00 **Prof. dr. sc. Nada Plavša, dr.med.vet. (Srbija)**
Nozemoza pčela-dijagnostika, preventiva i terapija

11:00 **Prof. dr. sc. Ivan Kosalec, dipl.ing.pharm. (Hrvatska)**
Farmaceutski pogled na propolis i proizvode

11:45 **Rajko Radivojac (BiH)**
Uzgoj matica i proizvodnja rojeva

12:45 **Doc. dr. sc. Ivana Tlak Gajger (Hrvatska)**
Značaj uvjetovanih bolesti pčela

13:45 **Grad Bjelovar i Agencija SJEVER-DAN, Varaždin**
predavač: **Miljenko Ernoić**
Mogućnost daljnjeg razvoja službe motrenja medenja u RH

OSTALA DOGAĐANJA TIJEKOM SAJMA:

Med u gastronomiji

Organizator: Udruga kuhara Hrvatske, Udruga kuhara grada Bjelovara i Udruga slastičara Hrvatske

Termini: subota i nedjelja – cijeli dan; **Mjesto održavanja:** Paviljon 1

OTROVNOŠĆ NEONIKOTINOIDNIH INSEKTICIDA ZAPČELINJE ZAJEDNICE

Daniela Laurino, Marco Porporato, Aulo Manino
University of Turin – DISAFA,
Via Leonardo da Vinci 44 - 10095 Grugliasco (Turin) – Italy;
e-mail: daniela.laurino@unito.it

Neonikotinoidi se svrstavaju u relativno noviju skupinu insekticida dizajniranih u 80 tim godinama, a karakterizira ih dobra učinkovitost budući su sistemici s dugotrajnim djelovanjem. Takvi insekticidi, ipak, pokazuju jaku otrovnost za kukce oprašivače, posebice medonosnu pčelu, uzrokujući i druge učinke koje je teško identificirati, poput poremećaja ponašanja, poteškoća s letenjem i pogoršanje socijalnih aktivnosti. Proteklih nekoliko godina u mnogim državama su prijavljivani alarmirajući pčelinji gubitci. U nekim slučajevima to je očito bila posljedica djelovanja neonikotinoidima tretiranog sjemena ili nakon tretiranja poljoprivrednih kultura.

Toksični učinci neonikotinoidnih insekticida thiametoxama, clothianidina, imidacloprida, acetamiprida i thiacloprida na medonosnu pčelu su istraživani u laboratoriju. Komercijalne formulacije raspršene su u šećernom sirupu ili vodi u najvišoj dozi označenoj na ljestvici proizvoda te su primijenjene u svrhu ispitivanja oralne i neizravne kontaktne probe za svaki pesticid. Clothianidin i thiametoxam su prouzročili više ugibanja nego netretirane kontrolne skupine pčela, te koje su također ispitane pri nižim koncentracijama dok ugibanja nisu postala statistički neznčajna u usporedbi s kontrolom. Akutna oralna otrovnost (AOT) LD₅₀, akutna neizravna kontaktna otrovnost (ICT) LC₅₀, i povećani kvocijent opasnosti su izračunati nakon 24, 48 i 72 sata od početka testiranja. Suprotno tome, acetamiprid i thiacloprid su prouzročili visoki mortalitet u usporedbi s netretiranim skupinama pčela samo u oralnim testovima otrovnosti gdje su uporabljene pčele koje su prethodno gladovale dva sata. Otrovnost neonikotinoidnih insekticida clothianidina, imidacloprida i thiametoxama su također istražene u laboratorijskim uvjetima na različitim genotipovima medonosne pčele (*Apis mellifera* L.). Oralne i neizravne kontaktne probe su provedene za svaki od navedenih pesticida, uporabom komercijalnih formulacija preparata te su izračunate AOT LD₅₀ i ICT LC₅₀. Srednja vrijednost AOT DL₅₀ pri 24, 48 i 72 sata od početka ispitivanja su bile istog redoslijeda veličine onih prikazanih u literaturi za sva tri neonikotinoidea. Statistički značajne razlike su utvrđene na nekoliko nivoa između istraživanih košnica na clothianidin, između *A. m. mellifera* pčelinje zajednice i četiri *A. m. ligustica* pčelinjih zajednica, te između *A. m. carnica*, *A. m. mellifera*, i *A. m. ligustica* pčelinjih zajednica ispitanih za thiametoxam.

Iako su ICT LC₅₀ vrijednosti utvrđene na malom broju zajednica, uočene su statistički značajne razlike u otrovnosti za imidacloprid i thiametoxam, ali ne za clothianidin. Rezultati potvrđuju da genetičke razlike u odgovoru na otrovnost pesticida u pčela postoje, ali one ne čine ključni čimbenik uključen u neravnomjerne rezultate uočene u

toksikološkim testovima. U svakom slučaju LD₅₀ ili neki drugi sličan parametar otrovnosti ne bi smio biti utvrđivan na samo jednoj zajednici.

Pčele koje su uginule tijekom ispitivanja su skladištene na -18 °C analizirane LC-MS/MS analitičkim protokolom prilagođenom AOAC metodama. Količina rezidua insekticida su bili utvrđeni u puno nižim koncentracijama od dopuštenih vrijednosti. Medonosne pčele koje nisu uginule unutar šest sati od početka ispitivanja su također analizirane i koncentracije insekticidnih rezidua su bile mnogo niže od količina rezidua utvrđenih u uginulim pčelama.

Neonikotinoidi se permanentno vežu na nikotinske receptore acetilkolina, blokiraju ih i posljedično blokiraju i prolazak živčanih impulsa (Tomizawa and Casida, 2005). Takav mehanizam djelovanja omogućava kontroliranje štetnih kukaca koji napadaju korijenje i one koji se hrane na površinskim dijelovima biljke. Neonikotinoidi su praktično prikladni za kontroliranje mnoštva kukaca s čeljustima prilagođenim za grizenje ili sisanje. Također, koriste se u zaštiti sjemena od štetnika u zemlji; oni budu apsorbirani i distribuirani po svim dijelovima mlade biljke. Njihova uporaba je vrlo raširena: voće, citrusi, grejp, poljoprivredne i industrijske kulture, cvijeće i ornamentalne biljke. Lisne uši, mušice, skakavci, niz kukaca, kukci koji žive u zemlji i kornjaši su ciljni štetnici (Muccinelli, 2008). Neonikotinoidi trenutačno prisutni na tržištu mogu se svrstati u dvije skupine 50kloronikotinoide i tianikotinoide, a na osnovu kemijske skupine koja ih karakterizira. Aktivne tvari trenutačno prisutne na tržištu u Italiji su: acetamiprid, clothianidin, imidacloprid, thiacloprid i thiamethoxam (Muccinelli, 2008).

Proteklih godina, smanjenje broja prirodnih oprašivača i “nestanak pčela” (CCD) postali su ozbiljna prijetnja koja može utjecati na proizvodnju mnogih poljoprivrednih kultura u Europi (Byrne and Fitzpatrick, 2009; Maini et al., 2010). Uporaba pesticida (točnije neonikotinoida) je navedena kao mogući čimbenik koji pridonosi pojavi CCD i jedan je od okolišnih stresora koji doprinosi smanjenju broja oprašivača, zajedno s drugim čimbenicima poput prisutnosti novih uzročnika bolesti, smanjenja raznolikosti staništa, štetnika i stresova vezanih uz prehranu. Većina neonikotinoida pokazuje jaku otrovnost za oprašivače, a posebice za medonosnu pčelu. Osim akutnih otrovanja može u subletalnim dozama prouzrokovati i druge učinke poput poremećaja u ponašanju, poteškoća u orijentaciji i nepravilnosti u socijalnom ponašanju (Desneux et al., 2007; Maini et al., 2010; El Hassani et al., 2008). Međutim, moguće je takve probleme ublažiti primjenom pravilne prakse (Riedl et al., 2006; Nikolakis et al., 2009), uzbuđivanjem pri masovnijim uginućima pčela i to posebno kod uporabe neonikotinoida za tretiranje sjemena ili za prskanje biljaka. Takve pojave su prijavljivane posljednjih godina i u nekim od zemalja su uvedena ograničenja za uporabu (Pistorius et al., 2009; Maini et al., 2010). Prijetnja medonosnim pčelama (*Apis mellifera* L.) i drugim oprašivačima od djelovanja većine insekticida i nekih fungicida te herbicida je poznata (Riedl et al., 2006; Desneux et al., 2007); zato je napravljena procjena rizika koja se trenutačno primjenjuje da bi se smanjili gubitci pčelinjih zajednica i da bi se informiralo korisnike o mogućim usputnim učincima (OEPP/EPPO, 2010). Ipak, neočekivani putevi unošenja insekticida u košnicu skupljačicama koje unose mikroenkapsuliranim insekticidima onečišćeni pelud (Stoner et al., 1979; Russell et al., 1998) ili, oslobađanjem prašine koja sadrži

insekticidima prekriveno sjeme prilikom uporabe neodgovarajućih strojeva (Greatti *et al.*, 2003; Chauzat *et al.*, 2010). Nepravilna i nedozvoljena uporaba pesticida može također utjecati na gubitke u pčelarstvu.

Dobro je poznato da se pojedine pasmine pčela međusobno razlikuju ne samo po morfološkim karakteristikama, nego i prema biokemijskim, fiziološkim i ponašajnim karakteristikama. Iste razlike može se uočiti između pojedinih ekotipova, populacija pa čak i pojedinačnih pčelinjih zajednica iste pasmine (Ruttner, 1988). Zato ne postoji razlog zašto ne bi postojale razlike u odgovoru na kontakt s toksičnim tvarima (Ladas, 1972; Mansour and Al-Jalil, 1985; Suchail *et al.*, 2000). Posljednje desetljeće korišteni su različiti pristupi za utvrđivanje i monitoring (Oomen 2001; Barnett *et al.*, 2007). U svakom slučaju, pojedinačno uzorkovanje uginulih pčela je ključna točka svakog protokola, posebice kad je količina utvrđenih rezidua bitna za postavljanje dijagnoze. U obzir se mora uzeti i mogućnost "gubitka" otrova u razdoblju od utvrđivanja uginuća pčela do analiziranja istih. Zato je nužno poduzeti odgovarajuća laboratorijska ispitivanja, preko izračunavanja LD₅₀, ne samo opasnost od tri aktivne tvari koje se najčešće koriste za tretiranje sjemena, nego i moguće razlike u osjetljivosti različitih genotipova medonosne pčele.

Uglavnom, koncentracije rezidua clothianidina, imidacloprida i thiametoxama su utvrđene nakon pokusno otrovanih pčela s ciljem određivanja gubitaka od tretiranja i za bolje razumijevanje uloge tih neonikotinoida u slučajevima otrovanja. Rezultati navedenih istraživanja su prezentirani i objavljeni u različitim člancima (Laurino, 2011; Laurino *et al.*, 2010, 2011, 2012 i 2013) te sažeto prikazani u ovom izvješću.

Materijali i metode

U pokusima su korištene komercijalne formulacije insekticida prisutne na tržištu u Italiji (Tablica 1). Učinak svakog od neonikotinoida je ispitan nakon uzimanja hranom i neizravnim kontaktom u najvećim dozvoljenim koncentracijama preporučenim za tretiranje kultura (poljske koncentracije). Ako je utvrđen 100% mortalitet ispitana su deseterostruko manja razrjeđenja i testiranja su ponavljana do koncentracije koja je uzrokovala uginuća koja se nisu značajno razlikovala od onih u netretiranih skupina pčela. Srednje koncentracije u rasponu između 100% i netretiranih kontrolnih skupina su također ispitivane s ciljem boljeg razumijevanja odgovora pčele na kontakt s otrovom. Pčele su smatrane uginulima kad su 10 sekundi bile potpuno mirne (Iwasa *et al.*, 2004). Za svaku skupinu (Tablica 2) uzeto je deset skupljačica s poletaljke svake pojedinačne košnice i smještene su u kaveze, ne kasnije od 15 minuta nakon hvatanja (Slika 1). Pčelinje zajednice iz kojih su uzete su periodički provjeravane da bi se isključila mogućnost pčelinjih bolesti. Testiranja su provedena u tamnoj sobi pri 28 do 30 °C i 70% relativnoj vlažnosti.

10. međunarodni pčelarski sajam

	Acetamiprid	Clothianidin	Imidacloprid	Thiacloprid	Thiamethoxam
Proprietary Formulation	Epik®	Dantop® 50WG	Confidor® 200SL	Calypso®	Actara® 25WG
Formulation	soluble powder in water-soluble bags	hydro dispersible granules	concentrated liquid soluble in water	concentrated suspension	hydro dispersible granules
a.i. %	5% w/w	50% w/w	17.1% w/w	40.4% w/w (480 g/l)	25% w/w
Field Concentration*					
- commercial formulation	150-200 g/hL	15 g/hL	75 g/hL	30 ml/hL	30-40 g/hL
- a.i.	7.5-10 g/hL	7.5 g/hL	15 g/hL	14.4 g/hL	7.5-10 g/hL
Crops	Ornamentals	Apple, Pear	Citrus, Courgette, Cucumber, Muskmelon, Potato, Strawberry, Ornamentals	Courgette, Cucumber, Muskmelon, Watermelon, Ornamentals	Apple, Pear
Pests	Whiteflies, Thrips	<i>Aphis pomi</i>	Aphids, Colorado potato beetle, Whiteflies	Whiteflies	Aphids, Psyllids, Leaf Miners, Sawflies
Highest Tested Concentration	100 ppm	75 ppm	150 ppm	144 ppm	100 ppm

Tablica 1. Karakteristike acetamiprida, clothianidina, imidacloprida, thiacloprida i thiamethoxama korištenih u istraživanjima. *najveća koncentracija preporučena za tretiranje poljoprivrednih kultura.

hive	subspecies	geographic origin	strain	clothianidin		imidacloprid		thiamethoxam	
				AOT	ICT	AOT	ICT	AOT	ICT
lig1	<i>A. m. ligustica</i>	Piedmont (Italy)	A	30(2)	30(2)	-	-	30(2)	30(2)
lig2	“	“	A	20(2)	-	20(2)	-	20(2)	-
lig3	“	“	A	20(2)	20(2)	30(2)	20(2)	30(2)	20(2)
lig4	“	“	A	-	-	-	-	30(3)	30(3)
lig5	“	“	B	20(2)	-	20(2)	-	20(2)	-
lig6	“	“	C	20(2)	-	20(2)	-	20(2)	-
mell1	<i>A. m. mellifera</i>	South-East France	D	20(2)	20(2)	30(2)	20(2)	30(2)	20(2)
car1a	<i>A. m. carnica</i>	Croatia	E	-	-	-	-	30(2)	30(3)
car1b	“	“	E	-	-	-	-	30(2)	-
car2	“	“	E	-	-	-	-	30(2)	-

Tablica 2. Pčelinje zajednice korištene u ispitivanjima I broj odraslih pčela uzetih za svaki od pojedinačnih testova.

Testovi akutne oralne otrovnosti

AOT su provedeni u kavezima 20x20x30 cm s dnom i dva nasuprotna zida od prozirnog plastičnog materijala te druga dva zida od najlonske mrežice veličine okanaca 300 µm. Nakon pripremanja potrebnom opremom i materijalom za ispitivanja, kavezi su zatvoreni s mrežastim poklopcima. Puštanje pčela i ostale aktivnosti su obavljane preko okruglog otvora na zidu promjera 10 cm i spojenog na 20 cm dugi rukavac. Pčele kontrolnih skupina su poslužene s 25% čistom šećernom otopinom, a pokusne skupine pčela istovjetnom šećernom otopinom kojoj su dodane poznate količine otrovnih tvari. Pripremljene otopine su poslužene preko hranilica napravljenih od 7 mm dugih i 28.2 mm unutarnjeg promjera kapsule u kojoj je umetnuta 25.9 mm široka i 70 mm duga cjevčica. Tako je dobiven 1.15 mm prstenasti prostor preko kojeg je pčelama omogućeno uzimanje otopina, a istodobno bez umakanja nogu. Otopine su pčelama bile na raspolaganju jedan sat, a nakon čega su hranilice zatvorene. Pčele su se mogle hraniti jedino šećernom pogačom koja je bila prisutna do kraja ispitivanja (Arzone and Vidano, 1974). S ispitivanjima je započeto u 12.00 h; a uginuća su provjeravana u 13.00 h, 15.00 h i 18.00 h prvog dana pokusa te u 9.00 h, 12.00 h, 15.00 h i 18.00 h narednih dana.



Slika 1. Kavezi pripremljeni za ispitivanja.
Neizravni kontaktni toksični testovi

Listovi španjolskog kestena (*Castanea sativa* Mill.) skupljeni su u šumi daleko od mogućih izvora onečišćenja, isprani s velikom količinom ručnim sprejom i ostavljeni da se osuše u sjeni oko tri sata. Korištene su vodena otopina ispitivanih proizvoda te čista voda za kontrolu. Tako pripremljeni listovi su zatim stavljeni po podu u kavezima (Slika 2.) Po 10 pčela je stavljeno u svaki od kaveza u kojima su se mogle slobodno kretati. Lišće je uklonjeno iz kaveza nakon tri sata.



Slika 2. Kavezi pripremljeni za neizravne kontaktne testove.

Tijekom ispitivanja pčelama je ponuđena hrana – šećerna pogača u hranilicama niskih stjenki (1 mm) tako da prilikom hranjenja nisu doticale pogaču, osim rilcem. Ispitivanje je započeto u 12.00 h a uginuća su provjeravana u 15.00 h i 18.00 h prvog dana pokusa te u 9.00 h, 12.00 h, 15.00 h i 18.00 h tijekom narednih dana.

AOT nakon gladovanja

Budući ni acetamiprid ni thiacloprid nisu pokazali škodljiv učinak na medonosne pčele u oba načina ispitivanja, naknadno su obavljena ispitivanja na gladnim pčelama. U tu svrhu pčele su izgladnjivane dva sata nakon hvatanja, držane na hladnom (11-13 °C) i tamnom. Preliminarnim testovima je pokazano da takvi uvjeti nisu utjecali na preživljavanje. Nakon razdoblja izgladnjivanja nastavljeno je s uobičajenim protokolom.

Utvrđivanje rezidua u uginulim pčelama

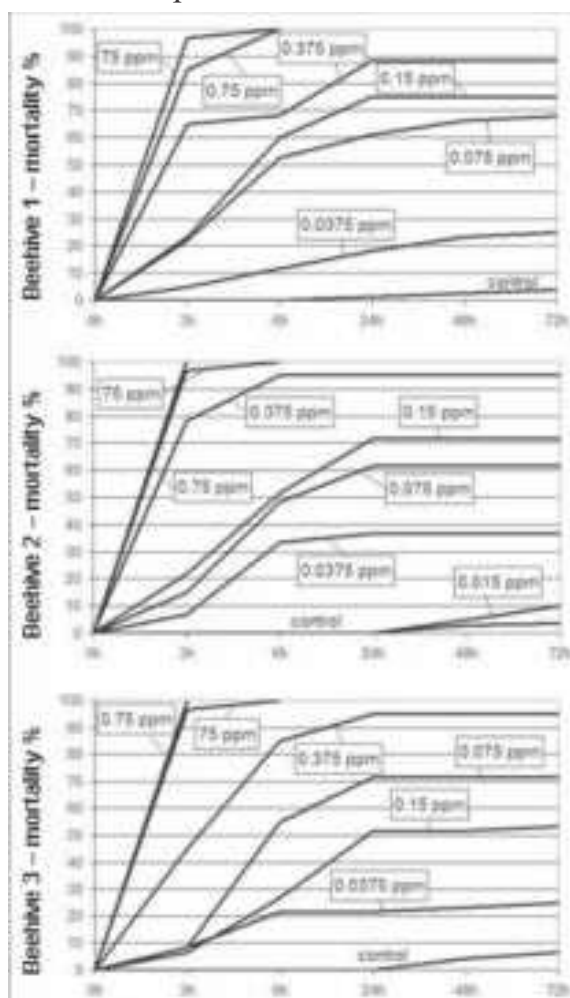
Pri svakoj provjeri ugibanja, skupljene su sve uginule pčele iz kaveza, pohranjene pri -18 °C, i smrznute dostavljane u analitički laboratorij za određivanje rezidua pomoću LC-MS/MS protokola (AOAC, 2007). LOD i LOQ su iznosili 0.01 $\mu\text{g kg}^{-1}$ i 0.05 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Linearna regresija utvrđenih količina na testirane koncentracije je proračunata statističkim paketom PAST (Hammer *et al.*, 2001). S ciljem utvrđivanja rezidua u pčelama koje nisu uginule tijekom pokusa, nakon šest sati od početka pokusa su skupljene sve uginule pčele, te uhvaćene žive. Obje skupine pčela su odvojeno pohranjene pri -18 °C i dostavljene na kemijsku analizu.

Statističke analize

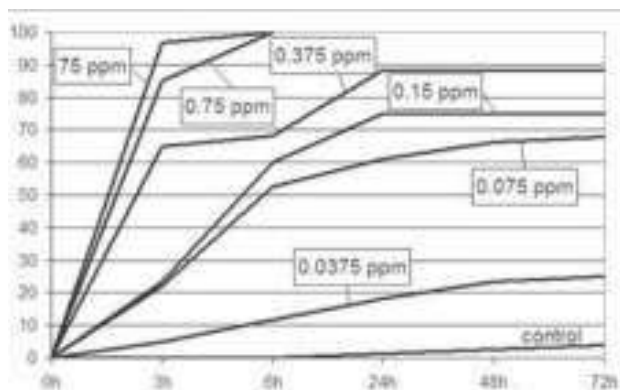
LC50 pri 24, 48 i 72 sata od početka pokusa te relativni gornji i donji intervali za 83% i 95% povjerljivost su proračunati za oba testa uporabom probit analiza prema Milani (1995). Budući su u akutnim oralnim testovima pojedinačna pčela uzela prosječno 35 μL šećernog sirupa (Laurino *et al.*, 2010), D₅₀ je utvrđena iz relativne vrijednosti LC₅₀. LD₅₀ za neizravnu kontaktnu otrovnosti nismo mogli izračunati jer je nepoznata količina apsorbiranih tvari. Statistička značajnost razlika između skupina je provjerena prema Robertson i Preisler (1992) na tri razine vjerojatnosti (P < 0.05, P < 0.01 i P < 0.001).

Rezultati

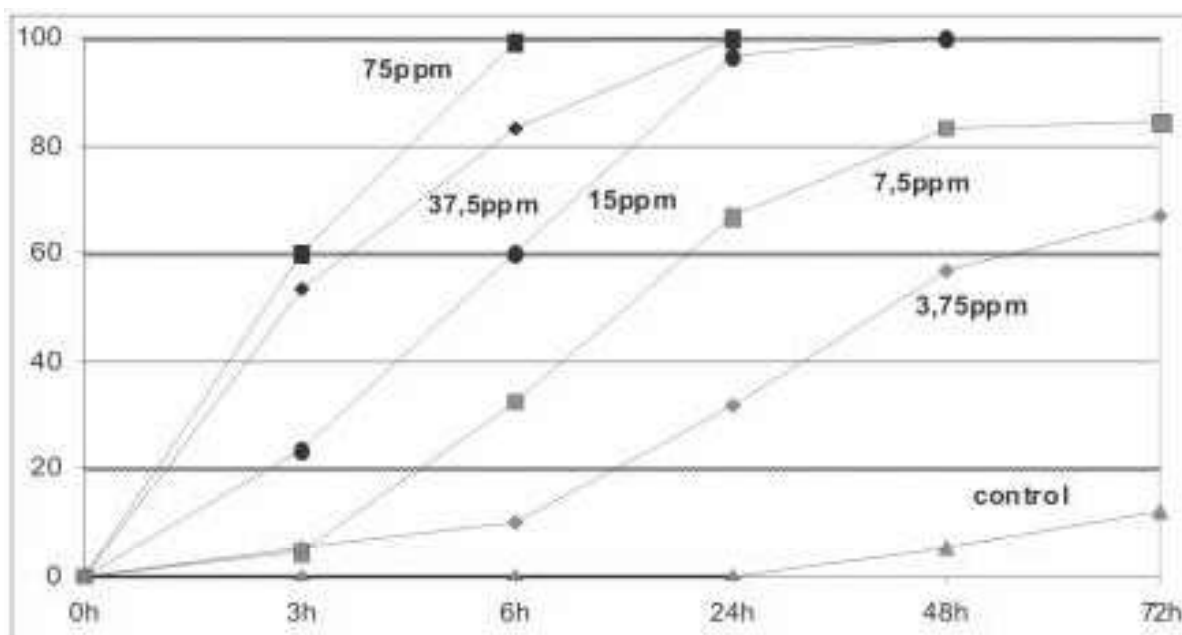
Tijekom ispitivanja pčele su pokazale očite simptome karakteristične za otrovanja, poput tresenja i drhtanja, nekoordiniranih i nekontroliranih kretnji, nemogućnosti da se postave u pravilan položaj tijela, produženih pomamnih pokreta nogu i vrtnje oko vlastite osi. Izravne promjene ponašanja pčela u kavezima dokazale su kratkotrajan učinak za acetamiprid i thiacloprid u poljskim koncentracijama te za clothianidin, imidacloprid, i thiamethoxam na nižim koncentracijama. Ipak, u akutnim toksičnim testovima najveće koncentracije su uzrokovale povraćanje u pčela. Acetamiprid i thiacloprid nisu uzrokovali uginuća ni u jednoj vrsti testa, dok su clothianidin, imidacloprid i thiamethoxam prouzročili 100% mortalitet u poljskim dozama tijekom nekoliko sati od početka ispitivanja, dok su nešto manji mortalitet prouzročile manje koncentracije istih. Rezultati su prikazani na Slikama 3 i 4.



Slika 3. Uginuća pčela skupljačica koje su se hranile jedan sat šećernom otopinom s različitim koncentracijama clothianidina.



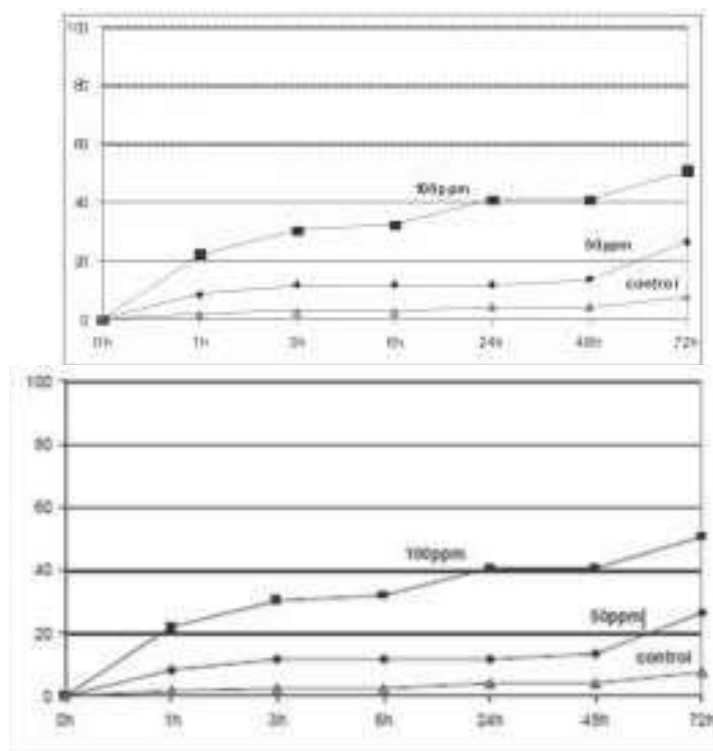
U kontaktnim testovima clothianidin je prouzročio mortalitet unutar 24 h pri koncentraciji od 37.5 ppm (pola poljske koncentracije), a unutar 48 h pri koncentraciji 15 ppm. Proizvod je prouzročio statistički značajni mortalitet pri 3.75 ppm, što je koncentracija 20 puta manja od preporučene poljske.



Slika 4. Uginuća pčela skupljačica koje su tri sata bile u kontaktu s lišćem kestena tretiranog s različitim koncentracijama clothianidina.

Toksikološki testovi nakon gladovanja

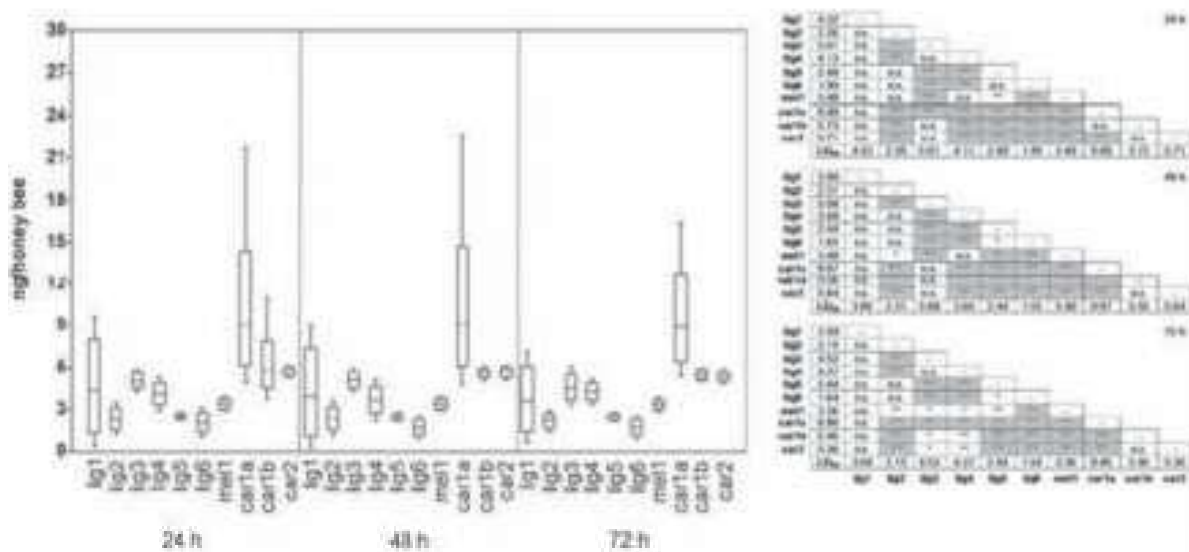
Uginuća prouzročena kontaktom s acetamipridom iznosila su 50.85% pri poljskim koncentracijama od 100 ppm. Statistički značajan mortalitet je uočen pri 50 ppm 72 h nakon početka testa (Slika 5). Mortalitet prouzročen kontaktom s thiaclopridom je bio statistički značajan pri koncentracijama većim od 36 ppm, što je jedna trećina poljske koncentracije.



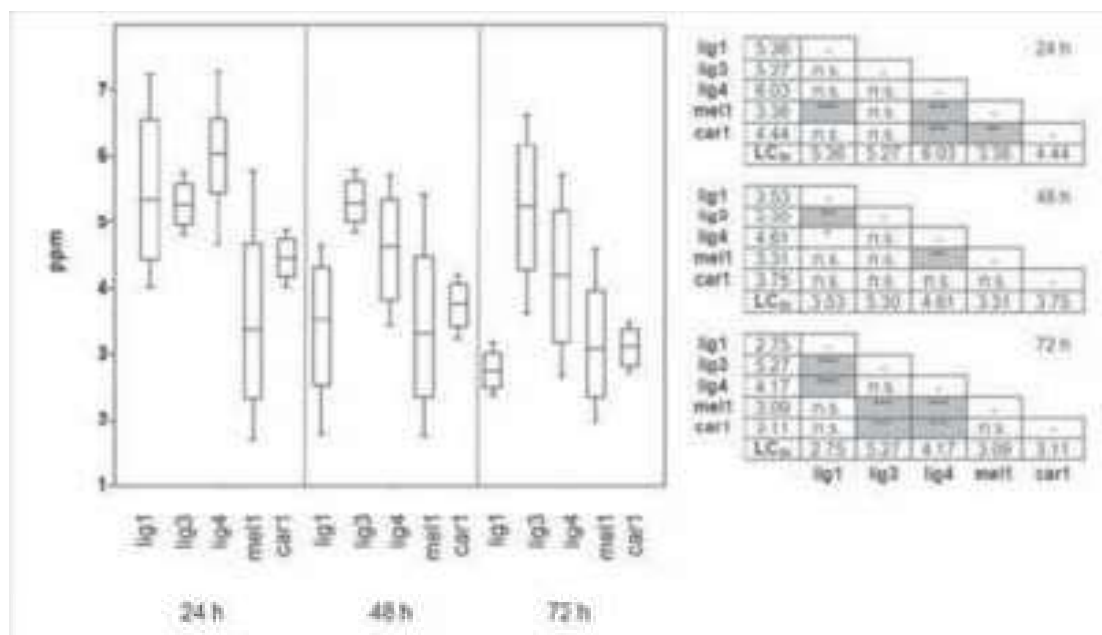
Slika 5. Mortalitet pčela skupljačica koje su izgladnjivane tijekom 2 sata i nakon toga primale hranu s dodatkom acetamiprida po volji tijekom jednog sata.

Odgovor različitih genotipova medonosne pčele

Srednje vrijednosti AOT DL₅₀ pri 24, 48 i 72 sata od početka pokusa su bile iste jačine kao i podaci iz literature za sva tri neonikotionoida; statistički značajne razlike su se pojavile u nekoliko slučajeva između pokusnih zajednica tretiranih clothianidinom, te između *A. m. mellifera* i četiri *A. m. ligustica* zajednica testiranih za imidacloprid, te između *A. m. carnica*, *A. m. mellifera* i *A. m. ligustica* zajednica testiranih za thiamethoxam. Iako su vrijednosti ICT LC₅₀ utvrđene za manji broj zajednica postojala je statistički značajna razlika za imidacloprid i thiamethoxam, ali ne za clothianidin (Slika 6).

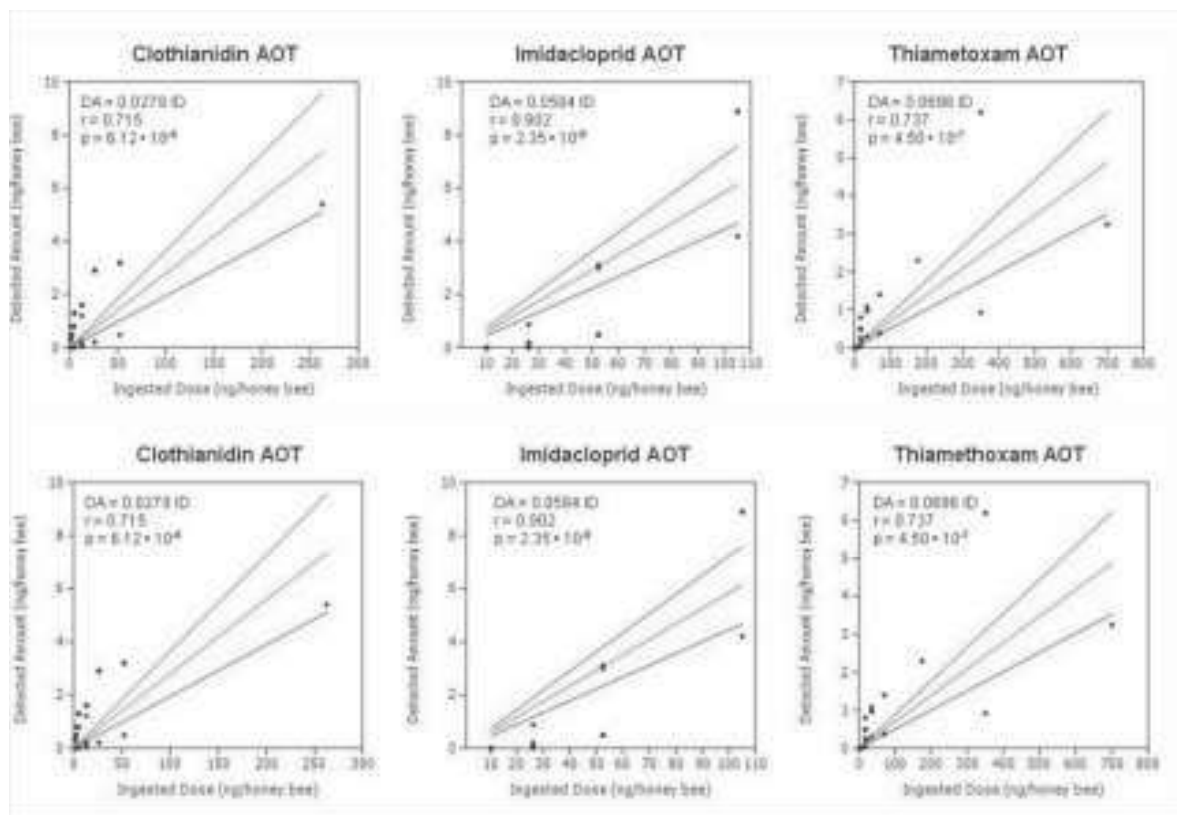


Slika 6. Thiamethoxam akutna oralna otrovnost LD₅₀ pri 24, 48 i 72 sata.



Slika 7. Thiamethoxam neizravna kontaktna otrovnost LC₅₀ pri 24, 48 i 72 sata.

Rezidue u pokusno otrovanih pčela



Slika 8. Linearna regresija neonikotinoida izdvojenih i uginulih pčela obzirom na ispitivane doze.

Rasprava

Simptomi otrovanja koje smo utvrdili tijekom pokusa su slični onima opisanim u literaturi (Bortolotti *et al.*, 2003; Medrzicky *et al.*, 2003; Maccagnani *et al.*, 2008; Suchail *et al.*, 2001). Istaknuto promijenjeno ponašanje otrovanih pčela, iako je kratkotrajano djelovanje za neke od aktivnih tvari pri niskim koncentracijama, mogu ireverzibilno utjecati na preživljavanje pčela u polju a obzirom na vanjske čimbenike poput hladnoće i prisustva predatora. Također, ako se otrovane pčele uspiju vratiti u košnicu, njihove su sposobnosti pamćenja i sporazumijevanja poremećene (Desneux *et al.*, 2007; Maccagnani *et al.*, 2008).

Clothianidin i thiamethoxam AOT LD₅₀ vrijednosti su bile vrlo slične literaturnim podacima (Tomlin, 2003; Decourtye and Devillers, 2010); no ipak su utvrđene statistički značajne razlike u LD₅₀ između nekoliko pokusnih zajednica kao rezultat dosad nepoznate raznolikosti u odgovoru na kontakt s neonikotinoidima. Budući je imidacloprid u uporabi mnogo više nego drugi neonikotinoidi, puno je više istraživana njegova otrovnost na pčele Doucet-Personeni *et al.* (2003). Rezultati su potvrdili da postoji očita razlika u odgovoru na otrovnost neonikotinoida različitih genotipova pčela, što je prvi dokazao Suchail *et al.* (2000).

Literatura

AOAC, (2007). Official methods of analysis, Association of Official Chemists, Arlington, WA USA.

ARZONE A, VIDANO C, (1974). Verifica dell'azione sull'Ape di antiparassitari dichiarati innocui a Insetti utili. Annali della Facolta di Scienze Agrarie della Universita degli Studi di Torino, 9: 171-182.

BARNETT EA, CHARLTON AJ, FLETCHER MR, (2007). Incidents of bee poisoning with pesticides in the United Kingdom, 1994-2003. Pest Management Science, 63: 1051-1057.

BORTOLOTTI L, MONTANARI R, MARCELINO J, MEDRZYCKI P, MAINI S, PORRINI C, (2003). Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. Bulletin of Insectology, 56(1): 63-67.

BYRNE A, FITZPATRICK Ú, (2009). Bee conservation policy at the global, regional and national levels. Apidologie, 40: 194-210.

CHAUZAT MP, MARTEL AC, BLANCHARD P, CLÉMENT MC, SCHURR F, LAIR C, RIBIERE M, WALLNER K, ROSENKRANZ P AND FAUCON JP, (2010). A case report of a honey bee colony poisoning incident in France. Journal of Apicultural Research, 49: 113-115.

DECOURTYE A, DEVILLERS J, (2010). Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. Insect nicotinic acetylcholine receptors (THANY S. H., Ed.). Springer Science + Business Media, LLC, New York, USA. pp. 87-95.

DESNEUX N, DECOURTYE A, DELPUECH JM, (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial Arthropods. Annual Review of Entomology, 52: 81-106.

DOUCET-PERSONENI C, HALM M P, TOUFFET F, RORTAIS A, ARNOLD G, (2003). Imidaclopride utilisé en enrobage de semences (Gaucho®) et troubles des abeilles rapport final. Comité Scientifique et Technique de l'Etude Multifactorielle des Troubles des Abeilles.

EL HASSANI A K, DACHER M, GARY V, LAMBIN M, GAUTHIER M, ARMENGAUD C, (2008). Effects of sublethal doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 54: 653-661.

GREATTI M, SABATINI AG, BARBATTINI R, ROSSI S, STRAVISI A, (2003). Risk of environmental contamination by the active ingredient imidacloprid used for corn seed dressing. Preliminary results. Bulletin of Insectology, 56: 69-72.

GREIG-SMITH PW, THOMPSON HM, HARDY AR, BEW MH, FINDLAY E, STEVENSON JH, (1994). Incidents of poisoning of honeybees (*Apis mellifera*) by agricultural pesticides in Great Britain 1981-1991. *Crop Protection*, 13: 567-581.

HAMMER O, HARPER DAT, RYAN PD, PAST, (2001). Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1): 9pp.

IWASA T, MOTOYAMA N, AMBROSE JT, ROE RM, (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*, 23: 371-378.

LADAS A, (1972). Der Einfluss verschiedener Konstitutions und Umweltfaktoren auf die Anfälligkeit der Honigbiene (*Apis mellifica* L.) gegenüber zwei insektiziden Pflanzenschutzmitteln. *Apidologie*, 3: 55-78.

LAURINO D, PATETTA A, PORPORATO M, VENANZIO D, MAGGIORA R, CARPINTERI M, (2009). Verify in field of the impact of pesticide substances on about honeybees. *Annali del settore fitosanitario 2009*, 38-41.

LAURINO D, MANINO A, PATETTA A, ANSALDI M, PORPORATO M, (2010). Acute oral toxicity of neonicotinoids on different bee strains. *Redia*, 93: 99-102.

LAURINO D, PORPORATO M, MANINO A, PATETTA A, (2011). Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. *Bulletin of Insectology*, 64: 107-113.

LAURINO D, (2011). Sviluppo delle famiglie di api, dinamica e fattori avversi. Tesi di dottorato. Facolta di Agraria, Universita degli Studi di Torino.

LAURINO D, MANINO A, PATETTA A, ROMANO A, PORPORATO M, (2011). Quantitation of neonicotinoid insecticide residues in experimentally poisoned honey bees. 11th International Symposium of the ICP-BR Bee Protection Group, Wageningen (The Netherlands), November 2-4. *Julius-Kühn-Archiv*, 437: 125-132.

LAURINO D, MANINO A, PATETTA A, PORPORATO M, (2013). Toxicity of neonicotinoid insecticides on different honey bee genotypes. *Bulletin of Insectology*, 66(1): 119-126.

MACCAGNANI B, FERRARI R, ZUCCHI L, BARISELLI M, (2008). Difendersi dalle cavallette, ma tutelare le api. *L'Informatore Agrario*, 64(25): 53-56.

MAINI S, MEDRZYCKI P, PORRINI C, (2010). The puzzle of honey bee losses: a brief review. *Bulletin of Insectology*, 63: 153-160.

MANSOUR SA, AL-JALIL MK, (1985). Pesticides and beneficial organisms: 1. The response of two honey bee races to certain insecticides. *Pesticides*, 19 (3): 39-40.

MEDRZYCKI P, MONTANARI R, BORTOLOTTI L, SABATINI AG, MAINI S, PORRINI C, (2003). Effect of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee (*Apis mellifera* L.) behaviour. Laboratory tests. *Bulletin of Insectology*, 56(1): 59-62.

MILANIN, (1995). The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie*, 26: 415-429.

MUCCINELLI M, (2008). Prontuario degli agrofarmaci. Dodicesima edizione. Edagricole, XXI - 1017 pp.

NIKOLAKIS A, CHAPPLE A, FRIESSLEBEN R, NEUMANN P, SCHAD T, SCHMUCK R, SCHNIER HF, SCHNORBACH HJ, SCHÖNING R, MAUS C, (2009). An effective risk management approach to prevent bee damage due to the emission of abraded seed treatment particles during sowing of seeds treated with bee toxic insecticides. *Julius-Kühn-Archiv* 423: 132-148.

OEPP/EPPO, EPPO Standards PP1/170, (2010). Efficacy evaluation of plant protection products, Side-effects on honeybees. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 40: 313-319.

OOMEN PA, (2001). Honeybee poisoning incidents over the last ten years, as reported by beekeepers in the Netherlands. *Hazards of Pesticides to Bees* ed. Belzunces LP, Pelissier C and Lewis GB, Avignon, France, INRA Les Colloques 98, pp129-135.

PISTORIUS J, BISCHOFF G, HEIMBACH U, STÄHLER M, (2009). Bee poisoning incidents in Germany in spring 2008 caused by abrasion of active substance from treated seeds during sowing of maize. *Julius-Kühn-Archiv*, 423: 118-126.

RIEDL H, JOHANSEN E, BREWER L, BARBOUR J, (2006). How to reduce bee poisoning from pesticides. PNW 591, A Pacific Northwest Extension Publication, Washington, Oregon, Idaho, Oregon State University, Corvallis, OR, USA.

ROBERTSON JL, PREISLER HK, (1992). *Pesticide bioassays with Arthropods*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

RUSSELL D, MEYER R, BUKOWSKI J, (1998). Potential impact of microencapsulated pesticides on New Jersey apiaries. *American Bee Journal*, 138: 207-210.

RUTTNER F, (1988). *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Springer Verlag, Berlin, Germany.

STONER A, RHODES HA, WILSON WT, (1979). Case histories of the effects of microencapsulated methyl parathion (Pennap-M) applied to fields near honey bee colonies. *American Bee Journal*, 119: 648-649, 651-654.

SUCHAIL S, GUEZ D, BELZUNCES LP, (2000). Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 1901-1905.

SUCHAIL S, GUEZ D, BELZUNCES LP, (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental toxicology and chemistry*, 20(11): 2482-2486.

TOMIZAWA M, CASIDA JE, (2005). Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanisms of Selective Action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45: 247-268.

TOMLIN C, (2003). The pesticide manual, 13th ed. British Crop Protection Council, Alton, Hampshire, UK.

Toxicity of neonicotinoid insecticides on honeybee colonies

Neonicotinoids are a class of relatively new insecticides, designed in the '80s, characterized by their excellent feedback, since they are highly systemic and with long-term persistence. These insecticides, however, show very strong toxicity to pollinating insects and in particular to the honey bee, besides causing also other effects which are often not easily identifiable, such as behavioural disturbances, orientation difficulties, and impairment of social activities. During the past few years, in many countries, alarming bee mortality rates were recorded. In some cases this was clearly due to the use of neonicotinoids either for seed dressing or crop spraying. Toxic effects on *Apis mellifera* L. of the neonicotinoid insecticides thiamethoxam, clothianidin, imidacloprid, acetamiprid and thiacloprid were tested in the laboratory. Commercial formulations, dispersed in sugar syrup and water, at the highest dose level marked on the label were used to carry out oral and indirect contact trials on each pesticide. Clothianidin, imidacloprid, and thiamethoxam caused higher mortality than the untreated controls and were also tested at decreasing concentrations until mortality was statistically insignificant in comparison with that of the control; the acute oral toxicity (AOT) LD₅₀ and the acute indirect contact toxicity (ICT) LC₅₀ were calculated at 24, 48, and 72 hours from test initiation. On the contrary, acetamiprid and thiacloprid caused higher mortality than the untreated controls only in oral toxicity tests when honey bees, which had starved for two hours, were used.

Toxicity effects of the neonicotinoid insecticides clothianidin, imidacloprid, and thiamethoxam were also tested in the laboratory on different honey bee (*Apis mellifera*

L.) genotypes. Mean AOT DL₅₀ at 24, 48, and 72 hours from test start were of the same order of magnitude of those reported in the literature for all three neonicotinoids; statistically significant differences emerged in a few instances between the tested hives for clothianidin, between the *A. m. mellifera* hive and the four *A. m. ligustica* hives tested for imidacloprid, and more extensively between the *A. m. carnica*, *A. m. mellifera*, and *A. m. ligustica* hives tested for thiamethoxam. Although ICT LC₅₀ values were obtained for a reduced number of hives only, statistically significant differences were observed for imidacloprid and thiamethoxam, but not for clothianidin. The results confirm that genetic differences in the response to pesticide toxic action exist in the honey bee, but they do not constitute the key factor involved in the uneven results observed in toxicity tests. In any case, the LD₅₀ or other similar toxicity indexes should not be determined on a single colony. During AOT and ICT tests, dead honey bees were removed from the cages at every check, stored at -18 °C, and shipped frozen to the analytical laboratory for residue determination through a LC-MS/MS analytical procedure adapted from AOAC methods 2007.01 2007. LOD and LOQ were 0.01⁻¹ μg kg and 0.05 μg kg⁻¹ respectively. Linear regression of a.i. detected amounts on tested doses and concentrations were calculated.