



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Ekotoxikologie – závěr přednášek nové přístupy a poznatky

Luděk Bláha, PŘF MU

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

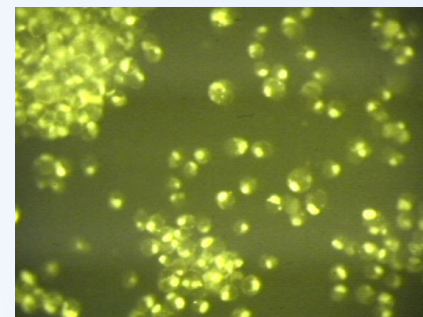
Přehled závěrečné přednášky

- Moderní přístupy experimentální ekotoxikologie
 - In vitro modely
 - Biomarkery a „MOA“ (mode-of-action / omics) techniky
- Modely v ekotoxikologii
 - SAR a QSAR
 - AOP / PBPK / TOXCAST
- „Nové“ problémy v ekotoxikologii
 - Nanočástice
- Novinky a zajímavosti



Výzkumy mechanismů toxicity in vitro modely a biotesty

- Zjišťování účinků (Biologie, Toxikologie a Ekotoxikologie) - existuje velké množství modelů
- Účinky na celých organismech
 - Standardní biotesty in vivo: legislativa
 - „Nestandardní“ biotesty in vivo: experimentální výzkumná práce
- Pochopení a identifikace **specifických mechanismů** působení
 - In vitro modely: Orgánové / Tkáňové / Buněčné
 - Výhody
 - Mechanistické porozumění
 - Šetření experimentálních zvířat (etické principy „3R“)
 - Nevýhody
 - „Jen“ in vitro, chybí komplex a interakce v organismu



Výzkumy mechanismů toxicity in vitro modely a biotesty

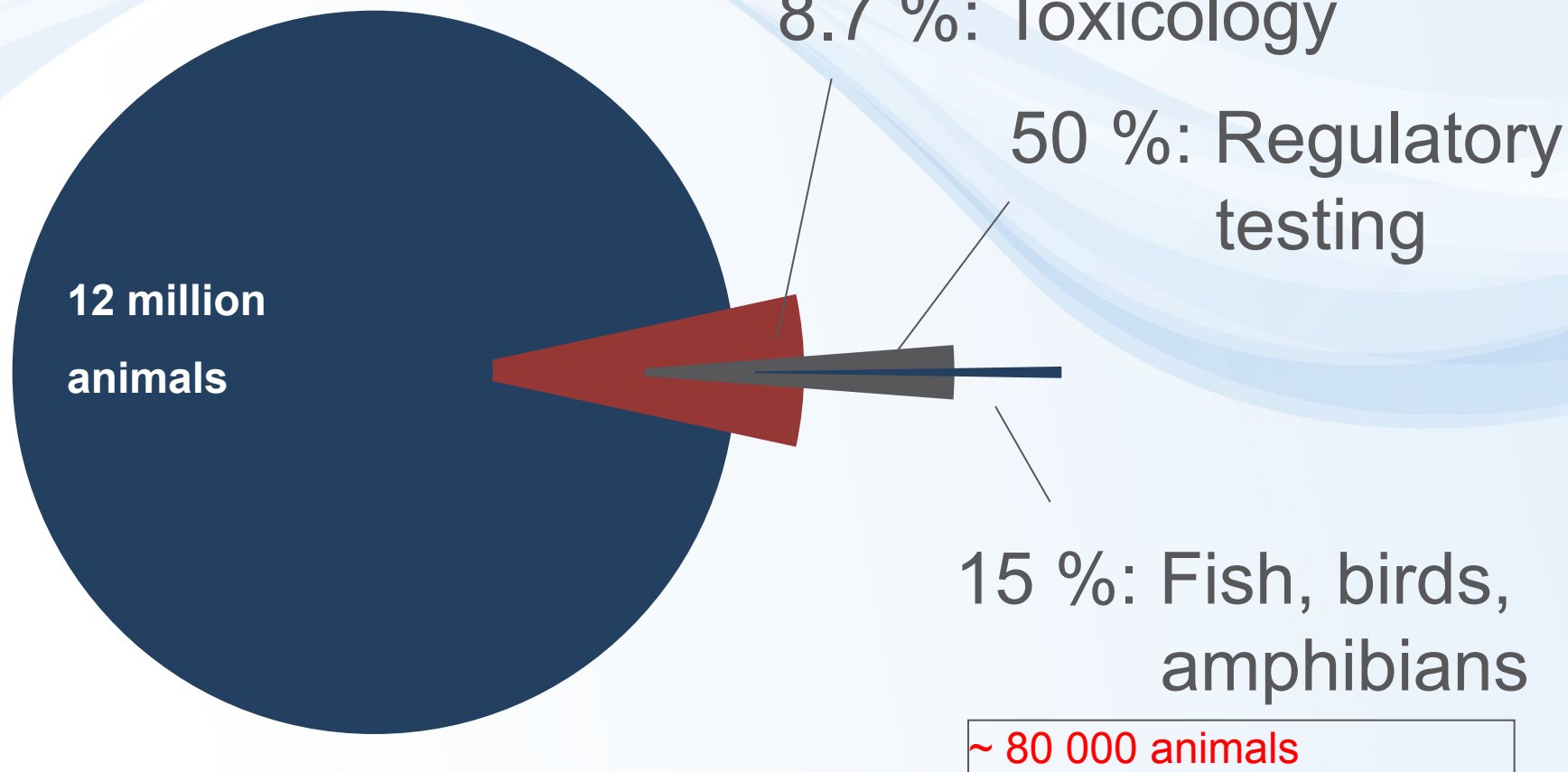


Práce s in vitro kulturami
(kultivační / expoziční
nádoby a média)



Sterilní práce s modely in
vitro

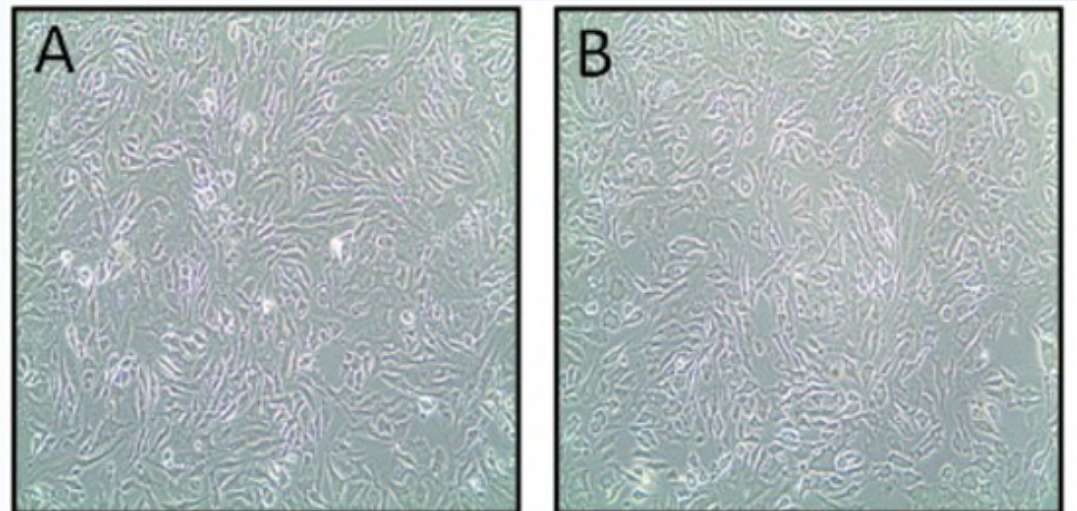
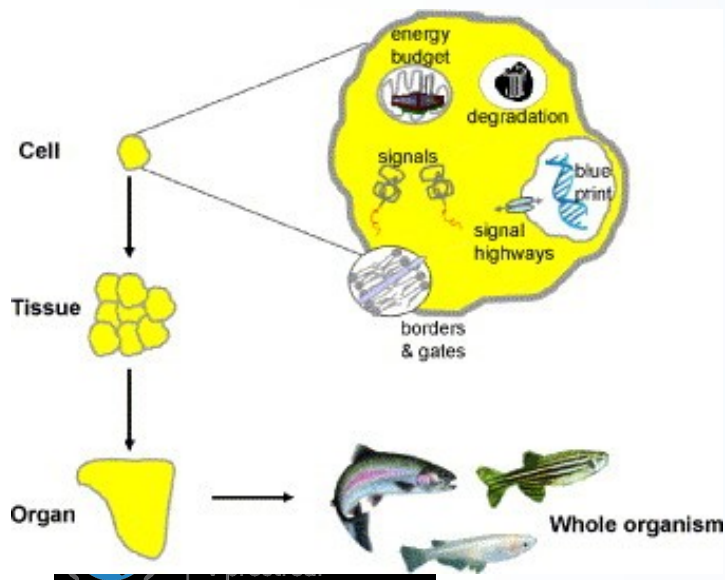
Počty obratlovců používaných pro hodnocení chemických látek v Evropě



Commission of the European Communities, 2010

In vitro models v ekotoxikologii 1 – rybí buňky

- Rybí buňky in vitro
 - Relativně snadná izolace buněk a udržování v kultuře (na rozdíl od savčích primárních linií se rybí buňky in vitro chovají jako immortalizované)
 - Příklady linií
 - RTgill (Rainbow Trout Gill)
 - RTL-W1 (Rainbow Trout Liver - W1)
 - Využití např. pro testování akutní toxicity (snaha o nahrazení testů in vivo)
 - Př. Rtgill - podobná citlivost s in vivo modely → *validace / standardizace*



In vitro modely – stanovení specifických účinků

Jaderné receptory – ER, AhR

- Toxicita závislá na jaderných receptorech → velký význam v ekotoxicitě (viz jinde v přednáškách)
- Jaderné receptory = transkripční faktory
 - Aktivace receptoru → produkce nových proteinů (zvýšené hladiny = marker expozice)
 - Možnosti měření
 - Měření aktivity (např. oxidace – CYP450 – viz dále)
 - Měření celých proteinů (např. WesternBlotting nebo ELISA)
 - Měření na úrovni mRNA – genová exprese - PCR nebo kvantitativní PCR
 - Sleování „reporterových genů“ (viz dále)
- Měření aktivity AhR → indukce detoxikačních enzymů – CYPs
 - Nejčastěji - měření oxidázové aktivity CYP (metoda EROD)
 - (využívají se i další analýzy – Wblotting, mRNA ...)
- Měření aktivity ER → indukce ER-závislých proteinů
 - Vitellogenin (prekurzor žloutkového proteinu u vejcorodých – ryby, ptáci ..): měření WBlottin, ELISA nebo exprese mRNA

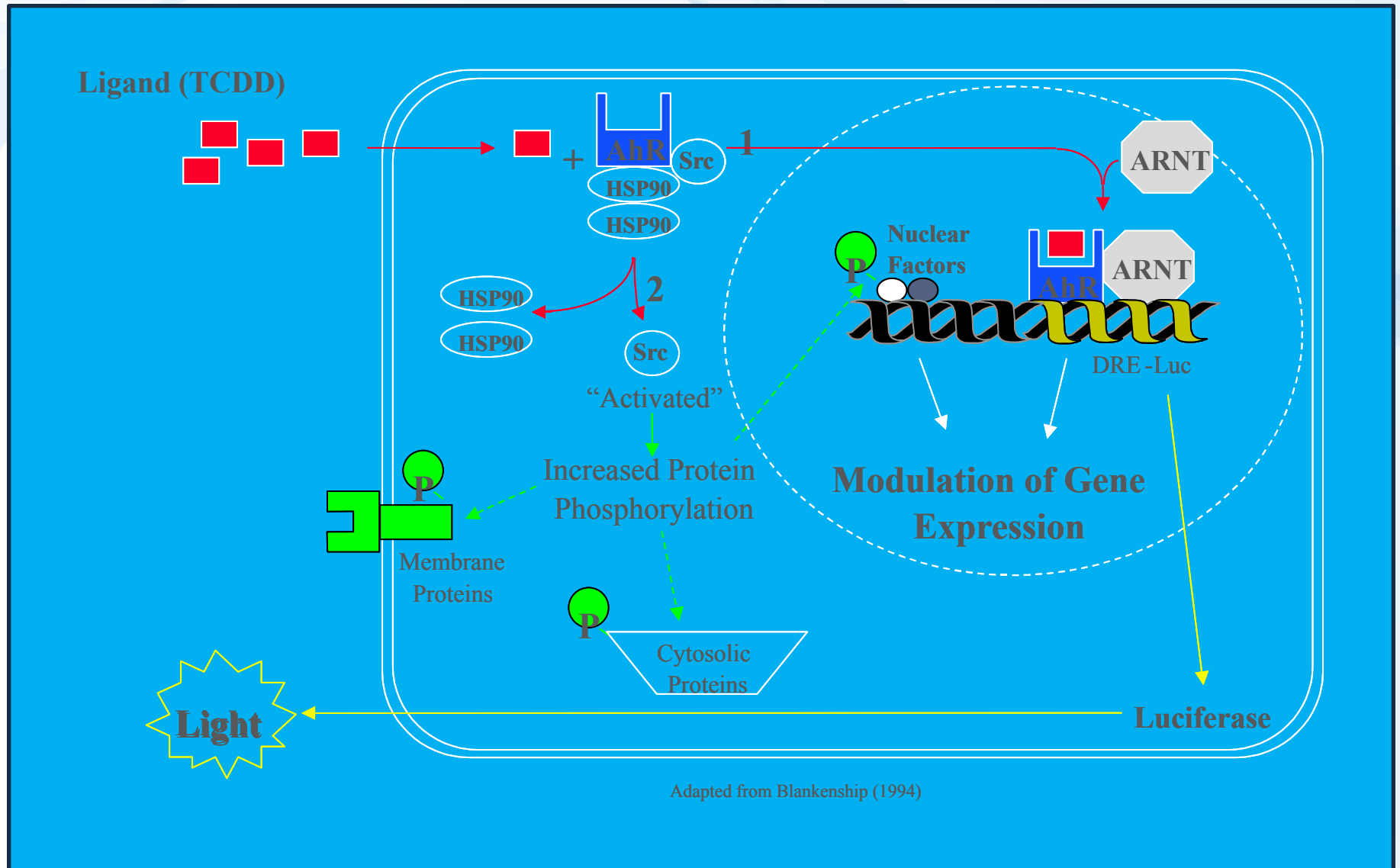


Reporterové testy

analýza účinků závislých na jaderných receptorech

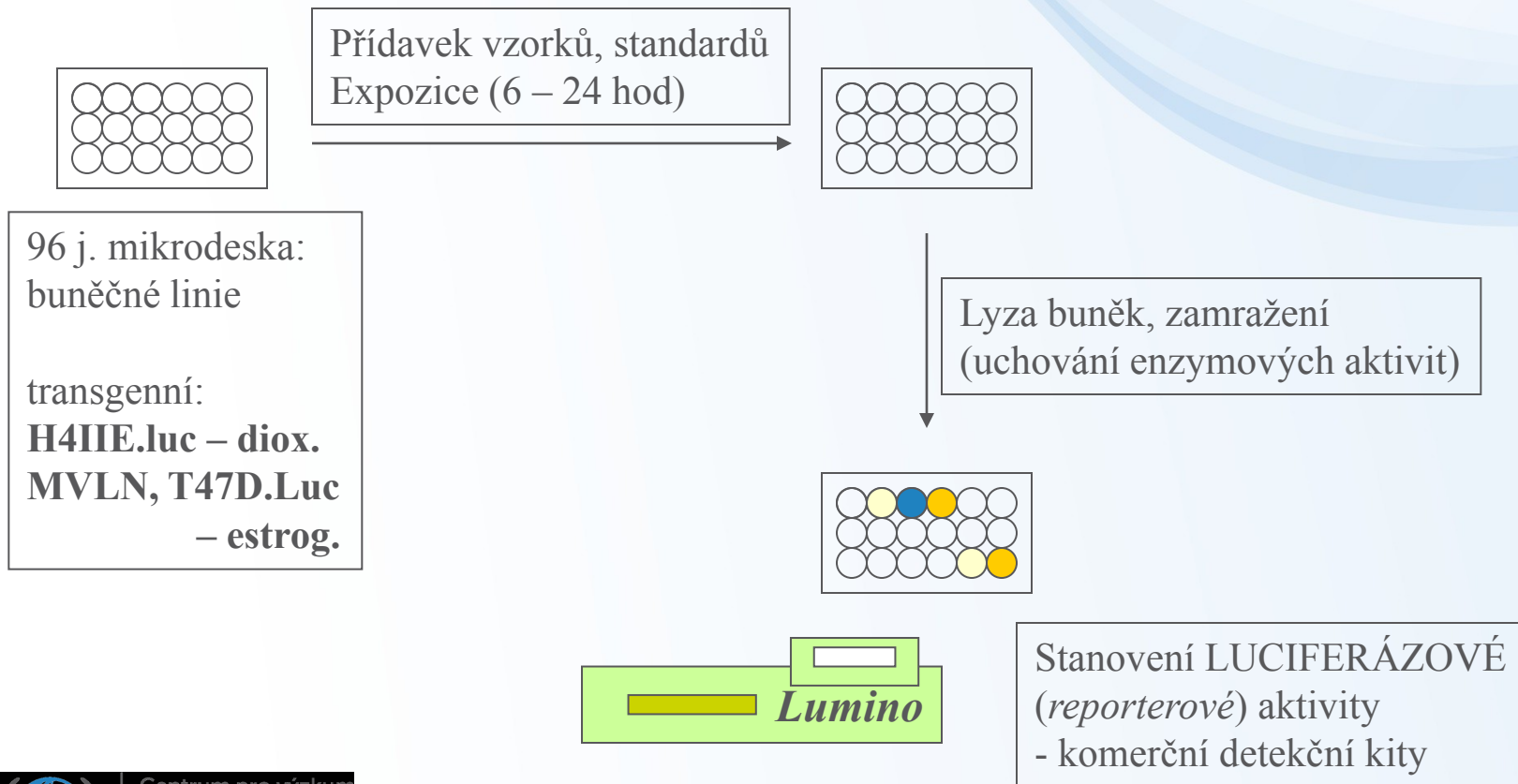
- Specificky vytvořené buněčné linie
- Původně odvozené z lidských, potkaních, rybích či jiných tkání
- Následná úprava („GMO“)
 - stabilní transfekce specifickými geny, které se v buňkách normálně nevyskytují
 - Luciferáza (ze světlušky), Beta-galaktosidáza
 - Vložení do DNA v místech, která jsou kontrolována příslušným receptorem (AhR, ER...)
- Princip – viz obrázek
 - Měření světla z luciferázy ~ množství dioxinově aktivních látek
- Někdy označované „CALUX“ (Chemical Assisted Luciferase Expression)
 - jde o komerční název některých buněk, ale v mnoha laboratořích (včetně RECETOX) se užívají principiálně stejné „nekomerční“ buňky (např. H4IIE.luc / MVLD / MDAkb2)

Stanovení toxicit závislých na intracelulárních receptorech



Stanovení aktivit/toxicit závislých na intracelulárních receptorech

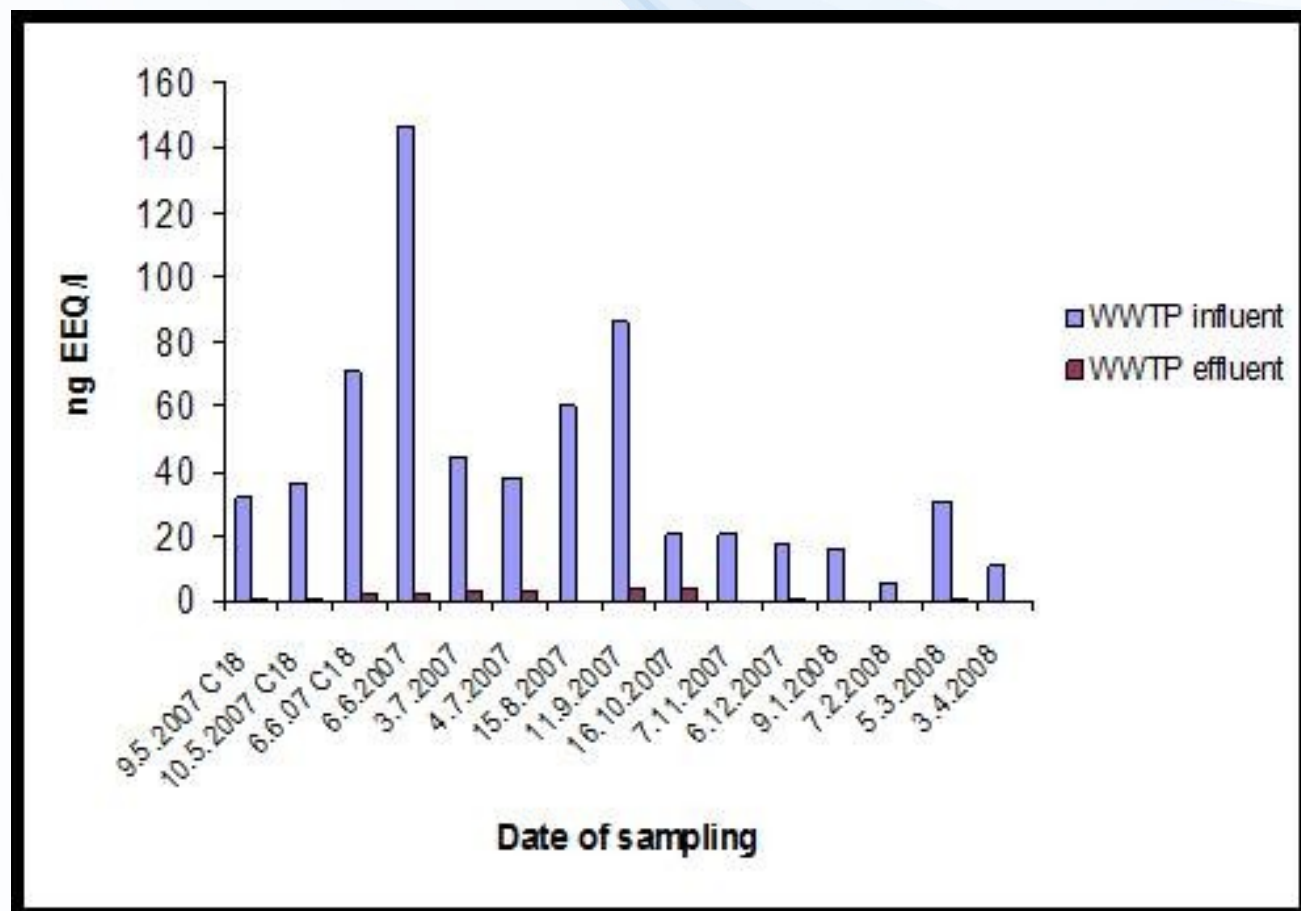
AhR, ER – experimentální design



Příklad – využití reporterových testů

Hladiny estrogenních látek (stanovení pomocí MVLN testu) na
Přítoku a Odtoku ČOV Brno-Modřice

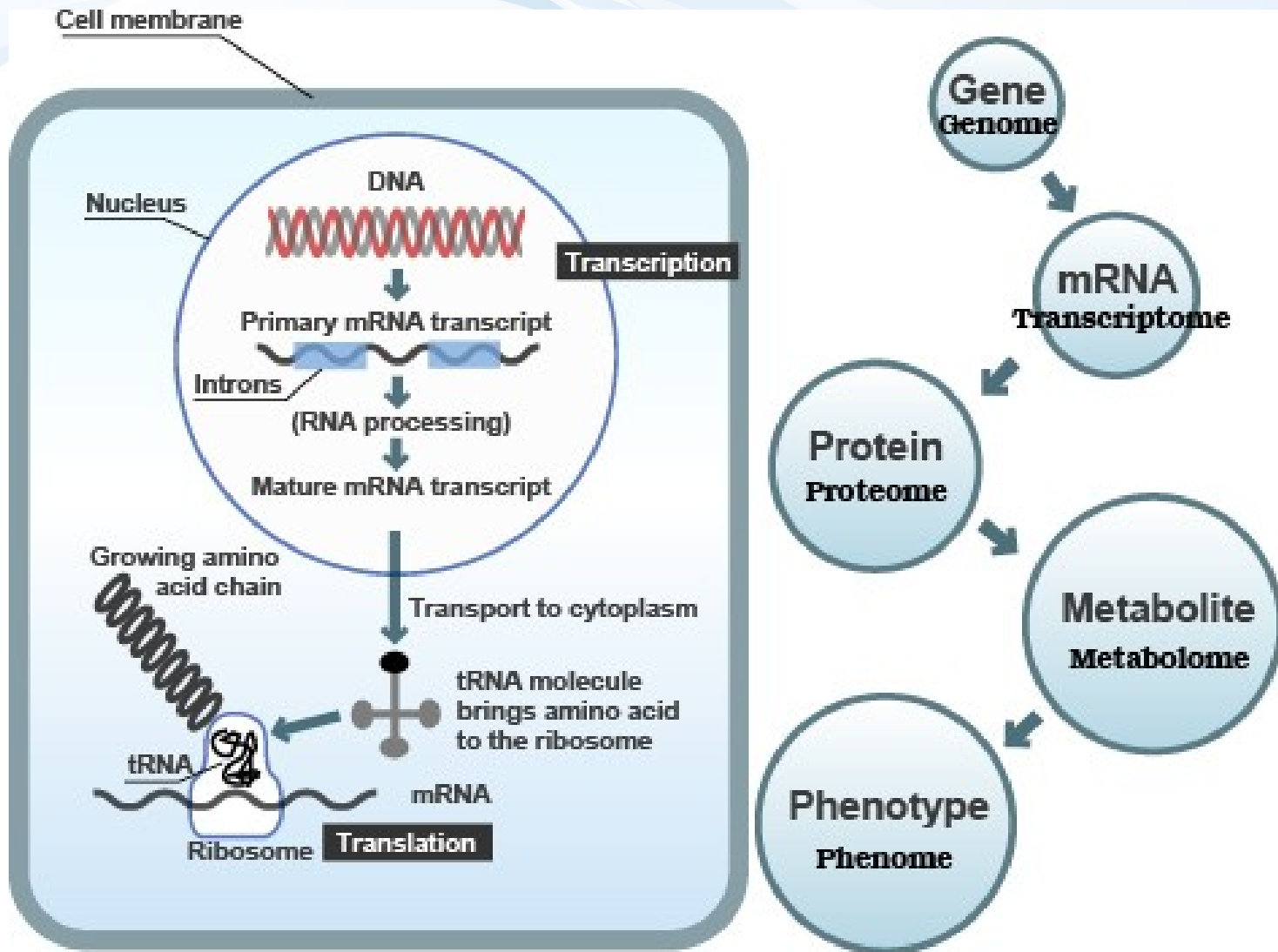
- Velká účinnost čištění
- Výsledné koncentrace (až 5 ng/L) jsou i tak biologicky účinné !



Techniky „OMICS“

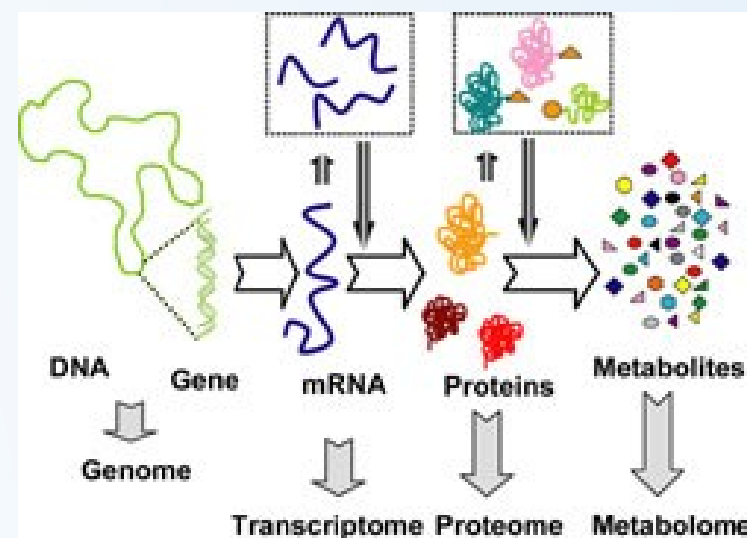


Úrovně působení látek v buňce / organismu



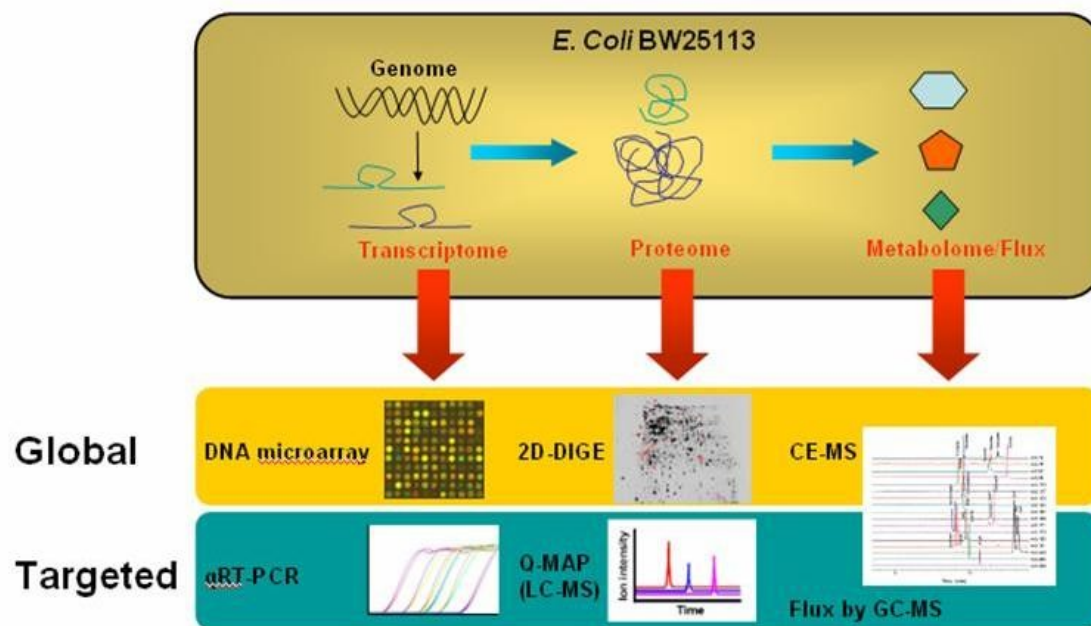
„Omiky“ –mechanistické změny

- Měření na jednotlivých úrovních
 - Geny – genomika: variabilita mezi jednotlivci, populacemi, druhy / vznik mutací atd.
 - mRNA – transkripce / transkriptomika – úroveň exprese jednotlivých genů
 - Proteiny – proteomika - hladiny jednotlivých proteinů
 - Produkty proteinů / metabolity – metabolomika
- Výsledný fenotyp (viditelný projev / změna)
 - Např. porucha rozmnožování / smrt



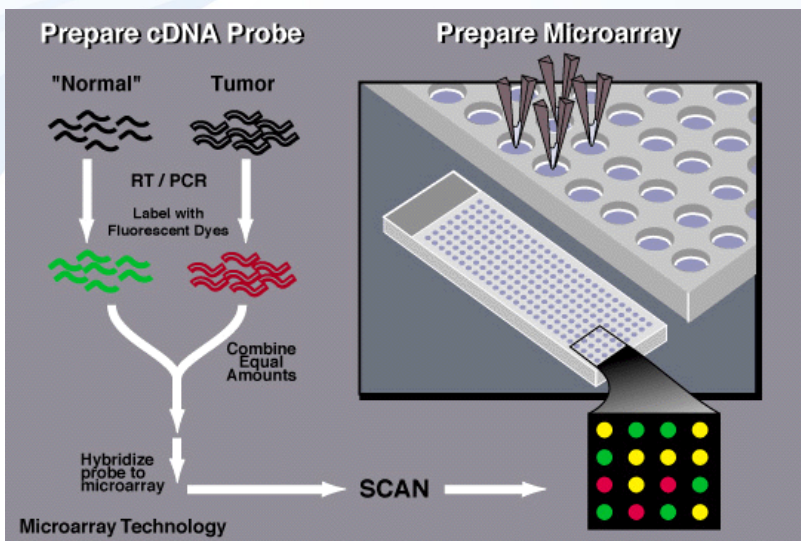
MOA (mode of action) techniky

- Generování velkých množství údajů (dat) z jednotlivých experimentů
- Současné sledování:
 - Hladiny mRNA - exprese až desítek-tisíc genů
 - Proteiny – sledování tisíců proteinů
 - Metabolity – tisíce metabolitů
- Moderní techniky molekulární biologie a hmotnostní spektrometrie
 - Velký rozvoj v posledních 10 letech
 - Postupné „zlevňování“ → větší dostupnost



Příklad - microarrays

Exponované vs. Kontrolní



- 1) Izolace mRNA
reverzní transkripce (RT) do cDNA
- 2) „Obarvení“
(různé barvy Kontrola vs. Exponovaná)
- 3) Smíchání Exp + Kontrola
(stejné celkové koncentrace)
- 4) Hybridizace na „microarray“
(párování nukleotidů - tisíce předpřipravených cílových DNA na jednom array)
- 5) Scanování → výsledná barva:
analýza relativní exprese (? Které je více ?)
Zelená = více „normal“
→ snížení exprese u exponovaných
Červená = více „exponovaná“
Žlutá = žádná změna



Výsledek – microarrays

Výsledek

„Heat map“

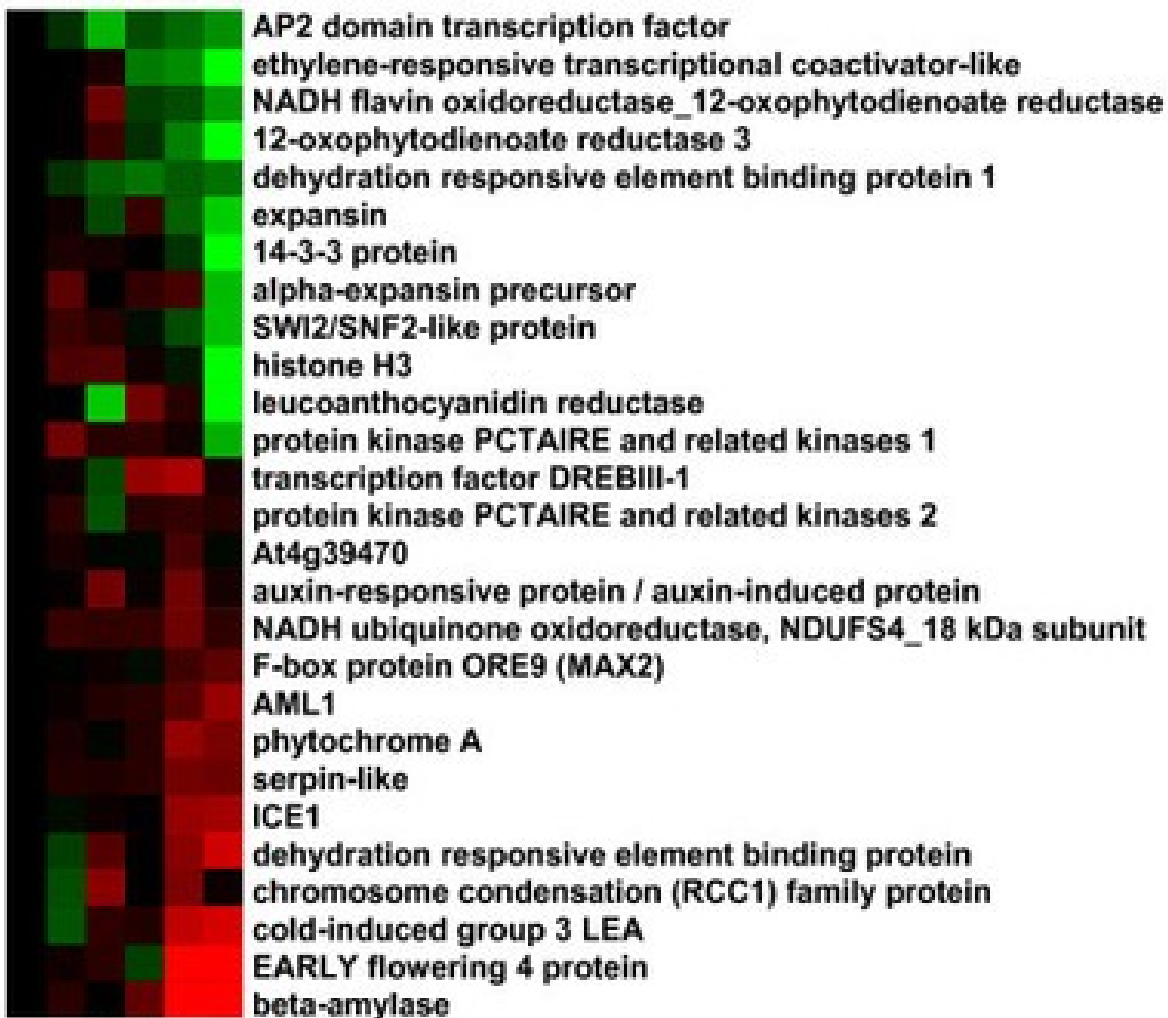
Změny exprese

Různých genů

→ Náročné
statistické zpracování

Experimentální varianty

K c1 c2 c3 c4 c5



Modely SAR a QSAR



SAR, QSAR

- **SAR = Structure Activity Relationships**
 - hledání vztahů mezi STRUKTUROU a AKTIVITOU látek (*struktura -> eko-toxicita*)
 - předpovědi efektů bez nutnosti experimentálních testování
- **Řada přístupů**
 - kvalitativní
 - přítomnost určité charakteristiky implikuje aktivitu (*vlastnost*)
 - *dlouhý alifatický řetězec -> afinita k membránám*
 - kvantitativní (=QSAR – Quantitative SAR)
 - matematický popis vztahů
 - jednorozměrné vztahy – korelace, regresní vztahy ...
 - vícerozměrné modelování (*PCA, PLS*), neuronové sítě ...



SAR, QSAR v ekotoxikologii

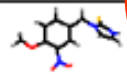
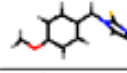
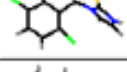
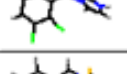
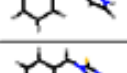
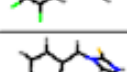

- Techniky QSAR původně vyvinuty pro design farmak
- Aplikace SAR, QSAR v ekotoxikologii
 - předpovědi environmentálně významných parametrů látek
 - *logKow*
 - *biokoncentrace, bioakumulace*
 - *předpovědi biodegradability a metabolismu*
 - *odhady rychlosti degradace t_{1/2}, vznikající metabolity*
 - předpovědi toxicity



Princip vývoje modelu QSAR

- **1) Vstupní data – ZNÁMÉ údaje**
 - Skupina podobných látek
 - Známá (změřená) vlastnost – např. aktivita / toxicita
 - Známá fyz-chem data (stovky různých parametrů)
- **2) Hledání modelu ve známých datech**
 - Např. $\text{Aktivita} = a * \text{parametr1} + b * \text{parametr2} + c$
 - (viz příklady dále)
- **3) Využití modelu pro předpověď „Aktivity“ neznámé látky**
 - Fyz-chem parametry \rightarrow dosazení do modelu \rightarrow výpočet „toxicity“

Příklad – vstupní data pro QSAR

	Structure	Activity [Y1]	Apol [X1]	Area [X2]	Dipole [X3]	Energy [X4]	Fl
1.		3.150	1.06E+04	270.566	7.139	133.002	
2.		3.450	9.55E+03	242.417	2.056	100.681	
3.		4.130	1.17E+04	252.990	1.037	103.760	
4.		3.450	1.17E+04	257.214	2.313	109.687	
5.		3.690	8.65E+03	215.372	1.028	90.970	
6.		4.010	1.17E+04	242.563	2.286	93.813	
7.		4.280	1.17E+04	251.587	1.558	100.894	



SAR, QSAR - příklady

- Předpovědi environmentálně významných parametrů chemických látek (*viz také úvod přednášek*)
 - Fyzikálně chemické parametry
- **Log P (log Kow)**  Příklady software, různé modely a principy výpočtu
 - ClogP (www.biobyte.com)
 - KOWWIN (esc.syrres.com)
(www.epa.gov/oppt/exposure/docs/episuitedi.htm)
 - SLIPPER (www.ibmh.msk.su/qsar/molpro)
 - KlogP (www.multicase.com)
 - ABSOLV (www.sirius-analytical.com)
 - ProLogP (www.compudrug.com)
 - SPARC (ibmlc2.chem.uga.edu/sparc)
 - IA (www.interactiveanalysis.com)
 - ACD (www.acdlabs.com)
 - QikProp (www.schrodinger.com)
 - AP-Algorithms (www.ap-algorithms.com)
 - ProPred (www.capec.kt.dtu.dk)
 - Cerius² (www.accelrys.com)
 - QMPRPlus (www.simulations-plus.com)



SAR, QSAR - příklady

– Předpověď' biokoncentrace

Modely doporučené TGD (*technical guidelines*) při registraci nových chemických látek v EU:

$$\log K_{ow} < 6$$

$$\log BCF = 0.85 \log K_{ow} - 0.7$$

$$\log K_{ow} \text{ values } 6 - 10$$

$$\log BCF = -0.2 \log K_{ow}^2 + 2.74 \log K_{ow} - 4.72$$

– Předpověď' biodegradability *také někdy: QSBR*

- jednoduché korelace degradability-chemický parametr
- sčítání vlivu charakteristických subdomén na degradabilitu ("+" degradace, "-" stabilita)
-> *suma pro celou molekulu = degradability score*

- vícerozměrné modelování

Table 11. Molecular structures and groups used by Geating (1981) to evaluate biodegradability

Description	Coefficient ^a
Single occurrence of sulfur in a ring	-13.9
More than two carbocyclic rings	-10.5
Alkyl chain (CH ₂) _n or CH ₃ (CH ₂) _{n-1} where n = 10 or more (chain fragment)	5.03
One benzene ring	3.94
More than one —N= or HN= group (substituent fragment)	-12.1
One —C=O group (sub. fragment)	4.71
Atoms other than C, H, O, N, S, or halogen	5.01
One —OH group (sub. fragment)	3.03
Substituent hydroxylamine	-16.4
Single occurrence of carbonyl in a ring	6.16
Substituent primary amide	-11.0
Presence of suffix	-4.80
More than one —O— group (chain fragment)	-5.44

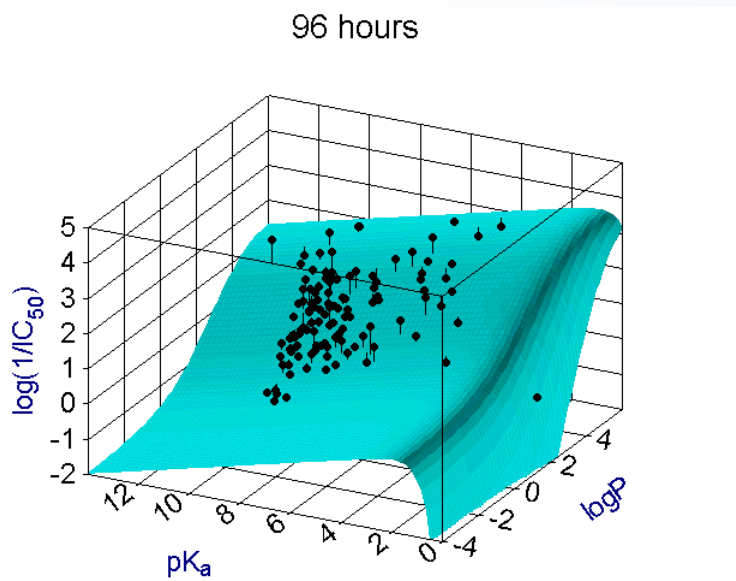
SAR, QSAR - příklady

- Předpovědi toxicity (také označováno – QSTR – Quantitative STRUCTURE-TOXICITY relationships)

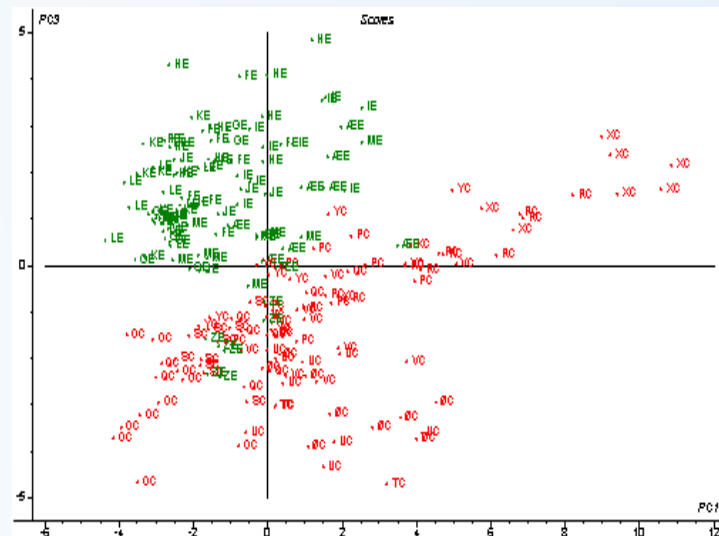
Př 1 – toxicita narkotických látek pro ryby (využívána např. i pro účely REACH)

$$\log(1/LC50) = 0.907 \cdot \log Kow - 4.94$$

Př 2 – toxicita fenolů pro korýše – vícenásobná regrese
(nepolární narkoza – $\log P$, polární toxicita – pK_a)



Př 3 – vícerozměrné modelování:
výsledek analýzy hlavních komponent (PCA)
- výstup : odlišení toxických a netoxických látek



Moderní výpočetní toxikologie



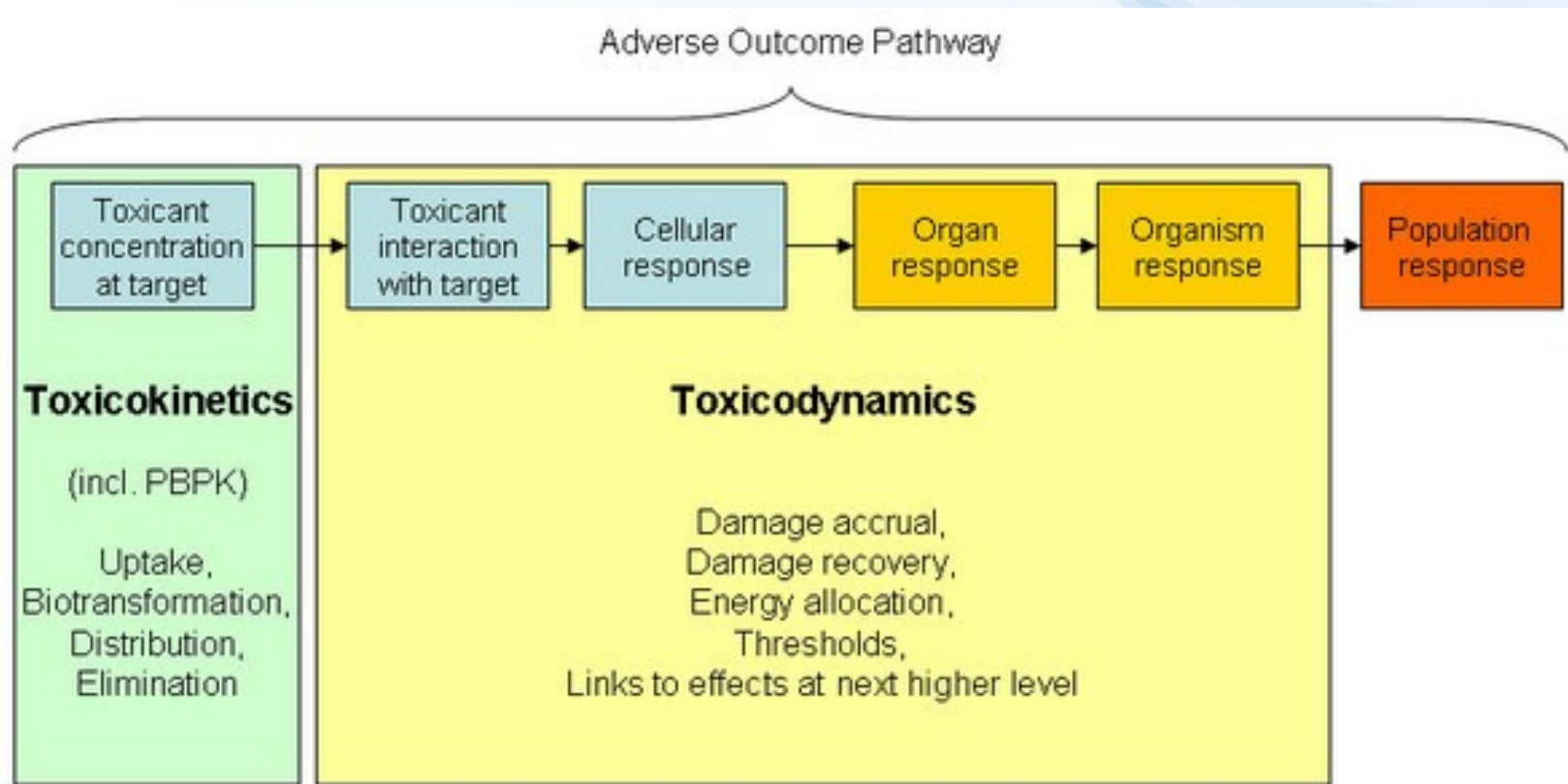
Adverse outcome pathways

Viz také dříve v přednáškách:

Dokážeme z koncentrace látky v prostředí předpovědět (matematicky) účinky ?

Základem je dokonalé porozumění

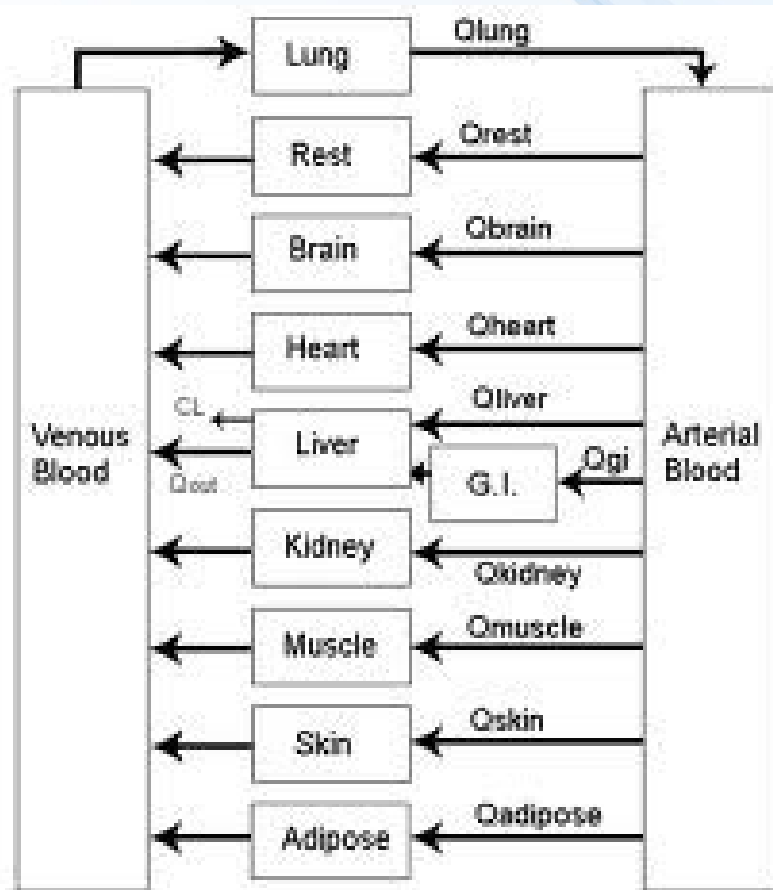
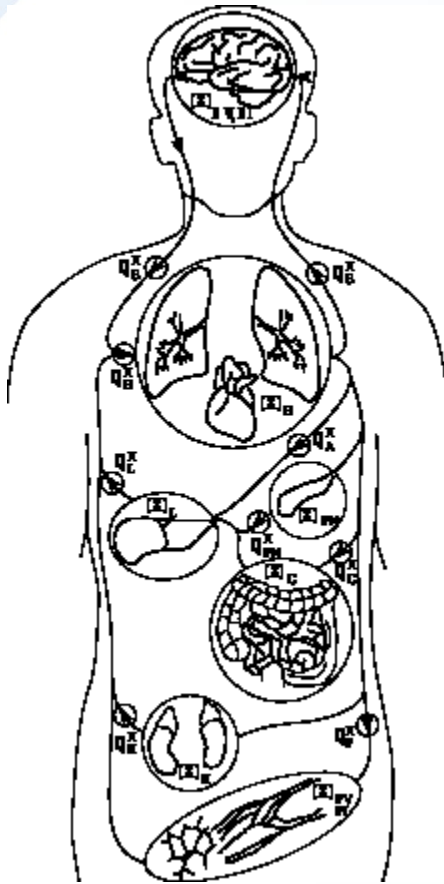
1) toxikokinetice (modely PBPK – viz dále) a 2) následně mechanismům (dynamika)



PBPK modely

PBPK (PBTK)

Physiologically based pharmacokinetic (toxicokinetic) models



Vnitřní „rozdělení“ organismu a parametrizace běžících procesů

→ Složitý model : Predikce koncentrací v jednotlivých tkáních



Výpočetní model → toxicita

Li et al. *BMC Systems Biology* 2011, 5:63
<http://www.biomedcentral.com/1752-0509/5/63>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

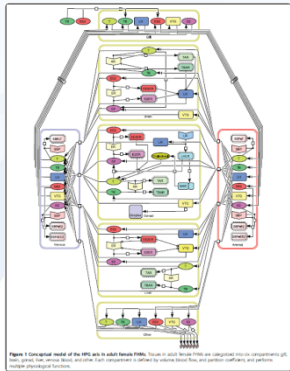
A computational model of the hypothalamic - pituitary - gonadal axis in female fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to 17α -ethynylestradiol and 17β -trenbolone

Zhenhong Li¹, Kevin J Kroll², Kathleen M Jensen³, Daniel L Villeneuve³, Gerald T Ankley³, Jayne V Brian⁴, María S Sepúlveda⁵, Edward F Orlando⁶, James M Lazorchak⁷, Mitchell Kostich⁷, Brandon Armstrong⁸, Nancy D Denslow² and Karen H Watanabe^{1*}

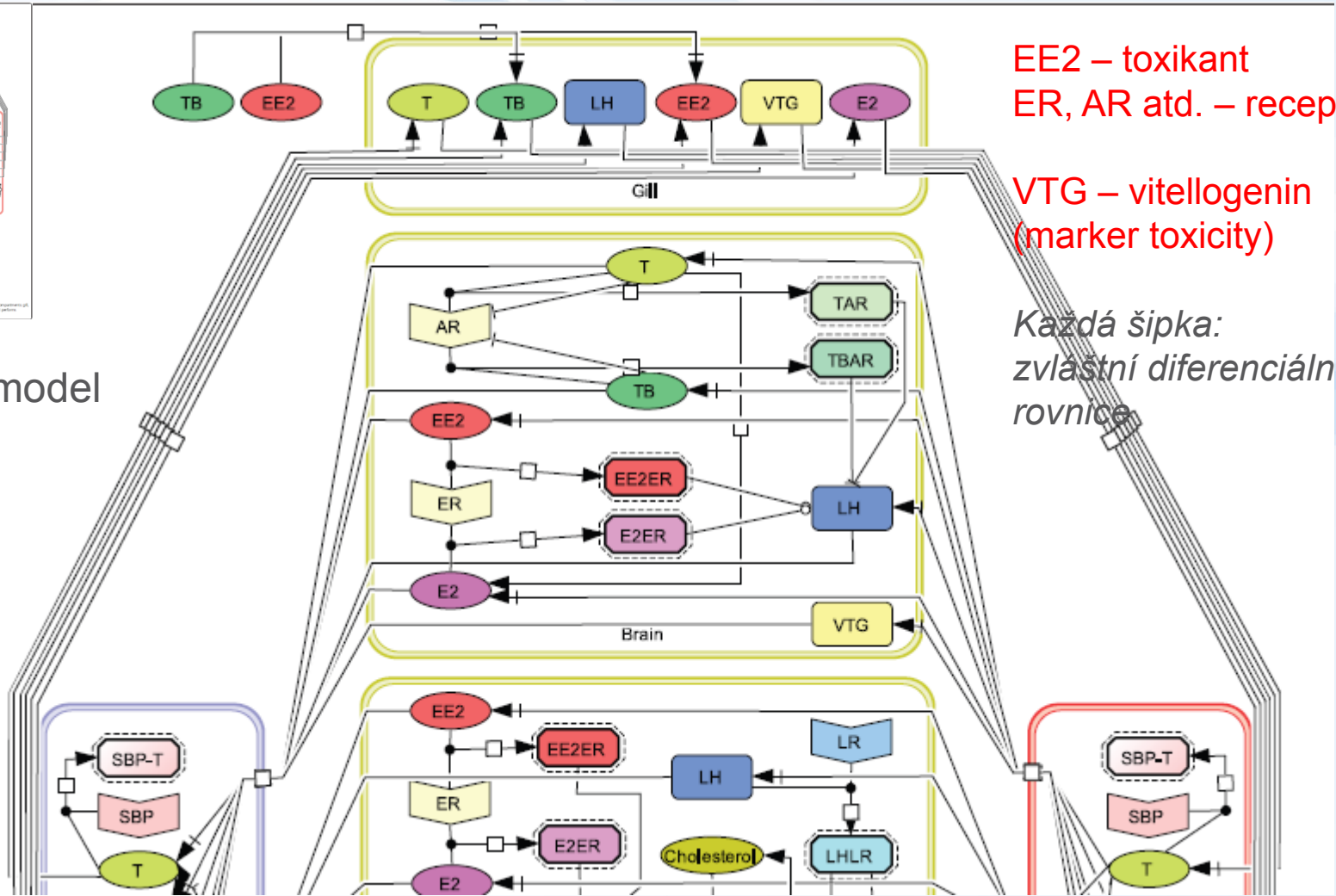


Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Li (2011) BMC Systems Biology



Konceptní model
→ ZOOM



EE2 – toxikant
ER, AR atd. – receptory

VTG – vitellogenin
(marker toxicity)

*Každá šipka:
zvláštní diferenciální
rovnice*

Li (2011) BMC Systems Biology

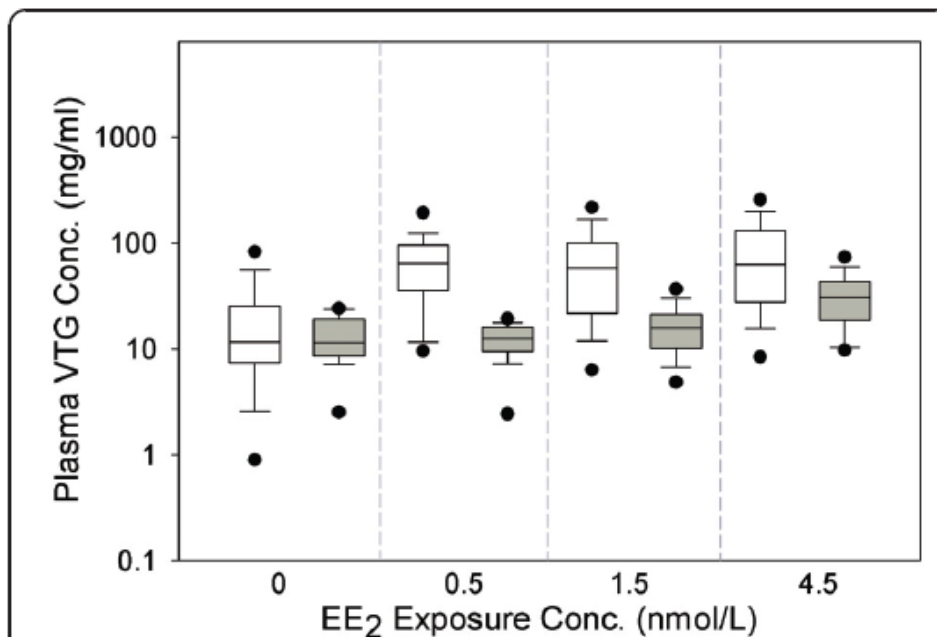


Figure 6 Comparison of model predictions with measured data in female FHM_s exposed to EE₂. $n = 28$ at each sampling time.

White boxes represent model predictions, and grey boxes represent measured data [42]. The x-axis represents EE₂ concentrations in ng/L. The solid line within the box marks the median; the boundary of the box farthest from zero indicates the 75th percentile; the boundary of the box closest to zero indicates the 25th percentile; the whisker (error bar) farthest from zero marks the 90th percentile; whisker (error bar) closest to zero marks the 10th percentile; the circle farthest from zero marks the 95th percentile; and the circle closest to zero marks the 5th percentile.

Výsledek:

Srovnání
MODEL vs. MĚŘENÍ



Programy US EPA – „Výpočetní toxikologie“ – např „ToxCast“



United States Environmental Protection Agency

LEARN THE ISSUES | SCIENCE & TECHNOLOGY | LAWS & REGULATIONS | ABOUT EPA

ALL EPA THIS AREA Advanced Search

SEARCH

Computational Toxicology Research

Contact Us

You are here: [EPA Home](#) » [Research & Development](#) » [CompTox](#) » [ToxCast™](#)

Key Links

[CompTox Home](#)
[Basic Information](#)
[Organization](#)

[Research Projects](#)
[Chemical Databases](#)
[CompTox Events](#)

[Research Publications](#)
[Scientific Reviews](#)
[Communities of Practice](#)

[Staff Profiles](#)
[CompTox Partners](#)
[Jobs and Opportunities](#)

ToxCast™

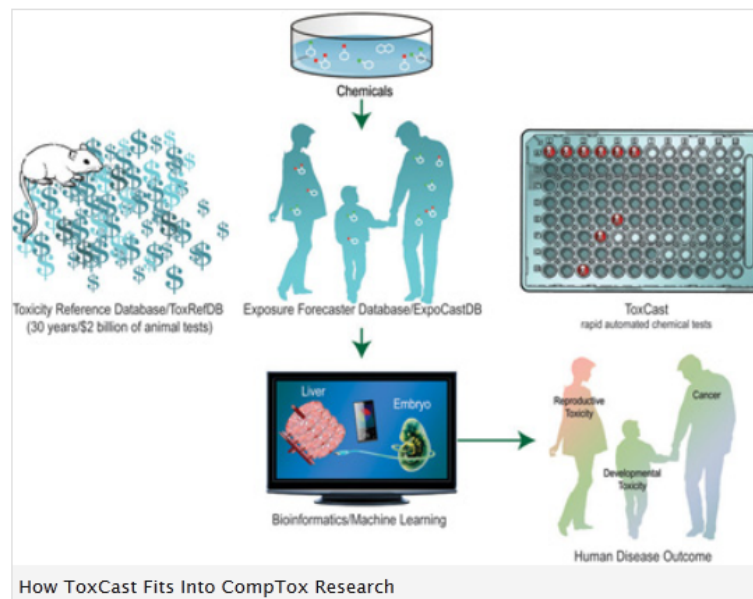
Screening Chemicals to Predict Toxicity Faster and Better

EPA launched ToxCast™ in 2007 to develop ways to predict potential toxicity of chemicals and to develop a cost-effective approach for prioritizing the thousands of chemicals that need toxicity testing. ToxCast™ uses advanced science tools to help understand how human body processes are impacted by exposures to chemicals and helps determine which exposures are most likely to lead to adverse health effects.

Using ToxCast to Prioritize Chemicals

Helping to prioritize chemicals for:

- EPA's [Endocrine Disruption Screening Program](#) by prioritizing chemicals for the Tier 1 screening battery que. 880 chemicals are being evaluated in approximately 50 endocrine related HTS assays. Long term goal is for ToxCast to eventually replace part or all of the current EDSP Tier 1 Screening Battery.
- Chemicals EPA regulates under the [Toxic Substance Control Act \(TSCA\)](#) by working towards using ToxCast to inform requests for further testing data on High Production Volume industrial chemicals.
- EPA's future drinking water contaminant lists, ([Candidate Contaminant List](#) or [CCL](#)) by helping prioritize which chemicals on existing contaminant lists should be tested first, will recommend what types of toxicity testing should



How ToxCast Fits Into CompTox Research

ToxCast Resources



Nano-eko-toxikologie



NANOČÁSTICE

- „NANO“ – relativně nová oblast, řada praktických využití
- **ALE: unikátní vlastnosti**
 - Vlastnosti nanočástic (včetně toxicity) nelze odvodit z vlastností částic z téhož materiálu o větších rozměrech a ani z vlastností chemikálie, ze které je materiál tvořen
- Definice
 - **Nanočástice** (nanoparticles): alespoň jeden rozměr <100 nm
 - **Nanočástice přírodního původu** - „ultrafine particles“ přítomné v přírodních aerosolech nebo jako vedlejší produkt lidské činnosti (prach, dým, kouř apod.)
 - **Vyráběné nanomateriály** (manufactured, engineered NM)
 - **Nanoaerosoly**: aerosoly jednotlivých volných nanočástic nebo nanostrukturních částic (= aglomerátů nanočástic nebo nanovláken) – přírodního původu nebo vyráběných

- tvar a struktura částic
 - Kulovité nebo nepravidelné částice, trubičky, vlákna, destičky
 - Homogenní částice (chemická individua)
 - Kompozitní nanomateriály (jádro a obal)
 - Nanočástice 3. a 4. generace (budoucnost: různé komponenty se specializovanými funkcemi („nanodevices“))

Základní charakteristiky vyráběných NM

Kovy

- stříbro
- zlato
- železo
- *další*

Oxidy kovů

- TiO_2
- Al_2O_3
- SiO_2
- ZnO
- ZrO_2
- *další*

Uhlíkové NM

- nanotrubičky
- fullereny
- saze
- nanodiamanty

Další anorganické NM

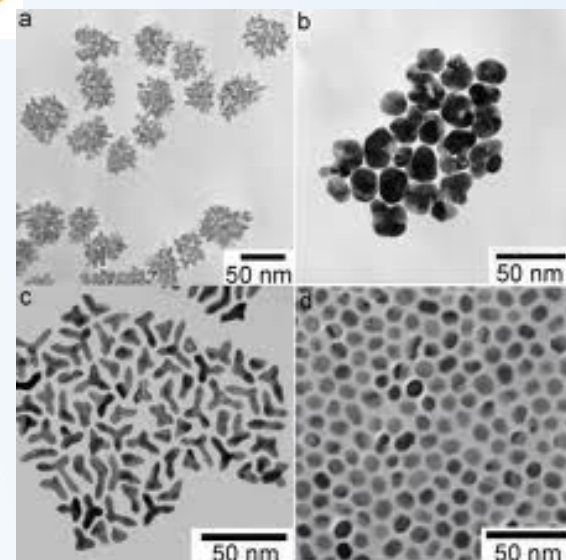
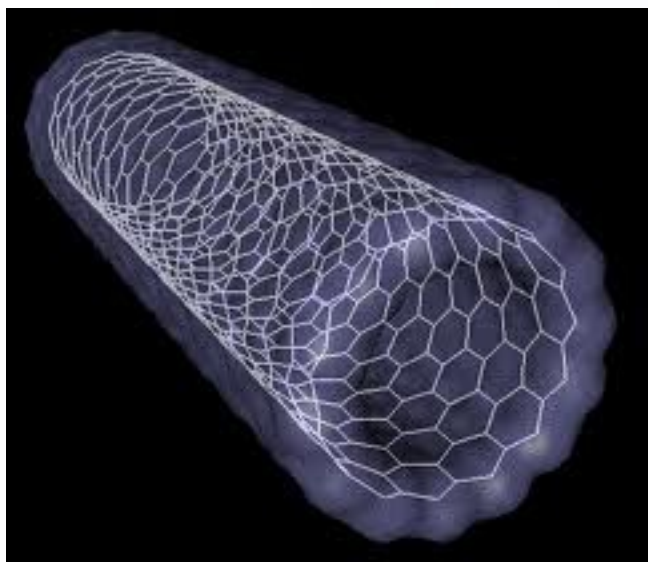
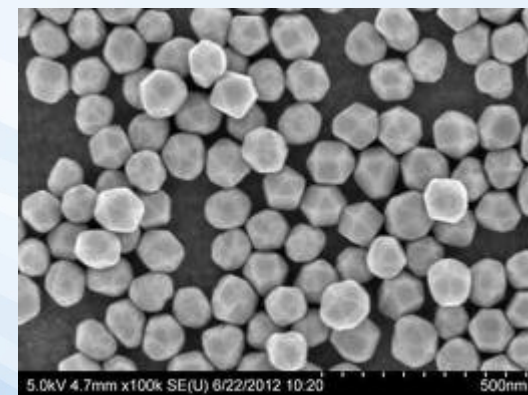
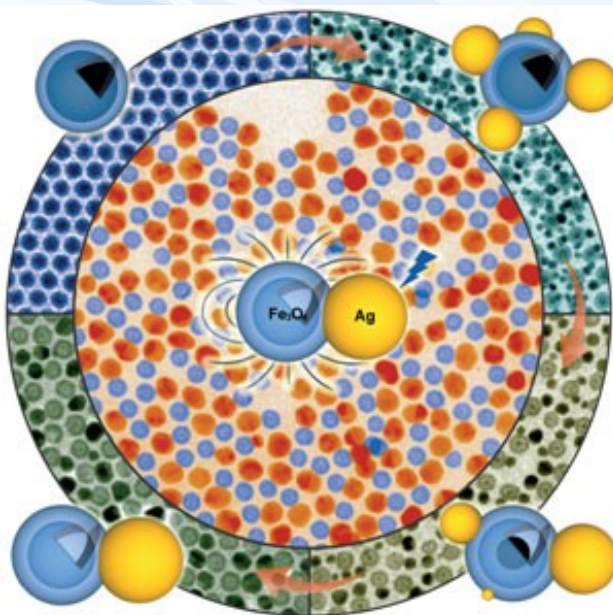
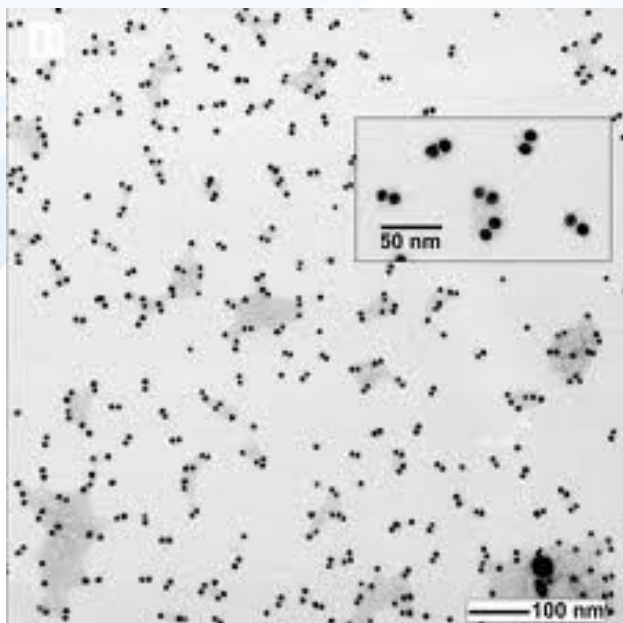
- magnetické materiály
- kompozitní nanomateriály
- kvantové tečky
- silikáty, zeolity, jíly
- anorganická nanovlákná

Organické NM

- nanovlákná polymerů
- dendrimery
- polystyren



Příklady - nanočástice



Nanoparticle movement through the environment

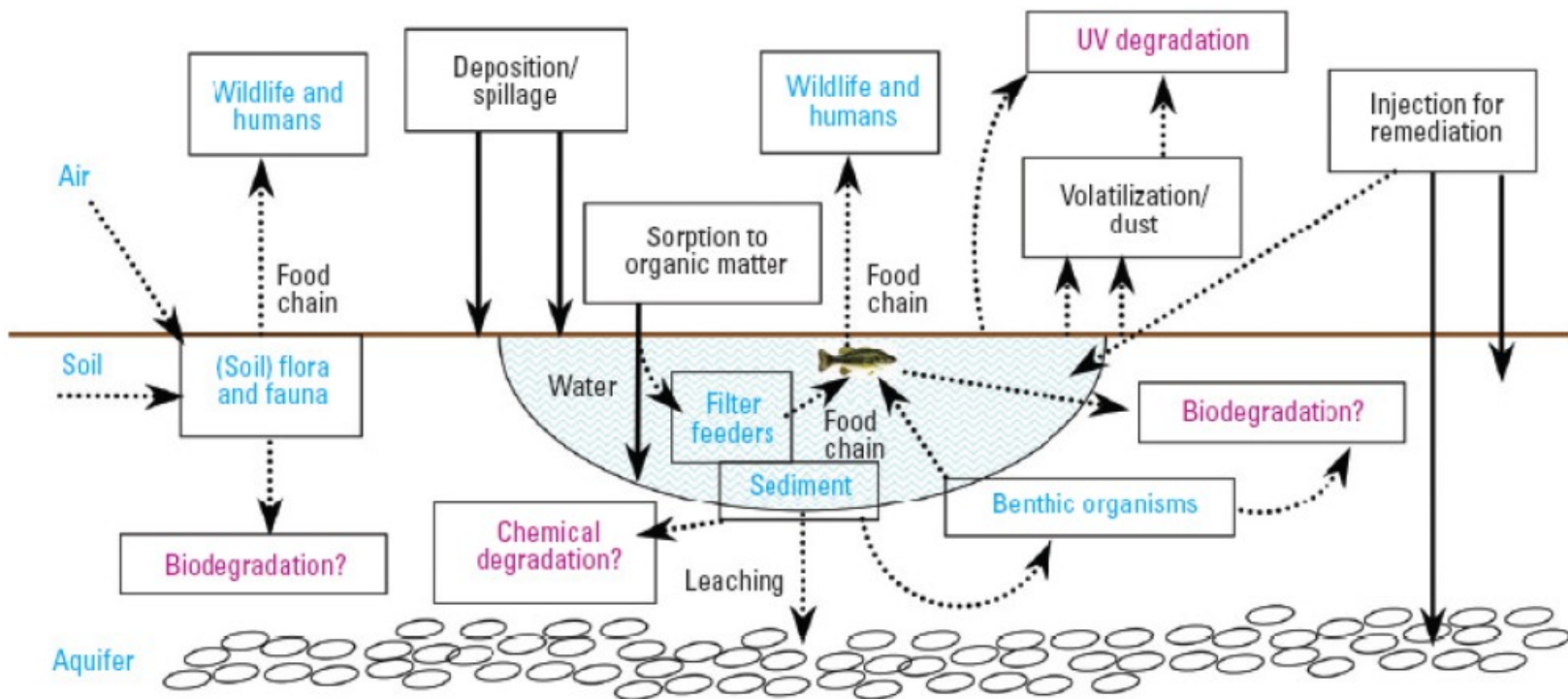
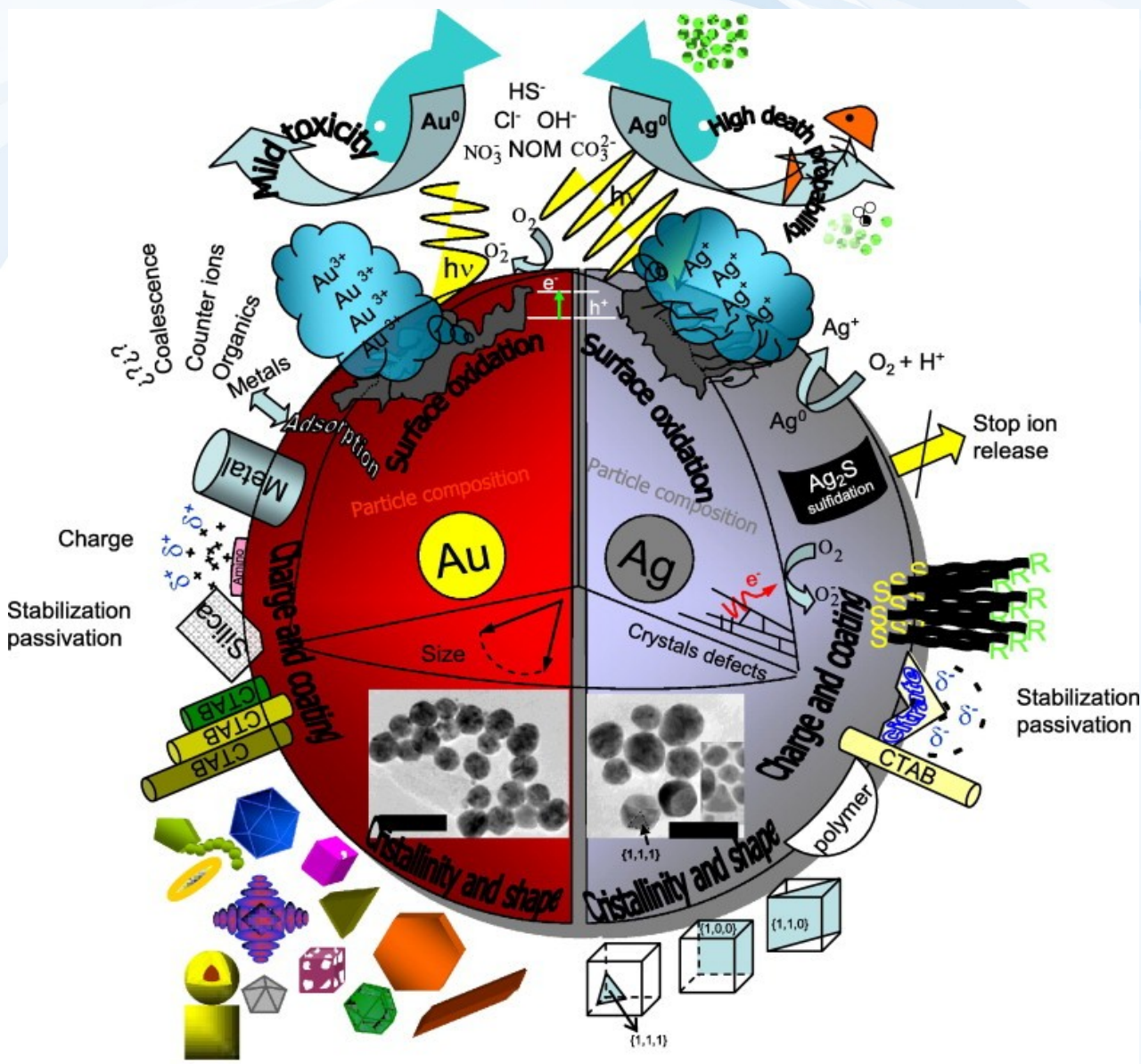


Figure 5. Routes of exposure, uptake, distribution, and degradation of NSPs in the environment. Solid lines indicate routes that have been demonstrated in the laboratory or field or that are currently in use (remediation). Magenta lettering indicates possible degradation routes, and blue lettering indicates possible sinks and sources of NSPs.

(Eko)toxicita nanočástic – specifické vlastnosti



(Neznámé) parametry částic, které mohou mít vliv na toxicitu

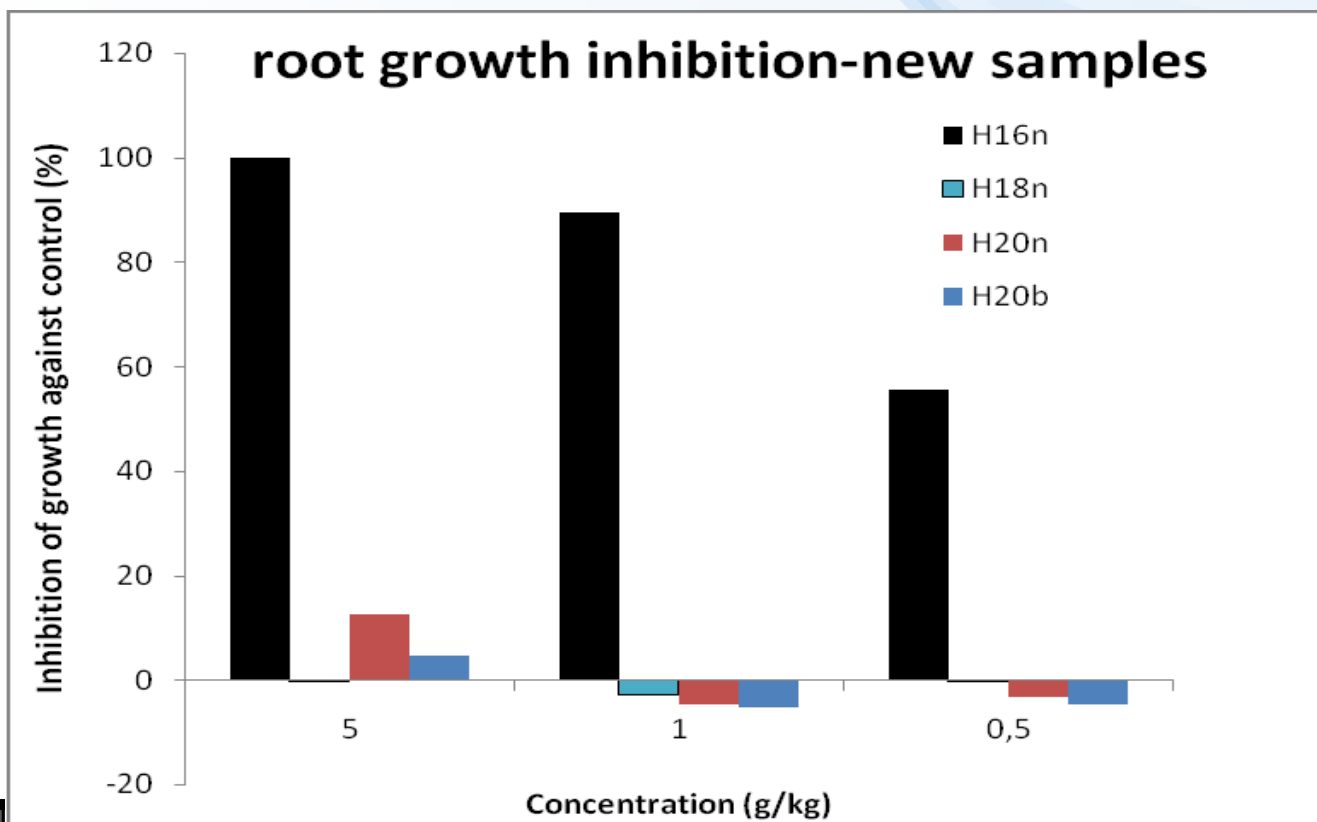
Složení (chemické)
Povrch (velikost, tvar)
Náboj
Stabilita
Agregace částic
Interakce s chemikáliemi
Interakce s ionty

Vliv na osud látek
Přímá toxicita

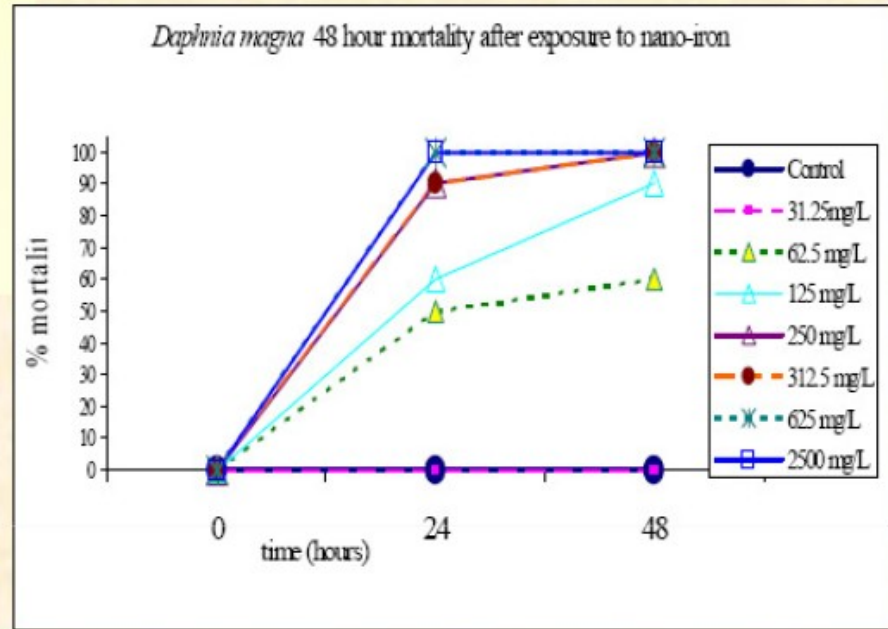
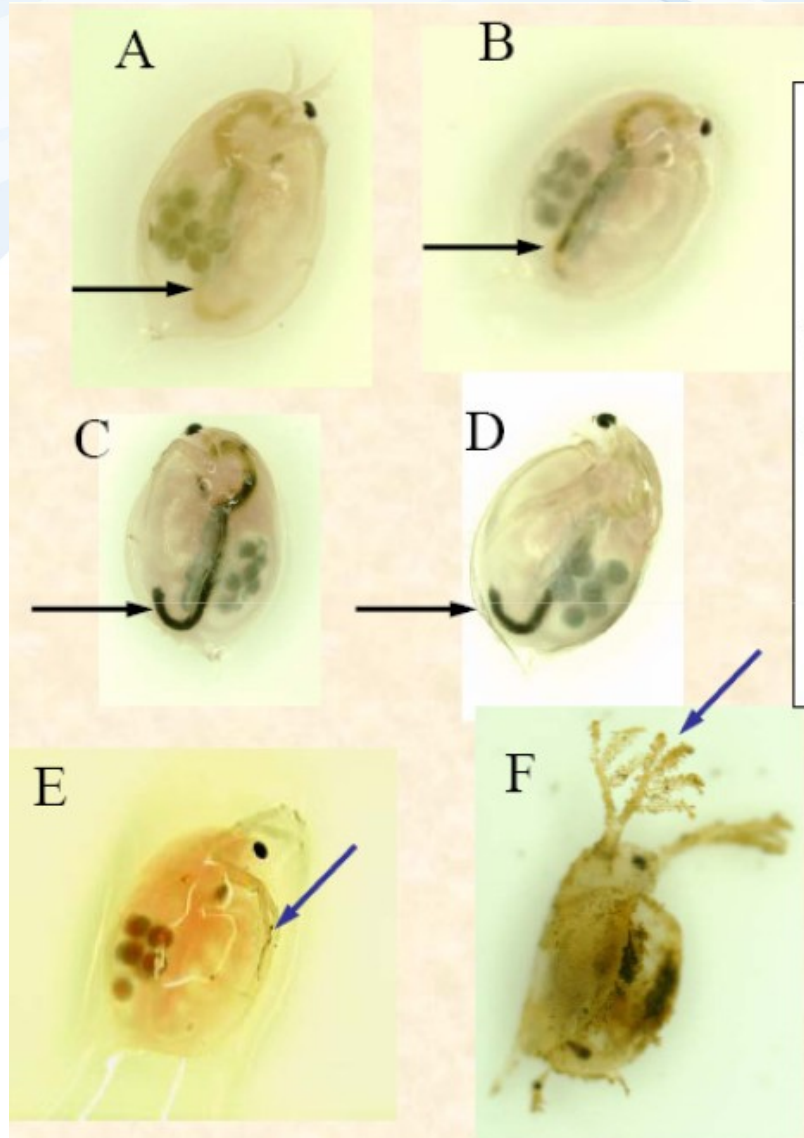
(Eko)toxická nanočástic – příklad RECETOX

Toxicita – srovnání - 4 „stejně“ částice (jeden výrobce – 4 různé šarže)
(zerovalent iron – ZVI – Fe⁰)

Opakovaně pozorována toxicita u částic H16 – příčina neznámá (žádné změny pH, rozpouštění železa či dalších příměsí ...)



Nanočástice → mechanické vlivy = toxicita



Daphnia exposed to various concentrations of nano-iron used in remediation. A = control; B = 3 mg/L; C = 7.5 mg/L; D = 15 mg/L; E = 30 mg/L; F = 125 mg/L (dead daphnid). All daphnids shown are 21 days old and eggs are visible in their brood pouches (green circles). Note the darkening of the digestive tract from A (normal greenish color) to D with increased ingestion of nano-iron particles (black arrows). Antennae become clogged with nano-iron in E and F (blue arrows). The 24 and 48 hour mortality curve is shown on the right.

Novinky ... stresová biologie



Maternal predator-exposure has lifelong consequences for offspring learning in threespined sticklebacks



Daniel P. Roche, Katie E. McGhee*
and Alison M. Bell

School of Integrative Biology, University of Illinois, Urbana,
IL 61801, USA

*Author for correspondence (kemcghee@illinois.edu).

Koljušky (ryby), které byly
v době kladení vajíček ve stresu (predátor)

→ Snížená schopnost učení u potomků

! Transgenerační přenos

Table 1. Behaviours (mean \pm s.e.) of the offspring from the maternal treatments.

	offspring of predator-exposed mothers (s)	offspring of unexposed mothers (s)
initial exploratory behaviour (day 1: 09.00):		
latency to first begin moving	49 \pm 30	56 \pm 20
latency to enter either chamber for the first time	330 \pm 70	326 \pm 78
learning the colour association:		
day 1 (09.00): latency to find food reward	426 \pm 65	427 \pm 61
day 3 (09.00): latency to find food reward	533 \pm 48	304 \pm 74
day 5 (09.00): latency to find food reward	337 \pm 61	158 \pm 68



LETTER

Sperm of colourful males are better protected against oxidative stress

Abstract

Sperm cells are highly vulnerable to free radicals, and sperm quality and male fertility are critically affected by oxidative stress. Recently, sexual ornaments, particularly carotenoid-based colourful traits, have been proposed to depend on a male's capacity to resist oxidative stress, and thus to signal sperm quality. We conducted an experimental test of this hypothesis on great tits *Parus major*, in which adults are sexually dichromatic in carotenoid-based breast plumage. We report the first evidence that ornaments and sperm quality may be linked through oxidative stress. When experimentally subjected to oxidative stress resulting from increased workload, less colourful males suffered a greater reduction in sperm motility and swimming ability, and increased levels of sperm lipid peroxidation compared to more colourful males. Moreover, the level of sperm lipid peroxidation was negatively correlated with sperm quality. Finally, carotenoid supplementation increased sperm quality of less colourful males, suggesting that pale males are deficient in carotenoid antioxidants.

Fabrice Helfenstein,^{1*} Sylvain Losdat,¹ Anders Pape Møller,^{2,3} Jonathan D. Blount⁴ and Heinz Richner¹

¹Evolutionary Ecology Group, Institute of Ecology and Evolution, University of Bern, Baltzerstrasse 6, CH-3012 Bern, Switzerland

²Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution, CNRS UMR 8079, Université Paris-Sud, Bâtiment 362, F-91405 Orsay Cedex, France

³Center for Advanced Study, Department of Biology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599, USA



Barevnější samci sýkor
 → Atraktivnější pro samice ...
 → Lepší kvalita spermatu
 (karotenoidy brání proti oxidativnímu stresu)

Ekotoxicita pesticidů – nové poznatky

- Pesticidy – registrace před použitím
- Povinné testy účinků na včely
 - Odvození bezpečného dávkování pro použití
- Nově zjištěné problémy
 - Jak se projeví „bezpečné koncentrace“ více pesticidů, pokud budou působit současně ?
 - Jak se projeví u jiných druhů opylovačů než u včel ?

Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees

Richard J. Gill, Oscar Ramos-Rodriguez & Nigel E. Raine

[Affiliations](#) | [Contributions](#) | [Corresponding authors](#)

Nature 000 (2012) | doi:10.1038/nature11585

Received 19 April 2012 | Accepted 13 September 2012 | Published online 21 October 2012

- **Čmeláci a pesticidy**
 - Velice významní opylovači
 - Specifická biologie oproti včelám
 - kolonie s velmi malým počtem jedinců
 - Současné aplikace různých pesticidů na sousedních polích
 - V praxi není koordinace mezi farmáři: koexpozice





Figure 1 | A complex exposure landscape. In a typical agricultural setting, different crops may be sprayed with different pesticides at different times and doses. Bees will obtain food both from these crops and from wild plants, which makes it difficult to estimate their overall exposure to chemicals. Furthermore, bees returning to the colony after foraging may pass on the pesticides as they feed larvae. In an attempt to partially mimic this exposure complexity, Gill *et al.*¹⁰ placed pesticide-laden feeders and filter paper (not shown) at the entrance to boxed colonies of bumblebees, which could also access flowers on crops and wild plants in the wider landscape. The researchers measured the effect of these added pesticides at both the individual-bee and colony level.

Vliv pesticidů na čmeláky – polní studie: aplikovány povolené dávky

- 2 individuální látky „I“ a „LC“
- současná expozice „M“ (mixed)

Celkové ztráty
dělnic v
průběhu experimentu

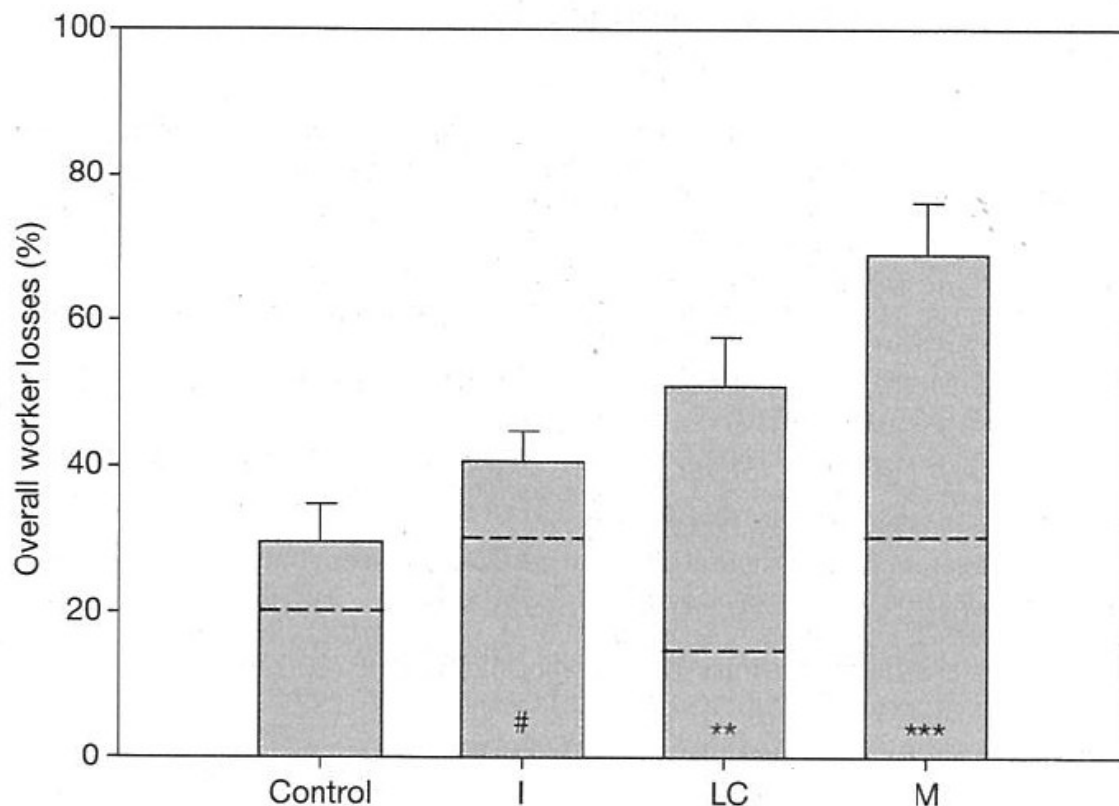


Figure 3 | Overall worker losses. Mean (\pm s.e.m.) overall percentage of workers lost per colony, including workers lost outside (below the dashed line) and worker mortality (dead workers found in nest box; above the dashed line), during the 4-week experiment. $n = 40$ colonies. # $P \leq 0.1$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ (comparison with control).

Vliv pesticidů na čmeláky – polní studie: aplikovány povolené dávky

- 2 individuální látky „I“ a „LC“
- současná expozice „M“ (mixed)

Table 1 | Summary of observed pesticide effects for each treatment group (I, LC or M) in comparison to the control group

Effect level	Effect type	I	LC	M
Effects on individual behaviour	Number of foragers	+	ND	+
	Foraging bout frequency	ND	ND	–
	Amount of pollen collected	–	ND	–
	Duration of pollen foraging bouts	+	ND	+
Effects at colony level	Worker production	–	ND	–
	Brood number	–	ND	–
	Nest structure mass	ND	ND	ND
	Worker mortality	ND	+	+
	Worker loss	+	–	+
	Worker mortality & loss	ND	+	+
	Colony failure (<i>n</i> failed/ <i>n</i> survived)	0/10	0/10	2/8

Significant decrease (–), significant increase (+) and no detected effect (ND) at the 5% significance level.

