

Comunicación

Transporte de esporas de *Bacillus larvae* por el ácaro *Varroa jacobsoni*.

Adriana M Alippi *

Area de Fitopatología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales U N L P, calles 60 y 118, cc 31 (1900) La Plata. Argentina.

* Investigadora de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Prov de Bs As

Recibido 26 de febrero de 1992, aceptado 10 de febrero de 1993.

Palabras clave: *Bacillus larvae*-loque americana-*Varroa jacobsoni*-*Apis mellifera*

La "loque americana" causada por la bacteria *Bacillus larvae* White es la enfermedad más grave que afecta a la cría de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) (Gochnauer et al, 1975; Shimanuki, 1978). Recientemente introducida en la Argentina ha causado importantes pérdidas en la apicultura (Alippi, 1992, Alippi y Nuñez, 1991).

La varroosis es una ectoparasitosis ocasionada por el ácaro *Varroa jacobsoni* Oudemans que afecta tanto a las larvas como a las abejas adultas de las especies *Apis cerana* Fabr. y *Apis mellifera* L. Se la encuentra en todos los continentes con excepción de Australia (Crane, 1978; Shimanuki and Knox, 1991). El ácaro actúa en forma directa alimentándose de la hemolinfa de insectos adultos y de larvas. En colmenas muy afectadas, las pupas no nacen o se transforman en adultas deformes o con peso inferior al normal, debido a la pérdida de nutrientes.

V. jacobsoni está estrechamente relacionada con los virus de la parálisis aguda (APV) y del sacbrood (SBV) actuando como un agente de transmisión de ambas enfermedades mediante la inoculación de partículas virales en la hemolinfa (Puerta et al., 1988) o

por estimulación de la replicación viral mediante la introducción de proteínas extrañas, como las enzimas digestivas del ácaro (Ball, 1985). Otra acción indirecta de la varroa sería la transmisión de enfermedades fúngicas como la aspergilosis (Cría petrificada) y la ascosferiosis (cría yesificada). Puerta et al, (1990) examinaron mediante el microscopio electrónico de barrido la superficie de hembras de *V. jacobsoni* y hallaron esporas de los hongos *Ascospaera apis* (Maasen ex Clausen) Olive & Spiltor y *Aspergillus flavus* Link ex Fries llegando a la conclusión que la varroa era capaz de transportar esporas de *Ascospaera apis*, pero esa situación no era significativa en la epidemiología de la enfermedad.

Con respecto a las interrelaciones entre la loque americana y la varroosis, no existen datos al nivel mundial, razón por la cual, el objetivo del presente trabajo fue evaluar mediante observaciones con el microscopio electrónico de barrido la presencia de esporas de *B. larvae* sobre *V. jacobsoni* para detectar la posible transmisión de la bacteriosis por medio del ácaro.

Los muestreos se realizaron sobre 3

Alippi. Transporte de esporas de Bacillus larvae...

núcleos de 5 cuadros previamente infectados con loque americana, cuyo grado de infección era 5, de acuerdo con la escala de Moffett (Wilson *et al.*, 1971) y que no habían sido tratados contra varroa en esa temporada.

En cada núcleo se colocó una tira de PVC de 25 X 3 cm, impregnada con fluvalinato (Apistan R, Sandoz SAIC), las varroas muertas se recogieron en un papel blanco, colocado sobre el piso de los nucleos, a las 24 h de efectuado el tratamiento con el acaricida. Se emplearon hembras adultas, de las cuales, un grupo fue preparado para ser observado en un microscopio electrónico de barrido (SEM) y el resto se utilizó para efectuar aislamientos en medios de cultivo con el objeto de detectar la presencia de *B. larvae*.

Las varroas destinadas a SEM se colocaron en alcohol etílico de 96° filtrado previamente por membranas millipor de 0,2 µm de diámetro de poro. Se fijaron durante 24 h, al cabo de las cuales se dejó evaporar el alcohol durante 7 días en un lugar fresco, seco y al abrigo del polvo (Fernández, com. pers., 1991). Los ácaros se montaron en tacos con cinta bifaz, se metalizaron al vacío con una capa de oro de 1 µm de espesor y se observaron con un microscopio electrónico Jeol Scanning JSM-T 100, efectuándose un barrido total de la superficie de los mismos (10 repeticiones de la cara ventral y 10 de la dorsal)

Para los aislamientos, cada muestra de 50 varroas se colocó en tubos de tapa a rosca con 5 ml de agua destilada estéril y se calentaron a B.M. a 80°C durante 10 min. Luego de una agitación en vortex (2 min), se sembraron alícuotas de 0,015 ml en medio J-sólido (Gordon *et al.*, 1973) con el agregado de 3 µg/ml de ácido nalidixico (Alippi, 1991). Las cajas sembradas se incubaron a 36-37°C en aire con 10% de CO₂ (Honitzky and Karlovskis, 1989) hasta la aparición de desarrollo

bacteriano. Una vez aisladas, las cepas se mantuvieron en condiciones aeróbicas y se identificaron de acuerdo con el siguiente esquema: características culturales, reacción de Gram, producción de catalasa, reacción de Voges-Proskauer (VP), determinación de pH en caldo de VP, descomposición de gelatina, hidrólisis de almidón, utilización de citrato de sodio, producción de ácido a partir de D-manitol, reducción de nitratos a nitritos, descomposición de tirosina y supervivencia luego de numerosos pasajes por caldo nutritivo (CN) (Gordon *et al.*, 1973; Sneath, 1984).

Las colonias bacterianas desarrolladas en medio J eran de color blanco-grisáceo, de 3-4 mm de diámetro, con superficie rugosa y bordes irregulares. Las bacterias resultaron Gram (+), catalasa (-), VP (-), con pH en VP entre 6,5 y 6,2; licuaron gelatina, no hidrolizaron almidón, no utilizaron citrato ni acidificaron manitol, no degradaron tirosina, redujeron nitrato y no sobrevivieron a varios pasajes por CN.

Estos resultados coinciden con los descritos para *B. larvae* (Haynes, 1972; Gordon *et al.*, 1973; Sneath, 1984; Alippi, 1992).

Mediante la observación superficial de ejemplares hembras de *V. jacobsoni*, se detectó la presencia de esporas de *B. larvae* sobre el escudo dorsal de las mismas (Figs. 1, 2 y 3).

Las esporas, de forma elipsoidal, poseían superficie lisa, eran muy refringentes y se hallaban libres, sin restos de esporangio. Sus dimensiones oscilaban entre 0,6-0,65 µm de ancho por 1,25-1,3 µm de largo. Estas características son diferenciales para las esporas de *B. larvae* vistas al microscopio electrónico de barrido en relación con las de otras especies de *Bacillus* asociadas con abejas (Bradley and Franklin, 1958; Bulla *et al.*, 1969; Alippi, 1991).

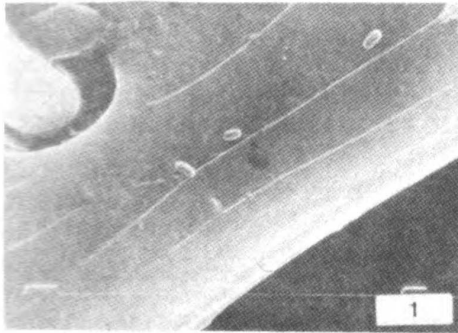
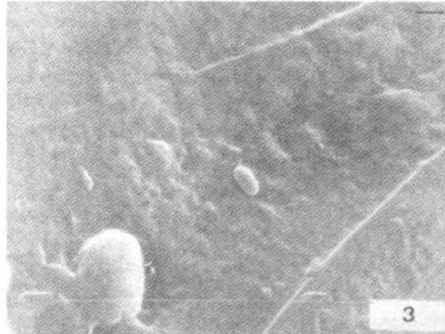
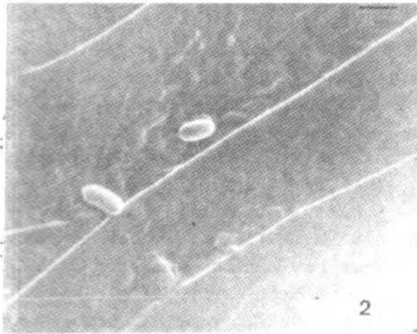


Figura 1: Fotografía de microscopio electrónico de barrido de esporas de *Bacillus larvae* sobre el borde del escudo dorsal de una hembra de *Varroa jacobsoni*. Se observan las estriaciones transversales del escudo dorsal y la base de un pelo rígido.
Escala: Barra: 10 μ m

Scanning electron micrograph of *Bacillus larvae* spores over the edge of the dorsal shield of a female *Varroa jacobsoni*. A view of the dorsal shield showing transversal fluttings and a rigid hair.
Bar. 10 μ m



Figuras 2 Y 3: Esporas de *Bacillus larvae* sobre el escudo dorsal de una hembra de *Varroa jacobsoni* vistas al microscopio electrónico de barrido (Scanning).
Escala: Barra: 1 μ m

Bacillus larvae spores over the dorsal shield of a female *Varroa jacobsoni* as seen by scanning electron microscope.
Bar. 1 μ m

Por todo lo expuesto se concluye que *Varroa jacobsoni* puede transportar esporas viables de *Bacillus larvae* en su superficie.

Estudios posteriores permitirán establecer si la loque americana es transmisible de colmenas enfermas a sanas por intermedio de *V. jacobsoni*.

También será necesario evaluar la virulencia de la loque americana en colmenas, con y sin varroas, y determinar si el debilitamiento ocasionado por el ácaro sería un factor predisponente para el desarrollo de la enfermedad al crear situaciones de estrés en la colmena. Esto jugaría un papel muy

importante en el caso de colmenas asintomáticas, pero con altas poblaciones de esporas de *B. larvae*, ya que *V. jacobsoni* podría llegar a actuar como un catalizador para la aparición de la loque americana.

AGRADECIMIENTOS

A los técnicos del Servicio de Microscopía electrónica de barrido del Museo de Ciencias Naturales de la U N L P, Sta. P. Sarmiento y Sr. R. Urrejola por su asistencia durante las observaciones con SEM y a los

Alippi. Transporte de esporas de *Bacillus* larvae...

Ings. Agrs. G. Albo y D. Leveratto por su colaboración en el manejo de las colmenas y recolección de varroas.

Esta investigación fue parcialmente subsidiada por la International Foundation for Science, Suecia (IFS Grant N° B/1859-1).

BIBLIOGRAFIA

- Alippi Adriana M (1991) A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee, *Apis mellifera*, in Argentina. *J apic Res* 30: 75-80
- Alippi Adriana M (1992) Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of American Foulbrood of honey bees. First record of its occurrence in Argentina. *Rev Arg Microbiol*: 24(2) En prensa
- Alippi Adriana M y L Nuñez (1991) La loque americana en Argentina. *Vida Apícola* 49: 20-24
- Ball Brenda V (1985) Acute paraisis virus isolates from honey bee colonies infested with *Varroa jacobsoni*. *J apic Res* 24: 115-119
- Bradley DE and JG Franklin (1958) Electron microscope survey of the surface configuration of spores of the genus *Bacillus*. *J Bact* 76: 618-630
- Bulla LA, G St Julian, RA Rhodes and CW Hesseltine (1969) Scanning electron and phase-contrast microscopy of bacterial spores. *Appl Microbiol* 18: 490-495
- Crane Eva (1978) The Varroa mite. *Bee Wld* 59: 164-167
- Gochnauer TA, B Furgala and H Shimanuki (1975) Enfermedades y enemigos de la abeja melífera. En: La colmena y la abeja melífera. Ed Dadant e hijos, Hemisferio Sur, Uruguay 791- 848
- Gordon Ruth, WC Haynes and C H-N Pang (1973) The genus *Bacillus* USDA Handbook 427
- Haynes WC (1972) The catalase test. An aid in the identification of *Bacillus larvae* *Am Bee J* 112: 130-131
- Hornitzky MAZ and S Karlovskis (1989) A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honey bees. *J apic Res* 28: 118-120
- Puerta F, A Castellano, M Bustos, P Pellín, JM Flores y F Padilla (1988) Características epizooticas de la parasitosis por *Varroa jacobsoni* O. en colmenas de la provincia de Almería. *Rev Iber Parasitol* 48: 195-202
- Puerta F, JM Flores, AJ Jimenez, M Bustos y F Padilla (1990) Enfermedades secundarias a la parasitación por *Varroa* en *Apis mellifera*. *Vida Apícola* 43: 54-59
- Shimanuki H (1978) Chapter 3: Bacteria. En: Honey bee pests, predators and diseases. Ed Morse Cornell University Press, USA 43-61
- Shimanuki H and DA Knox (1991) Diagnosis of honey bee diseases. US Department of Agriculture, Agriculture Handbook N° AH- 690
- Sneath PHA (1984) Section 13: Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. En: *Bergey's Manual for Systematic Bacteriology* vol 2 Eds Krieg NR and Holt JG The Williams and Williams Co, Baltimore 1104-1125
- Wilson WT, JR Elliot and JD Hitchcock (1971) Antibiotic extender patties for control of American foulbrood. *J apic Res* 10: 143-147