

AN EVALUATION OF THE DISINFECTANT VALUE OF „CAGROSEPT“ IN CONTROLLING CHALKBROOD

Krystyna Pohorecka, Piotr Skubida

Research Institute of Pomology and Floriculture, Apiculture Division,
Kazimierska 2, 24-100 Puławy, Poland, e-mail: opisik@man.pulawy

S u m m a r y

„Cagrosept“ is a disinfectant registered for use in the food industry. It is a 70% aqueous solution of ethyl alcohol with an active substance which extends the range and duration of its action. The study was done to assess the potential of the formula as a disinfectant in the controlling chalkbrood disease.

The activity of „Cagrosept“ against ascospaeriosis was determined by measuring the MIC (Minimal Inhibitory Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration) values of the formula. Toxicological tests were also carried out to study the effects of the formula when it came in contact with bees.

The results suggest that the application of „Cagrosept“ as a disinfectant has a positive effect in controlling chalkbrood disease in honey bees.

Keywords: Cagrosept, disinfection, chalkbrood, control.

INTRODUCTION

The efficient control and the prevention of bee diseases are possible only with the intervention of a disinfectant (Wawrzkievicz et al. 1981). Out of many antiseptic preparations, only a few are recommended for use in apiaries (Gliński, Chmielewski 1994). Many of them are already out of date, because they are too toxic or inconvenient in application, it is necessary to introduce new preparations.

„Cagrosept“ is a disinfecting preparation registered for use in the food industry. It is made up as a 70% aqueous solution of ethyl alcohol with the addition of an active substance which extends the range and duration of its action. The formula shows a broad anti-bacterial spectrum against many microbes - the most frequent food contaminants. It is safe and easy to use. The disinfected surfaces do not require washing. It can also be used to disinfect hands as it does not cause irritation.

The information provided by the manufacturer about the properties and the use of „Cagrosept“ together with only a small choice of available agents of this type prompted us to undertake a study to assess the potential of the formula as a disinfectant in controlling chalkbrood.

MATERIAL AND METHODS

To characterize the activity of an antiseptic preparation it is necessary qualify its activity in relation to suitable pathogenic microorganisms (Kędzia 1971, Dobrzański et al. 1980, Krzywicka et al. 1980, Zdrawski et al. 1989). The following investigations have been defined in this work:

1. Microbiological tests aimed at the description of the activity of the disinfecting agent towards fungi responsible for the development of chalkbrood in bee colonies (determination of MIC and MBC values)

Ascophæra apis Nebraska and CBS 53469 (museum cultures) and a strain of *Ascophæra apis*, isolated from diseased brood, were used as check organisms.

The fungistatic (A) and fungicidal (B) properties of the formula were tested using the author's modification of the suspension method. The fungi cultured on modified solid Sabouraud medium were washed with physiological salt and suspensions of *A.apis* spores were prepared. Spores were counted using the haemocytometric method. Standard test suspensions containing 5 million spores in 1 ml were prepared.

A. Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) for test fungi

Preliminary investigations were done using a broad spectrum of concentrations. From the source formula „Cagrosept“ stock solutions were prepared by diluting with hard sterilized water. One ml aliquots of the aqueous stock solutions of the formula were added to test tubes each containing 9 ml of liquid Sabouraud medium. In this manner proper bullion solutions of the formula were prepared with concentrations of 1/10 of those of the stock solutions: 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, and 1% ethyl alcohol solution which contained 0.26%, 0.22% 0.18% 0.14% 0.11% 0.07% 0.03% and 0.01% of the disinfectant, respectively.

One ml of the standard spore suspension was transferred by micropipette to each of the tubes containing the medium and the disinfectant. Subsequently, the contents of all tubes were streaked onto the Petri dishes with solid Sabouraud medium. Each inoculation was replicated three times. The dishes were incubated in an incubator at 32°C for 10 days. Dishes with solid medium inoculated with spore suspension transferred to a pure liquid medium (9 ml liquid medium + 1 ml distilled water) were used as a control.

B. Determination of minimum bactericidal concentration (MBC) as applied to the fungicidal activity of the formula in an aqueous environment against the spores of test fungi

Alcohols do show bactericidal action against vegetative forms but only at higher concentrations or in a static action at lower concentrations. However they do not affect the spores. That is why in the case of „Cagrosept“ the determination of MBC comes down to the determination of the best level of concentration necessary to kill the spores. Never the less, since ethyl alcohol shows fungistatic activity and because at the same time the disinfectant is not water soluble, the elimination of the alcohol action had to be attempted by finding a concentration level of the aqueous ethyl alcohol solution at which it loses its fungistatic properties. To this end, stock aqueous solutions of ethyl alcohol (without the disinfectant) were prepared at concentrations used in part A (from 70% to 5%). Aliquots of 1 ml of the stock solutions were added to test tubes each containing 9 ml of liquid Sabouraud medium. In this manner proper bullion solutions of ethyl alcohol were prepared with concentrations of 1/10 of those of the stock solutions: 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%. To each test tube containing the medium and alcohol, 5 ml of the standard spore suspension was transferred by a micropipette. Subsequently, the contents of all tubes were streaked onto the Petri dishes with solid Sabouraud medium. Each inoculation was replicated 3 times. The dishes were incubated in an incubator at 32°C for 10 days.

Dishes with a solid medium inoculated with spore suspension transferred from a pure liquid medium (9 ml liquid medium + 1 ml distilled water) were used as a control.

The results suggested that a 1% aqueous solutions of ethyl alcohol does not show fungistatic activity towards *Ascophaera apis*.

For further testing 1% aqueous solution of ethyl alcohol containing successively 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02% and 0.01% of the disinfectant were prepared. One ml aliquots of each of the solutions were added to the test tubes. The tubes containing the solutions and standard suspensions of the test spores were placed on a water bath at 20°C. After 15 min. 0.5 ml of the spore suspension was added at 30 sec. intervals to each disinfectant solution. After 5, 10, 15 and 30 mins the tube contents were thoroughly mixed, inoculated onto the Petri dishes with solid Sabouraud medium (with inactivator) and incubated for 14-21 days at 32°C.

2. Toxicological tests - investigations of the effect of „Cagrosept“ in contact with bees

Hybrid bees of Caucassian and Carniolan race were used for laboratory tests. Wooden cages were divided into two groups (5 cages in each group). The cages of group A were sprayed by means of a sprayer with the original „Cagrosept“ formula and care was taken that the agent wet the wall cages thoroughly. The cages of group B were not disinfected - a control group. 24 hrs after the disinfection treatment, the cages of both groups were colonized

with young bees, 100 worker bees in each cage. The bees were fed sugar syrup. The bees were observed for the effect of the formula on their longevity based on the daily mortality rates in the test group and in the control group. The observation lasted 20 days.

RESULTS

1. It was found that the disinfecting formula "Cagrosept" shows fungistatic activity against all tested *A. apis* strains (Tab.1). "Cagrosept" inhibits the growth of the fungus *Ascophaera apis*, spore germination and the growth of mycelium. In the case of „Cagrosept“, the smallest concentration of the formula at which it retains these properties is 2% ethyl alcohol solution containing 0.07% of the disinfectant (minimal inhibitory concentration - MIC).

Based on these experiments it can be stated that the disinfectant formula „Cagrosept“ displays fungicidal activity too. This preparation destroyed spore forms of the all test fungi *A. apis*. The smallest disinfectant concentration (MBC) at which it shows fungicidal activity is at 0.08% when the exposure time of the pathogen is not shorter than 10 mins and at 0.09% when the minimum disinfecting time is 5 mins (Tab.2).

2. In the course of toxicological tests no differences were found in the daily mortality rates of the bees in either disinfected or non-disinfected cages. In both groups the mortality rate was similar: in group A it was 3.2 dead worker bees on average and in group B - 3.0 dead worker bees. After the conclusion of the experiment there were similar numbers of living bees in cages of both groups: 35% of the initial number in group A and 40% in group B. There was also no difference in the death rates between the groups on successive days from the start of the experiment.

Table 1

Fungistatic activity of disinfecting formula „Cagrosept“
Grzybobostacyjne działanie preparatu dezynfekcyjnego „Cagrosept“

Test organism Organizm testowy	Concentration of aqueous alcohol solution (disinfectant concentration) Stężenie wodnego roztworu alkoholu (stężenie składnika dezynfekcyjnego)								Minimal fungistatic concentration (in %) Minimalne stężenie grzybobostacyjne (w %)
	7,0 (0,26)	6,0 (0,22)	5,0 (0,18)	4,0 (0,14)	3,0 (0,11)	2,0 (0,07)	1,0 (0,03)	0,5 (0,01)	
<i>A. apis</i> Nebraska	-	-	-	-	-	-	+	+	2 (0,07)
<i>A. apis</i> CBS	-	-	-	-	-	-	+	+	2 (0,07)
<i>A. apis</i> (pasieka)	-	-	-	-	-	-	+	+	2 (0,07)

(+) - growth of the culture (wzrost hodowli)

(-) - inhibition of the growth of the culture (zahamowanie wzrostu hodowli)

Table 2

Fungicidal activity of the disinfectant dissolved in 1% aqueous ethyl alcohol solution, against the spores of test fungi - Grzybobójcze działanie na zarodniki grzybów testowych składnika dezynfekcyjnego rozpuszczonego w 1% wodnym roztworze alkoholu etylowego

Disinfectant concentration (in %) Stężenie składnika dezynfekcyjnego (w %)	Time of activity (in min.) - Czas działania (w min.)			
	5	10	15	30
0,1	-	-	-	-
0,09	-	-	-	-
0,08	+	-	-	-
0,07	+	+	-	-
0,06	+	+	+	-
0,05	+	+	+	+
0,04	+	+	+	+
0,03	+	+	+	+
0,02	+	+	+	+
0,01	+	+	+	+

(+) - growth of the culture (wzrost hodowli)

(-) - inhibition of the growth culture (zahamowanie wzrostu hodowli)

CONCLUSIONS

1. The formula „Cagrosept“ shows fungistatic and fungicidal activity towards *Ascosphaera apis*.
2. The formula „Cagrosept“ currently available contains ingredients in amounts which largely exceed the required MIC and MBC and thus its efficacy is guaranteed. Disinfecting time should not be shorter than 5 mins.
3. The formula „Cagrosept“ does not show any toxic effect on the worker bees which are in contact with the disinfected surface, after 24 hours.
4. The formula „Cagrosept“ can be used for disinfecting treatments done to control and prevent chalkbrood.

REFERENCES

- Gliński Z., Chmielewski M. (1994)- Patologia i terapia chorób owadów użytkowych. Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Lublin : 50-52
- Dobrzański W.T. (red) (1980)- Zarys mikrobiologii dla farmaceutów . Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, : 433 - 436
- Kędzia W. (1977)- Dezynfekcja w medycynie i farmacji. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich. Warszawa.

- Krzywicka H. (red.) (1981)- Metody badań aktywności bakteriobójczej preparatów dezynfekcyjnych. Wydawnictwo Metodyczne Państwowego Zakładu Higieny, Warszawa
- Wawrzkievicz J.(red.) (1981)- Mikrobiologia weterynaryjna. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa; 314-373
- Zdrawski C., Skwarek P., Pawiak R. (1989)- Mikrobiologiczne metody badania chemicznych środków dezynfekcyjnych przeznaczonych dla celów weterynaryjnych.Zakład Organizacji i Upowszechniania badań Naukowych Państwowego Instytutu Weterynarii, Puławy.

OCENA MOŻLIWOŚCI STOSOWANIA PREPARATU DEZYNFEKCYJNEGO „CAGROSEPT“ W PROFILAKTYCE I TERAPII GRZYBICY WAPIENNEJ CZERWIU

Pohorecka K., Skubida P.

S t r e s z c z e n i e

„Cagrosept“ jest preparatem dezynfekcyjnym dopuszczonym i przeznaczonym do stosowania w przemyśle spożywczym. Sporządzony jest na bazie 70% wodnego roztworu alkoholu etylowego z dodatkiem aktywnego składnika dezynfekcyjnego (skażalnika).

1. Dla scharakteryzowania aktywności środka odkażającego w stosunku do grzybów odpowiedzialnych za rozwój grzybicy wapiennej przeprowadzono mikrobiologiczne badania laboratoryjne mające na celu określenie jego działania grzybobójczego i grzybobójczego. Polegały one na oznaczeniu wartości MIC (Minimal Inhibitory Concentration) i MBC (Minimum Bactericidal Concentration).

W badaniach jako organizmy testowe stosowano *Ascosphaera apis* Nebraska i CBS 53469 (hodowle muzealne) oraz szczep *Ascosphaera apis* wyizolowany z chorego czerwiu.

Badania aktywności grzybobójczej (A) i grzybobójczej (B) preparatu wykonano metodą zawiesinową w modyfikacji własnej.

- A. Badania wstępne wykonano w szerokim zakresie stężeń. Następnie przygotowano bulionowe roztwory preparatu o stężeniach 10-krotnie niższych w porównaniu do roztworów podstawowych : 7%-owy, 6%-owy, 5%-owy, 4%-owy, 3%-owy, 2%-owy, 1%-owy, 0,5%-owy roztwory alkoholu etylowego zawierające odpowiednio 0,26%, 0,22%, 0,18%, 0,14%, 0,11%, 0,07%, 0,03%, 0,01% skażalnika.

Kontrolę stanowiły posiewy na płytki z podłożem stałym wykonane z zawiesiny zarodników przeniesionej do czystego podłoża płynnego.

- B. Alkohole wywierają bakteriobójczy wpływ jedynie na formy wegetatywne (w wyższych stężeniach) bądź statyczne w niższych stężeniach, lecz nie działają na formy przetrwalnikowe. Dlatego w przypadku „Cagroseptu“ oznaczenie wartości MBC odnosiło się do oznaczenia stężenia bójczego drugiego składnika dezynfekcyjnego Cagroseptu (skażalnika). Jednak ze względu na fakt, iż skażalnik nie rozpuszcza się w wodzie, grzybobójcze działanie alkoholu etylowego można było wyeliminować jedynie poprzez poszukiwanie takiego stężenia wodnego roztworu alkoholu etylowego, przy którym traci swe właściwości grzybobójcze .

Na podstawie przeprowadzonych oznaczeń stwierdzono, iż 1% wodny roztwór alkoholu etylowego nie wykazuje działania grzybobójczego w stosunku do *Ascosphaera apis*. W kontroli wzrostu, zamiast środka dezynfekcyjnego, użyto sterylnej wody destylowanej.

2. Badania toksykologiczne wykonano w celu oceny działania kontaktowego preparatu „Cagrosept“ na pszczoły.

Do badań laboratoryjnych użyto pszczoł mieszańców rasy kaukaskiej i kraińskiej.

Drewniane klęczki podzielono na dwie grupy (po 5 klętek w grupie). Klęczki grupy A opryskano za pomocą opryskiwacza oryginalnym preparatem „Cagrosept“, tak aby preparat zwilżył dokładnie ich ściany. Klęczki grupy B nie dezynfekowano - kontrola. Po upływie 24 godzin od zabiegu dezynfekcji klęczki obu grup nasiedlono młodą pszczołą w ilości po 100 robotnic w każdej klęczce. Pszczoły podkarmiano syropem cukrowym. Prowadzono obserwację wpływu preparatu dezynfekcyjnego na długość życia pszczoł robotnic na podstawie oceny dobowej śmiertelności pszczoł w grupie doświadczalnej i kontrolnej. Czas trwania obserwacji wynosił 20 dni.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż preparat dezynfekcyjny „Cagrosept“ wykazuje działanie grzybobójcze - hamuje kiełkowanie zarodników i wzrost formy wegetatywnej, grzybni *Ascosphaera apis*. Najmniejszym stężeniem, przy którym preparat wykazuje te właściwości (MIC) jest 2% wodny roztwór alkoholu etylowego zawierający 0,07% składnika aktywnego (skażalnika).

Cagrosept odznacza się również działaniem grzybobójczym w stosunku do form przetrwalnikowych *A. apis*. Najmniejsze stężenie skażalnika (MBC), przy którym wykazuje działanie grzybobójcze wynosi 0,08% dla czasu ekspozycji na patogena nie krótszym niż 10 minut oraz 0,09% przy minimalnym czasie odkażania wynoszącym 5 minut.

W trakcie przeprowadzonych obserwacji toksykologicznych nie stwierdzono różnic w średniej, dobowej śmiertelności pszczoł i liczbie martwych pszczoł w poszczególnych dobach od rozpoczęcia doświadczenia, w klatkach dezynfekowanych i nie odkażanych.

Na tej podstawie można uznać, iż preparat „Cagrosept“ zastosowany do odkażania powierzchni, z którymi stykają się pszczoły robotnice, po upływie 24 godzin od przeprowadzenia zabiegu nie wykazuje negatywnego działania kontaktowego na te owady.

Na podstawie uzyskanych wyników wydaje się iż preparat „Cagrosept“ może być stosowany do zabiegów dezynfekcyjnych przeprowadzanych przy zwalczaniu i zapobieganiu grzybicy wapiennej czerwiu pszczelego.

Słowa kluczowe: Cagrosept, dezynfekcja, choroby pszczoł, zwalczanie, grzybica wapienna.