

1. Imię i Nazwisko

Krystyna Pohorecka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2004 specjalista w dziedzinie chorób owadów użytkowych;

Studia podyplomowe dla lekarzy weterynarii – specjalizacja „Choroby Owadów Użytkowych”, WCKP PIWet-PIB, Puławy, (2003 -2004), dyplom nr 9/31/2014 nadany przez Komisję ds. Specjalizacji Lekarzy Weterynarii decyzją z dnia 26 czerwca 2014.

1999 doktor nauk rolniczych z zakresu ogrodnictwa;

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach;

Tytuł rozprawy doktorskiej: Skuteczność leczenia nosemozy pszczoł fumagiliną podawaną w różnych postaciach pokarmu węglowodanowego.

1987 lekarz weterynarii;

Akademia Rolnicza w Lublinie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 2011 – obecnie** PIWet-PIB w Puławach, Zakład Chorób Pszczoł - adiunkt, kierownik zakładu, kierownik krajowego laboratorium referencyjnego właściwego dla prowadzenia badań w kierunku rozpoznawania zgnilca amerykańskiego pszczoł, zgnilca europejskiego pszczoł oraz warrozy;
- 2003 - 2011** PIWet-PIB w Puławach, Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, Pracownia Chorób Pszczoł, adiunkt, kierownik pracowni;
- 2006 - 2011** ISK w Skierniewicach, Oddział Pszczelnictwa - adiunkt, z-ca Dyrektora ISK ds. Naukowo-Badawczych z zakresu Pszczelnictwa;
- 1999 - 2006** ISK w Skierniewicach, Oddział Pszczelnictwa w Puławach, Zakład Technologii Pasiecznych – adiunkt;
- 1989 - 1999** ISK w Skierniewicach, Oddział Pszczelnictwa w Puławach, Zakład Biologii i Fizjologii Pszczoł, Zakład Technologii Pasiecznych, asystent.

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

4a) tytuł osiągnięcia naukowego (jednotematyczny cykl publikacji)¹:

Badania nad przyczynami masowych strat rodzin pszczelich w krajowych pasiekach.

4b) wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu:

H1 Pohorecka K., Bober A., Skubida M., Zdańska D. (2011): Epizootic status of apiaries with massive losses of bee colonies (2008-2009). Journal of Apicultural Science, 55 (1): 137-150 (IF₂₀₁₁ = 0,674; punktacja MNiSW₂₀₁₁ = 20; liczba cytowań WoScc = 22

Mój wkład w powstanie publikacji: pomysł i koncepcja pracy, zaplanowanie badań, nadzór nad częścią doświadczalną, udział w badaniach laboratoryjnych, opracowanie danych i ich analiza statystyczna, interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu poza opisem metody identyfikacji wirusów, wykonanie korekty po recenzjach.

Mój udział szacuję na 90%.

H2 Pohorecka K., Skubida P., Miszczak A., Semkiw P., Sikorski P., Zagibajło K., Teper D., Kołtowski Z., Skubida M., Zdańska D., Bober A. (2012): Residues of neonicotinoid insecticides in bee collected plant materials from oilseed rape crops and their effect on bee colonies. Journal of Apicultural Science, 56 (2): 115-134 (IF₂₀₁₂ = 0,529; punktacja MNiSW₂₀₁₂ = 20; liczba cytowań WoScc = 51)

Mój wkład w powstanie publikacji: pomysł i koncepcja pracy, zaplanowanie badań, nadzór i koordynacja części doświadczalnej, udział w badaniach polowych i laboratoryjnych, opracowanie danych i ich analiza statystyczna, interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu (poza opisem metody oznaczania pozostałości pestycydów), wykonanie korekty po recenzjach.

Mój udział szacuję na 80%.

H3 Pohorecka K., Skubida P., Semkiw P., Miszczak A., Sikorski P., Zagibajło K., Teper D., Skubida M., Zdańska D., Bober A. (2013): Effects of exposure of honey bee colonies to neonicotinoid seed-treated maize crops. Journal of Apicultural Science, 57 (2): 199-208 (IF₂₀₁₃ = 0,817; punktacja MNiSW₂₀₁₃ = 20; liczba cytowań WoScc = 5)

¹ Oświadczenia o indywidualnym wkładzie wszystkich współautorów stanowią załącznik 5 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Mój wkład w powstanie publikacji: pomysł i koncepcja pracy, zaplanowanie badań, nadzór i koordynacja części doświadczalnej, udział w badaniach polowych i laboratoryjnych, opracowanie danych i ich analiza statystyczna, interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu (poza opisem metody oznaczania pozostałości pestycydów), wykonanie korekty po recenzjach. Mój udział szacuję na 80%.

- H4 Pohorecka K., Bober A. Skubida M., Zdańska D, Torój K. (2014):** A comparative study of environmental conditions, bee management and the epidemiological situation in apiaries varying in the level of colony losses. Journal of Apicultural Science, 58(2): 107–132 (IF₂₀₁₄= 1,000; punktacja MNiSW₂₀₁₄ = 20; liczba cytowań WoScc = 6)

Mój wkład w powstanie publikacji: pomysł i koncepcja pracy, zaplanowanie badań, nadzór nad częścią doświadczalną, udział w badaniach laboratoryjnych, opracowanie danych i ich analiza statystyczna, interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu (poza opisem laboratoryjnej metody identyfikacji wirusów i Nosema spp.), wykonanie korekty po recenzjach. Mój udział szacuję na 90%.

- H5 Pohorecka K., Szczęsna T., Witek M., Miszczak A., Sikorski P. (2017):** The exposure of honey bees to pesticide residues in hive environment with regard to the winter colony losses. Journal of Apicultural Science 60(1): 105-125 (IF_{2016/2017} = 0,722; punktacja MNiSW_{2016/17} = 20; liczba cytowań WoScc = 0)

Mój wkład w powstanie publikacji: pomysł i koncepcja pracy, zaplanowanie badań, nadzór i koordynacja części doświadczalnej, opracowanie danych i ich analiza statystyczna, interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu (poza opisem metody oznaczania pozostałości pestycydów), wykonanie korekty po recenzjach. Mój udział szacuję na 85%.

Sumaryczna punktacja pięciu publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe:

- Współczynnik wpływu (IF)²: 3,742
- Liczba punktów wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW)³: 100
- Liczba cytowań⁴: 84

² Wg listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania.

³ Wg komunikatów MNiSW, zgodnie z rokiem opublikowania.

⁴ Wg kryteriów bazy Web of Science (WoS)

4c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wstęp

Wśród 100 gatunków roślin uprawnych, stanowiących 90% światowej żywności pochodzenia roślinnego, ponad 70 zapylanych jest przez pszczoły (*Apis*), a przede wszystkim, przez udomowiony gatunek - pszczoły miodne (*Apis mellifera* L.) [1]. Stały spadek populacji tych owadów, utrzymujący się od kilkunastu lat w wielu regionach Europy oraz w Ameryce Północnej, budzi zatem uzasadnioną obawę o prawidłowe plonowanie roślin [2, 3]. To niepokojące zjawisko jest w głównej mierze efektem wzmożonej śmiertelności rodzin pszczelich w okresie zimowania. Do szkodliwych dla zdrowia pszczół czynników, wskazywanych jako potencjalna przyczyna ginięcia nie tylko pszczół udomowionych, ale i dzikich, zalicza się utratę lub fragmentację naturalnych siedlisk, ubożenie roślinnej bazy pokarmowej, monokultury, wprowadzanie obcych gatunków roślin, zwierząt i mikroorganizmów, zmiany klimatyczne, rozprzestrzenianie i rozwój patogenów oraz chemiczne zanieczyszczenie środowiska [2, 4, 5]. Zmniejszanie się populacji pszczół miodnych jest po części spowodowane czynnikami ekonomiczno-społecznymi, wynikającymi ze stosunkowo niskiej rentowności prowadzenia pasiek określanych jako amatorskie. Zaniechanie utrzymywania pszczół ze względu na podeszły wiek, nie jest równoważone podejmowaniem działalności pszczelarskiej przez nowe pokolenia [2, 4].

Pszczoły, podobnie jak inne zwierzęta, są narażone na patogenne działanie wielu mikroorganizmów, pasożytów czy szkodników, przy czym przebieg infekcji/inwazji może być rozpatrywany na dwóch poziomach: osobniczym oraz kolonijnym. Rozwój choroby na poziomie rodziny jest determinowany liczbą zakażonych owadów. Stały wzrost liczby chorych osobników prowadzi do zaburzeń w funkcjonowaniu rodziny, zmniejszania się populacji pszczół w gnieździe, aż do ich całkowitej zagłady.

Dla pszczoły miodnej szczególne zagrożenie stanowią roztocze *Varroa destructor* [6], zewnętrzne pasożyty odżywiające się hemolimfą wszystkich stadiów rozwojowych (od larwy do imago). Niedożywienie pszczół spowodowane utratą składników pokarmowych zawartych w hemolimfie, skutkuje, poza zaburzeniami anatomicznymi, fizjologicznymi i behawioralnymi, istotnym skróceniem długości ich życia. W wyniku immunosupresji wzrasta podatność pszczół na zakażenie drobnoustrojami [7, 8].

Szczyt rozwoju inwazji *V. destructor* przypada na okres wychowu pokolenia pszczoł zimowych (sierpień), dlatego w nieleczonych lub nieprawidłowo leczonych rodzinach, owady, które były silnie spasożytowane na etapie rozwoju larwalnego, nie będą w stanie przeżyć kilku zimowych miesięcy. W takich przypadkach może dojść do osypania się całej rodziny w okresie jesienno-zimowym lub na przedwiośniu. Przy silnej inwazji roztoczy pszczoły mogą opuszczać gniazdo [7, 8].

Infekcji wirusowe pszczoł są najmniej poznaczonymi jednostkami chorobowymi pszczoł. Z 24. zidentyfikowanych dotychczas gatunków, najwyższą przewalencją odznacza się wirus zdeformowanych skrzydeł (DWV), wirus ostrego paraliżu pszczoł (ABPV), kaszmirski wirus pszczoł (KBV), wirus choroby czarnych mateczników (BQCV), wirus choroby woreczkowej czerwii (SBV) oraz wirus chronicznego paraliżu pszczoł (CBPV) [9]. Większość infekcji wirusowych występuje w pasiekach w postaci bezobjawowej. Taki przebieg zakażenia, poza skróceniem długości życia niektórych owadów, nie powoduje drastycznych zaburzeń w rozwoju rodzin pszczelich. W warunkach sprzyjających szybkiej transmisji wirusów i naruszających mechanizmy odporności przeciwwakażnej pszczoł (np. podczas silnej inwazji *V. destructor*), infekcje wirusowe z postaci bezobjawowej mogą przekształcać się w postać jawną, cechującą się wysokim poziomem produkcji cząsteczek danego wirusa i pojawieniem się objawów klinicznych choroby, nierzadko prowadzącą do osypania się całej rodziny pszczelej [10, 11, 12, 13].

Poważny problem epizootyczny mogą również stanowić wewnątrzkomórkowe pasożyty układu pokarmowego dorosłych pszczoł, należące do mikrosporydiów z rodzaju *Nosema* [14, 15]. Przez wiele lat *Nosema apis* był jedynym gatunek izolowanym od pszczoły miodnej w przebiegu nosemozy. W 2004 roku u pszczoły miodnej po raz pierwszy wykryto infekcję wywołaną gatunkiem *Nosema ceranae*, uznawanym za pasożyta pszczoły wschodniej (*Apis ceranae*). Odkrycie to stało się przyczynkiem do rozpoczęcia badań nad jego występowaniem i patogennością dla europejskich ras pszczoł. U zakażonych owadów, postępująca wraz z rozwojem mikrosporydiów dysfunkcja komórek nabłonkowych jelita środkowego (odpowiedzialnego za trawienie i przyswajanie pokarmu), zaburza metabolizm i przebieg procesów fizjologicznych. Konsekwencją silnego stresu energetycznego jest także drastyczne skrócenie długości życia chorych owadów [16,17, 18]. Rozwój nosemozy ma charakter sezonowy, jej szczyt

przypada na okres zimy i wczesnej wiosny, kiedy to stwarza szczególne zagrożenie dla rodzin pszczelich [14, 19].

Źródłem pożytku nektarowego i pyłkowego dla pszczół są zarówno rośliny uprawne jak i dziko rosnące. Pokarm pozyskany z upraw chronionych chemicznie stwarza ryzyko kontaktu owadów z pestycydami podczas jego zbierania (pszczoły lotne – zbieraczki nektaru lub pyłku), przetwarzania (pszczoły ulowe) i spożywania (wszystkie stadia rozwojowe pszczół, niezależnie od funkcji).

W ochronie upraw przy pomocy środków owadobójczych dominują obecnie trzy klasy związków organofosforanowe, pyretroidy i neonikotynoidy, które pomimo różnic w mechanizmie działania, wykazują wobec owadów efekt neurotoksyczny [20, 21, 22]. Pestycydy neonikotynoidowe stanowią stosunkowo nową (wynalezioną w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku) grupę systemicznych insektycydów działających na nikotynowe receptory acetylocholino. W wyniku modyfikacji pierwszych związków, w kolejnych latach uzyskiwano nowe substancje o wysokiej aktywności biologicznej, które zalicza się do tzw. chloronikotynyli lub do drugiej generacji insektycydów neonikotynoidowych. Pierwszy insektycyd z tej grupy – imidachlopyryd, ma duży udział w światowym rynku pestycydów. Następnie zarejestrowane zostały środki zawierające acetamipryd, tiametoksam, tiachlopyryd i chlotianidynę. Ze względu na szerokie spektrum działania neonikotynoidy znalazły zastosowanie w ochronie wielu upraw, przez co stały się najpowszechniej stosowaną klasą insektycydów na całym świecie [23]. W roku podjęcia badań będących przedmiotem przedstawianego cyklu publikacji, pestycydy neonikotynoidowe stanowiły 24% globalnego rynku agrochemicznego i były zarejestrowane w 120 krajach [24]. W tym samym czasie, w Polsce do obrotu dopuszczonych było ponad 20 preparatów neonikotynoidowych, przeznaczonych do stosowania na uprawy wielu gatunków roślin polowych, sadowniczych i ogrodniczych, w tym tych (drzew i krzewów owocowych, rzepaku, kukurydzy), które stanowią dla pszczół miodnych główne źródło pokarmu nektarowego i pyłkowego.

Ekspozycja pszczół na środki ochrony roślin (ŚOR) uwarunkowana jest nie tylko spektrum przeznaczenia pestycydów w odniesieniu do gatunków roślin atrakcyjnych dla pszczół, ale także powierzchnią ich uprawy. Zatem w kontekście przestrzennego zakresu stosowania pestycydów, za uprawy stwarzające potencjalnie najwyższe zagrożenie dla pszczół w kraju należy uznać intensywnie chronione rośliny oleiste (przede wszystkim rzepak), kukurydzę oraz rośliny sadownicze i ogrodnicze.

Oprysk jest formą aplikacji ŚOR należących do wielu grup chemicznych, przy której pszczoły narażone są na bezpośredni kontakt z substancjami chemicznymi (jeżeli są obecne na roślinach w czasie wykonywania zabiegów) lub kontakt z ich pozostałościami znajdującymi się po zabiegu na powierzchni roślin. Najbardziej powszechną metodą ochrony roślin przy pomocy neonikotynoidów są natomiast zaprawy nasienne. Pomimo tej, wydawałoby się bezpieczniejszej dla pszczół formy aplikacji, neonikotynoidy jako substancje systemiczne, krążą wraz z sokami po całej roślinie docierając do liścia (a z nich do wody gutacyjnej wydzielanej w niektórych warunkach środowiskowych) nektaru i pyłku [25]. W konsekwencji ekspozycja pszczół na pestycydy jest znacznie większa w odniesieniu do dróg narażenia (kontaktowa i pokarmowa), czasu jej trwania (pokarm zgromadzony w komórkach plastrów w sezonie jest wykorzystywany przez pszczoły aż do wiosny następnego roku) i populacji narażonych owadów. Jest to także wynikiem wysokiej trwałości związków neonikotynoidowych (np. okres rozpadu chlotianidyny wynosi około 2 lat). Utrzymujące się w glebie substancje stwarzają możliwość przedostawania się także do uprawianych na tych terenach roślin, niebędących celem ochrony [25, 26].

Spośród czynników decydujących o toksycznym działaniu pestycydów kluczowe znaczenie mają właściwości chemiczne warunkujące ich dawkę śmiertelną. Herbicydy i fungicydy, jako preparaty nieprzeznaczone do zwalczania szkodliwych owadów, odznaczają się wobec pszczół generalnie niską toksycznością, o czym świadczą stosunkowo wysokie dawki niezbędne do uśmiercenia co najmniej 50% populacji pszczół narażonych na ich działanie (LD_{50} lethal dose). Tym niemniej, wśród substancji należących do tych dwóch klas, znajdują się związki silnie toksyczne dla pszczół (np. chloropirifos). Środki grzybobójcze mogą okazać się szkodliwe także poprzez ich oddziaływanie z innymi pestycydami, polegające na hamowaniu metabolizmu, detoksykacji i wydalania insektycydów. Substancje należące do klasy insektycydów fosforoorganicznych i pyretroidów posiadają niezwykle szeroki zakres dawki LD_{50} (od 18 ng/pszczołę do 31 µg/pszczołę), a zatem ich toksyczny wpływ na pszczoły jest bardzo zróżnicowany. Przykładem substancji powodujących ostrą śmiertelność pszczół jest dimetoat (związek fosforoorganiczny), cypermetryna czy deltametryna (pyretroidy) [21]. Większość insektycydów neonikotynoidowych cechuje bardzo wysoka toksyczność, a mierzona w nanogramach wartość doustnej dawki LD_{50} trzech z nich (imidachloprydu, tiametoksamu, chlotianidyny) waha się pomiędzy 2,4 i 4,4 ng/pszczołę

[26, 27]. Ostre zatrucia pszczół są charakterystyczne dla sezonu pszczelarskiego i pojawiają się w trakcie lub w niedługim czasie po nieprawidłowej aplikacji pestycydów na uprawy. W zależności od mechanizmu działania preparatu i drogi narażenia, pszczoły mogą masowo padać na chronionych uprawach, w drodze powrotnej, w okolicy wlotu do ula lub nawet w samym ulu. Jeżeli złożą skażony pokarm w gnieździe objawy ostrego zatrucia mogą wystąpić także u pszczół ulowych.

Wiedza na temat oddziaływania na pszczoły subletalnych dawek pestycydów jest efektem, nielicznych zresztą, badań prowadzonych w warunkach laboratoryjnych lub pół-polowych. Ustalono, że niektóre insektycydy neonikotynoidowe wpływają na motoryczne, sensoryczne oraz poznawcze zdolności pszczół, upośledzając procesy uczenia się i zapamiętywania, procesy pamięci zapachowej, orientację, aktywność lotną, sprawność ruchową oraz proces reprodukcji. Trudną do wykazania, ale prawdopodobną konsekwencją tych zaburzeń na poziomie rodziny może być spadek produktywności i stopniowa depopulacja, która zmniejszy szanse rodziny na przeżycie [28, 29, 30, 31, 32, 33]. Jednakże ekspozycja rodzin pszczelich na pestycydy w rzeczywistych, polowych warunkach ochrony upraw oraz efekt długookresowego, chronicznego narażenia rodzin pszczelich w relacji do ich kondycji i przeżywalności, należą do najmniej poznanych, a tym samym najbardziej priorytetowych zagadnień badawczych [34].

Chemiczna ochrona roślin nie jest jedynym źródłem ekspozycji pszczoły miodnej na kontakt z substancjami chemicznymi. Akarycydy fosforoorganiczne (kumafos, bromfenwinfos), chloroorganiczne (bromopropylat), formamidyny (amitraz, cymiazol) i pyretroidy (fluwalinat, flumetryna, akrynatoryna) są stosowane w pszczelarstwie od ponad 30 lat przy zwalczaniu inwazji *V. destructor*. Ze względu na lipofilne właściwości większości wprowadzanych bezpośrednio do ula substancji warroabójczych, przenikają one przede wszystkim do wosku pszczelego, z którego zbudowane są plastry [35]. Tworzące gniazdo plastry, poza magazynowaniem pokarmu, służą do wychowu nowych pokoleń owadów, a zatem na kontakt z nimi narażone są także stadia rozwojowe pszczół. Pestycydy obecne w wosku wykazują wysoką trwałość i nawet termiczny proces jego obróbki nie powoduje obniżenia poziomu pozostałości. Kumulacji akarycydów sprzyja także zamknięty obieg produkcji wosku (starsze plastry są wycinane i przetapiane na wosk służący do produkcji kolejnych plastrów, poddawanych do rodzin w formie arkuszy węzy) [35, 36]. Pozostałości akarycydów w wosku

powodują powstawanie populacji roztoczy *Varroa* opornych, co bezpośrednio rzutuje na skuteczność terenową weterynaryjnych preparatów leczniczych [37].

Powszechne stosowanie pestycydów w rolnictwie i pszczelarstwie stwarza wysokie ryzyko zanieczyszczenia wszystkich produktów pszczelich (miód, pyłek, воск) różnymi pestycydami, co sprawia, że najczęściej pszczoły ekspozowane są na mieszaniny substancji chemicznych, o wysoce prawdopodobnym, synergistycznym oddziaływaniu [36, 38].

O efekcie szkodliwego oddziaływania na pszczoły różnego rodzaju stresorów decyduje także status owadów (stadium rozwojowe pszczół, stan fizjologiczny i tzw. doświadczenie wynikające z wieku, przynależności do określonej kasty i pory sezonu) [39, 40]. W rocznym cyklu życia rodziny pszczelej wyróżnia się dwa okresy, w których pszczoły różnią się diametralnie behawiorem i fizjologią [41]. W klimacie umiarkowanym pierwszy okres rozpoczyna się zimą, wraz z ponownym podjęciem przez matkę składania jaj (gdy średnia maksymalna temperatura otoczenia wynosi zaledwie 4 °C) i rozpoczęciem wychowu czerwii, z którego powstaje pokolenie pszczół letnich. Szczyt wychowu przypada na miesiące wiosenne, stopniowo maleje w miesiącach letnich i kończy się jesienią [42, 43]. Odnawianie składu i intensywny wiosenny rozwój (nawet do 50 tys. pszczół w gnieździe) umożliwia dokonanie podziału rodziny (utrzymanie gatunku). Po wydaniu roju, rodziny gromadzą pyłek (źródło białka do hodowli czerwii) i nektaru, który po przetworzeniu na miód jest używany jako źródło energii, zwłaszcza w miesiącach zimowych [44]. W miesiącach letnich (sierpień, wrzesień) rozpoczyna się wychów pokolenia pszczół zimowych, po czym czerwienie matek stopniowo ustaje. Przy temperaturze zewnętrznej poniżej 10 °C pszczoły tworzą tzw. kłęb (klaster) termoregulujący, umożliwiając przetrwanie zimy [45].

Letnie pokolenie pszczół robotnic, których średnia długość życia waha się od 30 do 40 dni, wykazuje zależny od wieku podział pracy. Najmłodsze pszczoły pielęgnują i karmią larwy, a od około 10 do 20 dni życia zaangażowane są w budowę plastrów, przetwarzanie i rozmieszczanie pokarmu na plastrach, czyszczenie, ochronę gniazda, regulację jego klimatu oraz opiekę nad matką. Starsze, ponad 20. dniowe pszczoły stają się zbieraczkami pokarmu [46]. Pomimo, że żyją krótko, nie odbija się to na kondycji rodziny pszczelej ponieważ, dzięki intensywnemu czerwieniu matek (nawet do 3 tysięcy jajeczek składanych w ciągu doby), są zastępowane przez nowe owady.

Pszczoły zimowe żyją do 8 miesięcy, a ich zadaniem jest zapewnienie przetrwania rodzinie okresu zimowania (trwa od ostatniego jesiennego oblotu do całkowitego wyjścia pszczół z kłębu). W pierwszym etapie życia nie są obciążone żadną pracą (w tym czasie w gnieździe są jeszcze pszczoły letnie). Wraz ze spadkiem temperatury formują kłęb termoregulacyjny i poprzez emisję ciepła, wytworzonego na skutek vibracji mięśni, utrzymują odpowiednią temperaturę w gnieździe. Wraz z rozpoczęciem wychowu letnich pszczół (późną zimą/wczesną wiosną) pszczoły zimowe, już jako kilkumiesięczne owady podejmują w gnieździe prace typowe dla pszczół letnich [43]. Aby pszczoły zimowe przeżyły od połowy sierpnia jednego roku do wiosny następnego roku muszą mieć zapewnione odpowiednie warunki podczas wychowu (dostęp do odpowiedniej jakości pokarmu białkowego – pyłku roślinnego, niski poziom inwazji roztoczy *V. destructor*), i w czasie zimowania (odpowiednie zapasy pokarmu węglowodanowego dostosowane do siły rodziny pszczelej) [47]. Pszczoły zimowe przebywają znaczną część swego życia jedynie w środowisku ulowym, co powoduje nie tylko wydłużenie okresu ekspozycji na obecne w gnieździe, potencjalnie szkodliwe czynniki, ale także wzrost ich natężenia (np. rozwój infekcji, wilgoć). Zwiększony ubytek pszczół zimowych spowodowany działaniem stresorów nie jest rekompensowany nowymi osobnikami, dlatego prowadzi do osłabienia lub osypania się rodziny. Zależne od pszczelarza, prawidłowe i terminowe przygotowanie rodzin pszczelich do zimowania jest jednym z podstawowych czynników decydujących o ich przeżyciu. Ingerencja człowieka w życie rodziny pszczelej i ich eksploatacja w czasie sezonu wymaga kompensacji tych działań i stworzenie warunków ograniczających liczbę i natężenie stresorów [48].

Zróznicowanie w występowaniu i nasileniu poszczególnych stresorów jest podyktowane materiałem genetycznym utrzymywanych pszczół, geograficzną lokalizacją pasiek, porą roku, a także metodami gospodarki pasiecznej. Zmienność ta uniemożliwia postawienie jednej, uniwersalnej diagnozy co do przyczyn zwiększonej śmiertelności pszczół obserwowanej w wielu regionach świata. Koniecznym okazało się ponadto kompleksowe badanie stresorów, co odpowiada realnym scenariuszom ekologicznym i umożliwia uwzględnienie, w inny sposób nieprzewidywalnych, interakcji (synergizm, antagonizm) pomiędzy między stresorami.

W Polsce problem zwiększonej, a czasami nawet masowej śmiertelności rodzin pszczelich w pasiekach został odnotowany przez pszczelarzy wiosną 2007 roku. Według

informacji przekazanych przez regionalne związki pszczelarskie podczas sezonu zimowego (2007/2008) w kraju zginęło około 30% rodzin pszczelich. Skala zgłaszanych przez pszczelarzy strat, przy całkowitym braku danych na temat występowania w krajowych pasiekach czynników potencjalnie szkodliwych dla pszczół, były bezpośrednią przyczyną podjęcia badań. Realizowano je w okresie pięciu lat. Badania opisane w pracy H1 wykonano w ramach tematu statutowego pt. „Określenie przyczyn występowania masowych strat rodzin pszczelich w krajowych pasiekach”. Badania przedstawione w pracach od H2 do H5 wykonane zostały w ramach projektu grantowego międzynarodowej akcji COST FA0803 „Prevention of honeybee colony losses”, zatytułowanego „Określenie roli czynników środowiskowych, genetycznych i chorobotwórczych w występowaniu masowej śmiertelności rodzin pszczelich”, w którym pełniłam funkcję kierownika i brałam udział jako wykonawca.

Cel badań

Zasadniczym celem podjętych badań było wskazanie czynników powodujących wzrost śmiertelności rodzin pszczelich w krajowych pasiekach.

Cel badań zrealizowany został poprzez:

- I. Kompleksową ocenę warunków przyrodniczych, metod gospodarki pasiecznej, sytuacji epizootycznej patogenów oraz skażenia środowiska ulowego pestycydami, w pasiekach o zróżnicowanym poziomie zimowych strat rodzin pszczelich oraz analizę wpływu tych czynników na śmiertelność rodzin.
- II. Ocenę rzeczywistego zagrożenia, jakie w warunkach polowych stwarzają dla rodzin pszczelich insektycydy neonikotynoidowe, stosowane do ochrony upraw stanowiących bazę pokarmową pszczół.

Omówienie przeprowadzonych badań i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

- I. Kompleksowa ocena warunków przyrodniczych, metod gospodarki pasiecznej, sytuacji epizootycznej patogenów oraz skażenia pestycydami środowiska ulowego, w pasiekach o zróżnicowanym poziomie zimowych strat rodzin pszczelich oraz analiza wpływu tych czynników na śmiertelność rodzin.**

Pierwsze badania nad przyczynami masowych upadków rodzin pszczelich opisane w pracy H1, prowadzone były w latach 2008 - 2009. Badania koncentrowały się na ocenie sytuacji epizootycznej wybranych patogenów, w pasiekach, w których w okresie jesienno-zimowym zginęło co najmniej 30% rodzin. Materiał do badań laboratoryjnych stanowiły próbki pszczół robotnic, w każdej z pasiek pobierane oddzielnie z kilku (maksymalnie z 10.) martwych rodzin. Próbki pszczół analizowane były w sześciu kierunkach, do czego wykorzystano procedury badawcze obowiązujące w Zakładzie Chorób Pszczół. Izolację roztoczy *V. destructor* wykonano metodą wypłukiwania, a po makroskopowej identyfikacji pasożytów szacowano poziom ich inwazji. Występowanie i stopień zakażenia pszczół mikrosporydiami z rodzaju *Nosema* określano metodą mikroskopową przy użyciu komory Bürkera. Badania wirusologiczne, wykonane techniką RT-PCR, miały na celu wykrycie zakażenia pszczół wirusem chronicznego paraliżu (CBPV), wirusem ostrego paraliżu (ABPV), wirusem zdeformowanych skrzydeł (DWV), oraz izraelskim wirusem ostrego paraliżu (IAPV).

Ogółem badaniami objęto ponad 300 pasiek zlokalizowanych na terenie całego kraju, przy czym dominowały pasieki z województw: małopolskiego, lubelskiego, zachodniopomorskiego, mazowieckiego, wielkopolskiego, dolnośląskiego, śląskiego i świętokrzyskiego. Analizie statystycznej poddano wyniki uzyskane dla 1000 próbek pszczół (czyli 1000 rodzin pszczelich) pochodzących ze 142 pasiek (takich, w których próby pobrano z co najmniej 5 rodzin i przebadano we wszystkich sześciu kierunkach). Prewalencję i poziom inwazji/infekcji poszczególnych patogenów porównywano pomiędzy pasiekami pogrupowanymi ze względu na odsetek osypanych rodzin (pasieki o stratach 30-40%, 41-50%, 51-60%, 61-70%, 71-80%, 81-90% i 91-100%).

W badanych pasiekach, w okresie jesienno-zimowym zginęło od 30 do 100% rodzin, ale w przeważającej liczbie odnotowane straty stanowiły od 30 do 50%. Łącznie, ze wszystkich rodzin przygotowanych do zimowania zginęło blisko 60%. Liczba martwych rodzin, w zależności od liczebności pasieki, wahała się od 3 do 385 rodzin (średnie straty na poziomie 38 rodzin). W niemal wszystkich badanych próbkach (99,6%) stwierdzono obecność co najmniej jednego patogenu, przy czym w większości (90,6%) stwierdzono zakażenie mieszane. Występowanie dwóch oznaczanych organizmów wykryto w 26,7%, trzech w 38%, a czterech w 24% próbek. Inwazję *V. destructor* stwierdzono w 88,7% rodzin, a jej poziom uznawany za wysoki odnotowano w ponad połowie (57%) próbek. Prewalencja mikrosporydii z rodzaju

Nosema okazała się być równie wysoka. Obecność spor *Nosema* spp. stwierdzono w trzech czwartych badanych próbek, a w blisko połowie oznaczono wysoki poziom inwazji. Spośród infekcji wirusowych najczęściej diagnozowane było zakażenie wirusem DWV (76,1% próbek), a w następnej kolejności zakażenie wirusem ABPV (35% próbek dodatnich). Detekcja wirusa CBPV była niska (7,8% próbek). Po raz pierwszy w kraju, w 2 rodzinach pszczelich wykryto obecność wirusa IAPV.

Analizując związek pomiędzy liczbą patogenów zidentyfikowanych w próbkach, a skalą osypanych rodzin nie stwierdzono wyraźnych zależności. Zarówno w pasiekach o najniższym, badanym poziomie strat (30%), jak i w pasiekach, w których zginęły wszystkie rodziny, w próbkach wykrywano średnio trzy patogeny.

W grupach pasiek różniących się wskaźnikiem śmiertelności rodzin, nasilenie inwazji *V. destructor*, poziom infekcji *Nosema* spp. oraz odsetek rodzin zakażonych wirusem CBPV i DWV był podobny. Stwierdzono natomiast, że wzrostowi upadkowości rodzin towarzyszył wzrost liczby rodzin zakażonych wirusem ABPV. Wykazano ponadto bardzo silną, dodatnią korelację pomiędzy poziomem inwazji roztoczy *Varroa*, a występowaniem wirusa DWV oraz ujemną korelację pomiędzy poziomem infekcji *Nosema* spp., a prevalencją wirusa DWV.

Ocena sytuacji epizootycznej pozwoliła wnioskować, iż inwazja roztoczy *V. destructor* oraz rozwijające się w jej następstwie infekcje wirusowe (DWV i ABPV), przy równoczesnym, szerokim rozprzestrzenieniu zakażenia mikrosporydiami z rodzaju *Nosema*, są wysoce prawdopodobną przyczyną masowej śmiertelności rodzin w okresie zimowania. Niemniej jednak sformułowanie jednoznacznych wniosków wymagało uzupełnienia badań o ocenę oddziaływania na rodziny pszczele innych, potencjalnie szkodliwych czynników oraz objęcia nią także tych pasiek, w których nie odnotowano problemu masowej śmiertelności pszczół. Z tego względu, w pasiekach o różnym poziomie śmiertelności rodzin w okresie zimowania przeprowadzono kompleksową analizę występowania i oddziaływania także kilku innych, istotnych dla zdrowia pszczół czynników. Badania te (opisane w pracy H4 i H5) wykonane zostały przy współpracy z pszczelarzami, których obowiązywał ujednolicony system pobierania i wysyłania próbek.

Próbki do badań epizootycznych i toksykologicznych pobierane były z tych samych rodzin podczas pierwszego, wiosennego przeglądu. W pasiekach, w których zginęło co najmniej dziesięć rodzin materiał pobierano oddzielnie z 10. losowo

wybranych rodzin. W pasiekach, w których osypało się mniej niż 10 rodzin, próbki pobierano z każdej, martwej rodziny. W pasiekach o niskich stratach (poniżej 10%) lub w pasiekach, w których wszystkie rodziny przezimowały, próbki pobierano także z żywych rodzin (ogółem 10 próbek z pasieki). Każdy z uczestników, wraz z próbkami do badań laboratoryjnych, przekazywał wypełniony formularz ankiety, pozwalającej uzyskać informacje na temat stanu liczbowego rodzin przed i po zimowaniu, dane dotyczące środowiska (m.in. na temat dzikich i uprawnych gatunków roślin stanowiących bazę pokarmowych pszczoł) oraz zagadnień związanych z gospodarką pasieczną, w tym metod profilaktyki i zwalczania chorób pszczoł.

Materiał, do opisanych w pracy H4, badań epizootycznych stanowiły martwe pszczoły pobierane z dna uli. Badania wykonano dla każdej próbki oddzielnie w celu identyfikacji sześciu patogenów (analogicznie jak w opisanych powyżej badaniach z lat 2008-2009). Ze względu na brak krajowych danych na temat prewalencji gatunku *N. ceranae*, diagnostykę zakażenia mikrosporydiami z rodzaju *Nosema* poszerzono o identyfikację gatunkową, wykonaną metodą multiplex PCR.

Przedstawioną w pracy H5 ocenę narażenia zimujących rodzin pszczelich na oddziaływanie ŚOR oraz akarycydów używanych w pszczelarstwie do zwalczania roztoczy *V. destructor*, przeprowadzono na podstawie oznaczonego poziomu skażenia środowiska ulowego tymi substancjami. Próbkę wosku pszczelego (wycinki plastrów gniazdowych) badano na zawartość akarycydów. W próbkach martwych pszczoł oraz zapasach pokarmu węglowodanowego (miodu lub syropu cukrowego przerobionego przez pszczoły) i pyłkowego (pierzgi), zgromadzonych przez pszczoły w plastrach, poszukiwano obecności pestycydów stosowanych w rolnictwie. Analizy toksykologiczne dla każdej z pasiek wykonano na próbkach zbiorczych, utworzonych dla każdej matrycy poprzez połączenie próbek pobranych z indywidualnych rodzin. Pozostałości sześciu substancji zaliczanych do akarycydów (akrynatryna, flumetryna, bromopropylat, amitraza, kumafos i tau-fluwalinat) oznaczone zostały w Zakładzie Pszczelnictwa IO techniką wysokotemperaturowej chromatografii gazowej ze spektrometrem masowym (amitraza) oraz techniką chromatografii gazowej z detektorem wychwyty elektronów (pozostałe związki). Pozostałości ŚOR (80. substancji) w próbkach pokarmu i pszczołach zostały zidentyfikowane w Zakładzie Badania Bezpieczeństwa Żywności IO metodą QuEChERS, chromatografu cieczowego z podwójnym detektorem masowym (LC/MS/MS). Wyniki badań laboratoryjnych oraz dane ankietowe przeanalizowano dla

pasiek podzielonych ze względu na poziom zimowych strat rodzin na pasieki ze wskaźnikiem strat powyżej akceptowalnego progu wynoszącego 10% stanu zazimowanych rodzin, pasieki z niskim, równym 10% lub niższym poziomem strat rodzin oraz pasieki bez strat zimowych.

Materiał badawczy, na którym oparto analizę, pochodził z 470 pasiek zlokalizowanych na terenie 16 województw, przy czym najliczniejszą grupę stanowiły pasieki położone w południowym i południowo-wschodnim regionie Polski. W pasiekach utrzymywanych było od 5 do nawet 800 rodzin pszczelich, ale nieco ponad połowę stanowiły pasieki uznawane za hobbystyczne i amatorskie (do 30. rodzin).

Większość pasiek stacjonowała na terenach rolniczych o zbliżonym profilu chronionych chemicznie upraw (rośliny oleiste, drzewa i krzewy owocowe), które stanowiły dla pszczół jedno z ważniejszych źródeł nektaru i pyłku. Tylko nieliczne pasieki usytuowane były na terenach nierolniczych, porośniętych dziką roślinnością. Wśród pasiek objętych badaniami przeważały pasieki prowadzące stacjonarny model gospodarki pasiecznej, co pozwoliło w większości z nich wyeliminować stres transportowy oraz eksploatacyjny, mający miejsce przy przewozie rodzin na kolejne kwitnące po sobie pożytki roślinne i odbiorze miodu towarowego, jako przyczynę wzrostu śmiertelności rodzin. Nie stwierdzono także związku pomiędzy zwiększonymi upadkami rodzin, a materiałem genetycznym utrzymywanych pszczół, ponieważ w pasiekach dominujący okazał się chów pszczoły krajńskiej *Apis mellifera carnica* (przy silnym zróżnicowaniu linii w obrębie tej rasy). W 85% pasiek, w których straty rodzin przekraczały akceptowalny próg, termin zakończenia pozyskiwania miodu towarowego, warunkujący możliwość rozpoczęcia przygotowania rodzin pszczelich do zimowania przypadał na lipiec (w 50% pasiek) i sierpień (w 35% pasiek). Uznano zatem, że w większości pasiek istniały warunki sprzyjające prawidłowemu przebiegowi tego procesu. Nie stwierdzono także zależności pomiędzy odsetkiem rodzin osypanych podczas zimy, a rodzajem pokarmu zastosowanego do uzupełnienia zimowych zapasów rodzin pszczelich (syrop cukrowy przygotowany przez pszczelarzy z cukru buraczanego i wody, syropy produkowane w warunkach przemysłowych tzw. inwerty). Od 45% do 62% pszczelarzy oceniło zapasy pyłku zgromadzonego przez pszczoły jako wystarczające na zaspokojenie ich potrzeb w okresie jesienno-zimowym. Co prawda najwyższy odsetek pasiek (8%), w których rodziny miały zdecydowanie za małe zapasy pierzgi, należał do grupy cechującej się

wysoką śmiertelnością rodzin, ale nie był on wysoki i nie różnił się istotnie od udziału takich pasiek w pozostałych grupach.

Największe różnice w zakresie prowadzonej przez pszczelarzy gospodarki pasiecznej uwidoczniły się w metodach zwalczania inwazji roztoczy *V. destructor*. W przeważającej liczbie pasiek stosowano krajowej produkcji preparaty weterynaryjne z amitrazą, których formą użytkową są tabletki do fumigacji rodzin. Jednakże, w pasiekach, w których nie odnotowano strat rodzin lub były one niskie, istotnie wyższy odsetek pszczelarzy uzupełniał te zabiegi podaniem kwasów organicznych (dopuszczonych do stosowania w pszczelarstwie) lub leczniczych preparatów weterynaryjnych, zawierających w swoim składzie inne związki chemiczne, czy zabiegami biotechnicznymi. Ponadto, w pasiekach tych znacznie większa liczba pszczelarzy rozpoczynała zabiegi zwalczania *V. destructor* już w lipcu. Całościowa ocena przebiegu leczenia w każdej z pasiek (liczba zabiegów, termin ich wykonania, rodzaj oraz dawka zastosowanej substancji czy preparatu) pokazała, że w prawidłowy sposób odbyło się to jedynie w 16% pasiek cechujących się wysokim wskaźnikiem upadkowości rodzin pszczelich. Natomiast w pozostałych pasiekach blisko 44% pszczelarzy wykonało zabiegi zgodnie z zasadami.

Analiza występowania organizmów chorobotwórczych w pasiekach różniących się poziomem zimowej śmiertelności rodzin, wykazała istotne różnice w odniesieniu do sytuacji epizootycznej inwazji *V. destructor*, DWV i ABPV. Obecność roztoczy *Varroa* i DWV wykryto w ponad 90% próbek pobranych z rodzin o wysokim wskaźniku strat, przy czym intensywność inwazji była w nich czterokrotnie wyższa w porównaniu do próbek pobranych z pasiek o niskiej śmiertelności rodzin. Zakażenie DWV wykryto w mniej niż połowie próbek pszczoł pochodzących z pasiek, w których wszystkie rodziny przeżyły zimę. Różnice w częstotliwości identyfikacji wirusa ostrego paraliżu pszczoł (ABPV) w próbkach z pasiek o zwiększonej upadkowości była niemal pięciokrotnie wyższa w porównaniu do zakażonych próbek pochodzących z pasiek o akceptowalnym poziomie strat i aż dziesięciokrotnie wyższa w odniesieniu do próbek pobranych z pasiek, w których wszystkie rodziny przezimowały.

Diagnostyka przeprowadzona w kierunku wykrycia obecności mikrosporydiów z rodzaju *Nosema* ponownie wykazała ich bardzo szerokie rozpowszechnienie (70% zainfekowanych próbek i 85% pasiek z których pochodziły próbki). Badania różnicowe dowiodły powszechnego występowania gatunku *N. ceranae*, a także jego dominacji nad

gatunkiem *N. apis*, uznawanym do tej pory za jedyny czynnik etiologiczny nosemozy. *N. ceranae* stwierdzono w pasiekach z terenu wszystkich województw (ogółem w 65% rodzin i w 81% pasiek) podczas, gdy obecność *N. apis* zidentyfikowana została w o połowę mniejszej liczbie pasiek i tylko w 23% rodzin. Nie wykazano jednakże bezpośredniego udziału infekcji *Nosema* spp. w masowym ginięciu rodzin. W grupach pasiek różniących się wskaźnikiem upadkowości rodzin, zarówno odsetek zakażonych rodzin, jak i poziom zakażenia, nie różnił się istotnie.

Istotną różnicę odnotowano natomiast liczbie organizmów chorobotwórczych diagnozowanych w próbkach pszczół. Zakażenia mieszane dominowały w próbkach z pasiek o wysokiej śmiertelności rodzin, w 67% z nich obecne były co najmniej trzy patogeny, podczas gdy w pasiekach o niskim wskaźniku strat i bez strat odsetek takich próbek stanowił odpowiednio 41 i 21% rodzin.

Badania pozostałości akarycydów stosowanych do zwalczania *V. destructor* i pestycydów stosowanych do ochrony roślin łącznie przeprowadzone zostały na 727 próbkach środowiskowych i pszczół, z czego 44% okazała się być skażona. Udział skażonych próbek wosku i obydwu rodzajów pokarmu był zbliżony i mieścił się w zakresie od 50 do 60%. Największe skażenie wosku spowodowane było obecnością tau-fluwalinatu (40% dodatnich próbek), przy średnim stężeniu tej substancji na poziomie 1,6 mg/kg (w około jednej trzeciej próbek ilość tau-fluwalinatu była wyższa). Pozostałości kumafosu średnio (około 1mg) znaleziono w 15% próbek, a tylko w 5. próbkach zawartość kumafosu była wyższa. Zanieczyszczenie wosku pozostałymi akarycydami stwierdzano sporadycznie. Zarówno odsetek skażonych próbek wosku kumafosem i tau-fluwalinatem, jak i stężenia tych substancji w wosku były podobne w próbkach z pasiek o niskim i podwyższonym wskaźniku strat, co pozwoliło wnioskować o podobnej ekspozycji rodzin pszczelich na kontaktowe oddziaływanie tych pozostałości. Ryzyko, jakie dla pszczół stwarzało skażenie wosku kumafosem i tau-fluwalinatem, oceniono także obliczając, dla maksymalnego stężenia obydwu związków, tzw. iloraz zagrożenia HQ (Hazard Quotient). Uzyskane wartości HQ dla tau-fluwalinatu i kumafosu były niższe od wartości HQ, przy której skażenie pestycydami definiowane jest jako „podwyższone” (z zastrzeżeniem że wosk nie zawierał innych pestycydów, których obecności nie oznaczano).

Pozostałości pestycydów stosowanych w ochronie roślin okazały się być dość powszechne w zapasach pyłku zgromadzonego w postaci pierzgi w plastrach zimujących

rodzin pszczelich. Pyłek w największym stopniu skażony był fungicydami (45% próbek dodatnich, 10 wykrytych związków), a następnie insektycydami (32% próbek, 8 związków) i herbicydami (24% próbek, 4 substancje), przy czym blisko 40% próbek zawierało co najmniej 2 substancje. Wykryte w pyłku pozostałości należały zarówno do mało, jak i bardzo toksycznych dla pszczół, aczkolwiek insektycydy odznaczające się najwyższą toksycznością (tiametoksam, dimetoat, pyridaben) wykryto jedynie w pojedynczych próbkach. Oznaczone ilości poszczególnych substancji nie zagrażały pobraniem śmiertelnej dawki pestycydu wraz ze spożywanym w ciągu doby pyłkiem przez pszczoły robotnice wychowujące czerw lub pszczoły ulowe. Niemniej jednak, w wielu rodzinach pszczoły zimowe były przez okres kilku miesięcy narażone na subletalne dawki mieszanek pestycydów. Ekspozycja pszczół na pozostałości ŚOR była podobna w pasiekach o niskim i wysokim wskaźniku strat rodzin.

Pozostałości pestycydów w zapasach węglowodanowych wykryto co prawda w zbliżonym odsetku próbek (50%) co pyłku, ale były to jedynie niewielkie ilości sześciu różnych substancji chemicznych. Porównanie uzyskanych wyników z danymi na temat skażenia pestycydami miodu, opublikowanymi przez innych krajowych i zagranicznych autorów, wskazuje, iż analizowany przez nas pokarm w większości utworzony został z syropu podawanego rodzinom na jesieni. Uzupełnianie zapasów zimowych (w miejsce odwirowanego przez pszczelarzy miodu) pozwala zatem ograniczyć ekspozycję pszczół na pozostałości pestycydów wprowadzane do środowiska ulowego wraz z nektarem roślin chronionych chemicznie.

Również w próbkach pszczół (13,5% dodatnich próbek) identyfikowano tylko pojedyncze związki, a ich stężenie było dużo niższe od śmiertelnej dawki (LD_{50}) podanej drogą pokarmową. Uzyskane wyniki nie dały podstaw do wskazania pozostałości pestycydów jako czynnika odpowiedzialnego za osypanie się pszczół. W opisanych w literaturze, potwierdzonych przypadkach zatrucia pszczół pestycydami, w próbkach martwych owadów stwierdzano obecność zazwyczaj kilku substancji, wśród których znajdowały się znaczne ilości związków odznaczających się wysoką toksycznością.

Analiza toksykologiczna środowiska ulowego zimujących rodzin pszczelich pozwoliła ocenić ekspozycję pszczół na pozostałości pestycydów i oszacować związane z nią zagrożenie dla zdrowia pszczół. W ocenie uwzględnione zostały różne źródła i drogi narażenia pszczół. Skażenie środowiska ulowego rodzin pszczelich w pasiekach o niskich i wysokich stratach rodzin było porównywalne, a stwierdzone poziomy

pozostałości stwarzały względnie niskie zagrożenie toksykologiczne dla rodzin pszczoł.

Reasumując, na podstawie kompleksowej oceny warunków środowiskowych, metod prowadzenia gospodarki pasiecznej, sytuacji epizootycznej i toksykologicznej w pasiekach o różnym wskaźniku upadkowości rodzin stwierdzono, iż w większości krajowych pasiek pierwotną przyczyną masowego ginięcia rodzin jest silna inwazja roztoczy *V. destructor* wraz z towarzyszącymi jej infekcjami powodowanymi przez wirusa zdeformowanych skrzydeł i wirusa ostrego paraliżu pszczoł. Powszechne zakażenie rodzin mikrosporydiami z rodzaju *Nosema* oraz chroniczna ekspozycja pszczoł na oddziaływanie subletalnych dawek pozostałości pestycydów pełnią rolę wtórnych stresorów obniżających vitalność i długość życia pszczoł. Ko-infekcje i skażenie środowiska ulowego mieszankami pestycydów stwarza wysokie prawdopodobieństwo synergizmu w oddziaływaniu tych czynników.

Poprawa sytuacji epizootycznej w pasiekach możliwa jest poprzez weryfikację metod gospodarki pasiecznej, przede wszystkim w zakresie zabiegów zwalczania roztoczy *V. destructor*.

II. Ocena rzeczywistego zagrożenia, jakie w warunkach polowych stwarzają dla rodzin pszczoł insektycydy neonikotynoidowe, stosowane do ochrony upraw stanowiących bazę pokarmową pszczoł.

Spośród wszystkich roślin uprawianych w kraju, rzepak (*Brassica napus*) stanowi dla pszczoł najważniejszą roślinę pokarmową, dostarczającą zarówno pożytku pyłkowego jak i nektarowego. Rzepak ozimy uprawiany jest na powierzchni około 950 tys. ha, natomiast uprawa rzepaku jary zajmuje około 120 tys. ha. W ostatnich latach sukcesywnie rośnie także powierzchnia uprawy kukurydzy (*Zea mays*) zajmująca obecnie prawie 1 mln ha. Okres zakwitania kukurydzy przypada na lipiec, kiedy to, przy znacznie ograniczonej liczbie kwitnących roślin, może stanowić znaczące źródło pyłku. Niestety rośliny obydwu wymienionych gatunków są poddawane intensywnej ochronie chemicznej. Dopuszczenie do zaprawiania nasion rzepaku i kukurydzy insektycydami neonikotynoidowymi oraz stosowanie ich w formie oprysku stworzyło nowe zagrożenie toksykologiczne dla pszczoł. Ponieważ wzrost upadkowości rodzin po zimie zbiegł się z dopuszczeniem tych substancji do ochrony m.in. rzepaku i kukurydzy, zaistniały istotne przesłanki do sprawdzenia powiązań pomiędzy tymi faktami. W czasie podejmowania przeze mnie badań, problematyka rzeczywistego poziomu skażenia

surowców roślinnych wykorzystywanych przez pszczoły z upraw rzepaku i kukurydzy była szczątkowa. Jedyne, dostępne na ten temat dane pochodziły z publikacji wyników badań przeprowadzonych w Kanadzie, poświęconych określeniu poziomu skażenia nektaru, pyłku i miodu z rzepaku zaprawianego chlotianidyną. Konieczność rozpoczęcia badań nad wpływem pestycydów neonikotynoidowych na rodziny pszczele w rzeczywistych warunkach polowych była szeroko podnoszona przez środowisko naukowe, pszczelarzy oraz Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności.

Badania nad skażeniem wykorzystywanych przez pszczoły surowców roślinnych, pochodzących z chronionego chemicznie rzepaku i wpływem tych zanieczyszczeń na rodziny pszczele, opisano w pracy H2. Objęto nimi wszystkie trzy neonikotynoidy (chlotianidynę, imidachlopyrd i tiametoksam) stosowane w tym czasie do zaprawiania nasion rzepaku oraz dwa związki (acetamipryd i tiachlopyrd) aplikowane w formie oprysku. Polową część badań wykonano przy współpracy z Rolniczym Zakładem Doświadczalnym Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach. W roku 2010 badania przeprowadzono na 2 plantacjach rzepaku ozimego zaprawionego odpowiednio tiametoksamem i imidachlopyrdem, a w roku 2012 na 3 plantacjach rzepaku jarego, którego nasiona zaprawiono tiametoksamem, chlotianidyną i imidachlopyrdem. W fazie wzrostu rzepak został opryskany tiachlopyrdem. Ochrona chemiczna wszystkich plantacji wykonana została zgodnie z aktualnym programem ochrony, przy użyciu pestycydów dopuszczonych do obrotu w kraju. Zgodnie z programem ochrony na uprawach stosowane były także insektycydy należące do innych klas chemicznych oraz środki grzybobójcze i chwastobójcze.

Na czas zakwitania rzepaku przygotowano grupę doświadczalnych i kontrolnych rodzin pszczelich z pszczołami rasy *Apis mellifera carnica*, *Apis mellifera caucasica*. Na podstawie badań klinicznych do doświadczenia wybrano zdrowe i prawidłowo rozwijające się rodziny pszczele, o znanym statusie epizootycznym, ocenionym podczas laboratoryjnego badania próbek pszczół. Diagnostyką laboratoryjną objęto roztocze *V. destructor* (poziom inwazji oznaczany metodą wypłukiwania), mikrosporydia z rodzaju *Nosema* (poziom infekcji oznaczany metodą mikroskopową) oraz wirusy: chronicznego paraliżu pszczół (CBPV), ostrego paraliżu pszczół (ABPV), zdeformowanych skrzydeł (DWV), oraz izraelski wirus ostrego paraliżu pszczół (IAPV) (wykrywanie infekcji techniką RT-PCR). Badania laboratoryjne wykonano w Pracowni

Chorób Pszczół Zakładu Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych PIWet-PIB według wcześniej opracowanych i obowiązujących procedur badawczych.

Rodziny pszczele umieszczano w pobliżu plantacji rzepaku na okres jego kwitnięcia (około 3 tygodni). Kontrolną grupę rodzin ustawiano w tym czasie w terenie rolniczym, wolnym od dużych upraw rzepaku. Po przekwitnięciu rzepaku rodziny z obu grup przewożono na stacjonarne pasieczysko.

Aby móc ocenić poziom skażenia pestycydami surowców roślinnych wykorzystywanych przez pszczoły w czasie kwitnięcia rzepaku oraz przetworzonych i zgromadzonych w gniazdach, do badań laboratoryjnych pobierano sukcesywnie (6-7 razy) nektar bezpośrednio z kwiatów rzepaku (z tej części roślin, która została zabezpieczona izolatorami przed dostępem owadów). Natomiast z każdej rodziny pszczelej pobierano dwukrotnie próbki świeżego nektaru (tzw. nakrop) złożonego przez pszczoły w komórkach plastrów. Próbkę pyłku, w postaci obnóży pyłkowych, pobierano z każdej partii uzbieranej w poławiaczach przez pszczoły w ciągu 3-4 dni. Po zakończeniu kwitnienia rzepaku, z każdej rodziny pobierano także próbki miodu, pierzgi i pszczół. W Zakładzie Badania Bezpieczeństwa Żywności IO w Skierniewicach próbki zostały poddane analizie chemicznej metodą chromatografii cieczowej z podwójnym detektorem masowym (LC/MS/MS) na obecność wszystkich pięciu związków neonikotynoidowych. Dla potwierdzenia pochodzenia botanicznego (określenia udziału surowca rzepakowego) przeprowadzono analizę pyłkową próbek nakropu, miodu, obnóży pyłkowych i pierzgi. Badania zostały wykonane w Zakładzie Pszczelnictwa IO w Skierniewicach.

Wpływ pozostałości pestycydów na rodziny badane był w regularnych odstępach czasu. Od chwili wywiezienia na plantację rzepaku, aż do zazimowania monitorowano śmiertelność pszczół, proces reprodukcji oraz populację pszczół. Po przewiezieniu rodzin na stacjonarne pasieczysko oceniano zbiory pierzgi zgromadzonej w plastrach oraz produkcyjność rodzin w zakresie miodu i pyłku. Miód rzepakowy został ze wszystkich rodzin odwirowany zgodnie ze standardową praktyką pszczelarską. Zbiory pyłku ocenione zostały na podstawie ilości obnóży pyłku zebranego z poławiaczy pyłkowych rodzin przeznaczonych jedynie do oceny tego parametru. W okresie późnoletnim wszystkie rodziny zostały w sposób standardowy przygotowane do zimowania. Stan rodzin pszczelich po okresie zimowania 2010/11, został ponownie oceniony wiosną.

Warunki atmosferyczne panujące w trakcie prowadzenia badań na uprawach rzepaku ozimego (maj) były nietypowe dla tej pory roku, co rzutowało na uzyskane wyniki. Intensywne i ciągłe opady deszczu utrzymujące się niemal przez cały miesiąc w bardzo dużym stopniu ograniczyły loty pszczoł zbieraczek i uniemożliwiły dobre wykorzystanie kwitnących w tym czasie roślin. Rodziny zebrały średnio po około 800 g pyłku, a powierzchnia pierzgi nie przekraczała 5 dm². Udział pyłku rzepakowego w próbkach pierzgi stanowił średnio od 25 do 33%. Zawartość pyłku rzepakowego w nektarze i miodzie była zbliżona i pozwalała zakwalifikować miód jako rzepakowy, przy czym jego produkcja (około 5 kg z rodziny) była dużo niższa od możliwej do uzyskania (do 27 kg/rodzinę). Średnie zbiory miodu, pyłku i pierzgi w rodzinach z grupy kontrolnej również były niskie, co pozwoliło wnioskować, że na produktywność rodzin miały wpływ głównie warunki atmosferyczne, a nie chemiczna ochrona upraw rzepaku. Znacznie więcej nektaru i pyłku zebrały rodziny pszczele na każdej plantacji rzepaku jarego, co potwierdziła analiza palinologiczna. Ilość zgromadzonej pierzgi i miodu była dwu lub trzykrotnie wyższa.

Pozostałości wszystkich pięciu insektycydów neonikotynoidowych zostały stwierdzone zarówno w próbkach pokarmu węglowodanowego (nektar, nakrop, miód) jak i białkowego (pyłek, pierzga). Najczęściej wykrywano tiachlopryd, tiametoksam i acetamipryd. Ogółem odsetek skażonych próbek nektaru, nakropu i miodu wynosił odpowiednio 64; 65 i 51%, a pyłku (obnóży i pierzgi) 62; 37 i 45%. Spośród insektycydów neonikotynoidowych stosowanych w postaci zapraw najwyższe skażenie powodował tiametoksam. Wykryto go we wszystkich próbkach nakropu i miodu z rzepaku ozimego, i we wszystkich matrycach roślinnych z rzepaku jarego. W próbkach z rzepaku jarego poziom pozostałości był zbliżony, a oznaczone, maksymalne stężenie nie przekraczało 2,6 ng/g próbki. Zawartość tiametoksamu w próbkach nektaru, nakropu i miodu z rzepaku jarego była istotnie wyższa (średnio 8,7ng/g). Stężenie tiametoksamu w próbkach pyłku było niższe i wynosiło średnio 5,7ng/g. Poziom pozostałości pestycydów w badanych próbkach obnóży pyłkowych i pierzgi był zależny od udziału pyłku rzepakowego. Różnice pomiędzy poziomami skażenia próbek pochodzących z rzepaku ozimego i jarego mogły być wynikiem dłuższego okresu, jaki upłynął od zaprawienia nasion rzepaku ozimego do zakwitania roślin (ponad sześć miesięcy), podczas którego mógł nastąpić częściowy rozkład tej substancji. W przypadku rzepaku jarego, od zaprawienia nasion do zakwitania roślin

upłynęło dwa miesiące. Za takim tokiem rozumowania przemawia także fakt, iż tiametoksamu nie wykryto nawet w tych próbkach pyłku z rzepaku ozimego, w których udział pyłku rzepakowego wynosił ponad 90%. Tiametoksam był także obecny w wysokim odsetku próbek wszystkich rodzajów pobieranych z plantacji rzepaku, na których nie był stosowany w postaci zaprawy, przy czym w tych próbkach jego zawartość była niższa. Chlotianidyna obecna była w większości badanych próbek nektaru, miodu i pyłku z rzepaku ozimego, ale jej stężenie we wszystkich matrycach było znacznie niższe. Podobnie jak w przypadku tiametoksamu, poziom skażenia nektaru okazał się istotnie wyższy od skażenia pyłku. Niskie stężenia imidachlopyrydu stwierdzono jedynie w próbkach nakropu i miodu, przy czym tylko w dwóch próbkach nakropu z rzepaku jarego. Obecności zapraw nasiennych nie wykryto natomiast w żadnej z pobranych próbek pszczoł.

Substancje czynne preparatów zastosowanych w formie oprysku zostały wykryte we wszystkich rodzajach pobranych próbek. Skażenie pyłku było porównywalne do jego zanieczyszczenia substancjami wchodzącymi w skład zapraw nasiennych. Zawartość acetamiprydu we wszystkich próbkach pochodzących z plantacji, na której oprysk wykonano na dwa tygodnie przed przywiezieniem rodzin pszczelich, była istotnie niższa w porównaniu do próbek pobranych z plantacji rzepaku, na której oprysk wykonano tydzień przed przywiezieniem rodzin. Mimo, że tiachlopyryd w formie oprysku był zastosowany na trzech różnych plantacjach rzepaku jarego w tych samych dawkach i terminach, to jego zawartość wahała się od 0,9 do 81,6 ng/g, co świadczy o bardzo zróżnicowanym poziomie skażenia, przy tym sposobie aplikacji preparatów. Pozostałości acetamiprydu i/lub tiachlopyrydu wykryto dodatkowo w próbkach pobranych z plantacji rzepaku, gdzie te substancje nie były stosowane oraz w próbkach z rodzin kontrolnych, przy czym ich stężenie było niskie. Uzyskane wyniki świadczą o powszechnym stosowaniu preparatów neonikotynoidowych w ochronie innych upraw, stanowiących dla pszczoł źródło pożytku nektarowego lub pyłkowego. Obecność tiachlopyrydu, podobnie jak acetamiprydu, stwierdzono także w próbkach żywych pszczoł.

Na podstawie oznaczonego stężenia insektycydów oceniono narażenie pszczoł różnych kast przy spożywaniu skażonego pokarmu, w zależności od jego rodzaju i ilości [49]. Dla żadnego insektycydu nie stwierdzono przekroczenia dawki śmiertelnej (LD₅₀), nawet podczas spożywania maksymalnie skażonej dziennej porcji nektaru (miodu) i/lub

pyłku. Tym niemniej stwierdzony poziom pozostałości tiametoksamu zagrażał pobraniem przez pszczoły zbieraczki i karmicielki takiej dawki tego związku, dla której wykazano działanie subletalne. W okresie przebywania rodzin pszczelich na uprawach rzepaku ozimego i jarego, w żadnej z rodzin nie stwierdzono wzrostu śmiertelności pszczół. Również po powrocie na pasieczysko stacjonarne, do czasu zazimowania rodzin, śmiertelność pszczół była bardzo niska. Obecność oznaczonych pozostałości insektycydów (w tym subletanych dawek tiametoksamu) nie miała także widocznego wpływu na kondycję i zachowanie rodzin. W okresie od wywiezienia uli na uprawy rzepaku aż do okresu zazimowania rodziny we wszystkich grupach rozwijały się prawidłowo. Nie obserwowano też negatywnych efektów chronicznego narażenia rodzin, które w prawidłowej kondycji przetrwały zimę, czego dowodem był nieliczny i podobny we wszystkich grupach zimowy osyp pszczół. Należy jednak podkreślić, że ocena krótko i długookresowego oddziaływania pozostałości insektycydów była prowadzona na klinicznie zdrowych rodzinach pszczelich. W chwili wywozu rodzin na rzepak poziom inwazji *V. destructor* był na tyle niski, że w pobranych próbach pszczół nie stwierdzono obecności roztoczy, w nielicznych wykryto jedynie niski poziom zakażenia sporami *Nosema* spp. i obecność DWV. Niezależnie od korzystnej sytuacji epizootycznej, ekspozycja rodzin na pestycydy została ograniczona niskimi zbiorami pyłku i nektaru.

Reasumując, należy uznać, że stosowanie insektycydów neonikotynoidowych w ochronie rzepaku stwarza dla pszczół istotne ryzyko, o czym świadczy wysoka prewalencja tych substancji w obydwu surowcach wykorzystywanych przez te owady. W ponad połowie próbek obecne były dwie, a w około 25% próbek, trzy związki neonikotynoidowe. Największe zagrożenie stanowią zaprawy nasienne z tiametoksamem. Ocenione ryzyko może być znacznie wyższe, ponieważ badania zostały przeprowadzone w niesprzyjających warunkach pogodowych, które uniemożliwiły rodzinom pszczelim dobre wykorzystanie tego pożytku. Z tego też względu nie można jednoznacznie wnioskować, iż większe zagrożenie dla pszczół stwarza ochrona rzepaku jarego, na co wskazały niektóre z uzyskanych wyników (np. porównanie stężenia tiametoksamu w nektarze zebranym bezpośrednio z roślin). Hydrofilne neonikotynoidy o działaniu systemicznym stosowane w zaprawach w dużym stopniu przenikają do nektaru, a zatem ten rodzaj matrycy powinien być także uwzględniany w przypadku prowadzenia badań z tego zakresu tematycznego. Na

terenach intensywnej uprawy rzepaku narażenie rodzin pszczelich na toksyczne oddziaływanie pozostałości insektycydów neonikotynoidowych może wzrastać na skutek lepszego wykorzystania pożytku rzepakowego i zwiększenia zapasów zgromadzonych przez pszczoły w gnieździe (także ilość miodu pozostawionego po miodobraniu), pogorszenia stanu zdrowotnego rodzin (synergizm patogen/pestycyd) i obecności innych substancji chemicznych. Duża liczba cytowań pracy H2 (ogółem 75) może świadczyć o istotnym wkładzie uzyskanych wyników w światowy rozwój wiedzy z tego zakresu.

Badania nad skażeniem pyłku zbieranego przez pszczoły z kukurydzy chronionej insektycydami neonikotynoidowymi opisano w pracy H3. Badania polowe wykonano przy współpracy z Rolniczym Zakładem Doświadczalnym Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach. Ochrona chemiczna wszystkich upraw kukurydzy wykonana została zgodnie z aktualną praktyką rolniczą, przy użyciu pestycydów zarejestrowanych w kraju. W roku 2011 na dwóch polach wysiano nasiona kukurydzy zaprawione odpowiednio imidachlopydem i chlotianidyną, a 2012 roku powtórzono doświadczenie na kukurydzy zaprawianej imidachlopydem. Wszystkie nasiona kukurydzy były dodatkowo zaprawione preparatami grzybobójczymi należącymi do innej klasy chemicznej.

Przygotowanie rodzin do doświadczenia oraz monitorowanie ich rozwoju i produktywności przebiegało w sposób analogiczny do badań prowadzonych na uprawach rzepaku. W doświadczeniu brały udział zdrowe rodziny z pszczołami rasy kraińskiej i kaukaskiej, osadzone w ulach typu Wielkopolski, wyposażonych w wielofunkcyjne dennice, umożliwiające pozyskiwanie obnóży pyłku kwiatowego oraz monitorowanie śmiertelności pszczół. Rodziny wywiezione zostały na pola kukurydzy na początku drugiej dekady lipca, gdzie przebywały do końca miesiąca. Kontrolę stanowiły rodziny stacjonujące na terenie wolnym od upraw kukurydzy. Od wywiezienia rodzin na plantacje kukurydzy, aż do zazimowania, w określonych odstępach czasu monitorowana była śmiertelność pszczół i parametry świadczące o ich rozwoju i sile. Po przewiezieniu rodzin na stacjonarne pasieczysko dokonano pomiarów pierzgi zgromadzonej w tym czasie w plastrach. Wszystkie rodziny zostały przygotowane do zimowania poprzez dostosowanie wielkości gniazd do populacji pszczół, podkarmienie syropem cukrowym i wykonanie zabiegów zwalczania roztoczy *V. destructor*. Siłę rodzin

i ich rozwój oceniono ponownie wiosną następnego roku. Próbkami obnóży pyłkowych zbierane w trakcie całego okresu kwitnienia kukurydzy co kilka dni oraz próbki pierzgi pobrane oddzielnie z gniazda każdej rodziny po zakończeniu okresu kwitnienia kukurydzy zbadano na obecność pestycydów neonikotynoidowych.

Analiza palinologiczna pyłku zebranego przez rodziny w okresie przebywania na plantacjach kukurydzy wykazała zróżnicowane (nie związane powierzchnią danej uprawy) wykorzystanie tego pożytku przez pszczoły. Rodziny stacjonujące na polu o powierzchni 6 ha zebrały średnio po 310 g obnóży pyłku, z czego pyłek kukurydzy stanowił około 26%, natomiast rodziny mające do dyspozycji 36 ha pole kukurydzy zebrały co prawda ponad 4-krotnie więcej pyłku, ale udział pyłku z kukurydzy wynosił w nim zaledwie około 2%. W kolejnym roku badań rodziny zgromadziły podobną ilość pyłku (średnio 1 kg/rodzinę), przy czym udział pyłku z kukurydzy był ponownie bardzo niski (średnio 1,3%). Wyniki analizy palinologicznej pierzgi były zbliżone. W rodzinach, które zgromadziły bardzo mało pierzgi (4 dm²) pyłek kukurydzy stanowił 12%, natomiast w rodzinach których pierzga zajmowała średnio od 12 do 14 dm² zawartość pyłku kukurydzy nie przekraczała 3%. Okazało się zatem, że mimo bliskiej obecności dużych powierzchni kukurydzy pszczoły oblatywały rośliny z rodzaju kapustowatych, grykę, cykorię, nawłóć, słonecznik, koniczynę białą, grykę, facelię maliny.

W badanych próbkach pyłku wykryto jedynie obecność chlotianidyny (we wszystkich próbkach obnóży) w ilości od 10 do 41 ng/g (średnio 27ng/g). W pierdze, w której zawartość pyłku rzepakowego była o połowę niższa niż w obnóżach, nie wykryto pozostałości chlotianidyny. W żadnej z próbek pyłku zebranych z kukurydzy zaprawianej imidachlopydem nie wykryto pozostałości tej substancji, co mogło być wynikiem bardzo niskiej zawartości pyłku kukurydzy w ogólnej masie badanych próbek. Nawet maksymalny poziom pozostałości chlotianidyny nie stwarzał ryzyka spożycia przez pszczoły śmiertelnej dawki (LD₅₀) w raz z dobową porcją pyłku, ale groził pobieraniem przez owady ilości chlotianidyny, przy której obserwowano subletalny efekt jej działania (powyżej 1 ng/g). W dużej liczbie próbek stwierdzono ponadto acetamipryd i/lub tiachlopyryd, aczkolwiek stężenia tych substancji były bardzo niskie.

W warunkach doświadczenia (bardzo niskie zbiory pyłku z kukurydzy czyli narażenie małej populacji pszczół na skażony pokarm), nie wykazano wpływu preparatów zastosowanych do ochrony upraw kukurydzy na kondycję i funkcjonowanie rodzin pszczelich w czasie sezonu, nie odnotowano również chronicznego

oddziaływania subletalnego poziomu skażenia zapasów pyłku na poziomie rodziny. Wartości mierzonych parametrów (śmiertelność pszczoł, populacja pszczoł, powierzchnia czerwiu) były prawidłowe i zbliżone do parametrów rodzin z grupy kontrolnej.

Uzyskane wyniki pozwalają wnioskować o mniejszej atrakcyjności dla pszczoł pyłku z kukurydzy, w porównaniu do innych roślin, których kwitnienie przypada na ten sam okres. Zaprawianie nasion kukurydzy neonikotynoidami stwarzać będzie istotne zagrożenie toksykologiczne dla rodzin pszczelich stacjonujących w pobliżu wielkoobszarowych upraw kukurydzy, przy braku innych roślin pożytkowych.

Osiągnięcia

- Uzyskanie danych (pierwszych w kraju) na temat rzeczywistego zagrożenia wynikającego dla rodzin pszczelich ze stosowania (zgodnie z obowiązującym ówczesnie programem) insektycydów neonikotynoidowych w ochronie upraw rzepaku ozimego, jarego i kukurydzy. Wykazanie wysokiego ryzyka dla zdrowia rodzin pszczelich stacjonujących w pobliżu dużego areału tych upraw, w warunkach sprzyjających dobremu wykorzystaniu przez pszczoły pożytku pyłkowego i nektarowego. Wyniki badań zostały przekazane do Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności i stanowiły jeden z przyczynków do wydania opinii na temat konieczności ponownej oceny ryzyka stosowania chlotianidyny, tiametoksamu i imidachloprzydu dla owadów zapylających. Komisja Europejska wprowadziła czasowe wstrzymanie zaprawiania nasion tymi substancjami i stosowanie w ograniczonych warunkach [50]. Zakończenie prac przez Europejskie Biuro ds. Bezpieczeństwa Żywności i wydanie decyzji planowane jest na początek 2018 roku.
- Wskazanie zachowania bioróżnorodności w okolicach upraw kukurydzy jako sposobu redukującego zagrożenia wynikające z chemicznej ochrony kukurydzy,
- Uzyskanie danych (pierwszych w kraju) na temat poziomu skażenia wosku pszczelego akarycydami stosowanymi w pszczelarstwie i ryzyka, jakie stwarzają dla zimujących rodzin pszczelich.
- Uzyskanie danych (pierwszych w kraju) na temat poziomu skażenia środkami ochrony roślin pokarmu pyłkowego – pierzgi i ryzyka, jakie stwarzają dla zimujących rodzin pszczelich.

- Wskazanie głównych czynników odpowiedzialnych za wzrost śmiertelności rodzin pszczelich w krajowych pasiekach.
- Uzyskanie pierwszych danych na temat sytuacji epizootycznej inwazji roztoczy *V. destructor*, infekcji mikrosporydiami z rodzaju *Nosema*, wirusów: DWV, ABPV, IAPV, CBPV w krajowych pasiekach.
- Uzyskanie pierwszych danych na temat sytuacji epizootycznej gatunku *Nosema ceranae* w rodzinach pszczelich na terenie całego kraju oraz określenie roli tego pasożyta w etiologii zjawiska zwiększonej śmiertelności rodzin pszczelich w Polsce.
- Wskazanie elementów gospodarki pasiecznej w zakresie zwalczania inwazji roztoczy *V. destructor* wymagających weryfikacji w celu poprawy ich skuteczności.

Piśmiennictwo:

1. Klein A.M., Vaissiere B.E., Cane J.H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C., Tscharntke T.(2007): Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceeding of the Royal Society. B.* 274: 303-313
2. Goulson D., Lye G. C., Darvill, B. (2008): Decline and conservation of bumble bees. *Annual Review of Entomology* 53: 191–208.
3. Potts S. G., Biesmeijer J. C., Kremen C., Neumann P., Schweiger O., Kunin W. E. (2010): Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution* 25: 345–353.
4. Smith K.M., Loh E.H., Rostal M.K., Zambrana-Torrel C.M., Mendiola L. Daszak P. (2013): Pathogens, pests, and economics: drivers of honey bee colony declines and losses. *Ecohealth*, 10: 434–445.
5. Cox-Foster D. L., Conlan S., Holmes E. C., Palacios G., Evans J. D., Moran N. A., Quan P.-L., Brieseman T., Hornig M., Geiser D. M., Martinson V., vanEngelsdorp D., Kalkseid A. L., Drysdale A., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchison S.K., Simons J. F., Egholm M., Pettis J. S., Lipkin W. I. (2007): A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318: 283-287.
6. Anderson D.L. and Trueman J.W.H. (2000): *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24: 165–189.
7. Korpela S., Aarhus A., Fries I., Hansen, H. (1992): *Varroa jacobsoni* Oud. in cold climates: population growth, winter mortality and influence on the survival of honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research*, 31: 157-164.
8. Le Conte Y., Ellis M., Ritter W. (2010): Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses. *Apidologie*, 41: 353-363.
9. Allen M.F., Ball B.V. (1996): The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World* 77: 141-162.
10. Gregory P.G., Evans J.D., Rinderer T., De Guzman L. (2005): Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by Varroa mites. *Journal of Insect Science*, 5 (7): 1-5

11. Shen M., Yang X., Cox-Foster D., Cui L. (2005): The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology*, 342: 141-149.
12. Di Prisco G., Pennacchio F., Caprio E., Boncristiani H.F. Jr., Evans J.D., Chen Y. (2011): Varroa destructor is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of General Virology*, 92: 151-155.
13. Tentcheva D., Gauthier L., Zappulla N., Dainat B., Cousserans F., Colin M.E., Bergoin M. (2004): Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 7185-7191.
14. Fries I. (1995): *Nosema apis* – a parasite in the honey bee colony. *Bee World*, 74: 5–19.
15. Klee J., Besana A.M., Genersch E., Gisder S., Nanetti A., Tam D.Q., Chinh T.X., Puerta F., Ruz J.M., Kryger P., Message D., Hatjina F., Korpela S., Fries I., Paxton R.J. (2007): Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 96: 1–10.
16. Mayack C., Naug D. (2009): Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 100: 185–188.
17. Higes M., Meana A., Bartolomé C., Botías C., Martín-Hernández R. (2013): *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1): 17-29.
18. Higes M., Martín-Hernández, R., Botías C., Bailón E.G., González-Porto A.V., Barrios L., Nozal M.J.D., Bernal J.L., Jiménez J.J., Palencia P.G., Meana A. (2008): How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10: 2659–2669.
19. Forsgren E., Fries, I. (2013): Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate. *Environmental Microbiology Reports*, 5: 78–82.
20. Koehler H.-R., Triebskorn R. (2013): Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science*, 341: 759–765.
21. Johnson R.M. (2015): Honey Bee Toxicology. *Annual Review of Entomology*, 60: 418-434.
22. Belzunces L. P., Tchamitchian S., Brunet J. L. (2012): Neural effects of insecticides in the honey bee. *Apidologie*, 43: 348–370.
23. Goulson D. (2013): Review: an overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50: 977–987.
24. Jeschke P., Nauen R., Schindler M., Elbert A. (2011): Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 2897–2908.
25. Krupke C.H., Hunt G.J., Eitzer B.D., Andino G., Given K. (2012): Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS ONE* 7(1): e29268.

26. Blacquiere T., Smagghe G., van Gestel C. A. M., Mommaerts V. (2012): Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21: 973–992.
27. Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J. T., Roe M. R. (2004): Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*, 23: 371–378.
28. Desneux N., Decourtye A., Delpuech J.M. (2007): The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52: 81–106.
29. Decourtye A., Devillers J., Cluzeau S., Charreton, M., Pham-Delegue M. H. (2004): Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 410–419.
30. Decourtye A., Devillers J., Genecque E., Le Menach K., Budzinski H., Cluzeau S., Pham-Delègue M.H. (2005): Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48: 242–250.
31. Decourtye A., Devillers J. (2010): Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. In: Thany SH (ed) *Insect nicotinic acetylcholine receptors*, 1st edn. Springer, New York, pp 85–95
32. Gregorc A., Ellis J.D. (2011): Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99: 200–207.
33. Aliouane Y., Adessalam K., El Hassani A.K., Gary V., Armengaud C., Lambin M., Gauthier M. (2009): Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effect on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(1): 113–122
34. Berry J.A., Hood W.M., Pietravalle S., Delaplane K.S. (2013): Field-level sublethal effects of approved bee hive chemicals on honey bees (*Apis mellifera* L.). *PLOS ONE*, 8(10): e76536
35. Wallner K. (1999): Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*, 30: 235–248.
36. Mullin C. A., Frazier M., Frazier J. L., Ashcraft S., Simonds R., Pettis J. S. (2010): High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLOS ONE*, 5(3): e9754.
37. Milani N. (1999): The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie*, 30: 229–234.
38. Pilling E.D., Jepson P.C. (1993): Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pesticide Science*, 39: 293–297.
39. Smirle M.J., Winston M.L. (1987): Intercolony variation in pesticide detoxification by the honey bee (Hymenoptera: *Apidae*). *Journal of Economic Entomology*, 80(1): 5–8.

40. Wahl O., Ulm K. (1983): Influence of pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*. *Oecologia*, 59(1): 106–128.
41. Fluri P., Lüscher M., Wille H., Gerig L. (1982): Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *Journal Insect Physiology*, 28: 61-68.
42. Seeley T., Visscher P. (1985): Survival of honeybees in cold climates: the critical timing of colony growth and reproduction. *Ecological Entomology*, 10: 81-88.
43. Mattila H.R., Harris J.L., Otis G.W. (2001): Timing of production of winter bees in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Insectes Sociaux*, 48: 88-93.
44. Nicolson S.W. (2011): Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, 46: 197-204.
45. Phillips E.F., Demuth G.S. (1914): Temperature of the honeybee cluster in winter. *Bulletin of the U.S. Department of Agriculture*, 93: 1-16.
46. Robinson G.E. (1992): Regulation of division of labor in insect societies. *Annual Review of Entomology*, 37: 637-665.
47. Brodschneider R., Crailsheim K. (2010): Nutrition and health in honey bees *Apidologie*, 41: 278-294.
48. Doke M.A., Frazier M., Grozinger C.M. (2015): Overwintering honey bees: biology and management *Current Opinion in Insect Science*, 10: 185-193.
49. Rortaisa A., Arnolda G., Halmb M-P. and Touffet-Briensb F. (2005): Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, 36(1): 71-83.
50. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 485/2013 z dnia 24 maja 2013 r. zmieniające rozporządzenie wykonawcze (UE) nr 540/2011 w odniesieniu do warunków zatwierdzania substancji czynnych: klotianidyna, tiametoksam i imidachlopyrd oraz zabraniające stosowania i sprzedaży nasion zaprawionych środkami ochrony roślin zawierającymi te substancje czynne.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Od początku pracy naukowej, którą rozpocząłam w 1989 roku w Zakładzie Pszczelnictwa ówczesnego Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach, a następnie od 2003 roku kontynuowałam także w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach, koncentrowałam się przede wszystkim na tematyce badawczej dotyczącej zdrowia rodzin pszczeł, w szczególności na zagadnieniach związanych z diagnostyką, profilaktyką i terapią chorób pszczoł. Do chwili obecnej uczestniczyłam w realizacji 34. tematów badawczych podjętych w ramach działalności statutowej. W 12. zadaniach pełniłam funkcję kierownika. Ponadto brałam udział w realizacji trzech międzynarodowych projektów

badawczych pełniąc w dwóch z nich rolę krajowego koordynatora merytorycznego, natomiast w trzecim, kierownika. Brałam także udział w pięciu krajowych projektach grantowych, w trzech jako kierownik. Kierowałam realizacją zakończonego zadania badawczego Programu Wieloletniego PIWet-PIB „Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego” w latach 2009-2013, a obecnie sprawuje nadzór merytoryczny nad kolejnym zadaniem Programu Wieloletniego na lata 2014-2018. Kierowałam także dwoma projektami realizowanymi we współpracy z naukowcami z innych ośrodków oraz z przedsiębiorcami. Szczegółowy wykaz tematów badawczych i projektów grantowych przedstawiłam w załączniku nr 3, natomiast problematykę, której dotyczyły, przedstawiłam według zagadnień pogrupowanych tematycznie.

Nosemoza

Nosemoza jest chorobą przewodu pokarmowego dorosłych pszczoł, której czynnikiem etiologicznym są mikrosporydia z rodzaju *Nosema* pasożytujące w komórkach nabłonka jelita środkowego. Zagadnienia związane z rozpoznawaniem i terapią nosemozy były głównym przedmiotem moich badań już w pierwszym okresie pracy naukowej. Rozpoznanie choroby polegało wówczas na stwierdzeniu pod mikroskopem optycznym obecności spor *N. apis* (jedyne, znany w tym okresie, gatunek patogenny dla pszczoły miodnej) w tkankach i treści przewodu pokarmowego pszczoł. Duża dowolność co do rodzaju próbki (pszczoły żywe z gniazda lub martwe z dna ula) i sposobu jej analizy (zbiorczo lub indywidualne) skłoniła mnie do podjęcia badań, które miały na celu wskazanie najbardziej miarodajnej metody diagnozowania infekcji. Efektem wykonanej pracy było stwierdzenie wysoko istotnej, dodatniej korelacji pomiędzy średnią liczbą spor/pszczołę (sposób wyrażenia wyniku przy badaniu pszczoł zbiorczo), a procentem zakażonych owadów (sposób wyrażenia wyniku przy indywidualnym badaniu pszczoł z próbki). Zależność ta została wykazana zarówno przy badaniu żywych jak i martwych próbek pszczoł. Obydwa sposoby badania zostały uznane za porównywalne i przydatne do określenia poziomu infekcji *N. apis*. Ponadto wykazałam, że poziom zakażenia żywych pszczoł pobranych z gniazda oraz martwych pszczoł zebranych z dennicy różni się istotnie i nie jest ze sobą skorelowany. Stanowiło to podstawę do wnioskowania, że ocenę rzeczywistego poziomu zakażenia rodzin pszczelich sporami *N. apis* po okresie zimowania powinno przeprowadzać się w oparciu o badanie próbek żywych pszczoł z gniazda, a nie jak dotychczas zalecano,

próbek osypu. Wnioski płynące z tej pracy wykorzystałam w dalszych badaniach dotyczących efektywności leczenia nosemozy.

Terapia chorób pszczół z wykorzystaniem preparatów leczniczych aplikowanych rodzinom pszczelim nastręcza zdecydowanie więcej trudności w porównaniu do leczenia większości gatunków zwierząt utrzymywanych przez człowieka. Obecność tysięcy owadów w pojedynczej rodzinie pszczelej uniemożliwia indywidualną aplikację ściśle określonej dawki leku chorym osobnikom. Nośnikiem leków podawanych drogą pokarmową jest najczęściej syrop cukrowy wlewany do podkarmiaczek znajdujących się wewnątrz uli. Ten sposób zalecany był między innymi przy podawaniu antybiotyku fumagiliny rodzinom pszczelim zakażonym przez *N. apis*. Szczyt rozwoju nosemozy, przypadający na okres zimy i wczesnej wiosny, determinował termin wykonywania zabiegów leczniczych. Jednak w naszych warunkach klimatycznych, ze względu na niskie temperatury panujące o tej porze roku, rodziny pszczele niechętnie wybierają pokarm podany w podkarmiaczkach gniazdowych. Negatywnym aspektem zastosowania syropu cukrowego jako nośnika fumagiliny był również fakt, że antybiotyk ten dość długo utrzymuje swoją aktywność w zapasach utworzonych z leczniczego syropu cukrowego, co grozi skażeniem pierwszego miodu towarowego. Podawanie wiosną fumagiliny w większych ilościach syropu cukrowego jest niekorzystne bowiem zwiększa koszt utrzymania pasieki. Ze względu na szerokie rozprzestrzenienie się nosemozy, mało skuteczna terapia antybiotykowa stwarzała poważny problem w środowisku pszczelarskim. Celem moich badań było określenie przydatności jako nośnika fumagiliny, innych postaci pokarmu cukrowego i sposobów ich podawania podczas wiosennego leczenia nosemozy pszczół. Podstawą tej oceny była szybkość ich pobierania i rozprzestrzeniania się w rodzinach pszczelich oraz skuteczność terapeutyczna. Spośród pokarmów węglowodanowych pobieranych przez pszczoły przetestowałam: syrop cukrowy podawany w podkarmiaczkach górnych i bocznych oraz w oprysku, cukier puder podany w podkarmiaczkach ramkowych, w postaci płytek lukrowych i w formie opylania oraz w cukier kryształ podany w podkarmiaczkach górnych. Wszystkie rodzaje pokarmu zostały zabarwione barwnikiem organicznym - błękitem metylenowym, dobrze uwidaczniającym się w treści przewodu pokarmowego pszczół. Umożliwiło to śledzenie szybkości pobierania i rozprzestrzeniania się pokarmów w rodzinach pszczelich, w trakcie całego okresu podawania leczniczych pokarmów, na podstawie zabarwienia wypreparowanych przewodów pokarmowych

pszczół robotnic oraz określenia odsetka pszczół, które spożyły pokarm. Ocenę skuteczności zabiegów leczniczych oceniłam na podstawie porównania poziomu infekcji przed leczeniem oraz po upływie jednego i trzech tygodni od jego zakończenia. Najlepsze rezultaty uzyskałam przy opylaniu rodzin pszczelich cukrem pudrem. Już po upływie jednej doby od jego podania, blisko 95% pszczół miało wybarwione przewody pokarmowe. W czasie dwutygodniowego okresu aplikacji spożywało go średnio 80% robotnic. Zastosowanie jako nośnika dla fumagiliny, cukru pudru w formie opylania pszczół oraz syropu cukrowego w formie oprysku zapewniło najwyższą skuteczność zabiegów leczniczych, pozwalającą na obniżenie początkowego poziomu infekcji *N. apis* o odpowiednio 95% i 93%. Wyniki wykonanych przeze mnie badań wskazały najbardziej efektywne metody podawania fumagiliny i chociaż stosowanie tego antybiotyku jest aktualnie zabronione, to mogą być one wykorzystane w terapii innych jednostek chorobowych wymagających podania leku drogą pokarmową. Zwieńczeniem opisanych badań była praca doktorska pt. „Skuteczność leczenia nosemozy pszczół fumagiliną podawaną w różnych postaciach pokarmu węglowodanowego”, której promotorem była Pani dr hab. Zofia Konopacka. Praca została wyróżniona i nagrodzona przez Radę Naukową ówczesnego Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach.

Wyniki badań prowadzonych w tym okresie zostały opublikowane w następujących recenzowanych czasopismach:

1. **Pohorecka K.**, Muszyńska J. (1996): Comparison of different methods to measure the infestation level of wintering honeybee colonies by the spores of *Nosema apis* Z.. Pszczelnicze Zeszyty Naukowe, 40: 129-139.
2. **Pohorecka K.** (1999): Wpływ rodzaju i sposobu podawania leczniczych pokarmów cukrowych na ich pobieranie i rozprzestrzenianie się w rodzinach pszczelich. Pszczelnicze Zeszyty Naukowe, 43(1): 79-93
3. **Pohorecka K.** (1999): Skuteczność leczenia nosemozy pszczół fumagiliną podawaną w różnych postaciach pokarmu węglowodanowego. Pszczelnicze Zeszyty Naukowe, 43(1): 133-155

Wyniki badań z tego obszaru były także prezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych w postaci doniesień ustnych lub plakatowych:

1. **Pohorecka K.**, Muszyńska J. (1996): Comparison of different methods for evaluation of *Nosema apis* infestation in overwintering honeybee colonies. III Polsko-Niemieckie Symposium „Die Honigbiene und Bienenhaltung im dicht besiedelten Mitteleuropa”, Olsztyn

2. **Pohorecka K.** (1997): Wyniki badań nad rozprzestrzenianiem się pokarmu cukrowego wraz z fumagiliną w rodzinie pszczołej w zależności od jego postaci i sposobu aplikacji. XXXIV Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
3. **Pohorecka K.** (1999): Wpływ sposobu podawania preparatu Fumagilin DCH na jego skuteczność terapeutyczną przy zwalczaniu nosemozy pszczoł. XXXVI Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
4. **Pohorecka K.** (1999): Wpływ rodzaju i sposobu podawania leczniczych pokarmów cukrowych na ich pobieranie i rozprzestrzenianie się w rodzinach pszczelich. XV Naukowa Konferencja „Warroza pszczoł i gospodarka pasieczna”, Olsztyn

Problematyka inwazji *Varroa destructor*

V. destructor jest zewnętrznym pasożytem form rozwojowych i dorosłych osobników pszczoły miodnej (*Apis mellifera* L.), i stanowi największe zagrożenie dla tego gatunku pszczoł. Do zachowania prawidłowej kondycji i produktywności rodzin konieczne są coroczne zbiegi lecznicze. Od chwili pojawienia się roztoczy w rodzinach pszczoły miodnej, badania poświęcone temu pasożytowi, a w szczególności metodom ograniczenia jego inwazji, są uznawane za priorytetowe. Tematyka ta była przedmiotem mojego zainteresowania na przestrzeni całego okresu pracy naukowej, a badania z tego zakresu rozpoczęłam od udziału w grancie Komitetu Badań Naukowych pt. „Badania nad odpornością pszczoł na warrozę”. Nadrzędnym celem projektu było poszukiwanie uwarunkowanych genetycznie cech, świadczących o aktywnej walce z roztoczami *V. destructor* określonych ras i linii pszczoł, wskazujących możliwość selekcji w kierunku zwiększenia odporności na inwazję pasożyta. Obserwacjom podlegały dwie cechy mające związek z odpornością, czyli długość trwania okresu czerwiu zasklepionego i stopień uszkodzania przez pszczoły samic *V. destructor*, u pszczoł kilku linii rasy kraińskiej i kaukaskiej. Obydwie cechy okazały się uwarunkowane genetycznie co oznacza, że selekcja w kierunku skrócenia okresu czerwiu zasklepionego i aktywnego uszkodzania roztoczy przez pszczoły jest możliwa. W wyniku obserwacji, dwie linie pszczoły kraińskiej wyróżniające się krótszym okresem czerwiu zasklepionego zostały zakwalifikowane do dalszych prac selekcyjnych.

Drugi obszar badań, miał na celu zwiększenie asortymentu krajowych preparatów warroabójczych. W latach 1992-1994 uczestniczyłam w badaniach realizowanych wspólnie z Instytutem Przemysłu Organicznego w Warszawie oraz krajowym przedsiębiorstwem zajmującym się produkcją preparatów weterynaryjnych, których celem było opracowanie preparatu leczniczego z fluwarolem jako substancją czynną. W ciągu trzech lat oceniona została skuteczność warroabójcza kilku postaci

preparatu, różniących się dawką substancji aktywnej, rodzajem nośnika (syntetyczny lub drewniany) i sposobem przygotowania (inkorporacja substancji czynnej w tworzywo paska lub nanoszenie na powierzchnię). Badania te doprowadziły do opracowania ostatecznej postaci preparatu, wdrożonego do produkcji w 1995 roku pod handlową nazwą Fluwarol. W tym samym zespole badawczym, w kolejnych latach brałam udział w przedrejestracyjnych badaniach klinicznych, podczas których oceniana była skuteczność warroabójcza różnych wersji technologicznych nowego preparatu weterynaryjnego z bromfenvinfosem. Efektem wykonanych badań była rejestracja leczniczego preparatu weterynaryjnego pod nazwą Apifos (w 1999 roku). Niestety brak oznaczonego maksymalnego limitu pozostałości bromfenvinfos w miodzie (MLP) był przyczyną wycofania preparatu z obrotu po uzyskaniu przez Polskę członkostwa w UE. Z tego względu producent preparatu podjął starania zmierzające do opracowania nowej wersji technologicznej leku oraz przeprowadzenia procesu rejestracji zgodnie z aktualnie obowiązującymi przepisami. W ramach dalszej współpracy, wykorzystując zdobytą wiedzę i doświadczenie w prowadzeniu badań klinicznych, opracowałam dwa projekty badań: „Badania pilotowe potwierdzające dawkę oraz skuteczność warroabójczą przyszłego produktu leczniczego Apifos” oraz „Potwierdzenie skuteczności warroabójczej i bezpieczeństwa stosowania przyszłego produktu leczniczego Apifos”, a także 16 procedur stosowanych przy przeprowadzaniu i raportowaniu badań. Zostały one zgłoszone do Centralnej Ewidencji Badań Klinicznych Weterynaryjnych i zostały pozytywnie zaopiniowane przez Ministra Zdrowia. W obydwu projektach brałam udział nie tylko w charakterze badacza, ale także koordynatora, ponieważ badania były wykonywane w trzech różnych ośrodkach naukowych. W ramach prowadzonych badań sprawdzałam działanie warroabójcze różnych dawek substancji czynnej oraz wpływ warunków klimatycznych i stanu biologicznego rodziny pszczelej na efektywność zabiegów leczniczych. Badania doprowadziły do stworzenia nowej wersji preparatu o udokumentowanej, wysokiej skuteczności, bezpiecznego dla rodzin pszczelich. Opracowane przez mnie raporty z badań zostały przyjęte przez Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych.

Introdukcja roztoczy *Varroa* do krajowych pasiek nastąpiła na początku lat osiemdziesiątych, a zatem w naszym regionie zabiegi zwalczania roztoczy wykonywane są przez około 35 lat. Stwarza to wysokie ryzyko powstawania populacji roztoczy

opornych na preparaty zawierające w swoim składzie syntetyczne związki chemiczne. Jednym ze sposobów, tak istotnej dla pszczelarzy, kontroli oporności roztoczy jest terenowa (pasieczna) ocena skuteczności warroabójczej akarycydów dostępnych na rynku. Badania z tego zakresu prowadzę od 2004 roku oceniając sukcesywnie skuteczność leczniczych preparatów weterynaryjnych zarejestrowanych w kraju. W grupie ocenianych preparatów znalazły się środki o działaniu kontaktowym, aplikowane w postaci pasków (nazwa handlowa: Apitraz, Biowar, Biowar 500, składnik aktywny amitraza; nazwa handlowa Bayvarol, składnik aktywny flumetryna) oraz przeznaczone do fumigacji (nazwa handlowa Apiwarol, składnik aktywny amitraza). Wykazanie zbyt niskiej i zróżnicowanej skuteczności terapeutycznej Apitrazu i Biowaru doprowadziło do zastąpienia obydwu leków, preparatem o zwiększonej ilości składnika aktywnego. Badania ostatniej wersji technologicznej Biowaru (500 mg amitraz/pasek) oraz Bayvarolu potwierdziły wysoką (powyżej 90%) skuteczność warroabójczą obydwu preparatów, pomimo wieloletniej aplikacji do rodzin pszczelich zawartych w nich substancji aktywnych.

Bardzo istotny aspekt praktyczny mają ostatnie badania, przeprowadzone przy współpracy z Zakładem Pszczelnictwa IO, a poświęcone ocenie efektywności terapeutycznej Apiwarolu (Biowet Puławy), preparatu najczęściej stosowanego przez polskich pszczelarzy. Zgodnie z zaleceniami producenta najlepsze efekty terapeutyczne uzyskuje się odymiając rodziny wiosną i jesienią, przy jak najmniejszej ilości zasklepionego czerwiu. Jednak w wielu pasiekach zwalczanie inwazji roztoczy odbywa się głównie w miesiącach letnich, dla których producent nie określił schematu wykonywania i efektywności zabiegów. Jest to przyczyną dużej dowolności aplikacji leku, często skutkującej niedostatecznym ograniczeniem populacji pasożyta. Z tego względu zaplanowałam badania mające na celu ocenę skuteczności Apiwarolu w zależności od stanu biologicznego rodzin, liczby i częstotliwości zabiegów oraz metody aplikacji leku. W rezultacie określony został poziom skuteczności pojedynczych zabiegów odymiania wykonanych w rodzinach z czerwem, o zróżnicowanej populacji pszczół, w różnych odstępach czasu, przy użyciu dwóch metod spalania tabletek (bezpośrednio w ulu i przy pomocy odymiacza elektrycznego). Ustalono ponadto, że w rodzinach bez czerwiu odsetek zniszczonych pasożytów jest bardzo wysoki, co w dalszym ciągu gwarantuje obniżenie populacji *V. destructor* do poziomu bezpiecznego dla rodzin pszczelich. Uzyskane wyniki umożliwiają pszczelarzom prawidłowe

wykonanie zabiegów w różnych porach sezonu oraz korygują opinię tych hodowców, którzy przyczyny niskiej skuteczności preparatu w rodzinach z czerwem upatrują w powstaniu populacji roztoczy opornych na amitraz.

Ocena efektywności warroabójczej innych, oferowanych pszczelarzom preparatów czy substancji (np. kwasy organiczne) także dostarcza informacji istotnych dla środowiska pszczelarskiego. Dlatego przedmiotem moich badań było także określenie wpływu aplikacji (w różnych porach sezonu, – rodziny z czerwem i bez czerwem, przy różnej liczbie zabiegów) roztworu kwasu szczawiowego w syropie cukrowym oraz preparatu BeeVital Hive Clean na roztocze *V. destructor* i kondycję rodzin pszczelich. Hop Guard (BetaTec Hop Products™) jest jednym z ostatnio opracowanych preparatów roślinnych, którego składnikiem czynnym są beta- kwasy ekstrahowane z chmielu. Zapowiadane na połowę 2015 roku, zakończenie procesu rejestracji preparatu w Europie skłoniło mnie do sprawdzenia jego skuteczności w warunkach krajowych. Przeprowadzone badania wykazały bardzo niską efektywność aplikacji wykonanej latem (wysychanie pasków), natomiast jesienią populacja roztoczy została obniżona średnio o około 65%.

Badania nad występowaniem populacji *V. destructor* opornych na akarycydy realizowałam także w warunkach laboratoryjnych. Uwzględniłam w nich dwie substancje, najdłużej i najczęściej stosowane w krajowych pasiekach. Szacowanie wrażliwości roztoczy na amitrazę wykonałam metodą Faucon'a i wsp. (1996) w modyfikacji własnej, natomiast do oznaczenia wrażliwości pasożytów na flumetrynę wykorzystałam metodę Milaniego (1995) oraz Milaniego i Vedova (1996). Badane populacje *V. destructor* pochodziły z rodzin leczonych przez co najmniej 5 kolejnych lat preparatami zawierającymi amitrazę (Apiwarol, Biowar) lub syntetyczne pyretroidy (Bayvarol) oraz z rodzin, w których te substancje nie były stosowane w podobnym okresie. W efekcie ustalono, iż długoletnie stosowanie amitrazy spowodowało spadek wrażliwości roztoczy, przejawiający się wydłużeniem czasu (maksymalnie o 5 godzin), po którym pasożyty mające kontakt z preparatem ginęły (Lethal Time – LT₅₀). Nie stwierdzono natomiast populacji roztoczy całkowicie opornych na amitrazę. Wrażliwość badanych populacji roztoczy na flumetrynę, mierzona wartością jej stężenia powodującego śmierć pasożytów (Lethal Concentration - LC₅₀ LC₉₅) była na podobnym poziomie niezależnie od rodzaju substancji warroabójczych stosowanych dotychczas w pasiekach.

Wyniki badań prowadzonych w tym okresie zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach :

1. Konopacka Z., Bieńkowska M., **Pohorecka K.** (1996): Duration of the post capping period in several populations of *Apis mellifera carnica* and *Apis mellifera caucasica*. Pszczelnicze Zeszyty Naukowe, 40: 243-245
2. **Pohorecka K.**, Bober A. (2007): Oporność *V. destructor* na najczęściej stosowane akarycydy. Medycyna Weterynaryjna, 63(8): 904-908
3. Semkiw P., Skubida P., **Pohorecka K.** (2013): The amitraz strips efficacy in control of *Varroa destructor* after many years application of amitraz in apiaries. Journal of Apicultural Science, 57 (1): 107-121

Wyniki były także prezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych w postaci doniesień ustnych lub plakatowych:

1. Konopacka Z., Bieńkowska M., **Pohorecka K.**, Śledziński B. (1994): Skuteczność warroabójcza różnych dawek fluwalinatu inkorporowanego w paski plastikowe i nanoszonego na deseczki drewniane. XI Naukowa Konferencja „Warroza pszczoł i gospodarka pasieczna”, Olsztyn
2. Konopacka Z., **Pohorecka K.**, Bieńkowska M. (1994): Porównanie dwóch metod oceny skuteczności preparatów zawierających fluwalinat. XI Naukowa Konferencja „Warroza pszczoł i gospodarka pasieczna”, Olsztyn, 1994
3. Konopacka Z., Bieńkowska M., **Pohorecka K.**, Śledziński B. (1994): Skuteczność warroabójcza fluwalinatu w zależności od dawki, rodzaju nośnika stałego i sposobu przygotowania preparatu w formie pasków. XXXI Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
4. Konopacka Z., **Pohorecka K.**, Bieńkowska M. (1994): Porównanie dwóch metod oceny skuteczności preparatów zawierających fluwalinat. XXXI Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
5. Konopacka Z., Bieńkowska M., **Pohorecka K.**, Śledziński B. (1995) Varroacidal efficacy of fluvalinate as affected by dose, type of carrier and carrier preparation. XXXIth International Apicultural Congress of Apimondia, Lozanna, Szwajcaria
6. **Pohorecka K.**, Konopacka Z. (1995): Comparison of two methods to assess the efficacy of varroacidal formulas of the 3rd generation. XXXIth International Apicultural Congress of Apimondia, Lozanna, Szwajcaria
7. Konopacka Z., Bieńkowska M., **Pohorecka K.** (1996): Zellverdeckelungsdauer bei einigen Populationen von *Apis mellifera carnica* und *Apis mellifera caucasica*. III Polnisch-Deutsches Symposium „Die Honigbiene und Bienenhaltung im dicht besiedelten Mitteleuropa”, Olsztyn
8. Konopacka Z., Bieńkowska M., **Pohorecka K.**, Śledziński B., Cieślak L. (1997): Skuteczność Apifosu – eksperymentalnego preparatu warroabójczego. XIII Naukowa Konferencja „Warroza pszczoł i gospodarka pasieczna”, Olsztyn
9. Konopacka Z., Bieńkowska M., **Pohorecka K.** (1997): Wyniki badań nad długością okresu czerwiu zasklepionego i uszkodzaniem samic *Varroa jacobsoni* u pszczoł rasy kraińskich i kaukaskich. XXXIV Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
10. Bieńkowska M., **Pohorecka K.**, Gerula D., Szymula J., Panasiuk B. (2005): Ocena terenowej skuteczności warroabójczej preparatów Biowar i Apitraz. XLII Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy

11. **Pohorecka K.**, Bieńkowska M., Gerula D., Semkiw P., Skubida P. (2006): Wpływ czynników biologicznych na skuteczność przeciw warrozą preparatu Biowar. XLIII Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
12. Londzin W., **Pohorecka K.**, Chuda Mickiewicz B. (2007): Skuteczność Biowaru i wybranych leków warroabójczych na podstawie badań terenowych przeprowadzonych w roku 2006. XLIV Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
13. **Pohorecka K.**, Bober A. (2008): Porównanie wrażliwości na amitraz populacji *Varroa destructor* pochodzących z pasiek leczonych amitrazem i fluwalinatem. XLV Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
14. Semkiw P., **Pohorecka K.**, Skubida P. (2008): Skuteczność warroabójcza Biowaru, Baywarolu i kwasu szczawiowego w badaniach terenowych, w 2007 roku. XLV Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
15. **Pohorecka K.**, Węgrzynowicz P., Gerula D., Panasiuk B. (2009): Beevital Hive Clean - wpływ na *V. destructor* i rodzinę pszczelą. XLVI Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
16. **Pohorecka K.**, Skubida P., Semkiw P. (2009): Skuteczność warroobójcza preparatu Biowar w odniesieniu do stanu rodziny pszczelej i czynników zewnętrznych. XLVI Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
17. **Pohorecka K.**, Bober A., Skubida M., Zdańska D. (2010): Susceptibility of *V. destructor* to synthetic pyrethroids after many years of their application in Polish apiaries. 4th European Conference of Apidology "EurBee", Ankara, Turcja
18. **Pohorecka K.**, Bober A., Skubida M., Zdańska D. (2010): Ocena wrażliwości *Varroa destructor* na syntetyczne pyretroidy. XLVII Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
19. **Pohorecka K.**, Skubida P., Semkiw P. (2015) HopGuard - nadzieja czy rozczarowanie? 52 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
20. **Pohorecka K.**, Skubida P., Semkiw P. (2015): Efektywność zwalczania roztoczy *Varroa destructor* preparatem Apiwarol w obecności czerwiu. 52 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
21. **Pohorecka K.**, Skubida P., Semkiw P. (2016): Określenie czynników wpływających na efektywność warroabójczą preparatu Apiwarol, 53 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy

Grzybica otorbielakowa

Grzybica otorbielakowa (wapienna) jest chorobą czerwiu pszczelego, której czynnikiem etiologicznym jest otorbielak pszczeli - *Ascosphaera apis*. W wyniku znaczącej redukcji ilości zdrowego czerwiu dochodzi do zmniejszenia populacji pszczół i obniżenia produktywności rodzin. Choroba odnotowywana jest w większości regionów świata, przy czym w polskich pasiekach występuje periodycznie, z różnym nasileniem. Za czynnik stymulujący rozwój grzybicy wapiennej uważa się spadek odporności czerwiu pszczelego spowodowany obecnością *V. destructor* i immunosupresyjnym oddziaływaniem powszechnie stosowanych akarycydów. Badania, w których jako jeden z wykonawców starałam się uzyskać odpowiedź na pytanie, czy w zakażeniu mieszanym

istnieje korelacja pomiędzy nasileniem inwazji roztoczy *Varroa*, a rozwojem infekcji *A. apis*, dowiodły braku wzajemnych zależności pomiędzy rozwojem obydwu chorób.

Charakterystycznym objawem grzybicy jest obecność z mumifikowanego czerwiu o białym, biało-szarym lub ciemnoszarym zabarwieniu w plastrach, na dnie uli lub przed wylotami, co sprawia, że zdiagnozowanie choroby możliwe jest w trakcie przeglądu rodziny. Wskazanie metody szacowania stopnia porażenia czerwiu w warunkach pasiecznych było celem kolejnych badań, w których brałam udział. Metoda uwzględniająca obserwację czerwiu obecnego w komórkach plastrów okazała się mało dokładna. W plastrach widoczne były bowiem tylko te zmarłe larwy, które zostały już odsklepione przez pszczoły, ale jeszcze nie usunięte z komórek. Wykazano, że przy szacowaniu stopnia porażenia należy uwzględnić co najmniej dwa miejsca gromadzenia się z mumifikowanych larw – plastry i dno uli, a w miarę możliwości także poławiacze założone na wyloty uli.

W okresie prowadzenia przeze mnie badań nad grzybicą wapienną, preferowanym sposobem walki z tą chorobą było łączenie zabiegów sanitarno-hodowlanych z chemioterapią. Jednym z zalecanych wówczas antybiotyków była Nystatyna, która *in vitro* silnie hamowała rozwój *A. apis*., natomiast podanie antybiotyku rodzinom ograniczało rozwój infekcji, ale rzadko prowadziło do całkowitego wyleczenia. Dla sprawdzenia hipotezy, że przyczyną niskiej efektywności antybiotykoterapii jest nieodpowiedni pokarm (syrop) stosowany jako nośnik leku, przetestowano podawanie nystatyny w innych rodzajach pokarmu, m.in. w cieście pyłkowym i miodowo-cukrowym. Obydwa wymienione sposoby podawania leku okazały się bardziej skuteczne, aczkolwiek odsetek rodzin, w których objawy choroby ustąpiły, nie różnił się istotnie od udziału zdrowych rodzin, w grupie otrzymującej nystatynę wraz z syropem. Efekt terapeutyczny zależał także od nasilenia infekcji, wśród rodzin o niskim poziomie zakażenia *A. apis*, odsetek rodzin, który uległ całkowitemu wyleczeniu był znacznie wyższy. Pomimo, iż obecnie brak jest leczniczych preparatów weterynaryjnych dopuszczonych do leczenia grzybicy otorbielakowej, to wyniki dotyczące przydatności poszczególnych pokarmów przy podawaniu leków w terapii chorób czerwiu i pszczół mają charakter uniwersalny i mogą być wykorzystane także przy aplikacji innych, dozwolonych obecnie preparatów.

W ramach obszaru badawczego dotyczącego zwalczania grzybicy wapiennej oceniałam także efektywność podawania rodzinom pszczelim syntetycznego tymolu,

połączonego z zabiegami sanitarno-hodowlanych (usuwanie plastrów z chorym czerwem, usuwanie zмумifikowanego czerwiu z dna uli, wymiana matek pszczelich). Stwierdziłam, że podanie tymolu powoduje ograniczenie rozwoju choroby jedynie w rodzinach o niskim stopniu zakażenia *A. apis*, przy czym najlepsze rezultaty uzyskuje się łącząc aplikację tymolu z wymianą matek pszczelich. Ponadto, wykazałam w warunkach laboratoryjnych, grzybostatyczne i grzybobójcze właściwości biobójczego preparatu „Cagrosept”, wskazujące na możliwość wykorzystania tego środka do dezynfekcji sprzętu pszczelarskiego.

Wyniki przedstawionych badań zostały opublikowane w następujących recenzowanych czasopismach:

1. Bieńkowska M., **Pohorecka K.**, Konopacka Z. (1996): Preliminary investigations on the relationship between Varroa and chalk brood infestations in honeybee colonies. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 40: 271-272
2. Bieńkowska M., **Pohorecka K.** (1998): Comparison of several methods to define the infection rate of honey bee colonies with chalk brood. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 42: 11-12
3. Konopacka Z., **Pohorecka K.**, Bieńkowska M. (1999): Leczenie grzybicy otorbielakowej z zastosowaniem różnych sposobów aplikacji leku przeciwwgrzybiczego. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 43: 119-133
4. **Pohorecka K.** Skubida P. (2000): An evaluation of the disinfectant value of „Cagrosept” in controlling chalkbrood. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 44: 141-147

Wyniki były prezentowane na konferencjach krajowych i międzynarodowych w postaci doniesień ustnych lub plakatowych:

1. Bieńkowska M., **Pohorecka K.**, Konopacka Z. (1996): Ermittlung des Zusammenhangs zwischen Varroatose – und Kalkbrutbefall in Bienenvölker. III Polnisch-Deutsches Symposium „ Die Honigbiene und Bienenhaltung im dicht besiedelten Mitteleuropa”, Olsztyn
2. Konopacka Z., **Pohorecka K.**, Bieńkowska M. (1999): Próba leczenia grzybicy otorbielakowej przy zastosowaniu różnych sposobów aplikacji wybranego leku przeciwwgrzybiczego. XV Naukowa Konferencja „Warroza pszczół i gospodarka pasieczna”, Olsztyn
3. **Pohorecka K.**, Skubida P. (2000): The assessment of the potential of „Cagrosept” – a disinfecting formula in the prevention and treatment of bee diseases. First European Scientific Apicultural Conference, Puławy
4. **Pohorecka K.** (2003): Influence of the hygienic procedures on the increase of efficacy of controlling the chalk brood disease (*Ascosphaera apis*) in honeybee colonies (*Apis mellifera* L.) by using synthetic thymol. XXXVIIIth International Apicultural Congress of APIMONDIA, Lubljana, Słowenia

Zastosowanie ziół w pszczelarstwie

Rośliny zielarskie, dzięki zawartości licznych substancji biologicznie czynnych, charakteryzują się wielokierunkowym działaniem farmakologicznym i są z powodzeniem stosowane w medycynie. Wzrost zainteresowania wykorzystaniem preparatów roślinnych w swoistej i nieswoistej profilaktyce chorób pszczół, w dużej mierze spowodowany został wycofaniem większości preparatów weterynaryjnych (w tym antybiotyku – fumagiliny) z leczenia rodzin pszczelich. Stanowiło to przesłankę do podjęcia przeze mnie badań nad możliwością wzbogacenia diety węglowodanowej pszczół ekstraktami roślin leczniczych w celu poprawy ich kondycji. Pszczoły robotnice otrzymywały w warunkach laboratoryjnych syrop cukrowy z dodatkiem standaryzowanego wyciągu z mniszka pospolitego (*Taraxacum officinale*), jeżówki wąskolistnej (*Echinacea angustifolia*), pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica*), nagietka lekarskiego (*Calandula officinalis*), babki lancetowatej (*Plantago lanceolata*) oraz arniki górskiej (*Arnica montana*). Ocenianymi wskaźnikami stanu fizjologicznego pszczół były gruczoły gardzielowe, ciało tłuszczowe, odczyn jelita środkowego oraz ogólna masa ciała. Najbardziej obiecujące wyniki uzyskałam po 20. dniowym okresie podawania pszczołom syropu z pokrzywy zwyczajnej oraz jeżówki wąskolistnej. Syrop wzbogacony dodatkiem obydwu ekstraktów był chętnie pobierany przez robotnice i miał korzystny wpływ na stan ich gruczołów gardzielowych oraz ciała tłuszczowego.

Podjęłam także próbę wykorzystania standaryzowanego wyciągu z bylicy piołunu (*Artemisia absinthium* L.) w leczeniu nosemozy. Pszczoły, zakażone w sposób naturalny i sztuczny sporami *N. apis*, były karmione w warunkach laboratoryjnych syropem z dodatkiem różnych ilości tego ekstraktu. W obydwu grupach nastąpiło obniżenie poziomu zakażenia świadczące o zahamowaniu infekcji. Efektywność podawania w pokarmie cukrowym określonej laboratoryjnie dawki wyciągu z bylicy piołunu rodzinom zakażonym *N. apis* została oceniona w warunkach pasiecznych. Pozytywne rezultaty były podstawą opracowania oferty wdrożeniowej dla pszczelarzy praktyków.

Wyniki opublikowano w następujących recenzowanych czasopismach :

1. **Pohorecka K.** (2004): Effect of standardized plant herb extracts on general condition of the honeybee (*Apis mellifera* L.). Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 48: 415-419

2. **Pohorecka K.** (2004): Laboratory studies on the effect of standardized *Artemisia absinthium* L. extract on *Nosema apis* infection in the worker *Apis mellifera* L. Journal of Apicultural Science, 48: 131-136

Wyniki w postaci doniesień ustnych lub plakatowych przedstawiano także na krajowych i międzynarodowych konferencjach:

1. **Pohorecka K.**, Skubida. P., Teper D. (2002): Assessment of the potential herb extracts fed to honey bees to improve their general condition – a preliminary study. Apimondia Symposium “Preventing residues in honey”, Celle, Niemcy.
2. **Pohorecka K.**, Skubida P. (2002): Ocena możliwości podawania pszczołom wyciągów roślin leczniczych dla poprawy ich stanu ogólnego. XXXIX Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
3. **Pohorecka K.** (2004): Wpływ standaryzowanego ekstraktu z piołunu (*Artemisia absinthium* L.) na rozwój pierwotniaka *Nosema apis*. XLI Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy

Diagnostyka laboratoryjna chorób pszczoł

Po rozwiązaniu Zakładu Chorób Owadów Użytkowych PIWet-PIB w Swarzędzu, w 2003 roku powierzono mi stworzenie od podstaw jednostki odpowiedzialnej za prowadzenie prac z zakresu ochrony zdrowia pszczoł, we wszystkich obszarach działalności PIWet PIB tj. badawczo-rozwojowej, referencyjnej i usługowej. W początkowym okresie wiązało się to przede wszystkim ze stworzeniem technicznych i merytorycznych podstaw funkcjonowania zakładu oraz wdrożeniem obowiązującego w Instytucie systemu zarządzania. Priorytetowymi były badania zmierzające do opracowania metod diagnostyki trzech referencyjnych jednostek chorobowych pszczoł. Z tego względu, jako pierwsze, opracowałam, walidowałam, a następnie wdrożyłam do praktyki laboratoryjnej, metody wyrywania czynnika etiologicznego zgnilca amerykańskiego i europejskiego pszczoł oraz warrozy w kilku matrycach (stadia rozwojowe - czerw, pszczoły, materiał środowiskowy z ula). Opracowane w formie procedur badawczych metody diagnostyki wymienionych jednostek uzyskały akredytację Polskiego Centrum Akredytacji natomiast Zakład Chorób Pszczoł uzyskał statusu Krajowego Laboratorium Referencyjnego właściwego dla prowadzenia badań w kierunku rozpoznawania zgnilca amerykańskiego, zgnilca europejskiego i warrozy. Wiąże się to ze stałą realizacją zadań umożliwiających utrzymanie gotowości do przeprowadzenia badań odwoławczych, nadzorowania i koordynowania prac wszystkich urzędowych laboratoriów Zakładów Higieny Weterynaryjnej oraz udzielania im merytorycznej pomocy przybierającej formę szkoleń, badań biegłości, wizyt kontrolnych, instrukcji. Opracowane przeze mnie instrukcje laboratoryjnej diagnostyki

AFB, EFB i warrozy zostały przez Głównego Lekarza Weterynarii wdrożone w laboratoriach ZHW w 2006 roku, a w znowelizowanej wersji, w 2016. Badania mające na celu poszerzenie możliwości diagnostycznych zakładu, polegające na opracowywaniu laboratoryjnych metod rozpoznawania kolejnych jednostek chorobowych pszczół z wykorzystaniem nowych technik diagnostycznych (RT-PCR, Real Time PCR), są jednym z głównych obszarów mojej aktualnej działalności naukowej. Efekty badań z zakresu diagnostyki laboratoryjnej (procedury badawcze) są wykorzystywane przy realizacji projektów naukowych, a także gwarantują pszczelarzom dostęp do szerokiego zakresu wysokiej jakości usług w zakresie rozpoznawania chorób pszczół.

Dotychczasowym efektem badań realizowanych w ramach tego obszaru (poza procedurami badawczymi) są następujące komunikaty kongresowe i konferencyjne:

1. Zdańska D., **Pohorecka K.**, Skubida M., Bober A. (2011): Optimalization and application of a multiplex RT-PCR for simultaneous detection of Acute bee paralysis virus (ABPV) and Deformed wing virus (DWV) in Polish samples of the honey bee (*Apis mellifera* L.). 5th Annual Meeting EPIZONE „Science on alert”, Arnhem, Holandia
2. Skubida M., **Pohorecka K.**, Bober A., Zdańska D. (2013): Diagnostyka choroby woreczkowej pszczół z wykorzystaniem metody RT-PCR. 50. Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
3. Zdańska D., Rzeżutka A., **Pohorecka K.** (2016): Opracowanie metody multiplex RT-PCR do diagnostyki infekcji pszczół powodowanych przez pikornawirusy i wirusa chronicznego paraliżu pszczół, 53 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
4. Zdańska D., Rzeżutka A., **Pohorecka K.** (2016): Development of a multiplex RT-PCR method for detection of infections caused by dicistroviruses of honey bees. Kongres PTNW, Lublin
5. Zdańska D., Rzeżutka A., **Pohorecka K.** (2017): Zastosowanie kontroli wewnętrznej amplifikacji (IAC) w diagnostyce molekularnej chorób wirusowych pszczół. 54 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy

Zgnilec amerykański

Zgnilec amerykański (zgnilec złośliwy, ang. american foulbrood – AFB) jest zakaźną i wysoce zaraźliwą chorobą stadium larwalnego pszczoły miodnej. Chorobę powodują bakterie *Paenibacillus larvae* (dawniej *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*), które cechuje zdolność do wytwarzania, opornych na temperaturę i działanie większości chemicznych środków dezynfekcyjnych, form przetrwalnikowych – endospor. Pszczoły robotnice, w trakcie usuwania zmarłego czerwiu z komórek plastrów, stają się nosicielkami bakterii (dorosłe owady nie są wrażliwe na zakażenie), powodując ich rozprzestrzenianie w obrębie całego środowiska wewnętrznego ula, a także pomiędzy rodzinami czy pasiekami. Badania laboratoryjne dorosłych pszczół lub produktów

pszczelich, a w szczególności zapasów pokarmu, pozwalają wykryć subkliniczną formę zakażenia. Poziom zanieczyszczenia miodu bakteriami *P. larvae* pozwala z dużym prawdopodobieństwem ocenić ryzyko rozwoju choroby. Zgnilec amerykański jest chorobą zwalczaną z urzędu, ale ustawowy obowiązek zgłaszania podejrzenia rozwoju choroby do Inspekcji Weterynaryjnej jest niedopełniany przez wielu pszczelarzy dlatego obraz sytuacji epizootycznej AFB, rysujący się na podstawie danych Głównego Inspektoratu Weterynarii (średnio około 50 ognisk choroby rocznie w latach 2000-2004), uznaje się za mocno odbiegający od rzeczywistej sytuacji. Całkowity brak danych na temat rozprzestrzenienia *P. larvae* w krajowych pasiekach skłonił mnie do zainicjowania badań rzucających więcej światła na to zagadnienie. Pierwszy etap stanowiły badania wstępne. W latach 2005 i 2007przebadanych zostało 242 próbki pobrane z miodu dostępnego w handlu (1 próbka miodu/pasiekę), z czego pozytywnych okazało się 23%. Uzyskane wyniki potwierdziły celowość podjęcia znacznie szerszych badań przesiewowych, opracowanych metodycznie w zakresie pobierania prób, pozwalających uzyskać miarodajną ocenę ryzyka rozwoju AFB w krajowych pasiekach. Badanie te okazały się być możliwe do realizacji w ramach Programu Wieloletniego PIWet-PIB „Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego” 2009-2013. Badaniami zostały objęte pasieki stacjonujące na terenie wszystkich 16 województw, po około 10% pasiek zarejestrowanych na terenie każdego z powiatów należących administracyjnie do trzech kolejnych województw w ciągu każdego roku (w roku 2013 badania wykonano na terenie 4 województw). Materiał do badań stanowiły zapasy pokarmu zgromadzone w plastrach rodzin pszczelich. W skali całego kraju przebadano ogółem 12236 zbiorczych próbek miodu pobranych z 4090 pasiek, stanowiących blisko 10% wszystkich zarejestrowanych w kraju pasiek. Obecność bakterii *P. larvae* wykryto w około 38% pasiek. Wysoki poziom zakażenia rodzin pszczelich, stwarzający wysokie ryzyko rozwoju zgnilca amerykańskiego, odnotowano w 12,5% pasiek. Analiza pięcioletnich wyników badań wykazała istotne zróżnicowanie sytuacji epizootycznej zakażenia *P. larvae* na terenie poszczególnych województw. Szczególnie wysokie ryzyko wystąpienia AFB stwierdzono w regionie południowej i południowo-wschodniej części kraju oraz na mniejszym obszarze, w Polsce północnej. Na południu zagrożony obszar rozciągał się wzdłuż trzech sąsiadujących województw (małopolskiego podkarpackiego i lubelskiego), przy czym najgorszą sytuację stwierdzono w województwie małopolskim, gdzie bakterie *P. larvae* wykryto w próbkach pochodzących z 71,3% przebadanych

pasiek. Drugi, znajdujący się na północy rejon kraju, gdzie ryzyko rozwoju okazało się wysokie, należał do województwa warmińsko-mazurskiego. Na tym terenie zarodniki *P. larvae* wykryto w blisko 60% pasiek. Uzyskane wyniki dostarczyły pierwszych, tak dokładnych, danych na temat występowania czynnika etiologicznego AFB, wskazując na obszary szczególnie zagrożone rozwojem choroby. Zestawienie ich z danymi Głównego Inspektoratu Weterynarii potwierdziło hipotezę, że większość przypadków choroby pozostaje nie rozpoznana lub nie zgłoszona przez właścicieli pasiek. Na podkreślenie zasługuje także praktyczny aspekt badań, gdyż wyniki przekazywane były na bieżąco właścicielom pasiek i Inspekcji Weterynaryjnej, co pozwalało wdrażać kompleksowe działania, skutkujące ograniczeniem zarówno dalszego rozprzestrzeniania się czynnika zakaźnego, jak i rozwoju choroby w wielu pasiekach.

W ramach problematyki dotyczącej AFB zajmowałam się także zagadnieniami związanymi ze zwalczaniem tej choroby, wykazując stosunkowo niską efektywność zabiegów higieniczno-hodowlanych, które stanowią alternatywę dla metody polegającej na radykalnym zniszczeniu chorych pni. Brałam również aktywny udział w opracowaniu projektu rozporządzenia w sprawie zwalczania zgnilca amerykańskiego pszczół, (obowiązującego od 2016 r.).

Dotychczasowym efektem badań realizowanych w ramach tej tematyki są następujące publikacje w czasopismach z listy JCR:

1. **Pohorecka K.**, Bober A. (2008): Occurrence of *Paenibacillus larvae* spores in honey samples from domestic apiaries. *Journal of Apicultural Science*, 52(2): 105-111
2. **Pohorecka K.**, Skubida M., Bober A., Zdańska D. (2012): Screening of *Paenibacillus larvae* spores in apiaries from eastern Poland. Nationwide survey Part I. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 56(4): 539-545

- oraz doniesienia kongresowe i konferencyjne:

1. **Pohorecka K.** (2005): Detection method of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* infections by samples honey and adult honeybee analysis. XXXIXth International Apicultural Congress of APIMONDIA, Dublin, Irlandia
2. **Pohorecka K.** (2005): Możliwości wykrywania obecności endospor *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* w rodzinach pszczelich na podstawie badania prób miodu i pszczół. XLII Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
3. **Pohorecka K.**, Gerula D., Bieńkowska M., Panasiuk B. (2006): Effect of sanitizing and curative treatments on the infestation of bee colonies by the spores of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Second European Conference of Apidology "EurBee", Praga, Czechy

4. **Pohorecka K.**, Gerula D., Bieńkowska M., Panasiuk B. (2006) Wpływ postępowania sanitarno-leczniczego na zakażenie rodzin pszczelich sporami *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. XLIII Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
5. **Pohorecka K.**, Bober A. (2008): Ocena ryzyka rozwoju zgnilca amerykańskiego w pasiekach na podstawie badania prób miodu – badania wstępne. XLV Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
6. **Pohorecka K.**, Bober A., Skubida M., Zdańska D. (2010): Sytuacja epizootyczna zgnilca amerykańskiego w pasiekach południowo - wschodniego regionu Polski. Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
7. **Pohorecka K.**, Skubida M., Bober A., Zdańska D. (2011): Występowanie bakterii *Paenibacillus larvae* w próbkach miodu pobranych z pasiek województwa mazowieckiego, podlaskiego i warmińsko-mazurskiego. XLVIII Naukowa Konferencja Pszczelarska, Pszczyna
8. Skubida M., **Pohorecka K.**, Bober A., Zdańska D. (2012): Prewalencja *Paenibacillus larvae* w pasiekach 9. regionów administracyjnych Polski. XLIX Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
9. Skubida M., **Pohorecka K.**, Bober A., Zdańska D. (2013): Badania przesiewowe pasiek centralnej Polski na obecność *Paenibacillus larvae*. 50. Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
10. Skubida M., **Pohorecka K.**, Bober A., Zdańska D. (2014): Analiza wyników 5-letniej oceny rozprzestrzenienia bakterii *Paenibacillus larvae* w krajowych pasiekach. 51 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Szczyrk
11. Skubida M., **Pohorecka K.**, Bober A., Zdańska D. (2017): Identyfikacja genotypowa szczepów *Paenibacillus larvae* izolowanych z krajowych pasiek przy wykorzystaniu metody ERIC-PCR. 54 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy

Monitorowanie stanu zdrowotnego rodzin pszczelich w krajowych pasiekach

Aktywny nadzór nad zdrowiem pszczół w krajowych pasiekach rozpoczął się w roku 2012 realizacją dwóch, następujących po sobie w kolejnych latach, międzynarodowych projektów, koordynowanych przez laboratorium referencyjne Unii Europejskiej ds. zdrowia pszczół (EURL, ANSES, Francja) pod wspólnym tytułem „Epidemiological surveillance of the honey bee health in Europe,” akronim EPILOBEE. Udział w tym przedsięwzięciu uwarunkowany był opracowaniem przez każde z państw członkowskich UE krajowego projektu (na bazie ogólnych wytycznych EURL), a następnie zaakceptowaniem go przez KE. Jako jeden z koordynatorów merytorycznych, brałam czynny udział w przygotowaniu obydwu krajowych projektów we współpracy z Głównym Lekarzem Weterynarii. Zadaniem obydwu programów było uzyskanie poprawy w zakresie dostępności do danych na temat sytuacji zdrowotnej pszczół na terenie UE w zakresie śmiertelności rodzin pszczelich i występowania niektórych, uznanych za najgroźniejsze, patogenów pszczelich. W każdym roku aktywnym nadzorem objętych było po 190 pasiek (ponad 3000 rodzin) z województwa lubelskiego. Wyniki badań laboratoryjnych, materiału pozyskanego z tych pasiek, zostały przekazane

zostały Inspekcji Weterynaryjnej i wprowadzone do bazy danych laboratorium referencyjnego UE. Końcowym efektem realizacji obydwu projektów były obszerne raporty na temat stanu zdrowia pszczół w Europie, zawierające wielokierunkową analizę strat rodzin pszczelich oraz sytuacji epizootycznej chorób pszczół w krajach UE objętych badaniami, które zostały przekazane Komisji Europejskiej.

Od 2014 roku badania nad stanem zdrowia pszczół w Polsce prowadzone są w znacznie szerszym zakresie terytorialnym i tematycznym, w ramach kierowanego przeze mnie zadania pt. „Monitorowanie stanu zdrowotnego i strat rodzin pszczelich w krajowych pasiekach” Programu Wieloletniego PIWet-PIB na lata 2014 – 2018 pt. „Ochrona zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego”. Kluczowym celem zadania, podjętego z myślą o aktywnym wspieraniu pszczelarzy w obszarze szeroko pojętej problematyki zdrowia pszczół, jest monitorowanie poziomu strat rodzin pszczelich w krajowych pasiekach oraz występowania czynników biotycznych i abiotycznych w powiązaniu z analizą warunków środowiskowych i metod prowadzenia gospodarki pasiecznej. We wszystkich województwach zostaje objętych nadzorem po 25 pasiek rocznie, przy czym w kolejnych latach są to pasieki zlokalizowane na terenie nowych powiatów. W skali kraju, w każdym cyklu rocznym nadzorowanych jest zatem 400 pasiek i około 1500 rodzin. Pasieki objęte badaniami są dwukrotnie wizytowane przez lekarzy weterynarii, w sposób zgodny z opracowaną przez PIWet-PIB instrukcją. Każda wizyta kontrolna składa się z wywiadu lekarsko-weterynaryjnego, badania klinicznego podejrzanych o chorobę i/lub losowo wybranych, zdrowych rodzin oraz pobrania próbek do badań laboratoryjnych. Diagnostyka laboratoryjna obejmuje ocenę występowania i intensywności inwazji roztoczy *V. destructor* oraz infekcji mikrosporydiami z rodzaju *Nosema* (łącznie z diagnostyką różnicową gatunków *N. apis* i *N. ceranae*), a także ocenę rozprzestrzenienia wirusów: zdeformowanych skrzydeł (DWV), ostrego i chronicznego paraliżu pszczół (ABPV i CBPV), choroby woreczkowej (SBV), czarnych mateczników (BQCV), izraelskiego wirusa paraliżu pszczół, oraz chorób bakteryjnych (AFB i EFB). Ocena toksykologicznego zagrożenia dla zdrowia rodzin pszczelich realizowana jest poprzez monitorowanie pozostałości pestycydów w środowisku ulowym (pierzga) i pszczołach (analizy toksykologiczne wykonuje Zakład Farmakologii i Toksykologii).

Program pozwala zatem na pozyskanie kompleksowej wiedzy na temat skali strat rodzin pszczelich w sezonie produkcyjnym i podczas zimowania, sytuacji epizootycznej

mikroorganizmów i pasożytów patogennych dla pszczół oraz sytuacji toksykologicznej (ekspozycja rodzin pszczelich na pozostałości pestycydów, diagnostyka ostrych i chronicznych przypadków zatruć pszczół), w odniesieniu do określonych warunków środowiskowych wraz z uwzględnieniem wielu zagadnień z zakresu gospodarki pasiecznej (np. metod i efektywności zwalczania inwazji *V. destructor*). Wyniki badań są bezpośrednio przekazywane pszczelarzom biorącym udział w programie, właściwym Powiatowym Lekarzom Weterynarii, a w formie rocznych sprawozdań, organom administracji rządowej. Na bazie uzyskiwanych wyników pszczelarze mogą korygować metody prowadzenia rodzin pszczelich w kierunku poprawy ich stanu zdrowotnego.

Analizując poziom strat rodzin pszczelich na przestrzeni trzech lat badań, można stwierdzić, zarysowującą tendencję naprzemiennego (w latach), wzrostu i spadku śmiertelności rodzin pszczelich. Analogiczna fluktuacja poziomu inwazji roztoczy *Varroa* (wysoki poziom inwazji oraz wysoka przewalencja wirusów, których wektorem są roztocze, w próbkach pszczół pobranych przed okresem zimowania w latach charakteryzujących się wysoką śmiertelnością rodzin pszczelich), pozwala wnioskować, że w dalszym ciągu te patogeny mają kluczowy wpływ na wielkość upadków rodzin pszczelich. Mikrosporydia z rodzaju *Nosema* stwierdza się w ponad połowie badanych rodzin. Spośród dwóch obecnie identyfikowanych gatunków dominującym jest w dalszym ciągu *N. ceranae*, a przebieg infekcji ma charakter sezonowy (podobnie jak w przypadku *N. apis*). Wśród diagnozowanych infekcji wirusowych najbardziej rozpowszechniony jest BQCV, DWV i SBV. Obecność pozostałych wirusów stwierdza się w istotnie mniejszej liczbie badanych rodzin i pasiek. Znacznie rzadziej diagnozowane są także choroby bakteryjne czerwii.

Dotychczasowym efektem badań realizowanych w ramach tego obszaru są następujące publikacje w czasopismach z listy JCR.

1. Topolska G., Gajda A., **Pohorecka K.**, Bober A., Kasprzak S., Skubida M., Semkiw P. (2010): Winter colony losses in Poland. *Journal of Apiculture Research*, 49(1): 126-128
2. **Pohorecka K.**, Zdańska D., Bober A., Skubida M. (2011): First detection of Israeli acute paralysis virus (IAPV) in Poland and phylogenetic analysis of the isolates. *Journal of Apicultural Science*, 56(2): 149-159
3. EPILOBEE Consortium (... **Pohorecka K.**...) Chauzat, MP., Jacques, A. et al. (2016): Risk indicators affecting honeybee colony survival in Europe: one year of surveillance. *Apidologie*, 47(3): 348-378
4. Jacques A., Laurent M., EPILOBEE Consortium (... **Pohorecka K.** ...), Ribière-Chabert M., Saussac M., Bougeard S., et al. (2017): A pan-European epidemiological study

reveals honey bee colony survival depends on beekeeper education and disease control. PLoS ONE, 12(3): e0172591.

5. Kiljanek T., Niewiadowska A., Gawęł M., Semeniuk S., Borzęcka M., Posyniak A., **Pohorecka K.** (2017): Multiple pesticide residues in live and poisoned honeybees – Preliminary exposure assessment. Chemosphere, 175: 36-44

Dotychczasowym efektem badań realizowanych w ramach tego obszaru są następujące komunikaty konferencyjne:

1. Zdańska D., **Pohorecka K.**, Skubida M., Bober A. (2011): Pierwsze doniesienie na temat izolacji i identyfikacji polskich szczepów izraelskiego wirusa ostrego paraliżu pszczoł. XLVIII Naukowa Konferencja Pszczelarska, Pszczyna
2. Zdańska D., **Pohorecka K.**, Bober A., Skubida M. (2013): Określenie zmienności genetycznej szczepów DWV (Deformed Wing Virus) oraz ABPV (Acute Bee Paralysis Virus) izolowanych z krajowych pasiek. 50. Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
3. Zdańska D., **Pohorecka K.**, Bober A., Skubida M. (2014): Viral infections in honey bee queens from Polish apiaries. 6th European Conference of Apidologie "EurBee", Murcia, Hiszpania
4. Skubida M., **Pohorecka K.**, Bober A., Zdańska D. (2013): Preliminary studies on the occurrence of sacbrood virus of the honeybee in Poland. XLIII International Apicultural Congress of APIMONDIA, Kijów, Ukraina
5. Zdańska D., **Pohorecka K.**, Bober A., Skubida M. (2013): Genetic diversity among Polish isolates of Acute bee paralysis virus. XLIII International Apicultural Congress of APIMONDIA, Kijów, Ukraina
6. Bober A., **Pohorecka K.**, Skubida M., Zdańska D. (2013): Krajowy program nadzoru nad stratami rodzin pszczelich. 50. Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
7. Bober A., **Pohorecka K.**, Skubida M., Zdańska D. (2014): Program mający na celu wykrycie występowania określonych czynników zakaźnych wywołujących straty w rodzinach pszczelich na obszarze województwa lubelskiego w latach 2012 – 2013. 51 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Szczyrk
8. Zdańska D., **Pohorecka K.**, Bober A., Skubida M. (2014): Infekcje wirusowe matek pszczelich pochodzących z krajowych pasiek. 51 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Szczyrk
9. **Pohorecka K.**, Skubida M., Zdańska D., Bober A. (2015): Monitoring stanu zdrowotnego rodzin pszczelich w krajowych pasiekach (2014 r.). 52 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
10. Skubida M., **Pohorecka K.**, Bober A., Zdańska D. (2015): Zdrowotność pasiek produkujących matki, odkłady i pakiety w świetle wymagań Krajowego Programu Wsparcia Pszczelarstwa 2013/2014. 52 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
11. Kiljanek T., Niewiadowska A., Semeniuk S., Posyniak A., **Pohorecka K.**, Żmudzki J. (2015): Diagnostyka zatruc pszczoł środkami ochrony roślin. 52 Naukowa Konferencja pszczelarska, Puławy
12. **Pohorecka K.**, Skubida M., Bober A., Zdańska D. (2016): Zimowe straty rodzin pszczelich oraz prawdopodobne przyczyny ich wystąpienia, w pasiekach nadzorowanych, w cyklu lato 2014 – wiosna 2015. 53 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy

13. **Pohorecka K.**, Skubida M., Bober A., Zdańska D. (2016): Monitoring zwalczania roztoczy *Varroa destructor* w sezonie 2015 r. 53 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
14. **Pohorecka K.**, Skubida M., Bober A., Zdańska D. (2016): Sezonowa zmienność występowania wybranych, patogennych dla pszczoł mikroorganizmów i pasożytów. 53 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
15. Bober A., **Pohorecka K.**, Skubida M., Zdańska D. (2016): Zdrowotność rodzin pszczelich w Polsce i Europie w świetle wyników programu EPILOBEE (2012 – 2014). 53 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
16. Skubida M., **Pohorecka K.**, Bober A., Zdańska D. (2016): Ocena zdrowotności pasiek produkujących matki, odkłady i pakiety w latach 2014-2015. 53 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
17. Bober A., Zdańska D., Skubida M., **Pohorecka K.** (2017): Charakterystyka molekularna grzybów *Nosema ceranae* występujących w Polsce. 54 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
18. **Pohorecka K.**, Skubida M., Bober A., Zdańska D. (2017): Wpływ materiału diagnostycznego na wyniki wiosennej oceny występowania infekcji wirusowych oraz zakażenia mikrosporydiami z rodzaju *Nosema*. 54 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
19. Skubida M., **Pohorecka K.**, Bober A., Zdańska D. (2017): Identyfikacja genotypowa szczepów *Paenibacillus larvae* izolowanych z krajowych pasiek przy wykorzystaniu metody ERIC-PCR. 54 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
20. Kiljanek T., Niewiadowska A., Gawęł M., Semeniuk S., Borzęcka M., Posyniak A., **Pohorecka K.** (2017): Współczynnik zagrożenia (HQ) jako kryterium oceny wyników badań diagnostycznych pszczoł podejrzanych o zatrucie środkami ochrony roślin. 54 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy

Pozostałości leczniczych preparatów weterynaryjnych w produktach pszczelich

Efektem ubocznym chemioterapii prowadzonej w rodzinach pszczelich jest skażenie pozyskiwanych od nich produktów. Stężenia związków chemicznych przekraczające dopuszczalny maksymalny limit ich pozostałości w miodzie oraz obecność substancji, które nie mogą być podawane pszczołom ze względu na brak ustalonego limitu, stwarzają potencjalne ryzyko dla zdrowia konsumentów tego produktu. Określenie ryzyka i skali skażenia miodu pozyskanego od rodzin, którym podano, obecnie niedozwolony do stosowania, Polisulfamid przy zwalczaniu AFB oraz od rodzin, w których spalano tabletki z amitrazą, było tematem współrealizowanych przeze mnie badań (między innymi w ramach projektu badawczego „Ocena wpływu postępowania pasiecznego na obecność sulfonamidów w miodzie”). W badaniach dotyczących problematyki skażenia miodu sulfonamidami obecność substancji z tej grupy (głównie sulfatiazol, sulfacetamid, sulfametazyna) wykryto w 17% próbek pobranych w latach 2007-2008 z miodu dostępnego na rynku, co świadczy o podawaniu Polisulfamidu rodzinom pszczelim wbrew obowiązującym przepisom. Eksperymentalne

podanie rodzinom pszczelim syropu z dawką leczniczą Polisulfamidu wykazało wysokie ryzyko skażenia miodu sulfonamidami, nawet do 24 miesięcy od aplikacji leku (związek ten był wykrywany w miodzie odwirowanym z rodzin w kolejnych dwóch sezonach).

W badaniach, w których oceniano wpływ sposobu i liczby zabiegów odymiania rodzin preparatem z amitrazą (Apiwarol), w żadnej z analizowanych próbek miodu nie stwierdzono obecności substancji macierzystej, natomiast wykazano obecność jej metabolitów we wszystkich próbkach miodu pobranego z rodni, miodni oraz z miodu odwirowanego. Odsetek próbek zawierających poszczególne metabolity oraz poziom ich zanieczyszczenia był wyższy w wyniku spalania tabletek bezpośrednio w ulach, niż za pośrednictwem odymiacza, co pozwoliło wnioskować, że sposób aplikacji amitrazy rzutuje na ilość substancji aktywnej dostarczanej do środowiska ulowego, a tym samym na efektywność warrozobóczego działania preparatu. W przypadku wykonania odymiania przed odwirowaniem miodu towarowego, przy czterokrotnym powtórzeniu zabiegów metodą tradycyjną istnieje bardzo duże prawdopodobieństwo przekroczenia dopuszczalnego limitu pozostałości amitrazy w miodzie obecnym w plastrach.

Dotychczasowym efektem badań realizowanych w ramach tego obszaru są następujące publikacje w czasopismach z listy JCR.

1. Szczęsna T., Rybak-Chmielewska H., Waś E., **Pohorecka K.** (2009): Study on sulphonamide residues in honey. *Journal of Apiculture Science*, 53(2): 39-47
2. Posyniak A., Błądek T., Jażdżewski K., Bober A., Mitrowska K., Żmudzki J., **Pohorecka K.** (2011): The depletion of sulfonamide residues in honey after experimental treatment of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Apicultural Science*, 56(2): 169-175

Dotychczasowym efektem badań realizowanych w ramach tego obszaru są następujące komunikaty konferencyjne:

1. Szczęsna. T, Rybak-Chmielewska H., **Pohorecka K.** (2006): Study on sulfonamide residues in honey. Second European Conference of Apidology "EurBee", Praga, Czechy
2. Szczęsna T., Rybak-Chmielewska H., **Pohorecka K.** (2006): Wstępne badania pozostałości sulfonamidów w miodzie. XLIII Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy
3. Posyniak A., Jażdżewski K., Mitrowska K., **Pohorecka K.**, Bober A., Pietruszka K., Błądek T. (2009): Wstępne wyniki badań nad występowaniem pozostałości sulfonamidów w miodzie po zastosowaniu w warunkach pasiecznych weterynaryjnego produktu leczniczego. XLVI Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy

4. 107. Kiljanek T., **Pohorecka K.**, Antczak M., Skubida P., Semkiw P., Posyniak A. (2016): Pozostałości amitrazy w miodzie pozyskanym z rodzin pszczelich leczonych Apiwarolem, 53 Naukowa Konferencja Pszczelarska, Puławy

Pozostałe tematy badawcze

Podczas swojej wieloletniej pracy brałam również czynny udział w realizacji zagadnień dotyczących chowu i hodowli pszczół, mających wpływ na kondycję, rozwój i produktywność rodzin pszczelich, i chociaż z problematyką ochrony zdrowia związane były pośrednio, to stanowiły istotne uzupełnienie mojej wiedzy z zakresu pszczelnictwa. Między innymi:

- uczestniczyłam w badaniach, podczas których stwierdzono korzystny wpływ dodatku cukru do nasienia przechowywanego w kapilarach na liczbę plemników w zbiorniczkach nasiennych matek sztucznie unasienionych, zwiększający efektywność tego zabiegu;
- brałam udział w pracach, które pozwoliły na określenie optymalnych metod poddawania matek pszczelich przy zastosowaniu różnych typów klateczek oraz mateczników;
- uczestniczyłam w badaniach, podczas których określono rodzaj poławiaczy pyłkowych pozwalających zwiększyć ilość obnóży pyłkowych pozyskiwanych od rodzin;
- realizowałam badania, których efektem było wskazanie postępowania umożliwiającego uzyskanie od rodzin utworzonych z odkładów, miodu towarowego w tym samym sezonie pasiecznym;
- brałam udział w badaniach, które wykazały brak wpływu obecności miodu spadziowego w zapasach zimowych na rozprzestrzenienie i poziom zakażenia mikrosporydiami z rodzaju *Nosema* w rodzin pszczelich stacjonujących w regionach występowania spadzi iglastej.
- uczestniczyłam w pracy, w której wykazano przekroczenie, dopuszczonego normą branżową, poziomu skażenia metalami ciężkimi obnóży pyłkowych pozyskiwanych od rodzin stacjonujących w okolicach Puław, świadczące o wysokim zanieczyszczeniu środowiska naturalnego tego regionu.

Efektom badań realizowanych w ramach tego obszaru są następujące publikacje: Konopacka Z., **Pohorecka K.**, Syrocka K., Chaber J. (1993): Zawartość kadmu, ołowiu, azotanów i azotynów w obnóżach pyłkowych pochodzących z różnych miejsc w okolicach Puław. Pszczelnicze Zeszyty Naukowe, 37(1): 181-187

1. Konopacka Z., **Pohorecka K.** (1995): The activation of the spermatozoon motility by addition of sugar to the semen stored in glass capillaries. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 39: 197-200
2. Bieńkowska M., **Pohorecka K.** (1996): Efekty pozyskiwania pyłku w zależności od wielkości otworów we wkładce strącającej obnóża pyłkowe. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 40: 95-101
3. Skubida P., **Pohorecka K.** (2000): Wpływ stosowania mateczników i klateczek różnych typów na przyjęcie matek w rodzinach pszczelich podczas wymiany. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 44: 231-237
4. Skubida P., **Pohorecka K.** (2000): Wykorzystanie różnych typów klateczek i mateczników do poddawania matek w pasiece. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 44: 85-87
5. **Pohorecka K.**, Skubida P. (2004): Healthfulness of honeybee colonies (*Apis mellifera* L.) wintering on the stores with addition of honeydew honey. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 48: 409-413
6. Skubida P., **Pohorecka K.** (2004): Honey-producing potential of nuclei in the season of their establishment. *Journal of Apicultural Science*, 48: 123-130
7. Skubida P., Semkiw P., **Pohorecka K.** (2008): Stimulative feeding of bees as one factor in preparing colonies for early nectar flows. *Journal of Apicultural Science*, 52(1): 65-73
8. Pidek A., **Pohorecka K.** (2004): Economical aspects of beekeeping in 10 countries ascending to European Union. *Journal of Apicultural Science*, 48: 43-53

Dotychczasowym efektem badań realizowanych w ramach tego obszaru są następujące komunikaty konferencyjne:

1. Konopacka Z., Pohorecka K., Zalewski W. (1992): Zawartość kadmu i ołowiu oraz azotanów i azotynów w obnóżach pyłkowych zbieranych z różnych stanowisk w okolicach Puław. XXIX Naukowa Konferencja Pszczelarska (NKP), Puławy
2. Konopacka Z., **Pohorecka K.** (1994): Motilität von Spermatozoen durch Zugabe von Zucker zu in Kapillaren gelagerten Sperma. II Polnisch-Deutsches Symposium „Auf dem Weg zu einer besseren Biene” Selektion-Zucht-Biologie. Oberursel, Niemcy
3. Skubida P., **Pohorecka K.** (2000): Introducing of honeybee queens in various types of cages. First European Scientific Apicultural Conference, Puławy
4. Skubida P., Pohorecka K. (2000): Wykorzystanie różnych typów klateczek i mateczników do poddawania matek w pasiece. XXXVII NKP, Puławy
5. Skubida P., **Pohorecka K.** (2002): Ocena zdrowotności pasiek w rejonach występowania pożytku spadziowego. XXXIX NKP, Puławy
6. **Pohorecka K.**, Skubida P. (2003): Presence of honeydew honey in stores of wintering honeybee (*Apis mellifera* L.) and their healthfulness. XXXVIIIth International Apicultural Congress of APIMONDIA. Lublana, Słowenia
7. Skubida P., **Pohorecka K.** (2003): Tworzenie odkładów w celu uzyskania od nich miodu towarowego w tym samym sezonie. XL NKP, Puławy
8. Pidek A., **Pohorecka K.** (2004): Economical perspectives for beekeeping in ten countries acceding to the EU. First European Conference of Apidology “EurBee”, Udine, Włochy
9. **Pohorecka K.**, Semkiw P., Skubida P. (2008): Analiza stanu zdrowotnego rodzin pszczelich na podstawie badania prób osypu zimowego. XLV NKP, Puławy
10. **Pohorecka K.**, Skubida P., Semkiw P. (2009): Wyniki badania osypu zimowego w wybranych pasiekach, w 2008 roku. XLVI NKP, Puławy.

6. Podsumowanie dorobku naukowego.

	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Razem
Artykuły z listy JCR (w tym stanowiące osiągnięcie)	-	22 (5)	22
Artykuły z listy MNiSW	7	6	13
Artykuły w opracowaniach monograficznych	1	19	20
Artykuły popularnonaukowe	10	35	45
Doniesienia na konferencje naukowe: międzynarodowe	6	25	31
krajowe	10	70	80
Opracowania zbiorowe, katalogi zbiorów, dokumentacja prac badawczych, ekspertyz, utworów i dzieł artystycznych	-	13	13
Referaty wygłoszone na krajowych konferencjach tematycznych	-	34	34
Łącznie	34	224	258
Pierwszy autor (%)	9 (26,5%)	154 (69%)	163 (63%)
Drugi autor (%)	16 (47%)	52 (23%)	68 (26%)
Trzeci lub kolejny autor	9(26,5%)	18 (8%)	27 (10%)
Artykuły w języku polskim (z listy JCR i MNiSW)	2	5	7
Artykuły w języku angielskim (z listy JCR i MNiSW)	5	23	28
Sumaryczny IF wszystkich prac ¹ (IF prac stanowiących osiągnięcie)	16,899 (3,742)		
Liczba cytowań ² (liczba cytowań prac stanowiących osiągnięcie)	127 (84)		
Suma punktów MNiSW ³ (suma punktów za czasopisma w których opublikowano prace stanowiące osiągnięcie)	420 (100)		
Indeks Hirscha ⁴	6		

^{1,3} Zgodnie z rokiem opublikowania^{2,4} Według kryteriów bazy Web of Science (bez autocytowań)

Załącznik nr 2

Zestawienie oryginalnych (34) i przeglądowych (1) publikacji z listy JCR i pozostałych (z listy MNiSW) z uwzględnieniem wskaźnika Impact Factor, liczby punktów MNiSW oraz liczby cytowań.

Czasopismo	Rok publikacji	Liczba publikacji	Impact Factor	Liczba punktów MNiSW	Liczba wszystkich cytowań w czasopismach z bazy Web of Science
Pszczelnicze Zeszyty Naukowe	1993	1		2	-
	1995	1		2	-
	1996	4		2	-
	1998	1		2	-
	1999	3		2	-
	2000	3		2	1
Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy	2004	2	0,192	10	5
	2012	1	0,377	20	2
Journal of Apicultural Science	2004	3	-	5	6
	2008	2	-	9	6
	2009	1		9	6
	2011	3	0,674	20	28
	2012	1	0,529	20	51
	2013	2	0,817	20	12
	2014	1	1,000	20	6
	2017	1	0,722	20	-
Medycyna Weterynaryjna	2007	1	-	10	-
Journal of Apiculture Research	2010	1	1,028	27	22
Apidologie	2016	1	2,196	40	4
Chemosphere	2017	1	4,208	35	1
PLoS ONE	2017	1	2,806	40	-
Suma		35	16,899	420	150

Szczegółowy wykaz wszystkich opublikowanych prac naukowych i twórczych prac zawodowych oraz wskaźniki dokonań naukowych, a także dorobek dydaktyczny i popularyzatorski oraz informacje o współpracy międzynarodowej zamieściłam w załączniku nr 3.

Leokadia Polowinski