

ZDZISŁAW GLIŃSKI, TADEUSZ WOLSKI\*, MAREK CHMIELEWSKI

## Badania „in vitro” nad aktywnością przeciwgrzybiczą wyciągów z owoców arcydzięgla lekarskiego (*Archangelica officinalis Hoffm.*) w stosunku do *Ascosphaera apis*

Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR,

ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

\* Zakład Farmakognozji Wydziału Farmaceutycznego AM,

ul. Pstrowskiego 12, 20-007 Lublin

Postępujące zanieczyszczenie środowiska, zwłaszcza środkami chemicznymi stosowanymi do zwalczania szkodników upraw i emisjami przemysłowymi, powodują nieodwracalne zmiany w warunkach biocenotycznych, w jakich żyje pszczoła miodna. Zmiana tych warunków wywiera bezpośredni i pośredni wpływ na organizm czerwia i pszczoł zwiększając ich podatność na choroby, w tym na grzybicę otorbielakową wywołaną przez warunkowo chorobotwórczy grzyb *Ascosphaera apis*. Dodatkowym czynnikiem usposabiającym do rozwoju grzybicę otorbielakowej są warunki klimatyczne, szczególnie wilgotna i chłodna pogoda (38), a także stosowanie w celach profilaktycznych i leczniczych niektórych chemioterapeutyków o działaniu przeciwbakteryjnym. Takie działanie wywierają sulfonamidy i antybiotyki z grupy tetracyklin (12, 13, 45), które poprzez wywołanie zaburzeń w składzie ilościowym i jakościowym flory bakteryjnej jelita środkowego czerwia i pszczoł prowadzą do rozwoju dysbakterioz i stymulują namnażanie grzybów. Bezpośrednie uszkodzenia nabłonka jelit przez te substancje stanowią wrota zakażenia dla kielkujących zarodników i rozwijającego się mycelium grzyba, zaś zakłócenie obronnych odczynów komórkowych ułatwia rozwój zakażeń grzybiczych w jamie ciała i atakowanie tkanek owada przez grzybnię.

Specyficzna biologia *A. apis* (wytwarzanie dużych ilości zarodników, obecność owocników i worków stanowiących barierę dla środków odkażających i utrudniających penetrację leków) (22, 34), istnienie w ulu oprócz pierwotnego również wtórnego źródła zakażenia, jakim są zanieczyszczone sporami i mycelium grzyba plastry i wnętrza ula, a także mechaniczne i biologiczne przeniesienia zakażenia przez pszczoły, a być może również przez szkodniki ula, przyczynia się do stacjonarnego występowania choroby i częstych jej nawrotów mimo stosowania chemioterapeutyków, a także do szybkiego szerzenia się grzybicę otorbielakowej w pasiece i między pasiekami (1, 8, 25, 36).

Zwalczanie grzybicę otorbielakowej obejmuje zespół zabiegów hodowlano-sanitarnych, których celem jest likwidacja źródła zakażenia, jakim jest martwy czerw, plastry i wnętrza ula zanieczyszczone sporami grzyba, wzmocnienie

siły rodziny (dodanie czerwia i pszczoł, stymulacja czerwienia) oraz leczenie chorych rodzin przy użyciu preparatów przeciwgrzybowych. Dotychczas pomimo rozległych badań nie wprowadzono do powszechnego stosowania w grzybicę otorbielakowej leków, które cechują się wysoką skutecznością „in vitro” i „in vivo” przy jednocześnie niskiej toksyczności dla czerwia i pszczoł, brakiem działania repelentnego i łatwości stosowania w pasiece. Antybiotyki polienowe z grupy tetraenów, a zwłaszcza sól cholinowa N-glukozylopolifunginy (*Ascocidin*), które działają fungicydnie w stężeniach hamujących wzrost *A. apis*, nie ulegają szybkiej inaktywacji w miodzie i w syropie, są dobrze tolerowane przez czerw i pszczoły w stężeniach działających fungistatycznie i fungicydnie, a przy tym dobrze rozpuszczają się w wodzie, nie zostały dotychczas wprowadzone do zwalczania grzybicę otorbielakowej.

W ostatnich latach obserwuje się w terapii chorób czerwia i pszczoł, podobnie jak w medycynie i w weterynarii, powrót do stosowania leków pochodzenia naturalnego. Leki te o działaniu farmakologicznym porównywalnym z chemioterapeutykami lub niekiedy je przewyższającym, po ewentualnym przedostaniu się do produktów spożywczych jakimi są miód, pyłek i mleczko pszczele, nie wywołują ujemnego wpływu na organizm konsumenta, względnie wpływ ten jest korzystny. Działanie przeciwgrzybowe wykazują wyciągi wielu roślin wyższych (2, 4, 39, 40). Pandey i wsp. (40) wyekstrahowali z liści 25 roślin substancje hamujące wzrost wielu gatunków grzybów patogennych dla ludzi i zwierząt. Działają one grzybobójczo w stężeniach około 100 ppm na grzyby z rodzaju *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Phyalophora* i *Trichophyton*. Działanie przeciwdrobnoustrojowe wykazują między innymi związki kumarynowe, które stanowią grupę substancji bardzo często spotykanych w świecie roślin (6). Podstawowym układem wspólnym związków z tej grupy jest lakton kwasu kumarynowego (kumaryna), furokumaryny i piranokumaryny. Pierwotnym i ważnym źródłem tych związków są rośliny z rodziny *Umbelliferae*, *Rutaceae*, *Compositae*, *Leguminosae*, *Solanaceae*, rzadziej *Gutiferae* i *Ranunculaceae*. Fakt, że liczne połączenia kuma-

rynowe charakteryzujące się działaniem przeciwdrobnoustrojowym znalazły zastosowanie w terapii oraz wykazanie aktywności przeciwgrzybiczej i przeciwbobowej niektórych pochodnych kumaryn (44) przyczynił się do podejmowania badań nad określeniem charakteru chemicznego substancji aktywnych. Wykazano, że największą efektywnością w stosunku do drożdżaków i pleśni cechują się psoralen, imperatoryna i ostrutyna (7, 10, 30, 35).

W pracy: 1) określono aktywność wyciągów z arcydzięgla lekarskiego (*Archangelica officinalis*) w stosunku do szczepów *Ascosphaera apis* wyosobnionych od czerwia zamarłego na grzybicę otorbielakową, 2) porównano aktywność tych wyciągów z działaniem preparatów o znanych wartościach MIC dla *A. apis*, 3) określono toksyczność ekstraktów arcydzięgla dla pszczoł robotnic. Wyniki badań stanowią podstawę do oceny przydatności klinicznej wyciągów arcydzięgla, opracowania formy preparatu i sposobów jego aplikacji.

#### Materiał i metody

**Szczepy.** W badaniach wykorzystano 8 szczepów „płodnych” *Ascosphaera apis*, które wyizolowano ze zmumifikowanego czerwia wykazującego zmiany typowe dla grzybicy otorbielakowej (32). Do izolacji zastosowano podłoże stałe wg Sabourauda (pH 7,2) z dodatkiem 0,25% wyciągu drożdżowego i 125 ug siarczanu gentamycyny/ml, które po posianiu punktowym rozcierem „mumii” inkubowano w 22°C przez 7–8 dni (32). Identyfikację szczepów oparto o właściwości morfologiczno-hodowlane (42), cechy biochemiczne: asymilację salicyny, eskuliny, azotanu amonowego i kwasu glutaminowego, fermentację laktozy i skrobi, rozkład mocznika i arbutyny (3, 41) oraz obecność swoistych dla *A. apis* frakcji antygenowych w wyciągach wodnych grzybni wykazywanych w odczynie immunodiffuzji (5). Inokulum do oznaczania wartości MIC i MFC sporządzano z 7–8 dobowej hodowli grzybów na podłożu stałym Sabourauda (mieszanina zarodników i grzybni) zmywając hodowlę stałą 0,85% NaCl, a następnie wytrząsając otrzymaną zawiesinę z perłkami szklanymi w stosunku 1 część wilgotnej masy na 5 części 0,85% NaCl.

**Wyciągi z arcydzięgla lekarskiego.** Wyciągi otrzymano przez ekstrakcję wyczerpującą 100 g wysuszonych owoców arcydzięgla lekarskiego (*Archangelica officinalis Hoffm.*) eterem naftowym, stosując obieg rozpuszczalnika w układzie zamkniętym przez 8–12 godzin. Roztwór zawierający ciała czynne oziębiono, zateżono i poddano krystalizacji (wyciąg I). Przez rozpuszczenie części ekstraktu I w mieszaninie: eter naftowy — heptan (1:1), wydzielono osad oznaczony jako wyciąg II. W następstwie zateżenia i krystalizacji roztworu, z którego wydzielono ekstrakt II, uzyskano wyciąg III. W badaniach stosowano wysuszone krystaliczne zespoły ciał czynnych z poszczególnych ekstraktów po ich rozpuszczeniu (v/v) w 96% etanolu i stężenia 1 mg/ml (20).

**Referencyjne preparaty przeciwgrzybowe.** Do badań porównawczych użyto soli cholinowej N-glukozylpolifunginy (Ascocidin-Polfa), kwasu sorbowego, nystatyny, amfoterycyny B, gryzeofulwiny, thiabendazolu i kwasu undecylenowego.

**Minimalne stężenie hamujące.** Wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC) określono na podłożu stałym Sabourauda z dodatkiem 0,25% wyciągu drożdżowego (pH 7,2) metodą kolejnych rozcieńczeń (9), stosując jako inokulum 0,1 ml zawiesiny zarod-

ników i fragmentów mycelium badanych szczepów *A. apis* (około  $2,0 \times 10^6$  spor/ml).

Nystatynę, przed dodaniem do podłoża rozpuszczano w 96% etanolu, a następnie rozcieńczano wodą destylowaną, zaś pozostałe preparaty rozcieńczano wodą destylowaną. Stężenie preparatów przeciwgrzybiczych w podłożu wahało się od 0,1 do 500,0 ug ekstraktu lub  $\mu\text{m/ml}$  podłoża wzrostowego. Posiewy inkubowano w 22°C przez okres 7 dni. Za minimalne stężenie hamujące przyjmowano najniższe stężenie badanej substancji, które hamowało wzrost testowanych szczepów grzyba. W tabelach podano wartości średnie.

**Minimalne miano grzybobójcze.** Wartość tego miana (MFC) oznaczono na podłożu płynnym Sabourauda z dodatkiem 0,25% wyciągu drożdżowego metodą kolejnych rozcieńczeń badanych preparatów. Inokulum stanowiła zawiesina zarodników i fragmentów grzybni, zawierająca około  $2 \times 10^6$  spor/ml. Po 8–9 dobowej inkubacji posianego podłoża w 22°C, posiewano 0,05 ml podłoża z serii probówek, w których nie występował wzrost na stałe podłożo Sabourauda. Posiane podłoże stałe inkubowano przez 8–9 dni w 22°C. Za minimalne miano grzybobójcze przyjęto najniższe stężenie środka czynnego w podłożu płynnym z którego posiew na podłożo stałe wypadł negatywnie.

Kontrole w metodach oznaczania wartości MIC i MFC stanowiły podłoża bez dodatku substancji grzybobójczych oraz podłoża, do których dodano trzy najwyższe stężenia użytych rozpuszczalników.

**Toksyczność wyciągów arcydzięgla dla pszczoł.** Wartość  $LD_{50}$  określono na pszczołach lotnych, którym podawano wyciągi arcydzięgla indywidualnie oraz w grupach (rodzinki) liczących po 20 owadów. Indywidualnie podawano jednorazowo 30  $\mu\text{l}$  syropu cukrowego (1:1), zawierającego odpowiednie stężenie badanego preparatu (43). Rodzinki podkarmiano przez 24 godziny i 120 godzin syropem cukrowym (1:1) z dodatkiem badanego preparatu. Stężenie wyciągów arcydzięgla w syropie wynosiło od 0 do 400 ug ekstraktu w 1 ml. Pszczoły przed przystąpieniem do oznaczeń głodzono przez około 9 godzin. W trakcie oznaczeń inkubowano je w ciemności w 30°C przy wilgotności względnej 60%. Wartość  $LD_{50}$  oznaczono wg Lichtfielda i Wilcoxona (33) po 24 godzinach po zaprzestaniu podawania badanych preparatów. Każdy preparat, zarówno w badaniach przeprowadzonych na pszczołach karmionych indywidualnie, jak i w rodzinach stosowano w 11 stężeniach w trzech równoległych powtórzeniach. W wynikach podano wartości  $LD_{50}$  w ug ekstraktu/g masy ciała pszczoły.

**Bioautografia.** W celu dokładniejszej charakterystyki, które z substancji zawartych w wyciągach arcydzięgla hamują wzrost *A. apis*, wyciągi poddano rozdzielowi chromatograficznemu w żelu krzemionkowym (Merck Kieselgel 60) wg metody cienkowarstwowej chromatografii cieczowej. Chromatogramy rozwijano w układzie benzen — octan etylu (85:15 v/v) przez okres 30 minut po naniesieniu pasmowym na linię startu 50,0 ug wyciągu o stężeniu 1 mg/ml na pasmo o szerokości 10 cm. Jako substancje referencyjne zastosowano imperatorynę, bergapten i ksantotoksynę. Rozwinięte płytki po wysuszeniu pokrywano warstwą podłoża wzrostowego wg Sabourauda z dodatkiem 0,25% wyciągu drożdżowego (grubość 1,5–2,0 mm), które posiewano punktowo w odstępach 1,0 cm zawiesiną zarodników *A. apis* ( $10^6$ ). Następnie posiane płytki inkubowano w komorze wilgotnej w 22°C przez 4–5 dni. Zahamowanie wzrostu grzyba następowało na skutek dyfuzji substancji czynnej z żelu krzemionkowego do podłoża wzrostowego. Pozytywnie poszczególnych substancji w rozwiniętym chromatogramie identyfikowano w promieniach UV.

#### Wyniki i omówienie

Zastosowane w badaniach metody ekstrakcji substancji czynnych z owoców arcydzięgla le

Tab. 1. Wartość minimalnego stężenia hamującego (MIC) i minimalnego stężenia grzybobójczego (MFC) wyciągów owoców arcydzięgla lekarskiego i leków przeciwgrzybowych w stosunku do 8 szczepów *Asco-sphaera apis*

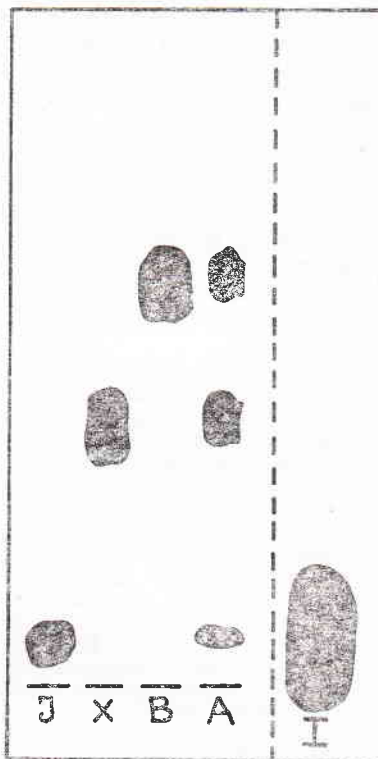
Preparat	Wartość (ug wyciągu/ml)	
	MIC	MFC
Wyciąg I	2,0—2,5	5,0—7,5
Wyciąg II	2,0—2,5	5,0—7,5
Wyciąg III	1,5—2,0	4,0—6,0
Ascocidin	10,0—15,0	10,0—20,0
Amfoterycyna B	25,0—200,0	250,0
Nystatyna	323,0—330,0	350,0
Kwas sorbowy	5,0	—
Gryzeofulwina	20,0—40,0	—
Thiabendazol	50,0	—
Kwas undecylenowy	50,0	—

karskiego umożliwiły uzyskanie w każdym z badanych wyciągów związków o działaniu przeciwgrzybiczym. Wszystkie trzy wyciągi arcydzięgla (I, II i III) cechuje silne działanie hamujące kiełkowanie i wzrost 8 badanych szczepów *A. apis*, przy czym różnice we wrażliwości szczepów na badane wyciągi są niewielkie i wynoszą tylko 0,5 ug/ml (tab. 1). Aktywność substancji czynnych o działaniu przeciwgrzybowym zawartych w badanych wyciągach przewyższa od 2 do ponad 120 razy aktywność pozostałych badanych preparatów grzybobójczych. W przypadku nystatyny wyciągi arcydzięgla były ponad 120 razy aktywniejsze, w przypadku amfoterycyny B od 10 do 40 razy, thiabendazolu i kwasu undecylenowego około 20 razy, askocydyny 4 do 6 razy. Aktywność tych wyciągów była dwukrotnie wyższa w porównaniu do aktywności przeciwgrzybiczej kwasu sorbowego. Ekstrakty arcydzięgla działają grzybobójczo w stężeniu 2—3 krotnie wyższych od stężeń statycznych. Różnice we wrażliwości szczepów na grzybobójcze działanie wyciągów są niewielkie (tab. 1).

Wszystkie trzy badane wyciągi arcydzięgla cechuje wysoka wartość  $LD_{50}$  zarówno po jednorazowym, indywidualnym jak i po 24-godzinym ich stosowaniu w małych rodzinach. Nie wykazano przy tym różnic w wartościach  $LD_{50}$  u pszczół, którym podawano wyciągi arcydzięgla indywidualnie (jednorazowo) a wartościami  $LD_{50}$  u pszczół robotnic, które otrzymywały wyciągi w pokarmie przez okres 24 godzin. Różnice w wartościach  $LD_{50}$  dla poszczególnych preparatów po ich stosowaniu przez 24 godziny są niewielkie i wynoszą od 15 do 20 ug ekstraktu na g masy ciała pszczoły. Przedłużenie czasu podawania z pokarmem (120 godzin) badanych wyciągów powoduje około 2-krotne obniżenie wartości  $LD_{50}$  (tab. 2). Podobnie jak wartości  $LD_{50}$  określone po 24-godzinym stosowaniu wyciągów, jak i wartości uzyskane po 120-godzinym stosowaniu są identyczne dla ekstraktu II

Tab. 2. Średnie wartości  $LD_{50}$  wyciągów arcydzięgla lekarskiego dla lotnych pszczół po stosowaniu preparatów przez 24 godziny i 120 godzin

Preparat	$LD_{50}$ (ug wyciągu/g masy ciała)	
	po 24 godz.	po 120 godz.
Wyciąg I	130,0	60,0
Wyciąg II	125,0	50,0
Wyciąg III	110,0	50,0



Ryc. 1. Schemat bioautografii rozdzielania chromatograficznego wyciągów z owoców arcydzięgla lekarskiego (A) i substancji wzorcowych: imperatoryny (I), bergaptenu (B), ksantotoksyny (X). Ciemne plamy wskazują na zahamowanie wzrostu grzybnicy *A. apis*. I — wyciąg z arcydzięgla lekarskiego nie poddany rozdzielaniu chromatograficznemu

i III, a różnią się nieznacznie od wartości uzyskanych dla wyciągu I.

Analiza bioautograficzna wykazała, że poszczególne substancje czynne zawarte w ekstraktach i rozdzielone chromatograficznie wykazują zróżnicowaną aktywność przeciwgrzybową w stosunku do *A. apis*. Na podstawie wielkości strefy zahamowania wzrostu grzyba można przyjąć, że najaktywniejsze są ekstrakty arcydzięgla, w porównaniu do bergaptenu, imperatoryny i ksantotoksyny (ryc. 1).

Pomimo szerokiego wachlarza leków wykorzystywanych w terapii grzybic ludzi i zwierząt gospodarskich, poszukiwania leku z wyboru w grzybicy otorbielakowej czerwia trwają nadal. Ta sytuacja jest spowodowana nie tylko faktem niewrażliwości *A. apis* na większość anty-

biotyków i chemioterapeutyków aktywnych w stosunku do grzybów patogennych dla człowieka i zwierząt, ale także specyficznymi wymogami, jakie muszą spełniać preparaty stosowane w terapii chorób czerwia i pszczół, w tym zalecane w zwalczaniu grzybicy otorbielakowej. Oprócz hamującego działania w niskich dawkach na kiełkowanie zarodników i wzrost grzybni, powinny one działać niszcząco na grzyba w dawkach nieznacznie wyższych od wartości MIC, nie mogą być toksyczne dla czerwia i pszczół, zaś rozpiętość między dawką terapeutyczną i toksyczną powinna być duża. Ponadto nie mogą one wywierać działania repelentnego przy zalecanych metodach stosowania, ani powodować zanieczyszczenia produktów pszczelich, zwłaszcza miodu przeznaczonego do konsumpcji. Znaczenie posiada też ich dostępność na rynku i łatwość stosowania. Preparaty przeciwgrzybicze powinny łatwo rozpuszczać się w wodzie, względnie w rozpuszczalnikach, z których można sporządzić wodne roztwory akceptowane przez pszczoły. Takie wymagania spełnia dotychczas wyłącznie sól cholinowa N-glukozylolopolifunginy, antybiotyk polienowy z grupy tetraenów, nadal niedostępny na rynku (14, 17, 18, 19). Nystatyna, oprócz dużych rozpiętości w wartościach MIC „*in vitro*” od 72,5—83,0 jμ/ml (16) do 328,0—330,0 jμ/ml (wykazanych w badaniach własnych), cechuje się niską skutecznością terapeutyczną w rodzinach porażonych grzybicą otorbielakową pomimo przeprowadzenia przed leczeniem zabiegów hodowlano-sanitarnych, których celem jest likwidacja pierwotnego i wtórnego źródła zakażenia (16, 24, 29, 48). Amfoterycyna B ze względu na stosunkowo niską „*in vitro*” aktywność przeciwgrzybiczą (25,0—200,0 jμ/ml) i działanie toksyczne (17, 23, 27, 29, 38) oraz mało zachęcające wyniki uzyskane w pasiekach, podobnie jak kwas sorbowy, kwas undecylenowy i thiabendazol (11, 29, 37) nie są zalecane w terapii grzybicy otorbielakowej (15). Także próby podjęte przez Jagielnicką i wsp. (28) leczenia grzybicy otorbielakowej natamycyną (pimafucyna) i aktynomycyną (daktynomycyna) nie dały jednoznacznej odpowiedzi odnośnie przydatności tych pochodzących z importu antybiotyków. Nadzieje, które wiązano z aktydionem (cykloheksymid) (21, 26) zawiodły ze względu na dużą toksyczność tego antybiotyku dla czerwia i pszczół (11) oraz jego działanie repelentne.

Badania nad przeciwgrzybiczym działaniem kumaryn prowadzone na drożdżakach i pleśniakach wykazały dużą aktywność psoralenu, imperatoryny i ostrutyny (7, 10, 30, 35). Imperatoryna występuje w owocach i korzeniach wielu gatunków roślin z rodziny Baldaszkwatych, w dużych ilościach w arcydzięglu lekarskim (31). Wyciągi uzyskane na drodze ekstrakcji owoców arcydzięgla spełniają wymogi odnośnie efektywności „*in vitro*”, braku działania toksycznego i repelentnego roztworów wodnych, cechują się one bowiem bardzo dużą aktyw-

nością w stosunku do szczepów *A. apis*, która przewyższa nawet aktywność soli cholinowej N-glukozylolopolifunginy. Przy tym działają one fungicydnie w stężeniach tylko nieznacznie przewyższających wartości MIC. Ekstrakty arcydzięgla są nietoksyczne dla pszczół nawet po 120-godzinnym podkarmianiu robotnic syropem leczniczym. To działanie grzybobójcze jest związane z obecnością kumaryn, zwłaszcza ksantotoksyny, imperatoryny i bergaptenu (31). Zarówno ksantotoksyna, imperatoryna, jak i bergapten w czystej formie oraz te substancje w badanych wyciągach arcydzięgla wywierają działanie na *A. apis* (ryc. 1). Związki te łącznie z innymi substancjami występującymi w wyciągach owoców arcydzięgla tworzą zespoły cechujące się aktywnością przeciwgrzybową większą, aniżeli wykazują poszczególne ich składowe. Zastosowane w badaniach metody ekstrakcji, mimo użycia różnych rozpuszczalników umożliwiły uzyskanie wyciągów o bardzo złizonej aktywności przeciwgrzybiczej „*in vitro*”. Te zachęcające właściwości ekstraktów arcydzięgla w przypadku *A. apis* stwarzają podstawę do podjęcia badań nad ich przydatnością w terapii grzybicy otorbielakowej czerwia, tym bardziej, że substancje obecne w wyciągach są naturalnymi składnikami roślin, a więc nawet po przedostaniu się do miodu nie będą stanowić żadnego zagrożenia dla konsumentów. Mogą one nawet polepszyć cechy organoleptyczne miodu.

### Wnioski

1. Wyciągi arcydzięgla lekarskiego (*Archangelica officinalis Hoffm.*), uzyskane na drodze wyczerpującej ciągłej ekstrakcji owoców przy użyciu eteru naftowego, cechują się aktywnością przeciwgrzybiczą w stosunku do *A. apis*. W niskich dawkach działają one fungistatycznie, zaś w nieco wyższych dawkach wywierają działanie fungicydne.

2. Praktyczny brak toksyczności wyciągów z owoców arcydzięgla lekarskiego i działania repelentnego przy równocześnie ich dużej aktywności przeciwgrzybiczej, stanowią podstawę do podjęcia badań terenowych nad przydatnością tych wyciągów w terapii grzybicy otorbielakowej czerwia pszczoly miodnej.

### Piśmiennictwo

1. Batra L. R., Batra S. W. T., Bohart G. E.: Mycopath. Mycol. appl. 49, 13, 1973.
2. Bhargava K. S., Dixit S. N., Dubey N. K., Tripathi R. D.: J. Indian bot. Soc. 60, 24, 1981.
3. Burbianka M., Płazka A.: Mikrobiologiczne metody badania produktów żywnościowych, PZW, Warszawa 1977.
4. Chandra H., Asthana A., Tripathi R. D., Dixit S. N.: Phytopath. Mediz. 21, 35, 1982.
5. Chmielewski M.: Annals Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sect. DD, 37, 79, 1982.
6. Cisowski W.: Herba Pol. 29, 301, 1983.
7. Dadak V.: Pharmazie 22, 47, 1967.
8. De Jong D., Morse R. A.: NY Food Life Sci. 9, 12, 1976.
9. Ericsson H. M., Sherris J. C.: Acta pathol. microbiol. scand. Suppl. 217, 1971.
10. Fuer G.: Prog. med. chem. 10, 85, 1974.
11. Giauffret A., Talliercio Y. P.: Bull. Apicole 10, 163, 1967.
12. Gilliam M.: Am. Bee J. 118, 468, 1978.
13. Gilliam M., Prest D. B., Morten H. L.: J. Invertebr. Pathol. 24, 213, 1974.
14. Gliński Z.: Vet. Med., Praga, 31, 442, 1986.

15. Gliński Z., Chmielewski M.: Nowości Wet. 13, 5, 1983.
16. Gliński Z., Ostrowski T.: Annls. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sectio DD. 39, 217, 1984.
17. Gliński Z., Rzedziński J.: Pol. Arch. wet. 22, 303, 1980.
18. Gliński Z., Rzedziński J.: Pol. Arch. wet. 22, 297, 1980.
19. Gliński Z., Rzedziński J.: Pol. Arch. wet. 23, 315, 1980.
20. Głowiatka K., Wolski T., Dragan T.: Sposób wyodrębniania kumaryn z surowców roślinnych, a zwłaszcza z owoców arcydzięgla i oleśnika. UP. PRL, P-266252, 1987.
21. Gochbauer T. A.: The hive and the honey bee. Dadant and Sons, Hamilton, 1963.
22. Gochbauer T. A., Hughes S. J.: Can. Entomol. 108, 985, 1976.
23. Hale P. J., Nenapace D. M.: J. Invertebr. Pathol. 36, 429, 1980.
24. Hartwig A.: Pszczelarstwo 27, 8, 1976.
25. Herbert E. W., Shimanuki H., Knox D.: J. Apicult. Res. 16, 204, 1977.
26. Hitchcock J. D.: Am. Bee J. 112, 300, 1972.
27. Hristea C. L.: Apicultura Romania 26, 24, 1973.
28. Jagielnicka M., Niemczuk R., Sobieszczanska B., Wnuk Z.: Nowości Wet. 11, 83, 1981.
29. Jeliński M.: Pszczelarstwo 26, 6, 1975.
30. Knypl J. S., Szopa J. S.: Nature, Lond. 185, 933, 1960.
31. Kohlmanzer S.: Farmakognozja, PZWL, Warszawa, 1985.
32. Kowalska M.: Badania nad właściwościami biologicznymi i strukturą antygenową *Ascosphaera apis*. Praca dokt. AR, Lublin 1978.
33. Lichtfield J. D., Wilcoxon F.: J. Pharmacol. exp. Ther. 96, 99, 1949.
34. Mathus F., Sarbak I.: Magy Alatorv. Lap. 29, 250, 1974.
35. Meyer F.: Naturf. 7B, 61, 1951.
36. Moeller F. E.: Am. Bee J. 118, 306, 1978.
37. Moeller F. E., Williams P. H.: Am. Bee J. 116, 484, 1976.
38. Olszewski P.: Pszczelarstwo 30, 5, 1979.
39. Pandey D. K., Tripathi N. N., Tripathi R. D., Dixit S. N.: Z. Pfl. Krankh. Pfl. Schutz. 89, 314, 1982.
40. Pandey D. K., Chandra H., Tripathi N. N., Dixit S. N.: Mykosen 26, 565, 1983.
41. Philpot Ch.: Sabouraudia 15, 141, 1977.
42. Prochacki H.: Podstawy mykologii lekarskiej. PZWL, Warszawa 1975.
43. Rinderer T.: J. econ. Entomol. 69, 489, 1976.
44. Shridhar D. R., Vishwakarma L. C., Bhujanga Rao A. K. S.: J. Indian chem. Soc. 56, 48, 1979.
45. Tabarly O.: Bull. Apicole 5, 105, 1962.

Adres autora: prof. dr habil. Zdzisław Gliński, ul. Sowiańskiego 8 m. 36, 20-040 Lublin

Глиньский З., Вольский Т., Хмелевский М. — Исследования „in vitro” противогрибковой активности

вытяжек из плодов дягиля лекарственного (*Archangelica officinalis Hoffm.*) относительно *Ascosphaera apis*

Вытяжки из плодов дягиля лекарственного, полученные путем исчерпывающей экстракции непрерывной петролейным эфиром, тормозят in vitro рост *A. apis* (MIC=1,5—2,5 µg/ml устойчивой среды Сабуро с добавкой 0,25% дрожжевой вытяжки; pH 7,2; 22°C; 8—9 дней). В несколько вышних концентрациях они действуют фунгицидно (MFC=4,0—7,5 µg/ml).

Высокая противогрибковая активность вытяжек из плодов дягиля, практическое отсутствие токсичности для рабочих пчел (LD50 через 24 часа 110—130 µg/t массы тела) является основой для принятия местных исследований их эффективности в семьях, в которых появляется перичесомикоз расплода медоносной пчелы.

Gliński Z., Wolski T., Chmielewski M. — The „in vitro” studies on antifungal action of *Archangelica officinalis Hoffm.* seed extract against *Ascosphaera apis*

The extracts from *Archangelica officinalis* seeds (*Umbelliferae*) prepared by a continuous extraction with petroleum aether inhibit in vitro growth of *Ascosphaera apis*, a causative agent of chalkbrood disease of the honey bee (MIC=1.2—2.5 µg/ml of a solid Sabouraud's medium enriched with 0.25% yeast extract, pH 7.2; 22°C, incubation time 8—9 days). The extracts only at a slight higher concentrations exert fungicidal action (MFC=4.0—7.5 µg/ml of a growth medium).

A high antifungal activity of the extracts, their practical lack of toxic effects on the workers of *A. mellifera* (LD<sub>50</sub> after 24 h of peroral application 110—130 µg/g of bee body weight) point to necessity of field studies on the efficacy of *A. officinalis* seed extracts for the control of chalkbrood disease.

JERZY NIEDZIELSKI, BARBARA BARTNICKA,  
MARIAN JELIŃSKI\*, ANDRZEJ KOWALSKI

## Mały z kwasem mrówkowym — nowy sposób zwalczania warrozy pszczoł

Pracownia Technologii Leków Instytutu Weterynarii, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy  
\* Zakład Badania Chorób Owadów Użytkowych Instytutu Weterynarii,  
ul. Poznańska 35, 63-020 Swarzędz

Próby zastosowania par stężonego kwasu mrówkowego do leczenia warrozy pszczoł prowadzono w RFN już pod koniec lat siedemdziesiątych. Początkowo stosowano 200 ml 98% kwasu mrówkowego w butelkach z tworzywa sztucznego, z szyjką o średnicy 4 cm. Butelkę z kwasem wstawiano do pustej nadstawki nad pszczołami. Latem pozostawiano ją na 80—100 dni. W wyniku tego zginęło ponad 80% roztoczy *V. jacobsoni* (8). Uzyskana skuteczność działania różniła się jednak znacznie. Poszukiwano więc lepszych metod stosowania. Jedną z nich było nasączenie miękkich płyt pilśniowych o powierzchni parowania 700 cm<sup>2</sup> — kwasem mrówkowym; płyty te trzeba było jednak wymieniać co 4—6 dni (6). Później metodę tę ulepszono. Zastosowano miękką płytę pilśniową o grubości 12 mm, którą nasączono 150 cm<sup>3</sup> 98%

kwasu mrówkowego. Następnie zamykano ją w spawanej torebce foliowej. Kwas parował w ulu przez otwory, które wycinano w folii. Całkowita powierzchnia otworów w folii wiosną nie mogła przekraczać 50 cm<sup>2</sup>, a jesienią 65 cm<sup>2</sup>. Po 18 dniach kończono terapię. Zalecano też, aby leczenie rozpoczynać pod koniec września, a kończyć w połowie listopada (7). Obecnie w RFN jest produkowany (zarejestrowany w sierpniu 1985) preparat pod nazwą „Illertisser-Milben-Platte” (IMP). Są to płytki nasączone 14,2 g bezwodnego kwasu mrówkowego. Lek ten stosuje się do zwalczania *Varroa jacobsoni* wykładając 3—4-krotnie co 4 dni, 1—2 płytki na beleczkę górne ramek. Płytki w ulu należy przetrzymywać co najmniej 12 godzin (9). W ZSRR stosowano kwas mrówkowy o stężeniach 86,5—99,7%, w ilości 200 cm<sup>3</sup>, nasączano nim