ФАРМАКОДИНАМИЯ ЩАВЕЛЕВОЙ КИСЛОТЫ В СЕМЬЕ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ

А. НАНЕТТИ[3], П. БАРТОЛОМЕЙ[1], Стефания БЕЛЛАТО[2], Мария де САЛВИО[2], Е. ГАТТАВЕКИА[2], Р. ГИНИ[2], ИТАЛИЯ

A. NANETTI[3], P. BARTOLOMEI[1], Stefania BELLATO[2], Maria De SALVIO[2], E. GATTAVECCHIA[2], R. GHINI[2]

[1] E.N.E.A. – U.F.I.S. sede di Montecuccolino, Bologna, ITALY, E-mail: istnapic@inapicoltura.org

[2] U.C.I. Scienze Chimiche Radiochimiche e Metallurgiche, Facoltà di Farmacia, Università di Bologna, ITALY

Tel.: +39 051 353103, E-mail: istnapic@inapicoltura.org

[3] Istituto Nazionale di Apicoltura, Bologna, ITALY, E-mail: istnapic@inapicoltura.org and ghini@biocfarm.unibo.it

Аннотация

Фармакодинамия щавелевой кислоты (ЩК), применяемой методом накапывания, экзаминирована радиохимическими методами. Сахарный сироп, содержащий ЩК, маркированную С14 накапывали в семью по технике и дозе, обычно применяемых в практике пчеловодства. Спустя 4 дня поражение взрослых пчел достигло 118 микрог/г, но сократилось до менее 1/10 и, соответственно, 1/60 спустя одной и, соответственно двух недель после обработки. В течение следующих месяцев регистрировано новое сокращение. Достоверно низкие уровни измерены у расплода 8-9-дневного возраста, который загрязнен только временно. Радиографии выявили присутствие ЩК во внутренних брюшных органах взрослых пчел.

В свежесобранном меду повышение уровня ЩК составляло 0,6 мг/г или меньше. Это лишь небольшая фракция натурального содержания ЩК меда. Радиоактивный маркер обнаружен и в воске свежеотстроенных сотов, но не ясно, причиной этого является непосредственное загрязнение, включающее химическую реакцию между свободной ЩК и воском или присутствие метаболитов, выработанных пчелами из абсорбированной ЩК.

Во втором эксперименте, проведенном по тем же методам применения учитывали и другие модели. Радиоактивный маркер присутствовал как в гемолимфе взрослых пчел, так и в пробах двуокиси углерода, взятых из семьи. Это, видимо, может подтверждать гипотез метаболизирования ЩК пчелами.

Ключевые слова: *Varroa/*остатки/щавелевая кислота/распределение

Введение

Накапывание сахарного раствора с добавлением щавелевой кислоты на пчелиные семьи (НАНЕТТИ и СТРАДИ, 1997) является распространенным методом борьбы с варроатозом во многих европейских странах. Проведено много экспериментов для проверки эффективности этого метода и установления толерантности к нему во многих технических условиях и условиях среды (НАНЕТТИ, 2002). Однако, наши знания об активном компоненте довольно бедны. Мало известна активность щавелевой кислоты внутри пчелиной семьи и в случае пчел индивидуально. Понимание этого явления, кроме чисто академического интереса, является очень важным для выяснения отрицательных эффектов обработки. Данные об остатках, обнаруженных в меду, показывают, обычно, невысокий риск сохранения чистоты меда после применения щавелевой кислоты (МУТИНЕЛЛИ с сотр., 1997; дель' НОЦАЛ, М.Ж. с сотр., 2000; БЕРНАРДИНИ, М. и ГАРДИ, Т., 2001; БОГДАНОВ с сотр., 2002; НАНЕТТИ, А. с сотр., 2002). Обычно применяемые техники не способны различать загрязнение щавелевой кислотой от загрязнения другим агентом, что в высокой степени зависит от ботанического происхождения меда (МУТИНЕЛЛИ с сотр., 1997; НАНЕТТИ с сотр., 2002).

Данная работа обогащает объем этих знаний. Распределение щавелевой кислоты изучено путем применения растворов с C_{14} и других радиохимических анализов.

Материал и методика

Эксперимент проведен двухкратно в течение летнего сезона 1999 и, соответственно, 2002 г недалеко от города Болоньи, Италия, во время медосбора. Из семей использована одна, содержаемая в двухкорпусном улье. В двух семьях двухразового эксперимента пчелы занимали все 10 сотов; из них 6-7 были заняты расплодом.

19 июля 1999 и, соответственно, 28 июля 2002, семьи обработаны щавелевой кислотой (накапаванием). Обработки проведены 50 и, соответственно, 41 мл водного раствора, содержащего 4,2% щавелевой кислоты и 60% сахара (вес/объем). Раствор накапывали шприцом. К растворам предварительно добавляли щавелевую кислоту с C_{14} (Sigma n.31, 391-2) в количествах, соответствующих 12,1 MBq и, соответственно, 7,4 MBq.

В случае двух повторений предобработанные пробы взяты как указано ниже. Эти пробы первоначально собраны раз (1999) или два раза в день (в 7 ч утра и 8 ч после обеда в 2002). Позже пробы собирали через более продолжительные интервалы.

В 1999 году использовали следующие пробы :
- взрослые пчелы с боковых сотов;
- расплод 8-9-дневного возраста;
- незапечатанный мед;
- воск со стен новоотстроенных ячеек (использовали искусственную вощину).

В 2002 году использовали следующие пробы:
- взрослые пчелы с боковых сотов;
- двуокись углерода из воздуха улья;
- воск с новоотстроенных сотов;
- свежий мед из новых сотов.

Пробы грудной гемолимфы взяты от пчел, собранных летом 2002. При этом использовали капиллярные пипетки Пастера (ФЛУРИ с сотр., 1981) и тюбики Эппендорфа. Передние крылья каждой пчелы отрезаны и фиксированы на микроскопических пластинках внешней частью вверх. Крылья с правой стороны оставили как таковые, а крылья с левой стороны обмыли дистиллированной водой. Кишки других пчел экстрагировали внимательно удаляя жало клещиками. Эти пробы оставлены при 40 ºС на микроскопических пластинках для медленного высыхания.

Для предоставления маткам большего простанства для откладывания яиц, на 5-й день эксперимента 2002 г был удален боковой сот с медом и заменен пустым. Перед началом обработки лишь верхняя часть замененного сота содержала мед. Затем он был постепенно заполнен до центральной части, где осталась зона незапечатанных ячеек с медом до момента замены.

Для сбора проб CO_2 внутри улья монтировали пластмассовую трубку. Внешний конец был закрыт пробкой а другой конец находился в центре расплодного гнезда. Были взяты меры для того, чтобы пчелы и капли раствора случайно не попадали в трубку. Все пробы, за исключением крыльев, кишек и медовых сотов были заморожены при -25 ºС до момента анализа.

Осуществлены авторадиографии промытых или не промытых крыльев, сухих кишек и медовых сотов, удаленных на 5-й день. Экспонирование продолжалось 33 и, соответственно, 23 дня для первых трех проб и, соответственно, сотов. Для интенсифицирования прилипания к фильму сот фиксирован на одной его стороне. Предупреждалось истекание меда осуществлением авторадиографии при –25 ºС. Пробы покрыты пластинкой политена (около 10 μм) для предупреждения непосредственного контакта с фоточувствительной эмульсией. Были использованы фильмы Кодак Биомакс MR1.

Измерение радиоактивности (инструменты и подготовка проб)

Все измерения радиоактивности осуществлены жидкой сцинтилляцией в счетчике Куантулуус 1220 (LKB, Швеция). Использованы ампулы полиэтилена (20 мл) и смесь сцинтилляции Ультима Гольд (Packard Canberra, США).

Пять лиофилизированных пчел взвешаны, перемолоты и подвешаны в известном объеме холодной щавелевой кислоты. Суспензию подвергли звуковым волнам в течение 10 мин., подогрели при 70-80 ºС и центрифугировали. 1 мл сверхплавающих добавлен в 18 мл счинтилляционной смеси (20 мл-ая ампула).

Проба меда (0,2 г) измерена в счинтилляционной ампуле непосредственно, разбавлена водой (1 мл) с добавлением 18 мл счинтилляционной смеси.

Проба 0,1 г воска разбавлена в 25 мл циклогексана и подвергнута звуковым волнам. 1 мл раствора добавили к 18 мл счинтилляционной смеси (20 мл-ая ампула).

Точно измеренная проба расплода 8-9-дневного возраста суспензирована в 5 мл холодной щавелевой кислоты, подвергнута звуковым волнам в течение 10 мин. Пробу подогрели при 60 ºС в течение 10 мин, после чего центрифугировали. Добавили три капли трихлоруксусной кислоты для просветления раствора. После второго центрифугирования 1 мл сверхплавающих добавили в 18 мл счинтилляционной смеси (20 мл-ая ампула).

Проба пыльцы суспензирована в 5 мл холодной щавелевой кислоты, подвергнута звуковым волнам в течение 10 мин. Пробу подогрели при 80 ºС в течение 10 мин, после чего центрифугировали. Сверхплавающую пробу фильтрировали микрофильтром, 1 μм. 1 мл полученного раствора добавили в 18 мл счинтилляционной смеси (20 мл-ая ампула).

1 мл гидроокиси гиамина из ловушки CO_2 добавили в 18 мл счинтилляционной смеси (20 мл-ая ампула).

Пробу гемолимфы (точный вес) перелили в последовательные количества счинтилляционной смеси до получения общего объема в 3 мл. При этом использовали 20 мл ампулу, содержащую 16 мл счинтилляционной смеси к которой добавили эти 3 мл.

Хроматография воска

Пробу воска, собранного в максимальном моменте радиоактивности разбавили в циклогексане и анализировали TLC (силикагель, Мерк). После элюирования ацетатом этила установлено распределение радиоактивности с помощью радиоскенера линейный скенер TLC, Бертольд, Германия).

Результаты и дискуссии

Взрослые пчелы и расплод

Рис. 1 показывает, что в случае взрослых пчел отмечено достоверное поражение спустя 24 часа после обработки в 1999 г. Один день спустя уровень был максимальным (118 µг/г). Понижение уровня имело постепенный характер, достигая на 7 и 11 день 10,8 и, соответственно, 2,0 µг/г. Если взять как сравнение вес пчелы в 100 мг, то загрязнение щавелевой кислотой составляло 12 µг, 1 µг и, соответственно, 0,2 µг. Эти постепенные понижения отмечены в течение следующих месяцев.

Figure 1. Contaminating oxalic acid in adult honey bees and in 8-9 day old brood.

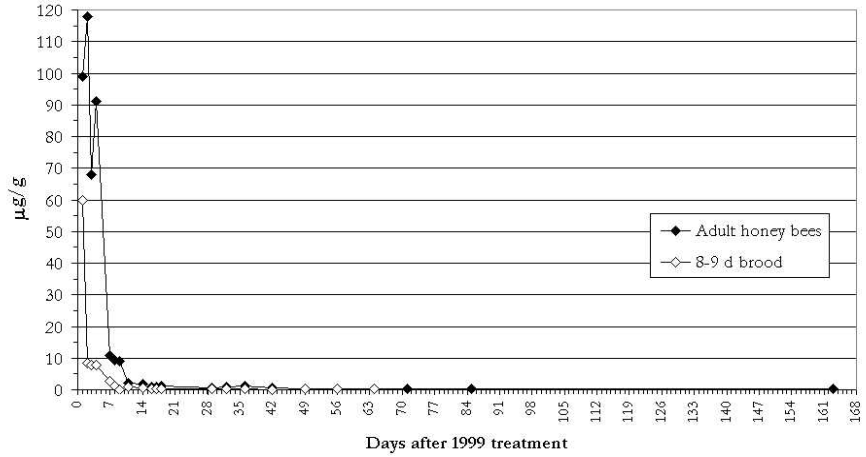

Рис. 1. Загрязнение щавелевой кислотой взрослых пчел и расплода 8-9-дневного возраста.
(µg/g = µг/г; adult honey bees = взрослые пчелы; 8-9 d brood = расплод 8-9-дневного возраста;
Days after 1999 treatment = дней после обработки в 1999 г.)

Более низкий уровень поражения отмечен у более взрослых личинок, незапечатанных (макс. значение – 60 µг/г). Как и у взрослых пчел, пик регистрирован спустя 24 ч после обработки. Но понижение началось намного раньше.

Во второй серии присутствие щавелевой кислоты C_{14} отмечено в гемолимфе медоносных пчел. Самое высокое значение (10 пг/мг) отмечено спустя 12 ч после обработки, после чего выявлено резкое понижение до 1,1 пг/мг спустя 84 ч после обработки. Радиоактивность почти полностью сократилась спустя месяц после обработки (Рис. 2).

Figure 2. Contaminating oxalic acid in honey bee haemolymph (left) and in CO2 (right).

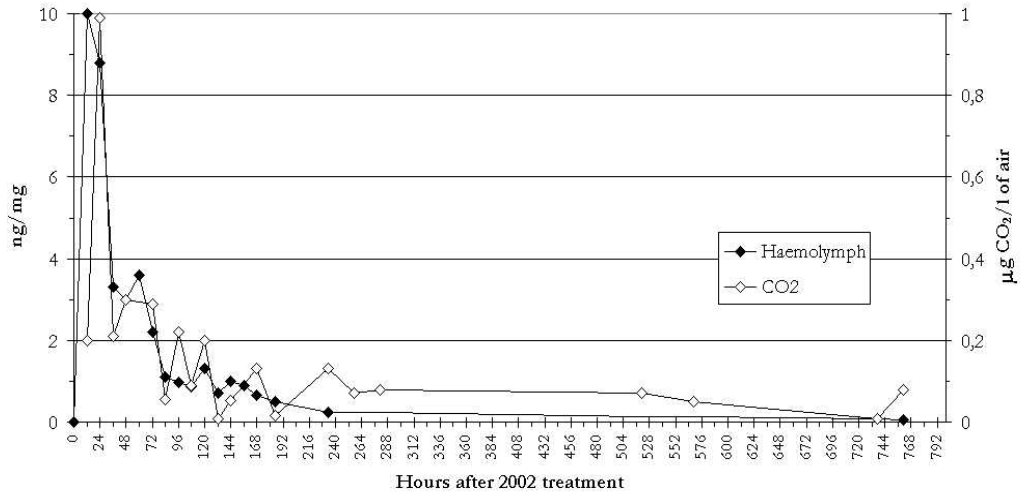

Рис. 2. Загрязнение щавелевой кислотой гемолимфы пчел (слева) и CO_2 справа)
(ng/mg = nr/мг; µg CO_2/l of air = µrCO_2/л воздуха; haemolymph = гемолимфа; CO_2;
Hours after 2002 treatment = часов после обработки в 2002 г)

Небольшие разницы отмечены в случае авторадиографияй необмытых крыльев и крыльев, тщательно обмытых для удаления щавелевой кислоты. Обе категории оставили на фильме четкие следы собственных жилков. Это, видимо, показывает пониженное внешнее загрязнение пчел и соответствует обнаруживанию загрязнения щавелевой кислотой гемолимфы.

Гипотез метаболизирования щавелевой кислоты пчелами поддерживается обнаруживанием радиоактивной CO_2 в экзаминированном внутри семьи воздухе (Рис. 2).

Что касается воздуха, из которого взяты пробы отмечено резкое понижение, после чего следовал ежедневный цикл вечером и сокращение рано утром. Хотя это явление нам не удалось выяснить, вероятно, разный уровень активности семьи днем и ночью может оказать влияние в этом случае.

Рис. 3 показывает распределение радиоактивности вдоль кишек пчел. Спустя 12 часов после обработки все кишечные тракты показали присутствие маркатора, после чего присутствие радиоактивного маркатора обнаружено только случайно внутри медового зобика. Вообще, загрязнение сокращалось со временени; взятые на 22 и 31 день пробы кишек не показывали загрязнений значительными количествами.

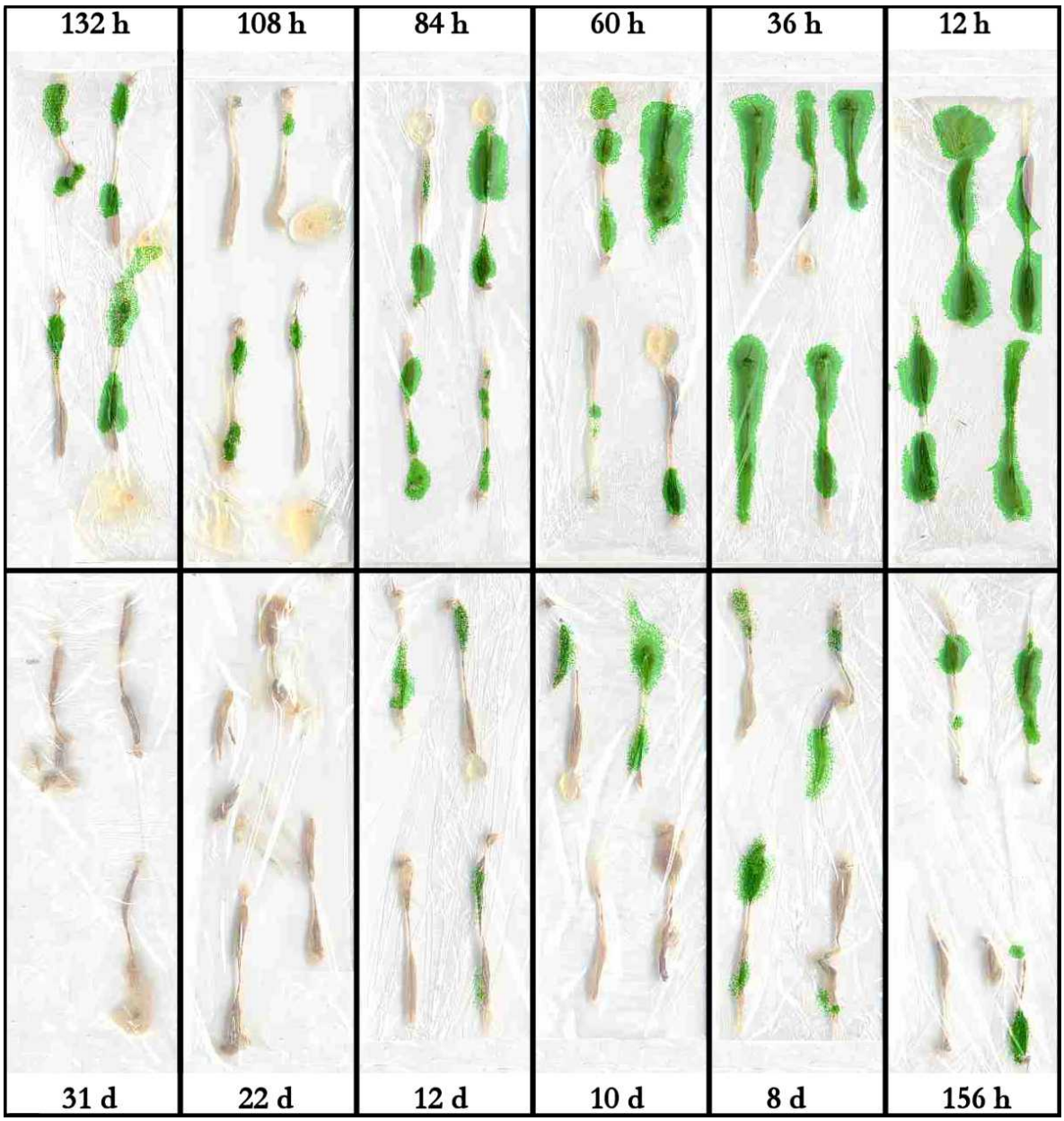

Рис. 3. Радиоактивность в кишках медоносных пчел (цветные зоны)

Воск и соты

Рис. 4 показывает радиоактивность, обнаруженную в пробах воска 1999 г. Пик отмечен с опозданием на 1 день по сравнению с взрослыми пчелами и расплодом. Несмотря на гидрофильное свойство щавелевой кислоты, отмечено присутствие радиоактивного маркатора C_{14} на продолжительное время. Хроматографические анализы некоторых проб показывают, что, вероятно, радиоактивная фракция воска может состоять из более чем одного компонента. Это может показывать, что, после обработки, не только кристаллы щавелевой кислоты могут находиться на сотах, но и что щавелевая кислота реагирует с воском и/или что ее метаболиты могут вести к синтезу определеннгого компонента воска у пчел, выделяющих этот продукт.

Figure 4. β-activity in new wax collected from pre-existing combs.

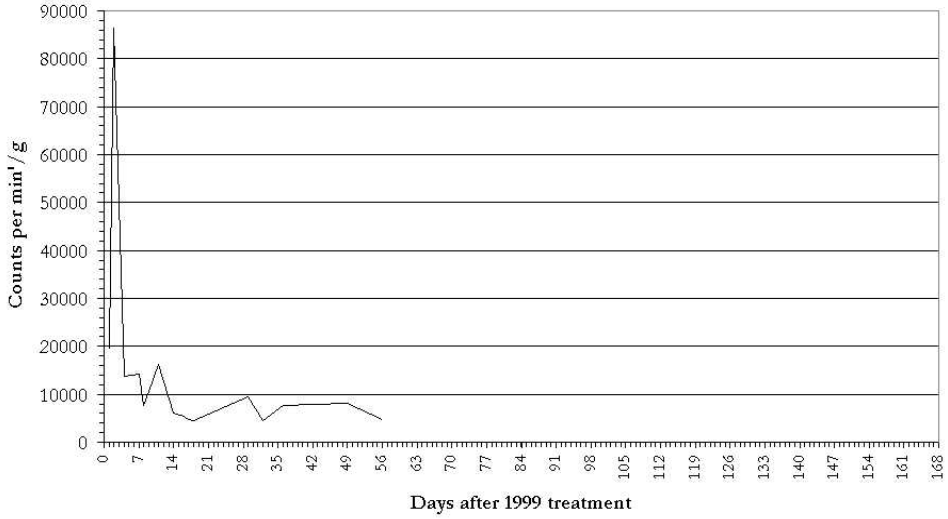

Рис. 4. В-активность из нового воска
(Counts per min^{1}/g = Исчисление в мин^{1}/г; Days after 1999 treatment = дней после обработки 1999 г)

В 2002 г радиоактивность обнаружена в пробах свежего воска. На рис. 5, все регистрированные сигналы превращены в концентрации щаведевой кислоты, но и в этом случае могут быть обнаружены неизвестные количества компонентов из химических реакций и/или метаболизации, что может вести к более или менее неправильному оцениванию загрязнения.

Figure 5. Contaminating oxalic acid in wax (see text) and honey.

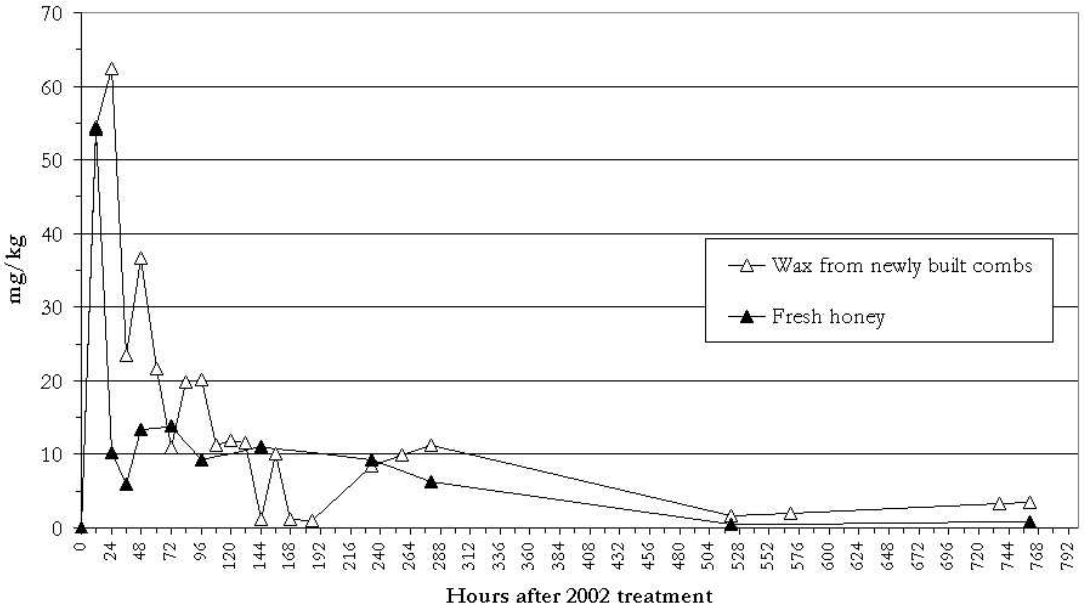

Рис. 5. Загрязнение воска и меда щавелевой кислотой
(mg/kg = мг/кг; Wax from newly built combs = Воск из свежеотстроенных сотов; Fresh honey = Свежий мед; Hours after 2002 treatment = Часов после обработки 2002 г)

Авторадиография на соте с медом (Рис. 6) показывает, что радиоактивный маркер рассеивался по соту. Верхняя зона темного цвета находится близко от пункта администрирования. В незапечатанных ячейках с медом загрязнение оказалось более сильным по краям ячейках, чем в самом меду.

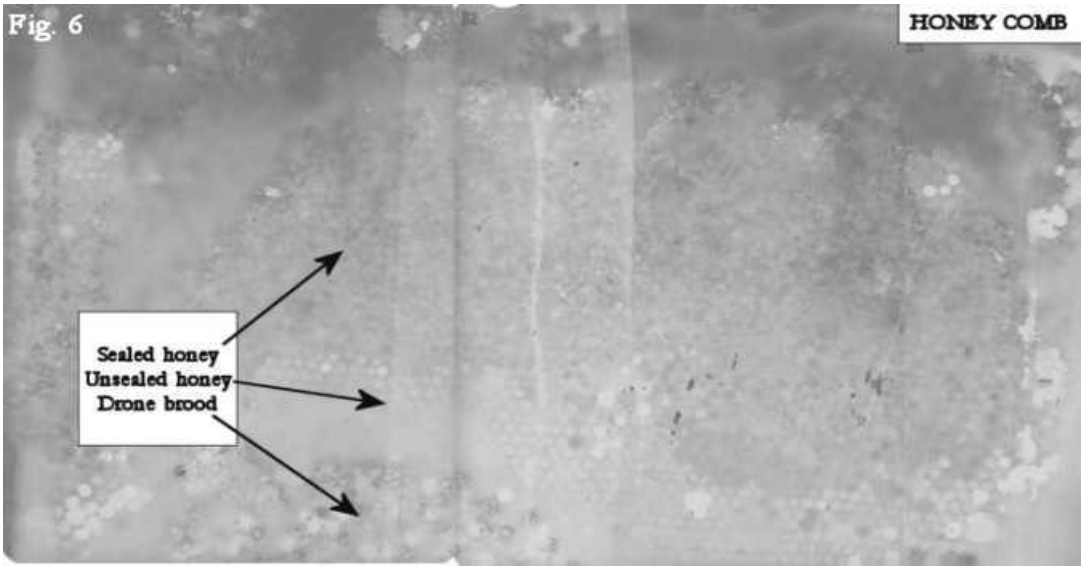

Рис. 6. Авторадиография медового сота. Изолированные пункты более темного цвета являются искусственными продуктами.
(Honey comb = Медовый сот; Sealed honey = Печатный мед; Unsealed honey = Незапечатанный мед; Drone brood = Трутневой расплод)

Остатки в меде

После обработки в 1999 г, содержание щавелевой кислоты в незапечатанном меде из магазинов повысилось до 0,59 мг/кг в 4-й день. Начиная с 8-го дня загрязнение было ниже 0,1 мг/кг. Пробы из запасов меда следующей осени продолжали содержать 0,07-0,1 мг/кг. Эти значения являются низкими по сравнению с натуральным содержанием щавелевой кислоты в меде (от 3 до 760 мг/кг) в зависимости от ботанического источника (НАНЕТТИ с сотр., 2002). Указанное выше показывает невысокий риск значительного загрязнения меда, предназначенного для экстрагирования.

В 2002 г мед собран из сотов, отстроенных пчелами в период между двумя взятиями проб, сокращая возможное влияние разбавления со существующим незагрязненным медом. Это более показательно дает данные о реальной передаче от пчел меду. В этом случае, максимальный уровень 54,2 мг/кг регистрирован спустя 12 ч после обработки (Рис. 5), но следовало резкое снижение до значений 6 и 13,8 мг/кг в первые 1-12 дней после обработки. Следующие регистрирования показали значения ниже 1 мг/кг.

Выражение благодарности

Авторы глубоко благодарят проф. Мария Аделаида ВЕККИ от Болоньского Университета и проф. Адриано ПОДЕСТА от Университета в Пизе за благотворные дискуссии и ценные советы.

Л И Т Е Р А Т У Р А

Bernardini M., Gardi T. (2001), Impatto degli interventi sanitari per il controllo dell'acaro varroasulla qualità del miele e della cera. *Apitalia* 28(7-8): 21-24

Bogdanov S., Charrière J.D., Imdorf A, Kilchenmann V., Fluri P. (2002), Determination of residues in honey after repeated field trials with formic and oxalic acid. *Apidologie* 33(4): 399-409

Del Nozal M.J., Bernal J.L., Diego J.C., Gómez L.A., Ruiz J.M., Highes M. (2000), Determination of oxalate, sulphate and nitrate in honey and honeydew by ion-chromatography. *J. of Chromatography* 881: 629-638

Fluri P., Sabatini A.G., Vecchi M.A., Wille H. (1981), Blood juvenile hormone, protein and vitellogenin titres in laying and non-laying queen honeybees. *J. Apic. Res*. 20(4): 221-225

Mutinelli F., Baggio A., Capolongo F., Piro R., Biasion L. (1997), L'acido ossalico nella lotta alla varroasi. L'ape nostra amica (4): 4-7

Nanetti A. (2002), Oxalic acid treatments for varroa control (review). Symposium "Prevention of residues in honey", Celle (Germany), October 10-11, 2002

Nanetti A., Ghini S., Gattavecchia E., Bartolomei P., Marcazzan G.L., Massi S. (2002), Pharmacodynamics of oxalic acid and treatment residues in honey. Symposium "Prevention of residues in honey", Celle (Germany), October 10-11, 2002. Poster session

Nanetti A., Stradi G. (1997), Oxalsäure-Zuckerlösung zur Varroabekämfung. Allg. Dtsch. Imkerztg 31 (11): 9-11