

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/3



ZAKLJUČNO POROČILO CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	V4-1105
Naslov projekta	UPORABA ZDRAVIL IN PESTICIDOV PRI ZDRAVSTVENEM VARSTVU ŽIVALI Z VIDIKA VAROVANJA OKOLJA
Vodja projekta	9654 Silvestra Kobal
Naziv težišča v okviru CRP	1.02.01 Vpliv uporabe zdravil in pesticidov pri zdravstvenem varstvu živali z vidika varovanja okolja
Obseg raziskovalnih ur	1671
Cenovni razred	
Trajanje projekta	10.2011 - 09.2014
Nosilna raziskovalna organizacija	406 Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	
Raziskovalno področje po šifrantu ARRS	4 BIOTEHNIKA 4.04 Veterina 4.04.03 Terapija in zdravstveno varstvo živali
Družbeno-ekonomski cilj	07. Zdravje
Raziskovalno področje po šifrantu FOS	4 Kmetijske vede 4.03 Veterina

2. Sofinancerji

	Sofinancerji	
1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo in okolje (prej Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano)
	Naslov	1000 Ljubljana, Dunajska 22

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta¹

SLO

Ostanki zdravil za uporabo v veterinarski medicini in produkti njihove biotransformacije lahko predstavljajo resno nevarnost za okolje in za neoporečnost živil živalskega in rastlinskega izvora. Zato je bil namen našega dela ugotoviti toksičnost lasalocida za deževnike in ugotoviti časovni potek razgradnje lasalocida in monenzina v piščančjem gnoju in na kmetijskih površinah. Namen je bil ugotoviti tudi vpliv zdravljenja s kumafosom ali amitrazom na rezultate kliničnega pregleda čebeljih družin in na prisotnost ostankov teh zdravil v medu, čebelji zalegi in vosku ter določiti morebitno kronično toksičnost kumafosa za sesalce. Poskus z deževniki smo izvedli po smernicah OECD. Poleg tega smo želeli ugotoviti tudi vpliv kumafosa in amitraza na biologijo čebelje družine, njuno akumulacijo v medu, čebelji zalegi in vosku ter določiti toksičnost nizkih koncentracij kumafosa za sesalce. Z ekotoksikološkim testom kronične toksičnosti lasalocida za deževnike smo ugotovili, da je LC_{50} za deževnike 156 mg/kg suhe zemlje, EC_{50} za razmnoževanje deževnikov 69,7 mg/kg in NOEC za reprodukcijo deževnikov 4,77 mg/kg. Podatki o hitrosti razgradnje lasalocida v gnoju in kompostu iz brojlarskih iztrebkov kažejo, da pri staranju gnoja brez kompostiranja ali brez mešanja in dodajanja vode ne poteče popolna razgradnja lasalocida in v času gnojenja lahko v gnoju še vedno pričakujemo približno polovico začetne koncentracije lasalocida. Pri kompostiranju lasalocid popolnoma razpade po približno treh mesecih. Poskusa razgradnje monenzina in lasalocida na kmetijskih površinah sta pokazala, da je razgradnja monenzina nekoliko počasnejša od razgradnje lasalocida in da je njuna razgradnja v okolju mnogo hitrejša kot v gnoju ali kompostu.

Vpliv zdravljenja s kumafosom ali amitrazom na rezultate kliničnega pregleda čebelje družine so pokazali, da je v drugem letu ob zdravljenju z amitrazom prišlo do intenzivne invazije z varjo. Detekcija ostankov kumafosa v čebeljih izdelkih je pokazala, da so njegove vrednosti v medu, vzorčenim pred zdravljenjem, kot tudi pri zdravljenju s predpisanim odmerkom, pod mejo kvantifikacije metode, ki znaša 50 µg/kg. Pri povečanem odmerku pa je akumulacija možna. Po zdravljenju čebeljih družin s kumafosom je kumafos bil ugotovljen v čebelji zalegi. V vosku iz vseh panjev, je bilo ob koncu poskusa več kumafosa kot na začetku zato sklepamo, da se kumafos kot lipofilna snov akumulira v vosku.

V medu, čebelji zalegi in vosku, tako pred, kot tudi šest tednov po vstavljanju zdravila v panje, nismo ugotovili prisotnosti amitraza in njegovih razgradnih produktov.

Kumafos v odmerku 0,1 mg/kg in 1,0 mg/kg telesne mase, nima niti neposrednega vpliva na delovanje možganov niti dolgotrajnega vpliva na razvoj možganov pri zarodkih in mladih miših. Kumafos tudi ni vplival na aktivnost genov v možganih.

ANG

Residua of veterinary drugs and products of their biotransformation might present risk for the environment and foods of animal and plant origin. Therefore, the aim of our study was to assess the toxicity of lasalocide in earthworms and to determine degradation steps of lasalocide and monensin in chicken manure and on agriculture areas. Additionally, the aim was to assess influence of the coumaphos or amitraz treatment on the results of clinical investigation in bee families and detection of the residua of these two compounds in honey, bee brood and beeswax. In addition chronic toxicity of coumaphos for mammals was investigated. The experiment with earthworms was performed following the OECD guidelines. Additionally, the influence of coumaphos and amitraz on bees' biology, their accumulation in honey, bee brood and beeswax, as well as the toxicity of low concentrations of coumaphos in mammals was also observed. Ecotoxicological test of chronic toxicity of lasalocide in earthworms showed that LC_{50} for earthworms was 156 mg/kg of dry soil, EC_{50} for reproduction of earthworms was 69.7 mg/kg and no observed effect concentration (NOEC) for the reproduction of earthworms was 4.77 mg/kg. Results of lasalocide degradation in chicken manure showed that only manure ageing without composting and shuffling does not lead to degradation of lasalocide, therefore lasalocide might be found in manure even several months later. In the time of manuring there is still half of starting concentration of lasalocide. During composting lasalocide was disintegrated in three months. The observation of degradation of monensin and lasalocide on agriculture areas showed that monensin disintegrated slower than lasalocide, however both chemicals disintegrated faster than in manure

or compost.

Results of the treatment of bee families with coumaphos and amitraz did not show influence on bee production, however during second season of amitraz treatment strong varroa infestation was observed. Before treatment with coumaphos as well as during treatment with regular dose, its level in honey was below the limit of quantification (50 µg/kg). The accumulation of coumaphos in honey was found during treatment with increased dose. After the treatment coumaphos was detected in bee brood. After the treatment higher coumaphos concentration was found in beeswax compared to levels before treatment, thus coumaphos as lipophilic substance accumulates in beeswax.

Contrary, before and after the treatment with amitraz it and its metabolites were not found in honey, bee brood nor beeswax. Additionally, experiment on mice showed that oral administration of 0.1 and 1.0 mg/kg of coumaphos have no effect on brain activity.

Influence on brain development in embryos and young mice were not found. In addition, coumaphos was not influenced the genes' expression in the brain.

4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu²

PRVI SKLOP: "Razgradnja kokcidiostatikov v iztrebkih in zemlji, njihov vpliv na rast krmnih rastlin in tveganje za okolje"

Ostanki zdravil za uporabo v veterinarski medicini in njihovi razgradni produkti lahko predstavljajo resno nevarnost za okolje. Zdravilne učinkovine se lahko izločajo v aktivni obliki predvsem z iztrebki tretiranih živali. Te iztrebke se lahko neposredno uporablja za gnojenje obdelovalnih kmetijskih površin. Odgovorna uporaba zdravil za uporabo v veterinarski medicini vključuje tudi poznavanje njihove razgradnje in učinkov v okolju. Delo v tem sklopu je bilo razdeljeno na štiri dele:

1. Kronična toksičnost lasalocida za deževnike
2. Razgradnja lasalocida v gnoju in kompostu
3. Razgradnja lasalocida in monenzina na kmetijskih površinah
4. Vpliv lasalocida in monenzina na rast krmnih rastlin

Rezultati dela so pokazali, da prihaja do velikih razlik v razgradnji lasalocida med načini shranjevanja oz. obdelave piščančjih farmskih iztrebkov. Razpolovni čas lasalocida se je posledično zelo razlikoval med obema substratoma: v gnoju je bil 61,8 dni, v kompostu pa 17,5 dni. V primerjavi s podatki o razgradnji monenzina, ki je strukturno podoben lasalocidu, so bile razlike med staranjem gnoja in kompostiranjem pri lasalocidu bolj izrazite. V projektu smo pridobili prve podatke o hitrosti razgradnje lasalocida v gnoju in kompostu iz brojlarskih iztrebkov. Iz njih lahko sklepamo, da pri staranju gnoja brez kompostiranja ali brez mešanja in dodajanja vode ne poteče popolna razgradnja lasalocida in v času gnojenja lahko v gnoju še vedno pričakujemo približno polovico začetne koncentracije tega kokcidiostatika. Pri kompostiranju lasalocid popolnoma razpade po približno treh mesecih.

Ugotovili smo, da imata oba kokcidiostatika vpliv na klitje semen in rast poganjkov detelje, vendar pri koncentracijah, ki jih dejansko ne moremo pričakovati v okolju, kot se je izkazalo na podlagi poskusov razgradnje v zemlji.

Takrat sta bili koncentraciji lasalocida in monenzina v vseh primerih pod mejo detekcije, zato lahko zaključimo, da za monenzin in lasalocid zaradi njune razmeroma hitre razgradnje in disipacije v zemlji ne obstaja nevarnost prenosa po prehranski verigi do živali oz. človeka. Vsebnost hranil v rastlinah se ni statistično značilno razlikovala glede na posamezno tretiranje.

Končni cilj tega dela projekta je bil izdelati podrobne kriterije in priporočila za varno uporabo brojlarskih iztrebkov, kontaminiranih z lasalocidom ali monenzinom, za gnojenje kmetijskih površin, kjer pridobivamo krmne rastline.

Za oceno tveganja smo izbrali dva scenarija: uporabo kontaminiranega gnoja brez staranja in uporabo gnoja po treh mesecih staranja. Iz naših poskusov z razgradnjo lasalocida v gnoju in kompostu ter vrednosti v literaturi, ki smo jih našli za monenzin, smo predvideli, da v staranem gnoju po treh mesecih vrednosti lasalocida oz. monenzina upadejo na polovico začetnih vrednosti. Količnik tveganja v nobenem primeru ne presega 1.

Po do sedaj pridobljenih podatkih uporaba gnoja, kontaminiranega z lasalocidom ali monenzinom na kmetijskih površinah pri gnojenju do letnega vnosa dušika 170 kgN/ha ni sporna. V primeru gnojenja 4-kosnih travnikov z večjimi količinami gnoja pa obstaja povečano tveganje.

DRUGI SKLOP: "Določanje ostankov amitraza in kumafosa včebeljih izdelkih in ugotavljanje njunega vpliva na čebele ter ugotavljanje toksičnosti kumafosa za sesalce"

Na področju zdravstvenega varstva čebel je zadnja tri desetletja eden največjih problemov zatiranje varoze, zajedavske bolezni čebelje družine, ki jo povzroča pršica (*Varroa destructor*). Varoje zatiramo z akaricidi, ki morajo biti aplicirani v takih oblikah in odmerkih, da ne škodujejo predstavnikom čebelje družine, hkrati pa čim bolj učinkovito uničujejo varoje. Zaradi morebitnih ostankov insekticidnih zdravil v čebeljih pridelkih predstavljata skrb za varne čebelje pridelke za potrošnika in zdravo okolje za razvoj čebelje zalege pomemben segment v zatiranju varoze.

Stabilne lipofilne učinkovine akaricidov, uporabne v čebelarstvu, se lahko akumulirajo v satju. Zaradi tega predstavljajo

potencialen vir onesnaženja medu, saj lahko iz voska difundirajo v med, pa tudi v čebeljo zalego. Čistost voska pa je pomembna tudi zato, ker se uporablja tudi v farmacevtski in kozmetični industriji.

Namen dela je bil po zdravljenju s kumafosom ali amitrazom ugotoviti prisotnost teh snovi v medu, vosku in čebelji zalegi in obenem s kliničnimi pregledi čebeljih družin oceniti učinkovitost zdravljenja varoze tako z enim kot z drugim zdravilom. Poleg tega je bil namen ugotoviti tudi vpliv majhnih količin kumafosa na zdravstveno stanje in vedenje živali.

Delo v 2. sklopu je bilo razdeljeno na štiri dele:

1. Vpliv zdravljenja s kumafosom ali amitrazom na klinično zaznavno jakost čebelje družine;
2. Ugotavljanje ostankov kumafosa v medu, čebelji zalegi in vosku;
3. Ugotavljanje ostankov amitraza in njegovih razgradnih produktov v medu, čebelji zalegi in vosku;
4. Vpliv nizkih odmerkov kumafosa na razvoj centralnega živčnega sistema pri miših kot modelnem organizmu za človeka.

V tem delu raziskave smo ugotavljali vpliv kumafosa in amitraza na razvoj in donosnost čebeljih družin. V obdobju trajanja projekta smo v času dveh aktivnih čebelariskih sezon spremljali razvoj čebeljih družin v dveh čebelnjakih na različnih lokacijah v Sloveniji.

Rezultati analiz kažejo, da so bile vrednosti kumafosa v medu, vzorčenim pred zdravljenjem, pod mejo kvantifikacije metode.

Po zdravljenju se kumafos nahaja v čebelji zalegi. Akumulacijo kumafosa smo ugotovili v zalegi iz čebeljih družin, ki so bili zdravljeni s povečanim kot tudi terapevtskim odmerkom. Pri kontrolni skupini čebeljih družin, kjer se kumafos ni uporabljal, njegove prisotnosti nismo zaznali. Presentljivo pa je, da smo pri treh čebeljih družinah ugotovili prisotnost kumafosa v čebelji zalegi že pred vstavljanjem zdravila s kumafosom v panje. Prisotnost kumafosa v vosku smo ugotovili tako pred kot tudi po zdravljenju.

Za določanje vsebnosti amitraza v vzorcih medu in zalege smo uporabili tekočinsko ekstrakcijo s heksanom ter metodo RP-HPLC z UV detekcijo.

Z navedenima metodama v medu, čebelji zalegi in vosku, tako pred, kot tudi šest tednov po vstavljanju zdravila v panje, nismo ugotovili prisotnosti amitraza in njegovih razgradnih produktov.

Rezultati kažejo, da se amitraz zaradi nestabilnosti ne akumulira v medu, čebelji zalegi in vosku. Prav tako se, ne akumulirajo njegovi razgradni produkti.

Delovanje kumafosa v visokih odmerkih kot zaviralca acetilholinesteraze je dobro proučeno, zelo malo pa je znanega o morebitnih škodljivih učinkih dolgotrajne izpostavljenosti nizkim dozam tega insekticida, ki bi se lahko nalagal v medu zaradi zdravljenja čebel. V naši raziskavi smo tudi proučili vpliv nizkih odmerkov kumafosa na razvoj in delovanje možganov pri modelnem organizmu, laboratorijski miši.

Izvedli smo dva poskusa in sicer smo proučili neposreden vpliv kumafosa na delovanje možganov z izpostavitvijo odraslih miši kumafosu, ter morebitne dolgotrajne učinke na razvoj možganov ob izpostavljenosti v obdobju razvoja zarodka ter takoj po rojstvu, ko se možgani intenzivno razvijajo. Pri ugotavljanju neposrednega vpliva kumafosa na delovanje možganov smo opazovali odrasle miši, ki so bile izpostavljene kumafosu, morebitne dolgotrajne učinke na razvoj možganov smo opazovali ob izpostavljenosti brejih miši v obdobju razvoja zarodka ter takoj po rojstvu, ko se možgani intenzivno razvijajo.

Vse miši v naši raziskavi smo testirali v testu socialnega prepoznavanja, testu odprtega polja, testu prisilnega plavanja, testu zakopavanja frnikol in testu dvignjenega labirinta. Pri nobenem od testov nismo dobili statistično zanesljivih razlik med tretiranimi in kontrolno skupino, iz česar sklepamo, da kumafos v dozah, s katerimi smo tretirali miši, nima niti neposrednega vpliva na delovanje možganov niti dolgotrajnega vpliva na razvoj možganov pri zarodkih in mladih miši, kar kaže, da kumafos v medu najverjetneje ne predstavlja nevarnosti za delovanje tistih delov možganov, ki so povezani s psihiatričnimi motnjami kot so anksioznost, depresija in avtizem.

Analiza rezultatov in statistična obdelava podatkov nista pokazali statistično značilnih razlik v izraženosti genov med možgani miši iz kontrolne in iz poskusne skupine, kar kaže, da tu v možganih na molekularnem nivoju kumafos ni vplival na aktivnost genov.

Rezultati naše raziskave kažejo, da koncentracija kumafosa, ki je dovoljena v živilih v EU, ne predstavlja nevarnosti za razvoj in delovanje možganov.

5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev³

Cilji so bili doseženi v celoti.

Potrebne so nadaljnje raziskave o transportu lasalocida in monenzina v okolju, posebno v površinske in podzemne vode. O večkratni (in večletni) uporabi kontaminiranega gnoja na istih kmetijskih površinah prav tako ni dovolj znanega, zato ne moremo zagotoviti, da na takšnih površinah ne prihaja do kopičenja lasalocida ali monenzina, še posebno v sušnih razmerah, ko ne prihaja do mikrobne razgradnje.

Rezultati drugega sklopa dajejo informacije o izboru zdravil za zdravljenje varoze pri čebelah, prikazujejo rezistenco varoje na določena zdravila in prikazujejo distribucijo

zdravil znotraj panja. Vedenjski testi na miših kot modelnem organizmu pa kažejo, da nizke koncentracije kumafosa najverjetneje niso nevarne za višje živali in človeka. Rezultati raziskave omogočajo pripravo smernic za gnojenje poljedelskih površin z gnojem, ki izvira iz brojlerskih farm, kjer so bili piščanci zdravljeni z monenzinom ali lasalocidom. Poskus na čebelah prikazuje neučinkovitost amitraza pri zdravljenju varoze, kar bi bilo potrebno upoštevati pri vsakoletnem izboru akaricidov.

6. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁴

--

7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁵

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	3791482	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Vsebnost kumafosa v medu in zalegi po zdravljenju čebeljih družin
		ANG	Coumaphos concentration in honey and bee brood after the treatment of honeybee colonies
	Opis	SLO	V raziskavi smo ugotavljali ostanke kumafosa v medu in čebelji zalegi po zdravljenju čebeljih družin s pripravkom, namenjenim zatiranju varoze. Pet čebeljih družin smo zdravili s predpisanim odmerkom zdravila CheckMite (Bayer), pet z 1,5-kratnim odmerkom, pet pa jih je služilo kot kontrola. Vzorce medu in zalege smo odvzeli pred, med in ob koncu šesttedenskega zdravljenja. Za določanje kumafosa v vzorcih medu in zalege smo uporabili tekočinsko ekstrakcijo s heksanom ter metodo RP-HPLC z UV detekcijo. Rezultati kažejo, da so bile vrednosti kumafosa v medu tako pred kot po zdravljenju pod MRL (100 µg/kg), vrednost nad MRL smo ob uporabi predpisanega odmerka določili le pri enem panju. V čebelji zalegi smo med in po zdravljenju pri predpisanem in preseženem odmerku ugotovili prisotnost kumafosa (do 909 µg/kg). Rezultati kažejo, da se kumafos akumulira v čebelji zalegi.
		ANG	The aim of the study was to assess the presence of coumaphos residues in honey and bee brood after the treatment of honeybee colonies against varosis. Five bee colonies were treated with regular dose of CheckMite (Bayer), in five 1.5x therapeutic dose was used, while five colonies served as controls. Honey and brood samples were collected before, during and at the end of 6-week treatment. Determination of coumaphos in honey and bee brood was based on RP-HPLC with UV detection after a liquid – liquid extraction with hexane. The results have shown that coumaphos levels in honey was not reached MRL (100 µg/kg), however level above MRL was found in one beehive. In bee brood from regular and exceed treated beehives the presence of coumaphos (up to 909 µg/kg) was found during and at the end of the treatment. Results have shown that coumaphos accumulates in bee brood.
	Objavljeno v	Slovensko akademsko čebelarsko društvo; Kmetijski inštitut Slovenije; V spomin dr. Janezu Poklukarju; 2014; Str. 24-29; Avtorji / Authors: Premrov Bajuk Blanka, Snoj Tomaž, Babnik K., Milčinski Luka, Jenčič Vlasta, Pislak Metka, Škof Martina, Kobal Silvestra	
Tipologija	1.08 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci		
2.	COBISS ID	3674363	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Razgradnja in disipacija veterinarskega ionofora lasalocida v gnoju in zemlji
		ANG	Degradation and dissipation of the veterinary ionophore lasalocid in manure and soil

Opis	SLO	Lasalocid je ionoforni antibiotik, ki se uporablja za preprečevanje in zdravljenje kokcidioze pri piščancih. Zdravljene živali ga izločajo večinoma v aktivni obliki, v okolje pa prihaja z uporabo kontaminiranega gnoja na poljedelskih površinah. Naše delo se je izvajalo z namenom, da se ovrednoti stopnja razpada lasalocida v gnoju pod različnimi pogoji skladiščenja (staranje na gnojišču ali kompostiranje) in v zemlji z obdelovalnih površin, gnojenih z gnojem, kontaminiranim z lasalocidom. Rezultati so pokazali razlike v razgradnji lasalocida pri staranem gnoju ($t_{1/2} = 61.8 \pm 1.7$ dni) in kompostiranju ($t_{1/2} = 17.5 \pm 0.8$ dni). Razpolovni čas v zemlji je še krajši (v povprečju 3.1 ± 0.4 d). Na osnovi izmerjenih koncentracij lasalocida v zemlji po nanosu gnoja lahko zaključimo, da je lahko potencialno škodljiv za talne organizme. Da preprečimo morebitno škodljivo delovanje, je priporočljivo kompostiranje.
	ANG	Lasalocid is an ionophore antibiotic used for prevention and treatment of coccidiosis in poultry. It is excreted from the treated animals mostly in its active form and enters the environment with the use of contaminated manure on agricultural land. A research was undertaken to ascertain the rate of lasalocid degradation in manure under different storage conditions (aging in a pile or composting) and on agricultural soil after using lasalocid-contaminated manure. The results have shown difference in lasalocid degradation between aging manure with no treatment ($t_{1/2} = 61.8 \pm 1.7$ d) and composting ($t_{1/2} = 17.5 \pm 0.8$ d). Half-lives in soil are much shorter (on average 3.1 ± 0.4 d). On the basis of the measured concentrations of lasalocid in soil after manure application, we can conclude that it can potentially be harmful to soil organisms. To make certain that no harmful effects occur, composting is recommended.
Objavljeno v	Pergamon Press.; Chemosphere; 2015; 5 str.; Impact Factor: 3.499; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 2.143; A': 1; WoS: JA; Avtorji / Authors: Žižek Suzana, Dobeic Martin, Pintarič Štefan, Zidar Primož, Kobal Silvestra, Vidrih Matej	
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	

8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine⁶

Družbeno-ekonomski dosežek			
1.	COBISS ID	3916666	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Vsebnost ostankov kumafosa in amitraza v medu, čebelji zalegi in čebeljem vosku	
	ANG	Coumaphos and amitraz residue levels in honey, bee brood and beeswax	
Opis	SLO	Kumafos in amitraz se veliko uporabljata za zdravljenje varoze (<i>Varroa destructor</i>) pri čebeljih družinah. Najvišja dovoljena količina (MRL) teh snovi v medu je določena, medtem ko za prisotnost njunih ostankov v čebelji zalegi in vosku obstaja malo podatkov. Z namenom pridobiti te podatke, smo po zdravljenju čebeljih družin s kumafosom ali amitrazom določali raven teh snovi v medu, čebelji zalegi in vosku. Vrednost kumafosa v medu iz zdravljenih in nezdravljenih panjev je bila pod MRL (100 µg/kg) tako pred kot tudi po zdravljenju. Raven kumafosa v čebelji zalegi iz zdravljenih panjev se je gibala med 49 in 784 µg/kg. Visoke vrednosti kumafosa v vosku smo ugotovili v zdravljenih in nezdravljenih panjih in so znašale od 0,19 do 36 mg/kg. Visoke vrednosti kumafosa v vosku tako iz zdravljenih kot tudi iz nezdravljenih panjev so najverjetneje posledica zdravljenja s kumafosom pred izvedbo raziskave. Nasprotno pa je bila vrednost amitraza v medu, čebelji zalegi in vosku pod mejo detekcije (50 µg/kg). Rezultati raziskave kažejo, da se kumafos akumulira v čebelji zalegi in vosku,	

		medtem ko akumulacije amitraza nismo ugotovili.
	ANG	Coumaphos and amitraz are widely in use for the treatment of honeybee colonies against varosis (<i>Varroa destructor</i>). Maximal residue levels (MRL) for those compounds in honey is well determined although there are few data for their residue levels in bee brood and beeswax. In light of that, the aim of the study was to determine coumaphos and amitraz levels in honey, bee brood and beeswax after the treatment of bee colonies with those compounds. Coumaphos levels in honey from treated and non-treated bee colonies were found below MRL (100 µg/kg) before and after treatment. Coumaphos levels in the brood from treated colonies ranged between 49 and 784 µg/kg. High coumaphos in wax was found in treated and non-treated bee colonies and were ranged between 0.19 and 36 mg/kg. High coumaphos residue accumulation in wax in both treated and non-treated colonies are probably the results of the bee colonies treatments with coumaphos before the research. Contrary, the levels of amitraz in honey, bee brood and beeswax were found below the limit of detection (50 µg/kg). To conclude, our study showed the accumulation of coumaphos in brood and beeswax, while for amitraz accumulation was not observed.
	Šifra	F.24 Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev
	Objavljeno v	Veterinarska fakulteta; 5. Slovenski veterinarski kongres 2014; 2014; Str. 121-122; Avtorji / Authors: Snoj Tomaž, Premrov Bajuk Blanka, Babnik K., Milčinski Luka, Jenčič Vlasta, Pislak Metka, Škof Martina, Kobal Silvestra
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci
2.	COBISS ID	3794042 Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO Vpliv zdravljenja čebeljih družin s kumafosom ali amitrazom na mejne vrednosti njihovih ostankov v medu, zalego in čebeljega voska
	ANG	Relation between treatment of bee colonies with coumaphos or amitraz on their residue levels in honey, bee brood and beeswax
	Opis	SLO Namen dela je bil ugotoviti akumulacijo ostankov kumafosa in amitraza v medu, čebelji zalegi in vosku po zdravljenju varoze pri čebeljih družinah. Raziskava se je izvajala v dveh čebelnjakih na dveh različnih lokacijah. Na eni lokaciji je deset čebeljih družin prejelo kumafos, na drugi pa smo pet čebeljih družin zdravili z amitrazom. Vzorce medu, zalege in voska smo jemali pred in šest tednov po zdravljenju. Meritve koncentracije kumafosa in amitraza z njegovimi razpadnimi produkti DPMF, DMF in DMA smo v medu in zalegi izvajali s HPLC z UV detekcijo, v vosku pa smo meritve izvajali z GC. Vrednosti kumafosa v medu so bile pod MRL, medtem ko je pri zalegi iz panjev, kjer bilo uporabljeno to zdravilo, vrednost znašala med 49.0 in 784.1 µg/kg. Kumafos smo našli tudi v panjih iz tretiranih in netretiranih panjev. Vrednost kumafosa v vosku je bila med 0.19 in 36 mg/kg. Visoka vrednost ostankov kumafosa v vosku iz panjev, kjer smo med poskusam uporabljali, in kjer nismo uporabljali kumafosa, so najverjetneje rezultat predhodnih zdravljenj čebeljih družin s kumafosom. Vrednosti amitraza in njegovih razpadnih produktov so bile pod mejo detekcije.
	ANG	The aim of the study was to assess the accumulation of coumaphos and amitraz residues in honey, bee brood and beeswax after the treatment of honeybee colonies against varosis. The study was conducted in two apiaries on two different locations. In the first location ten bee colonies were treated with coumaphos and on other location five bee colonies were treated with amitraz. Honey, wax and brood samples were collected before and six weeks after the treatment. Detection of coumaphos and amitraz and its metabolites DPMF, DMF and DMA in honey and brood was performed by HPLC with UV detection, while wax coumaphos and amitraz and its

		metabolites were determined using GC. Coumaphos level below MRL was found in honey while in the brood from treated colonies coumaphos levels ranged between 49.0 and 784.1 µg/kg. Interestingly, coumaphos in wax was found in treated and non-treated bee colonies. The levels of coumaphos in the wax were high and ranged between 0.19 and 36 mg/kg. High coumaphos residua accumulation in wax in both treated and untreated colonies are probably the results of the bee colonies treatments with coumaphos before the reasearch. However, the levels of amitraz and its metabolites were found bellow limit of detection.
Šifra	F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev
Objavljeno v	BBSRC; The impact of pesticides on bee health; 2014; Str. 16; Avtorji / Authors: Snoj Tomaž, Premrov Bajuk Blanka, Babnik K., Milčinski Luka, Jenčič Vlasta, Pislak Metka, Škof Martina, Kobal Silvestra	
Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
3.	COBISS ID	3883386 Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Kumafos in njegov pomen v terapiji varoze v Sloveniji
	ANG	Coumaphos and its importance in the treatment of varroasis in Slovenia
Opis	SLO	Varoza je parazitarna bolezen, ki jo povzroča pršica <i>Varroa destructor</i> , ki se hrani s hemolinfo čebelj in njenih razvojnih oblik. Pršica se zatira z zdravili, ki se morajo uporabljati v takšni obliki in takšnih koncentracijah, ki ne delujejo škodljivo na čebeljo družino istočasno pa uspešno uničijo pršico. V Sloveniji se za zdravljenje uporabljajo tudi zdravila Perizin (Bayer) in ChekMite (Bayer), ki vsebujejo kot učinkovino kumafos. Pomemben dejavnik pri zdravljenju varoze je skrb za neoporečne čebelje pridelke, ki se vključujejo v prehransko verigo človeka, skrb za zdravo okolje in skrb za razvoj čebelje zalege. Uporaba kumafosa v čebelji družini lahko privede do kopičenja ostankov kumafosa ali njegovih metabolitov in drugim čebeljim proizvodom. Kumafos je stabilen pri kislem in nestabilen pri alkalnem pH. V Evropski skupnosti je največja dovoljena kocentracija (MRL) kumafosa v medu 100 µg/kg.
	ANG	Varroasis is a parasitic disease caused by mite <i>Varroa destructor</i> . <i>Varroa</i> supplies itself by bee or bee brood hemolymph. The drugs that act on varroa mites must be used in formations and concentrations that not affect bee colony but they can take effect on parasite. Beside others, coumaphos containing drugs Perizin and ChekMite (Bayer) are used for varroasis treatment in Slovenia. Important role in eradication of varroasis play care for non-contaminated bee products, which are used as a human food, care for environment as well as care for undisturbed bee brood development. Coumaphos use in bee colonies might cause accumulation of its residua or metabolites in honey and other bee products. Coumaphos is stable at low pH, but instable in basic media. In European Union maximal residue limit (MRL) for coumaphos in honey is 100 µg/kg.
Šifra	F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev
Objavljeno v	Srpsko veterinarsko društvo; Jedan svet jedno zdravlje; 2014; Str. 163-167; Avtorji / Authors: Snoj Tomaž, Premrov Bajuk Blanka, Babnik K., Milčinski Luka, Jenčič Vlasta, Pislak Metka, Škof Martina, Kobal Silvestra	
Tipologija	1.09 Objavljeni strokovni prispevek na konferenci	

9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁷

10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁸

10.1. Pomen za razvoj znanosti⁹

SLO

Rezultati raziskave omogočajo pripravo smernic za gnojenje poljedelskih površin z gnojem, ki izvira iz brojlerskih farm, kjer so bili piščanci zdravljeni z monenzinom ali lasalocidom. Poskus na čebelah je pokazal neučinkovitost amitraza pri zdravljenju varoze, kar kaže na razvoj rezistence na amitraz, kar bi bilo potrebno upoštevati pri vsakoletnem izboru akaricidov.

ANG

Results of the research allow preparing the guidelines for the fertilization of agricultural land with manure originating from broiler farms where chickens were treated with monensin or lasalocid. Experiment including bees revealed the ineffectiveness of amitraz in the treatment of varroasis, which shows the potential development of resistance to amitraz what should be taken into account in the annual selection of acaricides.

10.2. Pomen za razvoj Slovenije¹⁰

SLO

Rezultati raziskave omogočajo pripravo smernic za gnojenje poljedelskih površin z gnojem, ki izvira iz brojlerskih farm, kjer so bili piščanci zdravljeni z monenzinom ali lasalocidom. Poskus na čebelah je pokazal neučinkovitost amitraza pri zdravljenju varoze, kar kaže na razvoj rezistence na amitraz, kar bi bilo potrebno upoštevati pri vsakoletnem izboru akaricidov.

ANG

Results of the research allow preparing the guidelines for the fertilization of agricultural land with manure originating from broiler farms where chickens were treated with monensin or lasalocid. Experiment including bees revealed the ineffectiveness of amitraz in the treatment of varroasis, which shows the potential development of resistance to amitraz what should be taken into account in the annual selection of acaricides.

11. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v domačih znanstvenih krogih
- pri domačih uporabnikih

Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?¹¹

Po naših spoznanjih oziroma rezultatih izražajo zanimanje predstavniki perutninarske proizvodnje v Sloveniji, proizvajalci veterinarskih zdravil, regulatorni organ za zdravila (JAZMP), veterinarji, ki se ukvarjajo z zdravstvenim varstvom čebel, Čebelarska zveza Slovenije in čebelarji

11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v mednarodnih znanstvenih krogih
- pri mednarodnih uporabnikih

Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:¹²

Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:¹³

12. Izjemni dosežek v letu 2014¹⁴

12.1. Izjemni znanstveni dosežek

"Razgradnja in disipacija veterinarskega ionofora lasalocida v gnoju in zemlji"

Lasalocid je ionoforni antibiotik, ki se uporablja za preprečevanje in zdravljenje kokcidioze pri piščancih. Zdravljene živali ga izločajo večinoma v aktivni obliki, v okolje pa prihaja z uporabo kontaminiranega gnoja na poljedelskih površinah. Naše delo se je izvajalo z namenom, da se ovrednoti stopnja razpada lasalocida v gnoju pod različnimi pogoji skladiščenja (staranje na gnojišču ali kompostiranje) in v zemlji z obdelovalnih površin, gnojenih z gnojem, kontaminiranim z lasalocidom. Rezultati so pokazali razlike v razgradnji lasalocida pri staranem gnoju ($t_{1/2} = 61.8 \pm 1.7$ dni) in kompostiranju ($t_{1/2} = 17.5 \pm 0.8$ dni). Razpolovni čas v zemlji je še krajši (v povprečju 3.1 ± 0.4 d). Na osnovi izmerjenih koncentracij lasalocida v zemlji po nanosu gnoja lahko zaključimo, da je lahko potencialno škodljiv za talne organizme. Da preprečimo morebitno škodljivo delovanje, je priporočljivo kompostiranje.

12.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

"Vpliv zdravljenja čebeljih družin s kumafosom ali amitrazom na mejne vrednosti njihovih ostankov v medu, zalego in čebeljega voska"

Namen dela je bil ugotoviti akumulacijo ostankov kumafosa in amitraza v medu, čebelji zalegi in vosku po zdravljenju varoze pri čebeljih družinah. Raziskava se je izvajala na dveh lokacijah. Na eni lokaciji smo zdravili s kumafosom, na drugi pa z amitrazom. Vzorce medu, zalege in voska smo jemali pred in šest tednov po zdravljenju. Vrednosti kumafosa v medu so bile pod MRL, medtem ko je pri zalegi iz panjev, kjer bilo uporabljeno to zdravilo, vrednost znašala med 49.0 in 784.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Kumafos smo našli v panjih iz tretiranih in netretiranih panjev. Vrednost kumafosa v vosku je bila med 0.19 in 36 mg/kg . Visoka vrednost ostankov kumafosa v vosku iz panjev, kjer nismo uporabljali kumafosa, so najverjetneje rezultat predhodnih zdravljenj čebeljih družin s kumafosom. Vrednosti amitraza in njegovih razpadnih produktov so bile pod mejo detekcije.

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat na zgoščenki (CD), ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba
raziskovalne organizacije:*

in

vodja raziskovalnega projekta:

Univerza v Ljubljani, Veterinarska
fakulteta

Silvestra Kobal

ŽIG

Kraj in datum:

Ljubljana	11.3.2015
-----------	-----------

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/3

¹ Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku). [Nazaj](#)

² Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

³ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)

⁶ Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta. Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.

Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.

Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)

⁷ Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁸ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

⁹ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹¹ Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹² Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹³ Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)

¹⁴ Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2014 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot prilonko/-i k temu poročilu.

Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/> [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2015 v1.00

73-05-ED-99-B6-9C-60-0D-BC-11-19-1A-7B-85-5E-42-91-95-05-D2

Priloga 1:

Vsebinsko poročilo o delu na projektu V4-1105, »Uporaba zdravil in pesticidov pri zdravstvenem varstvu živali z vidika varovanja okolja«

**Uporaba zdravil in pesticidov pri zdravstvenem varstvu živali
z vidika varovanja okolja**

**Use of drugs and pesticides in animal health care from the aspect
of the protection of environment**

Silvestra Kobal , Milan Pogačnik, Gabrijela Tavčar Kalcher, Tomaž Snoj, Anton Vengušt, Breda Jakovac Strajn, Vlasta Jenčič, Metka Pislak Ocepek, Marinka Drobnič-Košorok, Suzana Žizek, Mitja Gombač, Gregor Majdič, Blanka Premrov Bajuk, Katarina Babnik, Martin Dobeic, Katerina Čeh, Karin Šrampf

Ključne besede: Veterina, zdravila, pesticidi, živali, okolje

POVZETEK

Ostanki zdravil za uporabo v veterinarski medicini in produkti njihove biotransformacije lahko predstavljajo resno nevarnost za okolje in za neoporečnost živil živalskega in rastlinskega izvora. Zato je bil namen našega dela ugotoviti toksičnost lasalocida za deževnike in ugotoviti časovni potek razgradnje lasalocida in monenzina v piščančjem gnoju in na kmetijskih površinah. Namen je bil ugotoviti tudi vpliv zdravljenja s kumafosom ali amitrazom na rezultate kliničnega pregleda čebeljih družin in na prisotnost ostankov teh zdravil v medu, čebelji zalegi in vosku. Poskus z deževniki smo izvedli po smernicah OECD. Poleg tega smo želeli ugotoviti tudi vpliv kumafosa in amitraza na biologijo čebelje družine, njuno akumulacijo v medu, čebelji zalegi in vosku ter določiti toksičnost nizkih koncentracij kumafosa za sesalce. Z ekotoksikološkim testom kronične toksičnosti lasalocida za deževnike smo ugotovili, da je LC_{50} za deževnike 156 mg/kg suhe zemlje, EC_{50} za razmnoževanje deževnikov 69,7 mg/kg in NOEC za reprodukcijo deževnikov 4,77 mg/kg. Podatki o hitrosti razgradnje lasalocida v gnoju in kompostu iz brojlarskih iztrebkov kažejo, da pri staranju gnoja brez kompostiranja ali brez mešanja in dodajanja vode ne poteče popolna razgradnja lasalocida in v času gnojenja lahko v gnoju še vedno pričakujemo približno polovico začetne koncentracije lasalocida. Pri kompostiranju lasalocid popolnoma razpade po približno treh mesecih. Poskusa razgradnje monenzina in lasalocida na kmetijskih površinah sta pokazala, da je razgradnja monenzina nekoliko počasnejša od razgradnje lasalocida in da je njuna razgradnja v okolju mnogo hitrejša kot v gnoju ali kompostu.

Vpliv zdravljenja s kumafosom ali amitrazom na rezultate kliničnega pregleda čebelje družine so pokazali, da je v drugem letu ob zdravljenju z amitrazom prišlo do intenzivne invazije z varojo. Detekcija ostankov kumafosa v čebeljih izdelkih je pokazala, da so njegove vrednosti v medu, vzorčenim pred zdravljenjem, kot tudi pri zdravljenju s predpisanim odmerkom, pod mejo kvantifikacije metode, ki znaša 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Pri povečanem odmerku pa je akumulacija možna. Po zdravljenju čebeljih družin s kumafosom je kumafos bil ugotovljen v čebelji

zalegi. V vosku iz vseh panjev, je bilo ob koncu poskusa več kumafosa kot na začetku zato sklepamo, da se kumafos kot lipofilna snov akumulira v vosku.

V medu, čebelji zalegi in vosku, tako pred, kot tudi šest tednov po vstavljanju zdravila v panje, nismo ugotovili prisotnosti amitraza in njegovih razgradnih produktov.

Kumafos v odmerku 0,1 mg/kg in 1,0 mg/kg telesne mase, nima niti neposrednega vpliva na delovanje možganov niti dolgotrajnega vpliva na razvoj možganov pri zarodkih in mladih miših. Kumafos tudi ni vplival na aktivnost genov v možganih.

Key words: Veterinary medicine , medicines , pesticides, animals, environment

ABSTRACT

Residua of veterinary drugs and products of their biotransformation might present risk for the environment and foods of animal and plant origin. Therefore, the aim of our study was to assess the toxicity of lasalocide in earthworms and to determine degradation steps of lasalocide and monensin in chicken manure and on agriculture areas. Additionally, the aim was to assess influence of the coumaphos or amitraz treatment on the results of clinical investigation in bee families and detection of the residua of these two compounds in honey, bee brood and beeswax. The experiment with earthworms was performed following the OECD guidelines. Additionally, the influence of coumaphos and amitraz on bees' biology, their accumulation in honey, bee brood and beeswax, as well as the toxicity of low concentrations of coumaphos in mammals was also observed. Ecotoxicological test of chronic toxicity of lasalocide in earthworms showed that LC_{50} for earthworms was 156 mg/kg of dry soil, EC_{50} for reproduction of earthworms was 69.7 mg/kg and no observed effect concentration (NOEC) for the reproduction of earthworms was 4.77 mg/kg. Results of lasalocide degradation in chicken manure showed that only manure ageing without composting and shuffling does not lead to degradation of lasalocide, therefore lasalocide might be found in manure even several months later. In the time of manuring there is still half of starting concentration of lasalocide. During composting lasalocide was disintegrated in three months. The observation of degradation of monensin and lasalocide on agriculture areas showed that monensin disintegrated slower than lasalocide, however both chemicals disintegrated faster than in manure or compost.

Results of the treatment of bee families with coumaphos and amitraz did not show influence on bee production, however during second season of amitraz treatment strong varroa infestation was observed. Before treatment with coumaphos as well as during treatment with regular dose, its level in honey was below the limit of quantification (50 μ g/kg). The accumulation of coumaphos in honey was found during treatment with increased dose. After the treatment coumaphos was detected in bee brood. After the treatment higher coumaphos concentration was found in beeswax compared to levels before treatment, thus coumaphos as lipophilic substance accumulates in beeswax. Contrary, before and after the treatment with amitraz it and its metabolites were not found in honey, bee brood nor beeswax. Additionally, experiment on mice showed that oral administration of 0.1 and 1.0 mg/kg of coumaphos have no effect on brain activity. Influence on brain development in embryos and young mice were not found. In addition, coumaphos was not influenced the genes' expression in the brain.

1. OPIS PROBLEMA IN CILJEV

Ostanki zdravil za uporabo v veterinarski medicini in produkti njihove biotransformacije lahko predstavljajo resno nevarnost za okolje in za neoporečnost živil živalskega in rastlinskega izvora. Zdravilne učinkovine se iz živalskega organizma lahko izločajo v nespremenjeni obliki ali v obliki aktivnih in neaktivnih metabolitov v okolje ali v živalske produkte. V aktivni obliki se zdravilne učinkovine izločajo predvsem z iztrebki tretiranih živali. Te iztrebke se lahko neposredno uporablja za gnojenje obdelovalnih kmetijskih površin. Pri tem lahko učinkovine oz. njihovi razgradni produkti pridejo v neposreden stik z neciljnimi talnimi organizmi. Odgovorna uporaba zdravil za uporabo v veterinarski medicini zato vključuje tudi poznavanje njihove razgradnje in učinkov v okolju.

Posebno pozornost je potrebno nameniti tudi ostankom, ki se po zdravljenju čebeljih družin, akumulirajo v medu in drugih čebeljih izdelkih in s tem lahko vplivajo na zdravje ljudi. Nekatera zdravila za zatiranje varoze delujejo na principu zaviranja delovanja encima acetilholinesteraze, že zelo nizke koncentracije teh snovi pa lahko pri človeku povzročijo motnje v delovanju živčnega sistema.

Z namenom ugotavljanja vpliva veterinarskih zdravil na okolje in ugotavljanja delovanja zdravil za zdravljenje čebelje družine na samo čebeljo družino, sesalce ter detekcije ostankov teh zdravil v medu, čebelji zalegi in vosku je bilo delo razdeljeno v dva sklopa:

1. Razgradnja kokcidiostatikov v iztrebkih in zemlji, njihov vpliv na rast krmnih rastlin in tveganje za okolje;
2. Določanje ostankov kumafosa in amitraza v čebeljih izdelkih in ugotavljanje njunega vpliva na čebele ter ugotavljanju toksičnosti kumafosa za sesalce.

Tematika prvega sklopa bo v sledečem tekstu v podpoglavjih predstavljena s številko X.1., tematika drugega sklopa pa pod številko X.2.

1.1. Monenzin in lasalocid kot kokcidiostatika v intenzivni brojlerski proizvodnji

Monenzin in lasalocid sta najpogosteje uporabljana karboksilna ionoforna antibiotika. Lasalocid je na slovenskem tržišču na razpolago v obliki preparata Avatec (Alpharma), monenzin pa kot Elancoban (Eli Lilly and Company) in Coxidin (Huvepharma). Namenjena sta za rejo v perutninarstvu za preventivo in zdravljenje kokcidioze pri piščancih in puranih. Oba se iz tretiranih živali izločata z iztrebki, pretežno v nespremenjeni obliki. Podatkov o tveganju, ki ga lasalocid predstavlja za talne organizme, in o tem, koliko časa poteka njegova razgradnja v iztrebkih in kdaj je le-te varno uporabiti za gnojenje, je bilo v literaturi zelo malo. O okoljskih učinkih monenzina je znanega nekoliko več, vendar ni bilo podatkov o njegovi usodi v okolju. Zato smo v tem sklopu projekta izvedli študije razgradnje lasalocida v iztrebkih tretiranih živali pri različnih pogojih shranjevanja (kompostiranje in shranjevanje brez kompostiranja) in tako določili njegovo razpolovno dobo v iztrebkih. Prav tako smo izvedli test kronične toksičnosti lasalocida na deževnikih (OECD 222). Oba kokcidiostatika smo uporabili v poljskih poskusih, kjer nas je zanimala njuna razpolovna doba in učinki na krmne rastline. Zmanjšana reprodukcija talnih organizmov, ki imajo bistveno vlogo pri razgradnji in kroženju snovi v ekosistemih, predstavlja zmanjšano bakterijsko razgradnjo in s tem nižjo rastlinsko produkcijo, kar ima lahko resne posledice za pridobivanje hrane in trajnostno rabo zemljišč. Poleg tega je bil namen dela iz dobljenih podatkov o razgradnji in kronični toksičnosti monenzina in lasalocida izračunati oceno tveganja za gnojenje kmetijskih površin z iztrebki brojlerjev, tretiranih z lasalocidom ali monenzinom.

1.2. Kumafos in amitraz kot zdravili za zatiranje varoze pri čebelji družini

Na področju zdravstvenega varstva čebel je zadnja tri desetletja eden največjih problemov zatiranje varoze, zajedavske bolezni čebelje družine, ki jo povzroča pršica *Varroa destructor*. Varoja se razmnožuje v čebelji zalegi in s sesanjem hemolimfe poškoduje čebeljo ličinko, parazitira pa tudi na odraslih čebelah. Če varoj ne zatiramo, se v čebelji družini razmnožijo v tolikšni meri, da čebelja družina v kratkem času odmre. Zaradi tega varoje zatiramo, imenovanimi akaricidi, ki morajo biti aplicirani v takih oblikah in odmerkih, da ne škodujejo predstavnikom čebelje družine, hkrati pa čim bolj učinkovito uničujejo varoje. Zaradi morebitnih ostankov insekticidnih zdravil v čebeljih pridelkih predstavlja skrb za varne čebelje pridelke za potrošnika in zdravo okolje za razvoj čebelje zalege pomemben segment v zatiranju varoze. V Sloveniji smo za zatiranje varoze v zadnjih nekaj letih poleg drugih zdravil uporabljali amitraz v obliki zdravila Apivar (Veto-pharma, Francija), ki smo ga predpisali kot glavno zdravilno učinkovino za poletno zatiranje varoj v letu 2009 v okviru nacionalnega programa zatiranja varoze, čebelarji pa so ga v minulih letih veliko uporabljali tudi v drugih oblikah.

Poleg amitraza smo uporabljali tudi kumafos v obliki lastniškega zdravila Perizin (Bayer, Nemčija), ki se uporablja za zatiranje varoze v zimskem času, nekaj pa so ga čebelarji uporabljali tudi v drugih pripravkih. V letu 2010 je bila učinkovina kumafos predpisana v obliki lastniškega zdravila CheckMite (Bayer, Nemčija) v okviru nacionalnega programa zatiranja varoze pri večini čebeljih družin v Sloveniji. Poleg ostankov amitraza in kumafosa, ki se lahko pojavljajo v medu, kar je vsekakor aktualno z vidika varstva potrošnika, se pojavlja tudi vprašanje ostankov in vpliva obeh pesticidov v vosku iz katerega je zgrajeno satje, kjer se poteka razvoj zalege. Ostanki v zalogi, ki predstavlja prehrano za čebele, ter ostanki v satju lahko bistveno vplivajo na razvoj čebelje zalege ter vitalnost čebel in posledično na pojav drugih bolezni.

Stabilne lipofilne učinkovine akaricidov, uporabnih v čebelarstvu, se lahko akumulirajo v satju. Zaradi tega predstavljajo potencialen vir onesnaženja medu, saj lahko iz voska difundirajo v med, pa tudi v čebeljo zalego. Čistost voska pa je pomembna tudi zato, ker se uporablja tudi v farmacevtski in kozmetični industriji.

Amitraz je triazapentadienski akaricid, uporaben za zatiranje parazita varoje. Molekula amitraza je zelo nestabilna in lahko prek intermediatov hidrolizira v druge stabilnejše toksične produkte. Kemijske strukture le-teh so znane: 2,4-dimetilanilin (DMA), 2,4-dimetilfenilformamid (DMF) in N-(2,4-dimetilfenil)-N-metilformamidin (DPMF).

Kumafos je organofosfatni pesticid, ki povzroči fosforilacijo acetilholin esteraze. Za razliko od amitraza, je kumafos stabilen pri kislem, nestabilen pa pri bazičnem pH. Poleg tega, da se pri zdravljenju varoze s kumafosom lahko pojavijo neželeni učinki na čebeljo družino, lahko kot kontaminant medu deluje tudi na potrošnike medu. S tem v zvezi je bil namen dela ugotoviti vpliv zdravljenja z omenjenimi zdravili na donosnost čebeljih družin, določiti morebitno akumulacijo zdravil v medu, čebelji zalegi in vosku ter ugotoviti toksičnost nizkih koncentracij kumafosa za sesalce.

2. KRATEK POVZETEK KLJUČNIH UGOTOVITEV IZ LITERATURE

2.1. Ekotoksikološki učinek prisotnosti lasalocida in monenzina v piščančjem gnoju

Razgradnja lasalocida v iztrebkih tretiranih živali je močno odvisna od vlage in temperature iztrebkov (EFSA, 2004). V izsušenih iztrebkih razgradnja ne poteka, zato lahko sklepamo da

gre za biodegradacijo. V iztrebkih, ki jim je bil lasalocid dodan umetno, je v 30 dneh razpadlo več kot 75% učinkovine. Študij z uporabo iztrebkov tretiranih živali in shranjevanja pri realnih pogojih ni. Študija na monenzinu, ki je strukturno podoben lasalocidu in ima podoben mehanizem delovanja, je pokazala, da je pri kompostiranju puranjih iztrebkov razpolovna doba monenzina 17 dni (Dolliver s sod., 2008).

Podatkov o toksičnosti lasalocida za netarčne organizme je v literaturi malo. Test akutne toksičnosti za deževnike (*Eisenia andrei*) (EFSA, 2004) je pokazal, da je LC50 pri 71.8 mg kg⁻¹ lasalocida (nominalna vrednost, normalizirana na vsebnost organske snovi v testni zemlji). Pri tem je potrebno opozoriti, da so naše dosedanje študije na monenzinu (Žižek in sod., 2011) pokazale, da poročanje nominalnih koncentracij, uporabljenih v testih, ni dovolj. Realne koncentracije monenzina, ki smo jih izmerili v naših testih, so bile tudi do 30% nižje od nominalnih. Pri izračunavanju LC_x, EC_x in NOEC zato lahko pride do podcenjevanja strupenosti določene substance. Kroničnih testov na lasalocidu, kakršen je test za razmnoževanje deževnikov, nismo zasledili. Ker so kronična toksičnost in subletalni učinki na populacije s stališča varovanja okolja veliko bolj relevantni podatki, smo v tem delu projekta izvedli test kronične toksičnosti pri deževnikih (OECD, 2004) in izmerili dejanske testne koncentracije pred in po testu. Iz učinka na reprodukcijo smo tako dobili vrednosti PNEC (predicted no effect concentration), ki se jih uporablja pri izračunu ocene tveganja.

Študija tveganja ionofornih antibiotikov za okolje (Hansen s sod., 2009) je pokazala, da je podatkov o dejanskih koncentracijah lasalocida, ki jih lahko pričakujemo v okolju po gnojenju z iztrebki tretiranih živali, premalo, da bi lahko izračunali zanesljiv faktor tveganja. Zato bodo naši podatki o razgradnji lasalocida in njegovih koncentracijah v iztrebkih pomembno prispevali k našem poznavanju tveganja, ki ga ta ionoforni antibiotik predstavlja z okolje in netarčne talne organizme.

2.2. Ostanke kumafosa in amitraza v čebeljih izdelkih in ugotavljanje njunega vpliva na čebele ter ugotavljanje toksičnosti kumafosa za sesalce

Poznano je, da se zdravila, ki se uporabljajo za zatiranje varoze pri čebelji družini, lahko akumulirajo v medu in drugih čebeljih izdelkih in s tem prihajajo v stik s porabniki čebeljih izdelkov, poleg tega pa njihovo delovanje lahko vpliva tudi na vitalnost čebelje družine (Xu s sod., 2009; Martel in Zaggane 2002; Korta s sod., 2002). Za kumafos in amitraz kot zdravili, ki se ju veliko uporablja za zatiranje varoze, so prav zaradi tega postavljene zakonsko predpisane najvišje vrednosti (MRL), ki se lahko nahajajo v medu in znašajo za amitraz in njegove razgradne produkte 200 µg/kg, za kumafos pa 100 µg/kg (Commission regulation, 2009). Literatura navaja tudi podatke o toksičnosti amitraza in kumafosa (A Review of Treatment Options For Control of Varroa mites in New Zeland, 2001; Karazafiris s sod. 2008). Razmeroma malo pa je podatkov o vsebnosti amitraza in kumafosa v medu in vosku po tretiranju čebeljih družin z omenjenima zdraviloma (Tremolada s sod. 2004). Opravljene raziskave navajajo, da amitraz v nekaj dneh v medu in vosku hidrolizira in razpade na razgradne produkte 2,4-dimetilanilin (DMA), 2,4-dimetilfenilformamid (DMF) in N-(2,4-dimetilfenil)-N-metilformamidin (DPMF) (Korta s sod., 2001). Predoziranje obeh omenjenih zdravil lahko povzroči odmrtnje posameznih čebel ali cele čebelje družine (A Review of Treatment Options For Control of Varroa mites in New Zeland, 2001), o vplivu uporabe terapevtskih odmerkov na donosnost čebelje družine pa ni podatkov. Prav tako ni poznan vpliv nizkih koncentracij teh zdravil na zdravje sesalcev.

3. UPORABLJENE METODE DELA

3.1. Metode izvajanja poskusa z lasalocidom in monenzinom

Pri izvajanju naloge smo uporabljali test kronične toksičnosti lasalocida na deževnikih (OECD 222), analize prisotnosti lasalocida smo opravili z metodo visokotlačne tekočinske kromatografije (HPLC) s fluorescenčno detekcijo na opremi Varian Prostar 363, prisotnost monenzina smo določali z metodo tekočinska kromatografija s tandemskim masnim detektorjem (LC-MS/MS). Detekcijo smo izvajali na masno selektivnem detektorju Xevo TQ MS (Waters).

Za ugotavljanje morebitnega vpliv lasalocida in monenzina na rast rastlin smo uporabljali teste po smernicah OECD (test št. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test; OECD, 2003).

Vsebnost dušika v pšenici smo merili s Kjeldahlovo metodo po razklopu v žveplovni kislini, alkalizaciji z natrijevim hidroksidom, destilaciji v borovo kislini in titraciji s kloro vodikovo kislino. Koncentracije fosforja, kalija, kalcija in magnezija smo merili z masno spektroskopijo z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS) po kislinskem razklopu.

3.2. Vpliv amitraza in kumafosa na donosnost čebelje družine, njuna akumulacija v medu, čebelji zalegi in vosku ter ugotavljanje toksičnosti kumafosa za sesalce

Donosnost čebelje družine, akumulacijo amitraza in kumafosa v medu, čebelji zalegi in vosku smo spremljali dve zaporedni čebelarski sezoni. Vpliv amitraza in kumafosa na donosnost smo opravljali s periodičnimi kliničnimi pregledi čebeljih družin, pri katerih smo izvedli oceno zaležene površine in proizvodnjo medu ter peloda. Pri oceni delovanja kumafosa je bilo v poskus vključenih 15 čebeljih družin. Pet čebeljih družin je ob zdravljenju prejelo terapevtski odmerek kumafosa (Checkmite, Bayer, Nemčija), pet za polovico preseženi terapevtski odmerek, pet panjev pa ni bilo tretiranih s kumafosom in so služili kot kontrola. V poskus z amitrazom je bilo vključenih 10 čebeljih družin. Ob zdravljenju jih je Pet prejelo terapevtski odmerek amitraza (Apivar, Veto-pharma, Francija), pet pa jih je služilo kot kontrola. Določanje kumafosa in amitraza v vzorcih medu in zalege smo opravili s tekočinsko ekstrakcijo s heksanom ter metodo reverzno-fazna tekočinska kromatografijavisoke ločljivosti (RP-HPLC) z UV detekcijo. Kromatografska ločba je potekala pri valovnidolžini 289 nm na koloni C18 z gradientom mobilne faze. Za določanje kumafosa in amitraza v vosku smo uporabljali s plinsko kromatografijo z masno detekcijo. Statistično analizo o pokriti in nepokriti zalegi ter donosnosti čebelje družine smo izvedli z SPSS ver 21.0 (IBM, Chicago, ZDA). Primerjavo podatkov o zaleženosti in donosnosti čebeljih družin, ki so bile zdravljene s kumafosom in tistih, pri katerih kumafosa nismo uporabili, smo izvedli s Studentovim *t*-testom (amitraz) in z one way ANOVA (kumafos). Ugotavljanje statistično značilnih razlih med vrednostmi kumafosa v vosku smo izvedli z RM ANOVA. Statistična analiza ugotovljenih koncentracij kumafosa in amitraza v medu in čebelji zalegi zaradi zgolj posameznih izmerjenih vrednosti ne bi dala relevantnih podatkov, zato je nismo izvedli.

Pri ugotavljanja neposrednega vpliva kumafosa na delovanje možganov smo opazovali odrasle miši, ki so bile izpostavljene kumafosu, morebitne dolgotrajne učinke na razvoj možganov smo opazovali ob izpostavljenosti brejih miši v obdobju razvoja zarodka ter takoj po rojstvu, ko se možgani intenzivno razvijajo.

V prvem poskusu smo odrasle mišje samce in samice izpostavili dvema dozama kumafosa 1 mg/kg in 0,1 mg/kg, ki smo ga dodali v pitno vodo. Miši so pitno vodo s kumafosom prejemale od starosti 60 dni do žrtvovanja in bile v tem času (med 70 in 90 dnevom starosti) testirane v vedenjskih testih, ko so prejemale kumafos s pitno vodo. V drugem poskusu smo vodo s kumafosom (enake doze kot v prvem poskusu) dali za pitje brejim mišim dva tedna pred paritvijo, ves čas brejosti do kotitve in nato še ves čas laktacije do odstavitve mladičev. Mladiči po odstavitvi pri treh tednih starosti niso bili več izpostavljeni kumafosu, teste obnašanja pa smo izvedli, ko so bili stari med 60 in 90 dni.

Toksičnost nizkih koncentracij kumafosa za miši kot modelne organizme smo izvajali s standardiziranimi vedenjskimi testi. Izvedli smo naslednje teste:

- test dvignjenega labirinta, ki je pokazatelj anksioznemu podobnega obnašanja;
- test zakopavanja frnikol: tudi ta test je pokazatelj anksioznemu podobnega obnašanja;
- test prisilnega plavanja se smatra kot pokazatelj depresivnemu podobnega obnašanja;
- test odprtega polja, s katerim se ugotavlja splošno aktivnost in anksioznemu podobno obnašanje;
- test socialnega prepoznavanja, kot modelni test za avtizmu podobne motnje (University of Wisconsin – Madison, 2013).

Z uporabo mikromrež smo pri miših, ki so bile vključene v teste obnašanja, ugotavljali izraženost genov v možganih.

4. REZULTATI RAZISKAVE

4.1. Rezultati poskusa 'Razgradnja kokcidiostatikov v iztrebkih in zemlji, njihov vpliv na rast krmnih rastlin in tveganje za okolje'

Izmerjene koncentracije lasalocida v testni zemlji so prikazane v Tabeli 1.

Tabela 1: nominalne in izmerjene koncentracije lasalocida v testni zemlji Lufa 2.2 v testu kronične strupenosti za deževnike Eisenia andrei

Nominalna koncentracija (mg/kg)	Izmerjena koncentracija (mg/kg)
5	4.77 ± 0.09
30	29.1 ± 0.33
60	62.4 ± 0.43
125	121 ± 2.30
200	163 ± 2.52

Test je bil veljaven po kriterijih uporabljenega OECD standarda – v kontrolnih skupinah ni bilo pogina odraslih živali in vsaka paralelka kontrole je vsebovala več kot 30 juvenilnih organizmov. Glede na izmerjene vsebnosti dodanega lasalocida je LC₅₀ za deževnike

156 mg/kg suhe zemlje, EC_{50} za razmnoževanje deževnikov 69,7 mg/kg suhe zemlje in NOEC za reprodukcijo 4,77 mg/kg.

V gnoju in kompostu smo pred začetkom poskusa in po njem izmerili pH, delež suhe in organske snovi ter odstotek dušika. Rezultati meritev so prikazani v Tabeli 2.

Tabela 2: Izmerjeni parametri v gnoju in kompostu pred in po poskusu razgradnje lasalocida

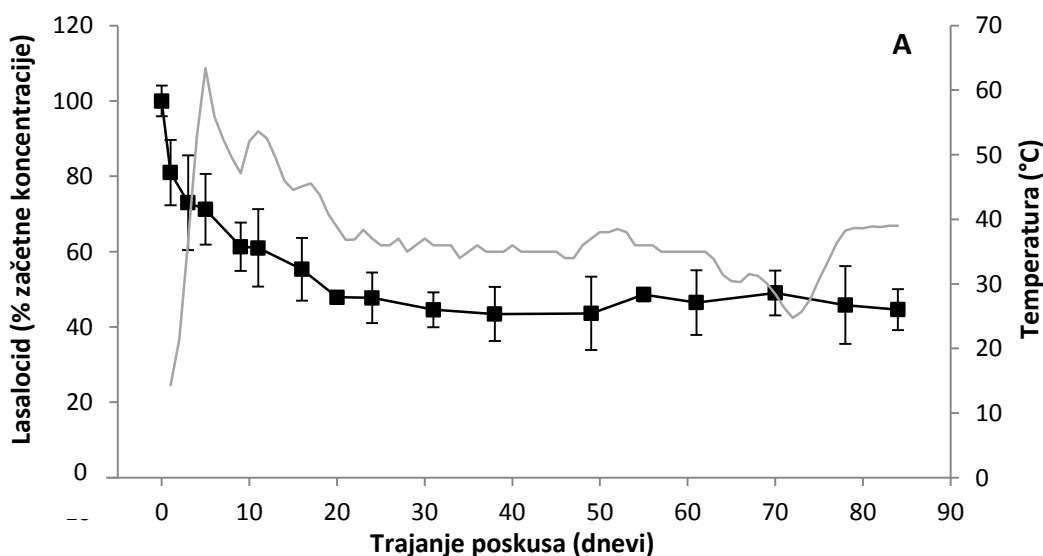
		pH	% suhe snovi	% organske snovi	% dušika
Gnoj	začetek	8.8	40.2	9.7	1.81
	konec	8.5	66.6	18.0	2.69
Kompost	začetek	8.8	38.7	3.8	0.76
	konec	8.7	39.0	11.7	1.23

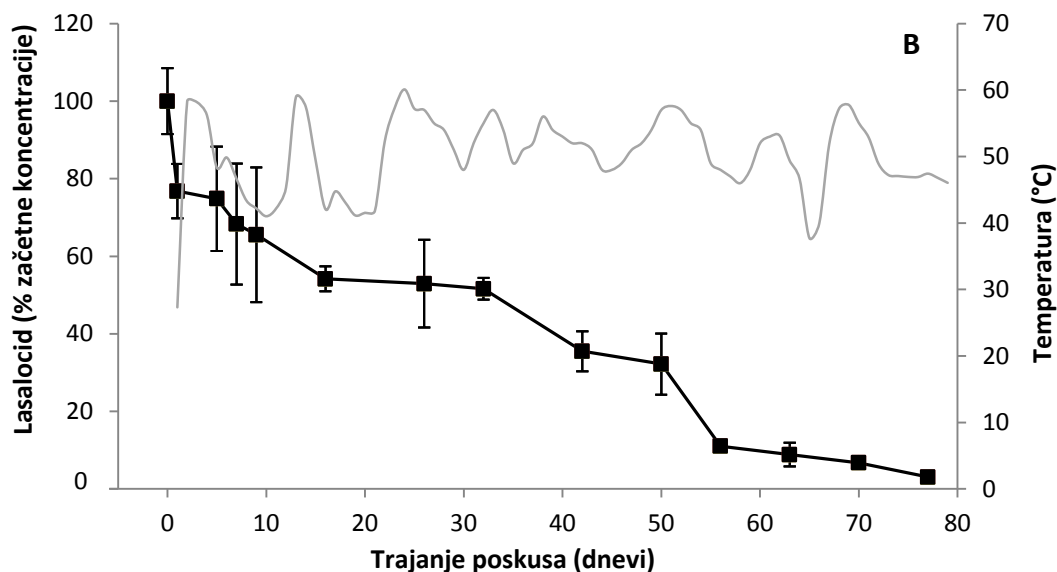
Vzorci za meritve lasalocida smo v začetku poskusa jemali v dnevih intervalih, po enem tednu pa dvakrat tedensko. Ekstrakcije lasalocida in meritve vzorcev so potekale na enak način kot je bilo opisano za testno zemljo pri poskusih kronične toksičnosti za deževnike. Vsak vzorec smo pripravili v treh paralelkah. Razgradnja lasalocida v obeh substratih (gnoju in kompostu) je prikazana na Sliki 2.

Razgradnjo lasalocida smo izračunali po dvofaznem kinetičnem modelu, ki sta ga predlagala Gustafson in Holden (1990):

$$C_t = C_0(1 + \beta t)^{-\alpha}$$

kjer je C_0 začetna koncentracija lasalocida, C_t koncentracija ob času t , α in β pa sta parametra gama verjetnostne razporeditve razpadnih konstant. Razpolovni čas lasalocida izrazimo z enačbo $(0.5 - (1/\alpha) - 1)/\beta$.

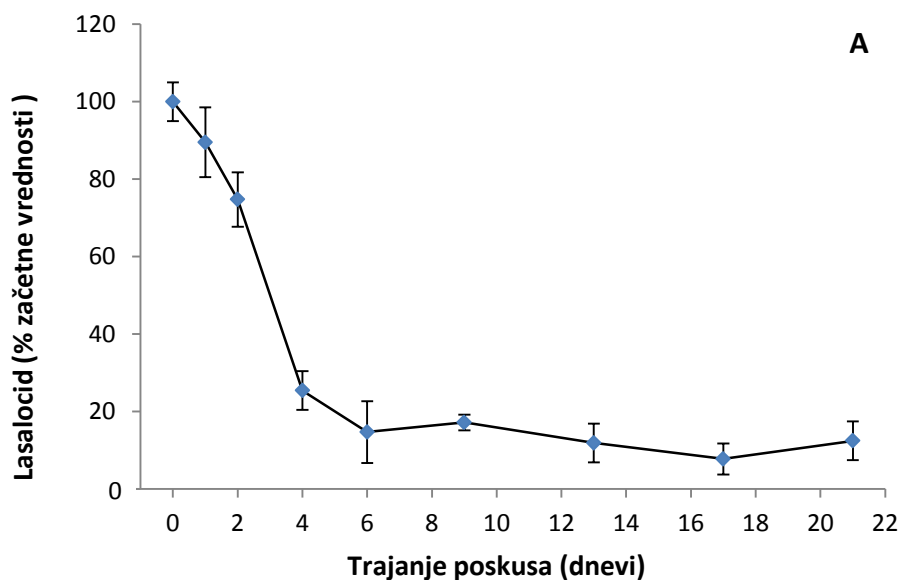


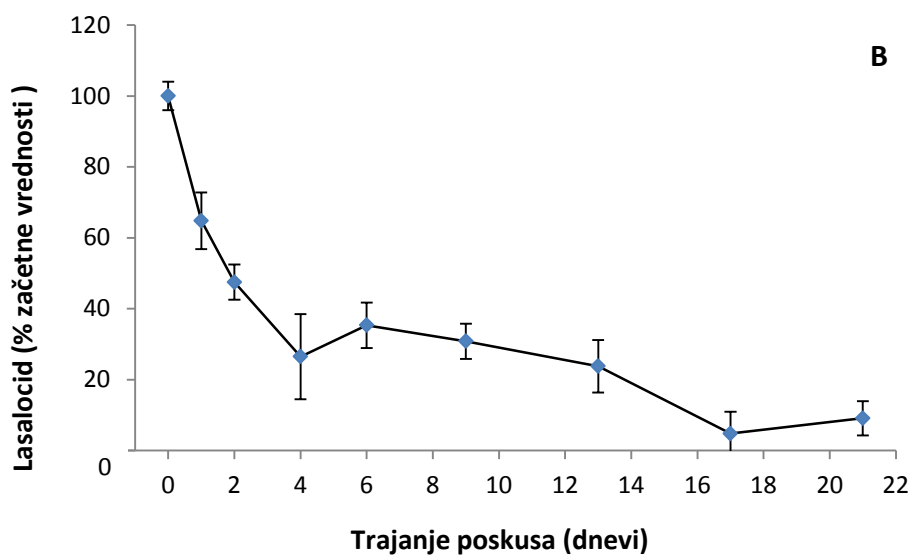


Slika 2: Razgradnja lasalocida v gnoju (A) in kompostu (B). Prikazane so srednje vrednosti (črni kvadrтки) in standardne deviacije treh neodvisnih vzorcev. Siva črta prikazuje temperature gnoja oz. komposta v času trajanja poskusa.

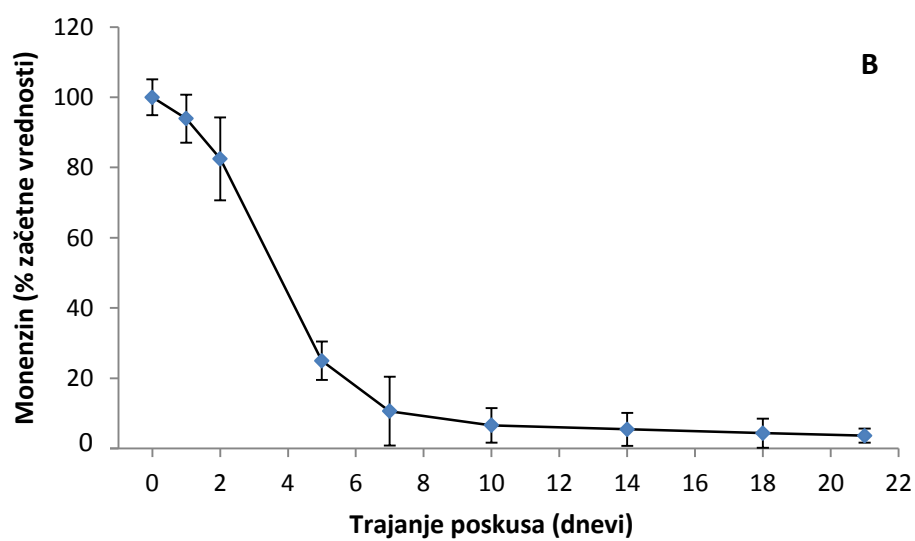
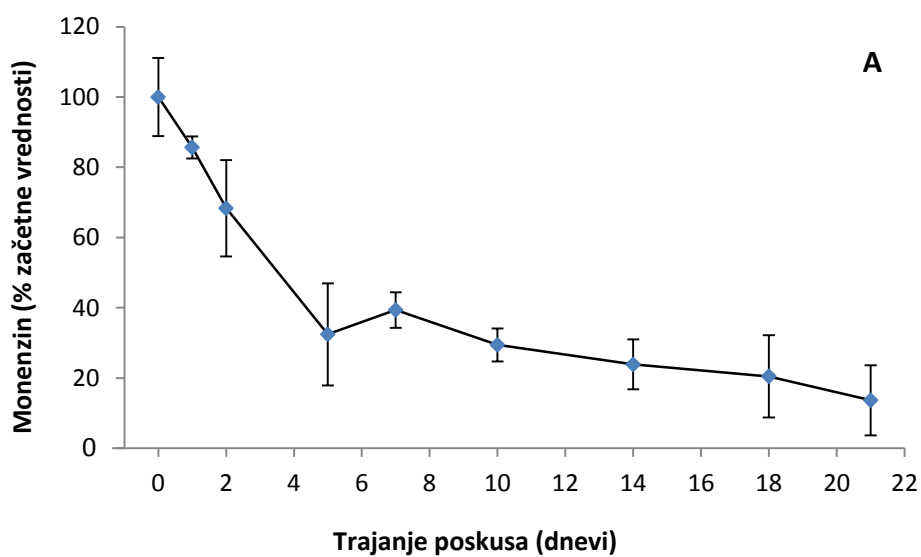
Razpolovni čas lasalocida in monenzina v zemlji smo izračunali na enak način kot je opisano za razgradnjo lasalocida v gnoju in kompostu.

Rezultati razgradnje lasalocida v zemlji so prikazani na Sliki 3, rezultate razgradnje monenzina pa prikazuje Slika 4.





Slika 3: Razgradnja lasalocida v zemlji njive (A) in travnika (B)

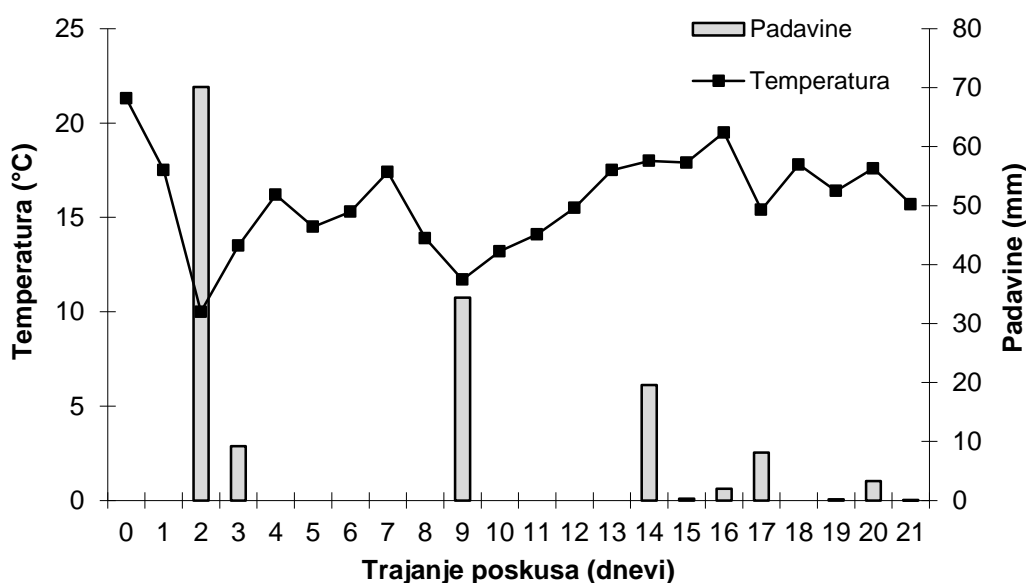


Slika 4: Razgradnja monenzina v zemlji njive (A) in travnika (B)

Začetne in končne koncentracije obeh kokcidiostatikov v zemlji ter njune razpolovne dobe so prikazane v Tabeli 3. Koncentracije so izražene na gram suhe zemlje.

Tabela 3: Koncentracije lasalocida in monenzina v zemlji in njun razpolovni čas

	Koncentracija v zemlji ob začetku poskusa ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Koncentracija v zemlji na koncu poskusa ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		Razpolovni čas (dni)	
	njiva	travnik	njiva	travnik	njiva	travnik
Lasalocid	$28,4 \pm 3,2$	$31,7 \pm 3,4$	$3,95 \pm 2,7$	$2,47 \pm 1,9$	3,84	3,03
Monenzin	$29,3 \pm 2,0$	$27,4 \pm 1,8$	$4,01 \pm 3,2$	$1,21 \pm 0,8$	5,67	5,45



Slika 5: Vremenske razmere v času poskusov razgradnje lasalocida in monenzina na kmetijskih površinah

Rezultati na klitje in rast detelje so prikazani v Tabeli 4.

Tabela 4: Rezultati laboratorijskega testa vpliva lasalocida in monenzina na klitje in rast detelje

	LC ₅₀ (mg/kg)	EC ₅₀ višina (mg/kg)	EC ₅₀ masa (mg/kg)
Lasalocid	48,1	24,8	19,4
Monenzin	35,4	20,2	14,6

Rezultati poljskega poskusa kopičenja monenzina in lasalocida v krmnih rastlinah ter njunega vpliva na hranilno sestavo rastlin so prikazani v Tabeli 5.

Tabela 5: Rezultati poljskega poskusa kopičenja monenzina in lasalocida v krmnih rastlinah ter njunega vpliva na hranilno sestavo rastlin

^a lasalocid

Trajanje poskusa (dni)	Suha snov (%)			Dušik (%)			Organska snov (%)			Mg (%)			P (%)			K (%)			Ca (%)		
	0	LA ^a	MO ^b	0	LA	MO	0	LA	MO	0	LA	MO	0	LA	MO	0	LA	MO	0	LA	MO
0	91,3	90,5	90,3	2,20	5,13	4,85	74,1	87,3	86,5	0,258	0,156	0,155	0,273	0,343	0,384	2,56	3,41	3,63	0,444	0,366	0,376
5	90,8	90,9	91,0	2,51	4,00	4,18	88,7	88,4	87,3	0,123	0,133	0,138	0,334	0,297	0,392	3,45	3,57	4,01	0,343	0,381	0,378
11	91,6	91,1	91,9	3,89	3,16	4,30	88,3	88,8	86,2	0,151	0,122	0,158	0,441	0,377	0,523	3,77	3,73	5,00	0,433	0,354	0,402
17	91,4	93,1	93,0	3,26	2,71	2,53	88,9	88,5	88,4	0,130	0,128	0,120	0,363	0,377	0,390	3,53	3,75	3,70	0,324	0,329	0,296
24	91,8	92,0	92,2	3,23	2,22	2,66	90,2	91,0	90,5	0,133	0,108	0,111	0,379	0,314	0,387	3,17	2,82	3,21	0,304	0,260	0,239

^b monenzin

Tabela 5: Rezultati poljskega poskusa kopičenja monenzina in lasalocida v krmnih rastlinah ter njunega vpliva na hranilno sestavo rastlin

^a lasalocid

^b monenzin

Tabela 6: ocena tveganja za lasalocid in monenzin na njivah v primeru letnega vnosa dušika 170 kgN/ha. PNEC – predvidena koncentracija brez učinka, PEC – predvidena okoljska koncentracija, PEC/PNEC – količnik tveganja, scenarij I – uporaba gnoja brez staranja, scenarij II – uporaba gnoja, staranega tri mesece.

	PNEC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	PEC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		PEC/PNEC	
		Scenarij I	Scenarij II	Scenarij I	Scenarij II
Lasalocid	47,7	28,4	14,2	0,59	0,30
Monenzin	35,0	29,3	14,7	0,85	0,42

Kot je vidno iz Tabele 6., količnik tveganja v nobenem primeru ne presega 1. Vendar pa je po nitratni direktivi mejna vrednost letnega vnosa dušika v tla lokalno (na 4-kosnih travnikih) dovoljena do 320 kgN/ha. Za ta primer smo PEC na travniku izračunali iz vrednosti, ki smo jo izmerili na začetku poskusa razgradnje obeh kokcidiostatikov na travniku. Izračunana ocena tveganja za tak primer je predstavljena v Tabeli 7.

Tabela 7: ocena tveganja za lasalocid in monenzin na travnikih v primeru letnega vnosa dušika 320 kgN/ha. PNEC – predvidena koncentracija brez učinka, PEC – predvidena okoljska koncentracija, PEC/PNEC – količnik tveganja, scenarij I – uporaba gnoja brez staranja, scenarij II – uporaba gnoja, staranega tri mesece.

	PNEC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	PEC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		PEC/PNEC	
		Scenarij I	Scenarij II	Scenarij I	Scenarij II
Lasalocid	47,7	59,7	29,9	1,25	0,63
Monenzin	35,0	51,6	25,8	1,47	0,74

Po do sedaj pridobljenih podatkih uporaba gnoja, kontaminiranega z lasalocidom ali monenzinom na kmetijskih površinah pri gnojenju do letnega vnosa dušika 170 kgN/ha ni sporna. V primeru gnojenja 4-kosnih travnikov z večjimi količinami gnoja pa obstaja povečano tveganje. Ker uporaba nestaranega gnoja razen možnosti kontaminacije s kokcidiostatiki predstavlja tudi možnost širjenja bolezni in onesnaženja ter izgubo hranil, je v vsakem primeru priporočljivo gnoj starati vsaj tri mesece. Na ta način se izognemo tudi tveganju za neciljne talne organizme in ne ogrozimo proizvodnega potenciala kmetijskih površin, ki bi lahko bil v nevarnosti, če s kokcidiostatiki škodujemo pomembnim talnim dekompozitorjem kot so deževniki, ki skrbijo za nemoteno kroženje snovi v okolju. Potrebne so nadaljnje raziskave o transportu lasalocida in monenzina v okolju, posebno v površinske in podzemne vode. O večkratni (in večletni) uporabi kontaminiranega gnoja na istih kmetijskih površinah prav tako ni dovolj znanega, zato ne moremo zagotoviti, da na takšnih površinah ne prihaja do kopičenja lasalocida ali monenzina, še posebno v sušnih razmerah, ko ne prihaja do mikrobne razgradnje.

4.2. Rezultati poskusa 'Določanje ostankov kumafosa in amitraza v čebeljih izdelkih in ugotavljanje njunega vpliva na čebele ter ugotavljanju toksičnosti kumafosa za sesalce'

Rezultati kliničnih preiskav (velikost pokrite in nepokrite zalege ter zalogo peloda in medu) čebeljih družin pred, med in po zdravljenju z amitrazom ali kumafosom prikazujeta Tabeli 8 in 9.

Tabela 8. Podatki o zaleženosti in donosnosti čebeljih družin brez zdravljenja in z zdravljenjem z amitrazom

	Prvo leto poskusa			Drugo leto poskusa	
	Pred zdravljenjem	Pred zdravljenjem	Po zdravljenju	Pred zdravljenjem	Po zdravljenju
Pokrita zalega (%)					
Brez zdravljenja z amitrazom	35,0±10,2	23,9±13,6	11,4±2,9	36,5±15,9	21,3±11,8
Terapevtski odmerek amitraza	39,7±5,9	28,7±6,8	12,4±5,0	48,8±6,5	21,3±4,9
Nepokrita zalega (%)					
Brez zdravljenja z amitrazom	13,6±9,9	31,2±9,3	5,6±4,5	20,5±6,5	51,2±2,9
Terapevtski odmerek amitraza	12,3±3,91	21,2±8,3	5,3±4,1	14,7±2,9	44,2±2,9
Med (%)					
Brez zdravljenja z amitrazom	13,6±6,0	60,6±15,7	56,6±17,3	20,5±11,07	51,2±14,2
Terapevtski odmerek amitraza	19,9±12,21	76,8±8,5	56,7±12,7	11,7±3,11	51,6±11,7
Pelod (%)					
Brez zdravljenja z amitrazom	28,9±6,6	15,0±5,6	16,1±4,1	14,7±4,1	18,0±5,3
Terapevtski odmerek amitraza	20,7±5,13	17±9,1	22,6±5,7	11,0±7,51	8,5±8,1

Tabela 9: Podatki o zaleženosti in donosnosti čebeljih družin brez zdravljenja in z zdravljenjem s terapevtskim in povečanim odmerkom kumafosa (povprečje ± SD)

	Prvo leto poskusa			Drugo leto poskusa		
	Pred zdravljenjem	Pred zdravljenjem	Po zdravljenju	Pred zdravljenjem	Pred zdravljenjem	Po zdravljenju
Pokrita zalega (%)						
Brez kumafosa	15,9±4,1	17,2±5,1	12,8±2,4	16,2±12,7	13,1±17,9	6±1,3
TD kumafosa	20,1±4,0	13,1±9,7	12,1±4,9	30,0±12,2	15,2±8,0	8,4±7,1
1,5 x TD kumafosa	14,5±1,7	11,3±8,4	12,3±4,2	37,6±10,1	6,5±8,6	3,1±2,1
Nepokrita zalega (%)						
Brez kumafosa	5,3±2,2	10,4±2,9	3,7±3,1	2,5±2,0	2,5±2,1	1,8±1,1
TD kumafosa	6,7±6,5	3,9±3,2	4,5±4,2	3,5±3,1	11,8±9,0	
1,5 x TD kumafosa	6,1±3,0	9,0±6,3	4,2±2,3	2,5±2,0	5,0±2,4	
Med (%)						
Brez kumafosa	54,4±10,2	79,6±17,1	79,0±22,6	42,0±30,1	23,6±25,1	58,0±35,8
TD kumafosa	39,8±12,9	72,0±17,8	69,5±7,7	41,5±12,0	56,2±18,6	62,6±12,7
1,5 x TD kumafosa	29,5±16,4	60±19,5	45,8±29,1	59,7±11,1	30±14,7	46,8±12,2
Pelod (%)						
Brez kumafosa	16,3±11,8	5,3±1,6	5,1±3,6	10,5±7,8	7,0±6,1	4,6±4,1
TD kumafosa	11,7±8,6	10,6±9,3	4,2±4,1	15,0±4,3	11,5±11,0	8,8±6,2
1,5 x TD kumafosa	30,1±13,5	19,6±9,0	5,9±3,4	27,9±11,8,0	21,0±8,0	23,3±11,8

Ob jemanju vzorcev po drugem zdravljenju z amitrazom (drugo leto poskusa) je bila ugotovljena močna invazija z varojo. Opazne so bile tudi posledice invazije na posameznih čebelah.

Vsebnost kumafosa v medu pred in po zdravljenju je prikazana v Tabeli 10. Rezultati analiz kažejo, da so bile vrednosti kumafosa v medu, vzorčenim pred zdravljenjem, pod mejo kvantifikacije metode, ki znaša 50 µg/kg. V prvem letu poskusa smo le pri eni čebelji družini (panj št. 18) ob uporabi 1,5 kratnega odmerka kumafosa po zdravljenju ugotovili vrednost 56,09 µg/kg, kar pa je še vedno pod zakonsko predpisanim MRL, ki znaša 100 µg/kg. V drugem letu poskusa vrednosti niso presegale LOQ. Iz rezultatov je razvidno, da uporaba terapevtskih odmerkov kumafosa ne povzroča zaznane akumulacije te snovi v medu, pri povečanem odmerku pa je akumulacija možna.

Tabela 10: Nivo kumafosa v medu pred in po zdravljenju

Panj št.	Kumafos v medu (µg/kg)				
	Prvo leto poskusa		Drugo leto poskusa		
	Pred zdravljenjem	Po zdravljenju	Pred zdravljenjem	Po zdravljenju	
1	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	TD
2	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	TD
3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	TD
4	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	TD
5	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	TD
6	< LOQ	< LOQ	23,17	< LOQ	1,5 x TD
7	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,5 x TD
8	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1,5 x TD
17	< LOQ	< LOQ	12,4	< LOQ	1,5 x TD
18	< LOQ	56,09	< LOQ	< LOQ	1,5 x TD
13	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	K
14	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	K
16	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	K
19	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	K
20	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	K

Legenda:

LOQ – meja kvantifikacije (limit of quantification)

TD – panj, pri katerem je bil uporabljen terapevtski odmerek kumafosa

1,5 x TD – panj, pri katerem je bil uporabljen za polovico presežen terapevtski odmerek kumafosa

K – panj, pri katerem se v času trajanja poskusa ni uporabilo kumafosa

Nivo kumafosa v čebelji zalegi pred in po zdravljenju so prikazani v Tabeli 11.

Tabela 11: Nivo kumafosa v čebelji zalegi pred in po zdravljenju

Kumafos v čebelji zalegi ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					
Panj št.	Prvo leto poskusa		Drugo leto poskusa		
	Pred zdravljenjem	Po zdravljenju	Pred zdravljenjem	Po zdravljenju	
1	< LOQ	567,81	< LOQ	58,26	TD
2	< LOQ	153,5	< LOQ	68,32	TD
3	59,25	204,93	< LOQ	215,78	TD
4	< LOQ	151,88	/	/	TD
5	< LOQ	223,8	< LOQ	97,96	TD
6	< LOQ	202,1	< LOQ	79,82	1,5 x TD
7	< LOQ	271,22	/	752,69	1,5 x TD
8	< LOQ	98,5	/	/	1,5 x TD
17	116,32	88,6	/	319	1,5 x TD
18	74,9	909,01	< LOQ	113,31	1,5 x TD
13	< LOQ	< LOQ	< LOQ	/	K
14	< LOQ	< LOQ	< LOQ	/	K
16	< LOQ	< LOQ	/	< LOQ	K
19	< LOQ	< LOQ	/	< LOQ	K
20	< LOQ	< LOQ	/	/	K

Legenda:

LOQ – meja kvantifikacije (limit of quantification)

TD – panj, pri katerem je bil uporabljen terapevtski odmerek kumafosa

1,5 x TD – panj, pri katerem je bil uporabljen za polovico presežen terapevtski odmerek kumafosa

K – panj, pri katerem se v času trajanja poskusa ni uporabilo kumafosa

/ - vzorca čebelje zalege ni bilo možno odvzeti

Akumulacijo kumafosa smo ugotovili v zalegi iz čebeljih družin, ki so bili zdravljeni s povečanim (1,5-kratnim) kot tudi terapevtskim odmerkom. Pri kontrolni skupini čebeljih družin, kjer se kumafos ni uporabljal, njegove prisotnosti nismo zaznali. Pri treh čebeljih družinah smo ugotovili prisotnost kumafosa v čebelji zalegi že pred vstavljanjem zdravila s kumafosom v panje.

Vsebnost kumafosa v satju (vosku) prikazuje Tabela 12.

Tabela 12: Nivo kumafosa v satju (vosku) pred in po zdravljenju

Panj št.	Kumafos v vosku (mg/kg)				
	Prvo leto poskusa		Drugo leto poskusa		
	Pred zdravljenjem	Po zdravljenju	Pred zdravljenjem	Po zdravljenju	
1	1,5	6,4	58	95	TD
2	2,8	8,8	14	33	TD
3	0,95	12	15	9,2	TD
4	0,57	1,5	12	10	TD
5	0,19	7,6	42	8	TD
6	8,5	17	4,6	24	1,5 x TD
7	1,7	6,3	40	26	1,5 x TD
8	5,1	2,4	4,7	5,4	1,5 x TD
17	0,49	9,4	28	13	1,5 x TD
18	1,4	36	35	10	1,5 x TD
13	10	11	0,64	27	K
14	2,4	6,5	18	4,2	K
16	0,29	5,2	7,0	18	K
19	1,7	1,3	31	35	K
20	5,1	4,6	22	17	K
Povprečje	2,85	9,07	22,13	22,32	
SE	0,67	1,90	3,67	4,98	

Legenda:

LOQ – meja kvantifikacije (limit of quantification)

TD – panj, pri katerem je bil uporabljen terapevtski odmerek kumafosa

1,5 x TD – panj, pri katerem je bil uporabljen za polovico presežen terapevtski odmerek kumafosa

K – kontrola; panj, pri katerem se v času trajanja poskusa ni uporabilo kumafosa

Pri našem delu v medu, čebelji zalegi in vosku tako pred, kot tudi šest tednov po vstavljanju zdravila v panje, nismo ugotovili prisotnosti amitraza in njegovih razgradnih produktov DMA, DMF in DPMF.

Vedenjski testi na miših niso pokazali razlik med kontrolnimi in poskusnimi živalmi, ki so prejemale kumafos v odmerku 1 mg/kg in 0,1 mg/kg telesne mase. Neposrednega vpliva na delovanje možganov niti dolgotrajnega vpliva na razvoj možganov pri zarodkih in mladih miši. V možganih na molekularnem nivoju kumafos ni vplival na aktivnost genov.

5. RAZPRAVA, ZAKLJUČKI IN PRIPOROČILA NAROČNIKU

5.1. Razlaga rezultatov v sklopu 'Razgradnja kokcidiostatikov v iztrebkih in zemlji, njihov vpliv na rast krmnih rastlin in tveganje za okolje'

Cilj dela na projektu je bil izdelati podrobne kriterije in priporočila za varno uporabo brojlarskih iztrebkov, kontaminiranih z lasalocidom ali monenzinom, za gnojenje kmetijskih površin, kjer pridobivamo krmne rastline. Določil o tem, kako ravnati z iztrebki, ki so kontaminirani z ostanki zdravil za zdravstveno varstvo živali, pri nas ni, zato naše delo predstavlja pomemben doprinos našemu poznavanju in obvladovanju tveganja, ki ga kokcidiostatiki predstavljajo za okolje.

Pri oceni tveganja za okolje se v Evropski Uniji ravnamo po smernicah Evropske Komisije (EC, 2003). Za oceno tveganja potrebujemo dve ključni informaciji: oceno izpostavljenosti (ang. exposure assessment) oz. koncentracijo snovi, ki jo lahko pričakujemo v okolju in jo označimo kot PEC (predicted environmental concentration), ter oceno vplivov (ang. effects assessment) oz. koncentracijo, pri kateri ima snov učinek na organizme v okolju (PNEC – predicted no effect concentration). Razmerje med tema dvema vrednostma (PEC/PNEC) imenujemo količnik tveganja. Če je količnik večji od 1, je okoljska koncentracija višja od koncentracije, ki nima vpliva na organizme in lahko rečemo, da obstaja tveganje za okolje. Za oceno okoljskih koncentracij (PEC) smo uporabili vrednosti, izmerjene po gnojenju s kontaminiranimi iztrebki tekom poskusov z razgradnjo lasalocida in monenzina v zemlji. Vrednost PNEC dobimo iz rezultatov ekotoksikoloških testov. Potrebujemo najnižjo vrednost, ki ni imela vpliva na testne organizme. V našem primeru je to vrednost NOEC za razmnoževanje deževnikov za lasalocid (4,77 mg/kg), ki smo jo pridobili v sklopu tega projekta. Ekotoksikološke teste z monenzinom smo izvedli v sklopu predhodne raziskave (Žižek s sod., 2011) in tudi v tem primeru je bilo razmnoževanje deževnikov najobčutljivejši parameter (NOEC = 3,50 mg/kg). Ker je sklepanje iz testnih organizmov, katerih odziv smo izmerili v kontroliranih laboratorijskih pogojih, na celoten ekosistem, kamor vnašamo določeno snov, povezano z veliko negotovostjo, vrednost PNEC dobimo tako, da najnižjo dobljeno vrednost v testih delimo s faktorjem zaupanja. Ta lahko zavzema vrednosti od 1 do 100, glede na razpoložljive podatke o kroničnih učinkih na organizme različnih življenjskih stadijev in trofičnih nivojev. Strokovnjaki se zaradi večje zanesljivosti in zato, da se izognejo morebitnemu podcenjevanju okoljskega tveganja, odločijo za faktor 100, ki smo ga uporabili tudi mi.

Za oceno tveganja smo izbrali dva scenarija: uporabo kontaminiranega gnoja brez staranja (scenarij I) in uporabo gnoja po treh mesecih staranja (scenarij II). Iz naših poskusov z razgradnjo lasalocida v gnoju in kompostu ter vrednosti v literaturi, ki smo jih našli za monenzin, smo predvideli, da v staranem gnoju (če predpostavimo staranje brez mešanja, dodajanja vlage in/ali kompostiranja) po treh mesecih vrednosti lasalocida oz. monenzina upadejo na polovico začetnih vrednosti.

Po do sedaj pridobljenih podatkih uporaba gnoja, kontaminiranega z lasalocidom ali monenzinom na kmetijskih površinah pri gnojenju do letnega vnosa dušika 170 kgN/ha ni sporna. V primeru gnojenja 4-kosnih travnikov z večjimi količinami gnoja pa obstaja povečano tveganje. Ker uporaba nestaranega gnoja razen možnosti kontaminacije s kokcidiostatiki predstavlja tudi možnost širjenja bolezni in onesnaženja ter izgubo hranil, je v vsakem primeru priporočljivo gnoj starati vsaj tri mesece. Na ta način se izognemo tudi tveganju za neciljne talne organizme in ne ogrozimo proizvodnega potenciala kmetijskih površin, ki bi lahko bil v nevarnosti, če s kokcidiostatiki škodujemo pomembnim talnim dekompozitorjem kot so deževniki, ki skrbijo za nemoteno kroženje snovi v okolju.

5.2. Razlaga rezultatov poskusa 'Določanje ostankov kumafosa in amitraza v čebeljih izdelkih in ugotavljanje njunega vpliva na čebele ter ugotavljanju toksičnosti kumafosa za sesalce'

Pri statistični obdelavi kliničnih pregledov čebeljih družin Studentov *t*-test (amitraz) in RM ANOVA (kumafos) ni bilo ugotovljenih statistično značilnih razlik v zaleženosti površine in donosnosti pred in po zdravljenju s kumafosom ali amitrazom med kontrolnimi in tretiranimi družinami (Tabeli 8 in 9).

Ugotavljanje prisotnosti ostankov kumafosa v medu, vzorčenim pred zdravljenjem, je pokazalo, da je bila vrednost v vseh panjih pod mejo kvantifikacije metode (LOQ), ki znaša 50 µg/kg. V prvem letu poskusa smo le pri eni čebelji družini (panj št. 18) ob uporabi 1,5 kratnega odmerka kumafosa po zdravljenju ugotovili vrednost 56,09 µg/kg (Tabela 10), kar pa je še vedno pod zakonsko predpisanim MRL, ki znaša 100 µg/kg. V drugem letu poskusa vrednosti niso presegale LOQ. Iz rezultatov je razvidno, da uporaba terapevtskih odmerkov kumafosa ne povzroča zaznane akumulacije te snovi v medu, pri povečanem odmerku pa je akumulacija možna.

Akumulacijo kumafosa smo ugotovili v zalegi iz čebeljih družin, ki so bili zdravljeni s povečanim (1,5-kratnim), kot tudi terapevtskim odmerkom (Tabela 11). Pri kontrolni skupini čebeljih družin, kjer se kumafos ni uporabljal, njegove prisotnosti nismo zaznali. Presenetljivo pa je, da smo pri treh čebeljih družinah ugotovili prisotnost kumafosa v čebelji zalegi že pred vstavljanjem zdravila s kumafosom v panje. Predvidevamo, da je to posledica difundiranja kumafosa iz satja (voska), kjer se kot lipofilna snov zaradi prejšnjih zdravljenj s kumafosom lahko akumulira.

Prisotnost kumafosa v vosku smo ugotovili tako pred zdravljenjem kot tudi po zdravljenju. Ker se je kumafos za zdravljenje varoze uporabljal že v preteklih letih, predvidevamo, da je prisotnost kumafosa v vosku že pred vstavljanjem zdravila s kumafosom v panje posledica akumulacije te snovi v iz predhodnih zdravljenj. To lahko podpremo z opažanji, da je koncentracija kumafosa v vosku v prvem letu poskusa po zdravljenju v vseh panjih, kjer je bilo vstavljeno zdravilo s kumafosom, bila višja kot pred zdravljenjem (Tabela 12). Podobna dejstva smo opazili tudi v drugem letu poskusa. Kljub temu pa nismo opazili statistično značilnih razlik. Predvidevamo, da se kumafos kot lipofilna snov akumulira v vosku. Naraščanje vsebnosti kumafosa v vosku smo opazili tudi v panjih, v katere ni bilo vstavljeno zdravilo, ki vsebuje kumafos. Najverjetneje ga ob zaletanju čebele iz panja, v katerega je bilo vstavljeno zdravilo, ki vsebuje kumafos, prenesejo, in na ta način kontaminirajo drug panj.

Rezultati kažejo, da se amitraz zaradi nestabilnosti ne akumulira v medu, čebelji zalegi in vosku. Prav tako se, ne akumulirajo njegovi razgradni produkti. V Evropski uniji je v čebeljih proizvodih maksimalna dovoljena rezidualna vrednost (MRL) za amitraz oz. njegove razgradne produkte 200 µg/kg. Kot kaže naša raziskava, je s tega stališča amitraz varno zdravilo, saj v nobenem vzorcu iz preiskovanih materialov nismo ugotovili prisotnosti amitraza ali njegovih razgradnih produktov, ki bi presegala LOQ (50 µg/kg).

Vse miši v naši raziskavi smo testirali v vseh petih testih, vendar pri nobenem od testov nismo dobili statistično zanesljivih razlik med tretiranimi in kontrolno skupino, iz česar sklepamo, da kumafos v dozah, s katerimi smo tretirali miši, nima niti neposrednega vpliva na delovanje možganov niti dolgotrajnega vpliva na razvoj možganov pri zarodkih in mladih miši, kar kaže, da kumafos v medu najverjetneje ne predstavlja nevarnosti za delovanje tistih delov možganov, ki so povezani s psihiatričnimi motnjami kot so anksioznost, depresija ali avtizem.

Za raziskavo z uporabo genskih mikromrež smo uporabili možgane miši iz kontrolne skupine ter miši, ki so prejemale visoko dozo kumafosa. Analiza rezultatov in statistična obdelava

podatkov nista pokazali statistično značilnih razlik v izraženosti genov med možgani miši iz kontrolne in iz poskusne skupine, kar kaže, da tu v možganih na molekularnem nivoju kumafos ni vplival na aktivnost genov.

Rezultati naše raziskave tako kažejo, da koncentracija kumafosa, ki je dovoljena v živilih v EU, ne predstavlja nevarnosti za razvoj in delovanje možganov.

Zaključki

- Z ekotoksikološkim testom kronične toksičnosti lasalocida za deževnike je bilo ugotovljeno, da je LC_{50} za deževnike 156 mg/kg suhe zemlje, EC_{50} za razmnoževanje deževnikov 69,7 mg/kg suhe zemlje, koncentracija, ki ni povzročila učinkov na reprodukcijo deževnikov pa 4,77 mg/kg suhe zemlje.
- Razpolovni čas za lasalocid na njivi znaša 3,84 in na njivi 3,03 dni, za monenzin pa 5,67 in 5,45 dni.
- Razgradnja lasalocida v gnoju poteka pod vplivom mikroorganizmov. Ob pomanjkanju vode se zaradi odsotnosti mikroorganizmov razgradnja ustavi, zaradi česar se razpolovna doba lasalocida poveča na več kot šest mesecev.
- Kumafos se ne akumulira v medu ali iz satja ne difundira v med v količinah, ki bi jih zaznali z uporabljenimi metodami, vsekakor pa ne presega MRL. Zaradi tega je uporaba kumafosa kot zdravila za zdravljenje varoze primerna, saj v terapevtskih odmerkih ob upoštevanju karence ne povzroča prisotnosti ostankov (kontaminantov) v medu.
- Za razliko od medu se kumafos akumulira v čebelji zalegi. Šest tednov po vstavljanju zdravila, ki vsebuje kumafos v panje, smo v zalegi iz vseh panjev našli kumafos. Koncentracija kumafosa se med panji, pri katerih se je uporabil terapevtski odmerek, in panji, pri katerih se je uporabil za polovico presežen odmerek, ni bistveno (statistično) razlikovala.
- Rezultati kažejo na prisotnost in akumulacijo kumafosa v satju (vosku) in da iz voska prehaja tudi v razvijajočo se čebeljo zalego, saj smo že pred vstavljanjem zdravila, ki vsebuje kumafos, pri čebelji zalegi iz treh panjev ugotovili prisotnost kumafosa.
- Amitraz ali njegovi razgradni produkti DMA, DMF in DPMF se po uporabi terapevtskih odmerkov zdravila, ki vsebuje amitraz, ne akumulirajo v medu, čebelji zalegi ali vosku.
- Nizki odmerki kumafosa v vodi za pitje pri miših niso povzročili spremembe vedenjskih vzorcev, kot tudi niso vplivali na izraženost genov v možganih.
- V drugem letu uporabe amitraza za zatiranje varoze pri čebeljih družinah je bila ugotovljena rezistenca varoj na omenjeno učinkovino.

Odprta vprašanja

- Potrebne so nadaljnje raziskave o transportu lasalocida in monenzina v okolju, posebno v površinske in podzemne vode.
- O večkratni (in večletni) uporabi kontaminiranega gnoja na istih kmetijskih površinah prav tako ni dovolj znanega, zato ne moremo zagotoviti, da na takšnih površinah ne prihaja do kopičenja lasalocida ali monenzina, še posebno v sušnih razmerah, ko ne prihaja do mikrobne razgradnje.
- Zaenkrat nam še ni znano, kolikšna bi morala biti koncentracija kumafosa v vosku oziroma kakšna bi morala biti stopnja difuzije kumafosa iz voska v vsebino satne celice, da bi to prizadelo razvoj čebelje zalege ali zdravje čebel. Škodljivo delovanje kumafosa bi se lahko pojavilo pri aditivnem delovanju kumafosa iz voska kot

kontaminanta in kumafosa (ali katere druge učinkovine) kot zdravila za zdravljenje varoze.

- V nadaljnjih raziskavah bi se bilo potrebno osredotočiti na dinamiko difundiranja kumafosa iz satja v vsebino celic, pa naj bo to med, matični mleček oziroma čebelja zalega ali cvetni prah. Že naša raziskava v nekaterih primerih nakazuje difundiranje kumafosa iz voska v čebeljo zalego (Tabela 2). Dinamika sproščanja kumafosa iz voska v vsebino celice satja pa še ni ovrednotena, zaradi česar se nejasnosti oziroma ugibanja pojavljajo tudi ob interpretacijah prisotnosti kumafosa v čebelji zalegi nezdravljenih panjev.
- Ker se čebelji vosek uporablja tudi v farmacevtski in kozmetični industriji, bi bilo pri oceni primernosti voska kot vhodne surovine za proizvodnjo potrebno upoštevati morebitno prisotnost kumafosa.

Priporočila naročniku

- Z namenom zagotavljanja varne hrane priporočamo rotacijo kokcidiostatikov, saj se na ta način zmanjša akumulacija teh učinkovin v zemlji obdelovalnih površin.
- Razpad lasalocida v gnoju in kompostu je odvisen od bakterijske razgradnje, zato priporočamo opisan postopek kompostiranja.
- Priporočamo tudi rotacijo uporabe učinkovin za zatiranje varoze pri čebeljih družinah, saj smo v drugem letu poskusa opazili rezistenco varoj na amitraz.
- Posebno pozornost je potrebno nameniti uporabi čebeljega voska, saj se je bila v njem ugotovljena akumulacija kumafosa, kar bi lahko imelo za posledico prehajanje te učinkovine iz voska v čebeljo zalego in med.

Objave

1. Žižek S, Zidar P, 2013. Toxicity of the ionophore antibiotic lasalocid to soil-dwelling invertebrates: avoidance tests in comparison to classic sublethal tests. *Chemosphere*; 92: 570-575.
2. Snoj T, Premrov Bajuk B, Babnik K, Milcinski L, Jencic V, Pislak Ocepek M, Skof M, Kobal S. Relation between treatment of bee colonies with coumaphos or amitraz on their residue levels in honey, bee brood and beeswax. In: *Proceedings of the The impact of pesticides on bee health. British Ecological Society, Biochemical Society and the Society for Experimental Biology, 2014: 16.*

3. Premrov Bajuk B, Snoj T, Babnik K, Milcinski L, Jencic V, Pislak Ocepek M, Skof M, Kobal S. Vsebnost kumafosa v medu in zalegi po zdravljenju čebeljih družin = Cumaphos concentration in honey and bee brood after the treatment of honeybee colonies. 1. znanstveno posvetovanje o čebelah in čebelarstvu, Ljubljana, 13. februar 2014. Gregorc A ed. V spomin dr. Janezu Poklukarju: zbornik prispevkov. Ljubljana: Slovensko akademsko čebelarstvo: Kmetijski inštitut Slovenije, 2014: 24-29.
4. Snoj T, Premrov Bajuk B, Babnik K, Milcinski L, Jencic V, Pislak Ocepek M, Skof M, Kobal S. Kumafos i njegov značaj u lečenju varoze u Sloveniji. XXV. savetovanje dezinfekcija, dezinfekcija i deratizacija-jedan svet jedno zdravlje: zbornik radova. Kovačica: Sekcija za dezinfekciju, dezinfekciju i deratizaciju SVD-a: Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, 2014: 163-167.

Viri

A Review of Treatment Options For Control of Varroa mites, 2001. Available at:
<http://www.biosecurity.govt.nz/files/pests/varroa/papers/varroa-treatment-options.pdf>

Commission regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacology active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Union. Available at:
http://ec.europa.eu/health/files/mrl/mrl_20101212_consol.pdf

Dolliver, H., Gupta, S., Noll, S., 2008. Antibiotic degradation during manure composting. *J Environ Qual* 37, 1245-1253.

EC, 2003. European Commission. Technical Guidance Document on risk assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and of Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. . Ispra (IT): European Chemicals Agency.

Gustafson, D.I., Holden, L.R., 1990. Nonlinear Pesticide Dissipation in Soil - a New Model Based on Spatial Variability. *Environ Sci Technol* 24, 1032-1038.

Hansen, M., Krogh, K.A., Björklund, E., Halling-Sørensen, B., Brandt, A., 2009. Environmental risk assessment of ionophores. *Trends in Analytical Chemistry* 28, 534-542.

Karazafiris E., Tananaki C., Menkissoglu-Spiroudi U., Thrasivoulou A., 2008. Residue distribution of the acaricide coumaphos in honey following application of a new slow-release formulation. *Pest manag sci* 64: 165-171.

Korta E., Bakkali A., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F., Kilchenmann V., Bogdanov S., 2001. Study of acaricide stability in honey. Characterization of amitraz degradation products in honey and beeswax. *J agric food chem* 49: 5835-5842.

Korta E., Bakkali A., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F., 2002. Study of an accelerated solvent extraction procedure for the determination of acaricide residues in honey by high-performance liquid chromatography-diode array detector. *J food prot* 65: 161-166.

Martel A.C., Zeggane S., 2002. Determination of acaricides in honey by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J chromatogr A* 19: 173-180.

OECD Guideline for testing Chemicals 208. 2003. Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test.

OECD Guideline for testing Chemicals 222. 2004. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*).

Sassman, S.A., Lee, L.S., 2007. Sorption and degradation in soils of veterinary ionophore antibiotics: monensin and lasalocid. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 1614-1621.

Tremolada P., Bernardinelli I., Colombo M., Spreafico M., Vighi M., 2004. Coumaphos distribution in the hive ecosystem: case study for modeling applications. *Ecotoxicology* 13: 589-601.

University of Wisconsin – Madison. Mouse behavioural tests. Available at:
<http://www.waisman.wisc.edu/rmc-bts-tests.htm>

Xu J.Z., Miao J.J., Lin H., Ding T., Zhao Z.Y., Wu B., Shen C.Y., Jiang Y., 2009. Determination of amitraz and 2,4-dimethylalanin residues in honey by using LC with UV detection and MS/MS. *J Sep Sci* 32: 4020-4024.

Žižek, S., Hrženjak, R., Kalcher, G.T., Šrimpf, K., Šemrov, N., Zidar, P., 2011. Does monensin in chicken manure from poultry farms pose a threat to soil invertebrates? *Chemosphere* 83, 517-523.