

kaj. Vpliv teh kombinacij na človeški organizem za zdaj še ni znan. Kot navaja publikacija PAN Europe »New scientific understanding of health impacts of pesticides calls for precautionary policy-making«, izdana decembra 2006, so študije pokazale, da lahko kombinacija majhnih količin ostankov različnih pesticidov vpliva na telo na popolnoma drugačen način kot posamezne kemikalije. Po navedbah omenjene publikacije je učinek ob zaužitju ostankov treh različnih pesticidov hkrati 100-krat večji kot učinek katerega koli izmed teh pesticidov, če bi ga zaužili

samostojno. Ker se v enem živilu pogosto pojavljajo ostanki več različnih pesticidov, zdaj še ne vemo, kako to vpliva na naše telo, čeprav so količine ostankov posameznih pesticidov manjše od dovoljenih.

Tisoče sintetičnih kemikalij, ki so do zadnjega kotička zapolnile sodobni svet, jemljemo kot nekaj samoumevnega, kot nekaj, kar je pač sestavni del napredka. Napredka? Toda, ali je vse bolj množično zastrupljanje prebivalstva res napredek? Ali je napredek dejstvo, da je zdajšnja populacija najbolj bolna v vsej zgodovini človeštva? ■



Toksičnost eteričnih olj in organskih kislin, s katerimi so krmili čebele (*Apis mellifera*)

Prevod in priredba: **Maja Smodiš Škerl**, Kmetijski inštitut Slovenije

Besedilo: **Ebert, T. A., Kevan, P. G., Bishop, B. L., Kevan, S. D., Downer, R. A.**

Oral toxicity of essential oils and organic acids fed to honey bees (*Apis mellifera*). Journal of apicultural research, 46(4): 220-224.

Povzetek

V raziskavi so preučevali naravne rastlinske produkte, ki bi jih morebiti lahko uporabili kot fumigante, torej kot takšne, ki v panju zavirajo razvoj varoj, pa tudi različnih drugih bolezni. Med poskusom so čebele krmili v kletkah, v katerih je bila temperatura nekoliko nižja, saj so s tem preprečili izhlapevanje teh snovi ter posledično ugotavljali neposreden vpliv učinkovin na nekatere čebelje bolezni. Zanimalo jih je predvsem ravnovesje med učinkovitim zatiranjem bolezni in stopnjo, na kateri so sredstva za čebele strupena. Pri odraslih čebelah so preverjali toksičnost desetih sredstev: evkaliptovega olja, klinčkovega olja, mravljinčne kisline, majaronovega olja, mentola, oranovega olja, oksalne kisline, žajbljevega olja, timola in olja zelenike. Pripravili so različne koncentracije teh sredstev v sladkorni raztopini in z njo nekaj dni krmili čebele, vsak dan pa so šteli mrtvice. Najbolj strupena je bila oksalna kislina. Pri mentolu in evkaliptovem olju je bila umrljivost podobna umrljivosti v kontrolni skupini čebel, ki so jih osem dni krmili zgolj s sladkornim sirupom. Štirinajst dni po vstavitvi je bila najmanjša toksičnost olja zelenike, vendar utegne biti takšna tudi pri mentolu in evkaliptovem olju, saj teh dveh sredstev niso zajeli v 14-dnevno testiranje.

Rezultati kažejo, da bi ta sredstva lahko neškodljivo uporabljali v čebelji družini, vendar le, če bi previdno odmerjali njihovo koncentracijo.

Uvod

V čebeljih družinah je za zatiranje pršice mogoče uporabljati različna esencialna olja in organske kisline v obliki fumigantov (Imdorf in sod., 1999) ali kontaktnih pripravkov (Amrine in sod., 1996). Vendar uporaba fumigantov zahteva primerno temperaturo za izhlapevanje, zato so ob hladnejšem vremenu manj učinkoviti (Scott-Dupree&Otis, 1992). Ne nazadnje so organske kisline, kot je mravljinčna, in esencialna olja, kot je timol, zelo učinkoviti pri zatiranju varoj (Imdorf in sod., 1999). Z uporabo oralne aplikacije se izognemo izhlapevanju, vendar je ta način pogosto zanemaren. Mentol lahko dodajamo čebelah v obliki mikrokapsul in na ta način zavremo razvoj pršice *Acarapis woodi* (Kevan in sod., 1997, 2003). Seveda pa moramo ta olja in organske kisline uporabljati na način, ki za čebele ne bo škodljiv. V prejšnjih raziskavah so preučevali morebitno zastrupitev z aktivno učinkovino sredstva (Kevan in sod., 1999). Za kontrolo so uporabili rastlinsko sestavino amigdalín (glikozidni prah iz mandljev in sorodnih semen, v medicini se po večini uporablja kot sredstvo za izkašljevanje, op. p.), ki je za čebele strupen (Kevan in Ebert, 2005), in še enkrat preizkusili mentol, ki naj bi bil za čebele nestrupen (Kevan in sod., 1999).

V tej raziskavi so ugotavljali, kolikšen odmerek izbranih naravnih rastlinskih snovi je za čebele strupen oziroma kolikšen odmerek bi v čebeljih družinah



lahko uporabljali za zdravljenje bolezni. Ker je pomemben tudi čas izpostavljenosti tem pripravkom, so prav tako preučevali vpliv odmerka in časa izpostavljenosti na umrljivost čebel.

Materiali in metode

Čebele (*Apis mellifera ligustica*), ki so jih uporabili za ta preizkus, so odvzeli iz panjev Centra za raziskave in razvoj kmetijstva v Ohio, ZDA, in jih namestili v kletke (podobne sta uporabila že Kulinčević in Rothenbuchler leta 1973, pozneje sta jih opisala tudi Kevan in Ebert, 2005). V vsaki kletki je bilo povprečno po 48 čebel. Krmili so jih z 69-odstotnim sladkornim sirupom oziroma z 69-odstotno sladkorno raztopino, ki so ji dodali enega od desetih naravnih rastlinskih produktov: evkaliptovo olje, klinčkovo olje, mravljično kislino, majaronovo olje, L-mentol, DL-mentol, origanovo olje, oksalno kislino, žajbljevo olje, timol in olje zelenike. Za klinčkovo olje so uporabili komercialni ekstrakt iz *Eugenia caryophyllata* Thunb. (Myrtaceae). Najpomembnejše sestavine klinčkovega olja so evgenol, evgenol acetat, iso-evgenol in kariofilen (<http://www.essentialoils.co.za/essential-oils/clove.htm>).

Za origanovo olje so uporabili komercialni ekstrakt iz *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae), katerega pglavitne sestavine so karvakrol, p-cimen, y-terpinen in b-kariofilen (Chorianopoulos in sod., 2004). Majaronovo olje so pridobili iz komercialnega ekstrakta *Origanum marjorana* L. (Laminaceae), ki vsebuje najpomembnejše kemične sestavine, kot so sabinen, a-terpinen, y-terpinen, p-cimen, terpinolen, linalol, cis-sabinen hidrat, linalil acetat, terpinen-4-ol in y-terpineol (<http://www.essentialoils.co.za/essential-oils/marjoram.htm>).



Testirano naravno sredstvo: klinčkovo olje
Foto: MB

	1. dan povprečje	Povprečen % umrljivosti		Število vseh testiranih čebel
		% smrtnosti	8 DT 1000 ppm 14 DT 100.000 ppm*	
Pripravki				
amigdalín	0	79**		221
evkaliptovo olje	2	11		214
klinčkovo olje	3	28	96	927
kontrola s sladkornim sirupom	1	10	40	1189
kontrola brez hrane	46	100***	100**	495
mravljična kislina	1	33	100	1438
majaronovo olje	2	34		308
DL-mentol	1	25		256
L-mentol	1	21		239
origanovo olje	1	41	92	953
oksalna kislina	6	96	100	1217
žajbljevo olje	3	21	87	1289
timol	8	43		201
olje zelenike	1	24	99	1308

Tabela 1. Umrljivost po 24 urah, povprečna umrljivost čebel po 8. in 14. dnevu zdravljenja (DT) z različnimi esencialnimi olji in organskimi kislinami ter število testiranih čebel (vsota vseh ponovitev in odmerkov).

*Polja brez podatkov so prazna. **Odmerek za amigdalín je bil 2250 ppm. ***Vse čebele so odmrle v štirih dneh.

Žajbljevo olje je komercialni ekstrakt iz *Salvia sclarea* L. (Lamiaceae). Najpomembnejše kemične sestavine tega olja so linalol, a-terpenol, linalil acetat, neril acetat in sklareol (Pitarokill in sod., 2002). Vse raztopine, vključno s kontrolno, so vsebovale 5 ml dodanega etanola do končne prostornine 100 ml. Netopne sestavine so najprej raztopili v etanolu, nato pa so jih do prostornine 100 ml zamešali v sirup. Da bi izključili vpliv sestavin, dodanih hrani, na zmanjšan apetit, so uporabili še kontrolno skupino čebel, ki ni imela na voljo ne hrane ne vode. Na ta način so lahko razlikovali med toksičnostjo in smrtjo zaradi stradanja in dehidracije.

Čebele so poljubno krmili ves čas trajanja poskusa. Vsako zdravljenje so ponovili štirikrat. Mrtvice so preštevali vsak dan in jih sprosti odstranjevali iz kletke. Po koncu poskusa so preživele čebele zamrzili in prešteli. Kletke so postavili v prostor s temperaturo od 17 do 25 °C in relativno vlažnostjo 18–37 %. Obravnavali so rezultate dveh poskusov. Pri prvem so ugotavljali dnevno toksičnost morebitnih zdravil v osmih dneh pri koncentracijah 100 in 1000 ppm (število delcev na milijon, op. p.). Pri drugem pa so ugotavljali toksičnost evkaliptovega olja, mravljične kisline, oksalne kisline, origanove-

ga in žajbljevega olja v primerjavi s kontrolno skupino, ki so ji 14 dni dodajali samo sladkorni sirup, in s kontrolno skupino, ki je bila 14 dni brez hrane. Koncentracije v drugem testu so bile: 100, 500, 1000, 5000, 10.000 in 100.000 ppm. Razlik v toksičnosti teh produktov niso zaznali.

Podatke so statistično obdelali v programu SAS.

Rezultati

Za primerjavo so vključili rezultate zatiranja z amigdalinom (Kevan & Ebert, 2003). Z izjemo amigdalina so vse preizkušene spojine neškodljive. Čeprav je oksalna kislina v primerjavi s drugimi snovmi strupena (tabela 1), je v tabeli 2 njena toksičnost skoraj za polovico manjša od toksičnosti amigdalina.

V prvih 24 urah je odmrlo 40 % čebel, ki so bile brez hrane in vode, v štirih dneh pa so odmrle vse (tabela 1). Najusodnejše so bile visoke koncentracije oksalne kisline, v primerjavi s skupino čebel brez hrane in vode pa je bilo prvi dan poskusa v teh družinah manj mrtvic. Največja koncentracija oksalne kisline je povzročila 100-odstotno odmrtnost, pri najnižji koncentraciji pa je po 14 dneh vstavljanja te kisline odmrlo 60 % čebel (v kontrolni skupini je bila umrljivost 40-odstotna). Po toksičnosti je bila na drugem

Pripravki	Molarnost*	LT ₅₀ v dnevih
amigdalini**	0,0049	4,6
evkaliptovo olje	0,0065	NS
klinčkovno olje		11,2
kontrola s sladkornim sirupom		17,0
kontrola brez hrane		1,9
mravljična kislina	0,0217	11,8
majaronovo olje		27,0
mentol	0,0064	NS
origanovo olje		10,8
oksalna kislina	0,0111	4,8
žajbljevo olje		11,5
timol	0,0067	NS
zelenika	0,0029	14,4

Tabela 2. Ocena LT50 (čas, pri katerem pogine 50 % testiranih živali) za potencialne pripravke pri 1000 ppm. Primerjava podatkov 1. in 2. testiranja in ocena LT50. Vsi modeli, razen posebej označenih, so različni ($\alpha \leq 0.01$), prav tako tudi testi neskladnosti ($\alpha \leq 0.01$).

NS = model ni značilen. Pri teh poskusih umrljivost ni dosegla 50 %, zato ni drugih ocen.

***Molarnost – razmerje med množino topljenca in maso topila. Rastlinski ekstrakti so mešanica različnih snovi, zato molarnosti ni mogoče izračunati za vsako snov posebej.**

****Koncentracija amigdalina je bila 2250 ppm; to je sicer najnižja koncentracija, ki sta jo testirala Kevan in Ebert (2005).**

Pripravek	LD ₅₀ v ppm
amigdalini	1600
klinčkovno olje	7800
mravljična kislina	5600
origanovo olje	14900
oksalna kislina	NS
žajbljevo olje	NS
zelenika	13500

Tabela 3. Ocena LD50 za testirana eterična olja in organske kisline 8. dan vstavljanja

NS = model ni značilen ($\alpha \leq 0.01$). Oksalna kislina je bila preveč toksična, umrljivost pri uporabi žajbljevega olja pa preveč različna.

mestu mravljična kislina (zadnje čebele so pri najvišji koncentraciji odmrle 8 dni po vstavitvi). Pri najnižji koncentraciji pa je bila po 14 dneh umrljivost le 30-odstotna. Velika stopnja umrljivosti pri najvišji koncentraciji je bila tudi pri uporabi nekaterih drugih pripravkov. Nasprotno pa lahko rečemo, da evkaliptovo olje, mentol, majaronovo olje in timol niso strupeni za čebele, saj je bila umrljivost pri testiranih koncentracijah vedno nižja.

Vsa sredstva, uporabljena v poskusu, so bila veliko manj toksična kot amigdalini. Čeprav je vrednost LD50 (odmerek, pri katerem pogine 50 % testiranih živali) za oksalno kislino in amigdalini podob-

Pripravek	LD ₅₀ v ppm	Standardna napaka v Log ₁₀ (odmerek)
klinčkovno olje	240	0,1483
mravljična kislina	450	0,0653
origanovo olje	600	0,1327
oksalna kislina	80	0,0635
žajbljevo olje*	NS	
zelenika	800	0,0632

Tabela 4. LD50 vrednosti po 14 dneh uporabe

***Odmerek ni imel vpliva.**

na, bi enako toksičnost dosegli šele z dvakrat večjim številom molekul oksalne kisline (tabela 2). Če primerjamo LD50 osmi dan po vstavitvi (DT), je najbolj toksična oksalna kislina (tabela 3). Model v tem primeru ni značilen ($\alpha \leq 0.01$), ker je bila umrljivost pri vseh vstavitvah previsoka in preveč različna (povprečna umrljivost pri najnižjem odmerku je 50 % +/- 40 % SD – standardni odklon). Prav tako ni značilen model za žajbljevo olje ($\alpha \leq 0.01$), saj je celo pri najvišjem odmerku smrtnost le 60 % +/- 40 % SD.

Kritična točka morebitne koristnosti sredstev, uporabljenih pri poskusu, je njihov dolgotrajen vpliv na zdravje čebel. To so preverili tako, da so čebele zadržali v kletkah, kolikor dolgo je bilo mogoče.





Testirana naravna sredstva: oksalna kislina, mravljinčna kislina, timol
Foto: MB

Uporaba žajbljevega olja je pokazala različno stopnjo umrljivosti, vendar tega ni moč razložiti. Oksalna kislina z najnižjim LD50 je bila najbolj toksična, olje zelenike pa najmanj (tabela 4).

Razprava

Če primerjamo umrljivost v tabeli 1, lahko predpostavimo, da so zelenika, mentol, žajbljevo in evkaliptovo olje razmeroma neškodljivi, majaronovo olje pa je razmeroma nenevarno. Po drugi strani pa sta najbolj toksična oksalna kislina in amigdalini, zato utegnejo visoki odmerki teh snovi povzročiti visoko umrljivost.

Rezultati prav tako kažejo, da bi bilo treba v navodilih za uporabo teh snovi upoštevati ravnotežje med časom izpostavljenosti in koncentracijo pripravka, s katerim posegamo v panj. Rezultati so zadovoljivi pri uporabi več kot 14 dni, vendar je pričakovati, da bo moral biti odmerek manjši, če bo čas izpostavljenosti podaljšan. Če je podaljševanje uporabe najboljša možnost za doseg optimalne učinkovitosti, bodo potrebne dodatne raziskave za določitev toksičnosti med prezimovanjem čebeljih družin, pa tudi, kako lahko to vpliva na sposobnost matice za zaleganje in na razvoj ličink. Vsi pripravki, uporabljeni v poskusu, imajo dovolj nizko toksičnost, da jih lahko uporabljamo v krmi za čebele (to pa je bolje kot fumigacija) in da minimalno vplivajo na družino. Vendar je treba ugotoviti, ali čebele lahko krmimo z varnimi količinami teh pripravkov, ne da bi zato zmanjšali njihovo učinkovitost pri zdravljenju bolezni, ali je bolje uporabiti t. i. šokterapijo, to je večjo koncentracijo pripravka v krajšem času, ali pa čebele za dalj časa izpostaviti manjšim odmerkom.

Bralce želimo opozoriti, da se ti rezultati nanašajo na zdrave odrasle osebkove čebelje družine.

Obstaja možnost, da odrasle čebele s hrano prenašajo pripravke tudi ličinkam, te pa so lahko bolj občutljive. Prav tako obstaja možnost, da lahko pripravki vplivajo na reproduktivno sposobnost matice in trotoev. Če imajo čebele poleg svoje hrane na voljo še sladkorni sirup z dodanim pripravkom, se bo pripravek pomešal z nektarjem, ki ga v panj prinesejo čebele, in se s tem tudi razredčil. Če matica od čebele delavke prejme kapljico sirupa s pripravkom, nato pa še kapljico nektarja, bo zaužila za polovico manjši odmerek zdravila. Zaradi tega bodo delavke izpostavljene večjim odmerkom zdravila kot preostali člani čebelje družine. Zato je preizkušanje toksičnosti teh sredstev pri čebelah delavkah prvi korak, z uporabo v praksi pa se bo morda pokazala potreba po nadaljnjih raziskavah vpliva teh pripravkov na čebeljo družino.

Viri:

- Amrine, J., in sod. (1996): Results of research using essential oils for honey bee mite control. 6pp. <http://www.wvu.edu/~agexten/oils.htm>
- Chorianopoulos, N., in sod. (2004): Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against food borne pathogens. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 52:8261–8267.
- Imdorf, A., in sod. (1999): Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. In honey bee colonies. *Apidologie*, 30:209–228.
- Kevan, S. D., Kevan, P. G. (1997): Protecting bees from tracheal mites: a novel approach. *American bee journal*, 137:149–150.
- Kevan, S. D., in sod. (1999): Feeding menthol to honey bees (Hymenoptera: Apidae): Entry and persistence in the haemolymph without causing mortality. *Canadian Entomologist*, 131:279–281.
- Kevan, S. D., in sod. (2003): Microencapsulated medicines for beneficial insects. V: Downer, R. A., Muening, J. C., Volgas, G. G. (ur.): Pesticide formulations and delivery systems: meeting the challenges of the current crop protection industry. ASTM International, West Conshohocken, PA; pp. 154–162.
- Kevan, P. G., Ebert, T. A. (2005): Can almost nectar and pollen poison honey bees? *Journal of apicultural research*, 12:179–182.
- Nowierski in sod. (1996): Analysis and modeling of time-dose-mortality of *Melanoplus sanguinipes*, *Locusta migratoria migratorioides*, and *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) from Beauveria, Metarhizium, and Paecilomyces isolates from Madagascar. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67:236–252.
- Pitarokill, D., in sod. (2002): Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50:6688–6691.
- Preisler, H. K., Robertson, J. L. (1989): Analysis of time-dose-mortality data. *Journal of Economic Entomology*, 82:1534–1542.
- Scott-Dupree, C. D., Otis, G. W. (1992): The efficacy of four miticides for the control of *Acarapis woodi* (Rennie) in a fall treatment program. *Apidologie*, 23:97–106. ■