

## SKRINING METODA OSTATAKA PESTICIDA U PČELAMA

Vojislava Bursić<sup>1</sup>, Gorica Vuković<sup>2</sup>, Nebojša Vuković<sup>2</sup>, Nemanja Ćuk<sup>1</sup>, Sonja Gvozdenac<sup>1</sup>, Maja Meseldžija<sup>1</sup>, Aleksandra Popović<sup>1</sup>

**Izvod:** Gubici pčelinjih društava su alarmantni ne samo za pčelara i potrošače meda, nego za poljoprivrednu proizvodnju uopšte. Od 2006. godine, pčele i drugi oprašivači širom sveta doživljavaju stalan i veoma brz pad populacije. Nastavak ove krize, ugrožava stabilnost ekosistema, privrede i proizvodnju hrane, usled njihove zavisnosti od polinatora. U radu su analizirani uzorci uginulih pčela ekstrahovani i prečišćeni QuEChERS metodom, dok su dobijeni ekstrakti analizirani GC-MS skrining metodom na sadržaj 927 pesticida.

**Ključne reči:** ostaci pesticida, pčele, QuEChERS, GC-MS

### Uvod

Poslednjih godina primećen je značajan pad populacija pčela. Pogrešnim delovanjem na prirodu, čovek je svakodnevno nanosio štete ekosistemu i između ostalog, dovodio do smanjenja broja pčela. Destrukcija prirodne ravnoteže ne može proći bez posledica koje su uticale na brojnost populacije. Smanjenje brojnosti pčela, negativno se odrazilo na proizvodnju meda i njegov kvalitet (Peći, 2014).

Kulinčević (2006) navodi da je posredna korist od pčela sto do stope deset puta veća od neposredne koristi. U našim klimatskim uslovima, insekti, uglavnom medonosne pčele, oprašuje preko 80% biljaka. Vetar, kao drugi najvažniji faktor u prenosu polena, oprašuje oko 20% (Jevtić i sar., 2006). Koliko su pčele neophodne u voćarstvu, govori podatak da se skoro sve naše voćne vrste, poput jabuka, krušaka, šljiva, trešanja, sitnog i drugog voća, uglavnom oprašuju pčelama. Neke sorte šljiva, jabuka ili krušaka su samooplodne, ali većina njih se bolje oprašuje sa drugih stabala. Angažovanje pčelinjih društava radi oprašivanja, naročito na većim površinama pod savremenim voćnim plantažama, težak je i odgovoran posao (Kulinčević, 2006).

Nepravilna primena pesticida u oblastima u kojima su pčele u potrazi za hranom, može ozbiljno da utiče na njihove kolonije i da dovede do njihovog uginjavanja te teških gubitaka za pčelare. Nije jednostavno pronaći uzrok ovakvo ozbiljnih situacija, pa je zbog toga, veoma važno, obezbediti naučnu potporu koja bi pomogla u proveru uticaja pesticida na uginuća pčela (Waloruczyk and Gnusowski, 2009).

---

Vojislava Bursić, (autor za kontakte), Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 8, Srbija ([bursicv@polj.uns.ac.rs](mailto:bursicv@polj.uns.ac.rs))

Gorica Vuković, Nebojša Vuković, Gradski zavod za javno zdravlje Beograd, Bulevar despota Stefana 54a, Beograd, Srbija ([gorica.vukovic@zdravlje.org.rs](mailto:gorica.vukovic@zdravlje.org.rs))

Nemanja Ćuk, Sonja Gvozdenac, Maja Meseldžija, Aleksandra Popović, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu ([sonjag@polj.uns.ac.rs](mailto:sonjag@polj.uns.ac.rs), [maja@polj.uns.ac.rs](mailto:maja@polj.uns.ac.rs), [popovica@polj.uns.ac.rs](mailto:popovica@polj.uns.ac.rs))

U poslednje vreme, povećana je zabrinutost po pitanju negativnog uticaja pesticida na polinatore. Mnogi radovi ističu važnost pčela kao prirodnih polinatora ne samo za useve, već i za divlje cveće, šumske i tropske ekosisteme. Biološki faktori koji su odgovorni za mnoge probleme koji se javljaju u košnicama, teško da mogu biti glavni uzročnici smanjenja broja i uginuća pčela. Povećan mortalitet, pa i sindrom kolapsa pčelinje zajednice su po aktuelnim nalazima svetski priznatih istraživača u ovoj oblasti, rezultati više faktora poput virusa, varoe, seljenja pčela, pesticida, slabe kondicije/oslabljenog imuniteta... Sa druge strane, u zemljama sa dugom tradicijom upotrebe pesticida u poljoprivredi, ističe se da su agrohemijski faktori koji dovode do smanjenja brojnosti ovih insekata (Sanchez-Bayo and Goka, 2014).

Našim istraživanjem je obuhvaćena skrining metoda određivanja ostataka 927 pesticida u uginulim pčelama. Priprema homogenizovanog uzorka je izvedena QuEChERS ekstrakcijom, dok je hromatografsko snimanje izvršeno gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom (GC-MS).

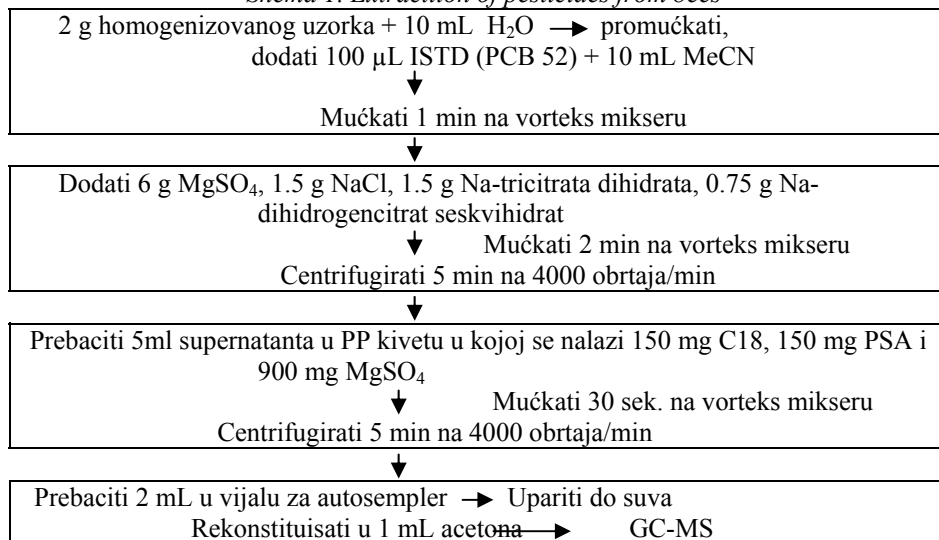
### **Materijal i metode rada**

Analiza ostataka pesticida u pčelama predstavlja pravi izazov za analitičara, zato što se radi o matriksu sa velikim količinama voska, proteina i drugih supstanci koje mogu imati velik uticaj na detekciju pesticida i rezultate (Walorczyk and Gnusowski, 2009).

**Formiranje uzorka.** U Laboratoriju za biološka istraživanja i pesticide na Departmanu za fitomedicinu i zaštitu životne sredine, Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, donešeni su uzorci uginulih pčela. Uzorci su iz privatnog pčelinjaka iz Čerevića. Do momenta analize, uzorci su čuvani u uslovima smrzavanja (-18 °C) u skladu sa dokumentom SANCO 12571/2013.

**Ekstrakcija pesticida iz pčela.** Ekstrakcija i prečišćavanje uzoraka pčela je izvedeno QuEChERS metodom (Shema 1).

Shema 1. Ekstrakcija pesticida iz pčela  
*Shema 1. Extractiion of pesticides from bees*



**Uslovi hromatografskog određivanja.** Gasni hromatograf: Hewlet Packard GC System model 6890, auto sampler Agilent 6890. Series Injector Maseni spektrometar Hewlet Packard 5973. GC kapilarna kolona: HP5MS, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm 5% fenil metilpolisiloksan. Noseći gas: helijum, konstantan pritisak 21.82 Psi (RTL Pestf-PTV metoda). GC temperaturni program: 2 min na 70 °C, 25 °C/min do 150 °C (0 min), 3 °C/min do 200 °C (0 min) 8 °C/min do 280 °C (10 min). Vreme trajanja analize je bilo 41.87 minuta, sa zapremina injektovanja od 5 µl ( PTV, solvent vent mode).

PTV temperaturni program: 0.04 min na 70 °C, 10 °C/sec do 280 °C (10 min), 250 °C (10 min). PTV protoci gasa: Vent flow: 50 mL/min. Vent press: 0.00 Psi drži 0.04 min Purge flow: 60 mL/min startuje na 2 min. Gas saver: Off.

Način akvizicije: SCAN, dok je jonizacija bila EI.

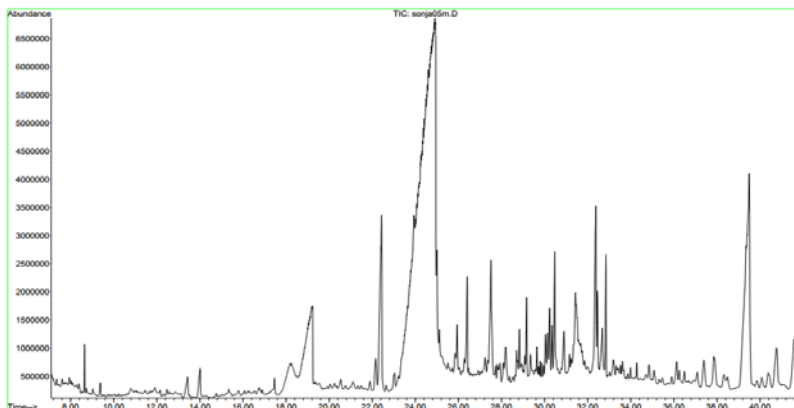
Temperatura transfer linije je bila 280 °C, a temperatura MS kvadrupola 150 °C, sa temperaturom jonskog izvora od 230 °C.

### Rezultati istraživanja i diskusija

Nakon izvršene QuEChERS ekstrakcije, izvedeno je skrining snimanje ekstrakta uzoraka pčele GC-MS u SCAN modu, koji se koristi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. U okviru skrining metode obuhvaćena su 927 pesticida.

GC-MS analizom, dobijeni su hromatogrami ispitivanih uzoraka (Slika 1) i na osnovu DRS (Deconvolution Reporting Software) analize identifikovano je prisustvo acetahlora na retencionom vremenu od 16.54 minuta, metolahlora na retencionom vremenu od 18.91 minut, propikonazola sa retencionim vremenom od 21.15 minuta i difenkonazola, čiji pik se pojavljuje na retencionom vremenu od 35.23 minuta.

**Slika 1.** Hromatogram uzorka ekstrakta pčele  
*Figure 1. Chromatogram of bees extract sample*



Potvrda prisustva detektovanih pesticida u uzorku, izvedena je poređenjem MS spektra dimetoata u uzorku sa MS spektrom iz biblioteke “Agilent RTL Pesticide Library”.

Tabela 1. SCD lista detektovanih pesticida

*Table 1. SCD list of detected pesticides*

SCD Compound List Report Instrument #1  
 Screen Database : C:\METHODS\TRI\_PEST.M\RTLPEst3.SCD

Total SCD Cpnds : 927

Compound Name	TIon	RT	Q1	Q2	Q3
Acetochlor	146	16.54	162	59	223
Metolachlor	162	18.91	238	240	146
Propiconazole	173	27.15	69	259	175
Difenoconazol	323	35.09	265	325	267

Detektovane vrednosti acetohlora su bile 185 ng/g, metolahlora 66 ng/g, difenokonazola 412 ng/g i 29 ng/g propikonazola.

Tipična procena rizika uzima u obzir samo akutnu trenutnu ili oralnu toksičnost pesticida tokom 24 ili 48 časa, ignorišući negativne efekte izazvanim stalnoj izloženosti delovanja pesticida tokom dužeg perioda (Sanchez-Bayo and Goka, 2014).

Prema Janjiću i Elezoviću (2010) 24<sup>h</sup> oralna LD<sub>50</sub> acetohlora je >100µg/pčeli, dok je kontaktna >200 µg/pčeli. Isti autori navode da je 48<sup>h</sup> kontaktna LD<sub>50</sub> difenokonazola za pčelu >100 µg/pčeli, dok je oralna >187 µg/pčeli. Takođe su 48<sup>h</sup> kontaktna i oralna LD<sub>50</sub> propikonazola >100 µg/pčeli.

Prema agenciji za zaštitu životne sredine SAD-a, metolahlor nije toksičan za pčele. Neke procene su fokusirane na sudbinu pesticida u životnoj sredini i izražene su preko stepena toksične izloženosti - TER (Toxicity Exposure Ratios) koja je indikator rizika pčela u kontaktu i prilikom udisanja polena. Nedavno je utvrđeno da ostaci pesticida u polenu itekako mogu naškoditi pčelama (Sanchez-Bayo and Goka, 2014).

### Zaključak

Vrednosti detektovanih koncentracija acetohlor, metolahlor, propikonazola i difenokonazola, predstavljaju ukupne akumulirane količine pesticida, no tipična procena rizika uzima u obzir samo akutnu trenutnu ili oralnu toksičnost pesticida tokom 24 ili 48 časa, ne možemo sa sigurnošću tvrditi da su u tom periodu vrednosti ostataka pesticida u pčelama bile iznad propisanih LD<sub>50</sub> vrednosti.

Imajući u vidu rezultete analize može se reći da postoji velika i opravdana sumnja da su detektovani pesticidi doveli do uginuća pčela.

### Literatura

- Janjić V., Elezović I. (2010). Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Srbiji 2010, Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd.
- Jevtić G., Mladenović M., Nedić N., Stanislavljević, Lj. (2006). Uloga medonosne pčele (*Apis mellifera L.*) u oprašivanju ratarskih kultura. Zbornik plenarnih i naučnih radova „Zaštita i proizvodnja domaće pčele i meda“, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, 103-109.
- Kulinčević, J. (2006). *Pčelarstvo*. Beograd: Partenon.
- Peçi A. (2014). Pesticidet po "vdesin" bletët, Grupimi Ekolevizja korrik 14 May 2014.
- Sanchez-Bayo F., Goka K. (2014). Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment, Plos One, 9(4), 1-16.
- SANCO (2013). Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO 12571/2013.
- Walorzyk S., Gnusowski B. (2009). Development and validation od multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography-tandem quadripole mass spectrometry, J. Sci. Food Agric. 89: 1250-1252.

## SCREENING METHOD OF PESTICIDE RESIDUES IN BEES

*Vojislava Bursić<sup>1</sup>, Gorica Vuković<sup>2</sup>, Nebojša Vuković<sup>2</sup>, Nemanja Ćuk<sup>1</sup>, Sonja Gvozdenc<sup>1</sup>, Maja Meseldžija<sup>1</sup>, Aleksandra Popović<sup>1</sup>*

### Abstract

The losses of bee colonies are of alarming proportion not only for bee-keepers and honey consumers but for agricultural production and the market itself as well. Since 2006, honey bees and other pollinators throughout the world have experienced ongoing and rapid population declines. The continuation of this crisis threatens the stability of ecosystems, the economy and our food supply, as one in three bites of food are dependent on pollinator services. The extraction and purification of bees samples were done by the QuEChERS method. The obtained extracts were analyzed by GC-MS, screening analysis of bees to the content of 927 pesticides.

**Key words:** pesticide residues, bees, QuEChERS, GC-MS

---

Vojislava Bursić, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Serbia, ([bursicv@polj.uns.ac.rs](mailto:bursicv@polj.uns.ac.rs))

Gorica Vuković, Nebojša Vuković, Institute of Public Health of Belgrade, Bulevar despota Stefana 54a, Beograd, Srbija ([gorica.vukovic@zdravlje.org.rs](mailto:gorica.vukovic@zdravlje.org.rs))

Nemanja Ćuk, Sonja Gvozdenc, Maja Meseldžija, Aleksandra Popović, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Serbia, ([sonjag@polj.uns.ac.rs](mailto:sonjag@polj.uns.ac.rs), [maja@polj.uns.ac.rs](mailto:maja@polj.uns.ac.rs), [popovica@polj.uns.ac.rs](mailto:popovica@polj.uns.ac.rs))