

VSEBNOST KUMAFOSA V VOSKU IN MEDU

Andreja KANDOLF BOROVŠAK¹, Melita ŠEŠERKO²

Izvleček

Skrb za varne in kakovostne čebelje pridelke se začne v primarni proizvodnji, pri čebelarjih. Čebelarji imajo malo vpliva na to, kaj čebele prinesejo v panj. Raziskave kažejo, da med redko vsebuje pesticide in druga onesnaževala iz okolja, medtem ko sta cvetni prah in propolis bolj občutljiva na vplive iz okolja. Največje tveganje za varnost medu predstavljajo akaricidi, ki jih čebelarji vstavljajo v panj za zatiranje varoj. Eden največjih onesnaževal čebeljih pridelkov je kumafos, ki se lahko precej nepredvidljivo širi po panju. Večkrat ko ga uporabimo, več ga imamo v panju, v vosku in celo v medu. Čebele vosek raznesejo po panju, z njim pa kumafos, če je prisoten v njem. Po uporabi Checkmita, ki vsebuje kumafos, tudi vosek proste gradnje in celo voščeni pokrovci, s katerimi je pokrit med v takem satju, lahko vsebujejo kumafos. V raziskavi smo določali razliko v vsebnosti kumafosa v medu in vosku glede na število zatiranj varoj s Checkmitom. Vzorčili smo 25 vzorcev medu, 32 vzorcev voska iz satja in 23 vzorcev voska voščenih pokrovčkov. Uporabili smo LC-MS/MS metodo, meja kvantifikacije za med je bila 0,005 mg/kg, za vosek pa 0,02 mg/kg. Najvišjo vsebnost kumafosa smo našli v vosku voščenih pokrovčkov po dvakratni uporabi Checkmita in je znašala 244 mg/kg, v vosku tega satja 60 mg/kg, med iz tega sata je vseboval 0,207 mg/kg kumafosa.

Ključne besede: kumafos, Checkmite, vosek, med

COUMAPHOS IN WAX AND HONEY

Abstract

Concern for safety and quality of bee products begins in primary production. Beekeepers do not really have control over what the bees bring to the hives, or their control is very small. Acaricides that beekeepers place into the hive represent a higher risk for bee products safety. One of the greatest threats is coumaphos. Coumaphos can quite unpredictably spread throughout the hive. The more we use coumaphos the more of them stay in bee wax and even honey. Bees transmit wax and with it also coumaphos, if it is present, over the hive. After bee treatment with Ccheckmite is also virgin wax and even caps on honey combs contaminated with coumaphos. We determined the difference in the levels of coumaphos in honey wax depending on how many times they were used. 25 samples of honey and 55 wax of different type of combs (brood chamber combs, virgin comb) were analyzed. LC-MS/MS was used, LOQ was 0,005 mg/kg for honey and 0,02 mg/kg for wax. Caps on honey from old combs after using Checkmite two times had the highest values of coumaphos (max 244 mg/kg), wax from that comb had 60 mg/kg of coumaphos and honey from that comb 0,207 mg/kg.

Key words: coumaphos, Checkmite, wax, honey

¹ Mag., svetovalka specialistka na področju varne hrane, Čebelarstva zveza Slovenije, Brdo 8, Lukovica

² Izr. prof. dr., Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani, Gerbičeva 60, Ljubljana

UVOD

Akaricidi so eni zmed največjih onesnažil čebeljih pridelkov, saj se že dolgo uporabljajo za zatiranje varoj (*Varroa destructor*). Za čebelje pridelke predstavljajo največje tveganje akaricidi, ki so topni v maščobah, saj je osnova vsakega panja satje iz voska, kamor čebelja matica leže jajčeca, čebele pa vanj odlagajo med in cvetni prah. Osnovna sestavina voska so estri višjih maščobnih kislin in alkohola, zato so v njih dobro topne snovi, ki se topijo v maščobah.

Lipofilni akaricidi se po uporabi kopičijo v vosku in lahko posledično onesnažijo med. Po zatiranju z akaricidi jih je največ v satih z zalego, manj v medenih satih, sladkorni raztopini (hrani čebel), najmanj pa v medu. Vsebnost akaricidov v medu je navadno nižja, kot je predpisana najvišja mejna vrednost, vendar se kopičijo v vosku. Količina le-teh je odvisna od števila tretiranj z akaricidi. Ostanke v medu je več, če je število tretiranj večje (Bogdanov, 2006).

Eden izmed lipofilnih akaricidov je kumafos, ki je prisoten v zdravih Perizin in Checkmite.

Po evropski uredbi (Uredba Komisije (EU), št. 37/2010, z dne 22. decembra 2009 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora) je lahko v medu največ 0,1 mg/kg kumafosa.

Kumafos je organofosforni pesticid. Problem zatiranja varoj s kumafosom je kopičenje ostankov le tega v vosku. Najdemo ga lahko v medu tudi pri čebelarjih, ki ga niso nikoli uporabljali, saj so lahko že satne osnove onesnažene s kumafosom in iz njih prehaja v satje in v med. Najvišja mejna vrednost za kumafos v vosku ni določena. Že vsebnost 1 ppm kumafosa v vosku pa lahko povzroči pojav le tega v medu (Wallner, 1992). Zanimivo je, da so ostanki kumafosa lahko v novih satnicah kar do 1,7 krat višji, kot v satih iz katerih smo satnice pridobili, saj je v satnicah čisti vosek, v satju pa so tudi druge snovi, v katerih je kumafos manj topen (Bogdanov, 1998).

V Italiji so analizirali vosek iz voščenenih pokrovcev medu iz konvencionalnih čebelarstev in vosek pridobljen ekološkega čebelarstva. V skoraj vseh analiziranih vzorcih so našli nekaj ostankov kumafosa (Kochansky, 2001).

Ko so v panju, v katerem ni bilo starega satja, dali satnice, ki so vsebovale različno količino ostankov kumafosa (0,09-1,57 mg/kg), v satih, ki so bili narejeni na satnicah z majhno koncentracijo kumafosa, niso našli ostankov kumafosa, v satih, ki pa so bili narejeni na satnicah z višjo koncentracijo kumafosa, pa so našli povprečno trikrat nižjo koncentracijo kumafosa, kot je bila prisotna v satnicah. Ko so bili v panju prisotni stari sati s koncentracijo kumafosa 5 mg/kg, so vsi izgrajeni sati vsebovali višjo koncentracijo kumafosa kot satnice. Celo sati narejeni v okvirjih brez

satne osnove, so vsebovali višjo koncentracijo kumafosa kot satnice (Kochansky, 2001).

Nato so naredili še poskus, v katerem so ugotavljali, v kolikšnem času lahko pridelamo vosek brez ostankov kumafosa. Iz voska pokrovčkov, ki je vseboval 1,57 mg/kg kumafosa, so naredili satnice. Po točenju je vosek iz pokrovčkov (druga generacija) vseboval 1/3 začetne vrednosti kumafosa. Ta vosek so uporabili za satnice medišča. Tretja generacija pokrovčkov, ki so jih zbrali v naslednjem letu, ni imela ostankov (Kochansky, 2001).

V konvencionalnem čebelarstvu so ostanke kumafosa našli v 18-tih od 22-tih primerov v vosku iz pokrovčkov in v vseh satih z zalego. V medu, ki je bil nabran v času zatiranja varoj, so po 70 dneh našli 0,05-0,016 mg/kg kumafosa. Vsebnost ostankov je bila po 135 dneh enaka kot po devetih dneh (Kochansky, 2001).

V medu iz interne kontrole medu slovenskega porekla je bilo kumafosa največ v letu 2012, ko je bil zaznan v 52 % vzorcev, v enem vzorcu je vsebnost dosegla mejno vrednost 0,1 mg/kg, dva vzorca, ki sta vsebovala 0,67 mg/kg in 0,73 mg/kg, pa sta se meji nevarno približala (Šešerko, 2012). V naslednjih letih ga je bilo bistveno manj (Kmecl, 2013; 2014; 2015).

Vse notranje površine panja čebele prevlečejo s tankimi plastmi voska. Lipofilne substance imajo veliko afiniteto do teh plasti in lahko posledično prehajajo iz teh plasti v med, propolis, deviški vosek (Wallner, 2003). Tudi vosek iz voščenenih pokrovčkov vsebuje kumafos, kar potrjuje domnevo, da čebele k novo sintetiziranemu vosku dodajo tudi vosek, ki je že v panju (Kochansky, 2001; Noč in sod., 2013; Bogdanov, 2006).

MATERIAL IN METODE

Vzorčenje čebeljih pridelkov

Med in vosek smo vzorčili v čebeljih družinah, naseljenih v AŽ panjih na lokaciji Bled-Golf.

V poskus so bile vključene 4 družine. Vzorčili smo v dveh družinah s konvencionalno prakso, kar pomeni, da se je v preteklosti za zatiranje varoj uporabljal amitraz, v letu 2009 Apivar, v letu 2010 Checkmite, v letu 2011 Apiguard, v letih 2012, 2013, 2014 in 2015 pa smo po navodilih proizvajalcev in veterinarjev uporabili Checkmite. Za zimsko zatiranje varoj se je v zadnjih letih uporabljala oksalna kislina.

Vzorčili smo tudi čebelje pridelke iz rojev, ki smo jih v letu 2013 naselili v nove panje (2 roja) (v nadaljevanju roji). V roje smo vstavili satnice brez ostankov kumafosa. V teh dveh družinah smo v letih 2013, 2014 in 2015 prav

tako po navodilih proizvajalcev in veterinarjev uporabili Checkmite.

Vzorci čebeljih pridelkov smo pridobivali tako iz medišča in plodišča AŽ panja. Med smo vzorčili iz tistega satja, pri katerem smo analizirali akaricide tudi v vosku satja, ugotavljali smo tudi vsebnost ostankov v voščenih pokrovčkih.

Slika 1: Prosta gradnja satja z medom iz katerega smo vzorčili vosek, med in voščene pokrovčke.



Sat z medom smo stisnili, precejali in posneli nečistoče (delčke voska itd.). Vzorčili smo vosek in med iz starega satja, deviškega satja in satja divje gradnje, kar pomeni, da smo v panje dali samo lesene okvirčke brez satnice. Satje iz katerega smo vzorčili med, smo stopili na vodni kopeli, da smo pridobili čisti vosek, brez ostankov čebeljih srajčk in drugih nečistoč. Za zagotovitev homogenosti vzorca, smo staro satje večkrat segrevali na vodni kopeli. Enako smo postopali z voščenimi pokrovčki.

Slika 2: Topljenje voska v vodni kopeli.



Uporabljena analitska metoda za določanje ostankov akaricidov v čebeljih pridelkih

Analize ostankov je opravil ERICo, inštitut za ekološke raziskave.

Aparaturi:

Tekočinski kromatograf 1100, Agilent.

Masni spektrometer API 3000, Sciex, Applied Biosystems.

Standardi:

Coumaphos, Pestanal, kat. št.: 45403, Fluka.

Kolona: Discovery HS C18, 5 cm x 2,1 mm, 3 μ m, kat. št.: 569253-U, Supelco.

Predkolona: SecurityGuardCartridges, C18, 4x3.0 mm, kat. št.: AJO-4287, Phenomenex.

Pretok: 0,3 ml/min.

Postopek:

Zatehtali smo 2 g medu (na pet decimalnih mest natančno), dodali ultra čisto vodo ter aceton. Vzorec smo nato pripravili za analizo: dodali smo topilo, ga stresali, prefiltrirali, posušili pod tokom dušika, ponovno raztopili v mešanici topil in prenesli v vzorčno stekleničko. Vzorec smo injicirali v LC-MS/MS sistem in kvantificirali z metodo umeritvene krivulje. Meja detekcije za kumafos v medu je 0,005 mg/kg, za vosek pa 0,01 mg/kg.

REZULTATI Z RAZPRAVO

Vzorčili smo 25 vzorcev medu, 32 vzorcev voska iz satja in 23 vzorcev voska voščenih pokrovčkov.

Šest vzorcev medu, 11 vzorcev voska satja in sedem vzorcev voska pokrovčkov smo vzorčili iz panjev, v katerih je bil Checkmite enkrat uporabljen. Iz panjev, v katerih je bil Checkmite uporabljen dvakrat, smo vzorčili po pet vzorcev medu, voska satja in voščenih pokrovčkov. Po trikratni uporabi Checkmita smo vzorčili po 11 vzorcev medu in satja ter osem voščenih pokrovčkov. Iz panjev, kjer je bil Checkmite uporabljen štirikrat, smo vzorčili samo en star sat s pokrovčki in medom. Po petkratni uporabi Checkmita pa smo vzorčili dva vzorca medu, štiri vzorce satja in dva vzorca pokrovčkov.

Rezultate prikazujemo glede na pogostost uporabe kumafosa.

Vsebnost kumafosa v vosku in medu

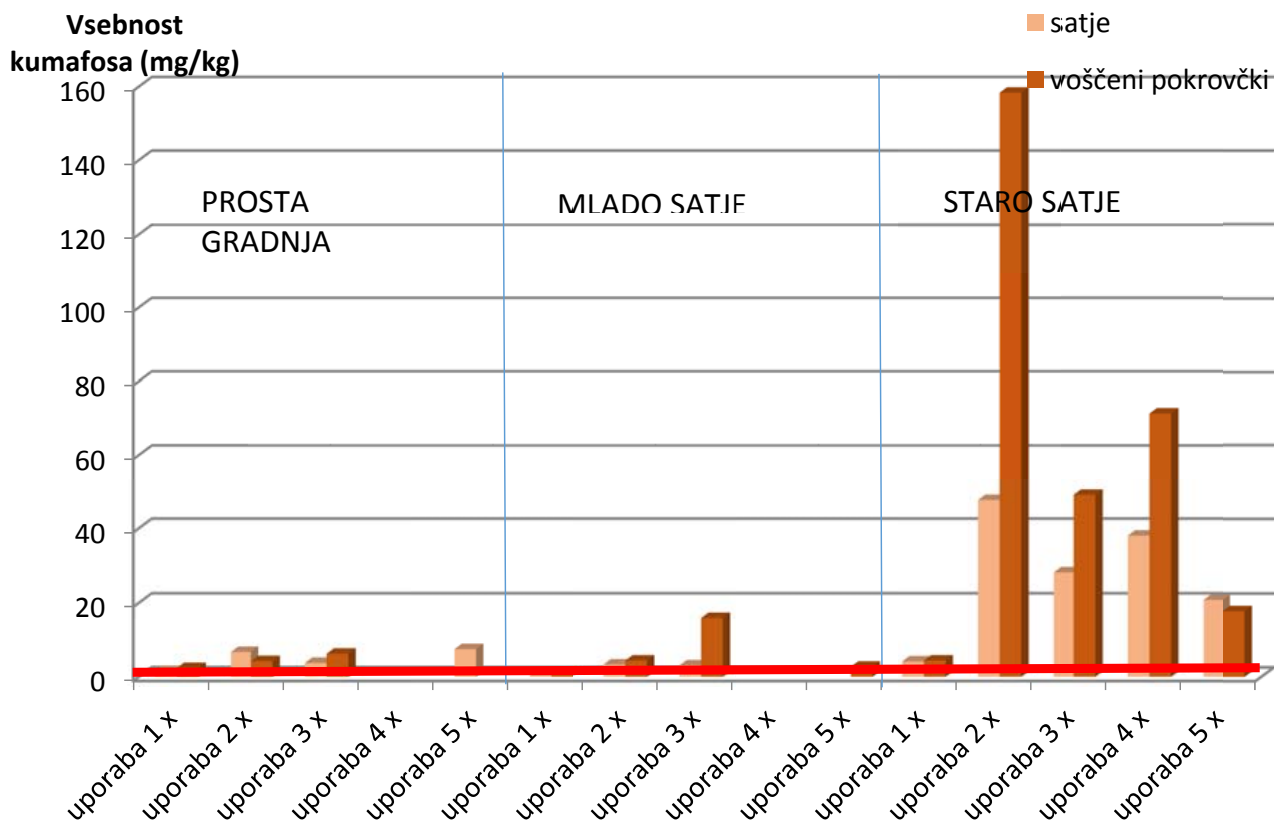
Največ kumafosa (244 mg/kg) smo našli v voščenih pokrovčkih starega satja, ki je bil dvakrat izpostavljen kumafosu, drugo najvišjo vrednost pa v voščenih pokrovčkih

starega satja, ki je bil trikrat izpostavljen Checkmitu. Vsebnosti kumafosa so v vosku proste gradnje in mlade-ga satja, ki v času uporabe zdravil ni prisoten v panju, v primerjavi s starim satjem, ki je izpostavljen zdravilom, bistvena nižje.

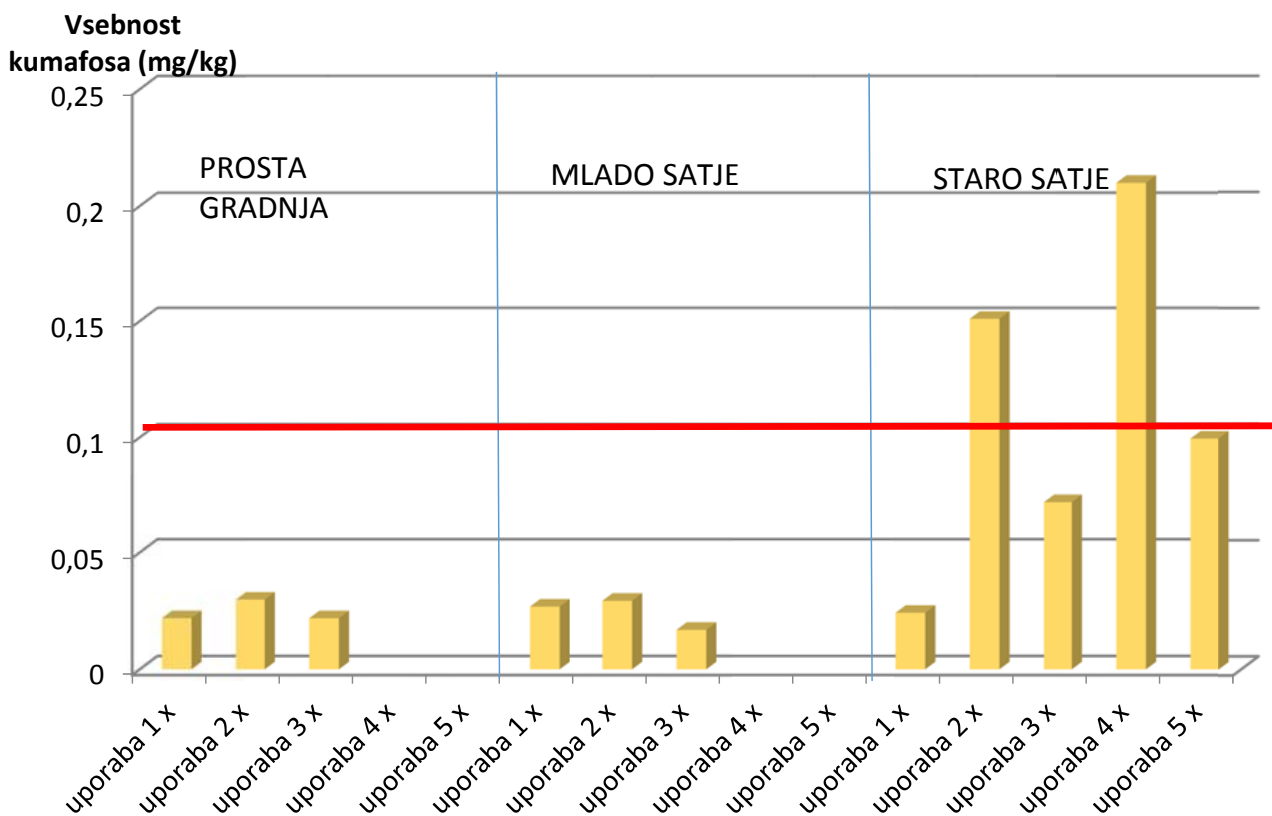
V prosti gradnji smo našli največ kumafosa v vrednosti 10,2 mg/kg v satju po trikratni uporabi Checkmita. V voščeni pokrovčki proste gradnje je bilo po tri in petkratni uporabi nekaj več kot 8 mg/kg kumafosa. Ker satje proste gradnje čebelje družine nerade gradijo, ne moremo reči, da je največ kumafosa v prosti gradnji po trikratni uporabi, saj

Vsebnosti kumafosa v medu in vosku

	N uporabe kumafosa	N	Min (mg/kg)	Max (mg/kg)	Povprečje (mg/kg)	SD
Prosta gradnja	1	2	1,06	2,04	1,55	±0,69
Voščeni pokrovčki proste gradnje	1	1	2,38			
Med prosta gradnja	1	1	0,02			
Prosta gradnja	2	1	6,73			
Voščeni pokrovčki proste gradnje	2	1	4,24			
Med prosta gradnja	2	1	0,03			
Prosta gradnja	3	4	0,14	10,20	3,76	±4,47
Voščeni pokrovčki proste gradnje	3	2	3,89	8,58	6,24	±3,32
Med prosta gradnja	3	3	0,01	0,03	0,02	±0,01
Prosta gradnja	5	2	6,76	8,22	7,49	±1,03
Mlado satje	1	3	< 0,01	0,86	0,48	±0,43
Voščeni pokrovčki mlado satje	1	2	< 0,01	1,96	0,99	±1,38
Med mlado satje	1	2	0,02	0,03	0,03	±0,01
Mlado satje	2	2	3,21	3,46	3,34	±0,18
Voščeni pokrovčki mlado satje	2	2	3,21	5,57	4,39	±1,67
Med mlado satje	2	2	0,02	0,04	0,03	±0,02
Mlado satje	3	2	1,91	4,24	3,08	±1,65
Voščeni pokrovčki mlado satje	3	1	15,90			
Med mlado satje	3	2	0,01	0,02	0,02	±0,01
Voščeni pokrovčki mlado satje	5	1	2,72			
Staro satje	1	6	<0,01	9,23	4,16	±3,43
Voščeni pokrovček staro satje	1	4	<0,01	7,23	4,39	±3,19
Med staro satje	1	3	0,005	0,04	0,02	±0,02
Staro satje	2	2	35,00	60,30	47,65	±17,89
Voščeni pokrovček staro satje	2	2	72,70	244,00	158,35	±121,13
Med staro satje	2	2	0,095	0,21	0,06	±0,05
Staro satje	3	6	0,70	49,70	28,06	±25,06
Voščeni pokrovček staro satje	3	5	8,00	102,00	49,06	±37,56
Med staro satje	3	6	0,02	0,16	0,07	±0,06
Staro satje	4	1	38,00			
Voščeni pokrovček staro satje	4	1	71,30			
Med staro satje	4	1	0,21			
Staro satje	5	2	19,00	22,60	20,80	±2,55
Voščeni pokrovček staro satje	5	1	17,80			
Med staro satje	5	2	0,06	0,14	0,10	±0,06



Povprečne vsebnost kumafosa (mg/kg) v vosku (rdeča črta prikazuje mejo 1 mg/kg, ko naj bi kumafos začel prehajati iz voska v med)



Povprečne vsebnosti kumafosa (mg/kg) v medu (rdeča črta prikazuje najvišjo mejno vrednost za kumafos v medu, glede na Uredbo Komisije (EU), št. 37/2010)

smo po štiri in petkratni uporabi imeli premalo vzorcev. V prosti gradnji smo kumafos našli v vseh vzorcih, najnižja izmerjena vrednost je bila 0,14 mg/kg. Celó po enkratni uporabi je bil prisoten v vrednosti več kot 1 mg/kg, kar je meja za prehod ostankov iz voska v med (Wallner, 1992). V mladem satju smo našli največ kumafosa v voščeni pokrovčki po trikratni uporabi (15,9 mg/kg), tudi v satju ga je bilo največ po trikratni uporabi Checkmita (4,24 mg/kg). Družine, v katerih smo Checkmite uporabljali štiri in petkrat, so bile zelo slabo živalne, kar je lahko posledica pogoste uporabe Checkmita, tako da v njih nismo mogli pridobiti vseh zelenih vzorcev.

V starem satju so bile vrednosti bistveno višje. Po prvem letu uporabe sicer en sat in njegovi pokrovčki niso vsebovali kumafosa, v povprečju pa je po prvem letu bilo 4 mg/kg kumafosa, v naslednjem letu 47 mg/kg, po tri in petkratni uporabi pa 20 mg/kg.

Voščeni pokrovčki imajo navadno več kumafosa kot satje.

V medu je, ne glede na pogostost uporabe v prosti gradnji in mladem satju, med 0,02 in 0,03 mg/kg kumafosa, v starem satju pa vrednosti naraščajo s pogostostjo uporabe. Že po dvakratni uporabi je bila v meja 0,1 mg/kg presežena, v povprečju je bilo 0,151 mg kumafosa/kg. Po trikratni uporabi je bilo v povprečju 0,07 mg/kg (največja vrednost je bila 0,16 mg/kg), po štirikratni uporabi je bilo 0,21 mg/kg, pri čemer smo imeli na voljo samo en vzorec. Po petkratni uporabi pa je bilo v povprečju 0,1 mg kumafosa/kg (največja vrednost je bila 0,14 mg/kg). V medu vsebnost kumafosa narašča. Če pridobivamo med samo iz satja, ki v času uporabe Checkmita ni prisotno v panju, je uporaba Checkmita za pridelavo medu varna, v nasprotnem primeru pa je lahko problematična že po dvakratni uporabi.

ZAKLJUČKI

Ostanki kumafosa ne naraščajo linearno z večkratno uporabo, kljub vsemu pa večkratna uporaba Checkmita pušča ostanke kumafosa, tako v vosku, kot v medu. V satju, ki je med uporabo Checkmita prisotno v panju, je bistveno več kumafosa, kot v satju, ki ga med uporabo Checkmita ni v panju. V medu pridobljenem iz satja, ki je prisotno v panju med uporabo Checkmita, je že po dvakratni uporabi Checkmita, lahko ostankov kumafosa več kot je dovoljeno, medtem ko je točenje medu, iz satja, ki med uporabo Checkmita, ni prisotno v panju, varno.

Ostanki se po panju širijo nepredvideno, kar še otežuje delo. Čebele vosek prenašajo po panju (Bogdanov in sod., 2006), v enem primeru smo v satju proste gradnje našli več kumafosa kot v starem satju. Težko razložimo, zakaj vsebnost ostankov tako v vosku, kot tudi v drugih čebeljih pridelkih niha glede na pogostost uporabe, vendar pa lahko rečemo, da, če pridobivamo med samo iz satja, ki v času uporabe Checkmita, ni prisotno v panju, je uporaba Checkmita za pridelavo medu varna, v nasprotnem primeru pa je lahko problematična že po dvakratni uporabi. Mediščno satje je pred uporabo Checkmita potrebno obvezno odstraniti iz panjev. Prav tako medu ne smemo točiti iz prevešenih satov, ki so med uporabo Checkmita bili prisotni v plodišču.

Čebelarjem svetujemo, da se izogibajo uporabi sintetičnih akaricidov, predvsem tistih, ki vsebujejo kumafos, predvsem glede na uveljavljeno tehniko premeščanja satov iz

plodišča v medišča v AŽ panju.

Čebele vosek in propolis prenašajo po panju. Posebej je potrebno poudariti, da je kumafosa navadno več v voščeni pokrovčki kot v samem satju, zato je v primeru uporabe Checkmita, vosek pred predelavo v satnice potrebno oddati v kontrolni pregled.

V čebelarški literaturi večkrat zasledimo, da moramo star, večkrat zaležen vosek izločiti iz čebelarstva in ga uporabiti za izdelavo sveč, za satnice pa so primerni deviški vosek, vosek iz trotovine in vosek iz pokrovcev. Če upoštevamo, da začne kumafos iz satja prehajati v med in druge čebelje pridelke, ko ga je v vosku 1 mg/kg oz. po podatkih nekaterih avtorjev celo manj, potem v primeru uporabe Checkmita, za satnice ni primeren niti vosek voščeni pokrovcev proste gradnje.

Čebelarjem, ki so uporabljali kumafos, svetujemo, da letno zamenjajo čim več satja, redno iz panja odstranjujejo vse voščene prizidke in ves propolis, kupujejo satnice iz ekološke pridelave ali z dodatnimi postopki očiščen vosek. Predlagamo, da po vsakokratni uporabi Checkmita preverijo vsebnost morebitnih ostankov v vseh čebeljih pridelkih. O uporabi Checkmita se naj pogovorijo z veterinarjem in dosledno upoštevajo njegova navodila.

ZAHVALA

Rezultati so nastali v okviru Programa ukrepov na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji v letih 2014-2016, ki je bil financiran iz sredstev državnega proračuna in proračuna Evropske unije.

LITERATURA

- Bogdanov, S., Kilchenmann, V., Imdorf, A. 1998. Acaricide residues in some bee products, *J. Apic. Res.* 37: 57-67.
- Bogdanov, S., Kilchenmann, V., Fluri, P., Bühker, U., Lavanchy, P., 1999: Influence of organic acids and components of essential oils on honey taste. *American bee Journal* 139 61-6.
- Bogdanov, S., Kilchenmann, V., Bütikofer, U. 2003. Determination of acaricide residues in beeswax: collaborative study. *Apiacta* 38 (2003): 235-245.
- Kandolf Borovšak, A., Lilek, L., Samec, T., Noč, B., Kozmus, P. 2016. Poročilo o ugotavljanju vpliva ostankov zdravil ter drugih škodljivih snovi na čebelje pridelke, na zdravje in preživetje čebeljih družin. Končno poročilo, v skladu z uredbo o izvajanju programa ukrepov na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji v letih 2014-2016. Čebelarska zveza Slovenije.
- Kochansky, J., Wilzer, K., Feldlaufer, M. 2001. Comparison of the transfer of coumaphos from beeswax into syrup and honey. *Apidologie* 32 (2001): 119-125.
- Kmecl, V. 2013. Poročilo o izvajanju interne kontrole medu v letu 2013. Kmetijski inštitut Slovenije.
- Kmecl, V. 2014. Poročilo o izvajanju interne kontrole medu v letu 2014. Kmetijski inštitut Slovenije.
- Noč, B., Kandolf, A., Lilek, N., Samec, T., Justinek, J. 2013. Poročilo o ugotavljanju ostankov zdravil v čebeljih panjih. Čebelarska zveza Slovenije.
- Šešerko, M. (2012): Poročilo o izvajanju interne kontrole in ocenjevanja medu v letu 2012, Sklop 2. Kmetijski inštitut Slovenije.
- Uredba Komisije (EU) št. 37/2010 z dne 22. decembra 2009 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora (UL L št. 15 z dne 20. 1. 2010, str. 1, z vsemi spremembami),
- Wallner, K., 1992. Diffusion varroazider Wirkstoffe aus dem Wachs in den Honig. *Apidologie* 23 (1992): 387-389.
- Wallner, K., 1999. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* 30 (1999): 235-248.