

Dosis Letal Media (DL₅₀) de algunos aceites esenciales y biocidas efectivos para el control de *Ascosphaera apis* en *Apis mellifera* L. Median Lethal Dose (LD₅₀) of some essential oils and biocides effective for the control of *Ascosphaera apis* on *Apis mellifera* L.

Albo, Graciela N: Producción Animal I, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118, (1900) La Plata, Argentina. E-mail: zooamg@agro.unlp.edu.ar | **Henning, Cynthia:** Bioquímica y Fitoquímica, FCAYF. UNLP | **Reynaldi, Francisco J:** CONICET. Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), FCAYF. UNLP | **Ringuelet, Jorge:** Bioquímica y Fitoquímica, FCAYF. UNLP | **Cerimele, Elsa:** Bioquímica y Fitoquímica, FCAYF. UNLP.

RESUMEN

La ascofaeriosis o cría yesificada, es una enfermedad de la abeja melífera (*Apis mellifera* L.) causada por el hongo *Ascosphaera apis* que produce la momificación de las larvas. Los aceites esenciales poseen efectos antimicrobianos y han sido utilizados para el control de cría yesificada. Por otra parte, a nivel mundial se han probado gran cantidad de productos de síntesis, pero ninguno ha resultado 100 % eficaz. El objetivo del presente trabajo fue determinar la Dosis Letal Media (DL₅₀) de algunos aceites esenciales y biocidas para abeja melífera adulta de otoño y primavera, que fueron previamente evaluados *in vitro* para el control de *A. apis*. Las esencias ensayadas fueron: ajedrea, lemongrass, menta, orégano y tomillo; y los biocidas: benomil, carbendazim, cloruro de benzalconio, mancozeb, nistatina y vinclozólín. Se utilizó una técnica previamente descripta, que consiste en administrar el producto formulado a abejas en laboratorio y evaluar la mortalidad a los 24, 48 y 72 h. Se observó mayor mortalidad en los experimentos de otoño. Ajedrea, menta y orégano se presentaron dentro del rango de productos "altamente tóxicos"; la esencia de lemongrass, "levemente tóxico"; y el tomillo, "virtualmente no tóxico". Dentro del grupo de los biocidas, el carbendazim se comportó como "altamente tóxico"; vinclozólín y nistatina, "levemente tóxicos" y cloruro de benzalconio, mancozeb y benomil como productos "virtualmente no tóxicos".

PALABRAS CLAVES: DL₅₀, aceites esenciales, biocidas, *Ascosphaera apis*, *Apis mellifera* L.

ABSTRACT.

Chalkbrood is a disease of the honeybee (*Apis mellifera* L) caused by the fungus *Ascosphaera apis* that transforms larvae into mummies. Essential oils have showed antimicrobial activity and have been used in the control of chalkbrood. Moreover, world-wide, great number of synthesized products have been assayed but no one has resulted 100% effective. The objective of the present study was to determine Median Lethal Dose (LD₅₀) of some essential oils and biocides on adult honeybee in autumn and spring, all previously evaluated *in vitro*, for control of *A. apis*. Essential oils tested were: ajedrea, lemongrass, mint, oregano and thyme; and the biocides: benomyl, carbendazim, benzalkonium chloride, mancozeb, nystatin and vinclozolin. We used a technique previously described consisting in the administration of formulated products to honeybees in laboratory, evaluating mortality after 24, 48 y 72 h. High mortality level was observed in experiments developed in autumn. Ajedrea, mint and oregano essences were considered in the product-ratio as "highly toxic"; lemongrass essential oil, "slightly toxic"; and thyme, "virtually nontoxic." Within the group of biocides, carbendazim behaved as "highly toxic"; vinclozolin and nystatin, "slightly toxic" and benzalkonium chloride, mancozeb and benomyl products as "virtually non-toxic."

KEY WORDS: LD₅₀, essential oils, biocides, *Ascosphaera apis*, *Apis mellifera* L.

INTRODUCCION

La ascosferosis o cría yesificada es una enfermedad fúngica de la abeja melífera (*Apis mellifera* L.) causada por el hongo *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) (Spiltoir and Olive, 1955), que produce la momificación de las larvas. Ingresó en Argentina en 1978 (Rossi *et al.*, 1980) y rápidamente se diseminó por todo el país (Carranza *et al.*, 1994). La infección con cría yesificada ocurre casi exclusivamente cuando las larvas de 4 - 5 días de edad consumen las esporas de *A. apis* que germinan y crecen dentro del lumen intestinal, probablemente activado por el CO₂ de los tejidos y por acción mecánica y enzimática (Theantana & Chantawannakul, 2008). El micelio comienza a crecer, atraviesa la membrana peritrófica, y en la hemolinfa, con mayor tensión de oxígeno, esporula nuevamente. Las pupas muertas en el interior de las celdas operculadas se cubren de un micelio algodonoso blanco, se secan, y finalmente se transforman en momias blancas, o en momias negras si ocurre la reproducción sexual. Los cuerpos de fructificación están conformados por esporocistos globosos, que contienen ascocistos con aproximadamente 10⁸ - 10⁹ ascosporas (Hornitzky, 2001), muchas de las

cuales son removidas de las celdas al exterior de la colmena por las abejas limpiadoras.

Las esporas del hongo se encuentran presentes en la miel y el polen almacenado en la colmena, cuadros, gotas de agua y en el aparato digestivo de las abejas adultas. El proceso de trofalaxia facilita la diseminación de las esporas entre las abejas adultas y la cría (Gilliam & Vanderberg, 1997).

Las larvas de abeja melífera pueden ser alimentadas con esporas de *A. apis* y no desarrollar la enfermedad; deben darse otras condiciones predisponentes como el enfriamiento del nido de cría por debajo de 35 ° C, aumento de la relación cría/abeja adulta por rápida expansión de las colonias en primavera, colmenas incentivadas, producción de núcleos, debilitamiento de las colonias por presencia de varroasis, loque europea y virosis (Borum & Ulgen, 2008). Glinski y Buczek, (2003) citaron, a la inmunidad de la colonia de abejas y el potencial genético de las reinas como otro factor que incide en el desarrollo de la enfermedad. Las características de agregación de las esporas del hongo, las hace muy resistentes y dificulta encontrar un tratamiento eficaz para su control. Cualquier antifúngico utilizado, natural o de síntesis, debe ser consumido por las abejas nodrizas, pasar a la hemolinfa y de allí ser transferido a las larvas a través de su inclusión en la jalea real durante los tres primeros días de vida y en este proceso se pierde gran parte del fármaco incorporado. Asimismo, es suministrado con la papilla de miel y polen en la etapa final de estado larval.

A nivel mundial se han probado gran cantidad de productos de síntesis para el control de cría yesificada *in vitro* (Mourad *et al*, 2005) y a campo (Matašín & Zeba, 2002), pero ninguno ha resultado 100 % eficaz (Craig & Wendy, 2003). Muchos investigadores han sugerido que la aplicación de fungicidas produce pérdidas de abejas después de su aplicación (Fletcher & Barnett, 2003) e incremento de la mortalidad.

Las plantas aromáticas han sido usadas tradicionalmente en medicina natural y su uso se ha extendido a los alimentos, mostrando inhibición de bacterias, hongos y levaduras. El control de parásitos y patógenos de la abeja melífera con sustancias naturales es de fundamental importancia, ya que la miel es el principal producto de la colmena y debe estar libre de cualquier contaminante (Aronstein & Hayes, 2004; Mourad *et al.*, 2005). Los aceites esenciales poseen menos efectos nocivos para el medio ambiente y reciben mejor aceptación por parte del público por ser productos naturales, perfectamente compatibles con la obtención de alimentos orgánicos.

Los aceites esenciales, productos del metabolismo secundario de algunas plantas, están formados por mezclas complejas de mono y sesquiterpenos

principalmente, y constituyen una alternativa para el control de algunas enfermedades. Se ha demostrado que son eficaces para el control de *in vitro* de: *Paenibacillus larvae* (Fuselli *et al*, 2006), *A. apis* (Bailac *et al*, 2007) y *Varroa destructor* (Ruffinengo *et al*, 2007). Otros autores han probado los aceites esenciales en colonias de abejas para el control de la ascosfaeriosis, loque americana (Albo *et al*, 2003) y varroasis (Floris *et al*, 2004). Si bien algunas investigaciones avalan el éxito de su utilización en colmenas para el control de diferentes patologías de la abeja melífera, se presentan algunas dificultades en las colonias de *A. mellifera* L., como el recambio de reinas (Albo *et al*, 2003).

Por otra parte se ha estudiado la toxicidad oral aguda de algunos fungicidas (Ladurner *et al*, 2005) y esencias sobre abeja melífera adulta (Albo *et al*, 2008; ICBB, 1985) y sobre larvas (Reynaldi *et al*, 2005; Pettis *et al*, 2004). Otros investigadores han tratado de estandarizar el efecto de las esencias naturales sobre la abeja melífera.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la DL₅₀ de aceites esenciales y biocidas, previamente evaluados *in vitro*, para el control del hongo *A. apis* en abeja melífera adulta en dos épocas del año: otoño y primavera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron en la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina (Latitud 35° 52' S, Longitud 57° 58' O) en los meses de marzo y septiembre de 2008. Se probaron aceites esenciales y biocidas que resultaron eficaces en ensayos previos, para el control de *A. apis* (Carranza *et al*, 1996).

Los aceites esenciales empleados fueron: lemongrass o pasto limón (*Cymbopogon citratus* D.C. Stapp), Fam. Poaceae; menta (*Mentha piperita* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), ajedrea (*Satureja hortensis* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.), todas ellas de la Fam. Lamiaceae. Los ejemplares de ajedrea provinieron de Calingasta, Provincia de San Juan y las restantes especies de la zona de la Plata.

Los aceites esenciales se extrajeron mediante hidrodestilación, utilizando trampa tipo Clevenger (Real Farmacopea Española, 1997).

Con respecto a los biocidas, se seleccionaron los siguientes productos: benomil (metil 1-butyl-carbamoil-2-bencimidazol carbamato), Benlate (PM al 50 %), Laboratorio Dupont; carbendazim [(2-metoxicarbamoil)-benzimidazol], Chemcarb (LS al 50 %), Laboratorio Chemiplant; cloruro de benzalconio (cloruro de alkyl-dimetil-benzil-amonio), Laboratorio Sigma; nistatina (dihidrato de nistatina 98%) Laboratorio Fluka; mancozeb (etileno bisditiocarbonato de manganeso coordinado con iones de zinc), Dithane M-

80 (PM al 80 %), Laboratorio Basf; y por último vinclozolin [3-(3,5 diclorofenil)-5-etenil-5metil-2-4 oxazolindional], Ronilan (PM al 50 %), Laboratorio Basf.

Los estudios de toxicidad sobre abeja melífera adulta se realizaron utilizando la técnica descrita por Alippi *et al* (1999). Los aceites esenciales se formularon en sacarosa al 50% utilizando como emulsionante 5% de propilenglicol v/v y los biocidas fueron disueltos en una solución de sacarosa al 50% p/v. Se realizaron dos experimentos: uno en otoño y otro en primavera de 2008, con un diseño enteramente al azar de 63 tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento. Las concentraciones fueron expresadas en microgramos de principio activo por abeja ($\mu\text{g p.a./abeja}$). Los tratamientos fueron: T₁ ajedrea 5, 10, 20, 25 y 30 ($\mu\text{g p.a./abeja}$); T₂ lemongrass 2.5, 5, 7.5, 12.5, y 15 ($\mu\text{g p.a./abeja}$); T₃ menta 3.5, 7, 10.5, 14, 21 ($\mu\text{g p.a./abeja}$); T₄ tomillo 3.5, 7, 14, 17.5 y 21 ($\mu\text{g p.a./abeja}$); T₅ orégano 3.5, 7, 10.5, 14, 21 ($\mu\text{g p.a./abeja}$); T₆ benomil 6, 7, 8, 9 y 11 ($\mu\text{g p.a./abeja}$); T₇ mancozeb 2, 3, 5, 6, y 7 ($\mu\text{g p.a./abeja}$); T₈ cloruro de benzalconio 3, 4, 5, 7 y 8 ($\mu\text{g p.a./abeja}$); T₉ carbendazim 1, 2, 3, 4, y 6 ($\mu\text{g p.a./abeja}$); T₁₀ nistatina 3, 4, 5, 6 y 7 ($\mu\text{g p.a./abeja}$); T₁₁ vinclozolin 3, 4, 5, 6 y 7 ($\mu\text{g p.a./abeja}$); T₁₂ testigo (esencias), sacarosa al 50% p/v + propilenglicol al 5% v/v como emulsionante y T₁₃ testigo (biocidas), sacarosa al 50% p/v y dimetoato fue usado como testigo tóxico standard a 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32 y 0.64 ($\mu\text{g p.a./abeja}$) (Gough *et al*, 1994).

Las dosis probadas en estos ensayos de toxicidad fueron seleccionadas de acuerdo con la metodología utilizada por Alippi *et al*, (1999) y se tuvieron en cuenta resultados obtenidos en ensayos *in vitro* realizados anteriormente por los mismos autores (observaciones no publicadas).

La variable de estudio fue el número de abejas muertas/frasco a las 24, 48 y 72 horas, y se expresó como porcentaje de mortalidad. Finalmente las dosis letal media (DL₅₀) fueron calculadas por "PROBIT Analysis" (Collet, 1981) y las correcciones de mortalidad de Abbott, usando el paquete estadístico EPA PROBIT ANALYSIS PROGRAM. Versión 1.5.

RESULTADOS

La DL₅₀ a las 24, 48 y 72 h para el dimetoato fue de 0.27, 0.22 y 0.17 $\mu\text{g p.a./abeja}$ respectivamente, encontrándose dentro del rango esperado para componentes altamente tóxicos (Gough *et al.*, 1994). La DL₅₀ ($p \leq 0.05$) para los aceites esenciales y biocidas a las 24, 48 y 72 h se detallan en las Tablas I y II respectivamente. Los resultados obtenidos presentan mayor mortalidad en los experimentos de otoño respecto de los de primavera, tanto en los aceites esenciales como en los biocidas.

Tabla I. Toxicidad de cinco aceites esenciales sobre abeja adulta de *Apis mellifera*, L. expresados como DL₅₀ ($p \leq 0.05$) a las 24, 48 y 72 h posteriores a su aplicación.

Producto Administrado	DL ₅₀ (µg p.a./abeja) Abejas de otoño			DL ₅₀ (µg p.a./abeja) Abejas de primavera		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
	Ajedrea	0.182	0.140	0.100	0.266	0.200
Lemongrass	61	50	52	Vnt	Vnt	75
Menta	0.130	0.102	0.080	7.890	6.904	6.300
Tomillo	Vnt	Vnt	Vnt	Vnt	Vnt	Vnt
Orégano	0.840	0.735	0.522	3.38	3.10	2.97

Vnt: virtualmente no tóxico ($> 100 \mu\text{g p.a./abeja}$); Lt: levemente tóxico ($10 - 100 \mu\text{g p.a./abeja}$); Mt: moderadamente tóxico ($1 - 10 \mu\text{g p.a./abeja}$); At: altamente tóxico ($< 1 \mu\text{g p.a./abeja}$).

Los valores presentados en esta tabla han sido generados por el paquete estadístico EPA PROBIT, versión 1.5. La clasificación de rangos de toxicidad utilizada en la determinación de DL₅₀, es la propuesta por la International Commission for Bee Botany (ICCB, 1985).

Las esencias de ajedrea y menta aplicadas en otoño y primavera, y orégano en otoño son las esencias que mostraron mayor toxicidad; todas ellas presentaron niveles de DL₅₀ inferiores a $1 \mu\text{g p.a./abeja}$ a las 24, 48 y 72 h (Tabla I) por lo tanto se encuentran dentro del rango de productos "altamente tóxicos" según la International Commission for Bee Botany (ICCB, 1985). Sin embargo en primavera, el orégano se comportó como un producto "moderadamente tóxico" en los tres tiempos de evaluación (Tabla I). El aceite esencial de lemongrass se presentó como una esencia "levemente tóxica" en otoño; en primavera, "virtualmente no tóxica" a las 24 y 48 h y "levemente tóxica" a las 72 h (Tabla I). La DL₅₀ del tomillo en los ensayos de otoño y primavera, para todos los tiempos de observación, fue superior a $100 \mu\text{g p.a./abeja}$, por lo que se consideraría un producto "virtualmente no tóxico" según la ICCB.

El carbendazim se presentó como el biocida de mayor mortalidad en los tratamientos de otoño, después de las 48 y 72 h, correspondiendo a un producto "altamente tóxico". La toxicidad a las 24 h no pudo ser determinada. En primavera tuvo el comportamiento de un producto "virtualmente no tóxico" a las 24 h, pero a las 48 y 72 h pasó a ser un producto "altamente tóxico" (ICCB, 1985), probablemente esto se produzca

por un efecto retardado en el consumo (Tabla II). La nistatina y el vinclozolin fueron productos que se comportaron como "levemente tóxicos" aplicados en otoño, y "virtualmente no tóxicos" en primavera. Los únicos biocidas que se comportaron como "virtualmente no tóxicos" en las dos estaciones fueron el mancozeb, cloruro de benzalconio y benomil (Tabla II).

Tabla II. Toxicidad de seis biocidas sobre *Apis mellifera*, L. expresados como DL₅₀ ($p \leq 0.05$) a las 24, 48 y 72 h posteriores a su aplicación.

Producto Administrado	DL ₅₀ ($\mu\text{g p.a./abeja}$) Abejas de otoño			DL ₅₀ ($\mu\text{g p.a./abeja}$) Abejas de primavera		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
	Mancozeb	Vnt	Vnt	Vnt	Vnt	Vnt
Clor.	Vnt	Vnt	Vnt	Vnt	Vnt	Vnt
Benzalconio						
Carbendazim	N/D	0.025	0.006	113.014	0.394	0.383
Nistatina	17.13	14.39	13.776	Vnt	Vnt	Vnt
	8	6				
Vinclozolin	15.16	14.23	14.04	Vnt	Vnt	Vnt
	9					
Benomil	Vnt	Vnt	Vnt	Vnt	Vnt	Vnt

Vnt: virtualmente no tóxico ($> 100 \mu\text{g p.a./abeja}$); Lt: levemente tóxico ($10 - 100 \mu\text{g p.a./abeja}$); Mt: moderadamente tóxico ($1 - 10 \mu\text{g p.a./abeja}$); At: altamente tóxico ($< 1 \mu\text{g p.a./abeja}$); N/D: no determinado.

Los valores presentados en esta tabla han sido generados por el paquete estadístico EPA PROBIT, versión 1.5. La clasificación de rangos de toxicidad utilizada en la determinación de DL₅₀, es la propuesta por la International Commission for Bee Botany (ICCB, 1985).

DISCUSIÓN

El uso de un producto químico para el control de una enfermedad a largo plazo, es probable que dé lugar al desarrollo de resistencia del patógeno al principio activo. El empleo de un producto natural o de síntesis, que controle la cría yesificada y no produzca residuos, brindaría ventajas a los apicultores. El control eficaz de la ascospaeriosis requerirá, probablemente, una combinación de estrategias (Craig & Wendy, 2003)

Un compuesto utilizado para el control de la cría yesificada debe tener tres características: primero, controlar totalmente la enfermedad o mantenerla por debajo del índice de infección natural (Hornitzky, 2001); segundo, el control debe ser de fácil aplicación, los tratamientos semanales y la limpieza de los pisos de las colmenas, no son medidas prácticas para los apicultores comerciales y tercero, el control debe ser menos costoso que la pérdida natural debido a la enfermedad.

Los estudios de eficacia "*in vitro*" no son suficientes para decidir sobre la utilización de un producto nuevo en la colmena, ya sea de síntesis o natural. Es necesario realizar investigaciones complementarias sobre la toxicidad de esas sustancias en los individuos de la colonia, abejas adultas, larvas y pupas (Albo *et al.*, 2008; Reynaldi *et al.*, 2005). Además se requiere establecer estrategias de manejo, dosis adecuadas y momento oportuno de aplicación del medicamento, que suministre a la colmena tratamientos no tóxicos y que no dejen residuos, ni sabor a la miel.

Los aceites esenciales presentan resultados aceptables en ensayos *in vitro*, sin embargo, muy pocos de ellos han probado su eficacia cuando son aplicados en ensayos de campo (Gende *et al.*, 2008). La variación de las condiciones ambientales y de la colonia, afectan su eficacia y hacen difícil predecir el éxito de muchos tratamientos. Por otra parte se dificulta conseguir esencias estandarizadas. Asimismo reducen el riesgo de la aparición de residuos en la miel. (Lodesani & Costa, 2005).

Los resultados observados en esta investigación, que presentan a la ajedrea como una esencia "altamente tóxica", difieren de los obtenidos por otros autores en estudios de eficacia a campo, donde no observan mortalidad de abejas con la aplicación de *Satureia montana* (Higes *et al.*, 1998). Por otra parte, la toxicidad de la ajedrea fue determinada en el estadio de huevo de la abeja (Reynaldi *et al.*, 2005) que la definió como altamente tóxica. Asimismo, se consideró al tomillo como altamente tóxico y al lemongrass como moderadamente tóxico para larvas. Pohorecka (2004) informó que la aplicación de la esencia de orégano (*Origanum vulgare*) produjo mortalidad mayor al 80% en la abeja melífera. En recientes estudios efectuados para determinar la toxicidad oral aguda en abeja melífera adulta de esencias puras efectivas "*in vitro*" para el control de *P. larvae*, no se pudo determinar la DL₅₀ de las esencias de ajedrea, tomillo, lemongrass y orégano, no obstante, la mayor mortalidad se produjo con dosis bajas, 5 µg p.a./abeja en ajedrea, 3 µg p.a. en orégano, 2 µg p.a. en lemongrass y 8 µg p.a. en tomillo. La reducida mortalidad en dosis altas podría ser debida a la evaporación y baja palatabilidad de la esencia (Albo *et al.*, 2003). Posteriormente, otros experimentos sobre abeja adulta, en los que se utilizó la mezcla de lemongrass - tomillo, se determinaron valores de DL₅₀ de 16.23, 21.51 y 23.55 µg p.a. a las 24, 48 y 72 h respectivamente (Albo *et al.*, 2008), correspondiendo al rango de productos "moderadamente tóxicos" (ICBB, 1985). Otros autores han demostrado la alta toxicidad del componente citral, y de los aceites esenciales de ajedrea y tomillo, en tanto que el lemongrass resultó moderadamente tóxico. Imdorf (1994) evaluó, en jaulas con 100 abejas, la toxicidad de 5-15 µg de timol y 20-60 µg de mentol (componentes de esencias). Ninguno producía pérdida sensible de abejas. Otros investigadores encontraron que el timol (componente de la esencia de *Thymus spp.*), es ampliamente utilizado en apicultura con alta efectividad

para el tratamiento de la varroasis, y bien tolerado por las abejas (Mikijuk, 1983). Este dato es muy importante, debido a la susceptibilidad de las abejas a algunos aceites esenciales (Lindberg *et al*, 2000).

Los biocidas en general, son poco recomendados para el tratamiento de *A. apis*, porque el uso inadecuado puede dejar residuos en los productos de la colmena, principalmente en la miel. Sin embargo los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el benomil, cloruro de benzalconio y mancozeb fueron productos "virtualmente no tóxicos", tanto en los ensayos realizados en otoño y como los de primavera. Ladurner *et al*. (2005) demostró que el benomil administrado en altas dosis no afectó la supervivencia de *A. mellifera*. Otras investigaciones determinaron una alta efectividad *in vitro* sobre larvas, extraídas y colocadas en tubos, tratadas con concentraciones de 0.1; 0, 0.1; 0.005 y 0.001 % de nistatina e incubadas a 30 C° por 3-5 días. Posteriormente se comprobó que la aplicación a campo de 250 ppm de nistanina no resultó tóxica en abejas adultas, larvas y/o reinas, aunque al aumentar las dosis de 500, 1000 y 2000 ppm, se produjo alta mortalidad. Por otro lado, no se encontraron residuos después de 7 - 14 días en la miel de las colmenas tratadas.

El mancozeb no es tóxico para abejas (Riyue Chemical Limited, 2008) El benomil se degrada rápidamente al methyl-2-carbamato de bencimidazol (carbendazim). Se hidroliza en menos de 2 h a un pH 5, 7, y 9. Por otra parte el carbendazim es un fungicida sistémico de amplio espectro, que controla el grupo de los Ascomycetes. Con respecto a su residualidad se degrada en 1-2 meses en medio acuoso aerobio. Residuos de carbendazim y de sus metabolitos se han hallado en el suelo (Anastassiades & Schwack, 1998)

Estos biocidas podrían ser utilizados en otoño, para que el período de carencia sea prolongado. Sin embargo es necesario efectuar estudios complementarios de residualidad en miel y cera.

Estos resultados de toxicidad oral aguda sobre abeja melífera adulta (DL₅₀) de productos con probada eficacia *in vitro*, serían una alternativa al manejo de la ascospaeriosis a campo. La utilización de aceites esenciales sería la opción de primera instancia, ya que no generan residuos en miel; sin embargo, ante brotes de esta micosis, los productos químicos de síntesis deben tenerse en cuenta como otra posible forma de control. Para esto es necesario conocer su eficacia *in vitro*, a campo, la mortalidad en larvas y abejas adultas, y su período de carencia, de forma tal de evitar residuos en miel.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido subsidiada por el Programa de Incentivos a la Investigación. Secretaría de Ciencia y Técnica. Universidad Nacional de la Plata. Pertenece al Proyecto 11 A/176. Argentina (G.N.A)

F.J.R. es investigador de CONICET. Argentina.

Los autores agradecen a la Ing. Agr. Ré M.S. por asistir en la destilación de las esencias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albo G., Henning C., Ringuelet J., Reynaldi F., De Giusti M., Alippi A. Evaluation of some essential oils for the control and prevention of American Foulbrood disease in honey bees. *Apidologie* 2003; 34: 417-27.
2. Albo G. N., Reynaldi F. J., Yordaz M., Henning C. Toxicidad de aceites esenciales con efecto fungistático sobre *Ascosphaera apis* en larvas y adultos de *Apis mellifera*, L. *Veterinaria Cuyana* 2008; 3 (2): 1-7.
3. Alippi A, Albo G, Leniz D, Rivera I, Zanelli ML, Roca A. Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control American Foulbrood of honeybees. *J. Apic. Res.* 1999; 38:149-58.
4. Anastassiades M., Schwack W. Analysis of carbendazim, benomyl, thiophanate methyl and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A.* 1998; 825 (1): 1-106.
5. Aronstein K., Hayes G, Antimicrobial activity of allicin against honeybee pathogens. *J. Apicult. Res.* 2004; 45: 20-24
6. Bailac, P.N, Guzmán M, Ponzi M.I, Gascón A, Eguaras M. Control de *Ascosphaera apis* con aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *Rev. Arg. de Prod. Animal.* 2007; 27(1): 403-4.
7. Borum A.E., Ulgen M. Chalkbrood (*Ascosphaera apis*) infection and fungal agents of honey bees in north-west Turkey. *J. Apicult. Res.* 2008. 47 (2): 170-171.
8. Carranza, M.; G. Albo; O. Larroque, D. Leveratto y G. Marsal. Ensayos preliminares para el control integrado de ascofaeriosis o cría yesificada en la abeja melífera. *IV Congreso Iberoamericano de Apicultura. I Foro Expo-Comercial Internacional.* Córdoba. Argentina.1994;
9. Carranza M, Albo G., Ringuelet J, Cerimele E, Ré M.S, Henning C, Leveratto D. Resultados preliminares de control de cría yesificada con esencias y biocidas. *Actas V Congreso Ibero latinoamericano de Apicultura y II Foro Expocomercial.* Mercedes Uruguay. 1996:155.
10. Collett D. *Modelling binary data, Collet Chapman et Hall, LONDON,* 1981; 369 pp.
11. Craig D, Wendy W. Control of chalkbrood disease with natural products. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. RIRDC Publication Nº 03/107. *RIRDC Project No DAQ-269A.* 2003.
12. Fletcher M, Barnett L. Bee pesticide poisoning incidents in the United Kingdom, *Bull. Insect.* 2003; 56:141-5
13. Floris, I., Satta A., Cabras P., Garau V. L., Angioni, A. Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*

- Anderson & Trueman effectiveness, persistence and residues. *J. Econ. Entomol.* 2004; 97:187-91.
14. Fuselli S.R, García De La Rosa S, Gende L.H, Eguaras M.J, Fritz. R. Inhibición de *Paenibacillus larvae* empleando una mezcla de aceites esenciales y timol. *Revista Argentina de Microbiología* 2006; 38: 89-92.
 15. Gende L. B., Floris R., Fritz R., Eguaras M. J. Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomun zeylanicum*) essential oils and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentine. *Bull. Insectol.* 2008, 61: 1-4.
 16. Gilliam M., Vandenberg J.D. Fungi. In: Morse R., Flottum K. (Eds.). *Honey Bee Pests, Predators and Diseases*. Third Ed.A.I Root, Ohio, OH. 1997. pp.81-110.
 17. Glinski Z.; Buczek K. Response of the Apoidea to fungal infections. *Apiacta* 2003. 38: 183-189.
 18. Gough H.J, Mc Indoe E.C, Lewis G.B. The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera* L.) 1981-1982. *J. Apic. Res.* 1994; 33: 119-25.
 19. Higes Pascual M, Suárez Robles M, Llorente Martínez J, Payá Vicens M^a J, Vicente Montaña A. Eficacia del aceite esencial de ajedrea (*Satureja montana*) en el control de la ascosferosis de la abeja (*Apis mellifera*) en condiciones de campo. *Rev Iberoam Micol* 1998;15: 151-4.
 20. Hornitzky M. Literature review of chalkbrood. A report for the RIRDC. Publication N^o 01/150, Kingston, ACT, AU. 2001.
 21. ICCB (International Commission for Bee Botany). Third symposium on the harmonization of methods for testing the toxicity of pesticides to bees, Rothamsted Experimental Station, England. 1985.
 22. Imdorf, A., S. Bogdanov, V. Kilchenmann, and C. Maquelin. ApilifeVAR –a *Varroa* treatment substance whit thymol as the active ingredient. *Schweizerische Bienen-Zeitung* 1994. 117:326-33.
 23. Ladurner E.L, Bosch J, Kemp W.P, Maini S. Assessing delayed and acute toxicity of five formulated fungicides to *Osmia lignaria* Say and *Apis mellifera*. *Apidologie* 2005; 36: 449-60
 24. Lindberg C., Melathopoulus A., Winston M. Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni*, a honey bee parasite. *J. Econ. Entomol.* 2000; 93: 189-98.
 25. Lodesani, M. and M. Costa. Limits of chemotherapy in beekeeping: development of resistance and the problem of residues. *Bee World*, 2005 85 (4): 102-109.
 26. Matašin Z, Zeba L. Enilconazol tolerance of bee brood, adult bees and queens. *Veterinarski Arhiv.* 2002, 72 (4), 229-34,
 27. Mikityuk V. Efficiency of thymol against *Varroa* disease, *Veterinariya* Moscow, USSR. 1983; 43-4 (in Russian).
 28. Mourad A. K, Zaghloul O. A., El Kady M. B., Nemat F. M., Morsy M. E. A novel approach for the management of the chalkbrood disease

- infesting honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) colonies in Egypt. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 2005; 70 (4): 601-11.
29. Pettis J.S., Kochansky J., Fedlaufer M. F. Larval *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) mortality after topical application of antibiotics and dusts. *Journal of Economic Entomology*, 2004, 97(2):171-76.
30. Pohorecka K. Effect of standardized plant herb extracts on general condition of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Bull Vet Inst Pulawy*, 2004; 48:415-19.
31. Real Farmacopea Española. 1ª Edición. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid. ESPAÑA. 1997. (Suplementos 1998 y 1999) 1527 pp.
32. Reynaldi FJ, Guardia López A, Ré MS, Arturi M y Albo G. N. Efecto tóxico de aceites esenciales usados para el control de la ascospaeriosis sobre huevos en colonias de *Apis mellifera* L. *Congreso de Apicultura del Mercosur. Punta del Este, Uruguay.* 2005
33. Riyue Chemical Limited. Mancozeb 80% Wp-Msds. 2008; <<http://www.riyuegroup.com/English/NewsView.asp?ID=133&SortID=23>>
34. Rossi C, Carranza M. Momificación de larvas (*Apis mellifera* L.) provocada por *Ascospaera apis*. *Revista Facultad de Agronomía, La Plata* 1980; 56 (1-2): 11-5.
35. Ruffinengo S, Maggi M, Faverin C, García De La Rosa SB, Bailac P, Principal J. Essential oils toxicity related to *Varroa destructor* and *Apis mellifera* under laboratory conditions. *Zootecnia Tropical* 2007, 25 (1): 63-9.
36. Spiltoir, C. F, Olive, L. S. A re-classification of the genus *Pericystis* Betts. *Mycologia*, 1955; 47: 238-44.
37. Theantana T, Chantawannakul P. Protease and β -N acetylglucosaminidase of honey bee chalkbrood pathogen *Ascospaera apis*. *J. Apicult. Res.* 47 (1): 68-76. 2008.

REDVET: 2010, Vol. 11 N° 10

Recibido 11.12.09 / Ref. prov. DIC0911B_RED VET / Revisado 21.05.10 / Aceptado 26.08.10
Ref. def. 101008_RED VET / Publicado 01.10.2010

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101010.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101010/101008.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET®
- <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>