

اندازه گیری باقیمانده کومافوس در عسل زنبورستانهای استان تهران

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

خلیل طالبی، علیرضا عباداللهی، سید احمد میرهادی، رسول مدنی و بلقیس 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 کلنیهای 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 و اروا، 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 همولنف لارو، داخل حجره تخم‌گذاری را شروع می‌کنند. از آنجائیکه کنه‌های ماده هم از همولنف زنبوران بالغ و هم از همولنف 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 واروآ 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 کنه‌کش‌ها در عسل وجود دارد. یکی از ترکیبات کنه‌کش 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 پائیز 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

با محلول پریزین 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 برحسب 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 آبیگری 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- قلبایی کردن نمونه‌ها: محلول جمع‌آوری شده از مرحله قبل را با سود ۰/۱ مول قلبایی کرده و pH محلول به ۱۲ رسانده شد. بعد از ۱۰ دقیقه که از قلبایی 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
www.SID.ir

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 جمع‌آوری شده در دستگاه تبخیر کننده دوار تبخیر گردید. به باقیمانده ۵ میلی لیتر هگزان-دی‌اتیل اتر^۲ (نسبت حجمی ۳:۷) اضافه شد. بالن حاوی باقیمانده مجدداً با ۱۰ میلی لیتر هگزان-دی‌اتیل 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 ته‌گرد 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 اندازه‌گیری 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 باز یافت

باز یابی 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

www.SID.ir

۱۰۰۰ ppm تهیه گردید. در هر آزمایش ۵۰ میلی لیتر عسل مورد استفاده قرار گرفت و به نمونه‌های مذکور در سطوح ۰/۰۲۵ و ۰/۰۵ میکروگرم در گرم کومافوس اضافه شد و در هر آزمایش ۲ تکرار انجام گرفت. متوسط درصد بازیافت در دو سطح ۰/۰۲۵ و ۰/۰۵ 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 اندازه گیری 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)	μg/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

نتایج میزان کومافوس در نمونه برداری فصل بهار نشان داد که در زنبورستان منطقه کرج بالاترین میزان باقیمانده در کلنی شماره ۱ پیدا شد. این مقدار برابر ۲۷/۵۹ میکروگرم در کیلوگرم بوده است (جدول ۵) و کمترین میزان باقیمانده در کلنی شماره ۵ یافت شده که مساوی ۷/۹۲ میکروگرم در کیلوگرم بود. در زنبورستان طالقان بیشترین میزان باقیمانده ۱۴/۹۴ و کمترین مقدار ۸/۳۶ میکروگرم در کیلوگرم اندازه گیری شد (جدول ۶).

جدول ۲- نتایج بدست آمده در زنبورستان منطقه کرج در نمونه برداری پاییز

Table 2- Results of fall sampling in Karaj apiary.

Colony No.	Weight of 50ml	Coumaphos residue
	honey (g)	$\mu\text{g/kg}$
1	66.12	18.93
2	63.81	10.00
3	74.36	13.70
4	72.88	17.24
5	76.64	9.15

جدول ۳- نتایج بدست آمده در زنبورستان منطقه دماوند در نمونه برداری پاییز

Table 3- Results of fall sampling in Damavand apiary.

Colony No.	Weight of 50ml	Coumaphos residue
	honey (g)	$\mu\text{g/kg}$
1	78.98	7.80
2	60.55	9.12
3	60.53	10.48
4	59.64	8.32
5	59.60	8.51

جدول ۴- مقایسه میانگین‌های تیمارها با استفاده از آزمون دانکن

Table 4- Comparison of treatments means using Duncan test.

Mean ($\mu\text{g/kg}$)	Treatment
19/454 ^a	Taleghan apiary
13.69 ^{ab}	Karaj apiary
8.846 ^b	Damavand apiary

۱- تفاوت بین میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنی دار نیست.

جدول ۵- نتایج بدست آمده در زنبورستان منطقه کرج در نمونه برداری بهار

Table 5- Results of spring sampling in Karaj apiary.

Colony No.	Weight of 50ml honey (g)	Coumaphos residue $\mu\text{g/kg}$
1	67.11	27.59
2	63.17	9.70
3	68.40	10.42
4	74.23	19.52
5	69.1	7.92

جدول ۶- نتایج بدست آمده در زنبورستان منطقه طالقان در نمونه برداری بهار

Table 6- Results of spring sampling in Taleghan apiary.

Colony No.	Weight of 50ml honey (g)	Coumaphos residue $\mu\text{g/kg}$
1	67.76	13.80
2	--	--
3	66.88	10.71
4	73.9	8.36
5	76.6	14.94

(#) کلنی شماره ۲ در زمان نمونه برداری فاقد عسل بوده)

در زنبورستان دماوند، بیشترین میزان باقیمانده یافت شده ۹/۳۸ میکروگرم در کیلوگرم بود که در نمونه عسل کلنی شماره ۱ مشاهده گردید، همچنین کمترین میزان باقیمانده در کلنی شماره ۵ اندازه گیری شد که برابر، ۸/۳۲ میلی گرم در کیلوگرم بود (جدول ۷).
متوسط میزان باقیمانده در سه زنبورستان کرج، طالقان و دماوند در نمونه برداری بهار و در مقایسه با نمونه برداری پائیز برابر ۱۵/۳۲، ۱۱/۹۵ و ۸/۸۰ میکروگرم در کیلوگرم محاسبه گردید (شکل ۱).

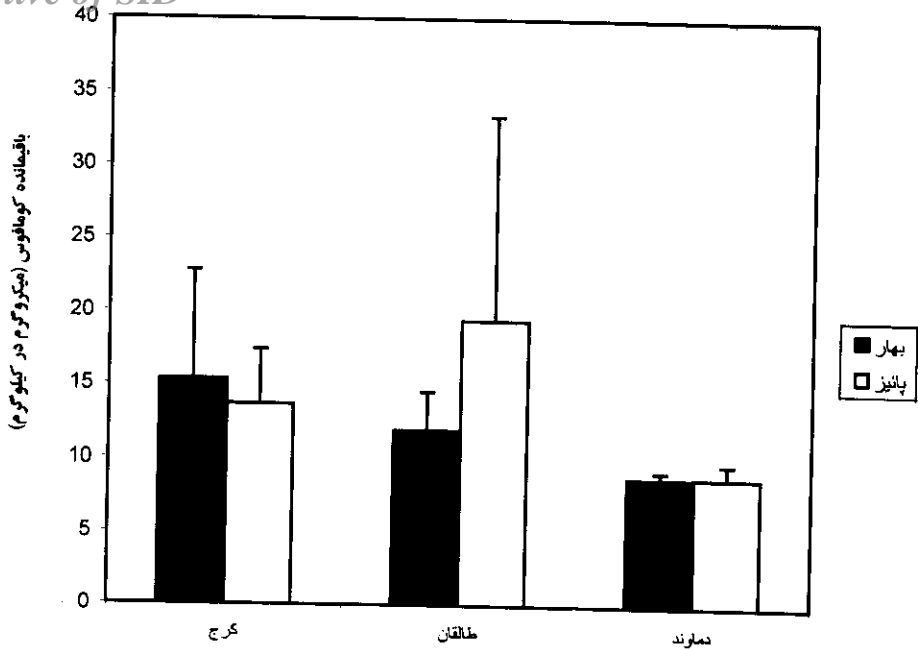
جدول ۷- نتایج بدست آمده در زنبورستان منطقه دماوند در نمونه برداری بهار

Table 7- Results of spring sampling in Damavand apiary.

Colony No.	Weight of 50ml	Coumaphos residue
	honey (g)	$\mu\text{g/kg}$
1	71.7	9/38
2	64.78	9.23
3	65.67	8.70
4	67.26	8/36
5	68.79	8.32

نتیجه و بحث

باقیمانده قابل اندازه گیری کومافوس در همه نمونه های عسل که کلنی های آن در پاییز تیمار شده بودند، وجود داشت. متوسط میزان باقیمانده در کلنی های تیمار شده در زنبورستان طالقان بیشتر از سایر زنبورستانها بود هر چند در پرسشنامه های جمع آوری شده از سه زنبورستان، زنبوردارها اعلام نمودند از دز استاندارد کومافوس یعنی ۶۴۰ میلی گرم در لیتر استفاده کرده اند ولی عملاً مشاهده گردید که عدم استفاده از اپلیکاتور^۱ باعث شده که دز مصرفی منطبق با دز استاندارد نبوده و نبودن وسیله مذکور سبب شده که بجای اینکه محلول کومافوس در فواصل قابها روی زنبورها بریزد، بیشتر بر روی قابها قرارگیرد و دقیقاً روی کلنی ها ریخته نشود، بخصوص اینکه طبق



شکل ۱- متوسط باقیمانده کومافوس در زنبورستانها در فصل بهار و پاییز.

Fig. 1- Mean residues of Coumaphos in apiaries during spring and fall.

بررسی (Velthuis et al. (1991 در صورتیکه کومافوس دقیقاً روی زنبورها پاشیده شود، انتقال آفت‌کش از طریق دهان به دهان انجام می‌گیرد و بنابر این باقیمانده بسیار کمتری در موم عسل موجود خواهد بود.

مقایسه میانگین باقیمانده کومافوس در کلنی‌ها از طریق آزمون دانکن نشان داد که بین زنبورستان طالقان با دماوند اختلاف معنی داری وجود دارد و بین این زنبورستان با زنبورستان کرج هیچ اختلافی موجود نیست. در زنبورستان طالقان بر اساس اطلاعات کسب شده از خود زنبوردار، جمعیت آفت زیاد بود و زنبوردارها بخاطر عملیات پیشگیرانه مجبورند در زمانیکه جمعیت آفت در کندو کم است نیز اقدام به کنترل آفت نمایند در صورتیکه اگر تیمار کردن در پاییز و بطور دقیق با آفت‌کش موثر انجام شود، در بهار آلودگی پایین خواهد بود و گاهی نیاز به درمان ندارد، از سوی دیگر بدلیل مناسب بودن آب و هوا و پراکنش وسیع پوشش گیاهی در منطقه طالقان

زنبورداران راغب هستند که در منطقه ساکن گردند و بدلیل تماس با کلنی های آلوده مهاجر جمعیت آفت در کندو در این منطقه بیشتر می باشد. انبوهی آفت باعث می شود اقدامات پیشگیرانه بیشتری در این منطقه انجام گیرد یعنی دفعات متعدد دارو درمانی و مصرف بیشتر کنه کش خود می تواند دلیلی بر وجود باقیمانده بیشتر کومافوس در عسل نمونه برداری شده از این مناطق باشد. در نمونه برداری پائیز تنها در یک نمونه عسل که متعلق به زنبورستان طالقان بود ۴۷/۱۳ میکروگرم در کیلوگرم باقیمانده وجود داشت، این احتمال وجود دارد که در این کلنی بدلیل داشتن موم قدیمی تر که چندین بار با کومافوس تیمار شده و نیز اندازه بزرگتر، میزان باقیمانده نسبت به سایر کلنی ها بیشتر بوده است. در زنبورستان منطقه دماوند بجز یک کلنی در بقیه کلنی ها میزان باقیمانده از حد استاندارد که برای کشور ایتالیا و کشورهای جامعه متحد اروپا در نظر گرفته شد (۱۰ میکروگرم در کیلوگرم) کمتر بوده است (Piro, 1977). بدون شک در این منطقه اقدامات حفاظتی بموقع و یکبار تیمار کردن در سال می تواند دلیل وجود باقیمانده کمتر از منطقه طالقان باشد. زنبورداران این منطقه بطور حرفه ای به شغل زنبورداری اشتغال داشته و در شرایط سرمای زمستان به شمال کشور و جنوب مهاجرت می نمایند. آب و هوای مرطوب شمال و شرایط نسبتاً گرم جنوب می تواند به هیدرولیز و شکسته شدن آفت کش کومافوس در این کندوها کمک کند.

در زنبورستان کرج تنها یک نمونه حاوی باقیمانده کمتر از حد استاندارد بود و در بقیه کلنی ها مقدار باقیمانده کومافوس بیشتر بود و از این نظر تا حدودی به زنبورستان طالقان شباهت دارد. به نظر میرسد که شباهت آب و هوایی این دو منطقه عامل اصلی این همانندی باشد.

در نمونه برداری بهار، متوسط باقیمانده کنه کش کومافوس در عسل شانها در زنبورستان دماوند به مقدار بسیار کم کاهش پیدا کرد، در حالیکه در زنبورستان طالقان میزان باقیمانده کاهش چشمگیری داشت. در زنبورستان طالقان با اینکه ۶ هفته قبل از جریان عسل در طبیعت، تیمار با کنه کش با همان دز قبلی انجام شده بود ولی میزان باقیمانده آن پایین آمد. انتظار می رفت میزان باقیمانده از مقدار موجود در تیمار پائیزه بدلیل افزایش میزان تجمع کومافوس در موم بیشتر گردد، اما مشاهده شد که عسل های جمع آوری شده از زنبورستان طالقان در فصل بهار و موقع نمونه برداری از رقت بالاتری برخوردار است. باید توجه داشت که در هیدرولیز کومافوس علاوه بر حرارت، رطوبت نیز نقش مهمی خواهد داشت. بطوریکه طبق بررسیهای انجام گرفته توسط Gajduskova et al. (1990) کومافوس در محیط آبی باگذشت زمان می تواند هیدرولیز گردد. غیر از موارد فوق، در زنبورستان طالقان تمامی کندوها در فصل بهار تعویض و از کندوهای استفاده گردید

که شستشو داده شده بودند. این احتمال وجود دارد که ذرات موم و فونداسیون مومها و چارچوبهای قاب طبق نظر Wallner (1995) نقش مهمی در آلودگی عسل بازی کند. در عسل بهار نمونه برداری شده در زنبورستان کرج میزان باقیمانده از پائیز بیشتر بود. به نظر میرسد که علت بالا بودن کومافوس اندازه گیری شده در فصل بهار پوک‌های مومی است که از قبل در کندو موجود بوده و به مرور کومافوس آزاد و وارد عسل گردیده است.

نشانی نگارندگان: خلیل طالبی، گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی کرج. علیرضا عباداللهی، مرکز آموزش عالی امام خمینی، تهران. سید احمد میرهادی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، صندوق پستی ۱۴۸۳-کرج، ایران. رسول مدنی، حصارک کرج، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بلقیس امامی یگانه، تهران، خیابان سید جمال‌الدین اسدآبادی، سازمان دامپزشکی کشور.