

## MICROORGANISMELE IZOLATE DIN ACARIANUL VARROA DESTRUCTOR ȘI VERIFICAREA PATOGENITĂȚII ACESTORA

J. HRABÁK

Luční 255, 338 28 Radnice, REPUBLICA CEHĂ  
E-mail: hrabakj@seznam.cz

### Rezumat

Cercetarea noastră a fost concentrată pe descoperirea unui acarian *Varroa destructor* cu simptome patologice și pe izolarea de microorganisme provenite din acesta. Acarienii morți au fost adunați de pe plăcile adezive din stupi și au fost examinați cu ajutorul unui stereomicroscop. Acarienii bănuți de a fi murit din cauza unui proces patologic au fost examinați cu metode bacteriologice și micologice. Patogenitatea microorganismelor izolate a fost verificată prin teste descrise în lucrare. În cursul cercetării, au fost găsite femele cu formațiuni negre în zona intestinului, precum și cu o micoză colorată în alb în idiosomă și pe suprafața ei. Bacteriile *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus albus haemolyticus* și ciupercile *Aspergillus flavus*, *Penicillium multicolor* și *P. simplicissimum* au fost izolate din indivizii cu pete negre, iar bacteriile *Enterobacter cloacae* și ciupercile *Mucor ramosissimus*, *M. indicus* și *M. hiemalis*, de la acarienii afectați de micoză. Testele de laborator pentru verificarea patogenității microorganismelor izolate au fost efectuate în cuști de laborator cu câte 40 de albine și 15 femele de *Varroa destructor*. Cuștile de laborator cu albine infestate de *Varroa destructor* au fost pulverizate cu un inocul și cu soluție salină sterilă (în cuștile martor). Experimentele au avut loc la o temperatură de 35°C. Testele de laborator au dovedit doar patogenitatea bacteriei *Enterobacter cloacae*, care a provocat o mortalitate medie a acarienilor de 77,4% în cuștile de laborator. Mortalitatea din cuștile martor a fost, în medie, de 15,9%. Nu a fost dovedită o diferență statistică față de cuștile martor prin testarea altor microorganisme. Acarienii infectați cu *Enterobacter cloacae* au murit prezentând modificări patologice caracteristice ale tubulilor lui Malpighi (observate macroscopic ca o mărire a acestora și a idiosomei), iar membrana dintre scuturile genitale și sternale, ori metapodale, era, de obicei, plesnită. Totuși în testele noastre de laborator n-am observat pete negre.

### Introducere

Cercetările pentru identificarea unor modalități noi de combatere biologică a *Varroa destructor* se pot concentra pe:

1. testarea microorganismelor cu patogenitate demonstrabilă pentru un alt gen de acarieni.
2. Utilizarea acarienilor prădători pentru atacarea celor care-și duc traiul în rezervele de hrană ale coloniilor de albine.
3. Depistarea de acarieni cu simptome infecțioase în colonii.

Ne-am concentrat cercetările pe găsirea de acarieni cu simptome patologice și infecțioase, în gunoiul stupului și din larvele de albine. Oricum, ne-am limitat numai la patogenii bacterieni și fungici.

Microorganismele patologice, descrise la alți acarieni (*Laelapidae*, *Iphipsidae*) și căpușe (*Ixodia*, *Holothyridia*), pot fi testate ca agenți de combatere biologică a varrozei, deoarece aceste organisme sunt înrudite cu acarienii *Varroidae*.

Cercetarea s-a concentrat asupra gazdei obișnuite a acarianului *Varroa jacobsoni*, *Apis cerana*. Cercetările lui ANDERSON și TRUEMAN (ANDERSON et al., 2000) au demonstrat că *Varroa jacobsoni* este o specie diferită de *Varroa destructor*, infestând coloniile de albine melifere (*Apis mellifera*). Acest fapt subliniază necesitatea căutării de patogeni afectând anumite specii de *Varroa*.

Patogenii de perspectivă pentru acarienii *Varroa destructor* pot fi împărțiți în grupuri, potrivit taxonomiei microorganismelor: nematode, protozoare, viruși, rickettsiae și ciuperci. Ne vom referi numai la agenții patogeni cu cel mai important potențial.

**Virusii** pot fi agenți avantajoși, deoarece ei invadează, de obicei, grupurile standard de celule identice, prin infectarea acestora. Acest factor afectează patogenitatea pentru organismul respectiv, astfel încât nu se poate implica patogenitatea *Varroa* pentru albinele melifere. Primul dezavantaj al virusurilor este cultivarea lor dificilă în cantitate mare. Virusii sunt, în majoritate, cultivați *in vivo*.

*Polydnviridae*, *Ascoviridae* și *Baculoviridae* sunt patogeni specifici pentru artropode (CHANDLER et al., 2001). *Baculovirusii* constituie un grup caracteristic pentru combaterea biologică (MARTIGNONI, 1984). Ei infestază intestinul și pătrund prin celulele epiteliale în organism.

Particule asemănătoare virusurilor au fost găsite în corpul gras al acarienilor ce infestau coloniile de *Apis mellifera*, dar testele de transmitere a acestor particule au eșuat. Acarienii cu diagnostic de particule asemănătoare virusurilor prezintă modificări de culoare neagră în țesutul intestinului și în corpul gras (KLEESPIES, 2000).

Un prezumtiv iridovirus a fost izolat din acarienii *Varroa* din colonii de albine melifere din SUA, deși patogenitatea sa față de acarieni nu a fost stabilită (CAMAZINE et al., 1998).

**Rickettsiae** au fost găsite la acarienii și la căpușe în concentrații mari. Ele pot fi primejdioase pentru oameni și pentru alte vertebrate. Alt dezavantaj este producerea lor dificilă în masă, și de aceea ele nu pot fi clasificate ca potențiali agenți patogeni, așa cum este cazul virusilor.

Un organism neidentificat, asemănător cu rickettsia, a fost găsit în rectul acarienilor *Varroa* (LIU et al., 1988). Aceste organisme au fost descoperite în toate stadiile de dezvoltare.

**Bacteriile** intră în categoria agenților patogeni ai insectelor. Familiile caracteristice de entomopatogeni sunt Bacillaceae, Enterobacteriaceae și Streptococcaceae. Efectul patogen al Bacillaceae este creat de obicei de sinteza toxinei care se formează prin sporularea microbilor.

*Bacillus thuringiensis* este utilizat pe scară largă în combaterea biologică. Așa, de exemplu, el este aplicat pentru combaterea lui *Galleria mellonella* L. în apicultură. *B. thuringiensis* ucide adulții și larvele acarienilor tetrancide (HALL et al., 1971), precum și unele specii de *Mesostigmata* și *Prostigmata* (CHANDLER et al., 2001).

Tulpini de *Bacillus thuringiensis* au fost izolate din intestinul lui *V. destructor*, dar patogenitatea lor nu este cunoscută (GLIŃSKI et al., 1990).

Totuși, bacteriile nu sunt patogeni caracteristici ai acarienilor, iar cultivarea lor are loc, de obicei, între 30-35°C, ceea ce este caracteristic pentru puietul albinelor. Umiditatea din coloniile de albine este, de asemenea, adecvată dezvoltării bacteriilor.

**Ciupercile** sunt descrise ca unul dintre primii agenți patogeni ai artropodelor în istorie. Temperatura optimă este situată la peste 25°C (BIRCHER et al., 1990). Ele se pot dovedi utile pentru aplicarea în coloniile de albine tocmai în timpul iernii. Numai un mic număr de specii dispun de o temperatură optimă de dezvoltare de peste 35°C, dar există o atenție reală față de patogenitatea lor pentru oameni, ca de exemplu *Aspergillus*.

Mortalitatea din cauza infecțiilor fungice este provocată de distrugerea mecanică a țesuturilor, eliminarea apei și activitatea micotoxinelor (BIRCHER et al., 1990).

Ciupercile *Beauveria bassiana* au fost utilizate ca micopesticide pentru combaterea a peste 700 specii de artropode (GOETTEL et al., 1992). O altă ciupercă patogenă importantă pentru insecte este *Metarhizium anisopliae*, ca și alte specii din genul *Metarhizium*. Ele au o temperatură de dezvoltare maximă de 38°C.

Avantajul utilizării ciupercilor în combaterea biologică este cultivarea lor ușoară în cantități masive. Totuși, *B. bassiana*, *M. anisopliae* pot declanșa infecții în condiții de laborator, dar infectarea albinei nu a fost, încă, descrisă (CHANDLER et al., 2001; WEISER, 1966).

*Hirsutella thompsonii* și *Metarhizium anisopliae* au fost evaluate în laborator și în stupii de observație, iar rezultatele au fost semnificativ pozitive (KANGA et al., 2002).

**Parazitoizii.** Utilizarea acarienilor prădători depinde de umiditatea și temperatura mediului înconjurător. Ei infestază adulții, diferitele stadii de dezvoltare și ouăle. Utilizarea prădătorilor implică un mare risc potențial pentru ouăle albinelor, deoarece aceștia le consumă cu predilecție.

## **Materiale și metode**

### **Identificarea agenților patogeni**

#### *Colectarea acarienilor*

Acarienii *Varroa destructor* au fost colectați din 1999, din stupinele aflate la Radnice (Boemia de vest). Coloniile (*Apis mellifica* L.) din stupine erau echipate cu plăci de fund, prevăzute cu tifon (Mesh ø 10 mm) și acoperite cu un alt tifon (Mesh ø 3 mm) (Figura 1).

Femelele moarte au rămas lipite pe plăcile de fund, fără să fie înlăturate de albine. Coloniile au fost observate de aproape, iar acarienii morți examinați la stereomicroscop. Modificările patologice s-au exprimat la acarienii printr-o culoare închisă evidentă sau prin creșterea de ciuperci pe suprafața lor.

#### *Izolarea*

Femelele moarte de *Varroa destructor*, bănuite că moartea li s-a datorat unui proces patologic, au fost tratate pe suprafața corpului cu alcool etilic (70%) și, ulterior, secționare în două. O parte a fost introdusă în 1 ml de soluție salină, iar cealaltă într-o eprubetă la o temperatură de 4°C pentru examinări ulterioare. Partea de acarian ținută în soluție salină a fost incubată timp de 2 ore la o temperatură de 36°C, după care fluidul a fost inoculat pe o placă Petri și incubat la temperatura de 36°C.

Pentru cultura bacteriană, a fost utilizat agar Columbia cu 5% SB, iar pentru ciuperci – agar Sabouraud de dextroză.

## Partea experimentală

### Infecții experimentale

Inoculul, conținând  $1 \times 10^7$  celule în  $1 \text{ mm}^3$  de soluție salină, a fost pulverizat cu 5% glucoză pe albinele infestate cu acarieni *Varroa destructor* din cuștile de laborator (Fig. 1). Partea de sus a cuștilor de laborator era făcută din tifon (Mesh  $\varnothing$  0,5 mm), iar partea inferioară era un fund de sticlă. 40 de albine și 15 acarieni au fost introduși în fiecare cușcă de laborator. Albinele cu acarieni din cuștile de laborator au fost pulverizate cu o soluție salină liberă de bacterii, care conținea și 5% glucoză.

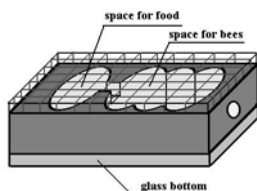


Figura 1 - Cușcă de laborator (schiță schematică)  
De sus în jos: spațiu pentru hrană, spațiu pentru albine, fund de sticlă

### Izolarea

Acarienii morți au fost scoși din cușca de laborator și suprafața lor a fost dezinfectată la fel ca la acarienii proveniți din căderea spontană. Apoi s-a efectuat puncția idiosomei, iar fluidul obținut a fost cultivat și examinat la microscop.

### Rezultate

În deșeuri au fost găsiți acarieni cu pete negre patologice pe intestine (Figura 2). Complexul diverticuliilor intestinale distale și laterali era umplut cu o substanță omogenă dură, de culoare neagră. Această substanță a fost cultivată conform metodelor descrise.

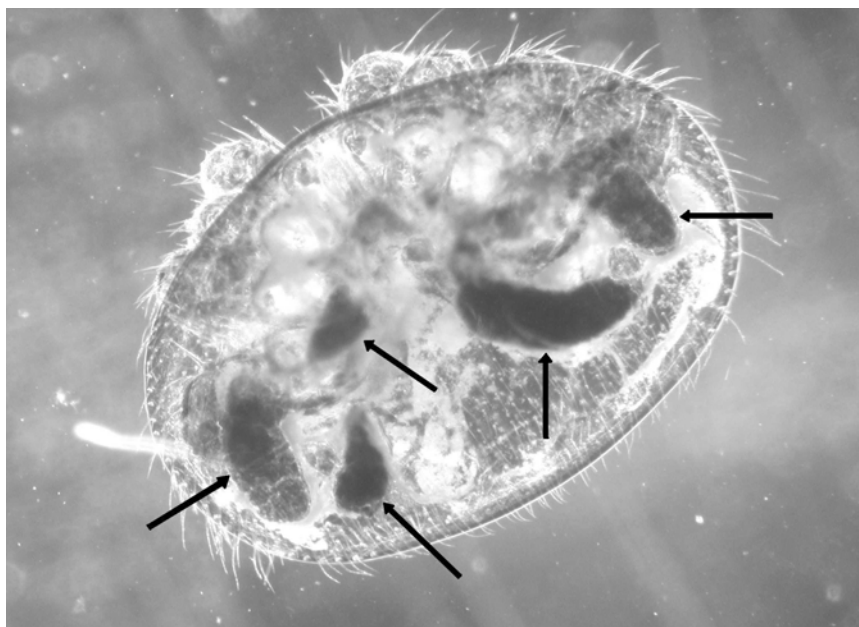


Figura 2 - Acarianul *Varroa destructor*, cu o substanță neagră densă în diverticuliile intestinale.  
(Preparat original, stereomicroscop, mărire: 20x).

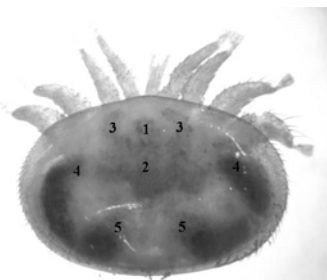


Figura 3 - Substanță de culoare neagră în tractul digestiv și formațiuni negre în diverticuli distali și laterali ai intestinului.

1 – esofag, 2 – diverticuli intestinali proximali, 3 – mezenter anterior, 4 – diverticuli intestinali laterali, 5 – diverticuli intestinali distali. (Preparat original, stereomicroscop, mărire: 20x)

Din acești acarieni, au fost izolate următoarele microorganisme:

**Ciuperci:**

- *Aspergillus flavus*,
- *Mucor ramosissimus*,
- *Mucor indicus*, *Mucor hiemalis*,
- *Penicillium multicolor*,
- *Penicillium simplicissimum*.

**Bacterii:**

- *Enterobacter cloacae*,
- *Staphylococcus albus*.

Pulverizarea albinelor cu un inoculum preparat din microorganismele izolate a dovedit că *Enterobacter cloacae* este agentul cauzator de infecții la acarieni. Mortalitatea înregistrată a fost de 70-88,9%. Acarienii au murit într-un interval de 48-72 de ore, prezentând o mărire specifică a idiosomei. Membrana dintre scutul genital ventral și cel sternal era, de obicei, ruptă, eliberând un lichid (Figura 4). Lichidul a fost prelevat din idiosoma intactă cu ajutorul unui ac de seringă steril, și atât la microscop cât și în cultura bacteriană a fost detectată prezența lui *Enterobacter cloacae*.



Figura 4 - Modificările patologice ale tubului Malpighi, după infectarea artificială, cu ruperea membranei dintre scuturile dorsal și metapodal.

1 – mărirea tubului Malpighi drept, 2 – scut dorsal, 3 – scut metapodal. (Preparat original, stereomicroscop, mărire: 20x)

Mortalitatea acarienilor din cuștile de laborator martor s-a situat între 0 și 45% (în medie 15,9%). Mortalitatea din cuștile de laborator în cazul testării de alte microorganisme izolate, nu a dovedit patogenitatea acestora:

*Aspergillus flavus* – mortalitatea medie 22,5%; *Mucor ramosissimus* – mortalitatea medie 25,2%; *Mucor indicus* – mortalitatea medie 22,1%; *Mucor hiemalis* – mortalitatea medie 18,6%; *Penicillium multicolor* – mortalitatea medie 12,5%; *Penicillium simplicissimum* – mortalitatea medie 18,6%; *Staphylococcus albus* – mortalitatea medie 23,8%.

Toate rezultatele au fost analizate statistic cu un tabel de contingențe,  $p > 0,95$ .

*Enterobacter cloacae* s-a dezvoltat în 12 ore după inocularea pe agar Columbia. Coloniile erau rotunde, de 2-4 mm, cu un centru îngroșat, de culoare cenușie și având o consistență mucoasă. Această bacterie este gram-negativă, în formă de bastonaș scurt și cu dimensiunea de 0,5-1 x 1-2  $\mu\text{m}$ , potrivit observării la microscop. Identificarea lor a fost confirmată de testele biochimice, iar rezultatele noastre de Colecția cehă de microorganisme (Universitatea Masaryk, Brno), unde s-a efectuat reidentificarea acestei tulpini.

*Enterobacter cloacae* s-a dezvoltat foarte bine pe agarul de cultură (1% extract de vită, 1% peptonă, 0,5% NaCl, 2% agar, pH 7,2), care urmează să fie folosit pentru producția de masă.

Tabelul I

Activitatea biochimică a lui *Enterobacter cloacae*

	Rezultate standard pentru specia <i>Enterobacter cloacae</i>	Rezultate sușe izolate din <i>Varroa destructor</i>
Ureeză	d	+
Indol	-	-
Fenilalanin desaminază	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-
VP	+	+
Gelatină (22 C)	-	-
Malonat	D	+
Dulcitol	(d)	-
Rafinoză	+	+
Ramnoză	+	+
Trehaloză	+	+
Manitol	+	+
Zaharoză	+	+
Glucoză/gaz	+	+

Simboluri:

- < 10% a sușelor, pozitive
- (d) 11 la 50% a sușelor, pozitive
- d 51 la 89% a sușelor, pozitive
- + > 90% a sușelor, pozitive

Tabelul II

Activitatea biochimică a speciei *Enterobacter*

	Arginină-hidrolază	Lisind-carboxilază	Ornitind-carboxilază	Adonitol	Sorbitol
<i>E. aerogenes</i>	-	+	+	+	+
<i>E. agglomerans</i>	-	-	-	-	d
<i>E. sakazakii</i>	+	-	+	-	-
<i>E. gergoniae</i>	-	+	+	-	-
<i>E. cloacae</i>	+	-	+	d	+
Sușă din Varroa	+	-	+	+	-

Simboluri:

- < 10% a sușelor, pozitive
- (d) 11 la 50% a sușelor, pozitive
- d 51 la 89% a sușelor, pozitive
- + > 90% a sușelor, pozitive

## Discuții

*Enterobacter cloacae* a fost descris de JORDAN în 1891. D'HERELLE a descris în 1910 această bacterie ca fiind entomopatogenă în peninsula Yucatán. Bacteria a fost denumită *Coccobacillus acridiorum*. Această tulpină a provocat epizootii ale lăcustelor care migrau în număr mare din Mexic în Yucatán, iar cercetătorii au observat modificări de culoare neagră și descompunerea epiteliului organelor digestive ale lăcustelor, precum și moartea acestora la 8 ore după infectare. Virulența bacteriei a sporit cu pasajele succesive (D'HERELLE, 1911, 1912).

D'HERELLE a utilizat bacteria izolată de el la combaterea biologică a lăcustelor în Algeria, Argentina și Tunisia în anii 1910-1912 (D'HERELLE, 1911, 1912).

În timpul perioadei 1914-1916, SERGENT și L'HÉRITIER au descoperit că realizarea unui număr de pasaje succesive de la 12 (la D'HERELLE) la 50 provoacă moartea insectelelor în 8 ore după infectare. De atunci nu a mai fost izolată o tulpină de asemenea virulență, ca cea de care a dispus D'HERELLE, (WEISER, 1966).

Am reușit să demonstrăm că *Enterobacter cloacae*, găsită în organele digestive ale acarianului *Varroa destructor*, este patogenă pentru acesta. Până în prezent, această bacterie nu a fost citată printre agenții de perspectivă de combatere biologică ai *Varroa destructor* în trecerea în revistă efectuată de CHANDLER et al. (CHANDLER, 2001).

*Enterobacter cloacae* este taxonomic definit ca gram-negativ, aerob și nesporulant. Structura sa antigenă reprezintă un mozaic tipic. Temperatura optimă de creștere se situează între 30 și 37 °C. Temperatura de 100 °C o ucide în 2 minute. Activitatea biochimică tipică pentru această specie este menționată în tabel.

## BIBLIOGRAFIE

- Anderson D.L., Trueman J.W.H. (2000), *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species, *Experimental and Applied Acarology* 24, 165-189
- Bircher S. et al. (1990), Medical Microbiology, The C.V. Mosby Company, Maning, USA
- Camazine S., Liu T.P. (1998), A putative iridovirus from the honey bee mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans, *Journal of Invertebrate Pathology* 71, 177-178
- Chandler D., Sunderland K.D., Ball B.V., Davidson G. (2001), Prospective Biological Control Agents of *Varroa destructor* n.sp., an Important Pest of the European Honeybee, *Biocontrol Science and Technology* 11, 429-448
- Glinski Z.F., Jarosz J. (1990), Micro-organisms associated fortuitously with *Varroa jacobsoni*, *Microbios* 62, 59-68
- Goettel M.S., Johnson D.L. (1992), Environmental impact and safety of fungal biocontrol agents, in Lomer C.J. (Ed.), Biological control of locusts and grasshoppers, International Wallingford, pp. 356-361
- Hall I.M., Hunter D.K., Arakawa K.Y. (1971), The effect of the  $\beta$ -exotoxin fraction of *Bacillus thuringiensis* on the citrus red mite, *Journal of Invertebrate Pathology* 18, 359-362
- D'Herelle F.H. (1911), Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur les sauterelles du Mexique, C.R.Acad.Sci. 152, 1413-1415
- D'Herelle F.H. (1912), Sur la propagation dans la République Argentine de l'épizootie des sauterelles. C.R.Acad.Sci. 152, 1413-1415
- Kanga L.H.B., James R.R., Boucias D.G. (2002), *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential microbial control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite, *Journal of Invertebrate Pathology* 81, 175-184
- Kleespies R.G., Radtke J., Bienefeld K. (2000), Virus -like particles found in the ectoparasitic bee mite *Varroa jacobsoni* Oudemans, *Journal of Invertebrate Pathology* 15, 87-90
- Lindberg C.M., Melathopoulos A.P., Winston M.L. (2000), Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite, *Journal of economic entomology* 93(2), 189-198
- Liu T.P., Ritter W. (1988), Morphology of some microorganisms associated with the female mite *Varroa jacobsoni*, a survey by electron microscopy, in Needham E. et al. (Ed.), Africanized honeybees and bee mites, Ellis Horwood, Chichester, pp. 467-474
- Martignoni M.E. (1984), Baculoviruses: an attractive biological alternative, in Burges H.D. (Ed.), Chemical and Biological Controls in Forestry, Seattle Washington, pp. 55-67
- Weiser J.(1966) Nemoci hmyzu, *Academia*, Praha