



**Kmetijski inštitut Slovenije**  
**Agricultural Institute of Slovenia**  
1001 Ljubljana, Hacquetova 17, SLOVENIJA  
Tel. +386 1 / 28 05 262, p.p. 2553  
Telefax +386 1 / 28 05 255

## **'VPLIV AMITRAZA IN KUMAFOSA NA RAZVOJ LIČINK V UMETNIH POGOJIH VZREJE'**

Raziskava je potekala v okviru naloge:

**UGOTAVLJANJE VPLIVOV AKARICIDA NA ČEBELE IN VAROJE**

**SODELUJOČI**

Mitja Nakrst, dipl. inž. zoot.

Maja Smodiš Škerl, dr. vet. med.

prof. dr. Aleš Gregorc

## 1. UVOD

Najpomembnejša vloga medonosne čebele je oprашevanje in pridelava čebeljih pridelkov. Delavke medonosne čebele oprășijo, od 70–80 % cvetov, na nekaterih večjih monokulturnih plantažah pa je količina pridelka v celoti odvisna od številčnosti in aktivnosti prisotnih čebel.

Odmiranje čebeljih družin se dogaja postopoma s pešanjem družine in je povezano z nekaterimi dejavniki, kot so napadenost z varjo, nosemo, čebeljimi virusi, uporaba akaricidov in drugih sredstev v panju in v okolici. Čebelar večjo zastрупitev opazi z odmrtnjem delavk pred in v panju z značilnimi znaki – iztegnjen rilček. Pri postopni slabitvi družine, kar opažamo z upadom delavk in njihovim hitrejšim odmiranjem, je možno, da se ves proces začenja že v obdobju razvoja družine.

V laboratoriju smo uvajali vzrejo čebelje zalege v inkubatorju. Cilj naloge je bil razviti laboratorijsko metodo, ki vključuje presajanje, hranjenje in razvoj zalege v kontroliranih pogojih. V Sloveniji ta metoda še ni bila razvita in uporabljena v raziskovalne namene. V nadaljevanju smo v okviru naloge v letu 2010 izvedli uporabno raziskavo ugotavljanja vpliva akaricidov kumafos in amitraz na razvoj in smrtnost čebelje zalege.

## 2. MATERIALI IN METODE

### 2.1 VZREJNO GRADIVO

Pravilno razvito čebeljo družino na sedmih AŽ satih smo uporabili za pridobivanje mladega vzrejnega materiala. V matični izolator smo vstavili prazen, vendar že uporabljen sat, iz katerega so se že polegile mladice. Sat smo dan pred namestitvijo matice namestili v izolator in ga dodali čebelji družini, da so ga zasedle čebele delavke. Naslednji dan smo matico za 10 ur namestili v izolator. Tako smo pridobili primeren in izenačen najmlajši vzrejni material – ličinke.



Slika 1. Matični izolator v petsatnem panju.

## 2.2 UPORABLJEN MATERIAL

- Matični izolator
- Pribor za presajanje ličink
- Mikrotiterske plošče za tkivne kulture
- Bombažni tamponi
- Plastični matični lončki
- Desikator
- Inkubator
- Matični mleček
- D-glukoza
- D-fruktoza
- Ekstrakt kvasa
- Demineralizirana voda
- Razkužilo

## 2.3 PRIPRAVA HRANE

Ličinke smo dnevno hranili z naslednjo sestavo hrane: matični mleček in vodna raztopina z D-fruktoze, D-glukoze in ekstrakt kvasa po metodi, ki sta jo opisala Vandenberg in Shimanuki (1987). Sladkorno raztopino smo filtrirali, nato pa primešali mleček. Hrano smo pripravljali sproti pred vsako vzrejno serijo in jo v času uporabe hranili v hladilniku pri temperaturi + 5 °C.



Slika 2. V čašah je pripravljena hrana za ličinke.

## 2.4 VZREJNI PROSTOR

Ličinke smo vzrejali v inkubatorju, v katerem je bila stalna temperatura 34 °C in temen prostor. Znotraj inkubatorja smo vstavili dva desikatorja, v katerih smo vzdrževali visoko relativno vlažnost (96 %) za razvoj ličink v prvih šestih dneh hranjenja, v fazi razvoja bub pa smo zalego preložili v drug desikator z nižjo vlažnostjo (80 %).

## 2.5 PRESAJANJE LIČINK IN VZREJA

Četrty dan po prestatitvi matice iz izolatorja smo sat z vzrejnim gradivom prenesli v laboratorij. Ličinke smo presajali v matične lončke, ki so bili nameščene v mikrotiterske plošče. Matične lončke smo predhodno dezinficirali, posušili in jih individualno stehali. Pred presajanjem ličink smo jih segreli v inkubatorju pri 34 °C in na dno odpipetirali prvi obrok hrane. V začetnem obdobju vzreje, ki je trajala 6 dni, smo ličinke vzrejali v prvem desikatorju z visoko relativno vlago.



Slika 3. Dezinfekcija vzrejnih lončkov pred presajanjem ličink.

## 2.6 HRANJENJE LIČINK

Hrano smo s pomočjo termobloka ogreli na primerno temperaturo in enkrat dnevno hranili ličinke. Prenos ličink iz inkubatorja in hranjenje je potekalo hitro in natančno, da smo preprečili stres, ki bi lahko vplival na povečano odmiranje ličink. Pred hranjenjem smo aktivnost ličink preverili s stereomikroskopom in sproti odstranili mrtve.

Tabela 1: Količina hrane, ki jo je dnevno prejela posamezna ličinka.

Dan	1.	2.	3.	4.	5.	6.	Skupaj
Količina hrane v $\mu\text{l}$	10	10	20	30	40	50	160

## 2.7 TRETIRANJE LIČINK

Aktivno snov kumafos smo pridobili iz pripravka Perizin<sup>®</sup>, ki se v čebelarstvu uporablja za zatiranje varoje, amitraz pa iz trakov pripravka Apivar<sup>®</sup>, ki je prav tako akaricidno sredstvo namenjeno uporabi v čebelarstvu.



Slika 4. Hrano za ličinke smo segrevali v termobloku pri 34 °C.

Tabela 2: Odmerki in količine kumafosa ter amitraza, ki jih je posamezna ličinka prejela s hrano.

Aktivna snov	KUMAFOS					AMITRAZ	
	1 x	4 x	6 x	8 x	10 x	1 x	LD <sub>50</sub>
Količina	0.615 $\mu\text{g}$	2.46 $\mu\text{g}$	3.69 $\mu\text{g}$	4.92 $\mu\text{g}$	6.15 $\mu\text{g}$	38.82 $\mu\text{g}$	50.66 $\mu\text{g}$

Košček traku Apivar<sup>®</sup> smo nekaj časa pustili v hrani za ličinke, nato pa analizirali vsebnost čistega amitraza. Dobili smo naslednje vrednosti:

- Vzorec 1; 73.6 ppm (mg/kg)
- Vzorec 2; < LOD (pod mejo detekcije)
- Vzorec 3; 52.5 ppm (mg/kg)
- Vzorec 4; 140.1 ppm (mg/kg)
- Vzorec 5; slepi vzorec – uporabili smo ga za postavitve območja koncentracije
- Vzorec 6; < LOD (pod mejo detekcije)

## 2.8 TEHTANJE LIČINK

Sedmi dan vzreje smo ličinke skupaj z matičnimi lončki individualno tehtali ( $\pm 0.1$  mg) in jih prestavili v drug desikator z nižjo relativno vlažnostjo. Pri tej starosti poteka zadnja levitev in iztrebljanje. Enajsti dan smo vzrejno ploščo prekrili s tanko plastjo čebeljega voska in jo postavili v pokončni položaj. Slednje je v tej fazi umetne vzreje pomembno za pravilen razvoj delavk, pri čemer zmanjšamo možnost, da se delavke izležejo s popačenimi krili.



Slika 5. Sedem dni stare ličinke v vzrejnih lončkih pred tehtanjem.

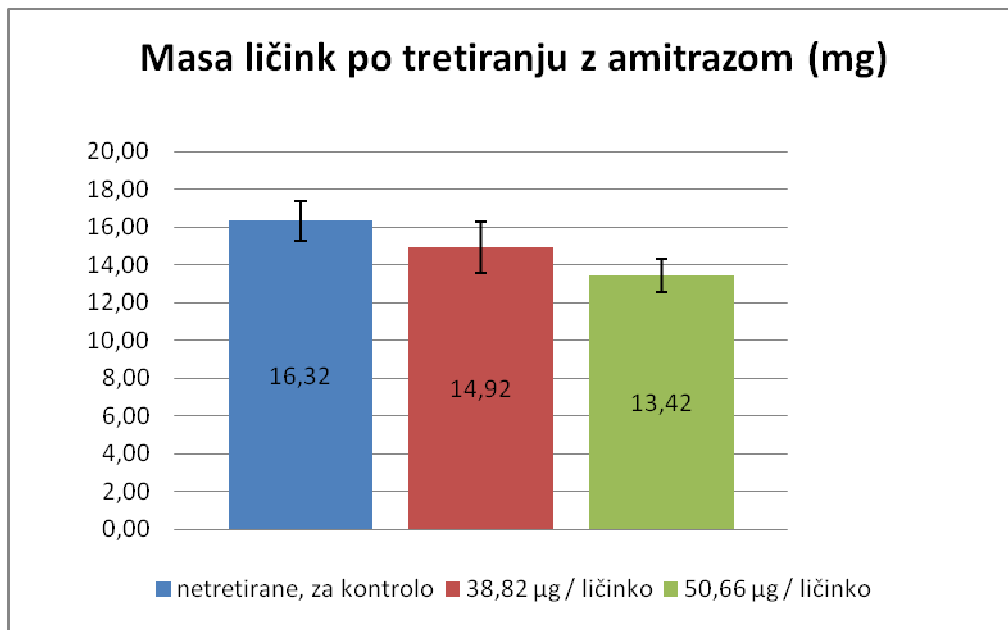
## 3. REZULTATI

Pri začetni fazi umetne vzreje smo dnevno spremljali smrtnost ličink, sedmi dan smo ličinke tudi tehtali. V povprečju so ličinke iz kontrolne skupine (netretirane ličinke) tehtale  $14.99 \pm 1.49$  mg.

### 3.1 AMITRAZ

#### 3.1.1 Masa ličink

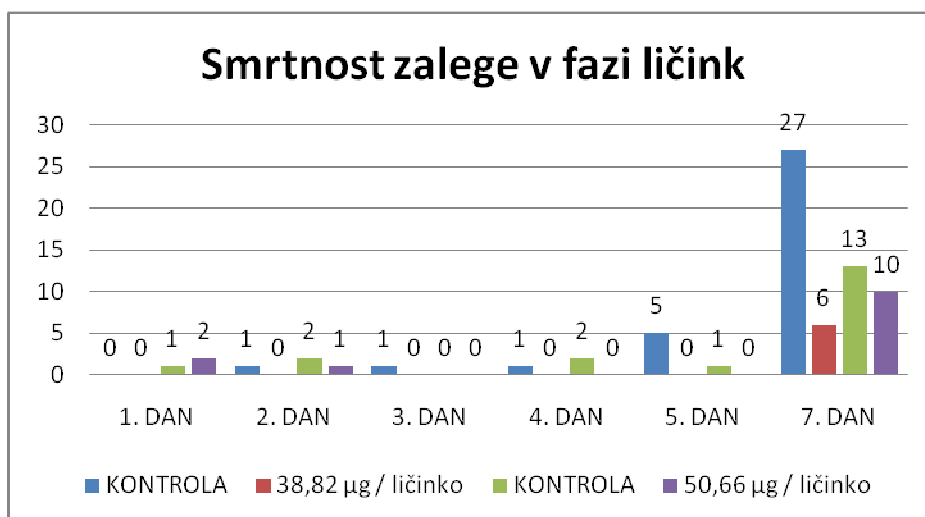
V skupini, kjer smo posamezne ličinke v obdobju razvoja tretirali z  $38.82 \mu\text{g}$  amitraza, je bila povprečna telesna masa  $14.92 \pm 1.36$  mg ( $n=42$ ) in  $13.41 \pm 0.86$  mg ( $n=35$ ) v skupini, kjer smo ličinkam aplicirali po  $50.66 \mu\text{g}$  amitraza. V obeh skupinah so imele kontrolne ličinke večjo skupno povprečno maso (graf 1 in tabela 3).



Graf 1. Masa ličink, ki so bile tretirane z različnimi koncentracijami amitraza.

### 3.1.2 Smrtnost ličink

Pri ličinkah, ki so bile v poskusu tretirane z 38.82 µg oziroma 50.66 µg amitraza, nismo opazili povečanega odmrta v obdobju dodajanja hrane (graf 2). V skupini ličink, ki so prejele najvišjo količino amitraza (50.66 µg), so bile tretirane ličinke lažje v primerjavi s kontrolno skupino, opazili smo tudi večje število odmrlih ličink.

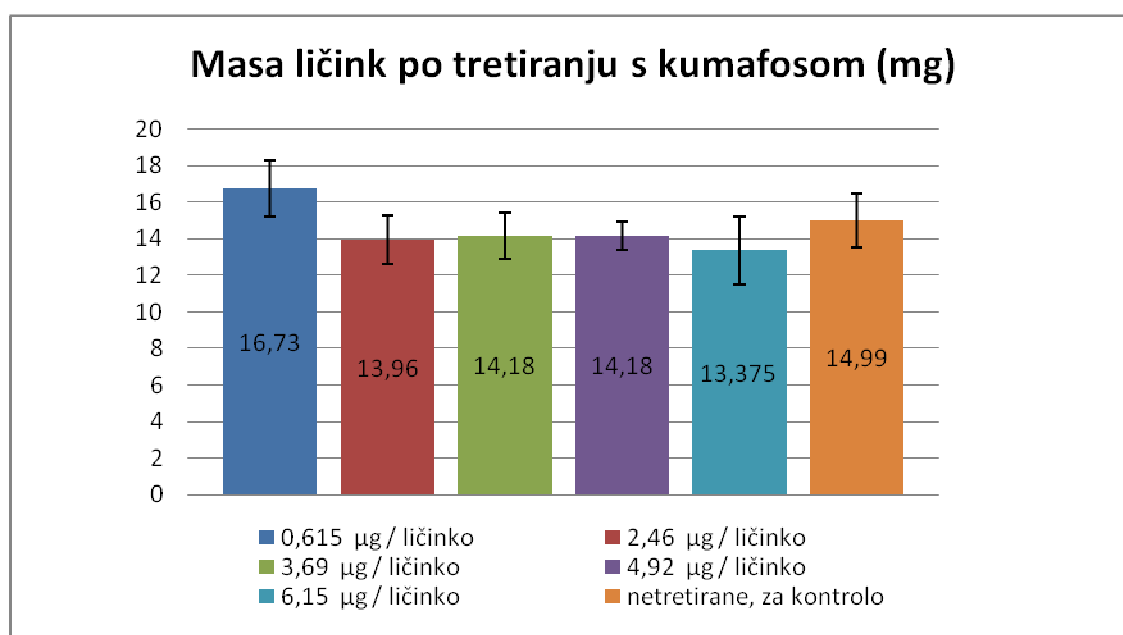


Graf 2. Spremljanje smrtnosti ličink, ki so bile tretirane z amitrazom.

## 3.2 KUMAFOS

### 3.2.1 Masa ličink

V poskus smo zajeli pet različnih koncentracij dodane učinkovine kumafos (tabela 2). Ugotovili smo, da je bila povprečna masa ličink v skupini, kjer smo posamezni ličinki aplicirali 0.615  $\mu\text{g}$  kumafosa, večja ( $16.73 \pm 1.52$  mg;  $n=27$ ) od primerjalnih kontrolnih - netretiranih ličink ( $14.99 \pm 1.49$  mg;  $n=102$ ). V omenjeni skupini je bila smrtnost ličink, ki smo jim aplicirali kumafos, višja (tabela 3). V ostalih skupinah, kjer smo dodajali višjo koncentracijo kumafosa in telesno maso primerjali s kontrolno skupino, smo ugotovili, da so ličinke v kontrolnih skupinah težje (tabela 3 in graf 3).

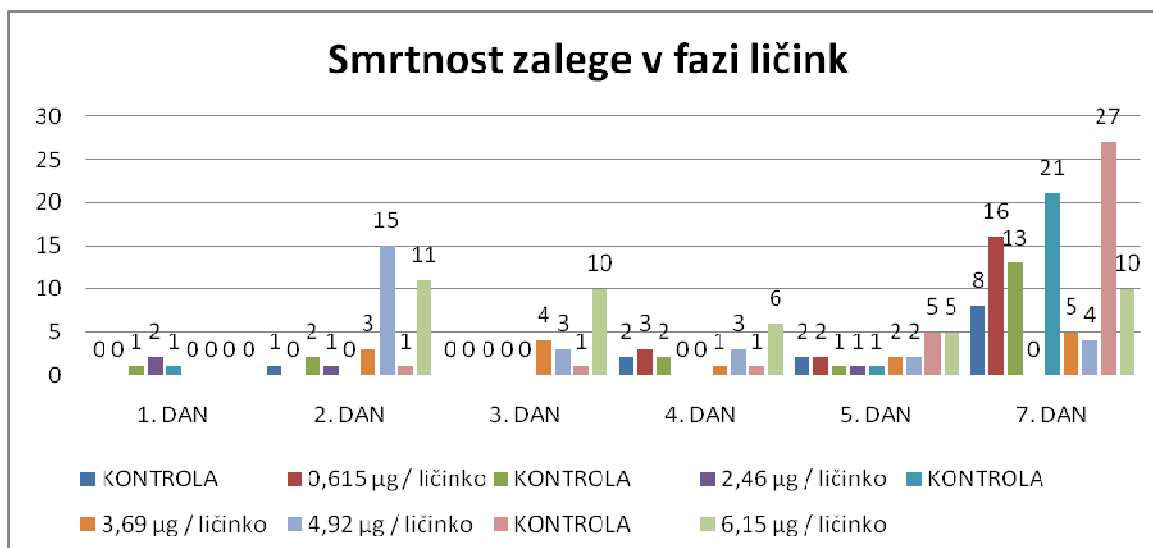


Graf 3. Telesna masa ličink, ki so bile tretirane z različnimi koncentracijami kumafosa.

### 3.2.2 Smrtnost ličink

Z dnevnim spremljanjem odmrtnosti ličink smo ugotavljali višino koncentracije, ki vpliva na preživetje ličinke oz. povzroči njeno odmrtnost. Ugotovili smo, da se ličinke niso dovolj razvijale, ko so s hrano prejemale 3.49  $\mu\text{g}$  kumafosa (pojedle so manj), od drugega dne naprej se je pojavljalo tudi odmiranje. Opaznejše odmiranje se je pojavljalo pri tretiranju s 4.92  $\mu\text{g}$  kumafosa/ličinko in 6.15  $\mu\text{g}$  kumafosa/ličinko (graf 3).





Graf 4. Spremljanje smrtnosti ličink, ki so bile tretirane s kumafosom.

Tabela 3. Odmiranje ličink v začetni fazi vzreje in povprečna telesna masa sedem dni starih ličink.

Št. poskusa	Aktivna snov	Koncentracija dodane aktivne snovi	Število odmrlih ličink po presajanju						Skupno število mrtvih ličink	Povprečna masa 7. dni starih ličink (mg)
			1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	5. dan	7. dan		
1	KONTROLA		0	1	1	1	5	27	35	16.32 ± 1.04
	AMITRAZ	38,82 µg/ličinko	0	0	0	0	0	6	6	14.92 ± 1.36
	KUMAFOS	6,15 µg/ličinko	0	11	10	6	5	10	42	13.37 ± 1.84
2	KONTROLA		0	1	0	2	2	8	13	15.49 ± 1.54
	KUMAFOS	0,615 µg/ličinko	0	0	0	3	2	16	21	16.73 ± 1.52
3	KONTROLA		1	2	0	2	1	13	19	14.08 ± 0.81
	AMITRAZ	50,66 µg/ličinko	2	1	0	0	0	10	13	13.41 ± 0.86
	KUMAFOS	2,46 µg/ličinko	2	1	0	0	1	0	4	13.95 ± 1.32
4	KONTROLA		1	0	0	0	1	21	23	14.64 ± 1.47
	KUMAFOS	3,69 µg/ličinko	0	3	4	1	2	5	15	14.27 ± 0.92
	KUMAFOS	4,92 µg/ličinko	0	15	3	3	2	4	27	14.18 ± 0.77

## 4. ZAKLJUČEK

V poskusih smo ugotovili možnost prehoda aktivne snovi amitraza iz komercialnih trakov Apivar® v matični mleček, ki je pomembna sestavina hrane za čebeljo zalego. Pri tretiranju z amitrazom ali kumafosom, ki se uporabljata v čebeljih družinah za zatiranje varoj, so imele razvijajoče se ličinke zmanjšano telesno maso, pojavljala pa se je tudi večja smrtnost v primerjavi s preživetjem kontrolnih netretiranih ličink. Kumafos in amitraz v količinah, ki se potencialno lahko najdetata v hrani čebelje zalege, delujeta negativno na razvoj zalege in imata tudi potencialne negativne učinke na dolgoživost izleženih delavk in druge neugodne, subletalne in subklinične vplive, ki se lahko odražajo v spremembah v različnih organih in tkivih.

Prisotnost kumafosa ali amitraza v čebelji družini ima negativne posledice na razvoj zalege. Nekatere druge negativne vplive na prebavila (srednje črevo), slinske in hipofaringealne žleze smo v našem laboratoriju že proučevali v predhodnih raziskavah. Vse negativne posledice prisotnosti akaricidov amitraza in kumafosa v družini ni mogoče preprečiti, v kolikor želimo uspešno zatirati varoje. Z ustreznim načinom vstavljanja akaricidov in upoštevanjem časovno omejene prisotnosti sredstev v čebelji družini je negativne vplive mogoče zmanjšati na najmanjšo možno mero.



Slika 6. Umetno vzrejena mlada delavka se izlega skozi tanko plast voska.

## 5. LITERATURA

Brodshneider R, Riessberger-Galle U, Crailsheim K (2009) Flight performance of artificially reared honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 40: 441 - 449.

COST; Proceedings of the COLOSS Works hop »Method standardization for larval tests« Graz, Austria, 7. - 9.6.2010.

Vandenberg JD, Shimanuki H (1987) Technique for rearing worker honeybees in the laboratory. *J Apic Res* 26: 90 - 97.