

## MICROORGANISMOS AISLADOS DEL ACARO VARROA DESTRUCTOR Y COMPROBACION DE SU PATOGENICIDAD

J. HRABÁK

Lučni 255, 388 28 Radnice, REPUBLICA CHECA  
E-mail: Hrabakj@seznam.cz

### Resumen

Nuestra investigación tuvo la finalidad de descubrir un ácaro *Varroa destructor* con síntomas patógenos y de aislar los microorganismos provenientes de éste. Los ácaros muertos se recogieron de los tableros pegajosos de las colmenas y se examinaron bajo un estereomicroscopio. Los ácaros sospechosos de haber muerto a consecuencia de un proceso patológico fueron examinados con métodos bacteriológicos y micológicos. La patogenicidad de los microorganismos aislados se comprobó a través de los ensayos que se describen en el trabajo. Durante la investigación, se encontraron hembras con formaciones negras en la región intestinal y también con una micosis de color blanco en el idiosoma y en su superficie. Las bacterias *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus albus haemolyticus* y los hongos *Aspergillus flavus*, *Penicillium multicolor* y *P. simplicissimum* fueron aislados de individuos con manchas negras, y las bacterias *Enterobacter cloacae* y los hongos *Mucor ramosissimus*, *M. indicus* y *M. hiemalis*, de ácaros afectados por micosis. Las pruebas de laboratorio destinadas a comprobar la patogenicidad de los microorganismos aislados se llevaron a cabo en jaulas de laboratorio con 40 abejas y 15 hembras de *Varroa destructor*. Las jaulas de laboratorio con abejas infestadas por *Varroa destructor* se pulverizaron con un inóculo y solución salina estéril (en las jaulas control). Los experimentos se efectuaron a 35° C de temperatura. Las pruebas de laboratorio mostraron patogenicidad sólo para la bacteria *Enterobacter cloacae*, que causó una mortalidad media de ácaros de 77,4 % en las jaulas de laboratorio. La mortalidad en las jaulas control fue, en media, de 15,9 %. Al ensayarse sobre otros microorganismos, no se comprobó una diferencia estadística frente a las jaulas testigo. Los ácaros infectados por *Enterobacter cloacae* murieron y evidenciaron modificaciones específicas de los tubos de Malpighi (observadas macroscópicamente como modificación de estos órganos y del idiosoma), y la membrana entre los escudos genital y esternal, o metapodal, habitualmente estaba rota. Sin embargo, las manchas negras no se observaron en nuestras pruebas de laboratorio.

### Introducción

Las investigaciones encaminadas a identificar nuevas modalidades de combate biológico de *Varroa destructor* se pueden centrar en:

1. Ensayar los microorganismos con patogenicidad demostrable para otro género de ácaros.
2. Utilizar los ácaros predadores para atacar a aquellos que viven en las provisiones de las colonias de abejas.
3. Encontrar ácaros con síntomas infecciosos dentro de las colmenas. Centramos nuestros estudios en la búsqueda de ácaros con síntomas patológicos e infecciosos, que vivían en los desperdicios de la colmena y en torno a las larvas de abejas. Sin embargo, nos limitamos a los patógenos bacterianos y fúngicos.

Los microorganismos patógenos, descritos en otros ácaros (*Laelapidae*, *Iphiopsidae*) y garrapatas (*Ixodia*, *Holothyridia*), se pueden ensayar como agentes de combate biológico de la varroosis, ya que estos organismos están emparentados con los ácaros Varroidae.

El estudio se centró en el huésped habitual del ácaro *Varroa jacobsoni* - *Apis cerana*, pero las investigaciones de Anderson y Trueman (D.L. ANDERSON et al., 2000) demostraron que *Varroa jacobsoni* es una especie distinta de *Varroa destructor*, que infesta las colonias de abejas melíferas - *Apis mellifera*. Lo que subraya la necesidad de buscar patógenos que afecten a determinadas especies de *Varroa*.

A los potenciales patógenos de los ácaros *Varroa destructor* se les puede agrupar, de acuerdo con la taxonomía de los microorganismos, en: nemátodos, protozoos, virus, rickettsia y hongos. Sólo nos vamos a referir a los agentes patógenos con el potencial más importante de la literatura de referencia.

Los virus pueden ser agentes beneficiosos, ya que suelen invadir los grupos estándar de células idénticas, infectándolas. Este factor resta patogenicidad para el respectivo organismo, de manera que no se puede implicar la patogenicidad de *Varroa* para las abejas melíferas. La principal desventaja de los virus es su difícil cultivo masivo. En su mayoría, a los virus se les cultiva *in vivo*.

*Polydnaviridae*, *Ascoviridae* y *Baculoviridae* son patógenos específicos de los artrópodos (D. CHANDLER et al., 2001). Los baculovirus constituyen un grupo específico para el combate biológico (M.E. MARTIGNONI, 1984). Ellos infestan el intestino y penetran entre las células epiteliales del organismo.

Partículas semejantes a los virus se encontraron en el cuerpo adiposo de los ácaros que infestaban las colonias de *Apis mellifera*, pero los ensayos de transmisión de estas partículas fallaron. Los ácaros con diagnóstico de partículas semejantes a los virus presentan modificaciones de color negro en el tejido y el cuerpo adiposo del intestino (R.G. KLEESPIES, 2000).

Un presunto idiovirus fue aislado de los ácaros *Varroa* de colonias de abejas melíferas de EE.UU., no obstante que su patogenicidad frente a los ácaros no haya sido comprobada (S. CAMAZINE et al., 1998).

Las **rickettsias** fueron encontradas en los ácaros y las garrapatas, en grandes concentraciones; pueden ser peligrosas para los humanos y otros vertebrados. Otra desventaja es su difícil producción masiva, de manera que no se les debe clasificar como potenciales agentes patológicos, como es el caso de los virus.

Otro organismo sin identificar, parecido a la rickettsia, fue encontrado en el recto de los ácaros *Varroa* (T.P. LIU et al., 1988). Estos organismos fueron descubiertos en todos los estadios de desarrollo.

Las **bacterias** entran en la categoría de los agentes patógenos de los insectos. Las familias características de los entomopatógenos son: *Bacillaceae*, *Enterbacteriaceae* y *Streptococcaceae*. El efecto patógeno de *Bacillaceae* suele ser provocado por la síntesis de la toxina que se forma por la esporulación de los microbios.

*Bacillus thuringiensis* viene siendo utilizado en amplia escala en el combate biológico. Así, por ejemplo, se le aplica para el combate de *Galleria mellonella* L. en apicultura. *B. thuringiensis* mató adultos y larvas de ácaros tetranychide (I. M. HALL et al., 1971), así como algunas especies de *Mesostigmata* y *Prostigmata* (D. CHANDLER et al., 2001).

Cepas de *Bacillus thuringiensis* fueron aisladas del intestino de *V. destructor*, pero su patogenicidad aún no se conoce (Z.F. GLIŃSKI et al., 1990).

Sin embargo, las bacterias no son patógenos específicos de los ácaros y su cultivo se lleva a cabo, habitualmente, entre los 30 y 35°C, hecho característico para las condiciones de cría del pollo. También la humedad de las colonias de abejas es apropiada para el desarrollo de las bacterias.

Los **hongos** se describen como uno de los primeros agentes patógenos de los artrópodos en la historia. La temperatura óptima se sitúa por arriba de los 25° C (S. BIRCHER et al., 1990). Pueden resultar útiles para ser empleados en las colonias de abejas precisamente durante el invierno. Sólo un escaso número de especies disponen de una temperatura óptima de desarrollo superior a los 35° C, pero se presta particular atención a su patogenicidad para los humanos, tal como es, por ejemplo, el caso de *Aspergillus*.

La mortalidad causada por las infecciones por hongos se debe a la destrucción mecánica de los tejidos, la eliminación del agua y la actividad de las micotoxinas (S. BIRCHER et al., 1990).

Los hongos *Beauveria bassiana* se utilizaron como micopesticidas en el combate de más de 700 especies de artrópodos (M.S. GOETTEL et al., 1992). Otro hongo patógeno importante para los insectos es *Metarhizium anisopliae*, y asimismo otras especies del género *Metarhizium*. Tienen una temperatura máxima de desarrollo de 38° C.

La ventaja que presentan los hongos en el combate biológico es el fácil cultivo de cantidades masivas. Sin embargo, *B. bassiana* y *M. anisopliae* pueden ocasionar infecciones bajo condiciones de laboratorio, pero la infección de la abeja aún no ha sido detectada (D. CHANDLER et al., 2001; J. WEISER, 1966).

*Hirsutella thompsonii* y *Metarhizium anisopliae* se evaluaron en el laboratorio y en colmenas de observación, y los resultados fueron significativamente positivos (KANGA et al., 2002).

**Parasitoides.** La utilización de los ácaros predadores depende de la humedad y la temperatura ambiente. Ellos infestan a los adultos, los distintos estadios de desarrollo y los huevos. La utilización de los predadores entraña un gran riesgo potencial para los huevos de las abejas, porque los consumen con predilección.

## **Materiales y métodos**

### **Identificación de los agentes patógenos**

#### *Recolección de los ácaros*

Los ácaros *Varroa* fueron recolectados, ya desde 1999, de los apiarios de Radnice (Chequia occidental). Las colmenas (colonias de *Apis mellifica* L.) de los apiarios estaban provistas de tableros de fondo cubiertos de una gasa de poros grandes (mallas de 10 mm) y encima otra gasa separada (mallas de 3 mm).

Las hembras muertas se quedaron adheridas a los tableros de fondo, sin que las abejas las apartaran. Se observaron de cerca los tableros y los ácaros muertos se estudiaron bajo estereomicroscopio.

Las modificaciones patológicas se expresaron en los ácaros por un color oscuro bien visible, caracterizándose incluso por el crecimiento de hongos sobre la superficie corporal.

### **Aislamiento**

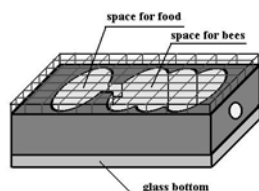
Las hembras muertas de *Varroa destructor*, sospechosas de haber muerto a consecuencia de un proceso patológico, se trataron con alcohol etílico (70 %) y, ulteriormente, se partieron en dos. Una de las partes fue colocada en 1 ml de solución salina y la otra en un tubo de ensayo, a 4° C de temperatura, en vista de su ulterior examinación. El fragmento de ácaro conservado en solución salina se incubó durante 2 horas a 36° C de temperatura y ulteriormente el fluido se inoculó sobre una placa de Petri y se incubó a 36° C de temperatura.

Para el cultivo bacteriano se utilizó agar Colombia al 5 % SB, y para los hongos agar Sabouraud de dextrosa.

### **Parte experimental**

#### *Infecciones experimentales*

El inóculo, con un contenido de  $1 \times 10^7$  células en  $1 \text{ mm}^3$  de solución salina y 5 % de glucosa, se pulverizó sobre las abejas infestadas por ácaros *Varroa destructor* en jaulas de laboratorio (Fig. 1). La parte superior de las jaulas de laboratorio era de gasa (la luz de la malla 0,5 mm) y la parte inferior era un fondo de cristal. Un número de 40 abejas y 15 ácaros fueron colocados en cada jaula de laboratorio. Las abejas con ácaros de las jaulas de laboratorio fueron pulverizadas con una solución salina libre de bacterias, al 5 % de glucosa.



*Figura 1 - Jaula de laboratorio (esbozo)*

Space for food = espacio para el alimento; space for bees = espacio de abejas; glass bottom = fondo de cristal

### **Aislamiento**

Los ácaros muertos fueron retirados de la jaula de laboratorio y desinfectados en superficie, igual que los ácaros caídos espontáneamente. Luego, se efectuó la punción del idiosoma, y el fluido obtenido fue cultivado y observado bajo microscopio.

### **Resultados**

Acaros con manchas negras patológicas sobre los intestinos fueron encontrados entre los desperdicios y la basura de la colmena (Figura 2). El complejo de los divertículos intestinales distal y lateral contenía una materia homogénea dura, de color negro. Esta materia fue cultivada, siguiendo los métodos descritos.

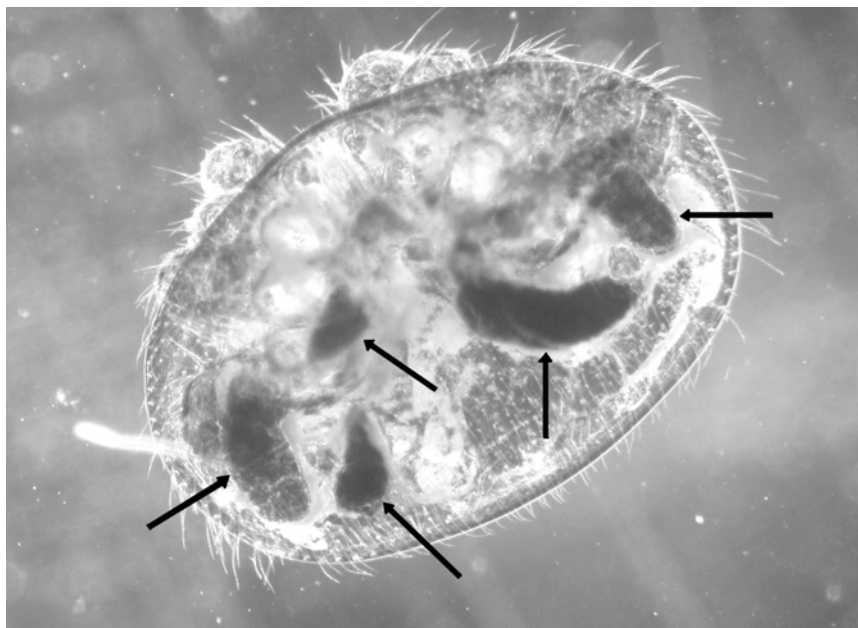


Figura 2 - El ácaro *Varroa destructor*, con una materia negra densa en los divertículos intestinales. (Preparación original, estereomicroscopio, aumento: 20x).

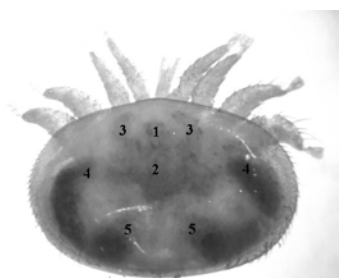


Figura 3 - La materia de color negro del tracto digestivo y las formaciones negras de los divertículos distal y lateral del intestino. 1 - esófago, 2 - divertículos intestinales proximales, 3 - mesenterio anterior, 4 - divertículos intestinales laterales, 5 - divertículos intestinales distales. (Preparación original, estereomicroscopio, aumento: 20x).

De estos ácaros se aislaron los siguientes microorganismos:

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

Bacterias: *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus albus*.

La pulverización de las abejas con un inóculo preparado con los microorganismos aislados mostró que *Enterobacter cloacae* era el agente causante de infecciones en los ácaros. La mortalidad registrada ascendió a 70-88,9 %. Los ácaros murieron en un intervalo de 48-72 horas, presentando un abultamiento específico del idiosoma. La membrana entre los escudos genital ventral y esternal habitualmente estaba rota y soltaba un fluido (figura 4). El fluido fue extraído del idiosoma intacto con una aguja de jeringuilla estéril; se detectó la presencia de *Enterobacter cloacae*, tanto microscópicamente como en cultivo bacteriano.

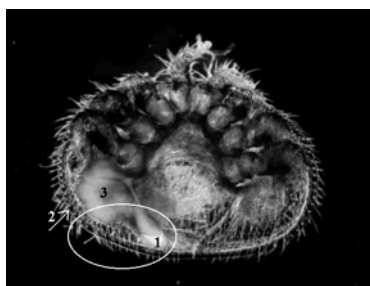


Figura 4 - Modificaciones patológicas en un tubo de Malpighi, tras la infección artificial, con rotura de la membrana entre los escudos dorsal y metapodal.

1 - abultamiento del tubo de Malpighi derecho, 2 - escudo dorsal, 3 - escudo metapodal. (Preparación original, estereomicroscopio, aumento: 20x).

La mortalidad de los ácaros de las jaulas de laboratorio control se situó entre 0 y 45 % (término medio, 15,9 %). La mortalidad en las jaulas de laboratorio, ensayando otros microorganismos aislados, no probó su patogenicidad.

*Aspergillus flavus* - mortalidad media 22,5 %; *Mucor ramosissimus* - en promedio, 25,2 %. *Mucor indicus* - en promedio, 22,1 %; *Mucor hiemalis* - en promedio, 18,6 %; *Penicillium multicolor* - en promedio, 12,5 %; *Penicillium simplicissimum* - en promedio, 18,6 %; *Staphylococcus albus* - en promedio, 23,8 %.

Todos los resultados se sometieron al análisis estadístico empleando un cuadro de contingencias, demostrando que  $p > 0,95$ .

*Enterobacter cloacae* se desarrolló en las 12 horas siguientes a la inoculación sobre agar Colombia. Las colonias eran radiales, de 2-4 mm de tamaño, con un centro engrosado. Son de color ceniza, de consistencia mucosa. Las bacterias son gramnegativas, de forma de bastoncillo corto, con el tamaño de 0,5-1 x 1-2  $\mu\text{m}$ , según lo observado bajo el microscopio. Su identificación se comprobó mediante ensayos bioquímicos. Nuestros resultados fueron confirmados con la Colección checa de microorganismos (Universidad Masaryk, Brno), donde se efectuó la reidentificación de esta cepa.

*Enterobacter cloacae* se desarrolló muy bien sobre agar nutritivo (Nutrimento) (1 % extracto de vacuno, 1 % peptona, 0,5 % NaCl, 2 % agar, pH 7,2), que se ha de utilizar para la producción masiva.

## Discusiones

*Enterobacter cloacae* fue descrito por Jordan, en 1891. D'Herelle describió esta bacteria como entomopatógena en la Península de Yucatán, en 1910. La bacteria fue denominada *Coccobacillus acridiorum*. Esta cepa causó epizootias de las langostas que emigraban en gran número de México a Yucatán, y los investigadores observaron modificaciones de color negro y la descomposición del epitelio de los órganos digestivos de las langostas, así como su muerte a las 8 horas de la infección. La virulencia de la bacteria aumentó, con las pasadas sucesivas (D'HERELLE, 1911, 1912).

D'HERELLE aplicó la bacteria por él aislada al combate biológico de las langostas en Argelia, Argentina y Túnez, en los años 1910-1912 (D'HERELLE, 1911, 1912).

En el período 1914-1916, SERGENT y L'HÉRITIER descubrieron la necesidad de la realización de un número de pasadas sucesivas, de 12 (en D'Herelle) a 50, para que los insectos murieran durante las 8 horas siguientes a la infección. Desde entonces, una cepa tan virulenta como aquella de que dispuso D'Herelle no ha vuelto a ser aislada (J. WEISER, 1966).

Pudimos demostrar que *Enterobacter cloacae*, encontrada en los órganos digestivos del ácaro *Varroa destructor*, es patógena para éste. Hasta el presente, a esta bacteria no se le ha citado entre los agentes de combate biológico con futuro de *Varroa destructor*, en el amplio repaso de Chandler et al. (D. CHANDLER, 2001).

*Enterobacter cloacae* es taxonómicamente definido como gramnegativo, aerobio y no esporulante. Su estructura antigénica representa un mosaico específico. La temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 37° C. La temperatura de 100° C lo mata en 2 minutos. La actividad bioquímica específica de esta especie aparece mencionada en los trabajos de especialidad.

## BIBLIOGRAFIA

- 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 sauterelle 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