

# Aktywność przeciwgrzybicza soli cymiazolu przeciwko *Ascosphaera apis*

ANNA CIENIECKA-ROŚŁONKIEWICZ, AGNIESZKA SAS, ALICJA MICHALCZYK,  
WIESŁAW LONDZIN\*, JERZY KAZIMIERCZAK

Instytut Przemysłu Organicznego, ul. Annopol 6, 03-236 Warszawa

\*Instytut Przemysłu Organicznego, Oddział w Pszczynie, ul. Doświadczalna 27, 43-200 Pszczyna

Cieniecka-Rosłonkiewicz A., Sas A., Michalczyk A., Londzin W., Kazimierczak J.

## Antifungal activity of cymiazol salts against *Ascosphaera apis*

### Summary

The activity of the cymiazol salts of oxalic and boric acids against *Ascosphaera apis* fungi was examined. A method of synthesising cymiazol salts was elaborated. The pathogenic fungi were isolated from honeybees infected with chalk brood. Fungistatic and fungicidal properties of the salts were examined in vitro, though their efficacy was tested in vivo in the infected beehives of honeybee colonies. Although cymiazol oxalate showed a slightly higher inhibiting activity than borate (MIC = 0.008 mol/L and 0.012 mol/L, respectively), the latter is a definitely stronger fungicide (MFC > 0.032 mol/L for oxalate, as compared with 0.012-0.014 mol/L for borate). Used separately, none of these active ingredients (boric acid, oxalic acid, cymiazol) was effective as fungicide, exhibiting only fungistatic properties in tested concentrations. High fungicidal efficacy was displayed only by cymiazol borate. Studies on honeybee colonies confirmed the effectiveness of the salts of cymiazol in treating ascospheeriosis. After 12-16 days of administering sugar syrup containing these preparations, either a considerable alleviation of the symptoms or even their complete abatement were observed. In families cured with a mixture of cymiazol oxalate and borate a complete abatement of symptoms was obtained. Cymiazol salts can be a valuable and safe supplement of fungicidal formulations used in apiculture.

**Keywords:** honeybee, *Ascosphaera apis*, ascospheeriosis, cymiazol, addition salts of cymiazol

Grzybica wapienna jest groźną chorobą czerwiu pszczoł wywołaną grzybem *Ascosphaera apis* dziesiątkującą te owady. Bezpośrednim skutkiem porażenia jest zamieranie znacznej części czerwiu, a w konsekwencji osłabienie rodzin i zmniejszenie produktywności pasiecznej, dodatkowo powoduje zwiększenie podatności zachorowania na inne choroby, np. na warrozę, nosemozę i in. Z kolei wymienione choroby ułatwiają zachorowalność na grzybicę. Chorobie sprzyja zły stan higieny ula wywołany np. słabym instynktem czyszczenia ula, warunki klimatyczne, błędy w hodowli np. późne dokarmianie, które powoduje zwiększenie wilgotności gniazda i in. Do zwalczania grzybicy u pszczoł stosowano antybiotyki, takie jak: nystatynę, amfoterycynę B, klotrimazol oraz kwasy organiczne np.: kwas octowy, mrówkowy, sorbowy i cytrynowy (10).

W niniejszych badaniach wykorzystano znany i stosowany w celu zwalczania warrozy cymiazol (2-(2',4'-dimetylofenyloimino)-3-metylotiazolina). Cymiazol uzyskuje się w wyniku syntezy przedstawionej w niemieckich opisach patentowych numer 2619724 i 2531602 (1976) oraz w belgijskim opisie patentowym numer 841504 (1976). Związek ten stosowano dotych-

czas w postaci chlorowodoru, np. w preparacie Apitol firmy Ciba-Geigy. Podawano go w syropie np. w czasie dokarmiania pszczoł w celu zwalczania roztoczy. Stwierdzono jego skuteczność w zwalczaniu kleszczy u bydła domowego (2, 4, 9). Obserwowano również aktywność akarycydową i przeciwgrzybiczą cymiazolu u drobiu (3), stosowanego w magazynach przeciwko *Tyrophagus longior* i *T. putrescentiae* (5).

Kwas borowy najczęściej jest wykorzystywany jako insektycyd do zwalczania karaluchów, mrówek, stonóg i termitów (6, 8, 12) oraz jako środek konserwujący drewno (13). Podobne właściwości wykazuje kwas borowy z dodatkiem fluorku potasu lub chlorku potasu (14). Kwas borowy wykazuje również działanie bakterio- i grzybobójcze. Wykorzystywany jest w terapii zakażeń wywołanych przez *C. albicans* i *C. glabrata* (12).

Kwas szczawiowy wykazuje dobrą skuteczność w zwalczaniu *Varroa destructor*, np. stosowanie 3,5% roztworu kwasu szczawiowego poprzez nakrapianie pszczoł znacznie ogranicza populację tego pasożyta w rodzinach pszczelich (1).

Badania własne prowadzone były nad aktywnością addycyjnych soli cymiazolu z kwasami karboksylowy-

mi i kwasem borowym. Wyniki prac opatentowano – polskie zgłoszenie patentowe nr P-382.341 (7). Badania nad aktywnością soli addycyjnych cymiazolu wobec *Varroa destructor* i wyniki badania toksyczności uzyskanych związków chemicznych wobec pszczoły miodnej przedstawiono we wcześniejszej publikacji autorów (11), w której podano również metody otrzymywania soli. Wielokrotnie obserwowano zanik askoferiozy u pszczół po zastosowaniu wymienionych związków do leczenia warrozy w ulach. Obserwacje te skłoniły autorów do podjęcia badań nad działaniem grzybobójczym addycyjnych soli cymiazolu w stosunku do *A. apis*, wywołującego grzybicę wapienną u pszczół.

Celem badań było określenie aktywności *in vitro* soli cymiazolu w stosunku do grzyba *Ascosphaera apis* oraz skuteczności działania grzybobójczego tych związków w warunkach pasiecznych.

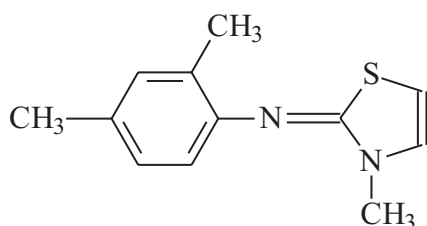
### Materiał i metody

**Przygotowanie substancji do badania.** Cymiazol (ryc. 1) oraz jego sole uzyskano w warunkach laboratoryjnych, w ilości ok. 100 g w Zakładzie Syntezy i Technologii Substancji Aktywnych Instytutu Przemysłu Organicznego. Sposób otrzymywania soli przedstawiono w poprzedniej publikacji (10). Badania biologiczne przeprowadzono dla następujących substancji: cymiazol o czystości 97,2% wg HPLC; szczawian cymiazolu o czystości 95,0% wg HPLC; 10% wodny roztwór kwasu borowego; kwas borowy - POCh czysty; 10% roztwór kwasu borowego w glicerynie; boran cymiazolu: cymiazol (0,05 g), 10% roztwór kwasu borowego w glicerynie (2,5 ml), etanol (2,5 ml); etanol bezwodny, czysty; gliceryna, czysta.

**Badania biologiczne.** Badania skuteczności soli cymiazolu wykonano w Pracowni Stosowania Mikrobiocydów IPO Warszawa (*in vitro*) oraz Pracowni Toksykologii Pszczół IPO Oddział Pszczyna (badania pasieczne).

Badanie aktywności *in vitro* wykonano cylinderkową metodą rozcieńczeń w agarze. Oznaczono minimalne stężenie hamujące wzrost *A. apis* (MIC) oraz minimalne stężenie bójcze (MFC), które ten grzyb zabija. *A. apis* wyizolowano od chorych pszczół.

Podłoże wzrostowe zawierające określone stężenie badanego związku rozlewało do płytek Petriego i po zestaleniu wycinano korkoborem otwory o średnicy 5 mm. Kontrolę stanowiły płytki zawierające samo podłoże lub z dodatkiem rozpuszczalnika użytego do rozpuszczenia związku. Do otworu inkorporowano cylinderek wycięty korkoborem z homogennej kultury grzyba wyhodowanego na płytce Petriego (*inoculum*). Wyniki odczytywano po 6 dniach inkubacji



Ryc. 1. Cymiazol – 2-(2',4'-dimetylofenyloimino)-3-metylotiazolina. Wzór strukturalny

w temperaturze 25°C. Za wartość MIC przyjęto stężenie związku ograniczającego wzrost grzyba do 7 mm, tj. 2 mm poza średnicę inkorporowanego *inoculum*. *Inoculum* grzyba uznane za negatywne (brak wzrostu) w teście MIC inkorporowano do świeżej pożywki bez dodatku badanego związku i inkubowano w temperaturze 25°C przez 6 dni. Jako wartość MFC przyjęto stężenie związku powodujące całkowity brak wzrostu grzyba.

Badania pasieczne zmierzające do określenia efektywności działania badanych związków na *A. apis* przeprowadzono w okresie letnim. Porażenie grzybicą określano przed i po zabiegach leczniczych, licząc na plastrze komórki ze zmumifikowanym czerwiem, a następnie obliczając procentowy udział czerwiu chorego. Badane substancje w formie preparatów eksperymentalnych (roztwór szczawianu cymiazolu, roztwór boranu cymiazolu oraz roztwór mieszaniny szczawianu i boranu cymiazolu w stosunku molowym 1 : 1) przed podaniem do rodzin rozprowadzano w syropie cukrowym (stosunek wagowy cukru do wody 1 : 1) w stężeniu podanym w tab. 3. Do każdej obserwowanej rodziny podawano czterokrotnie, co 3-4 dni po 1 litrze leczniczego syropu. Każdy preparat eksperymentalny oceniano na trzech rodzinach pszczelich. Efekty terapeutyczne obserwowano bezpośrednio po zakończeniu karmienia oraz po kolejnych 12 dniach. W czasie prowadzenia obserwacji z dennic uli, jeśli była taka potrzeba, usuwano zanieczyszczenia i martwy czerw (mumie).

### Wyniki i omówienie

Sole cymiazolu wykazywały znacznie silniejsze działanie przeciwgrzybowe niż sam cymiazol, co ilustrują wielkości stref wzrostu przedstawione w tab. 1 oraz wartości MIC i MFC w tab. 2. Szczawian cymiazolu wykazywał nieco silniejsze działanie grzybosta-

Tab. 1. Wyniki badania *in vitro* aktywności soli cymiazolu przeciwko *A. apis*

Badany związek	Stężenie (mol/l)	Średnica kolonii grzyba w mm
Cymiazol	0,046	10
Cymiazol	0,023	16
Cymiazol	0,012	32
Cymiazol	0,006	50
Cymiazol	0,003	> 60
Szczawian cymiazolu	0,032	5
Szczawian cymiazolu	0,016	5
Szczawian cymiazolu	0,008	6
Szczawian cymiazolu	0,004	25
Szczawian cymiazolu	0,002	> 60
Kwas borowy (woda)	1,6	21
Kwas borowy (gliceryna)	1,6	35
Etanol 96%		35
Gliceryna		> 60
Boran cymiazolu (woda, etanol, gliceryna – 1 : 1 : 1)	0,046	7
Aceton		> 60

tyczne (MIC) niż boran, zaś boran działał zdecydowanie silniej grzybobójczo (MFC). Żaden czynnik aktywny zastosowany pojedynczo (kwas borowy, kwas szczawiowy i cymiazol) nie zabijał grzyba, a jedynie hamował jego wzrost, a więc wykazywał działanie statyczne. Silne działanie grzybobójcze wykazał tylko boran cymiazolu. Stosowane rozpuszczalniki (etanol i gliceryna) nie wpływały hamująco na wzrost *A. apis*, o czym świadczą wielkości stref wzrostu grzyba, uzyskane w obecności rozpuszczalników (tab. 1).

Badane substancje wykazały znaczne zróżnicowanie pod względem toksyczności dla pszczoły miodnej. Najwyższą toksycznością cechował się cymiazol, znacznie mniej toksyczny był szczawian, zaś najmniejszą toksycznością charakteryzował się boran, przy czym różnice te były również zauważalne po uwzględnieniu składu i przeliczeniu dawek preparatów w stosunku do czystego cymiazolu (7, 10). Szczególnie korzystną właściwością boranu cymiazolu jest jego wysoka aktywność przeciwgrzybowa skorelowana z niską toksycznością.

W badaniach pasiecznych preparaty zawierające szczawian cymiazolu i/lub boran cymiazolu podawano pszczołom w syropie cukrowym. Objawy kliniczne grzybicy ustępowały zaraz po zakończeniu podawania preparatów (tab. 3). Bezpośrednio po zakończeniu terapii w części rodzin nie stwierdzono już zmumifikowanego czerwiu, a w pozostałych objawy występowały w znacznie mniejszym nasileniu. W rodzinach traktowanych mieszaniną szczawianu i boranu cymiazolu objawy grzybicy całkowicie ustąpiły. Po upływie 12 dni obserwowano dalszy zanik objawów choroby, zarówno po zastosowaniu preparatu zawierającego szczawian, jak i boran cymiazolu.

### Podsumowanie

Reasumując, szczawian i boran cymiazolu, a zwłaszcza ich mieszanina mogą stanowić cenne uzupełnienie leków stosowanych zarówno przeciw warrozie, jak i przeciw grzybicy pszczoł. Umożliwiają one jednocześnie zwalczanie tych chorób.

### Piśmiennictwo

- Charriere J., Imdorf A., Fluri P.: Neue Empfehlungen zur Oxalsäure-Träufel-methode. Schweizerische Bienen-Zeitung 123, 523-524.
- Durr D.: Thiazolines et produits pesticides qui en contiennent (Ectoparasiticide agent containing thiazoline compounds). Pat. szwajcarski nr 615,086, 1980, CA 92: 175787p.
- Goethe R.: The Argas walkerae infestation of chickens in vivo model for evaluation of the detaching potential of acaricides. Zentbl. Vet. Med. B 1979, 26, 290-303.
- Immler R.: The biological activity of 2-(2',4'-dimethylphenylimino)-3-methyl-4-thiazoline a new acaricide for the control of cattle ticks. Proc. Br. Crop. Prot. Conf-Pests Dis. 1977, 2, 383-396.

Tab. 2. Najmniejsze stężenie hamujące (MIC) i najmniejsze stężenie bójcze (MFC) wobec *A. apis* dla cymiazolu i jego soli, w porównaniu z kwasem szczawiowym i kwasem borowym

Badany związek *	MIC (mol/l)	MFC (mol/l)
Cymiazol (etanol)	0,045	> 0,045
Szczawian cymiazolu (woda)	0,008**	> 0,032**
Boran cymiazolu (woda, etanol, gliceryna – 1 : 1 : 1)	0,012**	0,012**
Boran cymiazolu (woda, etanol – 1 : 1)	0,014**	0,014**
Mieszanina: kwas borowy + kwas szczawiowy (woda)	0,06 + 0,025	> (0,18 + 0,075)
Mieszanina: kwas borowy + kwas szczawiowy (etanol)	0,037 + 0,020	> (0,14 + 0,08)
Mieszanina: szczawian cymiazolu + boran cymiazolu** (woda, gliceryna – 1 : 1)	0,008**	> 0,024**

Objaśnienia: \* – w nawiasach podano rozpuszczalnik; \*\* – stężenie przeliczone na cymiazol

Tab. 3. Efektywność zwalczania *A. apis* w rodzinach pszczelich

Zastosowany preparat (g cymiazolu/litr syropu)*	Nr rodziny	Porażenie czerwiu (%)			Skuteczność terapii (%)	Średnia skuteczność (%)
		przed leczeniem	po terapii	12 dni po terapii		
Boran cymiazolu, 0,344 g/litr	7	1,7	0,0	0,0	100,0	97,9
	12	3,2	0,6	0,2	93,8	
	22	1,1	0,2	0,0	100,0	
Szczawian cymiazolu, 0,212 g/litr	6	1,7	0,4	0,1	94,1	96,3
	9	1,8	0,3	0,1	94,4	
	16	0,8	0,0	0,0	100,0	
Mieszanina szczawianu i boranu cymiazolu, 0,278 g/litr	11	2,7	0,0	0,0	100,0	100,0
	18	2,1	0,0	0,0	100,0	
	27	1,3	0,0	0,0	100,0	

Objaśnienie: \* – stężenia przeliczone na cymiazol

- Ivanish Yu. D.: Sensitivity of Tetrahymena pyriformis to acaricides and chemotherapeutic preparation. Toksikol. Zascito Selskochozajstv. Život. Ektoparazitov 1981, M, 30-33.
- Kamei S.: Poison baits attractants and method of controlling insects pests. Pat. japoński numer 1192301, 1998, CA 130: P292832.
- Kazimierzak J., Londzin W., Golubski Z., Zieniewicz Z., Huras B., Sas A., Cieniacka-Roslonkiewicz A.: Zastosowanie cymiazolu i jego soli do zwalczania grzybów u pszczoł, zgłoszenie pat. polskie nr P-382.341 z dnia 30.04.2007.
- Logach F.: Nouvel insecticide a base d'acide borique. Pat. francuski nr 2491296, 1982, CA 87: P51228r.
- Nepoklonova M. I.: Promising agent for the control of black-legged ticks on cattle. Nauc. Tr. Mosk. Vet. Akad. 1978, 101, 121-124.
- Pohorecka K.: Grzybica wapienna czerwiu. Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, poz. 215 w serii, s. 12.
- Sas A., Londzin W., Chuda-Mickiewicz B., Kazimierzak J., Zieniewicz Z., Golubski Z. E.: Zwalczanie roztoczy Varroa destructor w rodzinach pszczelich. Medycyna Wet. 2008, 64, 945-948.
- Soares M. M. S. R., Cury A. E.: In vitro activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with tinea pedis. Braz. J. Microbiol. 2001, 32, 130-134.
- Tsuchikura K.: Cockroach attracting insecticide. Pat. japoński nr 08133917, 1996, CA 125: P135458a.
- Urabe H.: Mothproof treating agent and mothproof treated wood. Pat. japoński nr 06135812, 1994, CA 121: 76198h.
- Wytwer T.: Saline wood preservative. Pat. niemiecki nr 3210193, 1982, CA 87: P184226k.

Adres autora: dr Jerzy Kazimierzak, ul. Annopol 6, 03-236 Warszawa; e-mail: kazimierzak@ipo.waw.pl