

آفات و بیماریهای گیاهی

جلد ۶۸، شماره ۱ و ۲، بهمن ۱۳۷۹

اندازه گیری باقیمانده کومافوس در عسل زنبورستانهای استان تهران

Determination of coumaphos residues in honey from some apiaries in Tehran province

خلیل طالبی، علیرضا عبداللهی، سید احمد میرهادی، رسول مدنی و بلیس امامی یگانه
دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، مرکز آموزش عالی امام خمینی (ره)، موسسه تحقیقات علوم
دامی کشور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و سازمان دامپزشکی

چکیده

به منظور اندازه گیری باقیمانده کومافوس در عسل، سه زنبورستان در مناطق کرج، طالقان و دماوند که از چندین سال قبل مبادرت به تیمار کردن کلنی های خود با این کنه کش کرده بودند به صورت کرت های کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. نمونه برداری در پنج تکرار در دو فصل بهار و پائیز انجام گردید و نمونه ها به روش کروماتوگرافی با کارآیی بالا مورد تجزیه قرار گرفت. در تمامی نمونه های عسل، باقیمانده قابل اندازه گیری کومافوس یافت شد. متوسط میزان باقیمانده کومافوس در نمونه های عسل زنبورستان های نامبرده در بالا در نمونه برداری پائیز به ترتیب ۱۳/۶۹، ۱۹/۴۵ و ۸/۸۵ میکروگرم در کیلوگرم بود. تجزیه واریانس تیمارها اختلاف معنی داری را نشان نداد ولی میانگین های باقیمانده کومافوس در زنبورستان طالقان و دماوند با آزمون دانکن در گروه های مختلف قرار گرفتند. در نمونه برداری بهار باقیمانده کومافوس در سه زنبورستان کرج، طالقان و دماوند به ترتیب ۱۵/۰۳، ۱۱/۹۵ و ۸/۸۰ میکروگرم در کیلوگرم اندازه گیری شد که متوسط میزان باقیمانده در زنبورستان کرج نسبت به دو زنبورستان دیگر بیشتر بود.

واژه های کلیدی: عسل، کومافوس، کنه واروا، باقیمانده آفت کش

مقدمه

Varroa jacobsoni Oudemans کنه پارازیت زنبور عسل (*Apis mellifera* L.) می باشد که از سال

۱۳۶۳ باورود به ایران مشکلات مختلفی را در صنعت زنبورداری ایجاد کرده است (Emami, 1986). این انگل تمام مراحل زندگی خود را در داخل حجره‌های سر بسته نوزادان زنبور عسل می‌گذراند (Esmaili et al. 1989). کنه‌های ماده بالغ که بارور می‌باشند در سن پنج و نیم روزگی نوزادان کارگر و قبل از بسته شدن حجره‌ها وارد آنها گردیده و با تغذیه کافی از همولف لارو، داخل حجره تخم‌گذاری را شروع می‌کنند. از آنجائیکه کنه‌های ماده هم از همولف زنبوران بالغ و هم از همولف شفیره، تغذیه می‌کنند، لذا از دو طریق باعث کاهش قدرت زنبورها شده و نتیجتاً جمعیت یک کندو را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Emami, 1993). با توجه به اهمیت خسارت وارو زنبورداران مجبور هستند با روش‌های معمول که در اکثر کشورها مبارزه شیمیایی است آفت را کنترل نمایند (Van Buren et al. 1992). با گسترش کنترل شیمیایی که از سال ۱۳۶۳ بر علیه این آفت در تمام مناطق آلوده انجام گرفته، امکان وجود باقیمانده کنه کش‌ها در عسل وجود دارد. یکی از ترکیبات کنه کش کومافوس (پریزین)^۱ می‌باشد که از سال ۱۳۶۷ در کشور ما بر علیه این آفت به کار رفته است. در بعضی از کشورها از جمله ایران به دلیل عدم رعایت اصول صحیح کاربرد آفت‌کشها امکان دارد که نمونه‌های عسل دارای باقیمانده بیش از حد مجاز باشند. میزان حد مجاز بر حسب جیره غذایی افراد متفاوت می‌باشد. این میزان برای کشورهای متحد اروپا ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم در نظر گرفته شده است. کومافوس بدلیل چربی دوستی می‌تواند مدت‌ها در کندو باقی بماند و در حین عملیاتی نظیر سانتریفوژ کردن عسل و نیز استفاده مجدد از قابهای قدیمی منتقل گردد. هدف اصلی از این بررسی تعیین میزان باقیمانده این آفت‌کش در دو فصل بهار و پاییز در مکانهای مختلف استان تهران می‌باشد.

روش بررسی

کارهای صحرائی

نخست با تهیه پرسشنامه‌هایی در سه منطقه کرج، دماوند و طالقان، اطلاعات مورد نیاز مانند رعایت اصول صحیح برای جلوگیری از آلودگی، دز مصرفی و تعداد تیمار در سال جمع‌آوری گردید. در مرحله بعد، از مناطق مختلف استان تهران سه زنبورداری انتخاب شد. علت انتخاب مناطق مذکور این بود که در آنجا زنبور دارها از چندین سال قبل اقدام به تیمار کردن کلنی‌های خود

۱ Perizin (Coumaphos)

با محلول پر یزین کرده بودند و در پائیز سال‌های ۱۳۷۵ و ۱۳۷۶ نیز این روند را ادامه داده بودند. در پائیز ۱۳۷۶ از هر زنبور داری ۵ کلنی به طور تصادفی انتخاب شد و نمونه برداری انجام گردید. چون تیمار نمودن کندوها در مناطق مختلف زنبورداری بر حسب جمعیت آفت انجام می‌شود، نمونه برداری دوم در بهار سال بعد یعنی در سال ۱۳۷۷ و در اواخر خرداد ماه انجام گرفت.

کارهای آزمایشگاهی

نمونه‌های برداشته شده به آزمایشگاه منتقل گردید. برای اندازه‌گیری باقیمانده کومافوس در عسل از روش (Van Buren et al. 1992) با برخی تغییرات در مرحله تجزیه و خالص سازی استفاده شد. خلاصه این روش در زیر آمده است:

۱- جداسازی موم از عسل: نمونه‌های انتقال داده شده به آزمایشگاه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه و برای مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد تا ذرات موم بخوبی از عسل جدا گردد، نمونه‌های عسل جدا شده به ظروف شیشه‌ای منتقل و شماره گذاری گردید.

۲- مراحل استخراج: ۵۰ میلی لیتر عسل را وزن کرده و هم حجم آن آب مقطر بدان اضافه شد، سپس با ۱۰۰ میلی لیتر استونیتریل^۱ از نوع خالص آزمایشگاهی Merck استخراج گردید، عمل استخراج سه بار تکرار شد.

استونیتریل جدا شده توسط دستگاه تبخیر کننده دوار تبخیر گردید. بعد از تبخیر شدن استونیتریل، حجم محلول بکمک آب مقطر به ۵۰ میلی لیتر رسانیده شد. محلول حاصل سه بار توسط ۲۰ میلی لیتر هگزان نرمال^۲ اشباع شده از استونیتریل استخراج گردید. هگزان جمع‌آوری شده توسط سولفات سدیم خشک روی صافی شیشه‌ای آگیری شده و مجدداً به کمک دستگاه تبخیر کننده دوار در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تبخیر گردید. باقیمانده داخل بالن در ۵ میلی لیتر آب و ۲ میلی لیتر استون^۳ ۹۹٪ Merck حل شد.

۳- قلیایی کردن نمونه‌ها: محلول جمع‌آوری شده از مرحله قبل را با سود ۱٪ مول قلیایی کرده و pH محلول به ۱۲ رسانده شد. بعد از ۱۰ دقیقه که از قلیائی کردن نمونه‌ها گذشته بود به کمک بافر بورات pH محلول به ۹/۵ رسانیده شد. (بافر بورات استفاده شده از انحلال ۱۷/۳۵ گرم اسیدبوریک^۴ در ۱۰۰ میلی لیتر سود نرمال بدست آمده بود).

n- Hexane ۲

Acetonitrile ۱

Boric acid ۴

Acetone ۳

۴- تصفیه و خالص سازی: به منظور جداسازی ناخالصی‌ها ابتدا محلول توسط ۲۰ میلی لیتر کلروفرم^۱ استخراج گردید. عمل استخراج سه بار تکرار شد، سپس برای خالص سازی نهایی عمل استخراج سه بار دیگر هر بار به وسیله ۲۵ میلی لیتر هگزان نرمال صورت گرفت.

۵- اسیدی کردن نمونه‌ها: محلول حاوی کومافوس با ۵ میلی لیتر اسید کلریدریک نرمال اسیدی شد سپس این محلول سه بار هر بار با ۲۰ میلی لیتر کلروفرم استخراج گردید. لایه کلروفرم جمع آوری شده در دستگاه تبخیر کننده دوار تبخیر گردید. به باقیمانده ۵ میلی لیتر هگزان-دی اتیل اتر^۲ (نسبت حجمی ۳:۷) اضافه شد. بالن حاوی باقیمانده مجدداً با ۱۰ میلی لیتر هگزان-دی اتیل اتر و ۱۰ میلی لیتر هگزان-استون (نسبت حجمی ۳:۷) شستشو گردید. محلول حاصل یکبار دیگر توسط دستگاه تبخیر کننده دوار تبخیر شده و در نهایت به بالن شیشه‌ای ته گرد که حاوی باقیمانده کومافوس بود ۷ میلی لیتر مخلوط آب-استونیتریل (نسبت حجمی ۱:۱) اضافه شد تا برای تجزیه دستگاهی آماده گردد.

۶- شرایط تجزیه و دستگاه HPLC^۳: برای اندازه گیری باقیمانده کومافوس از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) مدل Waters-486 مجهز به دکتور ماوراء بنفش (UV Detector) که با کامپیوتر مدل NEC-Image 46603 متصل شده بود، استفاده گردید. شرایط کاری دستگاه بشرح زیر بود:

سیستم شستن از نوع فاز معکوس^۴، ستون C₁₈ و Delta pak با ابعاد ۳/۹ mm I.D × ۱۵۰، فاز متحرک محلول استونیتریل: آب به نسبت حجمی (۸۰:۲۰) با سرعت یک میلی لیتر در دقیقه بود و کومافوس در ۳۲۰ نانومتر شناسایی می‌شد. میزان تزریق ۲۰ میکرولیتر و روش شستن از نوع ایزوکراتیک^۵ بود.

آزمایشهای بازیافت

بازیابی کومافوس بروش بالا در دو غلظت متفاوت انجام گرفت، بدین صورت که ابتدا از نمونه استاندارد تهیه شده از شرکت بایر^۶ که درصد خلوص آن ۹۹/۵٪ بود محلول پایه به غلظت

Hexan-Diethyl ether ۲

Chloroform ۱

High Performance Liquid Chromatography ۳

Isocratic ۵

Reverse phase ۴

Bayer ۶

۱۰۰۰ ppm تهیه گردید. در هر آزمایش ۵۰ میلی لیتر عسل مورد استفاده قرار گرفت و به نمونه‌های مذکور در سطوح ۰/۰۵ و ۰/۰۲۵ میکروگرم در گرم کومافوس اضافه شد و در هر آزمایش ۲ تکرار انجام گرفت. متوسط درصد بازیافت در دو سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۲۵ میکروگرم در گرم به ترتیب ۸۳/۴۵ و ۸۷/۰۰ درصد بود.

نتیجه و بحث

در نمونه‌های عسلی که در فصل پاییز از سه زنبورستان در طالقان، کرج و دماوند برداشته شده بود اندازه‌گیری کومافوس انجام گردید. بیشترین مقدار کومافوس در زنبورستان طالقان در کلنی شماره ۵ پیدا شد که ۴۷/۱۳ میکروگرم در کیلوگرم و کمترین آن در کلنی شماره ۴ که برابر ۱۰/۶۱ میکروگرم در کیلوگرم عسل بود (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج بدست آمده در زنبورستان منطقه طالقان در نمونه برداری پاییز

Table 1- Results of fall sampling in Taleghan apiary

Colony No.	Weight of 50ml	Coumaphos residue
	honey (g)	$\mu\text{g}/\text{kg}$
1	68.7	14.94
2	69.6	13.79
3	73.2	10.80
4	71.97	10.61
5	71.5	47.13

در زنبورستان کرج، بیشترین باقیمانده در کلنی شماره یک پیدا شد که برابر ۱۸/۳۹ و کمترین میزان باقیمانده در کلنی شماره ۵، برابر ۹/۱۵ میکروگرم در کیلوگرم بوده است (جدول ۲).

در زنبورستان دماوند، بیشترین مقدار در کلنی شماره ۳ و کمترین میزان آن در کلنی شماره ۱ یافت گردید که به ترتیب ۱۰/۴۸ و ۷/۸۰ میکروگرم در کیلوگرم بوده است (جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن صورت گرفت. این نتایج نشان می‌دهد که بین تیمار دوم و سوم یعنی زنبورستان طالقان و دماوند اختلاف معنی داری از لحاظ میانگین میزان باقیمانده وجود دارد.