

Včela medonosná- zkouška akutní kontaktní toxicity



Metoda:



- k posouzení akutní kontaktní toxicity přípravků na ochranu rostlin (pesticidy) a jiných chemických látek pro dříve včel medonosné (dospělé)
- pesticidy jsou zkouzeny ve formě účinné látky nebo ve formě finálně upravených přípravků
- k ověření citlivosti včel a přesnosti zkuzebního postupu se používá standard toxicity

Definice:



Akutní kontaktní toxicita: nepříznivý účinek, ke kterému dojde nejpozději do 96 h od topikální aplikace jedné dávky zkoušené látky

Dávka: množství aplikované zkoušené látky, vyjaduje se v hmotnosti (μg) zkoušené látky na jednoho testovacího živočicha

LD₅₀ (střední letální dávka) kontaktní : je statisticky vypočtená jednotlivá dávka látky, která může po kontaktní aplikaci způsobit úhyn 50 % jedinců

Mortalita: jedinec se považuje za uhynulého, je-li zcela nepohyblivý

Podstata zkušební metody:



- dříve se exponují ad dávek zkoušené látky rozpustné ve vhodném nosiči pomocí aplikací na torax (jako kapky)
- doba expozice: 24/48/96 hodin
- mortalita se zaznamenává denně a porovnává se s kontrolními hodnotami
- výsledky zkoušky se analyzují s cílem vypočítat LD50 pro daný počet hodin

Validita zkoušky:



Má-li být zkouška platná, musí být splněny tyto podmínky:

- průměrná mortalita ve všech kontrolních skupinách nesmí na konci zkoušky překročit 10 %
- LD₅₀ pro standard toxicity odpovídá specifikovanému rozsahu

1. Sbírání včel:



- mladuzky téhož plemena
- z dobře potravou zásobených, zdravých, chorob prostých včelstev, s kladoucí matkou, se známým původem, chovem a fyziologickým stavem
- sbírány ráno v den zkoušky nebo večer před zkouškou
- neměly by být sbírány brzy na jaře nebo pozdě na podzim (změna fyziologie)
- kdy na jaře nebo na podzim-> mohou se vylíhnout v inkubátoru a chovat s světlým chlebem (na plástovém pylu) a s cukerným roztokem
- včely ošetřené chemickými látkami (antibiotika, atd.) by neměly být použity pro zkoušky toxicity po čtyřech týdnech od konce posledního ošetření

2. Podmínky chovu a krmení:



- snadno čistitelné a dobře v trané klíčky (z koroziivzdorné oceli, drát něho pletiva, plastu nebo dřev ně na jednorázové použití)
- velikost klíček vyhovovat potřebe v el-> dostatek prostoru, skupiny po 10 v elách
- p echovávány ve tm v experimentální místnosti při teplot $25 \pm 2 \text{ } ^\circ \text{C}$
- zaznamenává se relativní vlhkost, která je obvykle 50 . 70 %
- zacházení se v elami, včetně exponování a pozorování, může být prováděno za (denního) světla
- jako potrava se používá vodný cukerný roztok, podává se za použití krmítka včetně skleněné trubičky

3. Příprava včel:



- sesbírané včely mohou být za účelem aplikace zkouzené látky narkotizovány oxidem uhličitým nebo dusíkem
- množství anestetika v době expozice by mělo být minimalizováno
- hynoucí včely se před zahájením zkoušky odstraní a nahradí zdravými včelami

4. Příprava dávek:



- zkoušená látka se aplikuje jako roztok v nosiči, tj. v organickém rozpouštědle nebo jako vodný roztok se směsí edlem
- organické rozpouštědla: upřednostvován aceton, jinak rozpouštědla s nízkou toxicitou pro včely (např. dimethylformamid, dimethylsulfoxid)
- u finálně upravených přípravků dispergovaných ve vodě a u silně polárních organických látek nerozpustných v organických nosičích rozpouštědlech lze aplikaci usnadnit jejich rozpouštěním ve slabém roztoku komerčního směšedla (např. směšedla Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween)
- připraví se vhodné kontrolní roztoky, tzn. použijí-li se k rozpouštění zkoušené látky rozpouštědlo nebo dispergátor, použijí se dvě samostatné kontrolní skupiny: jedna ošetřená vodou a jedna rozpouštědlem/dispergátorem

1. Zkušební a kontrolní skupiny:



- pro zkoušku se požaduje alespoň pět dávek tvořících geometrickou řadu s faktorem nepěknějším 2,2 a pokrývajících rozsah pro LD_{50}
- počet dávek se musí stanovit s ohledem na směrnici křivky toxicity (dávka versus mortalita) a s ohledem na statistickou metodu zvolenou pro analýzu výsledků
- vhodné dávky je možné zvolit pomocí orientační zkoušky
- každá zkušební koncentrace se podává alespoň třem souborným zkušebním skupinám o 10 včelách, tj. ve třech opakováních
- vedle zkušebních skupin se nasadí alespoň i kontrolní skupiny, každá o 10 včelách
- je-li použito organické rozpouštědlo nebo směs, musí se za aditivum i kontrolní skupiny po 10 včelách pro rozpouštědlo a směs

2. Standard toxicity:



- vyberou se alespo t i dávky pokrývající o ekávanou hodnotu LD_{50}
- pro ka0dou zkuzební dávku se nasadí alespo t i paralelní klícky po 10 v elách
- up ednost ovaným standardem toxicity je dimethoát
- i jiné standardy toxicity, pokud lze p edlo0it dostatek údaj pro ov ení o ekávané reakce na dávku (nap . parathion)

3. Expozice:



a) podávání dávek

- u narkotizovaných v el se jednotliv provede topikální aplikace
- v ely se náhodn rozd lí do r zných zkuzebních a kontrolních skupin
- 1 μ l roztoku obsahujícího zkouzenou látku se ve vhodné koncentraci aplikuje mikroaplikátorem na dorsální stranu thoraxu ka0dé v ely
- po aplikaci se v ely umístí do zkuzebních klíček a zásobí se cukerným roztokem

b) délka trvání zkouzky

- 24/48/96 hodin

4. Pozorování:



- mortalita se zaznamená po 4 h od aplikace a poté po 24 h a 48 h
- je-li nezbytné dobu pozorování prodloužit, provedou se další vyhodnocení v 24hodinových intervalech maximálně do 96 h, pokud mortalita v kontrolních skupinách nepřekrojuje 10 %
- zaznamenává se veškeré neobvyklé chování pozorované během doby zkoušky



5. Limitní zkouška:

- v nichž (např. pokud se u látky nízká toxicita) limitní zkouška za použití 100 µg účinné látky na vlnu s cílem prokázat, že hodnota LD₅₀ je vyšší než tato hodnota
- postupuje se stejným způsobem, včetně nasazení tří souborů zkoušebních skupin pro každou zkoušební dávku, tj. tří opakování, odpovídajících kontrolních skupin a použití standardu toxicity
- dojde-li k úhynům, měla by se provést úplná studie
- jsou-li pozorovány subletální účinky, zaznamenají se