

## Ocena skuteczności środków ochrony roślin

### Efekty uboczne u pszczoł miodnych

#### Zakres

Niniejsza norma opisuje sposób prowadzenia badań nad oceną efektów ubocznych środków ochrony roślin u pszczoł miodnych.

#### Zatwierdzenie normy i poprawki

Po raz pierwszy zatwierdzona w 1991.  
Zmieniona wersja normy z 1998.  
Poprawka (uaktualniona zgodnie z zaleceniami ICPBR) zatwierdzona we wrześniu 2000.

#### Wstęp

Środki ochrony roślin należy dopuszczać do użytku tylko w sposób, który nie stanowi niedopuszczalnego zagrożenia szkodliwością dla pszczoł miodnych. W tym celu może zaistnieć konieczność przedstawienia podczas procesu rejestracji danych umożliwiających ocenę bezpieczeństwa rozpatrywanego środka. Niniejsza norma przedstawia kilka różnych typów badań (badania laboratoryjne, badania w klatkach/tunelach i doświadczenia polowe), które mogą być wykorzystane do dostarczenia takich danych. Jednak pewne badania, które są czasami wykorzystywane, takie jak badanie inhalacji i długookresowego kontaktu, nie zostały opisane.

Opis tych metod opiera się na „Wytocznych ujednolicenia metod badania zagrożenia pszczoł miodnych pestycydami” ustalonych przez Międzynarodową Komisję ds. Zależności między Roślinami i Pszczołami (ICPBR) podczas sympozjów o ujednoliceniu metod badania toksyczności pestycydów dla pszczoł odbywających się w Wageningen (Holandia, 1980), Hohenheim (Niemcy, 1982), Harpenden (Wielka Brytania, 1985), Rez (Czechy, 1990), Wageningen (Holandia, 1993), Brunshwiku (Niemcy, 1996) i Awinionie (Francja, 1999).

Badania laboratoryjne badają toksyczność doustną i toksyczność kontaktową środka ochrony roślin. Pół – polowe badania w klatkach i badania w pełni polowe mają za zadanie zbadać wpływ zastosowania środka podczas lotu pszczoły. Do badania pewnych zagrożeń dla pszczoł miodnych, takich jak wpływ na pszczoły żerujące na spadzi z mszyc, które są praktycznie niemożliwe do zbadania w warunkach polowych, może być wykorzystane badanie w tunelu. Badania laboratoryjne są przeprowadzane na pojedynczych pszczołach lub grupach pszczoł, natomiast badania pół - polowe i polowe są przeprowadzane na koloniach pszczoł na uprawie.

Przyjmując, że pojedyncza metoda badawcza nie może dostarczyć odpowiednich informacji do określenia efektów ubocznych środków ochrony roślin u pszczoł

miodnych, należy podkreślić, że nie są wymagane wszystkie te badania. Z powodu czasochłonności i kosztowności badań polowych, badania laboratoryjne i badania pół - polowe mogą służyć do klasyfikowania wielu środków jako zdecydowanie nieszkodliwych lub szkodliwych bez uciekania się do badań polowych. Decyzje dotyczące tego, które badania przeprowadzić i czy podejmować kolejne badania będą zależały od cech środka ochrony roślin, sposobu jego wykorzystania i badań, które już zostały wykonane. Decyzje te mogą opierać się na logicznie stworzonym planie podejmowania następujących po sobie decyzji (Oomen 1986). Połączone EPPO/Rada Europejskiego Zespołu ds. Oceny Zagrożenia Środowiska przez Środki Ochrony Roślin opracowały takie plany, w tym plan dla pszczoł miodnych (OEPP/EPPO 1993).

#### Badania laboratoryjne

##### 1. Warunki doświadczenia

###### 1.1 Zasada doświadczenia

Toksyczność doustną i kontaktową badanych związków dla dorosłych robotnic pszczoł miodnych określa się w laboratorium. Pszczoły poddaje się różnym dawkom związku drogą karmienia i zastosowania miejscowego. Wskaźniki śmiertelności wykorzystuje się do przedstawienia linii regresji i LD<sub>50</sub>.

###### 1.2 Warunki doświadczenia

Pszczoły umieszcza się w dobrze wentylowanych i łatwych do czyszczenia klatkach. Nie należy używać klatek plastikowych, jeśli nie zostaną usunięte po wykorzystaniu, z powodu prawdopodobnych zanieczyszczeń. Należy unikać powtórnego używania klatek drewnianych, chyba że są bardzo czyste i wysterylizowane. Klatki nie powinny powodować śmiertelności w próbie kontrolnej. Po zabiegu pszczoły należy trzymać w temperaturze 25 ± 2°C. Podczas badań należy zapisywać wilgotność względną.

Podczas całego okresu doświadczenia, z wyjątkiem okresów oceniania, pszczoły należy trzymać w ciemności.

### 1.3 Przygotowanie pszczół

Najlepiej jest użyć jednakowych młodych dorosłych robotnic pszczół. Pszczoły należy odpowiednio karmić i powinny one pochodzić ze zdrowej kolonii posiadającej matkę. W stosownych przypadkach należy określić ostatni zabieg przeciw warrozie i odnotować jego termin. Zabieg powinien zakończyć się przynajmniej 4 tygodnie przed rozpoczęciem badania. Pszczoły należy zebrać w znormalizowany sposób. Należy unikać zbierania pszczół wczesną wiosną i późną jesienią. Odpowiednie są pszczoły zebrane z plastrów bez czerwia lub z wylotka w wejściu do ula. Pszczoły można również wyhodować w inkubatorze karmiąc świeżym lub dobrze zakonserwowanym pyłkiem kwiatowym i roztworem sacharozy. Należy podać metodę zbierania, wiek i (jeśli jest znana) rasę pszczół i datę doświadczenia.

W celu zbadania toksyczności kontaktowej pszczoły można uśpić dwutlenkiem węgla. Należy użyć minimalnej ilości oraz minimalnego czasu ekspozycji, ale należy zapewnić całkowite uśpienie. Zabieg nie powinien obniżyć temperatury w klatce oraz temperatury pszczół.

### 1.4 Projekt doświadczenia

Zabiegi: badaniu poddawane są gotowe preparaty lub substancje czynne. Należy uwzględnić próbę kontrolną potraktowaną nośnikiem dawkującym oraz odpowiednią normę toksyczną w celu sprawdzenia powtarzalności wyników (np. paration, dimethoate; Gough i in. 1994).

Próba: pszczoły należy poddawać dawkom pojedynczo lub w grupach przynajmniej po 10. Nie należy ich przetrzymywać pojedynczo dłużej niż godzinę.

Powtórzenia: dla każdego stężenia należy użyć przynajmniej trzech grup złożonych z 10 pszczół. W badaniach granicznych należy zwiększyć liczbę grup do 5.

Stężenia: należy użyć odpowiedniego zakresu oraz liczby stężeń w celu przedstawienia linii regresji i  $LD_{50}$ .

## 2. Stosowanie zabiegów

### 2.1 Badanie toksyczności doustnej

#### 2.1.1 Badany preparat (preparaty)

Należy użyć gotowego preparatu lub substancji czynnej w 200-500 g/l końcowego stężenia roztworu sacharozy. Jeśli jest to możliwe preparaty należy rozpuścić lub zawiesić bez dodatkowych rozpuszczalników.

#### 2.1.2 Sposób stosowania

Pszczoły należy głodzić do 2 godzin przed badaniem. Należy podać dawkę 10 lub 20  $\mu$ l badanego roztworu na pszczołę za pomocą karmników jednorazowego użytku. Przy karmieniu grupowym pszczoły dzielą się

badanym roztworem pomiędzy sobą i w ten sposób otrzymują podobne dawki. Należy stosować maksymalny czas dawkowania (np. 4-6 godzin), aby uniknąć śmiertelności z powodu głodu.

Jeśli pod koniec tego okresu pozostanie badana dawka, należy zmierzyć jej ilość. Umożliwia to określenie dokładnej dawki pobranej przez pszczoły, co pozwala poprawnie obliczyć  $LD_{50}$  i dostarcza informacji na temat niesmaczności/działania odstraszającego.

Po usunięciu dawki należy dostarczyć świeżego roztworu sacharozy, który powinien być codziennie wymieniany, jeżeli badania prowadzone są ponad 48 h.

### 2.2 Badanie toksyczności kontaktowej

#### 2.2.1 Badany preparat (preparaty)

W przypadku, gdy jest to możliwe substancję czynną należy rozpuścić w acetonie. Innych rozpuszczalników należy użyć tylko wtedy, gdy substancja czynna nie rozpuszcza się w acetonie. Powinny być to rozpuszczalniki o wykazanym braku szkodliwości dla pszczół. Jeśli jest to konieczne, gotowy preparat należy zastosować w zawiesinie wodnej używając odpowiedniego czynnika zwilżającego.

#### 2.2.2 Sposób wykonania zabiegu

Uśpione pszczoły należy poddawać zabiegowi pojedynczo poprzez miejscowe zastosowanie. Zmierzoną ilość preparatu należy nanieść na tułów każdej pszczoły. Po zabiegu należy dostarczyć świeżego roztworu sacharozy, który należy codziennie kontrolować (w razie konieczności uzupełnić).

## 3. Sposób oceniania

Poddane zabiegowi pszczoły należy umieścić ponownie w klatkach. Liczbę martwych lub porażonych pszczół należy określać w 24-godzinnych odstępach do 48 h lub dłużej w przypadku, gdy śmiertelność dalej wzrasta.

## 4. Wyniki

Badania należy powtórzyć, jeśli śmiertelność w próbie kontrolnej przekracza 15%.

Śmiertelność należy obliczyć po uwzględnieniu poprawki na śmiertelność w próbie kontrolnej. W celu zanalizowania wyników i obliczenia średniej letalnej dawki ( $LD_{50}$ ), wyrażonej w  $\mu$ g substancji czynnej na pszczołę, należy użyć odpowiednich metod statystycznych.

## Badania w klatkach

Badania w klatkach można również zmodyfikować do szczegółowych badań na pszczołach, np. działania odstraszającego lub oceny zagrożenia stosowania środków ochrony roślin dla pszczół żerujących na spadzi wydzielanej przez mszyce. W takich przypadkach można przekształcić badania w klatkach w polowe badania w tunelach używając odpowiednich

roślin uprawnych np. zbóż. Można również badać ewentualne ogólnoustrojowe zagrożenie środkami stosowanymi na materiale siewnym.

## 1. Warunki doświadczenia

### 1.1 Zasada doświadczenia

W klatkach w polu pszczoły z małych kolonii zmuszone są do żerowania na kwitnącej roślinie uprawnej. Badane środki i normę toksyczną o znanym wysokim zagrożeniu dla pszczół rozpyla się w oddzielnych klatkach podczas lotu pszczół, natomiast pozostałe klatki służą jako niepoddana zabiegowi kontrola. Normę toksyczną wykorzystuje się do uzyskania potwierdzenia o powstałym zagrożeniu dla pszczół. Jeżeli warunki badania nie pozwalają na użycie normy toksycznej należy w inny sposób wykazać, że pszczoły zostały narażone. Wpływ zabiegu na pszczoły określa się tuż przed i kilkakrotnie po zabiegu.

### 1.2 Warunki doświadczenia

Należy użyć klatek o minimalnym rozmiarze 40 m<sup>2</sup>. Do przeglądu i badania prostych zagadnień takich, jak krótkookresowa śmiertelność, można użyć klatek o rozmiarze co najmniej 3 × 4 m<sup>2</sup>. Wielkość oczek siatki w klatce nie powinna przekraczać 3 mm.

Odpowiednimi do badań roślinami uprawnymi są *Borago*, *Brassica*, *Phacelia*, *Sinapis* i inne kwitnące rośliny przyciągające pszczoły, na których planowane jest użycie badanego środka.

W przypadku zbóż, na których imituje się spadz z mszyc, odpowiednia roślina uprawna, np. pszenica, jest opryskiwana roztworem sacharozy w taki sposób, aby utrzymać wystarczające przyciąganie pszczół.

Odpowiednie dla badań w tunelach warunki badań oraz metody podaje Shires i in. (1984).

### 1.3 Przygotowanie pszczół

Należy użyć jednej małej zdrowej kolonii posiadającej matkę na klatkę z przynajmniej trzech pełnych ramek lub odkładu.

W czasie doświadczenia może być konieczne karmienie kolonii oraz należy zapewnić jej wodę.

### 1.4 Projekt doświadczenia

Kombinacje doświadczenia: badany(e) preparat(y), norma toksyczna o znanym wysokim zagrożeniu dla pszczół (np. paration, dimethoate), próba kontrolna bez środka ochrony roślin. Próba kontrolna może zostać opryskana wodą.

Próba: klatki z jedną kolonią.

Powtórzenia: wystarczające, aby umożliwić odpowiednią analizę statystyczną oraz ocenę zagrożenia.

## 2. Stosowanie zabiegów

### 2.1 Badany preparat (preparaty)

Należy używać tylko gotowych preparatów.

### 2.2 Sposób stosowania

Środki należy stosować w ciągu dnia, gdy pszczoły żerują najaktywniej. Należy unikać opryskiwania ścian klatki.

Należy podać liczbę żerujących pszczół na m<sup>2</sup> i sposób oceniania.

### 2.3 Dawki

Preparat należy zwykle stosować w najwyższej dawce, jaka jest przewidziana do użytku na kwitnących roślinach uprawnych; jeśli jest to wskazane można również zbadać wyższą dawkę.

## 3. Sposób oceny

Ocena dokonana przed zabiegiem powinna być wystarczająca, aby umożliwić wykazanie stałej śmiertelności naturalnej oraz wykazanie, że pszczoły zaaklimatyzowały się do warunków badania i aktywnie żerują na roślinach uprawnych.

Oceny należy dokonać tuż przed i w kilku odstępach, najlepiej 0, 1, 2, 4 i 7 dni, po zabiegu. Należy podać aktywność żerowania i zachowanie pszczół na roślinach uprawnych i wokół ula. Należy policzyć martwe pszczoły w pułapkach na martwe pszczoły oraz pszczoły padłe w pozostałej części klatki. Należy podać temperaturę i wilgotność. Innych ocen, np. wpływu na czerw, należy dokonać w zależności od rodzaju badanego środka.

## 4. Wyniki

Badania należy powtórzyć, jeżeli śmiertelność w próbie kontrolnej jest znaczna w porównaniu z normą toksyczną oraz gdy śmiertelność w zabiegu z normą toksyczną jest niska.

Zawsze należy przedstawić dane o śmiertelności oraz wszystkie inne dane, które są istotne dla właściwości środka poddanego badaniu.

Dane źródłowe (robocze) powinny być dostępne na żądanie. Zwykle należy zastosować analizę statystyczną przy pomocy odpowiednich metod, które należy podać. Jeśli analiza statystyczna nie jest przeprowadzana, należy to uzasadnić.

## Badania polowe

### 1. Warunki doświadczenia

#### 1.1 Zasada doświadczenia

Kolonie pszczół umieszcza się na skraju lub na dużych polach badawczych z kwitnącymi roślinami uprawnymi. Pola wybiera się w taki sposób, aby pszczoły były głównie przyciągane do kwitnącego pola, na którym znajduje się ich ul. Pola poddane badaniu

powinny być dobrze odseparowane. Zabiegi przeprowadza się na oddzielnych badanych polach podczas lotu pszczoł. Dla porównania można włączyć preparaty porównawcze o znanym niskim lub wysokim zagrożeniu dla pszczoł. Jeśli preparat porównawczy o wysokim zagrożeniu nie zostanie uwzględniony (jako norma toksyczna) należy w inny sposób wykazać, że pszczoły miodne zostały narażone, np. na podstawie oceny żerowania pszczoł przed i po zabiegu. Zbiór pyłku oraz znakowanie pszczoł w polu mogą również dostarczyć przydatnych informacji w tym względzie.

Oceny dokonuje się w celu określenia potencjalnego wpływu na pszczoły krótko przed i kilkakrotnie po zabiegu.

## 1.2 Wybór rośliny uprawnej

Badania przeprowadza się na roślinach uprawnych, na których ma być używany badany preparat. Jeśli nie jest to możliwe należy użyć jako badanych roślin rzepaku, gorczycy, facelii lub innej rośliny uprawnej przyciągającej pszczoły. W każdym przypadku roślina uprawna powinna być w fazie pełnego kwitnięcia.

## 1.3 Warunki doświadczenia

Kolonie należy umieścić na skraju lub na kwitnącej uprawie, która zostanie opryskana. Aby zapewnić, że w dniu zabiegu pszczoły będą żerowały głównie na badanym polu, należy je umieścić w odpowiednim miejscu kilka dni przed badaniem, ponieważ pszczoły zaczynają żerować na powierzchniach bezpośrednio przylegających do ich uli.

## 1.4 Przygotowanie pszczoł

Należy użyć zdrowych, dobrze odżywionych, będących w normalnej kondycji kolonii posiadających matkę, zawierających w zależności od sezonu co najmniej 10 000-15 000 pszczoł. Każda kolonia powinna zajmować przynajmniej 10-12 ramek, wliczając w to przynajmniej 5-6 ramek z czerwiem. Jeśli kolonie różnią się wielkością, należy zapewnić ich odpowiednie rozmieszczenie.

## 1.5 Projekt i układ doświadczenia

Kombinacje doświadczenia: badany(e) preparat(y), preparaty porównawcze (jeśli są uwzględnione) i nie poddana zabiegowi lub opryskana wodą próba kontrolna.

Rozmiar poletka: co najmniej 1500 m<sup>2</sup>. Kolonie w pełnej sile wymagają większych powierzchni. Poletka powinny być dobrze odseparowane w celu uniknięcia żerowania pszczoł na niewłaściwym poletku. Poletka nie powinny znajdować się blisko innych kwitnących upraw, które przyciągają pszczoły. Należy odnotować odległość pomiędzy poletkami.

Powtórzenia: chociaż bardzo pożądane, powtórzenie jest często niewykonalne z powodu wymogu odseparowania. Należy użyć przynajmniej 3 kolonii na zabieg.

## 2. Stosowanie zabiegów

### 2.1 Badany (e) preparat (y)

Należy używać tylko gotowych preparatów.

### 2.2 Preparat (y) porównawczy (e)

Jeśli jest uwzględniony, należy zarejestrować preparat (y) porównawczy do użytku zbliżonego do planowanego użycia badanego środka.

### 2.3 Sposób stosowania

Środki należy stosować w ciągu dnia, gdy pszczoły aktywnie żerują na badanej roślinie uprawnej. Zabiegi należy stosować jednocześnie, np. w przeciągu maksymalnie 2 h. Stosowanie powinno być zgodne z zaleceniami.

Należy odnotować liczbę żerujących pszczoł na m<sup>2</sup> i sposób oceny.

### 2.4 Dawki

Zwykle należy stosować środek w najwyższej dawce zalecanej do praktycznego użycia w warunkach polowych. Objętość dawki i rodzaj dysz powinny być zgodne z zaleceniami i powinny być odnotowane.

## 3. Sposób zbierania i rejestrowania wyników

### 3.1 Dane meteorologiczne

W trakcie okresu doświadczenia należy odnotowywać temperaturę i wilgotność. Należy również odnotowywać opady deszczu, nasłonecznienie lub zachmurzenie.

### 3.2 Sposób, terminy oraz częstotliwość dokonywania oceny

#### 3.2.1 Rodzaj danych

Należy oszacować lub określić następujące parametry: liczbę pszczoł żerujących na uprawie, zachowanie pszczoł na uprawie i wokół uli, śmiertelność pszczoł (wykorzystując pułapki na martwe pszczoły).

Należałoby również określić zbiór pyłku (wykorzystując pułapki na pyłek) oraz pyłek w zebranym miodzie. W szczególnych sytuacjach może być konieczne określenie liczby pszczoł na ramkach, status czerwia w ramkach i zbadanie pozostałości w martwych pszczołach, pyłku, wosku i miodzie. Zawsze należy określać status czerwia na początku oraz na zakończenie badania.

#### 3.2.2 Terminy i częstotliwość

Ocena przed zabiegiem: przynajmniej dwukrotnie, w tym jedna powinna odbyć się bezpośrednio przed lub maksymalnie 1 dzień przed zabiegiem.

Ocena po zabiegu: w kilku odstępach, najlepiej 0, 1, 2, 4, 7, 14 i 28 (tylko dla czerwia) dni po zabiegu.

Wszystkie oceny należy wykonać mniej więcej o tej samej porze dnia. Ocenianie można kontynuować w dłuższych odstępach czasu aż do 3 miesięcy po zabiegu.

#### **4. Wyniki**

Doświadczenie jest nieważne i powinno zostać powtórzone, jeśli narażenie w czasie stosowania nie może być przekonująco wykazane, np. przy użyciu preparatu porównawczego lub na podstawie oceny żerowania przeprowadzonej bezpośrednio przed zabiegiem. Doświadczenie należy powtórzyć również wtedy, gdy śmiertelność w próbie kontrolnej jest znaczna (ogólnie ponad 15%).

Dane źródłowe (robocze) powinny być dostępne na żądanie. Zawsze należy przedstawić dane o śmiertelności oraz wszystkie inne dane, które są istotne dla właściwości środka poddanego badaniu. Zwykle należy przeprowadzić analizę statystyczną przy pomocy odpowiednich metod, które należy podać. Jeśli analiza statystyczna nie jest przeprowadzana, należy to uzasadnić.

#### **Odnosiniki**

Gough H.J., McIndoe E.C., Lewis G.B. 1994. The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera* L.) 1991-1992. *Journal of Apicultural Research* 33, 119-125.

ICBB. 1980. Wnioski ze spotkania. Sympozjum na temat ujednolicenia metod badania toksyczności pestycydów dla pszczoł. Wageningen (Holandia).

ICBB. 1982. Poprawione wytyczne ujednolicenia metod badania toksyczności pestycydów dla pszczoł. Drugie sympozjum na temat ujednolicenia metod badania toksyczności pestycydów dla pszczoł. Dodatek I: 11-16. Hohenheim (Niemcy).

ICBB. 1985. Wytyczne ujednolicenia metod badania toksyczności pestycydów dla pszczoł. Trzecie sympozjum na temat ujednolicenia metod badania toksyczności pestycydów dla pszczoł miodnych. Dodatek I. Harpenden (Wielka Brytania).

ICPBR. 1990. Materiały czwartego międzynarodowego sympozjum na temat ujednolicenia metod badania toksyczności pestycydów dla pszczoł. Rez (Czechy).

ICPBR. 1993. Dyskusja i wytyczne piątego spotkania. Materiały piątego międzynarodowego sympozjum na temat ujednolicenia metod badania toksyczności pestycydów dla pszczoł (red. Harrison E.G.): 10-14. Wageningen (Holandia).

ICPBR. 1996. Wytyczne spotkania. Materiały 6-ego międzynarodowego sympozjum na temat zagrożenia pestycydami dla pszczoł (red. Lewis G.B.): 31-35. Braunschweig (Niemcy).

ICPBR. 2000. Wytyczne spotkania. Materiały 7-ego międzynarodowego sympozjum na temat zagrożenia pestycydami dla pszczoł (red. Lewis G.B.). Awinion (Francja).

OEPP/EPPO (1993) Normy EPPO PP 3/10(1) Schemat podejmowania decyzji w ocenie zagrożenia środowiska środkami ochrony roślin: pszczoły miodne. Biuletyn OEPP/EPPO Biuletyn 23: 151-165.

Oomen P.A. 1986. A sequential scheme for evaluating the hazard of pesticides to bees, *Apis mellifera*. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent 51: 1205-1213.

Shires S.W., Le Blanc I., Debray P., Forbes S., Louveaux J. 1984. Field experiments on the effects of a new pyrethroid insecticide WL-85871 on bees foraging artificial aphid honeydew on winter wheat. Pesticide Science 15: 543-552.