

## Toxizität von Thymol, Campher, Menthol und Eucalyptol auf *Varroa jacobsoni* Oud und *Apis mellifera* L im Labortest

A Imdorf, V Kilchenmann, S Bogdanov, B Bachofen, C Beretta

Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Sektion Bienen, CH-3097 Liebefeld, Schweiz

(Eingegangen 15 Juni 1994; angenommen 29 September 1994)

**Zusammenfassung** — Zur Ermittlung der Toxizität von ätherischen Substanzen auf *Varroa jacobsoni* und *Apis mellifera* wurde ein Labortest entwickelt. Dabei wurden gekäfigte Bienen und *Varroa* in Exsikkatoren während 72 Stunden unterschiedlichen Konzentrationen von Thymol, Campher, Menthol und Eucalyptol in der Luft ausgesetzt. Die Konzentrationen, bei denen nahezu 100% der *Varroa* getötet wurden und die Bienen ohne nennenswerte Verluste überlebten, lagen für Thymol zwischen 5 und 15 µg/l, für Campher zwischen 50 und 150 µg/l und für Menthol zwischen 20 und 60 µg/l Luft. Bei Eucalyptol hingegen wurde bei einer *Varroa*-Mortalität von 100% bereits eine Bienenmortalität von 25% festgestellt.

***Apis mellifera* / *Varroa jacobsoni* / Toxizität / ätherische Substanz / chemische Bekämpfung**

### EINLEITUNG

Hoppe (1990) überprüfte 55 verschiedene ätherische Öle auf ihre Toxizität bei *Varroa* und Bienen nach topikaler Applikation und indem die Tiere den Dämpfen dieser Öle ausgesetzt wurden. Dabei zeigten nur Nelken- und das Wintergrünöl sowohl eine gute varroazide Wirkung als auch eine gute Bienenverträglichkeit.

Nach verschiedenen Autoren (Chiesa, 1991, Literaturübersicht) hat Thymol bei geeigneter Anwendung eine gute varroazide Wirkung. Das Produkt 'Apilife VAR', welches neben Thymol (76%) kleinere Men-

gen von Eucalyptol, Campher und Menthol enthält, weist bei der *Varroa*-Bekämpfung im Schweizerkasten mit 97% Behandlungserfolg eine sehr gute Wirksamkeit auf (Rickli *et al*, 1991; Imdorf *et al*, 1994). In verschiedenen Magazinbeuten muss vor allem in Völkern mit zwei Zargen mit einem geringeren Behandlungserfolg gerechnet werden (Van der Steen, 1992; Liebig, 1993; Mutinelli *et al*, 1993; Schulz, 1993; Vorwohl *et al*, 1994). Der geringe Anteil von Campher in diesem Produkt hat keinen Einfluss auf den Behandlungserfolg (Imdorf *et al*, 1994). Inwiefern Eucalyptol und Menthol zur Wirksamkeit beitragen, ist nicht bekannt. Eine zu hohe Thymolkonzentration in der

Stockluft kann zu Brut- und Bienenverlusten führen (Mautz, 1982; Liebig, 1993; Moosbeckhofer, 1993). Menthol reduziert den Befallsgrad von *Acarapis woodi* bei Bienen je nach Dosierung und Anwendungszeitpunkt unterschiedlich stark (Vecchi und Giordani, 1968; Cox *et al*, 1986, 1989; Wilson *et al*, 1990; Duff und Furgula, 1991, 1993; Delaplane, 1992).

Um eine optimale Wirkung bei der Varroabekämpfung erreichen zu können, ist es notwendig, jenen Konzentrationsbereich in der Luft zu kennen, bei dem die *Varroa* getötet, die Bienen jedoch nicht geschädigt werden. In der vorliegenden Studie wurde ein Labortest entwickelt und die Dosis-Wirkungs-Beziehung von 4 ätherischen Substanzen auf *Varroa*-Milben und Bienen ermittelt.

## MATERIAL UND METHODEN

Zwei Liebefelder Käfige mit seitlichen Gitterabdeckungen, welche je *ca* 100 Bienen mit 20 bis 40 *Varroa* enthielten, wurden bei 32°C in einen Exsikkator gestellt. Die Bienen stammten aus brutlosen Völkern mit eingesperrten Königinnen. Sie wurden mit sterilisiertem Zuckerwasser (1:1) gefüttert. Die Exsikkatoren wurden während 72 Stunden mit einem Gemisch aus Frischluft (*ca* 500ml/ min) und mit Thymol, Eucalyptol, Campher oder Menthol angereicherter Luft (5–130 ml/min) versorgt. Die Herstellung der kontaminierten Luft erfolgte, indem frische Luft durch eine Gaswaschflasche (250 ml), welche 20 g des Wirkstoffs enthielt, geleitet wurde. Ein Exsikkator diente bei jedem Versuch als Kontrolle und wurde nur mit Frischluft (*ca* 550 ml/min) beschickt. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde in jedem Exsikkator eine Luftprobe (1–20 l, je nach Wirkstoff und Konzentration) entnommen. Dabei wurde die Luft mit einer Pumpe (je nach Konzentration des Wirkstoffes bis 300 ml/min) durch ein Absorptionsröhrchen (Orbo-101, Supelco) angesogen. Die Wirkstoffe wurden anschließend in Toluol extrahiert und gaschromatographisch analysiert (Imdorf *et al*, 1994). Der Mittelwert der drei Luftproben ergab die durchschnittliche Luftkonzentration pro Exsikkator während der Behandlung. Dieser Wert wurde in den Abbildungen verwendet. Während der Behandlung lag die relative Luftfeuchtigkeit im Exsikkator zwischen 50 und 60%.

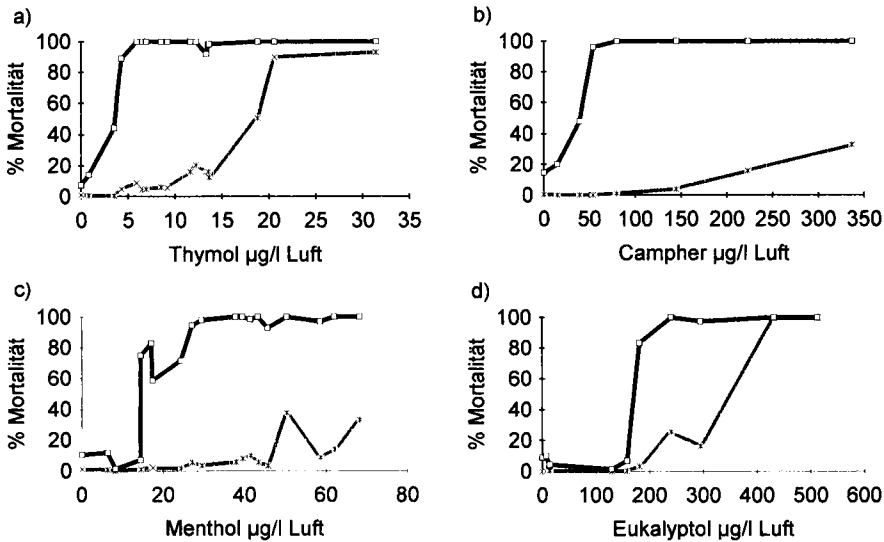
Nach 72 Stunden wurden die getöteten *Varroa* und Bienen ausgezählt. Die überlebenden *Varroa* und Bienen wurden erfasst, indem die lebenden Bienen mit CO<sub>2</sub> betäubt, in Alkohol ausgewaschen und ausgezählt wurden. Die *Varroa*- und Bienenmortalität entspricht dem Anteil der während der Behandlung getöteten Tiere an der Gesamtpopulation pro Exsikkator. Die Tests wurden 1992 und 1993 jeweils zwischen August und Mitte Oktober durchgeführt. Diese Periode wurde gewählt, da solche Substanzen nur zu diesem Zeitpunkt zur Bekämpfung der *Varroa* eingesetzt werden können. Zur Feststellung der Reproduzierbarkeit wurden vergleichbare Thymolkonzentrationen 1992 und 1993 getestet.

Die verwendeten ätherischen Substanzen von der Firma Fluka AG in Buchs waren Thymol (Nr 89330, > 99%), (±)-Campher (Nr 21310, ~ 95%), Menthol (Nr 63670, > 98%) und Eucalyptol (Nr 46090, ~ 99%).

## ERGEBNISSE

Insgesamt wurden 19 Kontrollbehandlungen (nur Frischluft) durchgeführt. Dabei wurde eine Bienenmortalität von 0,9% (SD ± 1,3) und eine *Varroa*-Mortalität von 9,1% (SD ± 6,6) ermittelt.

Bei einer Thymolkonzentration von über 5 µg/l Luft lag die *Varroa*-Mortalität nach 72 Stunden bei 100% (Abb 1a). Die Bienenmortalität stieg bis 15 µg/l nur gering an. Bei höheren Werten nahm sie stark zu. Die vergleichbaren Thymolkonzentrationen, welche 1992 und 1993 getestet wurden, ergaben auch vergleichbare Werte. Sie sind in Abbildung 1a enthalten. Campher wies bereits bei 50 µg/l eine *Varroa*-Mortalität von nahezu 100% auf (Abb 1b). Bis 150 µg/l war die Bienenverträglichkeit sehr gut. Bei Menthol nahm die Mortalität der *Varroa* zwischen 15 und 20 µg/l stark zu (Abb 1c). Ab 30 µg/l erreichte sie in den meisten Tests 100%. Bis zu einer Konzentration von 60 µg/l lag die Bienenmortalität (mit einer Ausnahme) unter 10%. Die *Varroa*-Mortalität stieg bei einer Eukalyptolkonzentrationen von 160 µg/l stark an (Abb 1d). Bei 240 µg/l



**Abb 1.** Mortalitätskurve für *Varroa* (\*) und Bienen (□) nach 72 Stunden Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Thymol (a), Campher (b), Menthol (c) und Eucalyptol (d).

erreichte sie 100%. Gleichzeitig wurde bei dieser Konzentration eine Bienenmortalität von 25% ermittelt.

## DISKUSSION

Neben Thymol, welches sich bereits in Form von 'Apilife VAR' als Wirkstoff zur *Varroa*-Bekämpfung in verschiedenen Kastentypen bewährt hat, scheinen auch Campher und Menthol die dazu nötigen Eigenschaften aufzuweisen. Praxisreife Formulierungen für die letzten beiden Substanzen liegen aber nicht vor. Mit Eucalyptol wurde bei einer *Varroa*-Mortalität von 100% bereits eine Bienenmortalität von 20–30% festgestellt. Deshalb, und wegen der schlecht kontrollierbaren Verdunstung bei Temperaturen um 30°C, eignet sich reines Eucalyptol nicht als *Varroa*-Bekämpfungsmittel. Die bei einer Produktentwicklung zur Bekämpfung der *Varroa* anzustrebenden Konzentrationen in der Stockluft dürfte für Thymol, Cam-

pher und Menthol bei 5–15, 50–150 resp 20–60  $\mu\text{g/l}$  liegen.

Während eines Screenings von ätherischen Ölen auf ihre varroazide Wirkung ermittelte Hoppe (1990) die Bienentoxizität nach 72 Stunden bei kleinen Gruppen von 20 gekäfigten Bienen in einem 3,4 l grossen Glasbehälter. Die Dosierung betrug ca 3  $\mu\text{l}$  ätherisches Öl pro l Luft. Für Thymian, Eukalyptus- und Pfefferminzöl wurde eine Bienentoxizität von 92, 67 resp 48% ermittelt. Diese hohe Bienenmortalität dürfte auf eine Überdosierung zurückzuführen sein. Nach einer Untersuchung von Colin *et al* (1989) streut der Thymolgehalt von Thymianöl je nach Herkunft zwischen 5 und 40%. Somit hätte im Test von Hoppe theoretisch eine Thymolkonzentration von ca 150 bis 1200  $\mu\text{g/l}$  Luft entstehen können. In unserem Test wurde bereits bei 20  $\mu\text{g/l}$  nach der gleichen Behandlungsdauer eine Bienenmortalität von 90% ermittelt.

Während der erfolgreichen Anwendung von 'Apilife VAR' im Schweizerkasten lag

die Thymolkonzentration in der Stockluft im Brutnestbereich zwischen 3,6 und 7,5 µg/l (Imdorf *et al*, 1994). Im Labortest wurden Konzentrationen von 5 bis 15 µg/l als optimal ermittelt. Dies zeigt, dass die Resultate des hier vorgestellten Labortests brauchbare Hinweise für die bei der *Varroa*-Bekämpfung anzustrebenden Konzentrationen von ätherischen Substanzen in der Stockluft geben. Mit Hilfe dieser Methode dürfte es auch möglich sein, die optimale Mentholkonzentration zur Bekämpfung von *Acarapis woodi* zu bestimmen.

**Résumé — Effets toxiques du thymol, du camphre, du menthol et de l'eucalyptol sur *Varroa jacobsoni* Oud et *Apis mellifera* L lors de tests en laboratoire.**

Afin de connaître les effets varroacides et la tolérance de l'abeille aux huiles essentielles (HE), le test en laboratoire suivant a été développé. Deux cages du type de Liebefeld contenant chacune 100 abeilles avec 20 à 40 varroas ont été placées dans un dessiccateur et exposées à un courant d'air chargé en HE. Différentes concentrations ont été produites en mélangeant l'apport d'air frais, environ 500 ml/min, avec des quantités différentes d'air chargé en HE (5 à 130 ml/min, selon la substance testée et la concentration souhaitée) peu avant sa diffusion dans le dessiccateur. Le traitement a été effectué en étuve à une température de 32°C et une humidité relative de 50 à 60%. Après 24, 48 et 72 h, nous avons mesuré la concentration des composés actifs dans les dessiccateurs. À cet effet, ce sont 1 à 20 l d'air qui, selon la substance active et la concentration, ont été aspirés au travers d'un tube d'absorption (Orbo-101, Supelco). La substance active a ensuite été extraite par du toluène et analysée par chromatographie en phase gazeuse. La valeur moyenne des 3 échantillons d'air a donné la concentration moyenne en HE pendant le traitement. L'un des 5 dessiccateurs, alimenté avec de l'air frais non odo-

risé (550 ml/min), a servi de contrôle. Après 72 h, les varroas et les abeilles morts ont été dénombrés. Les abeilles survivantes ont été anesthésiées avec du CO<sub>2</sub>, lavées dans de l'alcool pour faire tomber les varroas restants, puis abeilles et varroas ont été comptés. La mortalité des varroas et des abeilles correspond au pourcentage d'individus tués pendant le traitement par rapport à la population totale. Les concentrations ayant tué près de 100% des varroas sans pour autant affecter les abeilles se situaient pour le thymol entre 5 et 15 µg/l (fig 1a), pour le camphre entre 50 et 150 µg/l (fig 1b) et pour le menthol entre 20 et 60 µg/l d'air (fig 1c). Quant à l'eucalyptol, on a constaté, pour une mortalité de varroas de 100%, une mortalité des abeilles de 25% (fig 1d). Outre le thymol, qui a déjà fait ses preuves sous la forme d'«Apilife VAR» dans différents types de ruches, le camphre et le menthol semblent posséder les caractéristiques d'un varroacide efficace. En revanche, l'eucalyptol (240 µg/l) ne convient pas en raison de son évaporation difficilement contrôlable et de ses effets toxiques affectant non seulement les varroas, mais aussi les abeilles.

***Apis mellifera* / *Varroa jacobsoni* / huile essentielle / toxicité / lutte chimique**

**Summary — Toxic effects of thymol, camphor, menthol and eucalyptol on *Varroa jacobsoni* Oud and *Apis mellifera* L in a laboratory test.**

To study the toxic effects of volatile substances on *Varroa* and bees, the following test was developed. Two cages (Liebefeld type) with each 100 bees and 20 to 40 *Varroa* were placed in a desiccator and exposed to air contaminated with the volatile substances. Different air concentrations were produced by admixing fresh air (500 ml/min) to contaminated air (5–130 ml/min depending on the active compound and the desired concentration). This treatment was performed in an incubator at

a temperature of 32°C and 50 to 60% relative humidity. After 24, 48 and 72 h, the concentrations of the active compounds in the desiccators were measured. Depending on the active compound and the concentration, 1 to 20 l of air were sucked through adsorbent tubes (Orbo-10, Supelco). Thereafter, the active compounds were washed out with toluene and the extract analysed by gas chromatography. The values of the three air samples gave an average air concentration per treatment. One of 5 desiccators received fresh air only (550 ml/min) and served as a control. After 72 h, dead bees and *Varroa* were counted. The living bees were numbed with CO<sub>2</sub>, washed in alcohol to separate remaining *Varroa* from their hosts and the mites and bees counted. *Varroa* and bee mortality was expressed as the percentage of animals found dead during the treatment in the desiccator. The air concentration which killed nearly 100 % of *Varroa* without noticeable loss of bees was found to be between 5 and 15 µg/l for thymol (fig 1a), between 50 and 150 µg/l for camphor (fig 1b) and between 20 and 60 µg/l air for menthol (fig 1c). 240 µg/l eucalyptol produced 100% *Varroa* mortality but also 25% bee mortality (fig 1d). Thymol was found to be efficient as main compound of the varroacid "Apilife VAR" in different types of hives. Camphor and menthol also possess the necessary characteristics of an efficient varroacid. Eucalyptol however, is not very suitable for *Varroa* treatment since its rate of evaporation is difficult to control and only a small difference between its toxicity for *Varroa* and for bees was observed.

### ***Apis mellifera* / *Varroa jacobsoni* / volatile oil / toxicity / chemical control**

## **LITERATUR**

- Chiesa F (1991) Effective control of varroosis using powdered thymol. *Apidologie* 22, 135-145
- Colin M, Ducos de Lahitte J, Larribau, Boué T (1989) Activité des huiles essentielles de Labiées sur *Asco-phaera apis* et traitement d'un rucher. *Apidologie* 20, 221-228
- Cox R, Wilson W, Maki D, Stoner A (1986) Chemical control of the honey bee tracheal mite *Acarapis woodi*. *Am Bee J* 131, 315-317
- Cox R, Moffett J, Wilson W, Ellis M (1989) Effects of late spring and summer treatment on colony strength, honey production and tracheal mite levels. *Am Bee J* 129, 547-549
- Delaplane K (1992) Controlling tracheal mites in colonies of honey bees with vegetable oil and menthol. *J Econ Entomol* 85, 2118-2124
- Duff S, Furgula B (1991) Some effects of menthol on honey bee tracheal mite infestations in nonmigratory honey bee colonies in Minnesota. *Am Bee J* 131, 315-317
- Duff S, Furgula B (1993) Evaluation of Amitraz and menthol as agents to control honey bee tracheal mite infestations in nonmigratory honey bee colonies in Minnesota. *Am Bee J* 133, 127-130
- Hoppe H (1990) Vergleichende Untersuchung zur biotechnischen Bekämpfung der Varroose. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen und Tierhygienisches Institut Freiburg, Deutschland
- Liebig G (1993) Varroabekämpfung mit Apilife-VAR. *Bienenpflege* 9, 247-249
- Mautz D (1982) Untersuchungen zur Bienengefährlichkeit von Thymol. *Apidologie* 13, 103-104
- Moosbeckhofer R (1993) Versuche mit Apilife VAR zur Bekämpfung der *Varroa*-Milbe. *Bienenwelt* 7, 161-166
- Mutinelli F, Irsara A, Cremasco S, Piro R (1993) Utilizzo di Apilife-VAR sul vassoio di fondo per il controllo della varroasi. *Apic Mod* 84, 111-117
- Imdorf A, Kilchenmann V, Maquelin C, Bogdanov S (1994) Optimierung der Anwendung von "Apilife VAR" zur Bekämpfung von *Varroa jacobsoni* Oud in Bienenvölkern. *Apidologie* 25, 49-60
- Rickli M, Imdorf A, Kilchenmann V (1991) *Varroa*-Bekämpfung mit Komponenten von ätherischen Ölen. *Apidologie* 22, 417-421
- Schulz S (1993) Anwendung thymolhaltiger Varroazide bei Magazinvölkern. *Dtsches Bienen J* 8, 18-20
- Van der Steen J (1992) Der Effekt einer Mischung ätherischer Öle auf die *Varroa*-Infektion in Bienenvölkern. *Apidologie* 23, 383-385
- Vecchi M und Giordani G (1968) Chemotherapy of acarine disease. 1. Laboratory test. *J Invertebr Pathol* 10, 390-416
- Vorwohl G, Liebig G, Rüdiger G, Maier M (1994) Bericht der Landesanstalt für Bienenkunde der Universität Hohenheim für das Jahr 1993. *Bienenpflege* 3, 67-82
- Wilson W, Cox R, Moffett J, Ellis M (1990) Improved survival of honey bee colonies from long term suppression of tracheal mites *Acarapis woodi* with menthol. *BeeScience* 1, 48-54