

MAREK SOKOŁOWSKI, GRAŻYNA JURKIEWICZ

Diagnostyka zatruc pszczoł preparatami ochrony roślin z grupy karbaminianów

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Warszawie

Na przestrzeni ostatnich lat zanotowano bardzo znaczny wzrost zatruc pszczoł, spowodowany niewłaściwym zastosowaniem i wykonaniem zabiegów ochrony roślin preparatami z grupy karbaminianów (1, 9, 17, 18). Insektycydy karbaminianowe zostały wprowadzone w miejsce węglowodorów chlorowanych, na które wiele szkodników wykazywało dużą odporność. Preparatami należącymi do tej grupy, dopuszczonymi do obrotu w Polsce i wywołującymi najczęstsze zatrucia pszczoł są: Karbatox pylisty-5, Karbatox zawieszinowy-75, Gammakarbatox, Karbatox Ekstra P (9, 17).

Dawka toksyczna karbarylu na pszczołę przy działaniu kontaktowym wynosi 3×10^{-7} g. Związki te należą do I klasy toksyczności dla pszczoł, o okresie prewencji wynoszącym 7 dni (9, 18). Pesticydy karbaminianowe, podobnie jak estry kwasu fosforoorganicznego są silnymi inhibitorami aktywności hydrolazy acetylocholinowej (1, 9, 17).

Znanych jest kilka metod oznaczenia tych związków w materiale biologicznym (8, 14, 15, 16, 19). Powodem podjęcia jednak niniejszej pracy był brak danych piśmiennictwa dotyczących identyfikacji karbarylu w zatrutych pszczołach.

Materiał i metody

Do doświadczenia użyto dwie grupy żywych pszczoł, o wadze 60 g każda. Jedną z nich opylono 12 mg preparatu Gammakarbatox, a drugą 12 mg preparatu Karbatox Ekstra P. Zatrute pszczoły po 24 godzinach wykorzystano do badań laboratoryjnych, których celem było określenie stopnia inhibicji esterazy acetylocholinowej oraz stwierdzenie obecności HCH i karbarylu — składników czynnych preparatu Gammakarbatox oraz karbarylu i chlorfenwinfosu — składników czynnych preparatu Karbatox Ekstra P.

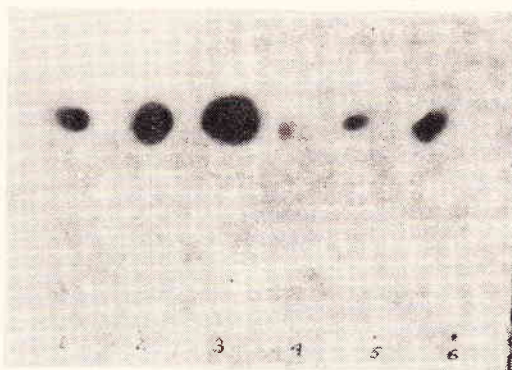
Ekstrakcja karbarylu i chlorfenwinfosu

Odważono 30 g zatrutych pszczoł i umieszczono w kolbie stożkowej na szlif o pojemności 250 ml, a następnie zalano 30 ml chloroformu. Całość wytrząsano mechanicznie przy maksymalnych oscylacjach przez 30 min. Następnie ekstrakt odsączono przez sączek średni. Z tak otrzymanego przesączu pobrano 1 ml do oznaczania stopnia zahamowania esterazy cholinowej, które wykonano wg metody Ellmana i wsp. (4) w modyfikacji opisanej przez Jurka (7). W badanych próbkach stwierdzono 95,75% zahamowania aktywności ww. enzymu.

Identyfikacja karbarylu

Uprzednio otrzymany ekstrakt zagęszczono do objętości 1 ml i nanoszono na kolejne tory płytki chromatograficznej, pokrytej żelem krzemionkowym wg Stahla o grubości 0,3 mm. Ekstrakt z pszczoł nanoszono w ilościach: 20, 50 i 100 μ l równolegle ze standardem, którego zawartość wynosiła 20, 50 i 100 ng karbarylu.

Chromatogram rozwijano do wysokości 20 cm od linii startu. Układ rozwijający stanowiła mieszanina chloroformu i acetonu w stosunku 9:1. Czas rozwijania płytki wynosił 25—30 min. Wyjęte płytki suszono w strumieniu zimnego powietrza a następnie umieszczano je w komorze nasyconej parami bromu na okres 20—30 sek. Po zakończeniu procesu bromowania, płytki spryskano roztworem chorku palladawego (0,5 g chorku palladawego + 2 ml stężonego kwasu solnego, całość uzupełniono wodą destylowaną do 100 ml). Płytki suszono na powietrzu. Po około 20—30 minutach karbaryl dawał plamy barwy pomarańczowo-brunatnej o Rf 0,62—0,64, których intensywność nasilała się po włożeniu pod lampę kwarcową. Przykładowy chromatogram przedstawiono na ryc. 1.



Ryc. 1. Plamy 1, 2 i 3 odpowiadają 20, 50 i 100 ng karbarylu; plamy 4, 5 i 6 odpowiadają 20, 50 i 100 μ l naniesionego ekstraktu pszczoł

Fot. I. Holly

Ekstrakcja lindanu

Odważono 25 g pszczoł zatrutych Gammakarbatoxem do kolby stożkowej na szlif o pojemności 250 ml i zalano je 75 ml 35% roztworem acetonu w wodzie. Wytrząsano mechanicznie przez 20 minut. Następnie dodano 37,5 ml eteru naftowego i ponownie wytrząsano przez 20 minut. Z kolei wprowadzono 150 ml 2% roztworu Na_2SO_4 . Całość wytrząsano 1—2 min., pozostawiając do rozdzielenia warstw. Następnie dodano taką ilość 2% roztworu Na_2SO_4 , aby górny menisk warstwy eterowej był w odległości 1—2 cm od dolnej krawędzi szlif kolby. Z warstwy eterowej pobrano 3 ml ekstraktu przenosząc go na kolumnę chromatograficzną o wymiarach 20×30 mm. Kolumnę wypełniono warstwami: 2 g florisilu i 2 g bezwodnego Na_2SO_4 . Eluację prowadzono przy użyciu 20 ml 6% mieszaniny eteru etylowego z eterem naftowym. Eluat zbierano przy szybkości 1 kropla na 5 sek. do kolby miarowej o pojemności 25 ml.

Identyfikacja lindanu

Oznaczanie lindanu wykonano przy użyciu chromatografu gazowego Pey Unicam seria 104. Zastosowano kolumnę szklaną o długości 2,7 m i średnicy wewnętrznej 4 mm, wypełnionej 7,5% SE — 30 na Chromosorbie WAW DMSC 80/100 mesh. Temperatura kolumny 205°C; detektor rekombinacyjny Ni 63; temperatura detektora 250°C; gaz nośny argon o przepływie 90 ml na minutę.

Pszczół z drugiego doświadczenia zatrute Karbatoxem Ekstra P poddano identyfikacji na obecność drugiego składnika czynnego — chlorfenwinfosu. Użytkany uprzednio zagęszczony wyciągu z pszczoł naniesiono na kolejne tory płytki chromatograficznej pokrytej żelazem krzemionkowym wg Stahla o grubości 0,3 mm. Ekstrakt nanoszono w ilościach: 20, 50 i 100 μ l równolegle ze standardem, którego zawartość wynosi 50, 100 i 200 ng chlorfenwinfosu. Identyfikację chlorfenwinfosu przeprowadzono wg metody Mendozy i wsp. (11, 12, 13). Źródło enzymu stanowiła surowica końska, a chromogennym substratem był buforowany roztwór octanu indoksyliu.

Omówienie wyników i wnioski

Spośród metod oznaczania karbarylu zastosowanie znalazły metody: chromatograficzne (5, 8, 19), enzymatyczne (10, 19), polarograficzne (6), fluorometryczne (3, 15), kolorometryczne (16). Powszechnie jednak stosowaną metodą identyfikacji karbaminianów przez wielu badaczy (2, 14) jest chromatografia cienkowarstwowa, uwzględniająca enzymatyczną hydrolizę tych pestycydów do 1-naftolu (10). Ww. metodę zastosowano również w naszym laboratorium w 1974 r. Okazała się ona jednak mało przydatna ze względu na swą pracochłonność oraz brak powtarzalności uzyskiwanych wyników. Opisaną wyżej metodę zastosowano do badań rutynowych przy identyfikacji karbaminianów. Dotychczas tą metodą zbadano 486 prób pszczoł i roślin nadesłanych do Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Warszawie.

Opracowaną przez nas metodę cechuje: krótki czas analizy i powtarzalność wyników. Pozwala ona również na pominięcie procesu hydrolizy karbarylu.

Opisana metoda jest przydatna zarówno przy wykrywaniu samego karbarylu jaki i jego metabolitów. Ma to zasadnicze znaczenie w diagnostyce rutynowej z uwagi na procesy rozkładu substancji czynnych w zatrutych pszczołach w zależności od czasu jaki upływa od zatrucia do podjęcia badań laboratoryjnych.

Piśmiennictwo

1. Bohosiewicz M.: Toksykologia Weterynaryjna. PWRiL 1970.
2. Buliński R., Szydłowska E.: Bromatologia i chemia toksykologiczna, 9, 363, 1976.
3. Daniel E. O., Ittag M., Fristad H.: J.A.O.A.C. 54, 160, 1971.
4. Ellman G., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M.: Biochem. Pharmacol. 7, 88, 1961.
5. Faucheur L. J.: J.A.O.A.C. 51, 676, 1968.
6. Gajan R. J., Benson W. R., Finocchiaro J. M.: J.A.O.A.C. 48, 958, 1965.
7. Jurek A., Syrowatka T.: Roczniki PZH 22, 682, 1971.
8. Juszkiewicz T., Zuk M., Cybulski W., Minta M.: Medycyna Wet. 32, 272, 1976.
9. Kostecki R., Lipa J.: Zatrucia pszczoł. PWRiL 1969.
10. Maier-Bode H.: Pflanzenschutzmittel Ruckstande. Stuttgart 1965.
11. Mendoza C., Wales P., Mc Leod., Mc Kinley W.: Analyst 93, 94, 1968.
12. Mendoza C., Wales P., Mc Leod., Mc Kinley W.: Analyst 93, 173, 1968.
13. Mendoza C., Grant D., Braceland B., Mc Cully K.: Analyst 93, 805, 1963.
14. Piechocka J.: Roczniki PZH 26, 81, 1975.
15. Piechocka J.: Roczniki PZH 24, 409, 1973.
16. De Riveros M., Vonesch E.: J.A.O.A.C. 55, 1083, 1972.
17. Rustecki W.: Toksykologia środków ochrony roślin. PZWL 1966.
18. Zniszczyński Z.: Pszczelarstwo. 6, 7, 1975.
19. Zweig G., Archer T. E.: J. Ar. Food. Chem. 6, 911, 1958.

Adres autora: lek. wet. Marek Sokołowski, ul. Górczewska 120 a m 55, 01-460 Warszawa.

Соколовски М., Юркевич Г. — Диагностика интоксикаций пчёл препаратами защиты растений из группы карбаминатов.

Авторы предложили метод определения карбарыла в отравленных пчелах. Карбарил определяли методом тонкослойной хроматографии. Проявляющей фазой была смесь хлороформа и ацетона (9:1). После проявления пластинки спрыскивали раствором хлорида палладия. Карбарил определяли оранжевые пятна $R_f = 0,62-0,64$. Метод позволяет проявить карбарил и его метаболиты. В лаборатории авторов метод применяют, получая хорошие результаты, с 1975 г.

Sokołowski M., Jurkiewicz G. — Determination of intoxication of honey bees with carbaminian pesticides-plant protection prepares.

The authors have proposed a method of the determination of carbaryl in intoxicated bees. Carbaryl was determined by thin layer chromatographic method. As a movable phase chloroform and acetone (9:1) were applied. The spots were developed with a solution of palladium chloride. The spots of carbaryl organe in colour have $R_f 0.62-0.64$. The applied method enables to determine carbaryl as well as its metabolites in intoxicated bees.

The method was used in authors laboratory since 1975 with good results.

ALDASY P., MOCSARI E., CHRIVNAK G.: Występowanie wirusowych chorób oddechowych i jelitowych na Węgrzech. (The incidence of viral respiratory and enteric diseases of cattle in Hungary). Vet. Med. Nauki 12, 12-13, 3, 1975.

W wielkotowarowych hodowlach bydła na Węgrzech wyisobniono 90 razy adenovirus, 9 razy wirus dyzenterii cieląt (VD/MD), 7 razy wirus zapalenia nosa i tchawicy (IBR/IPV), 3 razy wirus parainfluenzy (PI-3) i 3 razy chlamydie. Przeciwciała przeciwko IBR/IPV stwierdzano średnio w 11,82%, przeciwko VD/MD w 36,72%, przeciwko adenowirusom w 56,04% i przeciwko chlamydiom w 9,05% zbadanych zwierząt. Przeciwciała dla wirusa PI-3 ze względu na ich bardzo częste występowanie nie badano. Przeciwciała dla adenowirusów i wirusa VD/MD znajdowano częściej w hodowlach, gdzie występowały zachorowania, niż w hodowlach zdrowych.

Prawidłowości tej nie wykazano w stosunku do przeciwciała wirusa IBR/IPV i chlamydii. Za przyczynę zachorowań autorzy uważają zakażenie kilku rodzajami wirusów. Szczepionka przeciwko wirusom VD/MD, IBR/IPV oraz adeno- przyczyniła się do obniżenia strat ekonomicznych hodowli.

J.

MENGELING W. L., CUTLIP R. C.: Patogenność terenowych hemaglutynujących szczepów wirusa zapalenia mózgu i rdzenia dla nowo narodzonych prosiąt. (Pathogenicity of field isolants of hemagglutinating encephalomyelitis virus for neonatal pigs). J. Amer. vet. med. Ass. 168, 236-239, 1976 (3).

Oznaczonej patogenności terenowych szczepów hemaglutynujących wirusa zapalenia mózgu i rdzenia dla nowo narodzonych prosiąt. Wirus wyizolowano z mózgu 5 prosiąt, u których badaniem klinicznym i histopatologicznym zdiagnozowano tę chorobę. Każdym ze szczepów zakażono donosowo 5 prosiąt. Choroba w formie ostrej lub chronicznej występowała między 5-8 dniem po zakażeniu. Wśród objawów klinicznych dominowało osłabienie, utrata łaknienia i wymioty. W postaci ostrej występowało drżenie mięśni, przeczulica skóry oraz niechęć do poruszania się. U prosiąt padłych lub poddanych ubojowi występowały w mózgu wokółnaczyńnicowe nacieki komórek jednojądrzastych, gliozja i neuronofoglia.

G.