

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SABINA ZELKO

MAGISTRSKO DELO

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SABINA ZELKO

**IZDELAVA IN VREDNOTENJE GELOV Z METANOJSKO KISLINO ZA
ZATIRANJE VAROJE PRI ČEBELAH**

**DEVELOPMENT AND EVALUATION OF GELS CONTAINING FORMIC ACID
FOR VARROA MITE ERADICATION IN HONEY BEES**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko delo sem opravila na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko tehnologijo pod mentorstvom prof. dr. dr. h. c. Stanka Srčiča, mag. farm.

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Igor Locatelli

Članica komisije: doc. dr. Nina Kočevvar Glavač

Zahvaljujem se družini za podporo, razumevanje in potrpežljivost v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno, pod vodstvom mentorja prof. dr. dr. h. c. Stanka Srčiča, mag. farm.

Sabina Zelko

Vsebina

POVZETEK	i
ABSTRACT	iii
SLIKOVNO KAZALO	v
1. UVOD	1
1.1 RAZVOJNI CIKLUS <i>V. Destructor</i>	2
1.2 KONTROLA VAROJE.....	5
1.3 PREGLED ZDRAVIL PROTI VAROJI	7
1.3.1. Akaricidi na osnovi organskih kislin in sestavin eteričnih olj	7
1.3.2. Akaricidi sinteznega izvora.....	8
2. NAMEN IN NAČRT DELA	9
3. MATERIALI in METODE.....	10
3.1 MATERIALI	10
3.2 IZDELAVA GELOV Z METANOJSKO KISLINO	11
4. REZULTATI in RAZPRAVA.....	12
4.1 IZBIRA POLIMEROV	12
4.1.1. Anorganski polimeri.....	12
4.1.1.1. Aerosil 200	12
4.1.1.2. Porozni SiO ₂	14
4.1.2. Organski polimeri	15
4.1.2.1. Carbopol 971.....	15
4.1.2.2. Carbopol 940.....	16
4.1.3. Kombinacije polimerov	17
4.2 PRIMERJAVA IZDELANIH GELOV	23
4.3 SERIJA 1	27
4.4 SERIJA 2	29
4.5 SERIJA 3	31
4.6 KOMERCIALNI GEL MAQS®	35
4.7 PRIMERJAVA GELOV	39
5. ZAKLJUČEK.....	42
6. LITERATURA.....	44

POVZETEK

Varoja je zajedavska bolezen čebelje družine, ki povzroča v svetu ogromno škode na čebeljih družinah, posledično pa tudi na čebeljih izdelkih, in povzroča izgube v kmetijstvu zaradi slabšega ali celo prekinjenega oprševanja s čebelami. Čebelarji za kontrolo varoje uporabljajo akaricide, tako naravnega kot sinteznega izvora, pri čemer noben produkt, namenjen kontroli in zatiranju varoje, ne zagotavlja popolne učinkovitosti, včasih pa je vprašljiva tudi varnost za čebele in okolico, vključno s človekom-čebelarjem ali uporabnikom čebeljih izdelkov.

Metanojsko (mravljično) kislino kot učinkovino za zatiranje varoje uporabljam že dlje časa, saj je naravnega izvora in je tudi naravno prisotna v čebeljih izdelkih, poleg tega izkazuje primerno učinkovitost, rezistenca nanjo pa se še ni razvila. Glavni težavi pri uporabi metanojske kisline sta njena jedkost in velika hlapnost. Jedkost otežuje pripravo gelov, ki sčasoma navadno razпадajo. Hlapnost je težava, ker želimo, da metanojska kislina deluje skozi obdobje vsaj sedem dni.

Za izdelavo gelov smo uporabili 60- in 100-odstotno metanojsko kislino v kombinaciji z anorganskimi in organskimi tvorilci gelov: Aerosilom 200, Carbopolom 971 in Carbopolom 940, pri čemer je bil delež polimerov pod 10 % celotne mase. Izmed izdelanih gelov sta bila po konsistence ter videzu ustrezna gela z deležem polimerov 2,5 % Aerosila 200 in 5 % Carbopola 940, prvi izdelan s 60-, drugi pa s 100-odstotno metanojsko kislino. Geloma se je viskoznost izrazito znižala že v prvem dnevu po izdelavi, pa tudi večina kisline je izhlapela na začetku, kar bi lahko predstavljalo nevarnost za čebele, medtem ko je bilo v naslednjih dneh izhlapevanje premajhno za zagotavljanje učinkovite kontrole varoje. Gel 1 z 2,5 % Aerosila 200, 5 % Carbopola 940 in 60-odstotno metanojsko kislino ter gel 2 z 2,5 % Aerosila 200, 5 % Carbopola 940 ter 100-odstotno metanojsko kislino smo z namenom kontrole hlapenja metanojske kisline pokrili z različnimi barierami in spremljali zmanjševanje mase gelov na račun izhlapele kisline v obdobju 14 dni. Izhlapevanje je bilo enakomernejše v primerjavi z geli, ki so bili odkriti, kar pomeni, da smo ga uspešno omejili. Oba gela smo primerjali s komercialno dostopnim gelom MAQS® pri temperaturah 22 °C in 35 °C. Pri 22 °C se je našima geloma enakomerno zmanjševala masa na račun izhlapele

kisline, medtem ko je bilo zmanjševanje pri komercialnem gelu veliko manj enakomerno. Ta trend je bil še očitnejši pri temperaturi 35 °C.

Izbrani polimeri so se izkazali kot primerni za izdelavo stabilnih gelov tudi s 100-odstotno metanojsko kislino in bi bili enostavni za pripravo, hkrati pa ustrezni lastnosti, saj se je metanojska kislina sproščala enakomerno skozi obdobje 14 dni pri temperaturah 22 °C in 35 °C. Vendar pa razlika v hlapenju metanojske kisline v primerjavi s komercialno dostopnim gelom ni tolikšna, da bi lahko trdili, da sta izdelana gela bistveno boljša za kontrolo varoje.

Ključne besede: čebela, metanojska kislina, polimerni gel, *Varroa destructor*

ABSTRACT

Varroa is a parasitic disease affecting honey bee families across the world, which causes significant damage to bee families and, consequently, bee products, as well as great loses in agriculture due to poor or even lack of bee pollination.

To control Varroa, beekeepers use natural and synthetic acaricides. However, none of the products used to control and eradicate Varroa ensure complete safety and sometimes security is also questionable both for bees and the environment, including humans-beekeepers and users of bee products.

For some time now, formic acid has been used as an eradication agent, as it is of natural origin and is present in bee products. Moreover, it exhibits sufficient efficiency, and the parasite has not yet developed a resistance towards it. The main drawbacks of using formic acid are its acidity and high volatility. Acidity also impedes the production of gels, as the combination of polymers and acidity creates gels which, if we succeed in producing them, eventually dissolve or do not form at all. Volatility presents an issue, since the formic acid needs to be active for a period of at least 7 days.

For gel production, 60 and 100% formic acid in combination with organic and inorganic polymers: Aerosil 200, Carbopol 971, and Carbopol 940 were used, whereby the polymer content was below 10% of the whole mass. Among the produced gels, two were of suitable consistency and appearance, both with polymer content of 2.5% Aerosil 200 and 5% Carbopol 940, the first produced with 60% formic acid and the second with 100% formic acid. The gels' viscosity significantly decreased within the first day after production. This presents difficulties, since most of the acid evaporates at the beginning, potentially posing a risk for the bees, whereas in the following days, there was not sufficient evaporation to ensure efficient Varroa control.

Gel 1 with 2.5% Aerosil 200, 5% Carbopol 940 and 60% formic acid and gel 2 with 2.5% Aerosil 200, 5% Carbopol 940 and 100% formic acid were covered with different barriers with the aim to control the evaporation of formic acid, and the gels' reduction of mass due to evaporated acid was monitored over a period of 14 days. This reduction was more consistent in comparison with the gels left uncovered, which means that evaporation was successfully limited.

At temperatures of 22 °C and 35 °C, both gels were compared with the commercially available gel MAQS®. At a temperature of 22 °C, the produced gels' mass evenly decreases due to the acid evaporated; whereas with the commercial gel, the decrease is significantly less consistent. This trend is even more evident at a temperature of 35 °C.

Though the selected polymers have been proven suitable for the production of stable gels even with 100% formic acid, and despite the simple production, appropriate characteristics, and formic acid being released over a period of 14 days at a temperature of 22 °C and 35 °C, the difference between the commercially available gel and the produced ones is not notable enough to claim that the produced gels are significantly better for Varroa control.

Key words: bee, formic acid, polymer gel, *Varroa destructor*

SLIKOVNO KAZALO

Slika 1: <i>V. destructor</i> na <i>A. mellifera</i> (10).	3
Slika 3: Razvojni ciklus varoje <i>V. destructor</i> (11).	5
Slika 4: Vzorec A po enim dnevu (levo) in sedmih dneh (desno).	12
Slika 5: Vzorec C ob izdelavi (levo), po enim dnevu (sredina) in sedmih (desno) dneh.	..	13
Slika 6: Vzorec D ob izdelavi (levo), po enim dnevu (sredina) in sedmih (desno) dneh.	..	13
Slika 7: Vzorec F ob izdelavi (levo) in po enim dnevu (desno).	14
Slika 8: Vzorec G ob izdelavi (levo) in po enim dnevu (desno).	14
Slika 9: Vzorec M ob izdelavi (levo), po enim dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).	..	15
Slika 10: Vzorec N ob izdelavi.	16
Slika 11: Vzorec K ob izdelavi (levo), po enim dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).	..	16
Slika 12: Vzorec L ob pripravi.	17
Slika 13: Vzorec B ob izdelavi (levo), po enim dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).	..	17
Slika 14: Vzorec F ₁ ob izdelavi (levo) in po enim dnevu (desno).	18
Slika 15: Vzorec G ₁ ob izdelavi (levo) in po enim dnevu (desno).	19
Slika 16: Vzorec H ob izdelavi (levo), po enim dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).	..	19
Slika 17: Vzorec I ob izdelavi (levo), po enim dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).	..	20
Slika 18: Vzorec H ob izdelavi (levo), po enim dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).	..	20
Slika 19: Vzorec O ob izdelavi (levo), po enim dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).	..	21
Slika 20: Vzorec P ob izdelavi (levo), po enim dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).	..	22
Slika 21: Vzorec R ob izdelavi (levo), po enim dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).	..	22
Slika 22: Pokriti geli serije 1.: 1.1 filter <i>discus grad</i> (skrajno levo), 1.2 fini filter papir (drugi iz leve), 1.3 grobi filter papir (drugi iz desne), 1.4 tkanina (skrajno desno).	27
Slika 23: Delež izhlapele kisline gelov serije 1 pri 22 °C.	28
Slika 24: Slike gela 1.1 ob izdelavi (zgoraj levo), po sedmih (zgoraj desno), devetih (spodaj levo) in po 14 dneh (spodaj desno).	28
Slika 25: Pokriti geli serije 2. a) filter discus, b) fini filter papir, c) grobi filter papir, d) tkanina.	29
Slika 26: Primerjava deleža izhlapele kisline iz gelov serije 2 glede na bariero pri 22 °C.	30	
Slika 27: Slike gela 2.3 ob izdelavi (zgoraj levo), po enim dnevu (zgoraj desno), sedmih dneh (spodaj levo) in 14 dneh (spodaj desno).	31
Slika 28: Gel z 8 % Aerosila 200 in 100-odstotno metanojsko kislino ob pripravi (levo), po enem dnevu (sredina) in po sedmih dneh (desno).	32
Slika 29: Izhlapevanje metanojske kisline iz gela serije 3 pri barieri s filtrom <i>discus grad</i> in 22 °C.	32
Slika 30: Gel serije 3 (kot bariera filter <i>discus grad</i>) ob pripravi (zgoraj), po sedmih dnevih (spodaj levo) in po 14 dnevih (spodaj desno).	33
Slika 31: Primerjava izhlapevanja metanojske kisline iz vzorcev serije 2 pri barieri filtra <i>discus grad</i> in temperaturah 22 °C in 35 °C.	34
Slika 32: Primerjava izhlapevanja metanojske kisline iz vzorcev serije 3 pri barieri filtra <i>discus grad</i> in temperaturi 22 °C in 35 °C.	34

Slika 33: Izhlapevanje metanojske kisline iz vzorcev nepokritega gela serije 3 pri temperaturah 22 °C in 35 °C.....	35
Slika 34: Gel MAQS® v primarni ovojnini	36
Slika 35: Gel MAQS® ob odprtju primarne ovojnine.	36
Slika 36: Odkrit gel MAQS® po treh (levo) in 14. dneh (desno).	38
Slika 37: Primerjava izhlapevanja metanojske kisline iz gela MAQS® pri temperaturah 22 °C in 35 °C.....	39
Slika 38: Primerjava izhlapevanja metanojske kisline iz izbranih gelov serij 1, 2 in 3 z bariero filtra <i>discus grad</i> in iz komercialnega gela MAQS® pri 22 °C.	40
Slika 39: Primerjava izhlapevanja metanojske kisline iz vzorcev pri 35 °C.....	41

1. UVOD

Varoja je zajedavska bolezen čebelje družine, ki v zadnjih letih povzroča več škode kot vse druge zajedavske bolezni skupaj in zato predstavlja grožnjo tako čebelam kot čebelarjem (1, 2). Neuspešno in neustrezno zdravljenje ali odsotnost zdravljenja povzroči izgubo povprečno 72 % čebel (3).

Varojo povzroča pršica *Varroa destructor*, ki se je iz originalnega azijskega gostitelja *Apis cerana* naselila na medonosno čebelo *Apis mellifera* (4, 5). V Sloveniji so jo prvič potrdili leta 1979 (2). *V. destructor* se pri *A. mellifera*, glede na vremenske razmere, uspešno razmnožuje tako znotraj delavske kot trotje zalege (za razliko od *Apis cerana*, kjer je to možno samo znotraj trotje zalege skozi vse leto (1).

Pršico znotraj čebelnjaka prenašamo z združevanjem družin, med kraji s prevažanjem čebel na pašo in med državami s trgovino z živimi čebelami. Do prenosa pride, ko se čebeli srečata in podrgneta druga ob drugo (2). Težava z varojo je tudi v tem, da na tržišču ni zdravila, ki bi uspešno zatiralo pršico in hkrati ne škodovalo čebelam. Dodatne težave so pridobljena odpornost pršice na primer na sintezne akaricide, kot sta fluvalinat in kumafos, omejitev pri uporabi glede na letni čas in temperaturo, nekonsistentna učinkovitost in zaostanki v čebeljih izdelkih (6). Uporabljana zdravila večinoma učinkujejo samo na odrasle pršice, ne pa tudi na mlade pršice, kar je razlog, da moramo zdravljenje ponavljati (3, 7). Nenadzorovanoto širjenje okužbe s pršico vodi do propada čebelje družine. Škodo, ki bi jo imeli kmetje zaradi zmanjšanega pridelka, kot posledico prenehanja oprševanja s čebelami, so v Združenih državah Amerike na letni ravni ocenili na 15 milijard dolarjev. Posledice zajemajo zmanjšanje ali izgubo pridelka, predvsem pri pridelavi zelenjave, sadja, jagodičevja in oreščkov (1).

Razloge za izgube velikega števila čebel in probleme pri zatiranju varoje lahko najdemo v več dejavnikih:

- Pršica je razširjena po celi svetu.
- Brez periodičnega zdravljenja bi čebelje kolonije propadle v obdobju dveh do treh let.
- Redna zdravljenja povzročajo večje stroške in povečajo možnosti za zaostanke uporabljenih zdravil v čebeljih izdelkih.
- Varoja je glavni razlog za zmanjševanje števila čebeljih družin, kar bi lahko pripeljalo do svetovnih problemov z opašitvijo (4).

Za preprečevanje propada čebeljih družin in s tem povezanih stroškov in problemov sta potrebna stalna kontrola in zatiranje varoje.

1.1 RAZVOJNI CIKLUS V. *Destructor*

Varoja je ektoparazit, ki se prehranjuje s hemolimfo čebel. Prehranjevanje s hemolimfo se začne že v stadiju čebele ličinke in se nadaljuje preko bube do odrasle čebele, zaradi česar je mlada čebela oslabljena in šibkejša ter težje preživi zimo (2). Ob odkritju pršice so bili prepričani, da gre za vrsto *Varroa jacobsoni*, vendar so kasneje odkrili, da gre za sorodno vrsto *Varroa destructor*, ki povzroča ogromno ekonomske škode predvsem v zmerno toplem podnebju (1, 4). Trenutno poznamo štiri vrste varoje:

- 1) *Varroa jacobsoni*, ki se je prvič pojavila na otoku Java in se od tam razširila na preostalo Azijo, napada (naseljuje) pa gostitelje čebele *Apis cerana* in *Apis nigrocincta*.
- 2) *Varroa underwoodi* so odkrili v Nepalu in naseljuje *Apis cerana*.
- 3) *Varroa rinderri* so našli na Borneu in je ektoparazit *Apis koschevnikovi*.
- 4) *Varroa destructor*, ki so jo sprva zamenjevali za *V. jacobsoni* in se je iz prvotnega gostitelja *Apis cerana*, preselila na *Apis mellifera* (4).

Izmed zgoraj naštetih je *V. destructor* tista, ki je najbolj odgovorna za propadanje čebeljih družin in s tem za veliko škode. Težava je nastala, ko se je pršica preselila iz primarnega gostitelja *Apis cerana* na *Apis mellifera*, ki nima ustrezne obrambe (4).

Problem okužbe s pršico ni samo v fizični oslabitvi zalege in posledično šibkih odraslih čebelah (pršica se namreč prehranjuje s hemolimfo čebel), ki s težavo preživijo zimo, ampak tudi v virusih ozziroma pridruženih boleznih, ki jih pršica prenaša med gostitelji. Eden od nevarnejših in najpogostejših je virus deformiranih kril, nevarni so tudi virus akutne paralize, virus kronične paralize čebel, virus mešičkaste zalege idr. (8, 9).

K razvojnemu ciklu varoje pripomore več dejavnikov, od katerih je odvisna hitrost širjenja bolezni. Spomladi je število pršic majhno, saj pozimi ni zalege, poveča se s pojavom trotje zalege, kjer se pršice razmnožujejo mnogo hitreje kot v zaledi čebel samic, zato njihovo število hitro narašča. Kje so pršice najbolj prisotne, je odvisno tudi od letnega časa: poleti jih je največ v čebelji zaledi in na mladih čebelah, jeseni pa na odraslih, saj se razvijajo glede

na ciklus čebele (2). Če je v čebelji družini poleg zalege prisotna še varoja, se njeni število v mesecu dni podvoji. Brez posegov začetnih deset pršic tako v dveh do treh letih povzroči propad celotne čebelje družine (1, 4).

Odrasla pršica ima osem nog, rdečerjavo sploščeno ovalno telo in meri približno 1 do 1,5 mm (9). Varoja je dovolj velika, da jo lahko opazimo s prostim očesom, ko se zadržuje na čebeljem hrbtnem ali trebuhi (slike 1 in 2) (10, 11).



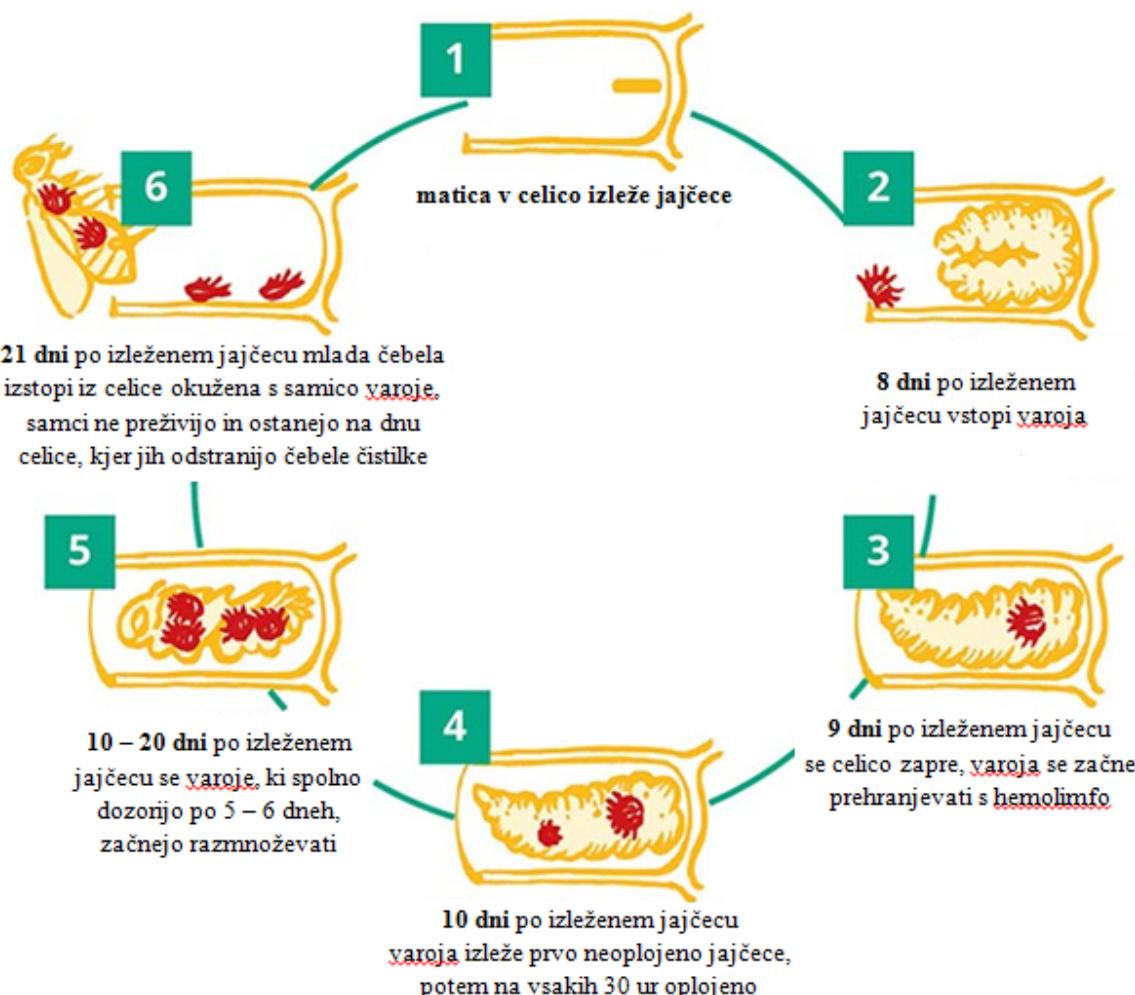
Slika 1: *V. destructor* na *A. mellifera* (10). Slika 2: *V. destructor* na bubi (11).

Pršice najdemo na odraslih čebelah in zalegi, za razmnoževanje pa nujno potrebujejo čebeljo zalego. Mlade, spolno nedozorele pršice najdemo samo v pokriti zalegi. Odrasle samice gredo v svojem življenjskem ciklu skozi dve fazи: foretično in reproduksijsko. V foretični se samice hranijo s hemolimfo odraslih čebel in se prenašajo iz ene čebele na drugo, ko se le te srečujejo. V tej fazi se varoja zadržuje med abdominalnimi segmenti čebel, kjer je pritrjena s kaveljčki, telo pa prebode s pomočjo čeljusti. V foretični fazi je možen prenos med družinami, če te rojijo ali jih vozimo na pašo na drugo lokacijo (12). Kako dolga je foretična faza, je odvisno od letnega časa. Ker je razmnoževanje optimalno v času zalege, živi varoja v tem času do 27 dni, medtem ko je pričakovana življenjska doba pozimi, ko ni zalege, tudi več mesecev (13).

Da se varoja lahko razmnožuje (reprodukcijska faza), mora vstopiti v celice satja, v katerih bo pokrita zalega (slika 3). Čebelja matica v te celice izleže jajčeca, iz katerih se čez tri dni razvije ličinka. Ko ličinka doseže določeno stopnjo razvoja (pet do šest dni), čebele delavke to celico pokrijejo z voskom – nastane pokrita zalega. Nato se ličinka razvije v bubo, kar traja 12 dni. Po skupno 21 dneh (16 dneh pri matici, 24 dneh pri trothih) se izleže mlada čebela delavka (ta čas je 16 dni pri matici in 24 dni pri trothih) (4).

Samica varoje mora v celico vstopiti, predno jo čebele delavke zaprejo, kar po navadi stori dan pred pokritjem celice (14). Če gre za *A. mellifera*, vstopajo varoje v celice trotov in čebel, medtem ko pri *A. cerana* vstopajo predvsem v celice s trotjo zaledo. To je za varoje bolj zaželeno, saj so te celice večje, zato se lahko tam odleže in razvije večje število varoj (4).

Varoja, ki je pripravljena na razmnoževanje, zapusti čebelo in se splazi na dno celice, v kateri je že ličinka in se potopi v hrano, ki je na dnu celice, namenjena ličinki. Na ta način se skrije pred čebelami čistilkami, ki odstranjujejo nečistoče v celicah. Dih s pomočjo posebnih dihalnih cevčic, ki jih pomoli skozi hrano do površja. Tam ostane, dokler čebele celice ne pokrijejo, nato se prisesa na ličinko in se začne prehranjevati z njeno hemolimfo. Deset dni po tem, ko matica izleže čebelje jajče, varoja znotraj celice izleže prvo svoje jajče, ki je neoplojeno in iz katerega se bo razvil samec varoje. Potem v razmiku 30 ur izleže oplojena jajčeca, iz katerih se izvalijo samice varoje. V celici je povprečno do pet jajčec, v večjih tudi do deset. Znotraj celice je tako samo en samec in več samic. Potomci se skupaj z odraslo pršico prehranjujejo na bubi. Mlade varoje spolno dozorijo v petih do šestih dneh in se začnejo razmnoževati pod pokrovcem (15). Praviloma se pršice razmnožujejo le znotraj iste celice, čeprav je razmnoževanje mogoče tudi med pršicami iz sosednjih celic. Odrasle in oplojene samice zapustijo celico pritrjene na mlado čebelo, samci pa poginejo in čebele jih iz celic odstranijo pri čiščenju. Samice čez 3 do 15 dni vstopajo v nove celice z ličinkami, kjer se ciklus ponovi (4, 13).



Slika 3: Razvojni ciklus varoje *V. destructor* (11).

1.2 KONTROLA VAROJE

Točna ocena škode v čebelarstvu, povzročene zaradi varoje, je težka, domnevajo pa, da gre za številke v milijardah evrov (16).

Za vsa danes uporabljana zdravila za zatiranje varoje velja, da med uporabo in nekaj dni po uporabi ne točimo medu, ker se ta zadržijo v medu. Optimalno zdravilo bi zato bilo takšno, ki bi ga uporabljali kratek čas, brez omejitve, torej tudi v času točenja medu, in da ne bi imelo negativnega vpliva na čebele in ne bi zaostajalo v medu in ostalih čebeljih izdelkih (17, 18).

Ker je pršica dovolj velika, da jo lahko opazimo s prostim očesom, njene prisotnosti v panju ni težko preveriti. Vendar to velja le za varoje, ki so že naseljene na čebelah (foretična faza) in jih lahko spremljamo preko dnevnega odpada. Težje pa je preverjati prisotnost v pokriti zalegi (5).

Za zatiranje varoje uporabljam različna sredstva, zelo pogosto tudi sintezne akaricide, ki pa žal predstavljajo velik problem, ker škodujejo čebelam, prav tako pa se pojavlja problem njihovega zaostanka v čebeljih izdelkih, predvsem medu in vosku (2). Za vse te substance velja, da smejo biti prisotne do maksimalne koncentracije, ki jo določajo na osnovi toksikoloških študij in študij zaostankov (MRL, *maximum residue level*) (19). Dodatno težavo predstavlja tudi pojav odpornosti varoje na akaricide in je delno posledica napačne uporabe teh zdravil. Alternativo sinteznim akaricidom predstavljajo organske kislino (mravljična, oksalna) in sestavine eteričnih olj, npr. timol. Vse naravne snovi so manj učinkovite kot sintezni akaricidi, a ravno tako uspešni, če jih kombiniramo z ustrezno strategijo zdravljenja (6).

Metanojsko (mravljično) kislino so za kontrolo varoje prvič uporabili v 80. letih, tako da so v panj postavili karton, ki so ga prej namočili v to kislino. Poleg kartona so v to kislino namakali tudi spužve, lesne ostružke in uporabljali vsebnike s kislino in stenjem (20). Metanojska kislina je naravno prisotna v medu in jo zato uvrščamo med varne substance (19). Ne poškoduje zalege, mladih čebel in ne zavira razvoja čebelje družine, pomembno pa je še, da lahko prehaja (hlapi) v pokrito zalego, kamor druge, nehlapne sintezne in naravne substance ne morejo (21). Sama metanojska kislina je dovolj učinkovita, da ni potrebe po dodatku drugih akaricidnih substanc, npr. timola, saj so ugotovili, da ne prispevajo bistveno k učinkovitosti zdravljenja, če smo že uporabili metanojsko kislino (22). Odpornosti varoj na metanojsko kislino zaenkrat še niso zasledili, poleg tega pa so jo uradno odobrili kot ustrezno sredstvo za uporabo pri zatiranju varoje.

Metanojska kislina pridobiva na pomembnosti zaradi:

- enostavne uporabe,
- uničenja varoje v pokriti zalegi,
- uporabe v času zaledanja,
- majhne možnosti pojave odpornosti,
- delovanja na druge čebelje bolezni (poapnela zalega in nosema) in
- sprejemljive cene (23).

1.3 PREGLED ZDRAVIL PROTI VAROJI

Zdravila, ki jih uporabljamo za zatiranje varoje, v grobem razdelimo v dve skupini:

- naravne akaricide, t. i. organske kisline in eterična olja in sestavine eteričnih olj ter
- akaricide sinteznega izvora.

1.3.1. Akaricidi na osnovi organskih kislin in sestavin eteričnih olj

Akaricidi naravnega izvora so zdravila, ki kot učinkovino vsebujejo organske kisline, eterična olja ali sestavine eteričnih olj. Med najpogosteje uporabljenimi najdemo oksalno, metanojsko in mlečno kislino, med sestavinami eteričnih olj timol, kafro in levomentol, med eteričnimi olji pa eterična olja eukaliptusa in rožmarina. Široko uporabnost teh učinkovin zagotavlja nizka toksičnost za čebele in nizki zaostanki. Nekateri akaricidi naravnega izvora so naravno prisotni v medu in drugih čebeljih izdelkih.

Kljub temu moramo biti previdni ob uporabi, saj lahko nepravilna uporaba vpliva na kakovost izdelkov, med drugim tudi na njihov okus (24). Za dosego najboljših rezultatov zatiranja varoje z organskimi kislinami je pomembno dosledno upoštevati predpisano ravnanje z njimi (uporaba v določenem letnem času, uporaba določeno časovno obdobje, upoštevanje varnostnih navodil), kjer imajo velik vpliv tudi razmere v panju, zunanje vremenske razmere, letni čas ... Poseganje po akaricidih naravnega izvora narašča, saj smernice na področju hrane težijo k uporabi naravnih učinkovin s čim manjšimi vplivi na okolje ter ljudi.

Timol in timol v kombinaciji z drugimi sestavinami eteričnih olj pogosto uporabljamo za zatiranje varoje. Gre za hlapen monoterpenoid, ki inhibira rast, hranjenje (zmanjšuje apetit) in razmnoževanje varoje. Kot lipofilna učinkovina se lahko pojavlja v čebeljem vosku, a navadno pri tako majhnih koncentracijah, da so te človeku nezaznavne in nenevarne (25, 26). Na tržišču ga najdemo v različnih oblikah: gelu (Apiguard®), impregniranih ploščicah (Apillife VAR®, ki je kombinacija z eteričnim oljem evkaliptusa, mentolom in kafro), prepojenih trakovih (Thymovar®) idr. (27).

Metanojska (mravljična) kislina ubija *V. destructor* preko inhibicije dihanja. Je cenovno ugodna, ne škoduje odraslim čebelam in nanjo še ni znana odpornost, kar jo uvršča med najbolj uporabljana zdravila za zdravljenje čebel pri okužbi z varojo. Na voljo je v različnih oblikah: gelu (MAQS®), raztopini (AMO Varroxal®) idr (7).

1.3.2. Akaricidi sinteznega izvora

Zdravila iz te skupine so zelo učinkovita pri zatiranju varoje, hkrati je njihova uporaba enostavnejša, saj so zdravljenja pogosto kratkotrajnejša in manj zahtevna. Na tem mestu je potrebno dodati, da so tudi cenovno ugodna, kar je pogosto prvi razlog za njihovo uporabo. Večina učinkovin je zelo hlapnih, kar pomeni, da so zaostanki v čebeljih izdelkih večji, hkrati se s tem dlje časa zadržujejo v čebeljih izdelkih, kar posledično vpliva na odpornost pršic, ki se tako povečuje (28).

Načini delovanja so različni:

- piretroida flumetrin (Bayvarol®) in tau-fluvalinat (Apistan®) vplivata na ionsko permeabilnost,
- kumafos (Checkmite®) je inhibitor acetilholinesteraze in
- bromopropilat (Folbex-Va Neu®) prav tako deluje kot inhibitor acetilholinesteraze (4).

Bistvena slabost teh učinkovin je, da zaostajajo v medu in drugih čebeljih izdelkih, zato je potrebno paziti, da ti zaostanki ne presegajo maksimalno in regulatorno določenih vrednosti (MRL, *maximum residue level*).

2. NAMEN IN NAČRT DELA

Namen magistrske naloge je bil izdelati stabilen gel z metanojsko kislino za zatiranje varoje, ki bi bil enostaven za uporabo, ki bi ga lahko uporabljali pri čim širšem spektru zunanjih vremenskih razmer in bi bil varen za čebele in čebelarje ter seveda učinkovit proti varoji. Poleg tega bi moral izdelani gel zagotavljati enakomerno sproščanje kisline v želeni količini in s tem konstantno koncentracijo kisline znotraj panja, kar je nujno za zagotavljanje učinkovitosti zdravljenja z metanojsko kislino. Kontrola varoje je potrebna, da se njeno širjenje omeji, z zatiranjem pa poskrbimo, da pršico dokončno odstranimo.

Za metanojsko kislino želimo, da se iz gela enakomerno sprošča najmanj sedem dni, pri čemer je za učinkovitost potrebna vsaj 60-odstotna kislina. Sproščanje mora potekati čim bolj neodvisno od temperature, da se izognemo omejitvam pri uporabi gela (npr. uporaba samo v določenem letnem času in pri določeni temperaturi). Sproščanje kisline bomo določali kvantitativno preko izgube mase gela in tako določali kinetiko izhlapevanja kisline. Hlapnost bomo poskusili omejiti z uporabo različnih barier, tako da bomo gele pokrili z različnimi vrstami filter papirja. Končni cilj je vgraditi čim večji delež (najmanj 60-odstotne) metanojske kisline, da bo gel primeren za uporabo kot šok terapija (gel brez barier) in za podaljšano terapijo (gel z barierami) do najmanj sedem dni.

Izdelani gel mora biti dovolj mazljiv, da ga enostavno nanesemo v končne vsebниke, a hkrati dovolj kompakten, da ohrani obliko. Pri izdelavi želimo uporabiti čim manjši delež polimerov, in sicer manjši od 10 %. Poleg tega želimo, da bo izdelava enostavna in poceni. Za primerjavo bomo uporabili komercialno dostopen gel z metanojsko kislino za zdravljenje varoje, MAQS® (NOD Apiary Products Ltd.), ki je na voljo tudi v Republiki Sloveniji kot zdravilo proti varoji med čebeljo pašo.

3. MATERIALI in METODE

3.1 MATERIALI

Polimere za izdelavo gelov smo izbrali glede na literaturne podatke o stabilnosti v močno kislem območju pH. Uporabili smo 60-odstotno (w/w) ali 100-odstotno metanojsko kislino (98 100 %; EMSURE® ACS, Reag. Ph. Eur.).

Za nosilce/tvorilce gelske strukture smo uporabili:

- anorganski
 - Aerosil 200 (Degussa): proizveden s hidrolizo pri visokih temperaturah, manjša velikost delcev in specifična površina kot pri poroznem SiO_2 (SiO_2)_n
 - porozni SiO_2 (Grace): proizveden z metodo precipitacije, večja porozognost od Aerosila 200
- organski
 - Carbopol 940 (BF Goodrich): visokomolekulski prečno premreženi polimer akrilne kisline ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$)_n,
 - Carbopol 971P NF (BF Goodrich): visokomolekulski prečno premreženi polimer akrilne kisline ($\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$)_n, (manjša premreženost kot pri Carbopolu 940).

Drugo:

- Trakovi MAQS® (MAQS®; BASF ple, Cheshire, United Kingdom) kot referenčni produkt:
 - dimenzijs traku: $10 \times 20 \times 0,4$ cm,
 - posamezen trak tehta 146 g, pri čemer metanojska kislina predstavlja 47,6 % (68,2 g) te mase,
 - trakovi so oviti v biorazgradljiv papir,
 - priporočena uporaba ob temperaturah med 10 in 29,5 °C.
- Prečiščena voda
- Filter *discus grad* (IDL GMBH &CO)
- Fini filter papir (običajni laboratorijski)
- Grobi filter papir (običajni laboratorijski)
- Tkanina (trikotna ruta iz kompleta prve pomoči)

Laboratorijska oprema: terilnica, pestilo, steklena palčka, čaše, petrijevke, tehntica, gumice.

3.2 IZDELAVA GELOV Z METANOJSKO KISLINO

Metanojsko kislino smo redčili glede na masno/masne odstotke (% w/w) do koncentracij 60 % in 100 %. Glede na masno/masne odstotke (% w/w) smo pripravili tudi vse gele. Gele smo izdelali ročno v laboratorijskem posodju (patena, pestilo). Za nadaljnje poskuse meritev in opazovanj smo jih prenesli v čaše ($V = 50 \text{ mL}$) ali petrijevke (premera 4,8 cm). Geli so bili po izdelavi primernih viskoznosti oziroma pastozne konsistence.

Pri določanju količine izhlapele metanojske kisline smo gelom v petrijevkah ali čašah določali maso v odvisnosti od časa pri določeni temperaturi. V primerjavi z vodo ima metanojska kislina višji parni tlak pri isti temperaturi, zato smo predpostavili, da je izguba mase pri uporabi 60-odstotne metanojske kisline predvsem zaradi kisline.

Primarno smo želeli ugotoviti, kateri polimeri so sposobni tvoriti gel z metanojsko kislino, in predvsem, če tvorilci gelov prenesejo nizek pH oziroma se viskoznost s časom ne znižuje (depolimerizacija). Geli so imeli ob testiranju hlapenja metanojske kisline podobne mase in bili v petrijevkah in čašah s podobnim premerom. Na ta način smo izključili vpliv debeline in površine gela na izhlapevanje kisline.

Gele smo poimenovani s črkami od B do R ali kombinacijo posamezne črke in številke.

4. REZULTATI in RAZPRAVA

4.1 IZBIRA POLIMEROV

4.1.1. Anorganski polimeri

4.1.1.1. Aerosil 200

Vzorec A:

Aerosil 200 **5 %**

Metanojska kislina (60 %) do 100 %

Gel pripravimo v pateni ob mešanju z dodajanjem metanojske kisline k Aerosilu 200. Takoj po izdelavi je bil gel homogen, ustrezne konsistence in smo ga lahko brez težav prenesli v petrijevko. Gel je bil po enem dnevu še zmeraj homogen in prožen, zmanjšala pa sta se mu masa in volumen. Po tednu dni je bil gel občutno manjši in lažji, na vrhu je nastala skorja, gel je postal bele barve, a ostal enotne oblike (slika 4). Izgubil je večino svoje prožnosti. Iz razlike v masi gela takoj po izdelavi in po tednu dni sklepamo, da je izhlapela celotna količina metanojske kisline.



Slika 4: Vzorec A po enem dnevu (levo) in sedmih dneh (desno).

Vzorec C:

Aerosil 200 **3 %**

Metanojska kislina (100 %) do 100 %

Aerosil 200 se je lepo omočil, izdelani gel je bil homogen, lepo mazljiv in želene pastozne konsistence. Gel smo razporedili v petrijevko, ga stehtali in pustili na zraku 24 ur ter ponovno stehtali. Gel je občutno spremenil videz, skrčil se je za polovico, na otip je bil neprožen. Meritev smo ponovili čez šest dni (torej sedmi dan od izdelave): masa je ostala nespremenjena, vzorec pa je razpokal in postal krhek (slika 5).

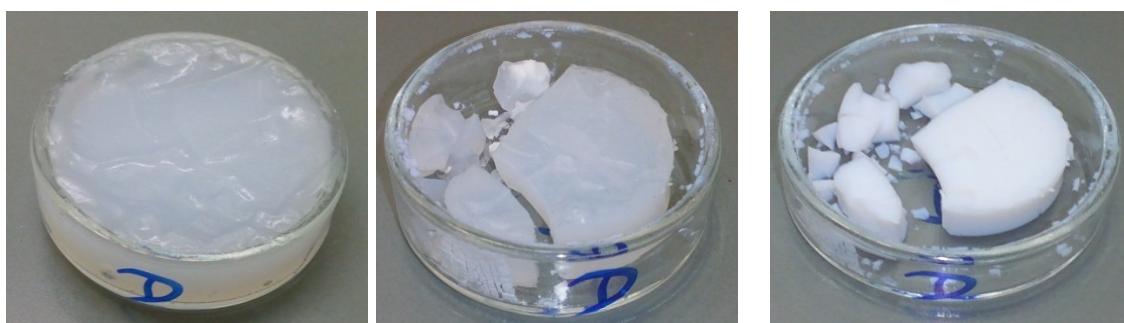


Slika 5: Vzorec C ob izdelavi (levo), po enem dnevnu (sredina) in sedmih (desno) dneh.

Vzorec D:

Aerosil 200 **7 %**
Metanojska kislina (60 %) **do 100 %**

Vzorec D je bil primerljiv z vzorcem C, s tem da je bil vzorec D nižje viskoznosti in smo z njim lažje ravnali. Vzorec smo prenesli v petrijevko in ga pustili na zraku. Po enem dnevnu je bil lažji, bistveno se mu je zmanjšal volumen in dodatno je razpokal. Po tednu dni od priprave je bil vzorec bel, otrdel in krhek (slika 6).



Slika 6: Vzorec D ob izdelavi (levo), po enem dnevnu (sredina) in sedmih (desno) dneh.

4.1.1.2. Porozni SiO₂

Vzorec F:

Porozni SiO₂ 3,5 %

Metanojska kislina (100 %) do 100 %

Ob pripravi je bil vzorec še vedno tekoč in ni geliral. Prelili smo ga v petrijevko, stehtali ter pustili na zraku 24 ur. V tem času je metanojska kislina izhlapela, ostali pa so manjši delci trdega gela (slika 7).



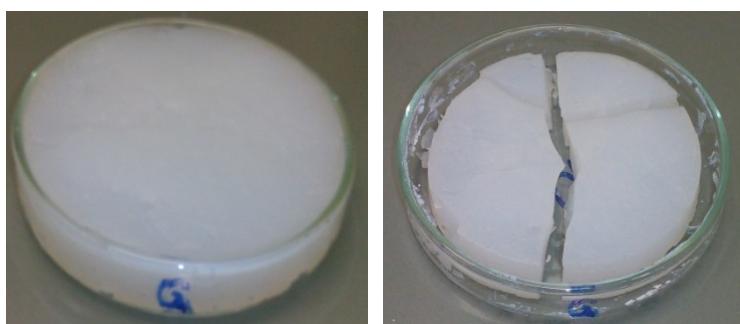
Slika 7: Vzorec F ob izdelavi (levo) in po enem dnevu (desno).

Vzorec G:

Porozni SiO₂ 10 %

Metanojska kislina (60 %) do 100%

Vzorec je ob izdelavi izgledal homogen, rahlo težje mazljiv, a dovolj, da smo ga brez težav prenesli v petrijevko. Vzorec smo stehtali, ga pustili na zraku nadaljnjih 24 ur, ko smo meritev ponovili. Gel je izgubil del mase, se razlomil in strdil (slika 8).



Slika 8: Vzorec G ob izdelavi (levo) in po enem dnevu (desno).

4.1.2. Organski polimeri

4.1.2.1. Carbopol 971

Vzorec M:

Carbopol 971 10 %

Metanojska kislina (60 %) do 100 %

Vzorec je bil neposredno po izdelavi prozoren, enoten in lepljiv. V petrijevko smo ga razporedili s težavo, ker je bil preveč lepljiv. Po dnevnu na zraku se je gel neenakomerno skrčil in otrdel, a je bil še vedno prozoren. Do sedmega dne ni bilo občutnih razlik v videzu, gel je popolnoma otrdel oziroma se zaskorjil (slika 9).



Slika 9: Vzorec M ob izdelavi (levo), po enem dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).

Vzorec N:

Carbopol 971 10 %

Metanojska kislina (100 %) do 100 %

Izdelava gela ni bila uspešna, saj se je polimer ob stiku z metanojsko kislino združil v vrvici podobno strukturo, ki je bila gumijasta in je nismo mogli preoblikovati. Za geliranje polimer ni porabil vse kisline, zato je bila ta še vedno opazna kot prosta tekočina (slika 10).



Slika 10: Vzorec N ob izdelavi.

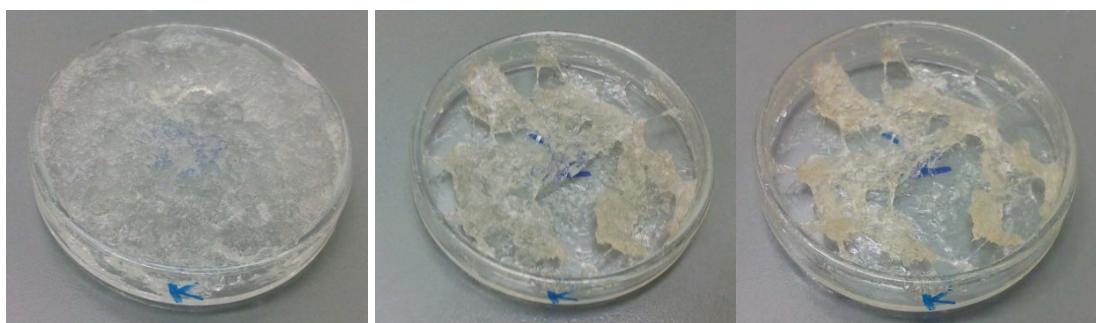
4.1.2.2. Carbopol 940

Vzorec K:

Carbopol 940 10 %

Metanojska kislina (60 %) do 100 %

Izdelani gel je bil homogen, prozoren, kompakten, a še vedno dovolj mazljiv, da smo ga lahko dali v petrijevko. Stehtani gel smo pustili na zraku in meritev ponovili čez en dan in sedem dni. Naslednji dan je bil gel popolnoma drugačne oblike, saj se je skrčil in izgubil velik delež mase. Med gelom po enem in sedmih dneh, tako v masi kot v obliki, ni bilo bistvenih razlik.



Slika 11: Vzorec K ob izdelavi (levo), po enem dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).

Vzorec L:

Carbopol 940 10 %

Metanojska kislina (100 %) do 100 %

Tako kot vzorec N, pripravljen s Carbopolom 971, tudi ta gel ni bil ustrezен za nadaljnje poskuse, saj je tudi v tem primeru nastal elastičen gel, s katerim je bilo težko ravnati in ki za geliranje ni sprejel celotne količine metanojske kisline (slika 12).



Slika 12: Vzorec L ob pripravi.

4.1.3. Kombinacije polimerov

Vzorec B:

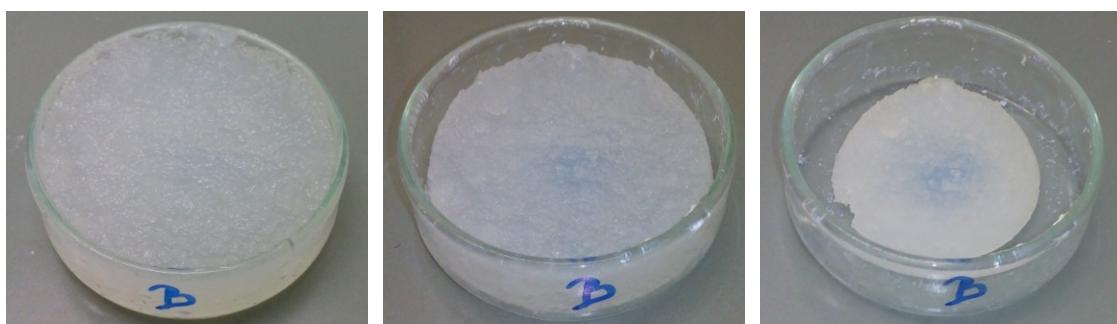
Aerosil 200 **2,5 %**

Carbopol 940 **5 %**

Metanojska kislina (60 %) do 100 %

Izdelani gel je bil lepo mazljiv, dovolj tekoč, da smo ga enostavno razporedili v petrijevko, a hkrati dovolj kompakten, da je obdržal obliko. Gel smo pustili na zraku 24 ur in ga ponovno stehtali. To smo ponovili še čez šest dni.

Gel je bil po enem dnevu še vedno kompakten, fleksibilen, le volumen in masa sta se mu zmanjšala na račun izhlapele kisline. V tednu dni je izhlapelo več kot 85 % kisline (tekoče faze gela) (slika 13).



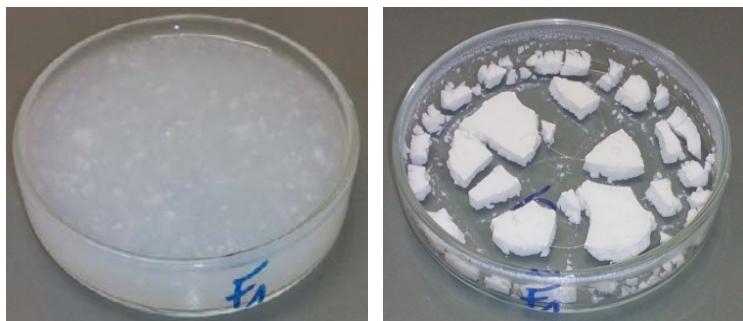
Slika 13: Vzorec B ob izdelavi (levo), po enem dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).

Vzorec F₁:

Aerosil 200	3,5 %
Carbopol 940	1 %
Metanojska kislina (100 %) do 100 %	

Gel iz kombinacije Carbopola in Aerosila je bil rahlo nehomogen. Kljub temu je bil želene konsistence, ker je bil mazljiv, hkrati pa dovolj tekoč, da smo lahko z njim enostavno ravnali (slika 14).

Pričakovali smo, da bo dodatek Carbopola 940 upočasnil izhlapevanje kisline v primerjavi z vzorcem F, ki vsebuje samo Aerosil 200 (zaradi večje premreženosti gela). Izguba mase tekoče faze tega ni potrdila, izguba je bila primerljiva z vzorcem F, kjer smo uporabili samo Aerosil 200, brez dodatka Carbopola 940.

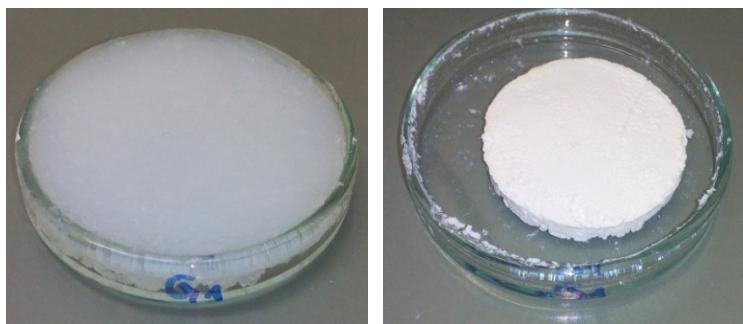


Slika 14: Vzorec F₁ ob izdelavi (levo) in po enem dnevu (desno).

Vzorec G₁:

Aerosil 200	10 %
Carbopol 940	1 %
Metanojska kislina (60 %) do 100 %	

Pripravljeni gel je bil motne bele barve, pastozne konsistence in homogen. Ravnanje z njim je bilo enostavno in lepo se je razporedil v petrijevko. Po enem dnevu se je gel enakomerno skrčil v manjši disk, ki je bil neprožen in popolnoma bel (slika 15).

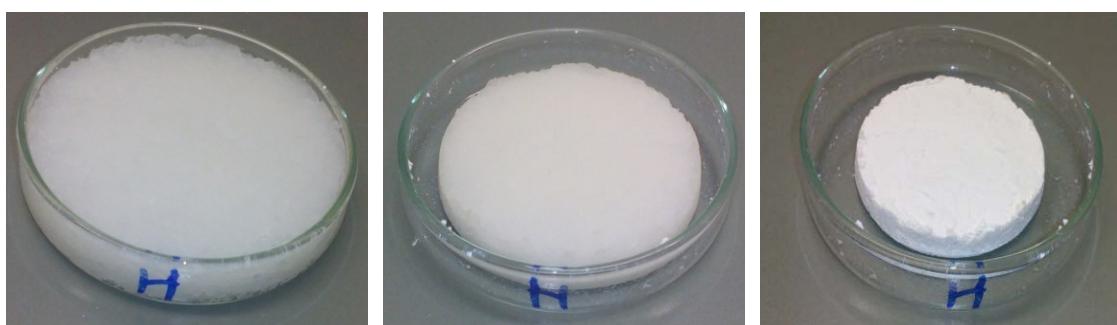


Slika 15: Vzorec G₁ ob izdelavi (levo) in po enem dnevu (desno).

Vzorec H:

Aerosil 200	10 %
Carbopol 940	5 %
Metanojska kislina (60 %) do 100 %	

Polimera sta se lepo omočila in tvorila kompakten, belkast gel, ki smo ga dali v petrijevko in ga teden dni pustili na zraku. Po enem dnevu in po sedmih dneh smo vzorec stehtali. Masa se je postopoma zmanjševala, gel se je prav tako postopoma enakomerno krčil. Po prvem dnevu je bil še zmeraj prožen, belkast in homogen, medtem ko je po tednu dni izgubil prožnost in otrdel, vendar ni razpadel (slika 16).

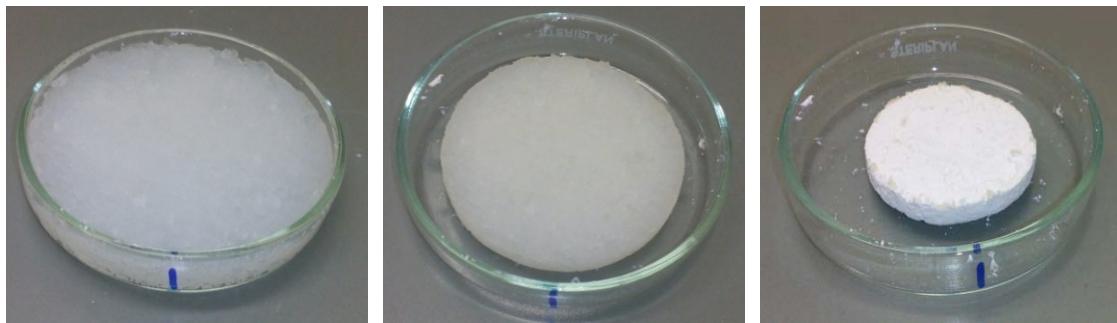


Slika 16: Vzorec H ob izdelavi (levo), po enem dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).

Vzorec I:

Aerosil 200	5 %
Carbopol 940	5 %
Metanojska kislina (60 %) do 100 %	

Kombinacija Aerosila 200, Carbopola 940 in 60-odstotne metanojske kisline se je že takoj po izdelavi zdela ugodna, saj je bil gel homogen in primerne viskoznosti. Dali smo ga v petrijevko in stehtali, pustili na zraku 24 ur in ga ponovno stehtali. Gel je izgubil del mase na račun izhlapele kisline, bil pa je še zmeraj homogen in prožen. Bistveno se je spremenil po drugem dnevu, ko je izhlapelo 98 % metanojske kisline in je gel postal trden in bel (slika 17).



Slika 17: Vzorec I ob izdelavi (levo), po enem dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).

Vzorec J:

Aerosil 200	7 %
Carbopol 940	7 %
Metanojska kislina (60 %) do 100 %	

Vzorec je bil po lastnostih po pričakovanjih kombinacija med vzorcema H in I, torej homogen in mazljiv. Do prvega in sedmega dne sta se mu postopoma manjšala masa in volumen, dokler ne izhlapela večina kisline in je ostal samo še trd bel disk.



Slika 18: Vzorec H ob izdelavi (levo), po enem dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).

Vzorec O:

Aerosil 200 **2,5 %**
Carbopol 940 **5 %**
Metanojska kislina (100 %) do 100 %

Izdelani gel je bil homogen, a precej tekoč, zato nismo imeli težav pri prenosu v petrijevko, kjer smo ga tako kot ostale gele po tehtanju pustili na zraku teden dni. Tehtanje smo ponovili po enem in sedmem dnevu od izdelave in ugotovili, da je že po prvem dnevu izhlapelo 98 % metanojske kisline, kar je ostalo nespremenjeno tudi po enem tednu. Masa se je zmanjšala, gel se je enakomerno skrčil in otrdel (slika 19).



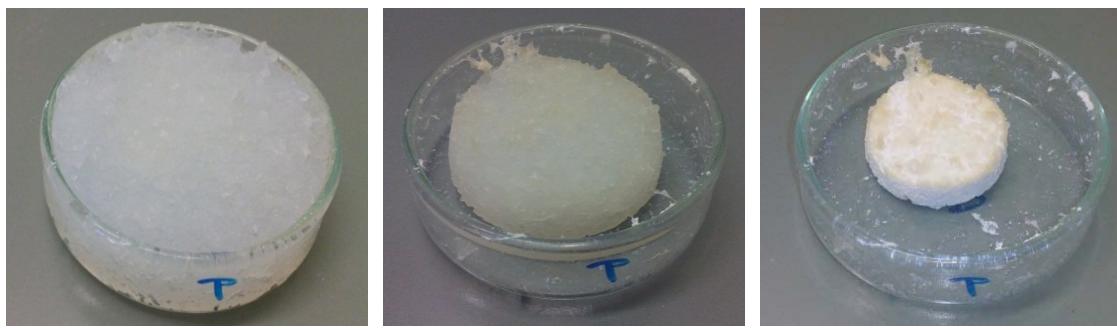
Slika 19: Vzorec O ob izdelavi (levo), po enem dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).

Vzorec P:

Aerosil 200 **2,5 %**
Carbopol 971 **5 %**
Metanojska kislina (60 %) do 100 %

Pripravljeni gel je bil homogen, moten in lepo mazljiv. Prenesli smo ga v petrijevko in stehtali. Gel smo ponovno stehtali po enem dnevu in sedmih dneh stanja na zraku.

Gel je bil ob pripravi kompakten, z njim se je dalo lepo ravnati, brez težav smo ga prenesli v petrijevko. Do naslednjega dne je izhlapelo 67 % kisline, a je gel kljub temu ohranil svojo plastičnost. To se je spremenilo po tednu dni, ko je bil delež izhlapele kisline kar 99 %, gel je sicer stal homogen, a je postal bel, kompakten in trd. (slika 20).



Slika 20: Vzorec P ob izdelavi (levo), po enem dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).

Vzorec R:

Aerosil 200 **2,5 %**

Carbopol 971 **5 %**

Metanojska kislina (100%) do 100 %

Aerosil 200 in Carbopol 971 ob mešanju s 100-odstotno metanojsko kislino nista gelirala popolnoma, nastala zmes je bila nehomogena, fazi sta bili ločeni. Zmes smo prenesli v petrijevko, jo stehtali, pustili na zraku do naslednjega dne, ko smo ponovili tehtanje, ki je pokazalo, da je izhlapelo 94 % metanojske kisline, v sedmih dneh po izdelavi pa 95 %. Gel je bil trd in lomljiv (slika 21).



Slika 21: Vzorec R ob izdelavi (levo), po enem dnevu (sredina) in sedmih dneh (desno).

4.2 PRIMERJAVA IZDELANIH GELOV

V preglednici 1 je prikazana primerjava narejenih gelov. Našim začetnim zahtevam sta se najbolj približala gela B in O (v preglednici označena z modro).

Preglednica 1: Pregled gelov.

60-odstotna metanojska kislina					
Vzorec	Aerosil 200	Carbopol 940	Carbopol 971	Slika gela	Opis gela
B	2,5	5	/		Moten, primerne viskoznosti
G	10	/	/		Homogen, primerne viskoznosti
G1	10	1	/		Bolj viskozen od G
H	10	5	/		Homogen, gumijast, neprimerne viskoznosti

I	5	5	/		Gumijast, a lažje mazljiv od H
J	7	7	/		Težko mazljiv, lepljiv
K	/	10	/		Želatinast, prozoren
M	/	/	10		Želatinast, prozoren
P	2,5	/	5		Homogen, moten, lepo mazljiv

100-odstotna metanojska kislina					
Vzorec	Aerosil 200	Carbopol 940	Carbopol 971	Slika gela	Opis gela
F	3,5	/	/		Tekoč, rahlo moten
F1	3,5	1	/		Rahlo viskozen, nehomogen, vidni delci Carbopola
L	/	10	/		Polimer se je združil v vrvici podobno obliko, ločeni fazi
N	/	/	10		Polimer se je združil v vrvici podobno obliko, ločeni fazi
O	2,5	5	/		Homogen, a še vedno precej tekoč
R	2,5	/	5		Ni geliral popolnoma, ločeni fazi

Izmed izdelanih gelov smo glede na v začetku postavljene kriterije izbrali najustreznejše, s katerimi smo nadaljevali nadaljnje poskuse. Izločili smo tiste, ki so imeli delež polimerov večji od 10 %, s prenizko ali previsoko viskoznostjo, in nehomogene gelske strukture. Najustreznejša sta bila vzorca B in O (označena z modro v preglednici 1):

Serija 1:

- Aerosil 200 2, 5 %
- Carbopol 940 5 %
- Metanojska kislina (60 %) do 100 %

Serija 2:

- Aerosil 200 2,5 %
- Carbopol 940 5 %
- Metanojska kislina (100 %) do 100 %

Kljub zelo podobnim rezultatom med vzorci s Carbopoloma 940 in 971 smo se odločili za Carbopol 940 zaradi razlike pri pripravi gela s 100-odstotno metanojsko kislino. Gel s Carbopolom 940 je bil namreč kompaktnejši in manj tekoč od tistega, pripravljenega s Carbopolom 971.

Gela, pripravljena z izbrano kombinacijo polimerov in deležev sestavin, sta bila ustrezne viskoznosti. Edina težava je bila, da je metanojska kislina izhlapevala prehitro. Zato smo se odločili, da gele prekrijemo z različnimi barierami:

1. filter *discus grad,*
2. fini filter papir,
3. grobi filter papir in
4. tkanino (trikotna ruta iz kompleta prve pomoči).

Gele smo označili s številkami od 1.1 do 3.4, kjer prva pomeni serijo, druga pa vrsto bariere (npr. 2.3 – serija 2, bariera: grobi filter papir).

4.3 SERIJA 1

Aerosil 200	2,5 %
Carbopol 940	5 %
Metanojska kislina (60 %) do 100 %	

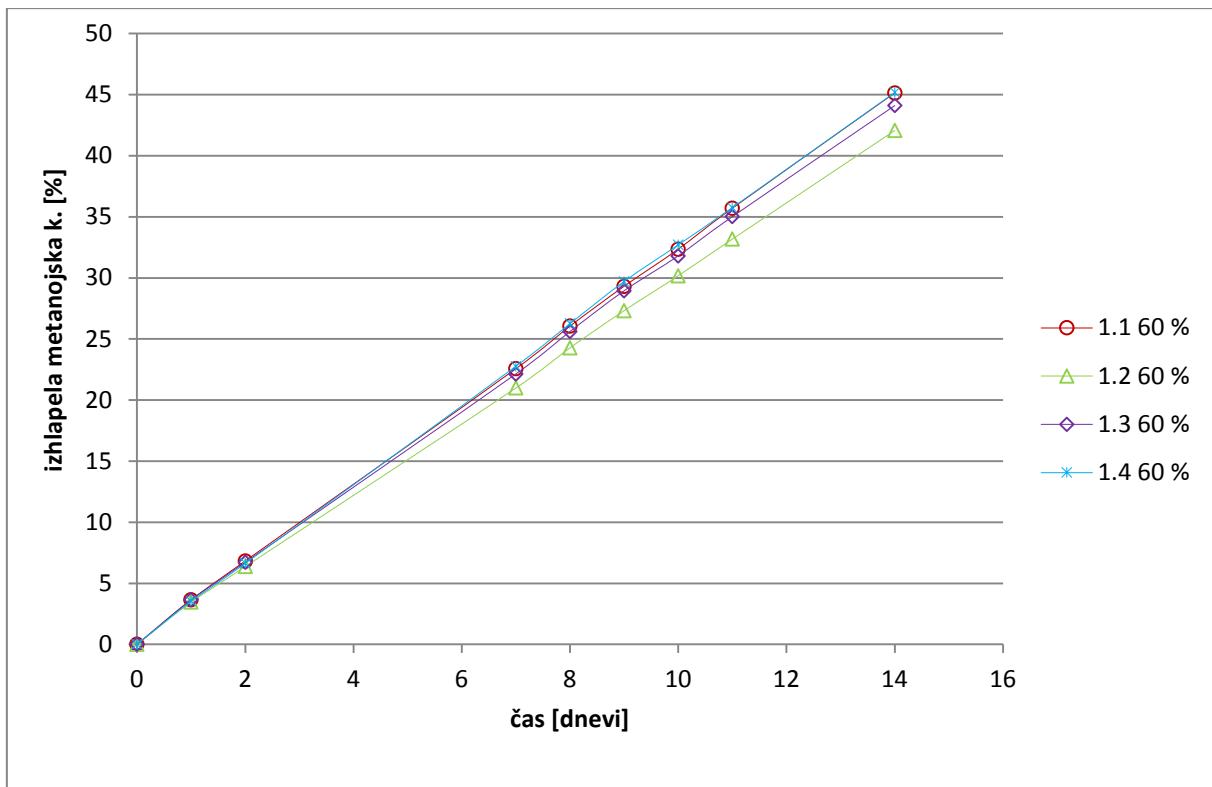
Gele smo prenesli v 50-mililitrske čaše v količini 25 g in jih pokrili s filtrom *discus grad* (vzorec 1.1), finim filter papirjem (vzorec 1.2), grobim filter papirjem (vzorec 1.3) in tkanino (vzorec 1.4) ter jih zatesnili (slika 22).



Slika 22: Pokriti geli serije 1.: 1.1 filter *discus grad* (skrajno levo), 1.2 fini filter papir (drugi iz leve), 1.3 grobi filter papir (drugi iz desne), 1.4 tkanina (skrajno desno).

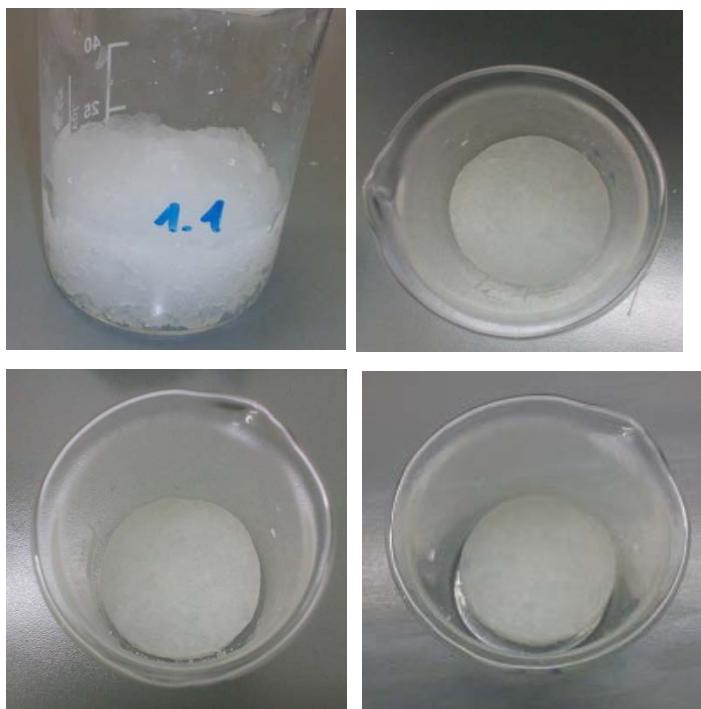
Gele smo spremljali v obdobju 14 dni, z ugotavljanjem izgube mase zaradi izhlapevanja metanojske kisline ter spremembe v videzu.

Iz slike 23 vidimo, da je kislina izhlapevala enakomerno. Izhlapevanje je bilo počasno, saj v obdobju dveh tednov ni izhlapela niti polovica metanojske kisline v posameznem gelu (od 42 do 45 %). Največ metanojske kisline je izhlapelo iz vzorcev 1.1 in 1.4, pokritih s filtrom *discus grad* in tkanino, najmanj pa iz vzorca 1.2, ki je bil pokrit s finim filter papirjem, kar je posledica najmanjših por bariere. V splošnem pa zaključujemo, da med posameznimi barierami ni bistvenih razlik.



Slika 23: Delež izhlapele kisline gelov serije 1 pri 22 °C.

Poleg zmanjševanja mase na račun izhlapele metanojske kisline smo spremljali tudi spremembo videza gelov. Ker je v primerjavi z vzorci, ki niso bili pokriti z bariero, kislina izhlapevala počasneje, se je počasneje spremenjal tudi videz gela (slika 24).



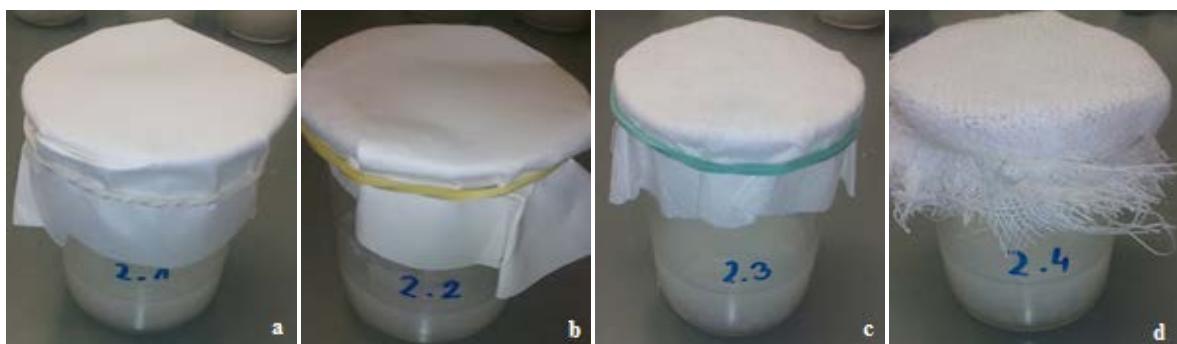
Slika 24: Slike gela 1.1 ob izdelavi (zgoraj levo), po sedmih (zgoraj desno), devetih (spodaj levo) in po 14 dneh (spodaj desno).

Na sliki 24 vidimo, da so razlike v videzu gela 1.1 minimalne. Gel se je sicer skrčil in postal manj prožen, a je ostal enoten in ni razpadel na več kosov, kot se je zgodilo v začetnih poskusih, ko bariere nismo uporabili. Tudi spremembe med posamezni geli znotraj serije, kjer je bila edina razlika vrsta bariere, so bile zelo podobne: majhno krčenje, ohranila se je minimalna plastičnost.

4.4 SERIJA 2

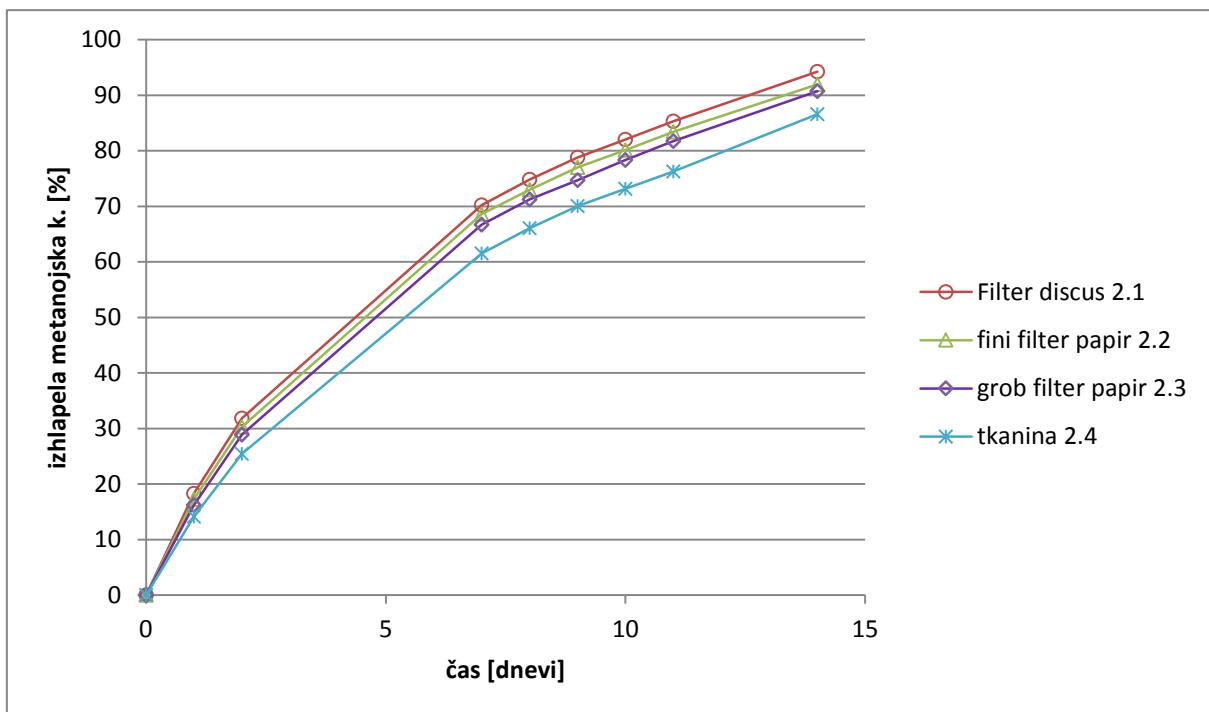
Aerosil 200	2,5 %
Carbopola 940	5 %
Metanojska kislina (100 %) do 100 %	

Gele smo prenesli v 50-mililitrske čaše in jih pokrili s filtrom *discus grad* (vzorec 2.1), finim filter papirjem (vzorec 2.2), grobim filter papirjem (vzorec 2.3) in tkanino (vzorec 2.4) ter jih zatesnili (slika 25). Čaše so vsebovale povprečno 25 g gela. V obdobju 14 dni pri temperaturi 22 °C smo beležili zmanjšanje mase na račun izhlapevanja kisline in spremembe videza.



Slika 25: Pokriti geli serije 2. a) filter discus, b) fini filter papir, c) grobi filter papir, d) tkanina.

Pri seriji 2 je bilo izhlapevanje metanojske kisline manj enakomerno kot pri seriji 1. Kislina je najintenzivneje izhlapevala v začetku, nato se je izhlapevanje upočasnjevalo s časom (slika 26). V obdobju 14 dni je tako izlapela skoraj vsa kislina, ki je bila prisotna v gelu (od 86 do 90 %).



Slika 26: Primerjava deleža izhlapele kisline iz gelov serije 2 glede na bariero pri 22 °C.

Gel je bil ob pripravi primerne viskoznosti, kar je omogočalo sprejemljivo rokovanje pri prenosu. Naslednji dan je bil gel kompaktnejši, po tednu dni pa smo že opazili izrazite spremembe, saj se je gel skrčil, a je bil še zmeraj delno plastičen (slika 27). Po 14 dneh je postal trd in krhek.





Slika 27: Slike gela 2.3 ob izdelavi (zgoraj levo), po enem dnevu (zgoraj desno), sedmih dneh (spodaj levo) in 14 dneh (spodaj desno).

Spremembe videza gela so bile v tej seriji izrazitejše kot pri seriji 1. Pri seriji 2 smo uporabili 100-odstotno metanojsko kislino, ki je izhlapevala hitreje kot pri vzorcih serije 1, kjer smo pri pripravi gelov uporabili 60-odstotno metanojsko kislino. V vzorcih serije 1 je ostalo nekaj vode, ki je gele vzdrževala še sprejemljivega videza oziroma sprejemljivih lastnosti. Podobno pa se lastnosti posameznih gelov serije 2 niso razlikovale bistveno glede na bariero, kar sklepamo iz krivulj na sliki 26, ki prikazujejo podobno izhlapevanje med vzorci iste serije.

Z barierami smo želeli doseči enakomernejše, predvsem pa počasnejše izhlapevanje metanojske kisline in to nam je glede na dobljene rezultate tudi uspelo.

Po uporabi barier so se geli po nekaj dneh vidno razlikovali od gelov, pri katerih bariere nismo uporabili. Zato smo izvedli dodatne poskuse še z gelom, ki smo ga pripravili samo z Aerosilom 200 in 100-odstotno metanojsko kislino (serija 3).

4.5 SERIJA 3

Aerosil 200 **8 %**

Metanojska kislina (100 %) do 100 %

Kislini smo postopoma dodajali Aerosil 200, dokler ta ni postal želene konsistence (mazljiv, a dovolj kompakten, da je nastali gel ohranil obliko in smo z njim enostavno ravnali). To smo dosegli pri 8 % dodanega Aerosila 200.

Pripravljeni vzorec 3 smo prenesli v petrijevko, ga stehtali in pustili pri temperaturi 22 °C na zraku sedem dni, ga ponovno stehtali in ocenili vizualne spremembe.

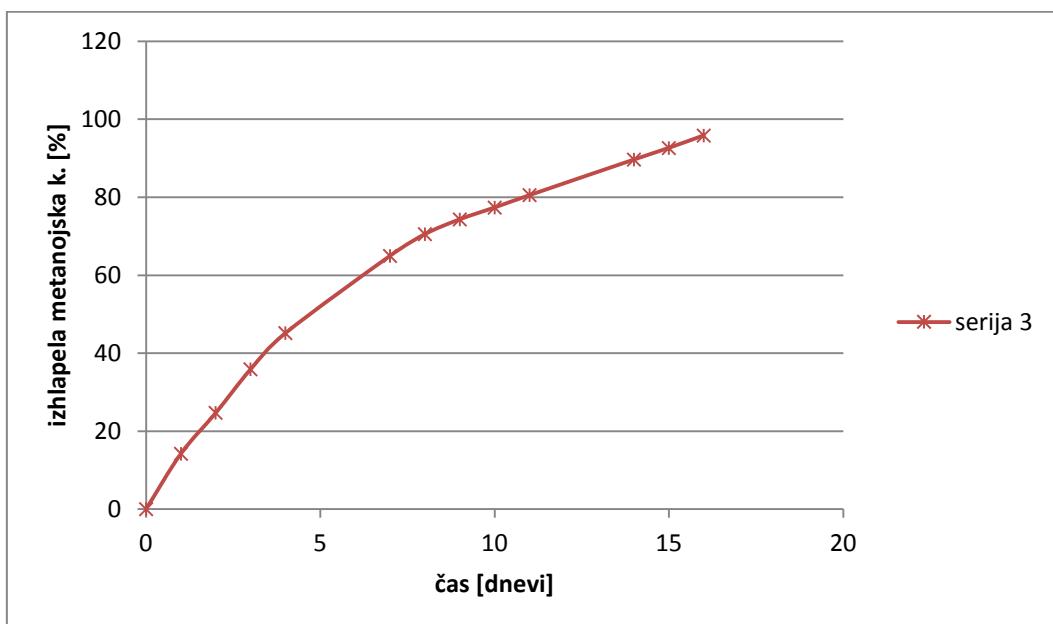
Kot smo pričakovali, je tudi tukaj metanojska kislina izhlapela relativno hitro (89-odstotno zmanjšanje mase kisline) in vzorec je otrdel že po enem dnevu (slika 28). V naslednjih dneh se videz gela ni bistveno spremenil, izhlapelo pa je kar 99 % metanojske kisline, kar pomeni, da je v petrijevki ostal skoraj samo Aerosil 200.



Slika 28: Gel z 8 % Aerosila 200 in 100-odstotno metanojsko kislino ob pripravi (levo), po enem dnevu (sredina) in po sedmih dneh (desno).

Ker smo pri serijah 1 in 2 ugotovili, da med posameznimi vrstami barier ni bistvene razlike, smo v seriji 3 kot bariero uporabili le filter *discus grad*.

Delež izhlapele metanojske kisline vidimo na sliki 29. Delež izhlapele metanojske kisline po 7 dnevih je bil 65 %, po 14 dnevih pa 90 %.



Slika 29: Izhlapevanje metanojske kisline iz gela serije 3 pri barieri s filtrom *discus grad* in 22 °C.

Vzorec 3 je bil primerne viskoznosti, homogen in zato je bilo z njim enostavno delati. V začetnih dneh v videzu ni bilo bistvenih sprememb, te so se pokazale po tednu dni, ko se je vzorec skrčil in izgubil nekaj plastičnosti (slika 30, spodaj levo). Ob zaključku eksperimenta je bil gel trd, bel, krhek, kar je glede na meritve, ki kažejo, da je izhlapela skoraj celotna količina metanojske kisline, pričakovano (slika 30, spodaj desno).



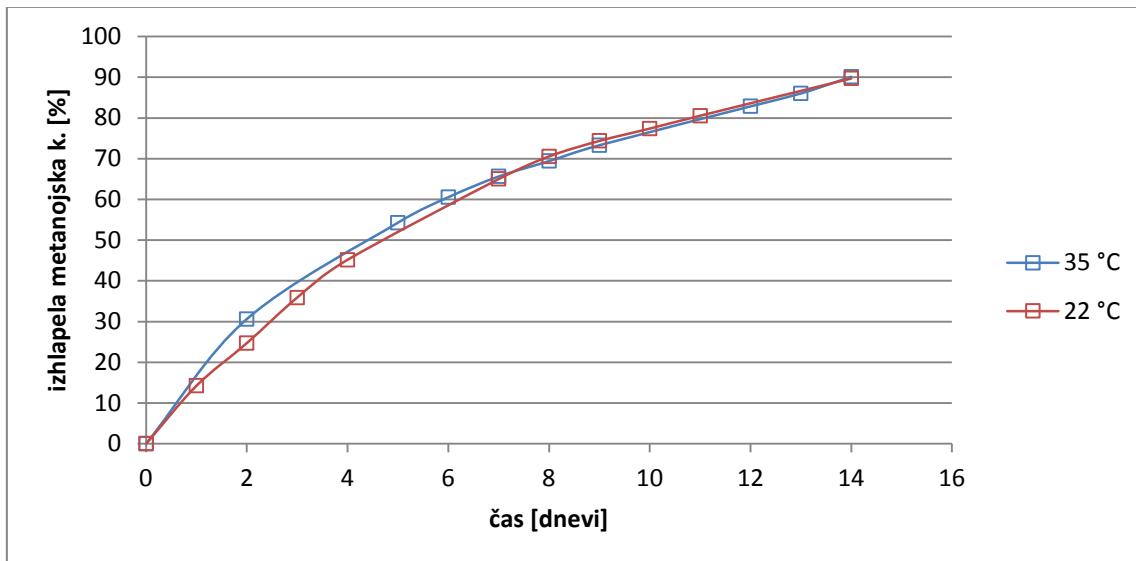
Slika 30: Gel serije 3 (kot bariera filter *discus grad*) ob pripravi (zgoraj), po sedmih dnevih (spodaj levo) in po 14 dnevih (spodaj desno).

Ugotavljamo, da je z uporabo primernih barier kot kontrolnih elementov izhlapevanja metanojske kisline v okolico možno podaljšati njen izhlapevanje tudi do 14 dni.

Toda pojavi se vprašanje, kako bi na izhlapevanje metanojske kisline vplivalo povišanje temperature. Ker se razmere v panju nenehno spreminjajo in z njimi tudi temperatura, ki je odvisna od zunanjega temperature, smo izvedli poskus izhlapevanja tudi pri višji temperaturi.

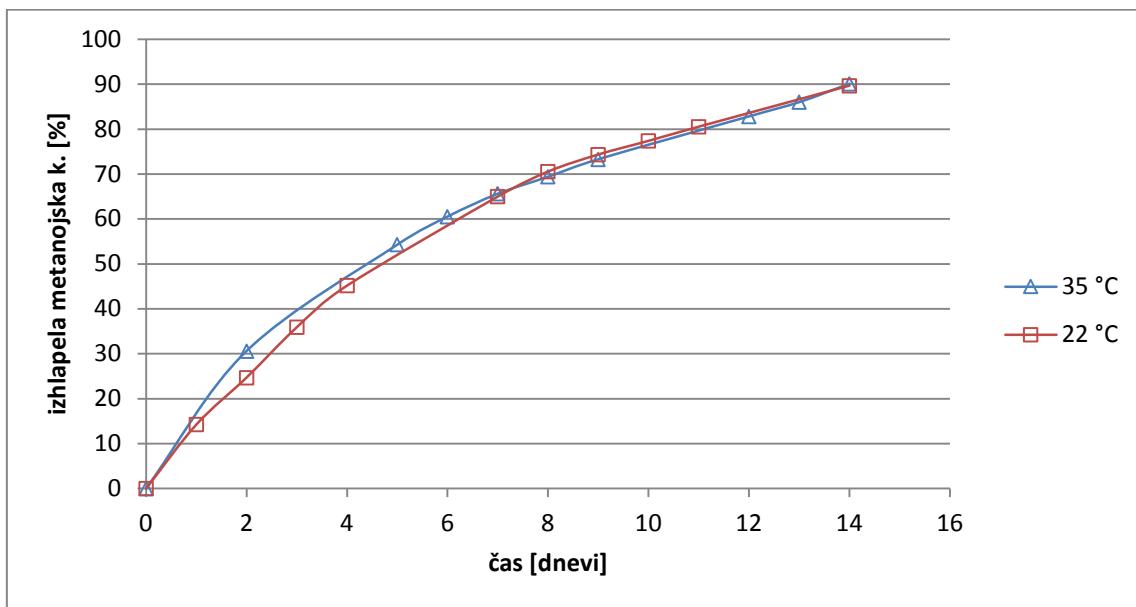
Eksperiment smo izvedli le z bariero filtra *discus grad*, pri čemer smo izločili serijo 1, pri kateri smo za pripravo gelov uporabljali 60-odstotno metanojsko kislino, saj želimo, da je v gelu prisotna čim bolj koncentrirana kislina (v tem primeru 100-odstotna). Ponovno smo pripravili gela serij 2 in 3, ju pokrili z bariero filtra *discus grad* in zatesnili. Izhlapevanje smo izvedli pri 35 °C, saj je to temperatura, ki je redko presežena v regijah z zmerno toplim pasom.

Rezultati izhlapevanja metanojske kisline iz gela serije 2 pri temperaturi 35 °C (slika 31) kažejo, da izhlapevanje ni bistveno višje kot pri 13 °C nižji temperaturi, tj. 22 °C . Iz tega sklepamo, da tudi pri višjih temperaturah bariera učinkovito kontrolira hitrost izhlapevanja metanojske kisline. To je bil izjemno pomemben rezultat za načrtovanje končnih gelov za predvideno uporabo kot akaricidi.



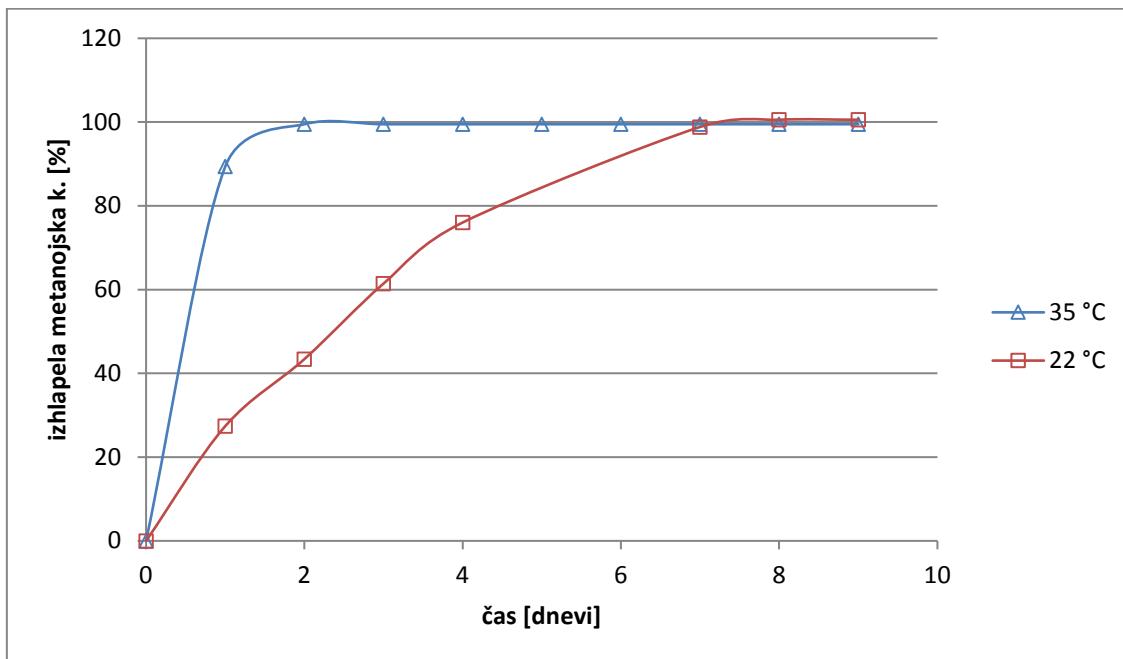
Slika 31: Primerjava izhlapevanja metanojske kisline iz vzorcev serije 2 pri barieri filtra *discus grad* in temperaturah 22 °C in 35 °C.

Poskusi z gelom serije 3 (slika 32) so to ponovno potrdili: pri obeh proučevanih temperaturah je bilo izhlapevanje metanojske kisline praktično enako.



Slika 32: Primerjava izhlapevanja metanojske kisline iz vzorcev serije 3 pri barieri filtra *discus grad* in temperaturi 22 °C in 35 °C.

Dodatni test za učinkovitost bariere je bil eksperiment brez bariere in pri obeh izbranih temperaturah (slika 33). Potrdili smo bistveno spremembo v hitrosti izhlapevanja zaradi povišane temperature, kar smo tudi pričakovali. Celotna količina metanojske kisline je pri 35°C izhlapela že po dveh dneh, pri 22°C pa je bilo za to potrebnih šest dni.



Slika 33: Izhlapevanje metanojske kisline iz vzorcev nepokritega gela serije 3 pri temperaturah 22°C in 35°C .

Kot je vidno iz slik 32 in 33, temperaturna razlika več kot 10°C ne vpliva bistveno na izhlapevanje metanojske kisline, če imamo prisotno bariero. Zaključujemo, da smo tako uspešno omejili oziroma kontrolirali hitrost izhlapevanja metanojske kisline ne glede na temperaturo.

4.6 KOMERCIJALNI GEL MAQS®

Kot kontrolni vzorec smo uporabili na tržišču dostopen gel MAQS (Mite Away Quick Strips)® za čebeljo družino medonosnih čebel. Trak je v obliki gela sivobele do karamelne barve v ovoju iz belega laminiranega papirja, ki je biološko razgradljiv (sliki 34 in 35). En trak meri približno $10 \times 20 \times 0,4$ cm, tehta 146 g, pri čemer metanojska kislina predstavlja 46,7 % celotne mase. Obvezna je uporaba rokavic zaradi jedkosti metanojske kisline.



Slika 34: Gel MAQS® v primarni ovojnini.



Slika 35: Gel MAQS® ob odprtju primarne ovojnинe.

Ob odprtju zaznamo močen vonj po metanojski kislini, papir je rahlo vlažen, zato je uporaba rokavic nujna. Gel je dovolj čvrst za rokovanje brez posebne previdnosti, da bi se raztrgal, na otip je še vedno mehak.

Navodilo za uporabo MAQS® pravi, da je potrebno trakova z geloma vzeti iz zunanje ovojnine in ju postaviti v panj. Ker nas je zanimala tudi sprememb videza in ne samo zmanjševanje mase zaradi izhlapevanja metanojske kisline, smo v dveh primerjalnih poskusih traku odstranili primarno ovojnino (slika 35) in določali razliko v hlapenju glede na to, ali je primarna ovojnina prisotna ali ne. Poskus smo izvedli v digestoriju in pri temperaturi 22 °C. V preglednici 2 in na sliki 37 navajamo časovni potek hlapenja metanojske kisline.

Preglednica 2: Zmanjševanje mase gela MAQS® in metanojske kisline do 14. dneva.

Dan	Odkrit gel [g]	Masa metanojske kisline [g]	Zmanjšanje mase metanojske kisline [%]	Pokrit gel [g]	Masa metanojske kisline [g]	Zmanjšanje mase metanojske kisline [%]
0	142,21	68,2	-	141,70	68,2	-
1	113,52	39,51	42,06	122,34	48,84	28,38
2	102,28	28,27	58,54	111,30	37,8	44,57
5	88,16	14,15	79,25	94,02	20,52	69,91
6	86,12	12,11	82,24	90,05	16,55	75,73
7	84,77	10,76	84,22	87,99	14,49	78,75
13	81,01	7,00	89,73	82,30	8,8	87,09
14	80,45	6,44	90,55	81,42	7,92	88,38

Iz preglednice 2 je razvidno, da se je masa gela geloma zmanjševala različno hitro. Uporaba gela je predvidevana skupaj s primarno ovojnino, zato je bila razlika pričakovana. Med vzorcema se tako pojavi razlika, ki je najbolj opazna v prvih dveh dnevih, kjer iz odkritega gela izhlapi skoraj 60 % vse kisline, iz pokritega pa le okrog 45 %. Kasneje se ta razlika zmanjšuje in v 7 dneh iz odkritega gela izhlapi skoraj 85 % vse kisline, iz pokritega pa skoraj 79 %, v 14 dneh pa je razlika v deležu izhlapele kisline med obema geloma le dober 1 %.

Poleg izhlapevanja metanojske kisline smo v obdobju 14 dni spremljali tudi spremembe v videzu. Ob odprtju je bil gel svetle karamelne barve, homogen, na dotik kompakten, a še vedno plastičen in enostaven za rokovanje (sliki 34 in 35). Že po treh dnevih (slika 36) smo opazili prve razpoke, ki so se v času poskusa povečevale, saj se je gel ob izgubi metanojske kisline krčil. Gel je postal bolj trd in vonj po metanojski kislini manj močan, toda še zaznaven.



Slika 36: Odkrit gel MAQS® po treh (levo) in 14. dneh (desno).

Zanimalo nas je tudi, ali se iz gela izloči celotna količina metanojske kisline. Masa se je gelu nehala spremenjati po 20. dnevu, ko je izhlapelo približno 94 % metanojske kisline (preglednica 3). Izhlapevanje metanojske kisline se je nato upočasnilo in po 21. dnevu se je izhlapevanje ustavilo. Do tega dne je izhlapelo približno 94 % metanojske kisline.

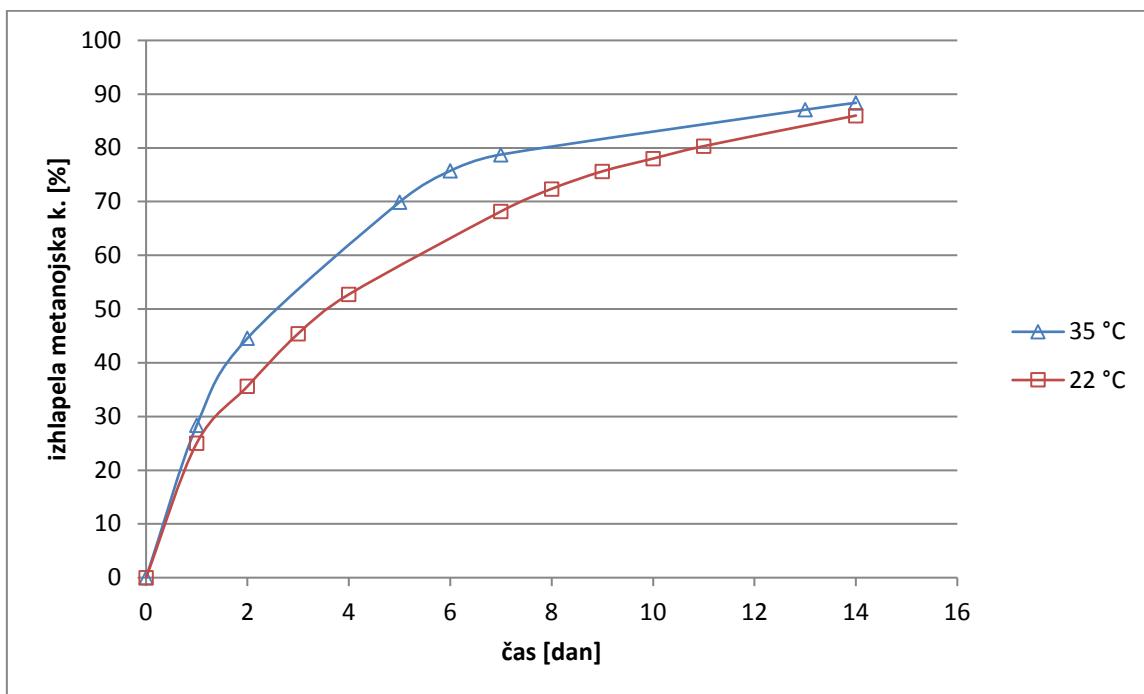
Preglednica 3: Zmanjševanje mase gela MAQS® in metanojske kisline od 15. do 23. dneva.

Dan	Odkrit gel [g]	Masa metanojske kisline [g]	Zmanjšanje mase metanojske kisline [%]	Pokrit gel [g]	Masa metanojske kisline [g]	Zmanjšanje mase metanojske kisline [%]
15	79,96	5,95	91,27	80,85	7,35	89,22
16	79,60	5,59	91,80	80,37	6,87	89,92
17	78,94	4,93	92,77	79,98	6,48	90,49
20	78,25	4,24	93,78	78,74	5,24	92,31
21	77,97	3,96	94,20	78,41	4,91	92,80
22	77,97	3,96	94,20	78,41	4,91	92,80
23	77,97	3,96	94,20	78,41	4,91	92,80

Navodilo za uporabo gela MAQS® pravi, da je gel potrebno po sedmih dneh zamenjati za drugega, zato lahko sklepamo, da samo v tem časovnem obdobju zagotavlja dovolj veliko koncentracijo metanojske kisline v panju.

Opisani poskus smo izvedli pri temperaturi 22 °C. Ker pa je izhlapevanje odvisno od temperature, nas je zanimalo tudi, kako ta vpliva na hitrost izhlapevanja metanojske kislina v komercialnem gelu MAQS. Zato smo zgornji poskus ponovili še pri temperaturi 35 °C.

Kot je vidno iz slike 37, izhlapeva metanojska kislina iz komercialnega gela MAQS® pri višji temperaturi hitreje. V prvih sedmih dneh, kolikor je priporočen čas uporabe gela, je izhlapelo pri višji temperaturi tudi po 10 % več metanojske kislino.

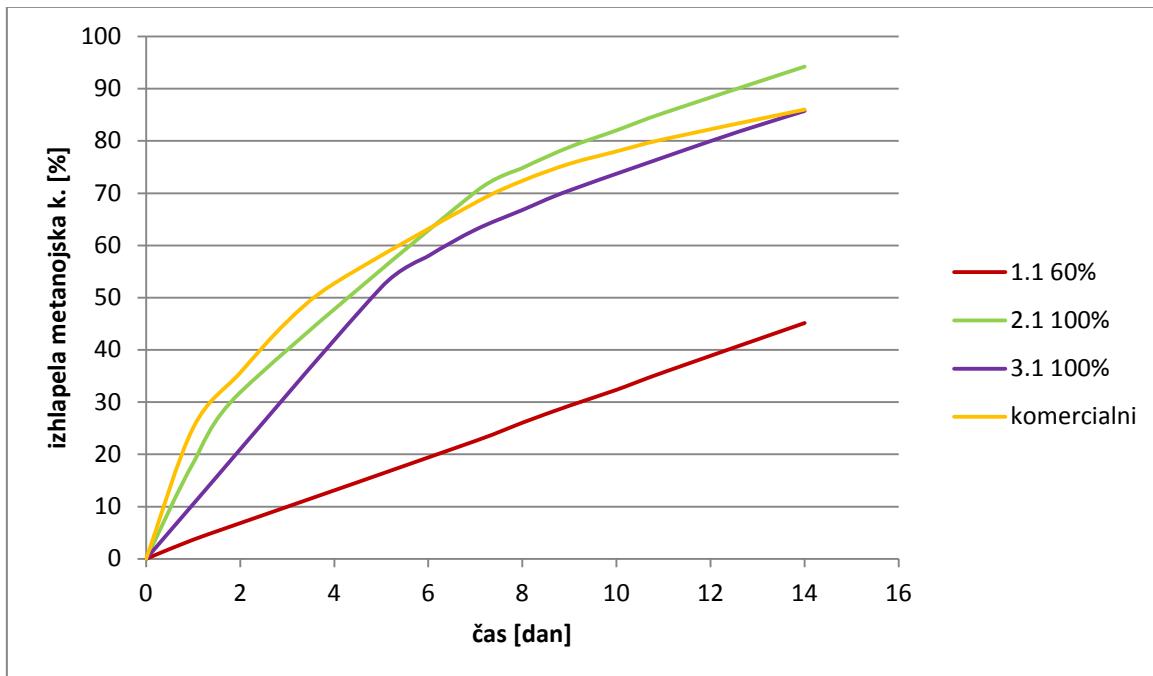


Slika 37: Primerjava izhlapevanja metanojske kislino iz gela MAQS® pri temperaturah 22 °C in 35 °C.

4.7 PRIMERJAVA GELOV

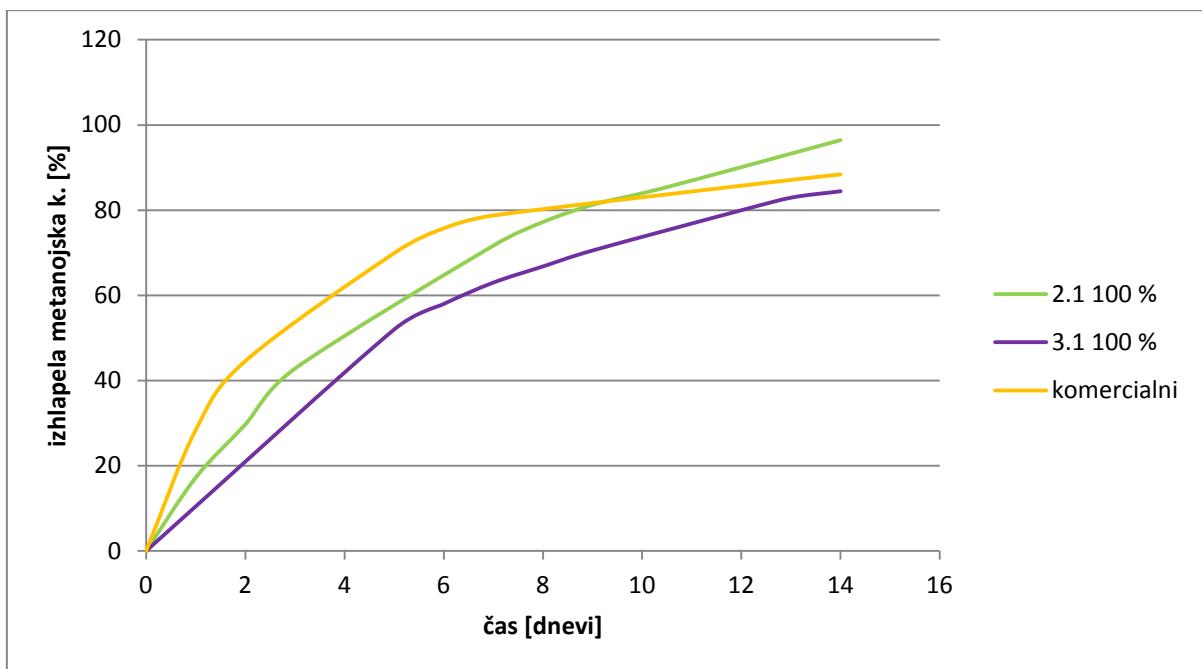
V nadaljevanju smo primerjali komercialni referenčni gel MAQS® z našimi geli, izdelanimi v serijah 1, 2 in 3. Iz slike 38 je razvidno, da najpočasneje, a s konstantno hitrostjo, izhlapeva metanojska kislina iz vzorca 1.1 (gel, izdelan z Aerosilom 200, Carbopolom 940 in 60-odstotno metanojsko kislino, ter bariero filtrom *discus grad*), kar je bilo pričakovano. Izhlapevanje metanojske kislino iz vzorcev 2.1 (v prvih 7 dneh) (gel izdelan z Aerosilom 200, Carbopolom 940 in 100-metanojsko kislino, ter bariero filtrom *discus grad*) in 3.1 (v vseh 14 dneh) (gel, izdelan z Aerosilom in 100-metanojsko kislino, ter bariero filtrom *discus grad*) je počasnejše kot pri komercialnem gelu MAQS®. Tako pri komercialnem gelu

MAQS® v 7 dneh izhlapi 68 % vse kislino, iz vzorca 2.1 70 % in iz vzorca 3.1 66 % celotne metanojske kislino. V primerjavi s komercialnim gelom MAQS® se je vzorec 1.1 odrezal veliko slabše, kljub temu, da je izhlapevanje pri vzorcu 1.1 veliko enakomernejše. Pri 22 °C tako iz komercialnega gela v prvih 7 dneh kislina najhitreje izhlapi, kar bi lahko bilo na račun njegove velike površine.



Slika 38: Primerjava izhlapevanja metanojske kislino iz izbranih gelov serij 1, 2 in 3 z bariero filtra *discus grad* in iz komercialnega gela MAQS® pri 22 °C.

Podobno lahko opazimo tudi, ko primerjamo pokrite gele serij 2 in 3, ki smo jih izdelali s 100-odstotno metanojsko kislino, in komercialni gel pri 35 °C. Iz slike 39 je razvidno, da metanojska kislina najhitreje izhlapeva ravno iz komercialnega gela MAQS®, kot smo to opazili tudi pri nižji temperaturi. Izhlapevanje iz komercialnega gela se je bistveno upočasnilo po sedmem dnevem. Izhlapevanje iz gelov 2.1 (gel izdelan z Aerosilom 200, Carbopolom 940 in 100-metanojsko kislino, ter bariero filtrom *discus grad*) in 3.1 (gel, izdelan z Aerosilom in 100-metanojsko kislino, ter bariero filtrom *discus grad*) je bilo v primerjavi s komercialnim počasnejše. Metanojska kislina je najpočasneje izhlapevala iz vzorca 3.1, najhitreje pa zopet iz komercialnega gela MAQS®.



Slika 39: Primerjava izhlapevanja metanojske kisline iz vzorcev pri 35 °C.

5. ZAKLJUČEK

Cilji naloge so bili izdelati stabilen gel z metanojsko kislino za zatiranje varoje v čebeljih družinah. Gel mora biti enostaven za uporabo, uporaben pri širšem spektru zunanjih vremenskih razmer in biti mora varen za čebele kot tudi za čebelarje. Pri izdelavi smo želeli uporabiti čim manjši delež polimerov in vsaj 60-odstotno metanojsko kislino.

S tem namenom smo izdelali petnajst različnih gelov, pri čemer smo pri devetih uporabili 60-odstotno in pri šestih 100-odstotno metanojsko kislino. Ob izdelavi smo spremljali njihove fizikalne lastnosti, kot sta homogenost in viskoznost, in videz. Po izdelavi smo gele najprej za 24 ur pustili na zraku. Izkazalo se je, da v tem času izhlapi večina kisline, gelom se občutno zmanjša viskoznost oziroma se površina lahko tudi zaskorji. Hlapnost smo poskusili omejiti z uporabo različnih barier, kar se je pri vseh gelih izkazalo za primeren način. Pokrite gele smo spremljali v obdobju 14 dni in ugotavljali delež izhlapele metanojske kisline. Pri tem sta se kot najprimernejša izkazala dva gela, oba izdelana s kombinacijo Aerosila 200 in Carbopola 940: Aerosil 200 v deležu 2,5 %, Carbopol 940 v deležu 5 %, prvi pripravljen s 60-odstotno metanojsko kislino, drugi pa s 100-odstotno metanojsko kislino. Ob izdelavi sta bila oba gela homogena in s primerno konsistenco, kar je izpolnjevalo začetne cilje.

Nadaljnje poskuse smo naredili pri temperaturah 22 °C in 35 °C, da bi ocenili, kako temperatura vpliva na izhlapevanje metanojske kisline, posledično pa tudi na fizikalne lastnosti gelov. Za primerjavo smo uporabili komercialno dostopen gel MAQS®, ki smo ga izpostavili enakim razmeram.

Pri obeh temperaturah se masa najhitreje zmanjšuje komercialnemu gelu MAQS®, sledi mu gel pripravljen iz Aerosila 200, Carbopola 940 in 100-metanojske kisline, ter bariero filtrom *discus grad*, najpočasneje pa metanojska kislina izhlapeva iz gela pripravljenega iz Aerosila 200 in 100-metanojske kisline, ter bariero filtrom *discus grad*. Ugotavljamo, da so se izbrani polimeri izkazali za primerne za izdelavo stabilnih gelov, tako pri uporabi 60- kot tudi 100-odstotne metanojske kisline. Izhlapevanje le-te je bilo v času 14 dni primerno enakomerno, če smo gele prekrili z bariero, ki je hlapenje omejila oziroma kontrolirala. So pa rezultati primerjave s komercialno dostopnim gelom MAQS® pokazali, da so razlike v izhlapevanju očitne vse do 14 dneva.

V primeru interesa v Republiki Sloveniji bi z nadaljnjam razvojem gelov nadaljevali, predvsem z vidika stabilnosti in primerne aplikacijske oblike. Seveda bi temu moral slediti še regulatorni del, ki pa je zahteven, čeprav bi izdelek opredelili kot generični proizvod.

6. LITERATURA

1. Boecking O, Genersh E: Varroosis – the Ongoing Crisis in Bee Keeping. JVL 2008; 3 (2): 221-228.
2. <http://www.czs.si/Files/zatiranje%20varoje.pdf> (8.5.2017)
3. Ostermann DJ.: Currie RW: Effect of Formic Acid Formulations on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies and Influence of Colony and Ambient Conditions on Formic Acid Concentration in the Hive. J. Econ. Entomol. 2004; 97 (5): 1500-8.
4. Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B: Biology and control of Varroa destructor. J Invertebr Pathol 2010; 103 (Suppl 1): S96-119.
5. Kralj J, Fuchs S: Parasitic Varroa destructor mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers. Apidologie 2006; 73 (5): pp.577-87.
6. Elzen PJ, Westervelt D, Lucas R: Formic Acid Treatment for Control of Varroa destructor (Mesostigmata: Varroidae) and Safety to *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Under Southern United States Conditions. J. Econ. Entomol 2004; 97 (5): 1509-12.
7. Calderone NW: Evaluation of Mite-Away-II™ for fall control of Varroa destructor (Acari: Varroidae) in colonies of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the northeastern USA. Exp Appl Acarol 2010; 50 (2): pp 123–32.
8. Calderon RA, van Veen JW, Sommeijer MJ: Reproductive biology of *Varroa destructor* in Africanized honey bees (*Apis mellifera*). Exp Appl Acarol 2010; 50: 281-97.
9. Giovenazzo P, Dubreuil P: Evaluation of spring organic treatments against Varroa destructor (Acari: Varroidae) in honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apidae) colonies in eastern Canada. Exp Appl Acarol 2011; 55(1): 65-76.
10. <http://news.cornell.edu/stories/2015/08/some-honeybee-colonies-adapt-wake-deadly-mites> (13.4.2017)
11. <http://guides.library.harvard.edu/c.php?g=310733&p=2072758> (13.4.2017)
12. Kurzea C, Routtu J, Moritz RFA: Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level. Zoology 2016; 119: 290-7.
13. Xie X, Huang ZY, Zeng Z: Why do Varroa mites prefer nurse bees? Scientific Reports 2016; 6:28228.

14. Anderson DL, Trueman JW: *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp Appl Acarol* 2000; 24(3): 165-89.
15. <http://www.veto-pharma.com/products/varroa-control/about-varroa-mites/> (25.5.2017)
16. Cook DC, Thomas MB, Cunningham SA, Anderson DL, De Barro PJ: Predicting the economic impact of an invasive species on an ecosystem service. *Ecol Appl* 2007; 17(6): 1832-40.
17. vanEngelsdorp D, Underwood RM, Cox-Foster D: Short-Term Fumigation of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies with Formic and Acetic Acids for the Control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *J Econ Entomol* 2008; 101 (2): 256-64 .
18. Giusti M, Sabelli C, Di Donato A, Lamberti D, Paturzo CE, Polignano V: Efficacy and safety of Varterminator, a new formic acid medicine against the Varroa mite. *Journal of Apicultural Research* 2017; 56 (2): 162-7.
19. Wallner K: Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* 1999; 30 (2-3): 235-48.
20. <https://entomology.ca.uky.edu/ef608> (16.1.2017)
21. Satta A, Floris I, Equaras M, Cabras P, Garau VL, Melis M: Formic acid-based treatments for control of *Varroa destructor* in a Mediterranean area. *J Econ Entomol* 2005; 98(2): 267-73.
22. Schmid-Hempel P. 1998. Parasites in Social Insects. Princeton University Press, Princeton, NJ. 410 pp.
23. Gracia MJ, Moreno C, Ferrer M, Sanz A, Peribanez MA, Estrada R: Field efficacy of acaricides against *Varroa destructor*. *PLoS One* 2017; 12(2): e0171633.
24. http://entnemdept.ufl.edu/creatures/misc/bees/varroa_mite.htm (4.2.2017)
25. Islam N, Armjad M, Ehsan-ul-Haq, Stephen E, Naz F: Management of *Varroa destructor* by essential oils and formic acid in *Apis Mellifera* Linn. Colonies. *JEZS* 2016; 4 (6): 97-104.
26. Gregorc A, Alburaki M, Werle C, Knight, PR, Adamczyk. Brood removal or queen caging combined with oxalic acid treatment to control Varroa mites (*Varroa destructor*) in honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Apidologie* 2017.
27. Salima K, Haddad N: Resistance of *Varroa Destructor* to Apistan® an Bayvarol®. *JZR* 2015; 1 (1): 35-42.

28. Maggi MD, Ruffinengo SR; Eguras MJ: Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasite mite Varroa destructor in Argentina. Parasitol Tes 2010; 107(5): 1189-92.