

STRESZCZENIE

Pszczoły są dominującą grupą zapylaczy na wielu uprawach. Pszczoły samotnice (zarówno dzikie, jak i hodowane) zapylają w szczególności uprawy drzew owocowych i orzechów, takich jak jabłonie, migdałowce itp. Pomimo ich znaczenia gospodarczego i ekologicznego, liczebność pszczół spadła znacząco w ostatnich dziesięcioleciach, z negatywnymi konsekwencjami społeczno-gospodarczymi, które wedle przewidywań będą miały nieproporcjonalnie duży wpływ na społeczności na całym świecie. Uważa się, że za zjawisko to znacznej mierze odpowiada powszechne stosowanie pestycydów. Wiadomo jednak, że w ciągu najbliższych kilkudziesięciu lat nie będzie można zaprzestać stosowania pestycydów. Dlatego ważne jest, żeby zrozumieć, w jakim stopniu pestycydy są szkodliwe dla pszczół samotnic, aby chronić te ważne ekologicznie i gospodarczo gatunki zapylające oraz opracować nowe strategie, które pozwoliłyby zahamować dalszy spadek liczebności ich populacji. Tymczasem, jeśli chodzi o monitorowanie i regulację pestycydów, pszczołom samotnicom poświęcono znacznie mniej uwagi niż pszczołom społecznym (*Apis* spp.). Jednak ze względu na różnice biologiczne i morfologiczne oraz brak społecznego stylu życia, zagrożenia dla pszczół samotnych ze strony pestycydów mogą być zgoła inne niż dla pszczół społecznych z rodzaju *Apis*. W 2013 roku Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) zalecił włączenie murarki ogrodowej, *Osmia bicornis*, jako organizmu modelowego dla pszczół samotnic nienależących do rodzaju *Apis*, do oceny ryzyka związanego ze stosowaniem pestycydów. Jednak niedostatek wiedzy na temat bezpośredniego lub pośredniego wpływu pestycydów oraz solidnych metod badania toksyczności dla tego gatunku ogranicza jego wykorzystanie w bieżącej ocenie ryzyka.

Celem pracy było zbadanie i porównanie toksykokinetyki i toksyczności trzech środków ochrony roślin opartych na insektycydach, a mianowicie Dursbanu 480 EC (zawierającego chloropiryfos – CHP jako składnik aktywny (s.a.)), Sherpy 100 EC (s.a. cypermetryna – CYP) oraz Mospilanu 20 SP (s.a. acetamiprid – ACT), u pszczoły samotnicy *O. bicornis* (nazwa zwyczajowa: murarka ogrodowa). Po pierwsze, oceniono toksyczność wszystkich trzech środków dla świeżo wylęgłych dorosłych samic pszczół przy różnych drogach narażenia, a mianowicie karmieniu skażonym pokarmem i kontakcie miejscowym (rozdział 2). Oszacowane asymptotyczne (dla nieskończonego czasu) wartości LC_{50} były dla Dursbanu przy obu drogach narażenia niższe od stężenia zalecanego do stosowania w uprawach, podczas gdy w przypadku Sherpy i Mospilanu wartości były niższe od zalecanych tylko w wypadku narażenia przez pokarm. Niezależnie od drogi

narażenia, Dursban powodował wysoką śmiertelność już po 24 h przy zaledwie ułamku stężenia faktycznie stosowanego przez rolników w terenie, co wskazuje na wysoką toksyczność tego produktu dla *O. bicornis*.

Ponieważ pszczoły mogą być narażone na pestycydy również w okresie życia larwalnego poprzez spożywanie skażonego pyłku, toksyczne działanie insektycydów obserwowano podczas rozwoju *O. bicornis*, karmiąc larwy skażonym pyłkiem, począwszy od 3 dnia życia (rozdział 3). W porównaniu z larwami kontrolnymi (karmionymi nieskażonym pyłkiem), zarówno CHP, jak i CYP, we wszystkich badanych stężeniach istotnie zmniejszyły przeżywalność larw *O. bicornis* i masę ciała. Z drugiej strony ACT nie wpływał ani na przeżywalność larw, ani na masę ciała, jednak długość stadium larwalnego do uformowania kokonu była istotnie krótsza niż w grupie kontrolnej. Żaden z badanych insektycydów nie wpływał na masę osobników w kokonach. Chociaż nie było wyraźnej monotonicznej zależności dawka-odpowiedź, co najmniej 80% osobników poddanych działaniu testowanych insektycydów w jakimkolwiek stężeniu nie osiągnęło stadium dorosłego, podczas gdy 43% osobników kontrolnych wylęzło się pomyślnie po przezimowaniu. Z badań jasno wynika, że przynajmniej niektóre insektycydy wykazują działanie toksyczne nie tylko u *imagines*, ale mogą również wpływać na rozwój *O. bicornis* w stężeniach w pyłku występujących faktycznie w środowisku.

Aby ocenić, w jaki sposób pszczoły regulują stężenie insektycydów (zarówno związków macierzystych, jak i ich głównych metabolitów), przeprowadzono typowy eksperyment toksykokinetyczny (TK), w którym dorosłe pszczoły karmiono indywidualnie najpierw roztworem sacharozy skażonym insektycydami (faza kontaminacji), a następnie roztworem nieskażonym (faza dekontaminacji) (rozdział 4). Świeżo wylęte pszczoły były narażone na subletalne stężenia trzech środków ochrony roślin (w stężeniach zbliżonych do LC₂₀, oszacowanych jak opisano w rozdziale 2). Modele TK różniły się znacznie między insektycydami. Toksykokinetyka ACT (i jego metabolitu) była zgodna z klasycznym modelem jednoprzediałowym ze stopniową akumulacją w fazie kontaminacji i wydalaniem w fazie dekontaminacji. Natomiast zarówno CYP, jak i CHP (plus właściwe im metabolity), akumulowały się szybko w ciągu pierwszych dwóch dni, a po przestawieniu pszczół na niezanieczyszczony pokarm stężenie w organizmie zmniejszało się powoli tylko dla CYP, podczas gdy do końca eksperymentu nie stwierdzono istotnego wydalania CHP. Wyniki te pokazały, że w warunkach chronicznej ekspozycji niektóre

insektycydy mogą szkodzić samotnym pszczołom nawet w śladowych stężeniach w pokarmie, ponieważ ich ciągła akumulacja może prowadzić do rosnącej z czasem toksyczności.

Na koniec oceniono subletalny wpływ insektycydów na markery fizjologiczne i biochemiczne u dorosłych samic *O. bicornis* (rozdział 3). Koszty energetyczne zatrucia oszacowano mierząc całkowite dostępne rezerwy energii (białka, węglowodany, lipidy) oraz zużycie energii (określone na podstawie tempa respiracji osobnika). Wszystkie trzy testowane środki ochrony roślin zmieniły budżet energetyczny pszczół, obniżając ilość energii zmagazynowanej głównie w postaci lipidów i węglowodanów (ale nie białek) i/lub zmniejszając tempo metabolizmu w porównaniu do kontroli (pszczół karmionych niezanieczyszczonym pokarmem). Przy narażeniu na subletalne stężenia insektycydów nie zaobserwowano zmian w aktywności acetylocholinesterazy i S-transferazy glutationowej. Wyniki tej części badań sugerują, że chroniczna ekspozycja na niektóre pestycydy, nawet w stosunkowo niskich stężeniach, może powodować poważne zaburzenia fizjologiczne, które potencjalnie mogą być szkodliwe dla samotnych pszczół. W szczególności spadek ilości dostępnej energii i jej związków źródłowych (w szczególności węglowodanów i lipidów) może prowadzić do skrócenia czasu życia, obniżenia płodności, upośledzenia pamięci długoterminowej, zmian behawioralnych i/lub supresji immunologicznej u pszczół.

Podsumowując, wyniki kompleksowego badania zaprezentowanego w niniejszej rozprawie doktorskiej wyraźnie wskazują, że niektóre preparaty owadobójcze wykazują zarówno letalną, jak i subletalną toksyczność względem pszczół samotnic w realistycznych stężeniach faktycznie spotykanych w środowisku. Udowodniono również, że nawet jeśli pestycyd nie powoduje żadnych skutków toksycznych we wczesnych stadiach rozwoju larwalnego, nadal może wpływać na całkowity rozwój osobniczy, jak pokazano dla Mospilanu-acetamipridu w rozdziale 3, lub może powodować zaburzenia fizjologiczne, jak zaobserwowano dla wszystkich testowanych insektycydów w rozdziale 5. Jednak w obecnych programach oceny ryzyka wynikającego ze stosowania pestycydów subletalny wpływ na rozwój pszczół do zdrowych *imagines* po ekspozycji na insektycydy w stadiach larwalnych jest pomijany. Badania przeprowadzone w mojej pracy są zatem komplementarne z wcześniejszymi badaniami nad wpływem insektycydów na organizmy niebędące przedmiotem zwalczania, wykazując, że narażenie na stężenia faktycznie

stwierdzane w środowisku może mieć negatywny wpływ na przeżywalność, rozwój, tempo metabolizmu i budżet energetyczny *O. bicornis*. Moje badania dodatkowo wskazują na problemy napotymane podczas prób pozyskania poprzez eksperymenty laboratoryjne realistycznych danych do wykorzystania w ocenie ryzyka stwarzanego przez stosowanie pestycydów i dostarczają rozwiązania. To z kolei umożliwi bardziej kompleksową ocenę ryzyka, skuteczniejsze regulacje dotyczące pestycydów i ochronę zapylaczy.

Za zgodność:



(Prof. dr hab. Ryszard Laskowski)

ABSTRACT

Bees are the dominant group of pollinators providing insect pollination services to many crops. In particular, solitary bees (both wild and managed) pollinate several fruit and nut crops such as apples, almonds etc. Despite their economic and ecological significance, bee populations have declined substantially in recent decades, with negative socio-economic consequences, which is predicted to disproportionately affect communities worldwide. The widespread use of pesticides is usually blamed for this phenomenon. It is known, however, that it will not be possible to stop using pesticides within the next few dozen years. It is therefore important to understand to what extent pesticides are harmful to the solitary bees in order to conserve ecologically and economically important pollinator species and to develop new strategies for mitigating their population declines. Moreover, when it comes to pesticides monitoring and regulation, solitary bees are given much less importance than social honeybees (*Apis* spp.). However, because of their biological and morphological differences and the lack of social lifestyle, solitary bees may be affected by pesticides differently than social *Apis* bees. In 2013, the European Food Safety Authority (EFSA) suggested to include the red mason bee, *Osmia bicornis*, as a model organism for non-*Apis* solitary bees in the pesticide risk assessment scheme. However, the scarcity of information about the direct or indirect effects of pesticides and robust toxicity test methods for this species limits its use in the current risk assessment.

The aim of this thesis was to study and compare the toxicokinetics and toxicity of three insecticide-based agrochemicals, namely Dursban 480 EC (containing chlorpyrifos – CHP as the active ingredient (a.i.)), Sherpa 100 EC (a.i. cypermethrin – CYP), and Mospilan 20 SP (a.i. acetamiprid – ACT), in the solitary bee *O. bicornis* (common name: red mason bee). First, toxicity of the agrochemicals was assessed on newly emerged adult female bees through different routes of exposure, namely oral feeding and topical contact (*Chapter 2*). The asymptotic LC₅₀s at infinite-time were estimated to be lower than the concentrations recommended for field application for Dursban in both exposure routes, whereas in case of Sherpa and Mospilan the values were lower for oral exposure only. Regardless of the exposure route, Dursban caused high mortality already after 24 h at a fraction of concentration actually used by farmers in the field, indicating high toxicity of this product to *O. bicornis*.

As the bees are also likely to be exposed to pesticides as larvae *via* the consumption of contaminated pollen, the toxic effects of the insecticides were observed during the development of *O. bicornis* by feeding the larva, since they were 3-day old, with

agrochemical-contaminated pollen (*Chapter 3*). When compared to the control larvae (fed with uncontaminated pollen), both CHP and CYP at all tested concentrations significantly reduced the *O. bicornis* larval survival and body mass. On the other hand, ACT did not affect either larval survival or body mass, however the length of larval stage to cocoon formation was significantly shortened compared to controls. None of the tested insecticides affected the mass of cocooned individuals. Although there was no clear monotonic dose-response relationship, at least 80% of individuals exposed to the tested insecticides at any concentration did not reach the adult stage, whereas 43% of the controls emerged successfully after overwintering. It is clear from these studies that at least some insecticide formulations reveal toxic effects not only in the adults but can also affect the development of *O. bicornis* at environmentally relevant concentrations in pollen.

To assess how bees regulate body concentrations of the insecticides (both parent compounds and their main metabolites), a typical toxicokinetics (TK) experiment was performed in which adult bees were fed individually insecticide-contaminated sucrose solution (contamination phase), and then were switched to uncontaminated food (decontamination phase) (*Chapter 4*). Here, newly emerged red mason bees were exposed to sublethal concentrations of the three agrochemicals (at near LC_{20s} concentrations, as estimated in *Chapter 2*). The TK models differed substantially between the insecticides. ACT (and its metabolite) followed the classic one-compartment model with gradual accumulation during the uptake phase followed by depuration during the decontamination phase. In contrast, both CYP and CHP (plus their respective metabolites) accumulated rapidly in the first two days, and after switching the bees to the uncontaminated food, body concentrations decreased slowly only for CYP whereas no substantial depuration of CHP was found until the end of the experiment. These results demonstrated that some insecticides could harm important solitary bees even at trace concentrations in food but when exposed continuously, because their constant accumulation may lead to time-reinforced toxicity.

Finally, the sublethal effects of insecticides on the physiological and biochemical markers were assessed in female *O. bicornis* adults (*Chapter 3*). The energetic costs of intoxication were assessed by measuring total available energy reserves (proteins, carbohydrates, lipids) and energy consumption (determined from whole-body respiration rate). All three tested agrochemicals altered the energetic budget of the bees by depriving energy amount stored mainly as carbohydrates and lipids (but not proteins) and/or a decrease in metabolic rate compared to the controls (fed with uncontaminated food). No

changes in the activities of acetylcholinesterase and glutathione-S-transferase by insecticides were observed at tested sublethal concentrations. The results of this study suggest that chronic exposure to some pesticides, even at relatively low concentrations, could cause severe physiological disruptions that can potentially be damaging for the solitary bees. Particularly the deprivation of available energy and its source compounds (specifically carbohydrates and lipids) may lead to decreased longevity and fecundity, long-term memory impairment, locomotor abnormalities, and/or immune suppression in bees.

To sum up, results of the comprehensive study presented in this doctoral thesis clearly show that some insecticide formulations exert both lethal and sublethal toxicities to important solitary bees such as *O. bicornis* even at environmentally relevant concentrations. It has also been proved that even if a pesticide does not cause any toxicity in the early stages of larval growth, it can still affect the overall development, as seen for Mospilan-acetamiprid in *Chapter 3*, or may cause physiological disruptions as observed for all tested insecticides in *Chapter 5*. However, in the current risk assessment schemes for pesticides in bees, the sublethal effects on bees' development to healthy adults when exposed at larval stages are overlooked. Studies conducted in my thesis are, thus, complementary with previous research on non-target organisms and insecticides, demonstrating that exposure even at field-relevant levels can have negative effects on survival, development, metabolic rate and energetic budget of the solitary bees, *O. bicornis*. My research further highlights the problems encountered when trying to provide realistic data for use in assessing risks posed by use of agrochemicals through laboratory experiments and provide solutions. This, in turn, will allow for more comprehensive risk assessments, more effective pesticide regulation and pollinator conservation.

Za zgodność:



(Prof. dr hab. Ryszard Laskowski)