

LUCHA FRENTE A LA VARROOSIS EN COLMENAS LAYENS



ESTUDIO FINANCIADO POR:

INFORME DEL ESTUDIO APÍCOLA: LUCHA FRENTE A LA VARROOSIS EN COLMENAS LAYENS

- ✓ Estudio realizado por COAG Salamanca: M^a Dolores Sánchez Escudero y Tomás Fernández Tejedor
- ✓ Colaboración con Fernando Calatayud Tortosa, técnico de la Agrupación de Defensa Sanitaria apiADS
- ✓ Colaboración del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas -CSIC: Iñigo Zabalgoeazcoa González, M^a Jesús Sánchez Martín, M^a Sonia Rodríguez Cruz, José Manuel Ordax de Castro, Raquel Arroyo Palomares
- ✓ Colaboración del Laboratorio de Bromatología y Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia: Yolanda Picó García
- ✓ Colaboración de apicultores: Juan Manuel Andrés Sánchez, Francisco Javier Fernández Santiago, Miguel Ángel Santos Oliva
- ✓ Colaboración especial: Fernando Sánchez –Montejo Álvarez y Aurelio Pérez Sánchez.



ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	5
2.- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	7
3.- OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	8
4.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
4.1.- Colmenas experimentales.....	8
4.2.- Inspección inicial de las colmenas.....	12
5.- VALORACIÓN DE EFICACIA DE LOS ACARICIDAS DE SÍNTESIS (M^a Dolores Sánchez Escudero y Fernando Calatayud Tortosa).....	18
5.1.- Tratamiento con fluvalinato en las colmenas del Grupo I, con amitraz las del Grupo II y con cumafós las del Grupo VIII. Seguimiento de la mortalidad de Varroa.....	18
5.2.- Retirada de los acaricidas probados: fluvalinato, amitraz y cumafós ...	25
5.3.- Enjaulado de las reinas y aplicación de un acaricida de contraste	26
5.4.- Evaluación de la eficacia de los acaricidas probados.	29
5.5.- Resultados y discusión del fluvalinato (Apistan®)	
5.5.1.- Evolución de las colmenas.....	29
5.5.2.- Evolución de la mortalidad de Varroa.....	31
5.5.3.- Eficacia del fluvalinato.....	32
5.5.4.- Conclusiones.....	36
5.6.- Resultados y discusión del amitraz (Amitraz®)	
5.6.1.- Evolución de las colmenas.....	36
5.6.2.- Evolución de la mortalidad de Varroa.....	37
5.6.3.- Eficacia del amitraz.....	39
5.6.4.- Conclusiones.....	42
5.7.- Resultados y discusión del cumafós (Checkmite®)	
5.7.1.- Evolución de las colmenas.....	42
5.7.2.- Evolución de la mortalidad de Varroa.....	44
5.7.3.- Eficacia del cumafós.....	45
5.7.4.- Conclusiones.....	49

6.- VALORACIÓN DE EFICACIA DE PRODUCTOS ORGÁNICOS: ÁCIDO OXÁLICO (M^a Dolores Sánchez Escudero y Fernando Galatayud Tortosa).....	50
6.1.- Tratamiento con ácido oxálico goteado en las colmenas del Grupo IV y con ácido oxálico sublimado las del Grupo V	50
6.2.- Seguimiento de la mortalidad de Varroa.....	53
6.3.- Aplicación de un acaricida de contraste.....	55
6.4.- Evaluación de la eficacia de las dos formas de administración de ácido oxálico probado.....	56
6.5.- Resultados y discusión del ácido oxálico goteado	
6.5.1.- Evolución de las colmenas.....	56
6.5.2.- Evolución de la mortalidad de Varroa.....	57
6.5.3.- Eficacia del ácido oxálico goteado	59
6.5.4.- Conclusiones.....	61
6.6.- Resultados y discusión del ácido oxálico sublimado	
6.6.1.- Evolución de las colmenas.....	62
6.6.2.- Evolución de la mortalidad de Varroa.....	63
6.6.3.- Eficacia del ácido oxálico sublimado	64
6.6.4.- Conclusiones.....	67
7.- VALORACIÓN DE EFICACIA DEL HONGO <i>TOLYPOCLADIUM CYLINDROSPORUM</i> (Iñigo Zabalgogea González).....	68
7.1.- Administración del hongo <i>Tolytocladium cylindrosporum</i> Cepa Tc11 en las colmenas del Grupo III y de la cepa Tc3398 en las colmenas del Grupo VII	70
7.2.- Seguimiento de la mortalidad de Varroa.....	73
7.3.- Cultivo y análisis de los ácaros Varroa muertos.....	75
7.4.- Aplicación de un acaricida de contraste.....	76
7.5.- Evaluación de la eficacia de las cepas del hongo <i>T. cylindrosporum</i> probado	77
7.6.- Resultados y discusión de la cepa Tc11 de <i>T. cylindrosporum</i>	
7.6.1.- Evolución de las colmenas.....	77
7.6.2.- Evolución de la mortalidad de Varroa.....	78
7.6.3.- Eficacia del hongo <i>T.cylindrosporum</i> cepa Tc11.....	79
7.6.4.- Conclusiones.....	81

7.7.- Resultados y discusión de la cepa Tc3398 de *T. cylindrosporum*

7.7.1.- Evolución de las colmenas.....	81
7.7.2.- Evolución de la mortalidad de Varroa	82
7.7.3.- Eficacia del hongo <i>T.cylindrosporum</i> cepa Tc3398	84
7.7.4.- Conclusiones	87

8.- EVALUACIÓN DE CONTENIDO DE CUMAFÓS RESIDUAL EN TIRAS DE CHECKMITE® ANTES Y DESPUÉS DEL PERIODO DE RESIDENCIA EN LAS COLMENAS (*M^a Jesús Sánchez Martín*) 88

8.1.- Material

8.1.1.- Fórmula estructural del cumafós	88
8.1.2.- Fórmula molecular del cumafós.....	88
8.1.3.- Propiedades físicas del cumafós	88
8.1.4.- Aplicaciones	88
8.1.5.- Toxicidad	89

8.2.- Métodos experimentales

8.2.1.- Evaluación cualitativa.....	89
8.2.2.- Evaluación cuantitativa	89

8.3.- Resultados obtenidos

8.3.1.- Evaluación cualitativa.....	91
8.3.2.- Evaluación cuantitativa	92

8.4.- Evaluación de resultados

8.4.1.- Evaluación de cumafós en las tiras de Checkmite® iniciales para análisis inicial (M0)	95
8.4.2.- Evaluación de cumafós en las tiras de Checkmite® correspondientes a los lotes de tiras que fueron introducidas en las colmenas (M1 y M2).....	95
8.4.3.- Evaluación de cumafós en las tiras de Checkmite® correspondientes a los lotes de tiras que fueron introducidas en las colmenas (M1 y M2) después de ser retiradas de las colmenas	96

9.- DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN CERA ANTES Y DESPUÉS DE REALIZAR LOS TRATAMIENTOS FRENTE A VARROA (*M^a Dolores Sánchez Escudero y Fernando Calatayud Tortosa*)..... 99

9.1.- Toma de muestras de cera de las colmenas.....	99
9.2.- Técnicas de análisis de cera.....	100

9.3.- Resultados obtenidos

9.3.1.- Resultados de las muestras de cera tomadas al inicio del estudio..... 100

9.3.2.- Resultados de las muestras de cera tomadas al final del estudio..... 102

9.4.- Evaluación de resultados

9.4.1.- Evaluación de plaguicidas en cera al inicio del estudio 103

9.4.2.- Evaluación de plaguicidas en cera al finalizar el estudio..... 104

10.- VALORACIÓN DE LA EFICACIA DE ATRAYENTE PARA AVISPA Y AVISPÓN 106

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA..... 107

1.- INTRODUCCIÓN

Actualmente la varroosis es el principal problema de la apicultura a nivel sanitario, tratándose de la enfermedad de las colonias de abejas más importante, y la única que obliga a realizar un tratamiento sistemático de la colmena para que los efectos del parásito no influyan negativamente en el rendimiento o incluso la viabilidad de la misma.

La varroosis está causada por ácaros del género *Varroa*. Esta parasitosis fue descrita en *Apis mellifera* por primera vez a mediados del siglo XX, asumiendo que el causante era la especie *Varroa jacobsoni*, que por entonces parasitaba colonias de abejas de la miel asiáticas, sobre todo la especie *Apis cerana*. En los años 60-70 se confirmó la aparición de la varroosis como una patología incipiente de la abeja de la miel occidental *Apis mellifera* y a finales de los años 80 el parásito ya se había detectado en la mayor parte de Europa, en el continente americano y norte de África, causando estragos en las colmenas y enjambres silvestres a su paso. En España se detectó por primera vez en 1985, pero en 1988 ya se podía encontrar en todo el territorio peninsular y provocó una enorme pérdida de colmenas, entre el 30-50%. En la actualidad, se considera que el ácaro más virulento que parasita las colonias de la abeja occidental *Apis mellifera*, que puede diferenciarse a nivel morfológico y molecular de *Varroa jacobsoni*, pertenece a una nueva especie bautizada como *Varroa destructor*, un nombre que refleja sus efectos sobre la apicultura mundial.

Los problemas provocados por la varroosis se han acentuado en España en los últimos años. La dependencia de los acaricidas de síntesis ha transferido a la apicultura el problema de la generación de resistencias del parásito a estos productos.

Durante las últimas temporadas comienzan a ser demasiado frecuentes los casos de infestaciones elevadas, de colmenas que necesitan más de un tratamiento anual para controlar el parásito, e incluso noticias de mortalidad de colmenas por la acción directa o indirecta de la varroosis, hechos que vienen ocurriendo de forma recurrente.

Las materias activas más usadas desde la primera detección de *Varroa* en 1985, han perdido progresivamente eficacia a causa de las estrategias del parásito para evadir la acción de estos productos. La persistencia de este ácaro, contra el que nuestras abejas todavía no saben defenderse, sigue comprometiendo en muchos casos el rendimiento de la apicultura e incluso la supervivencia de nuestras colmenas. Es urgente instaurar métodos de lucha contra *Varroa* más perdurables y un uso más racional de las materias activas disponibles que nos ofrezcan garantías para seguir preservando la calidad de los productos apícolas.

Desde que a primeros de los 90 se detectaron los primeros casos de resistencia al fluvalinato, quizás el producto más usado contra la varroosis, se han sucedido las evidencias de este hecho en la mayoría de los países europeos y en Estados Unidos. En nuestro país se generalizó el uso de este piretroide en 1988 y cinco- seis años después, tanto apicultores como técnicos, ya constataron casos frecuentes de pérdida de eficacia, indicio muy probable de la aparición de ácaros tolerantes a este producto. Luego han seguido los casos de resistencia al amitraz, el cumafós y la flumetrina, por citar las materias activas de uso más frecuente en el control de la varroosis.



Foto 1. Varroas sobre abejas en colonia objeto de estudio

2.- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Según los datos de la Subdirección General de Productos Ganaderos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de mayo de 2015, Castilla y León es la comunidad autónoma que cuenta con mayor número de explotaciones inscritas en el Registro General de Explotaciones Ganaderas, concretamente 4.546 explotaciones, lo que supone el 16,5% del censo nacional de explotaciones apícolas. Sin embargo, más del 88% de estas explotaciones (4.013) son no profesionales, y únicamente 533 explotaciones, el 11,7%, son profesionales, es decir, que están constituidas por 150 colmenas o más.

Por otro lado, según los datos proporcionados por la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León, dentro de nuestra Comunidad Autónoma, León es la provincia con mayor número de explotaciones apícolas registradas (1.537), pero cuenta con un censo de 40.289 colmenas. Sin embargo Salamanca, que únicamente tiene 555 explotaciones apícolas, es la provincia que no sólo posee el mayor número de colmenas, alcanzando las 271.496, sino que además dispone del mayor número de apicultores profesionales, cerca del 70%, y que manejan alrededor de 250.000 colmenas.

Otra característica de las explotaciones apícolas de la provincia de Salamanca es su carácter eminentemente trashumante para aprovechar las floraciones de otras Comunidades Autónomas, especialmente Extremadura y Andalucía o del país vecino Portugal. De las 555 explotaciones apícolas registradas en Salamanca, 475 (el 86%) son trashumantes y mueven anualmente el 99,50% del censo total, 270.148 colmenas.

El sector apícola se enfrenta a una difícil situación sanitaria, con casos muy frecuentes de infestaciones elevadas de las colonias de abejas por Varroa, que provocan una elevada mortalidad de colmenas, ante la escasez de medicamentos veterinarios presentes en el mercado para su control y la falta de eficacia o aparición de resistencias del parásito a los productos usados. A nivel general, se han descrito casos de ácaros resistentes a todas las materias activas más utilizadas contra Varroa como fluvalinato, amitraz, cumafós y flumetrina. Otra problemática inherente al uso de acaricidas de síntesis es la acumulación de residuos de acaricidas en la cera de las colonias de abejas.

Como consecuencia de la importancia de la actividad apícola en Castilla y León y dada la problemática sanitaria a la que se enfrenta el sector apícola, se justifica perfectamente la ejecución de un estudio de lucha frente a la varroosis, realizado en colmena Layens, colmena utilizada por el 80% de los apicultores españoles y mayoritaria en Salamanca. El estudio se ha ejecutado en esta provincia, que dispone del mayor número de apicultores profesionales y de colmenas y persigue que los resultados permitan a los apicultores mejorar la lucha contra esta parasitosis en sus explotaciones apícolas y mantener su viabilidad.

3.- OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Este estudio de campo en colmenas Layens abarca distintos aspectos de la lucha frente a la Varroa:

1.- Ensayos de valoración de la eficacia frente a la Varroa de distintos principios activos (amitraz y cumafós) de los medicamentos veterinarios autorizados por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios que se han empleado en los últimos años.

2.- Ensayos de valoración de la reversión de la eficacia de sustancias activas (fluvalinato) de medicamentos veterinarios que se emplearon hace tiempo y frente a los que Varroa habría generado resistencia.

3.- Ensayos de campo para valorar la eficacia de productos orgánicos (ácido oxálico), administrado en las colmenas de dos formas diferentes: goteado y sublimado.

4.- Ensayos de campo para valorar la eficacia frente a la Varroa de hongos entomopatógenos (lucha biológica).

5.- Análisis para valorar la liberación de los principios activos de los soportes usados en los medicamentos veterinarios autorizados (cumafós).

6.- Valoración de la presencia de residuos de plaguicidas y de los acaricidas empleados en la cera de las colmenas.

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- Colmenas experimentales

Para realizar este estudio se seleccionaron colmenas de una explotación apícola trashumante de la provincia de Salamanca, ya que se trata de la provincia de nuestra Comunidad Autónoma con mayor número de explotaciones apícolas profesionales y de colmenas censadas en el Registro de explotaciones apícolas de Castilla y León.

El control de la varroosis en el colmenar escogido se había realizado con un tratamiento de cumafós (Checkmite®) durante los años 2011, 2012 y 2013, como único tratamiento administrado en otoño y con un intervalo anual entre tratamientos. En 2014, el principio activo escogido para lucha contra la Varroa fue el amitraz (Apitraz®), aplicado en el otoño de este año.

El historial de tratamientos aplicados frente a la Varroa en esta explotación apícola la hacía idónea para el estudio, ya que en ésta se había utilizado cumafós y amitraz para el control de la varroosis, siendo un ejemplo representativo de la rotación de principios activos que se ha efectuado en la mayor parte de las explotaciones apícolas de Castilla y León.

Dentro de la explotación se escogieron 40 colmenas pobladas tipo Layens, que se asentaron en la finca experimental Muñovela, de 70 hectáreas, perteneciente al término municipal de Barbadillo, situada a 15 kilómetros de Salamanca, propiedad de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas y gestionada por el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, IRNASA-CSIC de Salamanca, que cuenta con superficie de encinar y pastos y con charcas de agua, necesarias para cubrir las necesidades de las abejas.



Foto 2. Disposición del asentamiento del colmenar estudio en finca adehesada

Para este estudio se establecieron 8 grupos de colmenas, constituido cada uno por 5 colonias de abejas:

- ✓ GRUPO I: usado para ensayar la eficacia del fluvalinato.
- ✓ GRUPO II: usado para ensayar la eficacia del amitraz.
- ✓ GRUPO III: usado para ensayar la eficacia del tratamiento con el hongo entomopatógeno *Tolypocladium cylindrosporum*, cepa Tc11.
- ✓ GRUPO IV: usado para ensayar la eficacia del ácido oxálico goteado.
- ✓ GRUPO V: usado para ensayar la eficacia del ácido oxálico sublimado.
- ✓ GRUPO VI: usado como grupo de control o testigo para los acaricidas de síntesis.
- ✓ GRUPO VII: usado para ensayar la eficacia del tratamiento con el hongo entomopatógeno *Tolypocladium cylindrosporum*, cepa Tc3398.
- ✓ GRUPO VIII: usado para ensayar la eficacia del cumafós.



Foto 3. Disposición del asentamiento del colmenar estudio en finca adehesada



Foto 4. Imagen de dehesa alrededor del colmenar estudio en finca Muñovela

En primavera, se llevaron a cabo unas pruebas preliminares para la administración de las dos cepas del hongo entomopatógeno *Tolypocladium cylindrosporium* en las colmenas, al objeto de valorar la dosis y la vía de aplicación de los mismos antes de comenzar este estudio global, que se realizó en septiembre de 2015. Se ha escogido esta estación del año, el otoño, al objeto de reproducir fielmente en el campo, el momento y el estado en el que se encuentran las colmenas cuando se realiza el tratamiento anual frente a varroosis en las colmenas de Castilla y León, entre septiembre y noviembre de cada año.

Las colmenas experimentales se equiparon con fondos sanitarios, que constan de una malla y un doble fondo, en el que se colocan unas láminas de cartulina cuadrículadas impregnadas con vaselina filante donde se recogen y retienen los restos de la colmena. Estas láminas se renuevan periódicamente y permiten posteriormente contar los ácaros *Varroa* caídos entre los residuos de la colmena. Se contabilizaron las *Varroas* caídas en los fondos por el tratamiento acaricida ensayado y después durante la aplicación del acaricida de contraste. El método seguido para evaluar la eficacia está ampliamente reconocido en la bibliografía consultada y en nuestro caso, además, se realiza un enjaulado de la reina para provocar ausencia de cría y permitir que el acaricida de contraste consiga una eficacia máxima. El conteo periódico de ácaros caídos se realizó hasta que los valores fueron mínimos.



Foto 5. Caja experimental vacía adaptada con fondo sanitario



Foto 6. Fondo sanitario de colmena con lámina de cartulina impregnada con vaselina filante

Las colmenas se aislaron del suelo, para evitar el humedecimiento de las láminas de cartulina por la lluvia y la interferencia de otros animales en los resultados de Varroas caídas, utilizando ladrillos para elevarlas, ya que el uso de hierros convencionales era incompatible con el sistema de apertura de los fondos sanitarios de las colmenas experimentales. Cada grupo de colmenas estaba separado del siguiente por un espacio suficiente para evitar la deriva de abejas pecoreadoras.



Foto 7. Colmenas aisladas del suelo mediante ladrillos

4.2.- Inspección inicial de las colmenas

Antes de iniciar este estudio se efectuó una inspección de todas las colmenas, para valorar su estado y establecer el nivel de parasitación inicial de Varroa de las colonias con el fin de determinar su idoneidad para realizar este estudio. En primer lugar, se midió la superficie de los panales ocupada por cría.



Foto 8. Panal de una colmena con cría operculada



Foto 9. Cuadros con cría operculada de una colonia objeto de estudio



Foto 10. Estimación de los panales ocupados por cría operculada

La cantidad de cría fue obtenida mediante una estimación subjetiva del número de dm^2 de panel ocupados por cría de abejas, realizada siempre por el mismo observador con la ayuda de una cuadrícula de acetato superpuesta al panel. Este valor fue transformado en número de celdillas mediante la aplicación del factor $380 \text{ celdillas}/\text{dm}^2$.

En segundo lugar, se realizó una estimación del porcentaje de parasitación de *Varroa* en la cría operculada, mediante la desoperculación de celdillas de cría y el conteo de los parásitos presentes.

Actualmente, este método, no sólo nos permite realizar un diagnóstico de *Varroa* en las colonias de abejas, sino que permite cuantificar el grado de parasitación de las mismas. Se trata de un método de fácil aplicación, que consiste en desopercular con un cuchillo una zona de 10 cm. de un panal de cría operculada, extraer las pupas y contar las *Varroas* existentes en esa cría.

Este método es más fiable que otros, como el conteo de parásitos sobre las abejas adultas, ya que en ocasiones no es fácil observar a simple vista las *Varroas* adheridas a las abejas, ya que su cuerpo aplanado dorsalmente les permite introducirse entre los anillos abdominales de la abeja. Además, como un mecanismo de adaptación frente al uso frecuente de los acaricidas de contacto que actúan únicamente contra los ácaros que están sobre las abejas adultas, el ácaro ha reducido el tiempo de la fase forética de su ciclo biológico, es decir, el tiempo que vive sobre las abejas adultas alimentándose de su hemolinfa antes de introducirse en una celdilla de cría a punto de ser operculada para iniciar su ciclo reproductivo, por lo que la presencia de *Varroa* en su fase forética es algo menor y más variable.

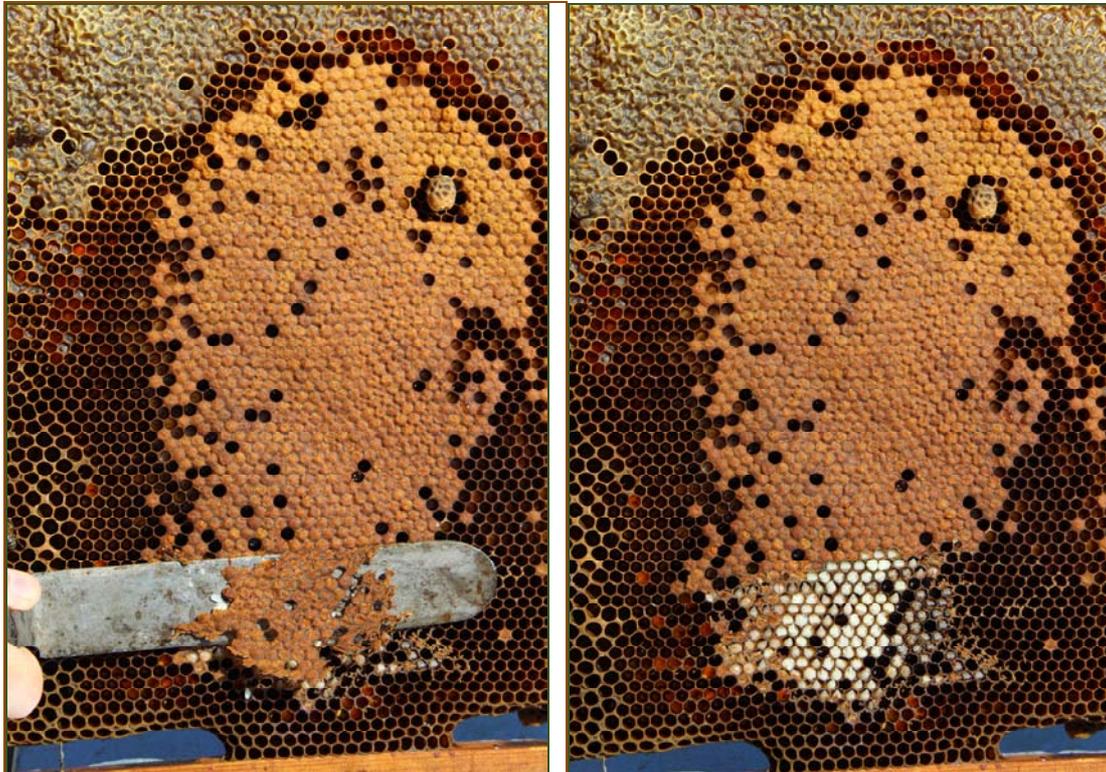


Foto 11. Desoperculación de celdillas de cría operculada



Foto 12. Desoperculación de celdillas de cría operculada

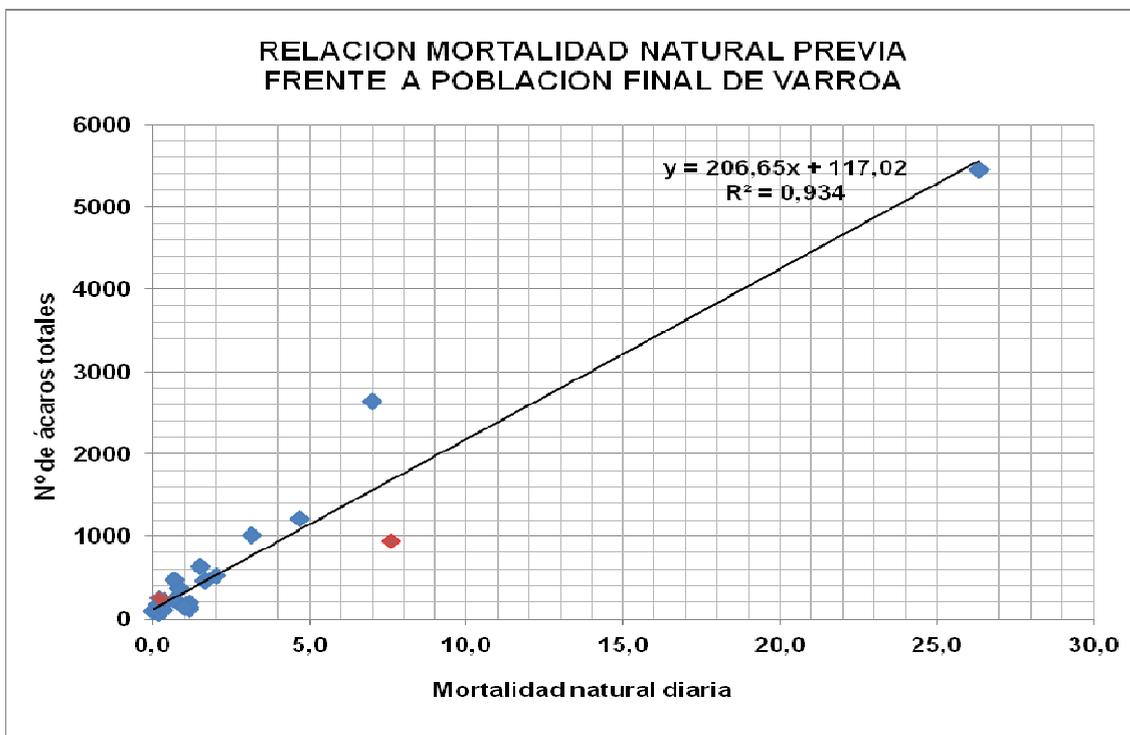


Foto 13. Observación de Varroa sobre cría recién desoperculada

Con los datos obtenidos sobre el porcentaje de parasitación de la cría y el número de celdas de cría en cada colonia, se estimó la población aproximada de Varroa en el interior de la cría operculada en el momento inicial del estudio.

La segunda estimación del nivel de parasitación inicial de las colonias de abejas fue la mortalidad natural previa. Se realizaron controles de seguimiento de la caída de Varroas en los fondos sanitarios durante dos semanas antes de iniciar el estudio, ya que estos datos de infestación previa de las colonias son primordiales para establecer la viabilidad del ensayo.

En la siguiente gráfica se establece la relación de la mortalidad natural previa frente a la población final de Varroa en las colmenas. Para ello, hemos utilizado datos procedentes de la bibliografía consultada sobre otros ensayos realizados con la misma metodología, interpolando el menor y el mayor valor de la mortalidad natural previa diaria obtenida en nuestro estudio, representados en la gráfica en color rojo.



GRÁFICA 1

El número total de ácaros de las colmenas sometidas al estudio se encontraban en el rango de 300-3.000 Varroas, excepto las colmenas nº 36, nº 37 y nº 40 del Grupo VIII, aunque el estado general y el vigor inicial de las colonias garantizaba la viabilidad del ensayo. Aunque la infestación de Varroa es algo superior al resto de los grupos, podemos considerar que la carga parasitaria está distribuida en una mayor población de abeja y cría.

Además, se anotaron otros datos representativos que pudieran ser relevantes para el desarrollo del ensayo, como los panales ocupados por abejas y las reservas de miel presentes en cada colmena.



Foto 14. Cuadro de abejas y de miel de una colonia objeto de estudio



Foto 15. Cuadro con polen de una colonia objeto de estudio

5.- VALORACIÓN DE EFICACIA DE LOS ACARICIDAS DE SÍNTESIS

5.1.- Tratamiento con fluvalinato en las colmenas del Grupo I, con amitraz las del Grupo II y con cumafós las del Grupo VIII. Seguimiento de la mortalidad de Varroa.

Tres grupos de 5 colmenas experimentales se dedicaron a evaluar la eficacia en campo de los productos comerciales Apistan®, Apitraz® y Checkmite®, cuyas materias activas son fluvalinato, amitraz y cumafós respectivamente. Se realizaron controles antes del tratamiento de las colonias con estos acaricidas de síntesis sometidos al ensayo, para establecer la tasa de mortalidad natural previa. Este dato pone de manifiesto el efecto del acaricida mediante el contraste entre la mortalidad natural previa y la que se produce después de colocar las tiras del producto ensayado.

Las colmenas del Grupo I recibieron un tratamiento acaricida contra la varroosis con 2 tiras de fluvalinato, a las 5 colmenas del Grupo II se les administraron 2 tiras de amitraz, y las colmenas del Grupo VIII se trataron con 2 tiras de cumafós, dejando las colmenas del Grupo VI, como control o testigo, no administrándoles ningún tratamiento contra Varroa durante el periodo de tiempo en el que se trataron las colmenas de estos tres grupos.

Las tiras de los acaricidas fluvalinato y cumafós se suspendieron mediante alambres, o directamente en el caso del amitraz, de la forma recomendada para las colmenas Layens, entre los panales de cría a ambos lados del nido, de tal forma que toda la superficie de la tira fuera accesible a las abejas y se mantuvieron 42 días en el interior de las colmenas de los Grupos I, II y VIII.



Foto 16. Colocación de las tiras de fluvalinato en una colonia objeto de estudio



Foto 17. Colocación de las tiras de amitraz en una colonia objeto de estudio



Foto 18. Colocación de las tiras de cumafós en una colonia objeto de estudio

Desde este momento se realizó un seguimiento continuo de la caída de Varroas afectadas por el acaricida y recogidas en los fondos sanitarios, efectuándose a intervalos de 3-4 días para facilitar el conteo durante los días de mayor mortalidad e impidiendo que se mezclaran con el detritus e impurezas procedentes de la limpieza de la colmena.



Foto 19. Retirada de lámina de cartulina impregnada con vaselina filante

Se contabilizaron las Varroas recogidas en las láminas del fondo de las colmenas de los Grupos I, II, VI y VIII en cada intervalo, usando una lupa con luz para facilitar el conteo y contadores manuales que se comercializan para este fin.

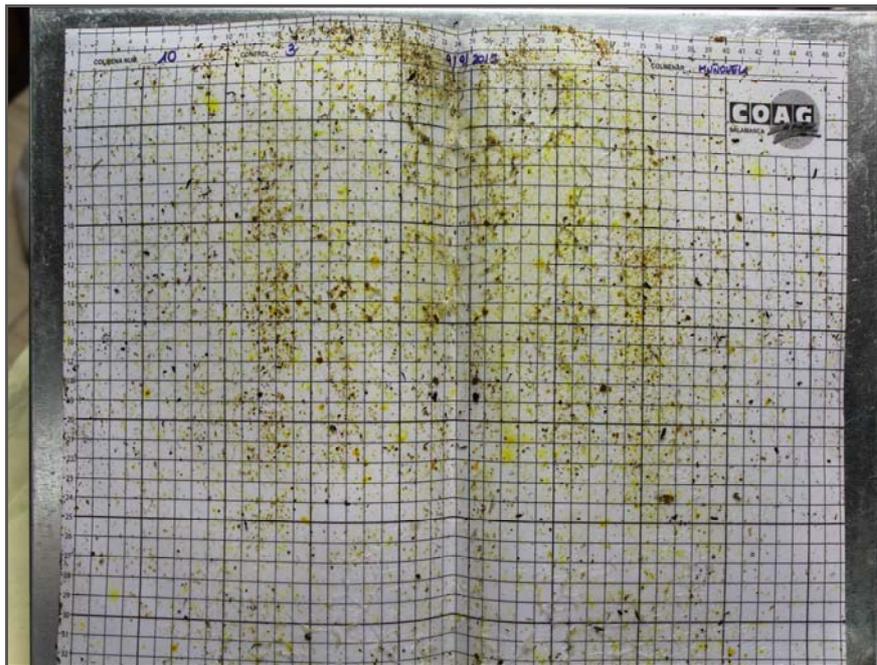
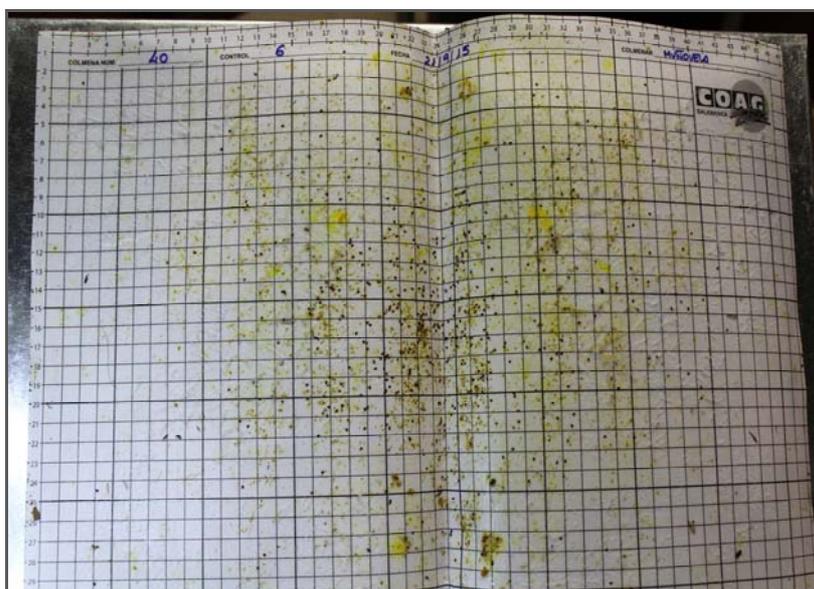
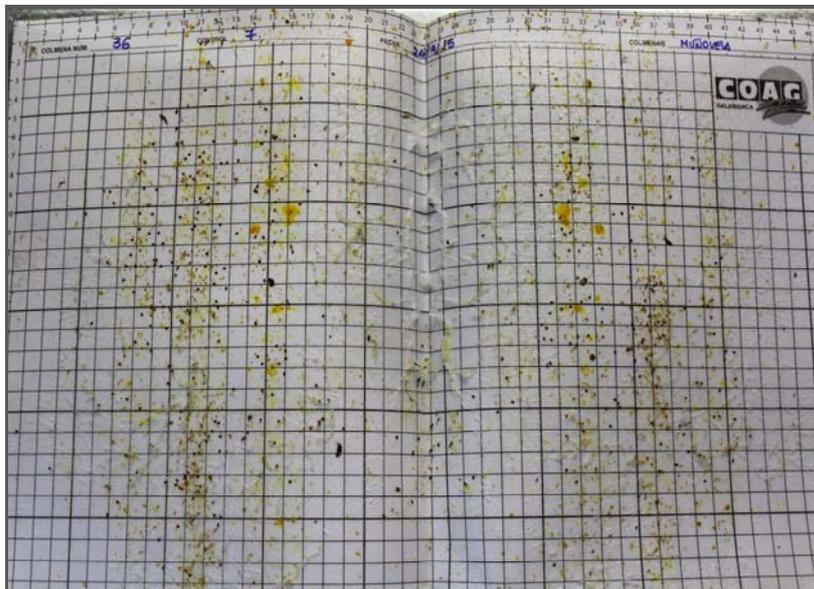
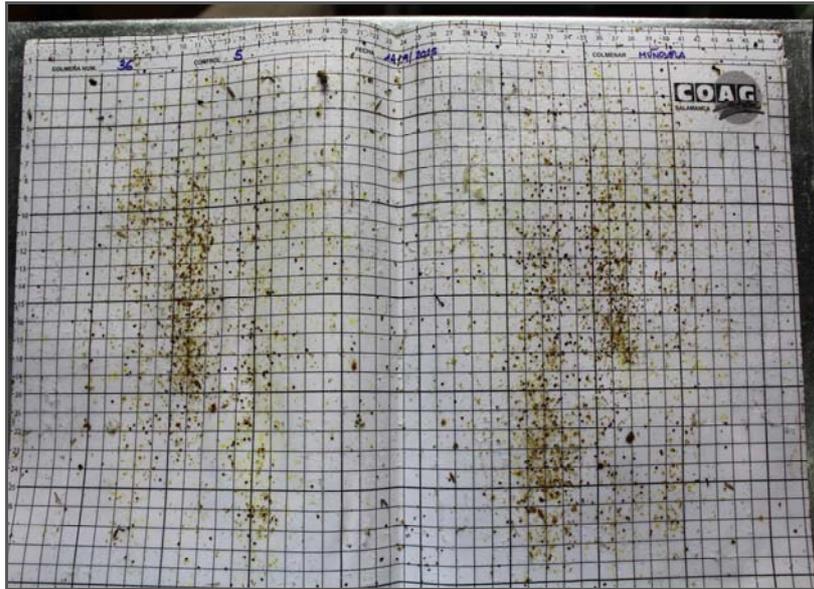


Foto 20. Retirada de lámina de cartulina impregnada con vaselina filante



Fotos 21,22 y 23. Láminas de cartulina retiradas de los fondos sanitarios

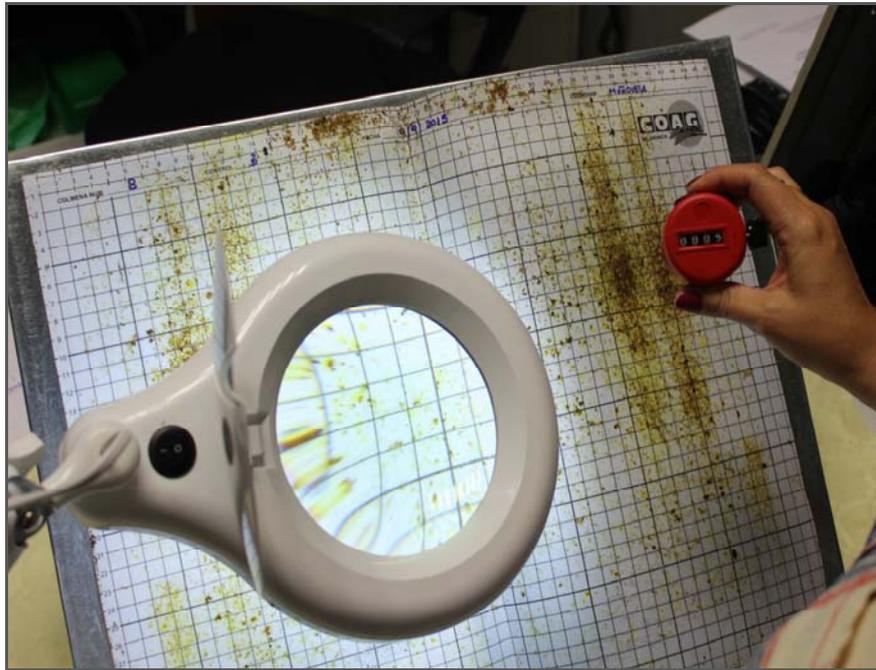


Foto 24. Lupa para observar una lámina de cartulina y contador manual

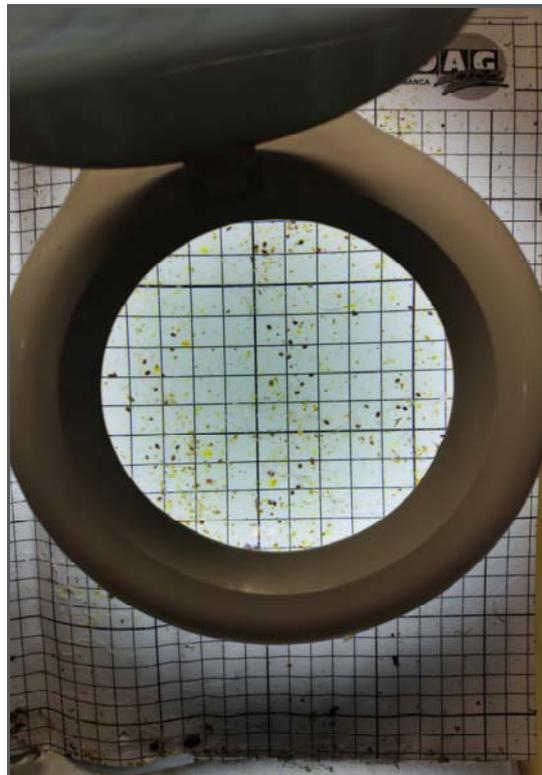
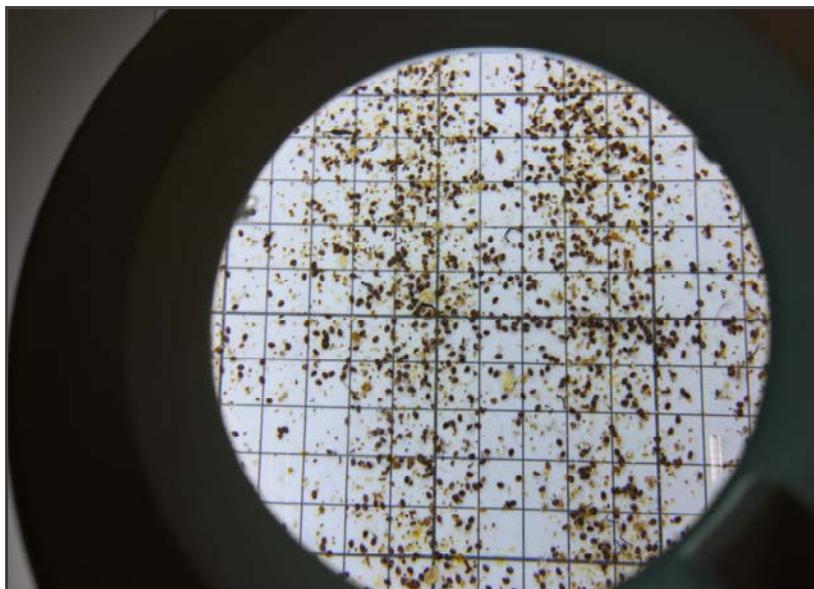
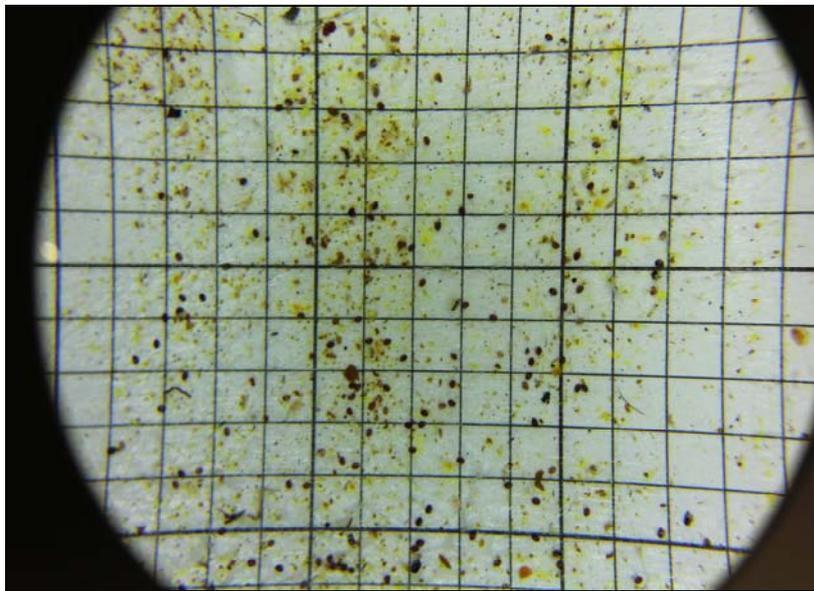
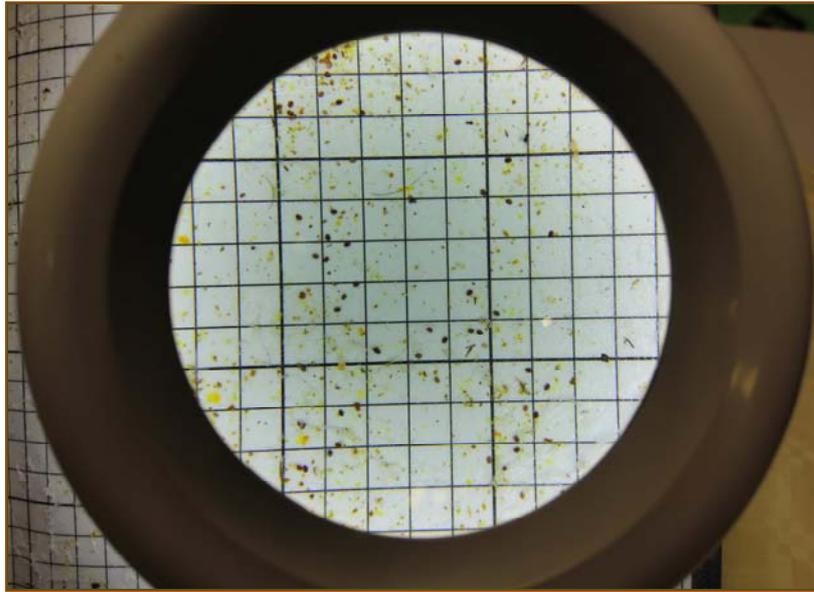
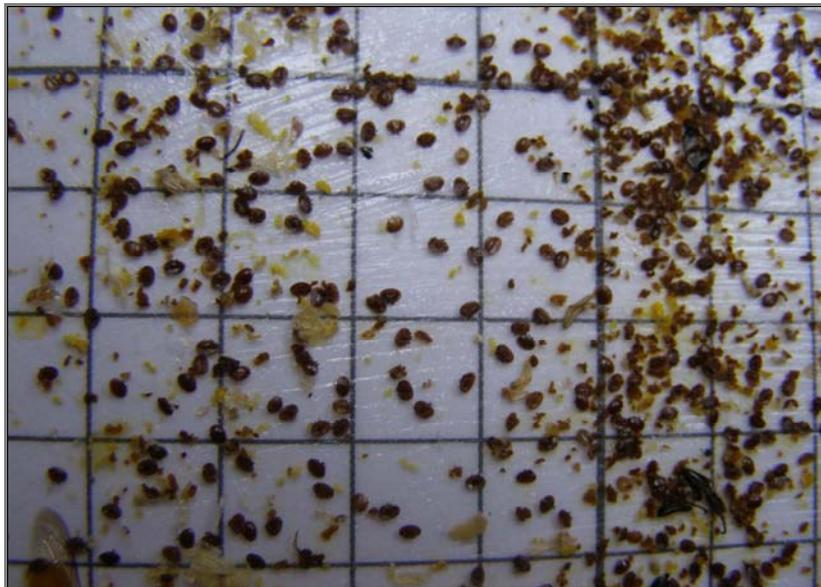
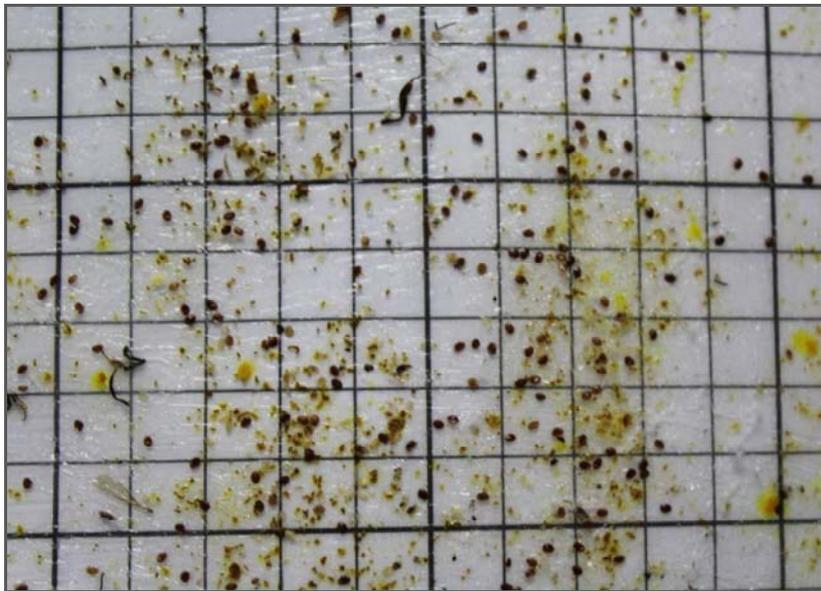
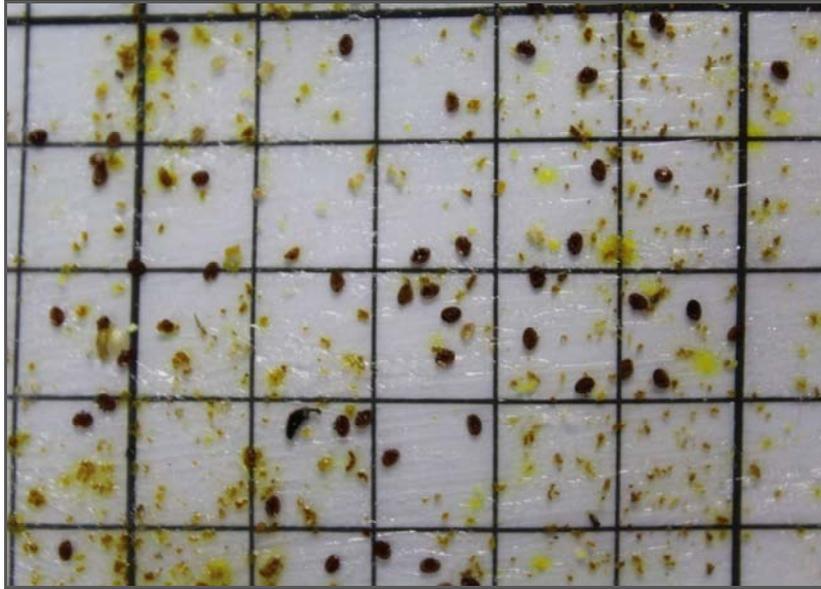


Foto 25. Observación con lupa de una lámina de cartulina de un fondo sanitario



Fotos 26,27 y 28. Observación con lupa de láminas de cartulina de fondos sanitarios



Fotos 29,30 y 31. Imagen de lámina de cartulina con Varroas y restos de la colmena

5.2.- Retirada de los acaricidas probados: fluvalinato, amitraz y cumafós

Transcurridos 42 días después de haber introducido las 2 tiras con fluvalinato en las colmenas del Grupo I y las 2 tiras con amitraz y cumafós en las colmenas de los grupos II y VIII respectivamente, se procedió a la retirada de las tiras de contacto.



Foto 32. Momento de retirada de una tira del acaricida fluvalinato



Foto 33. Vista desde arriba de dos tiras con amitraz antes de ser retiradas



Foto 34. Momento de retirada de una tira del acaricida cumafós

5.3.- Enjaulado de las reinas y aplicación de un acaricida de contraste

Debido a la presencia de cría en las colonias de abejas, se procedió al enjaulado de las reinas de las 5 colmenas de cada uno de los 3 grupos sometidos al estudio para provocar una ausencia total de cría y exponer así progresivamente a los ácaros Varroa, que habían soportado la acción del fluvalinato (Grupo I), amitraz (Grupo II) y cumafós (Grupo VIII), al acaricida de contraste elegido.



Foto 35. Observación de la reina en una de las colonias objeto de estudio



Foto 36. Captura de la reina de una de las colonias para su enjaulado



Foto 37. Observación de la reina en el interior de la jaula



Fotos 38 y 39. Disposición en un panel de la jaula con la reina en su interior

En ese mismo momento se aplicó un acaricida de contraste, escogiéndose el cumafós para los Grupos I y II, tratados con fluvalinato y amitraz respectivamente, y el amitraz para las colonias del Grupo VI (control) y Grupo VIII, tratadas con cumafós previamente. Para ello se utilizaron 2 tiras con los principios activos elegidos en cada colmena, que se debían mantener durante al menos 42 días en el interior de las mismas o en todo caso hasta que la caída de Varroa dejara de ser significativa. Las tiras se suspendieron entre los panales, de tal forma que toda la superficie de la tira fuera accesible a las abejas. Este segundo tratamiento, actuando en ausencia de cría debe provocar la caída de todas las Varroas que superaron la acción del fluvalinato en el caso del Grupo I, del amitraz en las colmenas del Grupo II y del cumafós en las del Grupo VIII. Esta metodología garantiza una gran fiabilidad y no implica la destrucción de la colmena.



Foto 40. Tira de contraste de cumafós en las colonias de los Grupos I y II



Foto 41. Tira de contraste de amitraz en las colonias del Grupo VIII y Grupo VI

5.4.-Evaluación de la eficacia de los acaricidas probados

Contabilizando las Varroas caídas en los controles realizados en las colmenas a lo largo de todo el estudio hasta su finalización, se pudo determinar el número de Varroas totales presentes en las colonias de abejas. El conocimiento de este dato, así como las Varroas caídas durante la aplicación del fluvalinato en las colmenas del Grupo I, del amitraz en el las del Grupo II y del cumafós en las colmenas del Grupo VIII permitieron evaluar la eficacia de estos acaricidas.

De esta forma se pudo calcular la eficacia acumulada del fluvalinato, amitraz y cumafós en todos los controles del estudio, como el cociente entre las Varroas caídas durante la aplicación de estos principios activos en las colmenas de los Grupos I, II y VIII respectivamente (42 días) y las Varroas totales contabilizadas en cada colmena durante los 109 días en los que se llevó a cabo un seguimiento de la mortalidad.

5.5.- Resultados y discusión del fluvalinato (Apistan®)

5.5.1.- Evolución de las colmenas

Al comienzo del estudio todas las colmenas del Grupo I presentaban actividad de cría, con una media en las 5 colmenas de 2,3 cuadros de cría, en consonancia con su vigor y con la climatología.

En la siguiente tabla se resumen los datos relativos al estado de las colonias del Grupo I y del grupo VI (control) en el inicio del estudio, inmediatamente antes de la colocación de las tiras de fluvalinato. Los parámetros que se incluyen son los panales con cría, el número aproximado

de celdas de cría, las reservas de miel, la población de abejas presentes; así como la presencia o ausencia de *Varroa forética* y de abejas con alas deformadas.

	GRUPO ESTUDIO I					GRUPO CONTROL				
COLMENA	1	2	3	4	5	26	27	28	29	30
Panales de cría inicial	2	2,5	3	2	2	2,5	3	3	0	2,5
Celdillas con cría operculada iniciales	4.085	3.040	4.750	4.750	5.795	4.323	7.600	7.790	0	6.460
Panales de miel	6	11	4	6	6	4	4	5	6	5
Panales con abeja	7	7	5	7	7	6	4	9	4	9
<i>Varroa forética</i>	Si	Si	Si	No	No	No	Si	Si	No	Si
Abejas con alas deformes	No	No	Si	No	No	No	Si	Si	No	Si

TABLA 1. *Panales de cría inicial y celdillas con cría operculada iniciales, panales de miel y panales con abeja de las colmenas del Grupo I del estudio.*

Inicialmente en 3 de las 5 colmenas del Grupo I objeto del estudio, se observaba *Varroa forética* sobre las abejas, concretamente las colmenas nº 1, nº 2 y nº 3 del Grupo I, y las colmenas nº 27, nº 28 y nº 30 del Grupo Control. Asimismo, era evidente la presencia de abejas con alas deformadas y abdomen más reducido en algunas de las colmenas, especialmente en la colmena nº 3 (perteneciente al Grupo I) y las colmenas nº 27, nº 28 y nº 30 (incluidas en el Grupo VI de control). Respecto a los parámetros poblacionales, podemos considerar que son comparables los datos de los dos grupos, exceptuando el caso de la colonia nº 29.

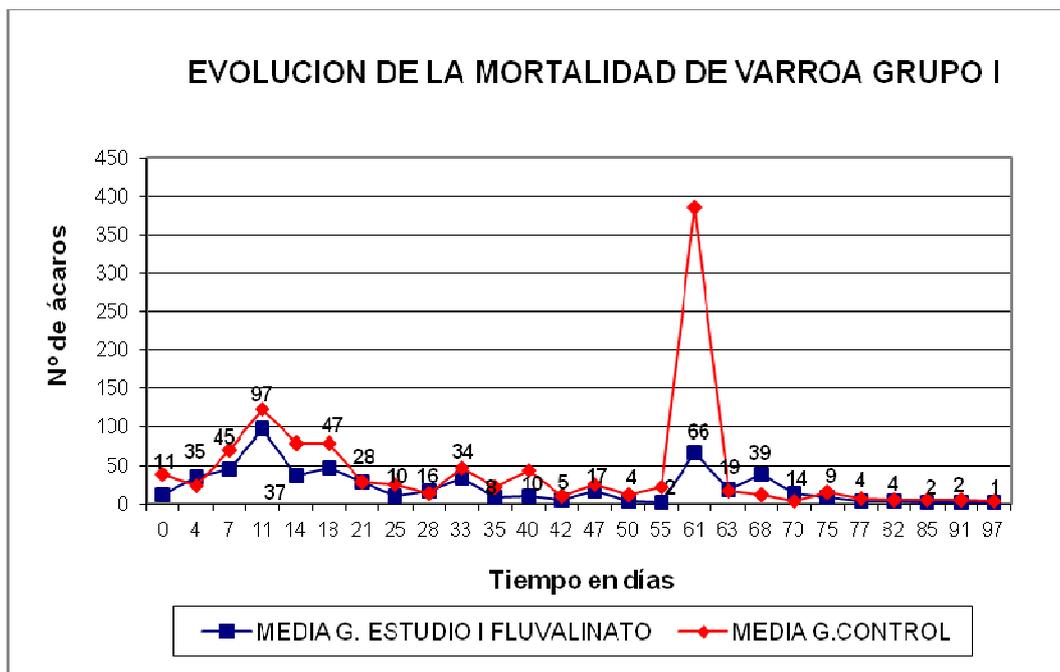


Foto 42. Observación de presencia de abejas con alas deformes

A lo largo del estudio no se ha observado ningún efecto adverso sobre las colonias a causa de la aplicación del tratamiento acaricida con fluvialinato, objeto de estudio.

5.5.2.- Evolución de la mortalidad de Varroa

En la **Gráfica 2** se han representado los valores medios de la mortalidad de Varroa en cada periodo de seguimiento, tanto del Grupo I (media de las 5 colmenas), como del Grupo Control (media de 5 colmenas).



GRÁFICA 2

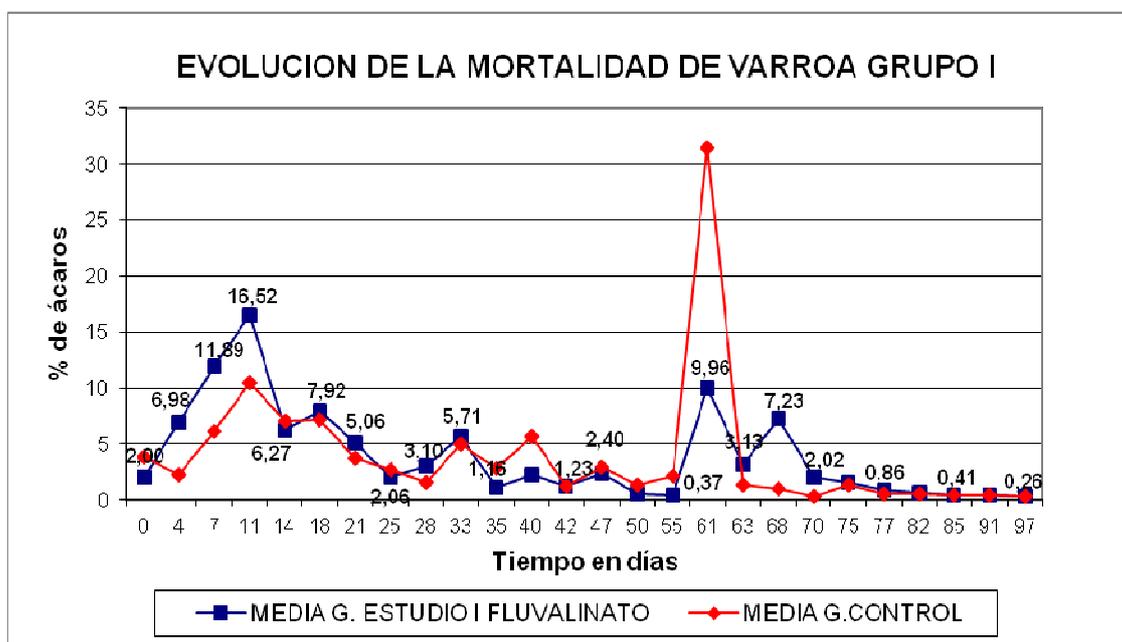
El valor a tiempo cero corresponde a la mortalidad natural previa. Los siguientes puntos hasta el día 42, representan la mortalidad media después de colocar en las colmenas las tiras de fluvialinato, y el resto, desde el día 55 hasta el final se debe al efecto del acaricida de contraste, cumafós en este caso, que nos sirve para estimar la eficacia.

El aumento de la mortalidad después de colocar las tiras de fluvialinato pone de manifiesto su efecto sobre las Varroas foréticas, que son las accesibles al acaricida en cada intervalo. Una parte de las hembras de Varroa que estaban dispuestas a entrar en las celdillas de cría en los días siguientes a la colocación de las tiras se vieron afectadas por el acaricida de contacto y se recogieron en los fondos sanitarios, de ahí el pico en la mortalidad de las Varroas que se alcanza el día 11 tras iniciar el ensayo.

Los ácaros que al inicio del tratamiento se encontraban dentro de la cría operculada estaban protegidos de su efecto hasta la emergencia de la abeja. El acaricida va actuando sobre las hembras de Varroa conforme salen de las celdillas de cría. Aproximadamente a los 12 días tras la aplicación, ya han nacido todas las abejas de las celdas de cría operculada existentes en el

momento de colocar las tiras del producto, por lo que todas las Varroas pueden tener contacto con el acaricida. El efecto del producto sobre las Varroas en este momento se evidencia en la gráfica con una mortalidad que se mantiene elevada hasta el día 18 del estudio. Posteriormente la mortalidad va decreciendo de forma progresiva conforme el principio activo va actuando sobre la Varroa que emerge de la cría de abeja.

La evolución de la mortalidad en el Grupo Control traza un perfil descendente hasta los 42 días debido a la disminución de la cantidad de cría durante este periodo. A partir del día 55, momento en el que se introduce el acaricida de contraste, se produce un pico de mortandad, que pone de manifiesto la efectividad del amitraz y su idoneidad para utilizarse como producto de contraste en el estudio.

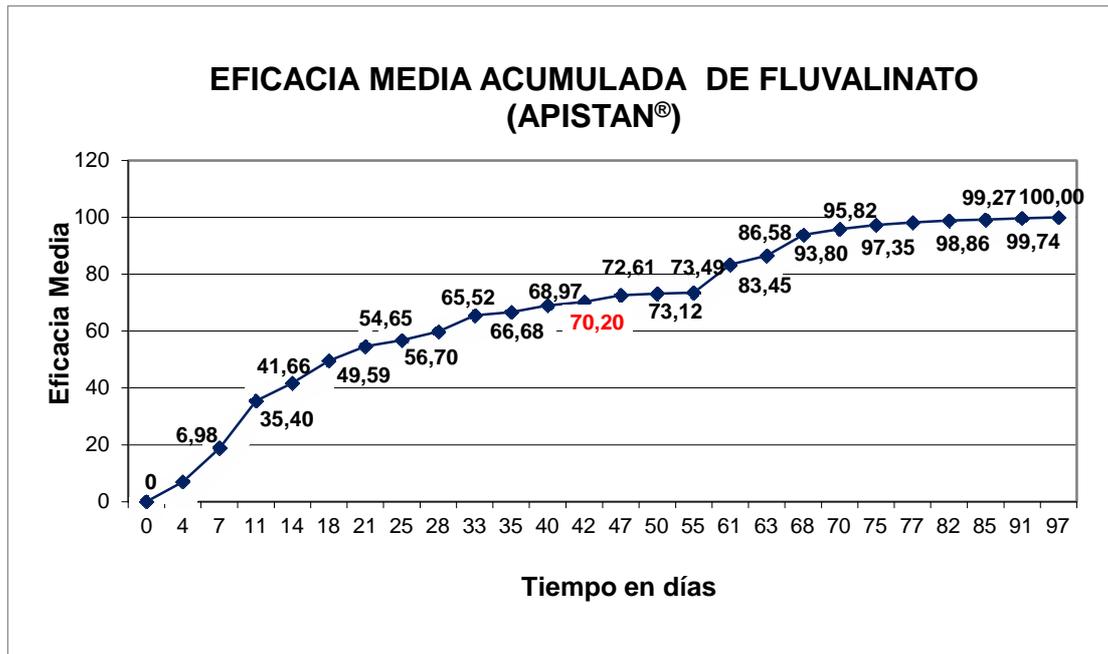


GRÁFICA 3

En la **Gráfica 3** se han representado los valores medios normalizados de la mortalidad de Varroa expresados en porcentaje en cada periodo de seguimiento, de las 5 colmenas del Grupo I y del Grupo Control. Al igual que en la gráfica anterior, el valor a tiempo cero se corresponde con la mortalidad natural previa. Los siguientes puntos hasta los 42 días representan la mortalidad media después de colocar en las colmenas las tiras de fluvalinato, y el resto desde el día 55 al efecto del acaricida de contraste (cumafós).

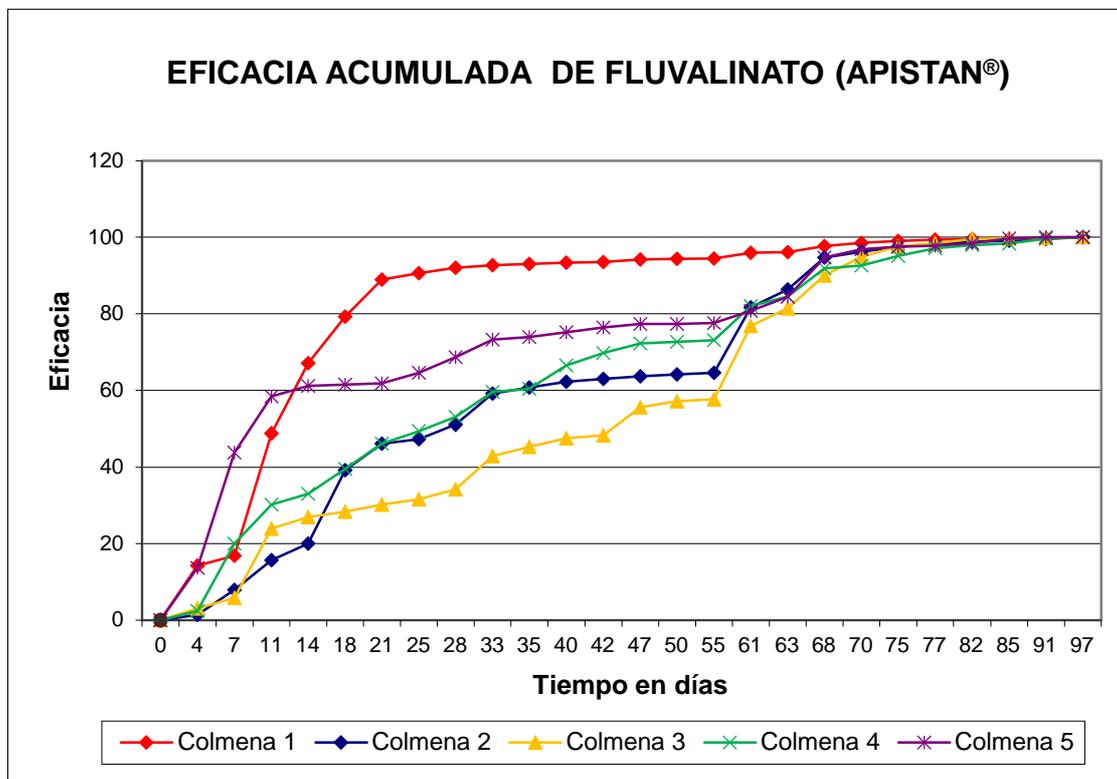
5.5.3.- Eficacia del fluvalinato (Apistan®)

En la **Gráfica 4** se ha representado la eficacia media acumulada en cada intervalo de las colmenas que integran el Grupo I del estudio, alcanzándose a las 6 semanas del tratamiento con el producto, una eficacia media de 70,20%.



GRÁFICA 4

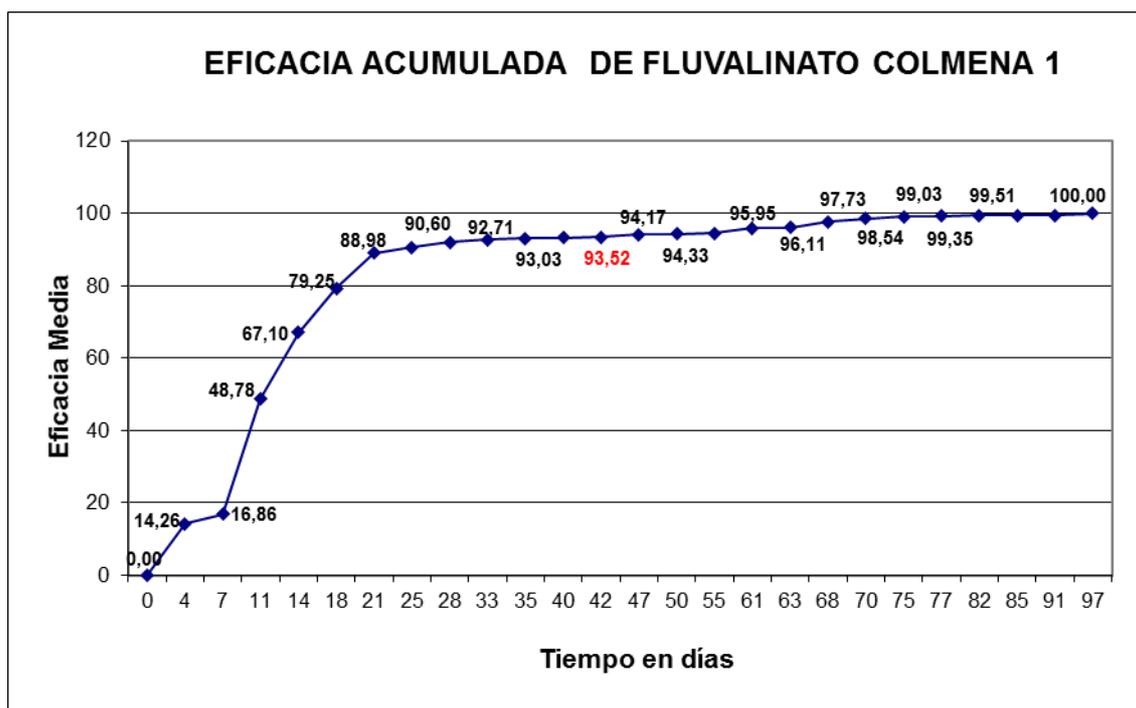
En la **Gráfica 5** se ha representado la eficacia acumulada de cada una de las 5 colmenas del Grupo I para poder apreciar las diferencias en la evolución de la eficacia del acaricida.



GRÁFICA 5

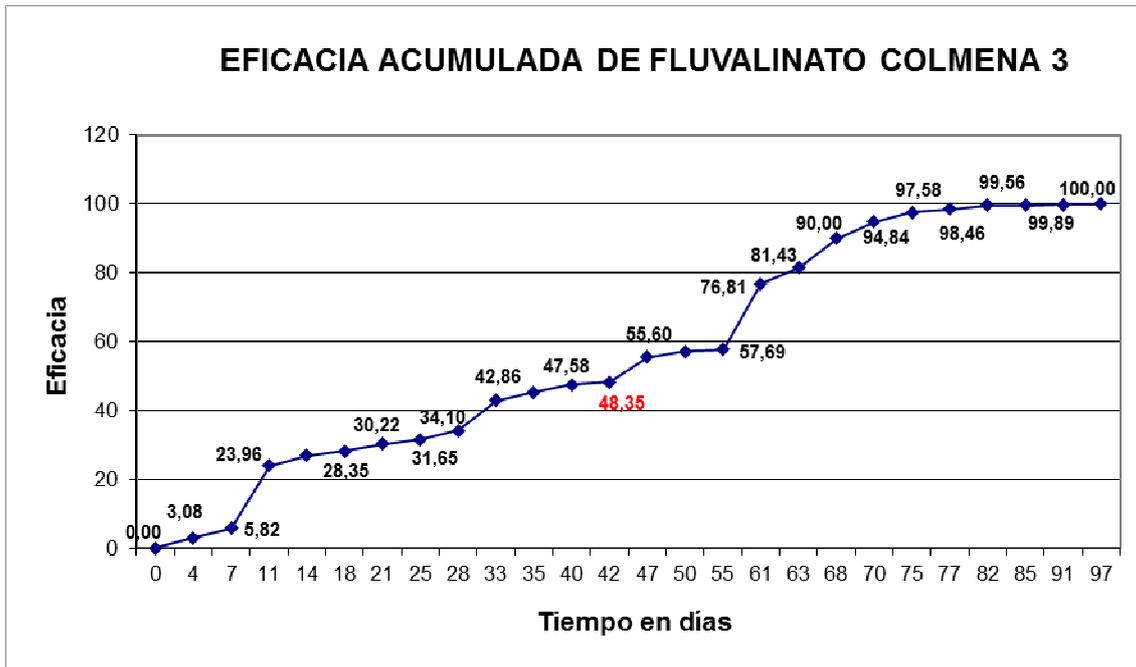
Las diferencias entre las colonias se dan en los valores de cada intervalo. Se puede comprobar que a las 6 semanas de la aplicación del producto, la eficacia se sitúa en un rango entre el 48,35% (valor más bajo correspondiente a la colmena nº 3) y el 93,52% (valor más elevado correspondiente a la colmena nº 1). En las colmenas nº 2, nº 4 y nº 5 la eficacia obtenida es de 62,96%, 69,80% y 76,40% respectivamente, situándose la media de las 5 colmenas en un 70,20%. Esta variabilidad se ha observado en anteriores ensayos de acaricidas cuando se han presentado problemas de eficacia.

En todas las colmenas tratadas con fluvalinato se observa una eficacia que está muy por debajo del valor óptimo recomendable para el control de la varroosis, que se ha establecido por convenio en un 95%. Sólo la colmena nº 1, se acerca a este valor óptimo de eficacia (93,52%) y tiene una curva ascendente típica, tal como se observa en la **Gráfica 6**.



GRÁFICA 6

Sin embargo, en la colmena nº 3 la eficacia es muy baja, y la gráfica correspondiente muestra un aplanamiento, característico en los casos de resistencia a un principio activo por parte de Varroa, tal como se observa en la **Gráfica 7**.



GRÁFICA 7

En la siguiente tabla se presentan los valores de la población de Varroa total al final del estudio y la eficacia alcanzada a las 6 semanas de aplicar el fluvalinato (Apistan®) en las colmenas del Grupo I.

GRUPO ESTUDIO I FLUVALINATO (APISTAN®)			
COLMENA	VARROAS CAÍDAS CON FLUVALINATO	POBLACIÓN TOTAL DE VARROA	EFICACIA (%) A 42 DÍAS
1	577	617	93,52
2	430	683	62,96
3	440	910	48,35
4	171	245	69,80
5	246	322	76,40
Media ± desv.	373 ± 163	555 ± 272	70,20 ± 16,67

TABLA 2. Varroas caídas con fluvalinato, población total de Varroa y eficacia en las colmenas a los 42 días en el Grupo I

En anteriores ensayos también se ha detectado otro factor que afecta negativamente a la eficacia de los acaricidas. La eficacia tiende a ser menor en las colmenas con un nivel de parasitación bajo. Esta tendencia sin embargo, ni siquiera se manifiesta en el estudio del fluvalinato, al ser la colmena nº 3, precisamente la más parasitada de entre las 5 colmenas sometidas al ensayo, la que muestra la eficacia más baja del producto a los 42

días. De todas formas, las poblaciones de *Varroa* encontradas se hayan dentro del rango óptimo para realizar este tipo de ensayos, con un mínimo de alrededor de 300 ácaros y un máximo por encima del umbral de daños.

5.5.4.- Conclusiones

En el Grupo I de colmenas sometido a este estudio, el fluvalinato (Apistan®) no ha mostrado una buena eficacia contra la varroosis.

A la vista de los resultados de este ensayo, creemos que la explicación más plausible para esta baja eficacia del fluvalinato se debe a la resistencia de *Varroa* a este principio activo.

El fluvalinato ha sido la materia activa más utilizada en España contra la varroosis. Se usó durante bastantes años para el control de *Varroa destructor* desde que entró en la península ibérica en 1985, al principio de forma artesanal y posteriormente a través del producto Apistan®, medicamento veterinario autorizado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. A partir de 1996 se describieron los primeros casos de resistencia de *Varroa* a este principio activo. No obstante, al realizar este ensayo se quería comprobar si se había producido una “reversión de la eficacia” del fluvalinato, que permitiera recuperar la acción de este acaricida después de suspender su utilización radicalmente durante cierto tiempo.

A pesar de que en las colmenas seleccionadas para el estudio no se había controlado la varroosis con fluvalinato desde hacía muchos años, no se ha conseguido la reversión de la eficacia de la molécula y en consecuencia no se ha recuperado la eficacia del fluvalinato a pesar de los años que ha estado en desuso. Esta molécula se detecta frecuentemente en la cera, como puede comprobarse también en el apartado dedicado al análisis de residuos del presente trabajo, y esta persistencia no favorece la reversión de la eficacia. Otro factor implicado es la dispersión de ácaros resistentes entre apiarios de distintos apicultores, desde colmenas muy parasitadas a otras sanas, a través de la deriva y el pillaje.

5.6.- Resultados y discusión del amitraz (Apitraz®)

5.6.1.- Evolución de las colmenas

Al comienzo del estudio todas las colmenas del Grupo II presentaban actividad de cría, con una media en las 5 colmenas de 2,3 cuadros de cría, en consonancia con su vigor y con la climatología.

En la siguiente tabla se resumen, los datos relativos a la cría de las colmenas del Grupo II y del grupo VI control en el inicio del estudio, antes de colocar las tiras de amitraz, las reservas de miel y la población de abejas presentes; así como la presencia de *Varroa* forética y de abejas con alas deformadas.

COLMENA	GRUPO ESTUDIO II					GRUPO CONTROL				
	6	7	8	9	10	26	27	28	29	30
Panales de cría inicial	3	2	2	1,5	3	2,5	3	3	0	2,5
Celdillas con cría operculada iniciales	8.455	4.085	4.180	3.135	5.510	4.323	7.600	7.790	0	6.460
Panales de miel	4	4	6	7	6	4	4	5	6	5
Panales con abeja	5	4	4	8	8	6	4	9	4	9
Varroa forética	No	Si	No	No	Si	No	Si	Si	No	Si
Abejas con alas deformes	No	Si	No	No	No	No	Si	Si	No	Si

TABLA 3. Panales de cría inicial y celdillas con cría operculada iniciales, panales de miel y panales con abeja de las colmenas del Grupo II del estudio.

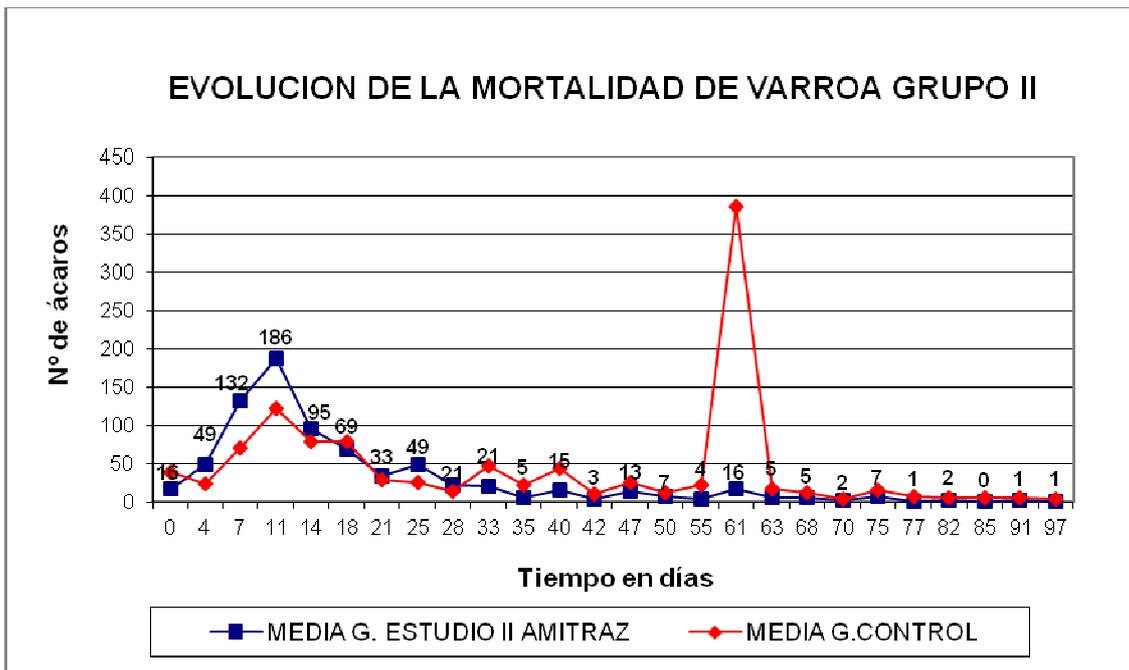
Inicialmente en 2 de las 5 colmenas del Grupo II objeto del estudio, se observaba Varroa forética sobre las abejas, concretamente las colmenas nº 7 y nº 10 del Grupo II. Asimismo, era evidente la presencia de abejas con alas deformadas únicamente en la colmena nº 7. Los parámetros productivos de los dos grupos indican que las colmenas se hallan en un estado comparable.

Durante el ensayo no se ha observado ningún efecto adverso sobre las colonias a causa de la aplicación del tratamiento acaricida con amitraz.

5.6.2.- Evolución de la mortalidad de Varroa

En la **Gráfica 8** se han representado los valores medios de la mortalidad de Varroa en cada periodo de seguimiento, tanto del Grupo II (media de las 5 colmenas), como del Grupo Control (media de 5 colmenas).

El valor a tiempo cero corresponde a la mortalidad natural previa. Los siguientes puntos hasta el día 42, representan la mortalidad media después de colocar en las colmenas las tiras de amitraz, y el resto, desde el día 55 hasta el final se debe al efecto del acaricida de contraste, cumafós en este caso, que nos sirve para estimar la eficacia.



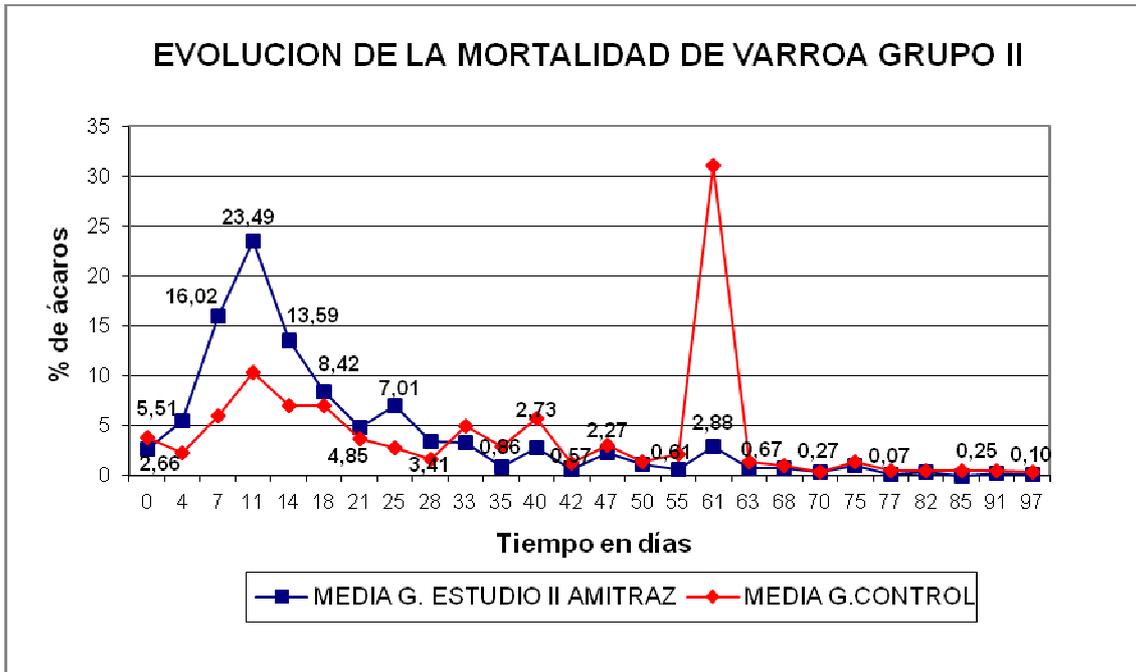
GRÁFICA 8

El aumento de la mortalidad después de colocar las tiras de amitraz pone de manifiesto su efecto sobre las Varroas foréticas. Al igual que en otros casos, se alcanza un máximo durante los primeros 12-15 días, en este caso 11 días después. El acaricida va actuando sobre las hembras de Varroa conforme salen de las celdillas de cría. Entre 12 y 15 días tras la aplicación, ya han nacido todas las abejas y zánganos de las celdas de cría operculada existentes en el momento de colocar las tiras del producto, por lo que todas las Varroas pueden contactar con el acaricida. Después, la mortalidad va decreciendo hasta la aplicación del acaricida de contraste, en la que experimenta un ligero repunte, menor que en el caso del fluvalinato, lo que ya nos indica que este producto ha tenido una mejor eficacia.

Se han incluido los datos de las colonias del Grupo Control para obtener el contraste entre mortalidad natural y la debida al tratamiento.

La evolución de la mortalidad en el Grupo Control traza un perfil descendente, como se espera en colonias no tratadas. A partir del día 55, momento en el que se introduce el acaricida de contraste, se produce un pico de mortandad, que pone de manifiesto la efectividad del amitraz y su idoneidad para utilizarse como producto de contraste en el estudio.

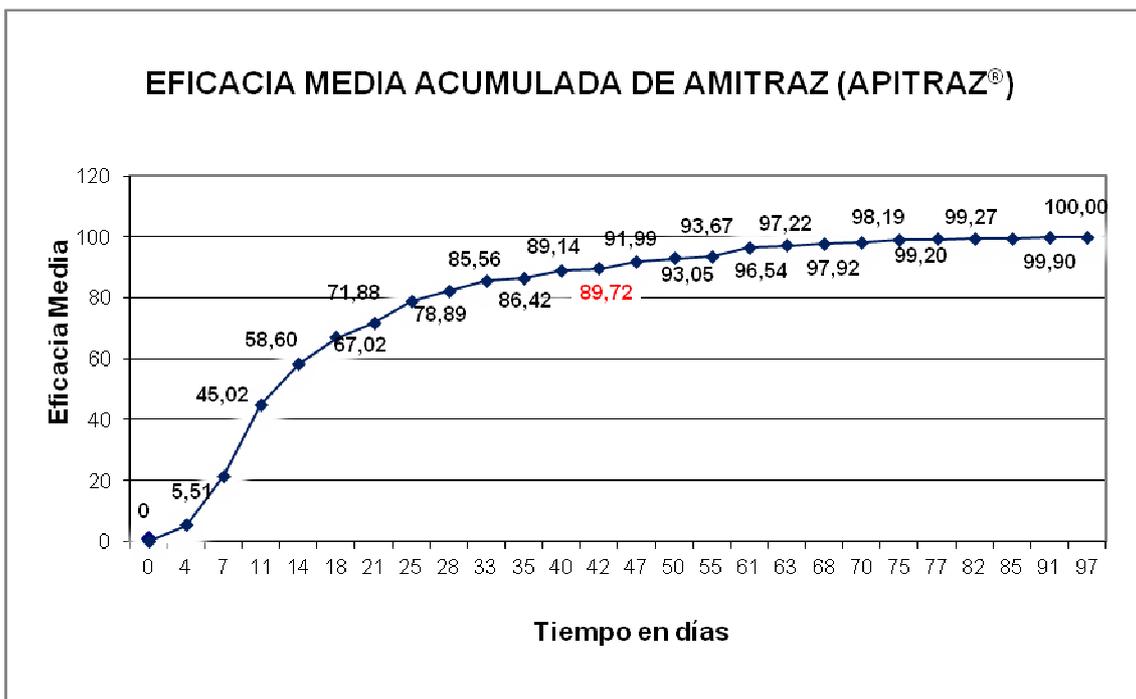
En la **Gráfica 9** se han representado los valores medios normalizados de la mortalidad de Varroa expresados en porcentaje en cada periodo de seguimiento, de las 5 colmenas del Grupo II y del Grupo Control. Al igual que en la gráfica anterior, el valor a tiempo cero se corresponde con la mortalidad natural previa. Los siguientes puntos hasta los 42 días representan la mortalidad media después de colocar en las colmenas las tiras de amitraz, y el resto desde el día 55 al efecto del acaricida de contraste (cumafós).



GRÁFICA 9

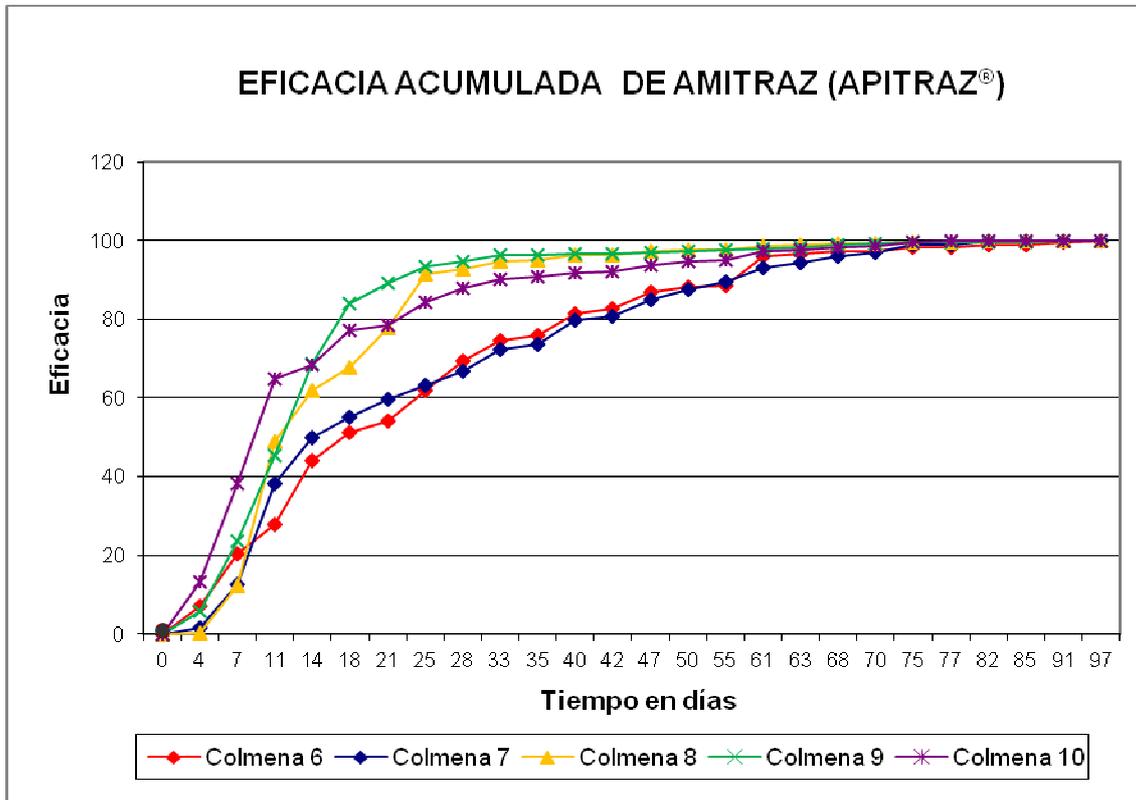
5.6.3.- Eficacia del amitraz (Apitraz®)

En la **Gráfica 10** se ha representado la eficacia media acumulada de las colmenas que integran el Grupo II del estudio, alcanzándose a las 6 semanas del tratamiento con el producto, una eficacia media de 89,72%.



GRÁFICA 10

En la **Gráfica 11** se ha representado la eficacia acumulada de cada una de las 5 colmenas del Grupo II para poder apreciar las diferencias en la evolución de la eficacia del acaricida.

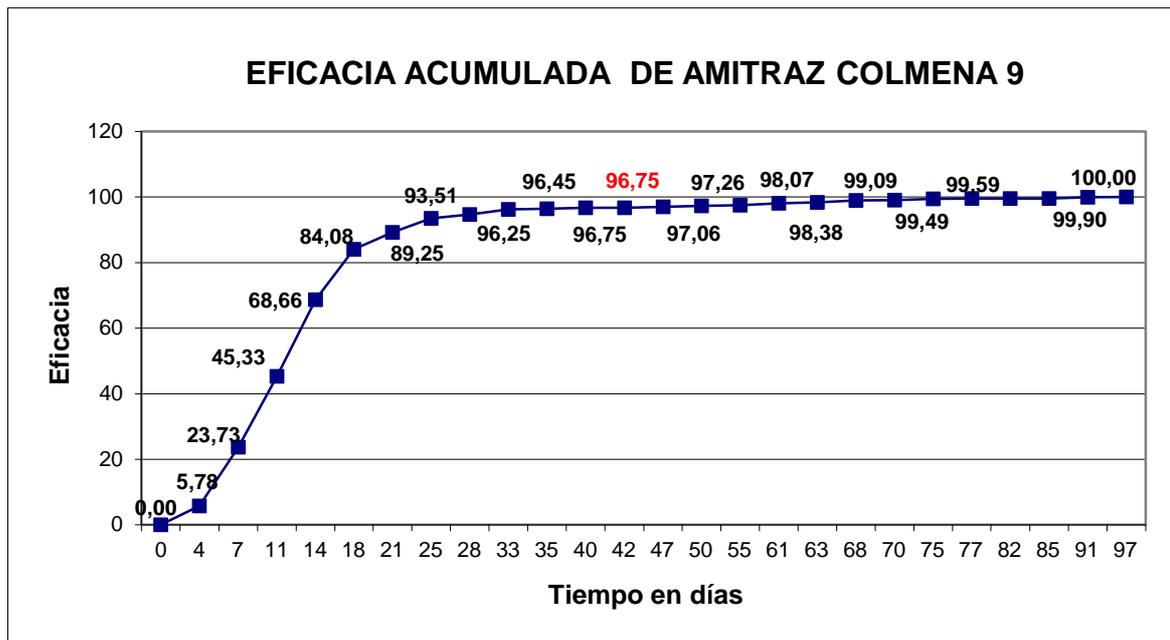


GRÁFICA 11

Las diferencias entre las colonias se dan en los valores de cada intervalo. Se puede comprobar que a las 6 semanas de la aplicación del producto, la eficacia se sitúa en un rango entre el 80,85% (valor más bajo correspondiente a la colmena nº 7) y el 96,75% (valor más elevado correspondiente a la colmena nº 9). En las colmenas nº 6, nº 8 y nº 10 la eficacia obtenida es de 82,65%, 96,34% y 91,98% respectivamente, situándose la media de las 5 colmenas en un 89,72%.

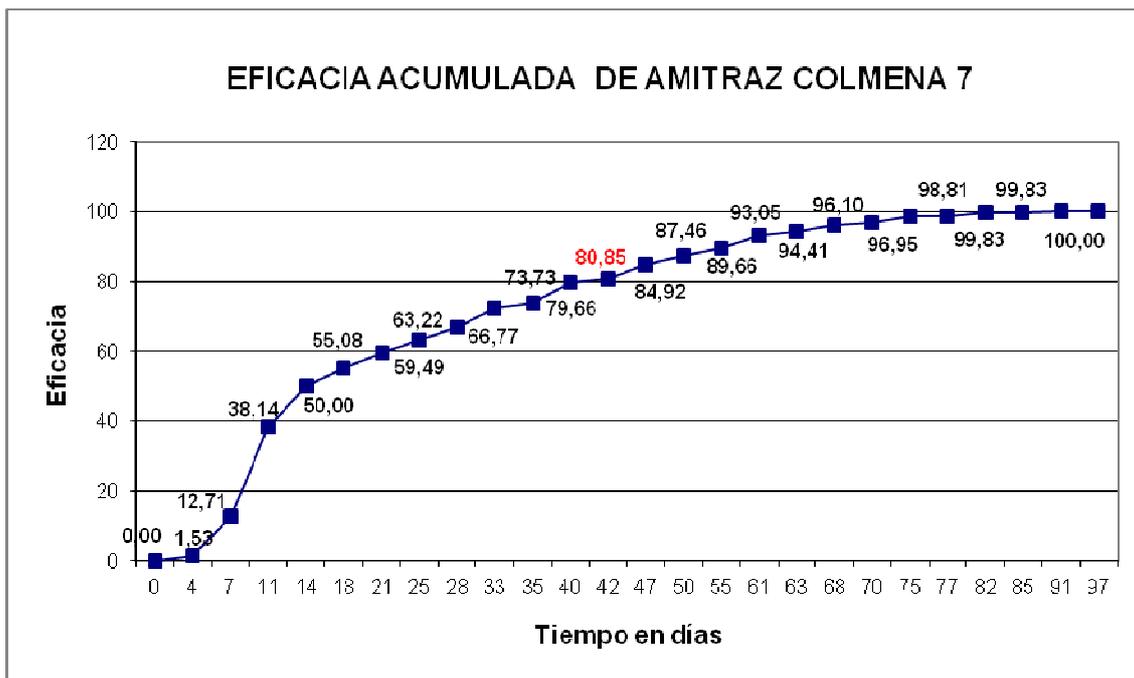
En 2 de las colmenas tratadas con amitraz se observa una eficacia que supera el 95%, valor óptimo necesario para el control de la varroosis, presentando el resto de las colmenas del Grupo II una eficacia inferior a este porcentaje.

En este grupo de ensayo del amitraz encontramos colmenas con una respuesta muy buena al principio activo, como la nº 8 (96,34%) y nº 9 (96,75%), que presentan curvas ascendentes muy marcadas, tal como se observa en la **Gráfica 12**. En estas dos colmenas se llega a una eficacia mayor del 95% alrededor de los 30 días, que es la situación típica que nos hemos encontrado en otros ensayos cuando el producto se comporta adecuadamente.



GRÁFICA 12

La colmena nº 7 muestra la eficacia más baja de las colmenas de su grupo, y aunque la gráfica presenta una curva ascendente, esta no es tan marcada como en el caso anterior descrito, especialmente a partir del día 18, tal como se observa en la **Gráfica 13**. En el caso de las colmenas nº 6 y nº 7, tanto el perfil de la curva como el valor de la eficacia a los 42 días revelan un comportamiento diferente del resto de las colmenas, con un control insuficiente de la población del parásito, seguramente por la manifestación de una tolerancia incipiente de las Varroas al principio activo.



GRÁFICA 13

En la siguiente tabla se presentan los valores de la población de Varroa total al final del estudio y la eficacia alcanzada a las 6 semanas de aplicar 2 tiras de amitraz en las colmenas del Grupo II. Como podemos observar, todas las colonias presentan una población de Varroa idónea para la realización de ensayos de eficacia. Aunque la eficacia media está por debajo del valor óptimo, se acerca al 90% y teniendo en cuenta los resultados globales no se puede considerar del todo insuficiente para el control de Varroa.

GRUPO ESTUDIO II AMITRAZ (APITRAZ®)			
COLMENA	VARROAS CAÍDAS CON APITRAZ	POBLACIÓN TOTAL DE VARROA	EFICACIA (%) A 42 DÍAS
6	262	317	82,65
7	477	590	80,85
8	606	629	96,34
9	954	986	96,75
10	1.090	1.185	91,98
Media ± desv.	678 ± 341	741 ± 344	89,72 ± 7,54

TABLA 4. Varroas caídas con amitraz, población total de Varroa y eficacia en las colmenas a los 42 días en el Grupo II

5.6.4.- Conclusiones

En el Grupo II de colmenas sometido a este estudio, el amitraz (Amitraz®) ha mostrado una buena eficacia contra la varroosis, a pesar de que no se alcanza el valor óptimo del 95%.

A la vista de los resultados de este ensayo, podemos concluir que el amitraz puede ser una molécula eficaz para el control de la varroosis en algunas colmenas del apiario, aunque en otras la eficacia será menor y se necesitará realizar un seguimiento de su efectividad y en su caso aplicar otros métodos de control frente a la Varroa.

5.7.- Resultados y discusión del cumafós (Checkmite®)

5.7.1.- Evolución de las colmenas

Al comienzo del estudio todas las colmenas del Grupo VIII presentaban actividad de cría, con una media en las 5 colmenas de 2,9 cuadros de cría, en consonancia con su vigor y con la climatología.

En la siguiente tabla se resumen, los datos relativos a la cría de las colmenas del Grupo VIII y del grupo VI control en el inicio del estudio, antes de colocar las tiras de cumafós, las reservas de miel y la población de abejas presentes; así como la presencia de Varroa forética y de abejas con alas deformes.

COLMENA	GRUPO ESTUDIO VIII					GRUPO CONTROL				
	36	37	38	39	40	26	27	28	29	30
Panales de cría inicial	2	2,5	3	2,5	4,5	2,5	3	3	0	2,5
Celdillas con cría operculada iniciales	6.175	5.890	9.690	5.700	7.790	4.323	7.600	7.790	0	6.460
Panales de miel	8	6	8	7	8	4	4	5	6	5
Panales con abeja	8	8	8	8	8	6	4	9	4	9
Varroa forética	No	No	No	Si	Si	No	Si	Si	No	Si
Abejas con alas deformes	No	No	No	Si	No	No	Si	Si	No	Si

TABLA 5. Panales de cría inicial y celdillas con cría operculada iniciales, panales de miel y panales con abeja de las colmenas del Grupo VIII del estudio.

Inicialmente en 2 de las 5 colmenas del Grupo VIII objeto del estudio se observaba Varroa forética sobre las abejas, concretamente las colmenas nº 39 y nº 40. Asimismo, era evidente la presencia de abejas con alas deformadas y abdomen más reducido en la colmena nº 39. Las colonias de este grupo presentaban una población de abeja y cantidad de cría algo superior a las colmenas control y, en general, su vigor superaba ligeramente a las de la mayoría de los grupos.

Al retirar las tiras de cumafós, cuya eficacia se pretendía estimar, se observó un efecto negativo sobre las abejas, con un despoblamiento evidente de las colonias del Grupo VIII tratadas, así como elevada presencia de abejas con alas deformes, incluso en la piquera de algunas de las colmenas, y excesiva Varroa en su fase forética.

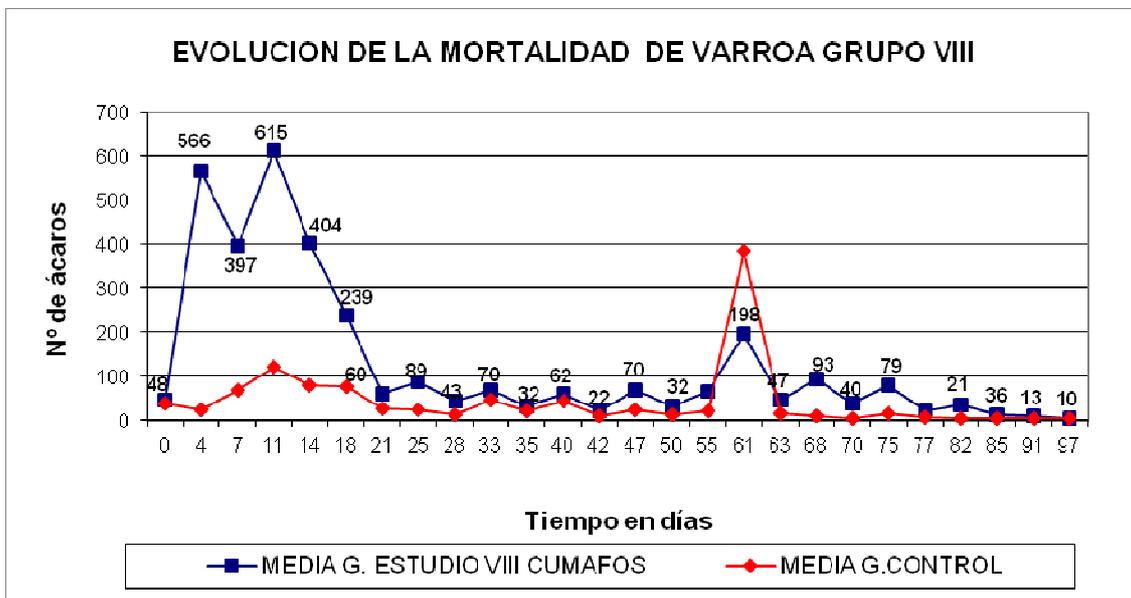


Foto 43. Observación de presencia de abejas con alas deformes y Varroa forética

5.7.2.- Evolución de la mortalidad de Varroa

En la **Gráfica 14** se han representado los valores medios de la mortalidad de Varroa en cada periodo de seguimiento del Grupo VIII (media de las 5 colmenas) y del Grupo Control (media de 5 colmenas).

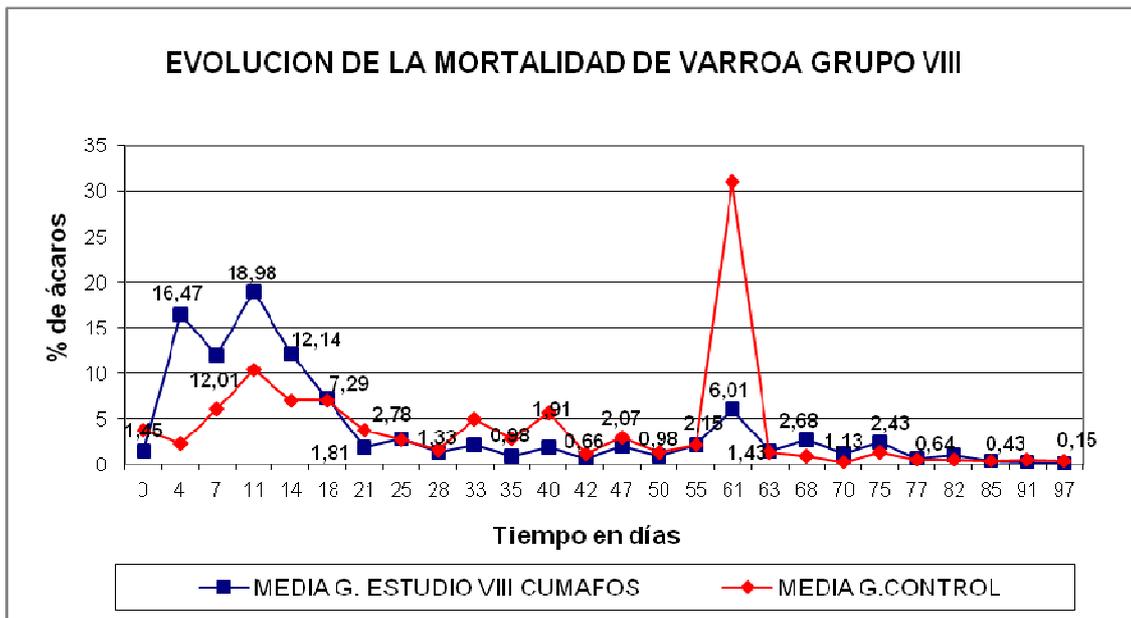
El valor a tiempo cero corresponde a la mortalidad natural previa. Los siguientes puntos hasta el día 42, representan la mortalidad media después de colocar en las colmenas las tiras de cumafós, y el resto, desde el día 55 hasta el final se debe al efecto del acaricida de contraste, amitraz en este caso, que nos sirve para estimar la eficacia.



GRÁFICA 14

El aumento de la mortalidad después de colocar las tiras de cumafós demuestra su efecto sobre las Varroas foréticas, que se encuentran expuestas al acaricida en cada tramo temporal. Como es de esperar, la mayor caída de ácaros se produce en los 15 primeros días y en este grupo es más acusada por la mayor infestación de las colonias. El efecto del producto sobre las Varroas en este momento se evidencia en la gráfica con un pico de mortalidad que se mantiene hasta el día 18 del estudio y que contrasta significativamente con los valores de mortalidad del grupo control. A partir de las 3 semanas del estudio la tasa de mortalidad va disminuyendo, aunque se observan ligeros incrementos de mortalidad los días 25, 33 y 40, dando una imagen de diente de sierra.

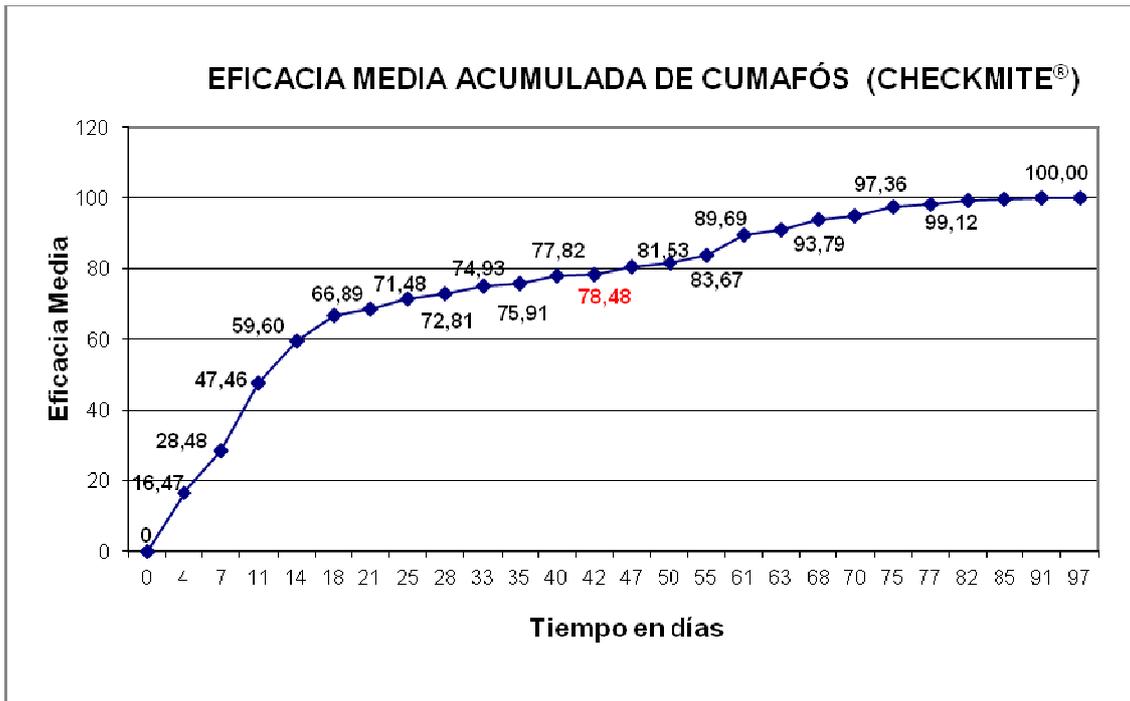
En la **Gráfica 15** se han representado los valores medios normalizados de la mortalidad de Varroa expresados en porcentaje en cada periodo de seguimiento, de las 5 colmenas del Grupo VIII y del Grupo Control. Al igual que en la gráfica anterior, el valor a tiempo cero se corresponde con la mortalidad natural previa. Los siguientes puntos hasta los 42 días representan la mortalidad media después de colocar en las colmenas las tiras de cumafós, y el resto desde el día 55 al efecto del acaricida de contraste (amitraz).



GRÁFICA 15

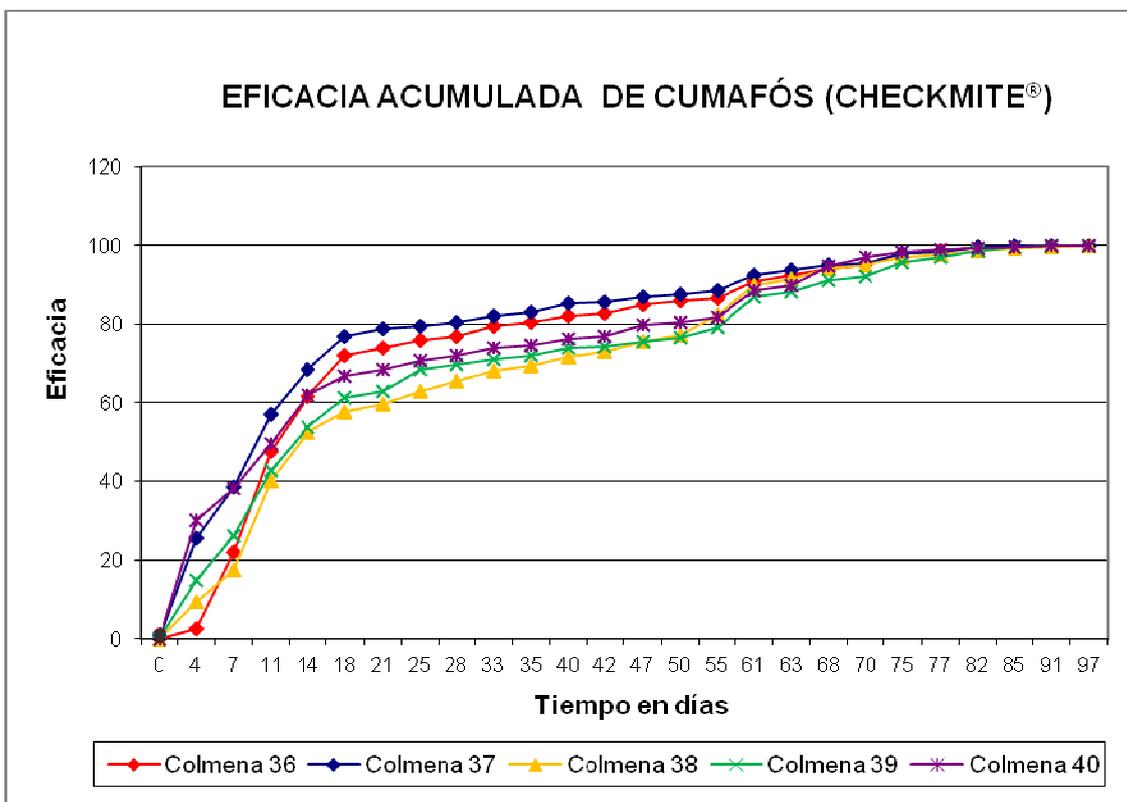
5.7.3.- Eficacia del cumafós (Checkmite®)

En la **Gráfica 16** se ha representado la eficacia media acumulada de las colmenas que integran el Grupo VIII del estudio, alcanzándose a las 6 semanas del tratamiento con el producto, una eficacia media de 78,48%.



GRÁFICA 16

En la **Gráfica 17** se ha representado la eficacia acumulada de cada una de las 5 colmenas del Grupo VIII para poder apreciar las diferencias en la evolución de la eficacia del acaricida.

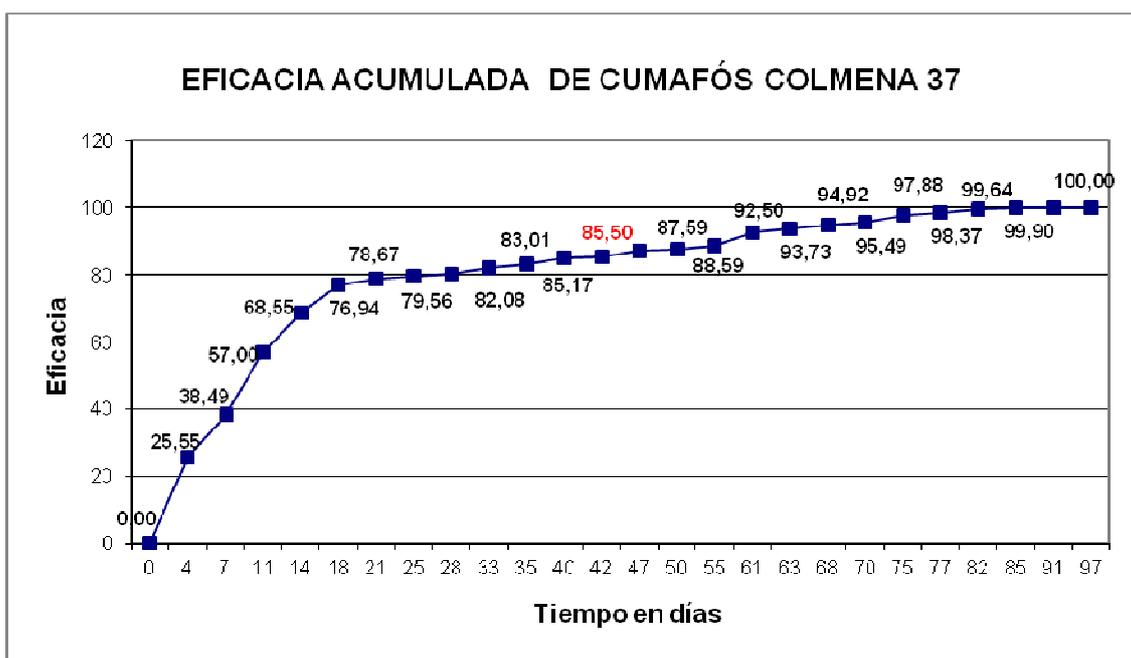


GRÁFICA 17

Las diferencias entre las colonias se dan en los valores de cada intervalo. Se pueden observar unas gráficas muy similares en todas las colmenas, que demuestran un comportamiento homogéneo de todo el grupo frente al cumafós. A las 6 semanas de la aplicación del producto, la eficacia se sitúa en un rango entre el 72,82% (valor más bajo correspondiente a la colmena nº 38) y el 85,50% (valor más elevado correspondiente a la colmena nº 37). En las colmenas nº 36, nº 39 y nº 40 la eficacia obtenida es de 82,74%, 74,34% y 76,98% respectivamente, situándose la media de las 5 colmenas en un 78,48%.

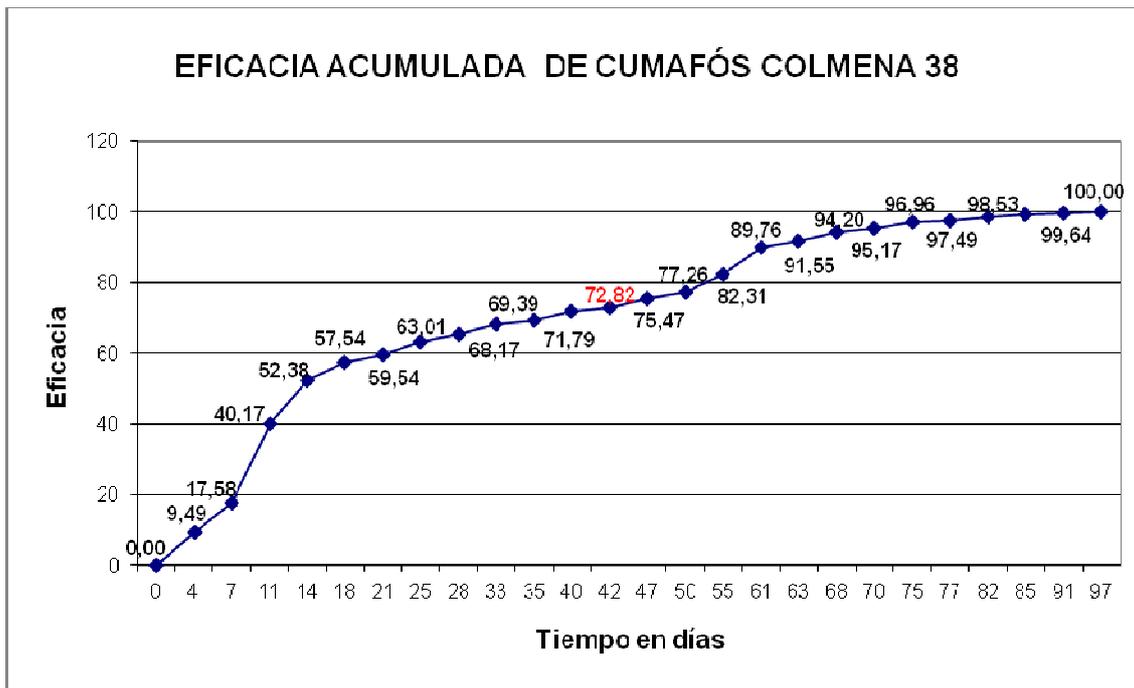
En todas las colmenas tratadas con cumafós se observa una eficacia que no alcanza el valor óptimo necesario para el control de la varroosis, establecido por convenio en un 95%.

Ni siquiera la colmena nº 37, de la que se ha obtenido mejor respuesta a este principio activo (85,50% de eficacia), alcanza este porcentaje, tal como se observa en la **Gráfica 18**.



GRÁFICA 18

La colmena nº 38 muestra la eficacia más baja de las colmenas de su grupo, y aunque la gráfica presenta una curva ascendente, esta no es tan marcada como en el caso anterior descrito, especialmente a partir del día 18, tal como se observa en la **Gráfica 19**.



GRÁFICA 19

En la siguiente tabla se presentan los valores de la población de Varroa total al final del estudio y la eficacia alcanzada a las 6 semanas de aplicar el cumafós en las colmenas del Grupo VIII.

GRUPO ESTUDIO VIII CUMAFÓS (CHECKMITE®)			
COLMENA	VARROAS CAÍDAS CON CUMAFÓS	POBLACIÓN TOTAL DE VARROA	EFICACIA (%) A 42 DÍAS
36	2.919	3.528	82,74
37	2.577	3.014	85,50
38	2.034	2.793	72,82
39	2.199	2.958	74,34
40	3.261	4.236	76,98
Media ± desv.	2.598 ± 505	3.305 ± 588	78,48 ± 5,45

TABLA 6. Varroas caídas con cumafós, población total de Varroa y eficacia en las colmenas a los 42 días en el Grupo VIII

Todos los valores de eficacia son insuficientes para el control efectivo de Varroa, están claramente por debajo del valor óptimo y todas las colmenas presentan curvas de mortalidad muy semejantes. Estos datos sugieren la presencia de ácaros resistentes al principio activo. Si tenemos en cuenta la población de Varroa al inicio del ensayo y el vigor de las colonias de este grupo, podemos considerar que tenían condiciones adecuadas para el estudio. En la bibliografía consultada se ha sugerido un valor umbral de

referencia de 3.000 ácaros para estos estudios, de todas formas este valor siempre hay que relacionarlo con el estado de las colonias y éstas presentaban un estado inicial adecuado.

Estos resultados están en consonancia con los obtenidos durante el otoño de 2015 en la Comunidad Valenciana por la Agrupación de Defensa Sanitaria apiADS con el producto Checkmite[®], cuya eficacia media se ha situado en torno al 70%. Además, una gran mayoría de los apicultores que han usado este acaricida durante la última campaña de tratamiento de apiADS contra la varroosis, han observado una eficacia claramente insuficiente y en no pocos casos se han constatado efectos graves de parasitación por *Varroa* en el momento de retirar las tiras. Otro efecto constatado por los Servicios Técnicos de apiADS ha sido la acentuación de los efectos tóxicos del cumafós sobre las abejas, con una pérdida acusada de abejas durante el tratamiento.

5.7.4.- Conclusiones

En el Grupo VIII de colmenas sometido a este estudio, el cumafós (Checkmite[®]) no ha mostrado una buena eficacia contra la varroosis.

Analizando los resultados de este ensayo, creemos que éste es el comienzo de una falta de sensibilidad o de resistencia de *Varroa destructor* al cumafós, posiblemente como consecuencia de su utilización durante años para el control de la varroosis sin realizar una correcta rotación de principios activos.

6.- VALORACIÓN DE EFICACIA DE PRODUCTOS ORGÁNICOS: ÁCIDO OXÁLICO

6.1.- Tratamiento con ácido oxálico goteado en las colmenas del Grupo IV y con ácido oxálico sublimado las del Grupo V

Se realizó un primer control antes del tratamiento de las colonias sometidas al ensayo con el ácido oxálico, tanto en su aplicación goteada como sublimada, al objeto de establecer la tasa de mortalidad natural previa. Este dato pone de manifiesto el efecto del acaricida mediante el contraste entre la mortalidad natural previa y la que se produce después de administrar el producto ensayado, ácido oxálico en este caso.

Las colmenas del Grupo IV recibieron un tratamiento acaricida contra la varroosis mediante el goteo sobre las abejas de un jarabe de azúcar con ácido oxálico, con una metodología similar a la consultada en la bibliografía. Asumiendo que en la actualidad existe un producto autorizado en España que se aplica con este método, el Ecoxal[®], hemos elegido ensayar una formulación diferente usada ampliamente en la bibliografía consultada para el control de la varroosis, al objeto de facilitar la comparación con los resultados de otros países europeos. Se preparó una disolución de sacarosa en agua al 50% y luego se añadió ácido oxálico de pureza 99% a razón de 45 gramos por litro de jarabe. Mediante una jeringuilla de alimentación que facilita el goteo, se administraron 50 cc de este jarabe con oxálico por colmena, aproximadamente 5 cc sobre las abejas a través del espacio entre panales (paso de abeja). La administración de ácido oxálico disuelto en un jarabe con azúcar al 50% aumenta su eficacia, ya que favorece su distribución entre las abejas.



Foto 44. Imagen de solución azucarada de ácido oxálico para su administración

Se realizó una primera aplicación en presencia de cría operculada para evaluar su acción acaricida en estas condiciones. A continuación, se procedió al enjaulado de las reinas de este grupo y 23 días después, se repitió la administración de ácido oxálico en las colmenas del Grupo IV, con la misma sistemática y la misma dosis, pero en esta ocasión las colmenas tenían ausencia total de cría tras haber bloqueado la puesta de la reina.



Foto 45. Administración de ácido oxálico goteado

Las colmenas del Grupo V se sublimaron con ácido oxálico a los 23 días de haber enjaulado las reinas. Para realizar esta sublimación se utilizó ácido oxálico con una pureza del 99% y un sublimador profesional.

Es necesario recordar la toxicidad del humo del ácido oxálico sublimado que se genera para la persona que lo administra, por lo que se adoptaron las medidas necesarias, utilizando una máscara integral, que protege los ojos, nariz y boca, y que incluye filtros específicos para ácidos orgánicos.



Foto 46. Sublimador de ácido oxálico y mascarilla integral de protección frente a ácidos orgánicos

La sublimación es el proceso que consiste en el cambio de estado de sólido al estado gaseoso sin pasar por líquido al someterlo a una elevada temperatura. Tras someter al ácido oxálico a una temperatura elevada de 600°C durante 4-5 minutos comienza a sublimarse. Después es necesario mantener una temperatura de 200°C para conseguir que la sublimación sea constante, a razón de 0,5 m³/minuto. Para evitar que se produjera algún efecto tóxico sobre la colonia se administraron 2 g/colmena, sublimando cada colmena durante aproximadamente un minuto.



Foto 47. Imagen del sublimador de ácido oxálico alcanzando la temperatura adecuada para sublimar



Foto 48. Preparación del sublimador de ácido oxálico para su administración en las colmenas

Posteriormente, a la semana se volvió a administrar ácido oxálico sublimado a las 5 colmenas del Grupo V, siguiendo el mismo protocolo de actuación.



Foto 49. Administración de ácido oxálico sublimado a una colmena

6.2.- Seguimiento de la mortalidad de Varroa

Se contabilizaron las Varroas recogidas en las láminas del fondo de las colmenas de los Grupos IV y V en cada intervalo, usando una lupa con luz para facilitar el conteo y contadores manuales.

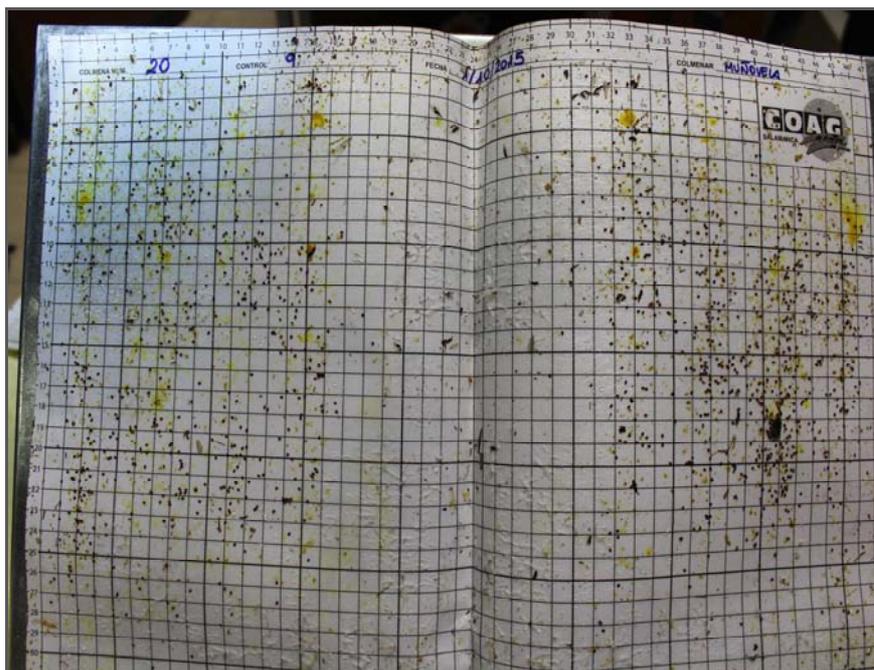


Foto 50. Lámina de cartulina retirada de un fondo sanitario de una colonia del Grupo IV

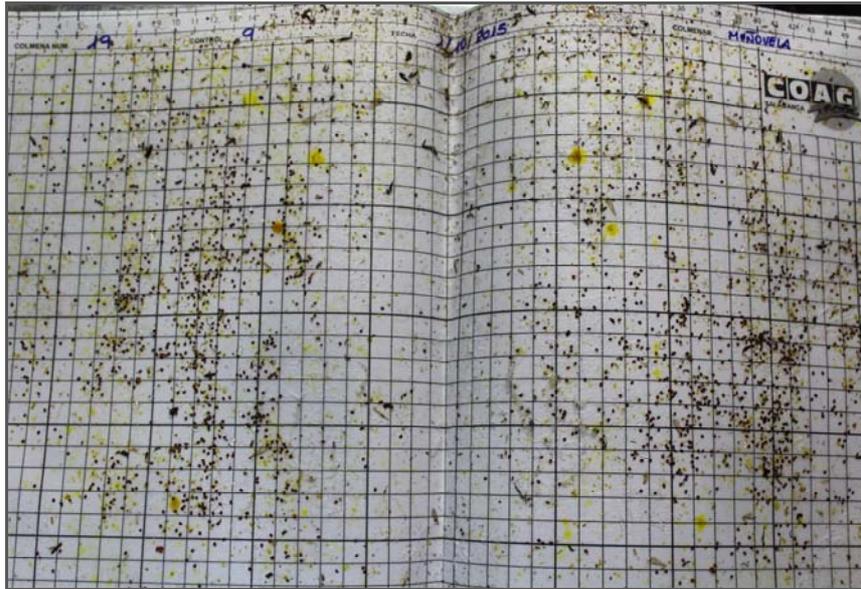


Foto 51. Lámina de cartulina retirada de un fondo sanitario de una colonia del Grupo IV

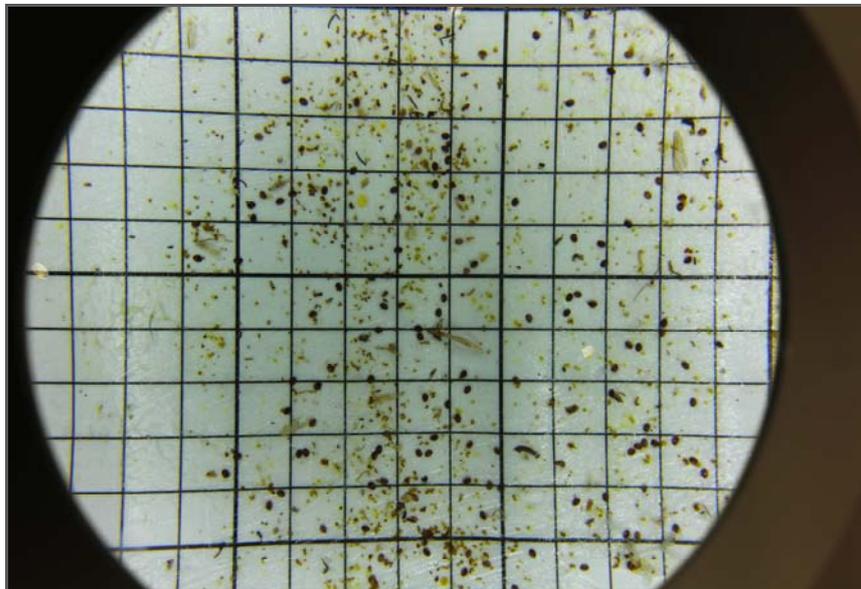


Foto 52. Observación de Varroa en una lámina de cartulina a través de lupa

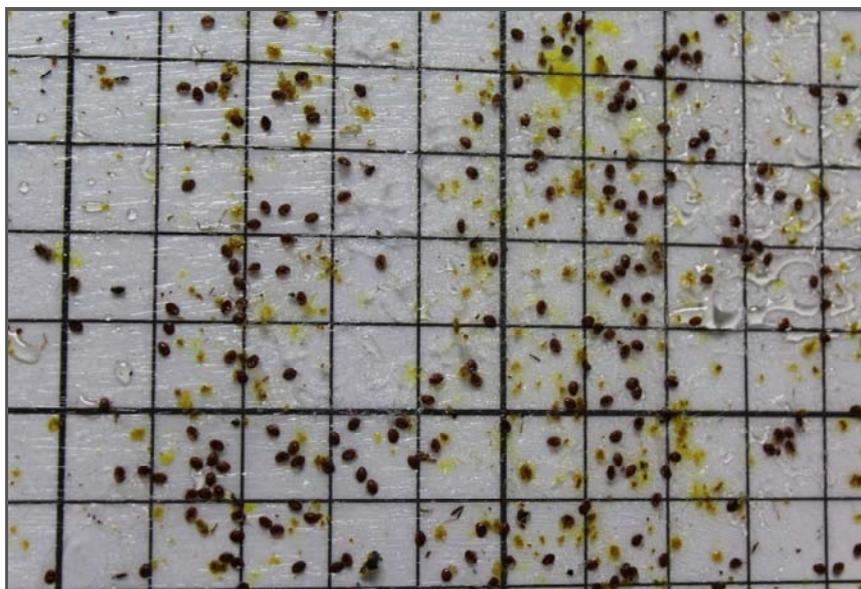


Foto 53. Observación de Varroa en lámina de cartulina retirada de un fondo sanitario

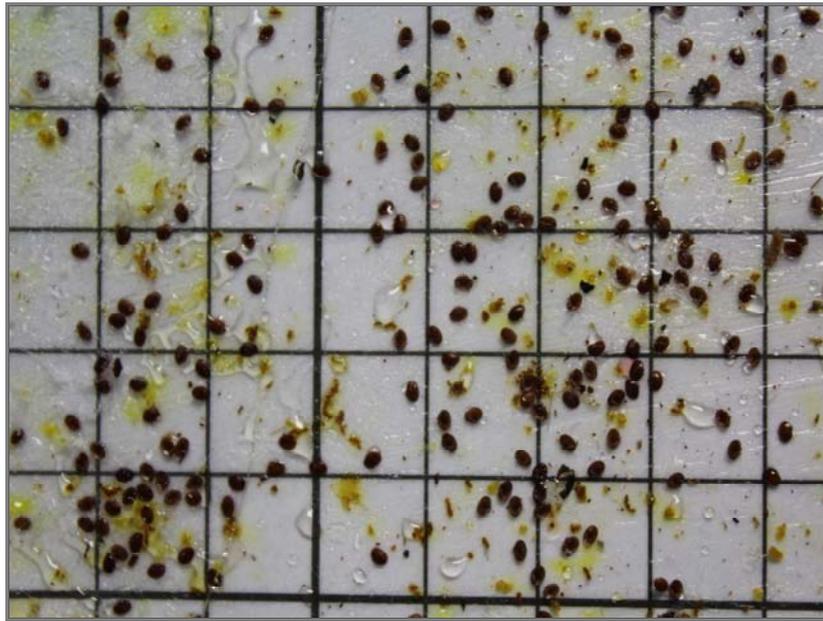


Foto 54. Imagen de lámina de cartulina con Varroas y restos de la colmena

6.3.- Aplicación de un acaricida de contraste

A la semana de administrar el segundo tratamiento de ácido oxálico goteado en las colmenas del Grupo IV y a los 12 días de haber sublimado por primera vez el ácido oxálico en las colonias del Grupo V, en ambos grupos se administró un acaricida de contraste, eligiéndose el cumafós en este caso. Para ello se introdujeron 2 tiras con este principio activo en cada colmena, suspendidas mediante alambres, de la forma recomendada para las colmenas Layens, de forma que toda la superficie de la tira fuera accesible a las abejas, y se mantuvieron durante 42 días en el interior de las mismas.



Foto 55. Tira de contraste de cumafós en las colonias de los Grupos IV y V

Las reinas de las colonias de ambos grupos se mantuvieron enjauladas durante 23 días, por lo que este tratamiento de contraste, actuando en ausencia de cría debe provocar la caída de todas las Varroas que superaron la acción del ácido oxálico goteado en el caso del Grupo IV y del ácido oxálico sublimado en las colmenas del Grupo V. Este método es muy fiable y no implica la destrucción de la colmena.

6.4.-Evaluación de la eficacia de las dos formas de administración de ácido oxálico probado.

Contabilizando las Varroas caídas en los controles realizados en las colmenas a lo largo de todo el estudio hasta su finalización, se pudo determinar el número de Varroas totales presentes en las colonias de abejas. El conocimiento de este dato, así como las Varroas caídas durante una semana después de la aplicación del ácido oxálico goteado en las colmenas del Grupo IV y durante los 12 días después de la primera aplicación del ácido oxálico sublimado en las colmenas del Grupo V permitieron evaluar la eficacia de las dos formas de administración de este ácido orgánico.

De esta forma se pudo calcular la eficacia acumulada del ácido oxálico, goteado y sublimado, siendo el cociente entre las Varroas caídas durante la semana posterior a la segunda aplicación de este ácido orgánico en las colmenas del Grupos IV, y durante los 5 días posteriores a la segunda administración del mismo en las colmenas del Grupo V; y las Varroas totales contabilizadas en cada colmena durante los días en los que se llevó a cabo un seguimiento de la mortalidad, que incluía los periodos de tratamiento más los 42 días del tratamiento de contraste en los dos grupos.

6.5.- Resultados y discusión del ácido oxálico goteado

6.5.1.- Evolución de las colmenas

Al comienzo del estudio todas las colmenas del Grupo IV presentaban actividad de cría, con una media en las 5 colmenas de 3 cuadros de cría, en consonancia con su vigor y con la climatología.

En la siguiente tabla se resumen, los datos relativos a la cría de las colmenas del Grupo IV en el inicio del estudio, antes de administrar el ácido oxálico goteado, las reservas de miel y la población de abejas presentes; así como la presencia de Varroa forética y de abejas con alas deformadas.

COLMENA	GRUPO ESTUDIO IV				
	16	17	18	19	20
Panales de cría inicial	3	3	2,5	3	3,5
Celdillas con cría operculada iniciales	7.125	6.935	3.990	7.030	4.845
Panales de miel	7	6	4	6	5
Panales con abeja	7,5	8	4	9	6
Varroa forética	Si	Si	Si	Si	Si
Abejas con alas deformes	No	No	Si	No	No

TABLA 7. *Panales de cría inicial y celdillas con cría operculada iniciales, panales de miel y panales con abeja de las colmenas del Grupo IV del estudio.*

La superficie de panal ocupada por cría fue transformada en celdillas mediante la aplicación del factor 380 celdillas/dm².

A la vista de los datos, destaca la presencia de Varroa forética en las cinco colmenas del Grupo IV objeto del estudio. Asimismo, era evidente la presencia de abejas con alas deformadas y abdomen más reducido en alguna de las colmenas, especialmente en la colmena nº 18.

A lo largo del estudio no se ha observado ningún efecto adverso sobre las colonias a causa de la aplicación del tratamiento acaricida con ácido oxálico goteado, debido posiblemente a su administración en la época idónea, en la que las colonias todavía presentaban mucha actividad y podían limpiar el producto administrado en muy poco tiempo y las temperaturas suaves acontecidas en el día de su aplicación y posteriores.

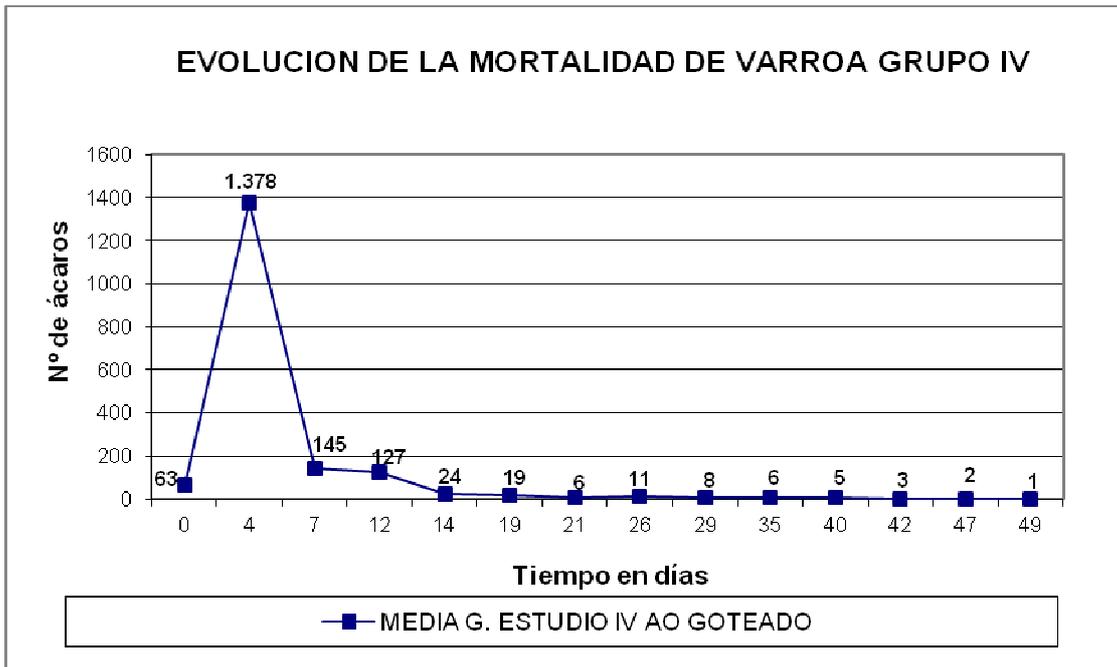
Al comienzo del estudio la colonia nº 18 cambió de reina y no pudo renovarla a lo largo del mismo, por lo que murió antes de finalizar el ensayo y fue descartada para la evaluación de la eficacia.

6.5.2.- Evolución de la mortalidad de Varroa

En la **Gráfica 20** se han representado los valores medios de la mortalidad de Varroa en cada periodo de seguimiento para el Grupo IV (media de las 4 colmenas).

El valor a tiempo cero corresponde a la mortalidad natural previa. Los siguientes puntos hasta el día 7, representan la mortalidad media después de administrar en las colmenas el ácido oxálico goteado, y el resto se debe al efecto del acaricida de contraste, cumafós en este caso, que nos sirve para estimar la eficacia.

En esta gráfica únicamente se ha representado la mortalidad de media después de la segunda aplicación de ácido oxálico goteado a las colmenas, teniendo en cuenta que las colonias tenían ausencia de cría tras haber enjaulado a la reina 23 días antes.

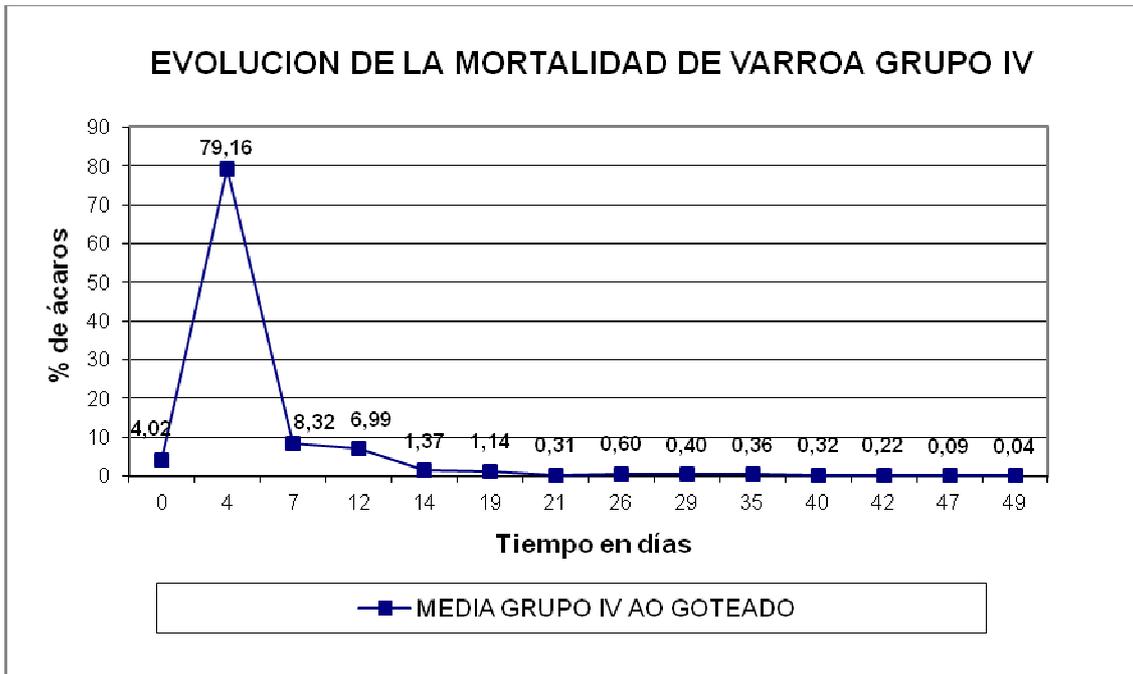


GRÁFICA 20

El aumento de la mortalidad tan exagerado después de administrar a cada colmena 50 cc. de la solución azucarada con ácido oxálico pone de manifiesto su efecto sobre las Varroas foréticas, que son las que se encuentran accesibles al ácido orgánico, ya que en el momento de su aplicación ya han nacido todas las abejas de las celdillas de cría operculada.

A partir del día 7, cuando se introduce el acaricida de contraste se observa todavía una caída importante de Varroas que han superado el efecto del ácido oxálico pero que han sido afectadas por el cumafós. Posteriormente y hasta los 42 días en los que se han mantenido las tiras del acaricida de contraste dentro de las colmenas se observa un perfil descendente y progresivo de la curva de mortalidad.

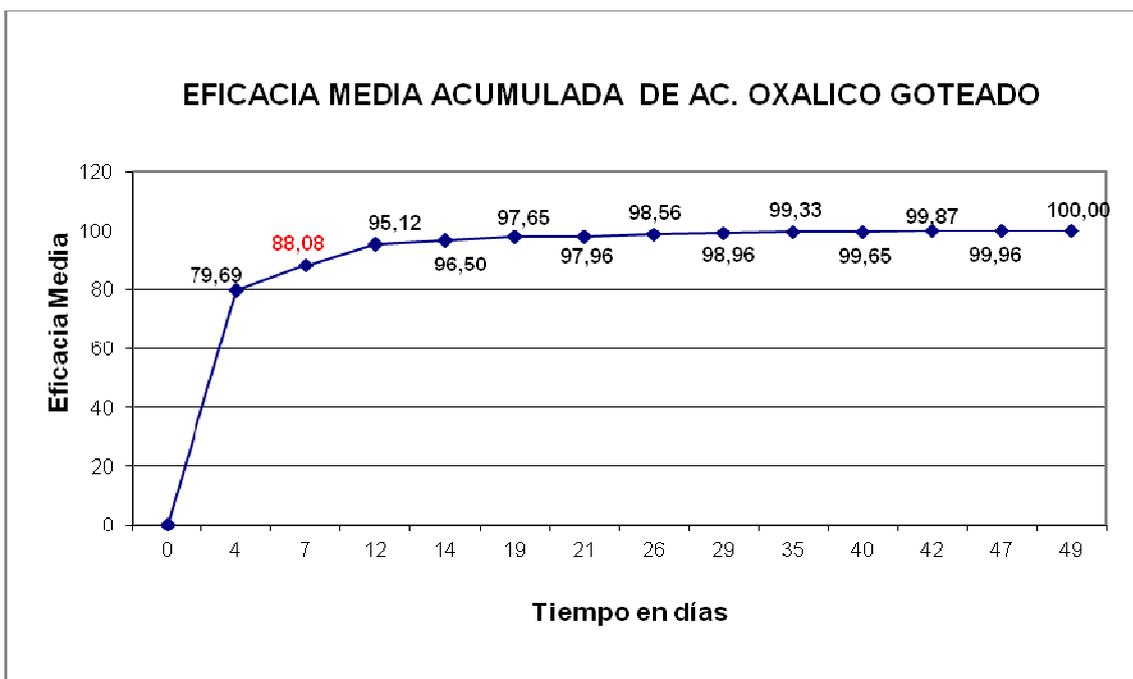
En la **Gráfica 21** se han representado los valores medios normalizados de la mortalidad de Varroa expresados en porcentaje en cada periodo de seguimiento de las 4 colmenas del Grupo IV. Al igual que en la gráfica anterior, el valor a tiempo cero se corresponde con la mortalidad natural previa. Los siguientes puntos hasta los 7 días representan la mortalidad media después de administrar a las colmenas la solución azucarada de ácido oxálico, y el resto hasta el día 49 al efecto del acaricida de contraste (cumafós).



GRÁFICA 21

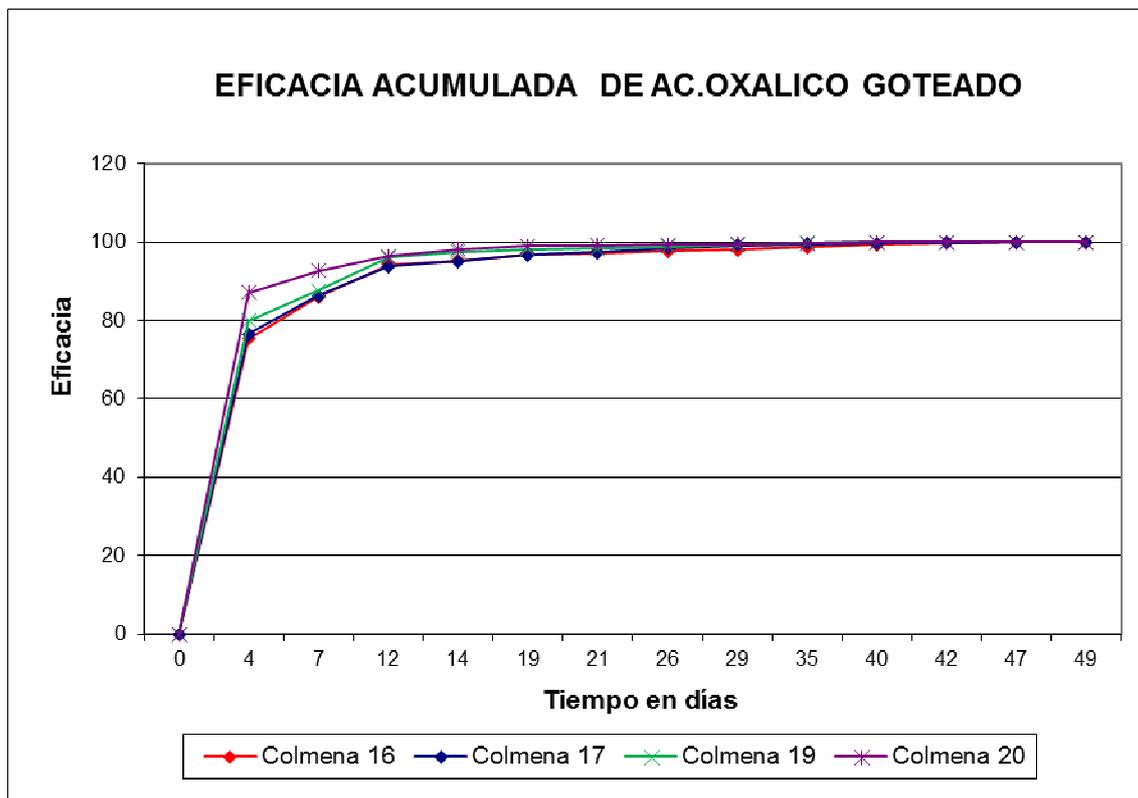
6.5.3.- Eficacia del ácido oxálico goteado

En la **Gráfica 22** se ha representado la eficacia media acumulada de 4 de las 5 colmenas que integran el Grupo IV del estudio, alcanzándose a la semana del tratamiento con la solución azucarada de ácido oxálico, una eficacia media de 88,08%.



GRÁFICA 22

En la **Gráfica 23** se ha representado la eficacia acumulada de 4 colmenas del Grupo IV para poder apreciar las diferencias en la evolución de la eficacia del acaricida.



GRÁFICA 23

Las diferencias entre las colonias se dan en los valores de cada intervalo. Se puede comprobar que a la semana de la aplicación del ácido oxálico, la eficacia se sitúa en un rango entre el 85,86% (valor más bajo correspondiente a la colmena nº 16) y el 92,57% (valor más elevado correspondiente a la colmena nº 20). En las colmenas nº 17 y nº 19 la eficacia obtenida es de 86,26% y 87,63% respectivamente, situándose la media de las 4 colmenas en un 88,08%. Asumiendo estas pequeñas diferencias, lo que destaca de las curvas de mortalidad acumulada es que tienen un perfil muy similar, una uniformidad que no se da en el caso de los acaricidas de síntesis estudiados y que revela una sensibilidad igual de todas las Varroas al oxálico, sin las interferencias de los fenómenos de tolerancia del ácaro al principio activo.

En la siguiente tabla se presentan los valores de la población de Varroa total al final del estudio y la eficacia alcanzada a la semana de aplicar la solución azucarada de ácido oxálico en las colmenas del Grupo IV.

GRUPO ESTUDIO IV ÁCIDO OXÁLICO GOTEADO			
COLMENA	VARROAS CAÍDAS CON AC.OXÁLICO GOTEADO	POBLACIÓN TOTAL DE VARROA	EFICACIA (%) A 7 DÍAS
16	1.087	1.266	85,86
17	1.588	1.841	86,26
19	2.210	2.522	87,63
20	1.208	1.305	92,57
Media ± desv.	1.523 ± 505	1.733 ± 587	88,08 ± 3,09

TABLA 8. Varroas caídas con ácido oxálico goteado, población total de Varroa y eficacia en las colmenas a los 7 días en el Grupo IV

Los datos finales revelan que el nivel de parasitación de las colonias fue óptimo para la realización de ensayos de eficacia. Los valores de eficacia muestran poca desviación de la media y alcanzan niveles comparables a los de la bibliografía consultada, que sitúan la eficacia del oxálico sin cría entre 85-95% en la mayoría de los casos. Ensayos realizados por los Servicios Técnicos de la Agrupación de Defensa Sanitaria apiADS en Valencia, durante el verano de 2015, en 7 colmenas Dadant siguiendo el mismo método de enjaulado de reinas y posterior aplicación de oxálico goteado, muestran una eficacia media de 90,3%. Esta información tan coincidente, confirma el apreciable y uniforme efecto acaricida del ácido oxálico goteado. Si tenemos en cuenta que con la dosis administrada no se observaron cambios reseñables en la mortalidad de abejas y se añaden las ventajas de ser de naturaleza orgánica, podríamos concluir que este método, usado de forma autorizada para la varroosis, podría ser de una ayuda inestimable para el control alternativo del ácaro.

6.5.4.- Conclusiones

En el Grupo IV de colmenas sometido a este estudio, el ácido oxálico administrado por goteo en una solución azucarada ha mostrado una buena eficacia contra la varroosis.

Es cierto que la eficacia alcanzada es inferior al 95%, valor óptimo necesario para el control de la varroosis. Sin embargo, teniendo en cuenta que se trata de un ácido orgánico y no un acaricida de síntesis, se puede concluir que la eficacia obtenida es más que aceptable. Este método ha sido ampliamente ensayado en Europa para el control de la varroosis y en algunos países ya se ha instaurado como método de control alternativo a los acaricidas de síntesis.

En consecuencia, y dado que la utilización del ácido oxálico no presenta tanta problemática de acumulación de residuos en la cera y otros productos de la colmena, y de generación de resistencia por parte de *Varroa* como en el caso de los acaricidas de síntesis, se puede concluir que el ácido oxálico administrado por goteo a través de una solución azucarada puede ser un producto natural eficaz para el control de la varroosis, o cuando menos, usado como complemento al tratamiento químico de esta parasitosis con un acaricida de síntesis.

6.6.- Resultados y discusión del ácido oxálico sublimado

6.6.1.- Evolución de las colmenas

Al comienzo del estudio todas las colmenas del Grupo V presentaban actividad de cría, con una media en las 5 colmenas de 3 cuadros de cría, en consonancia con su vigor y con la climatología.

En la tabla nº 9 se resumen los datos relativos a la cría de las colmenas del Grupo V antes de administrar el ácido oxálico sublimado, las reservas de miel y la población de abejas presentes; así como la presencia de *Varroa* forética y de abejas con alas deformadas.

COLMENA	GRUPO ESTUDIO V				
	21	22	23	24	25
Panales de cría inicial	3	3	3	3	3
Celdillas con cría operculada iniciales	5.795	5.890	3.705	6.745	4.655
Panales de miel	5	2	5	4	4
Panales con abeja	5	4	7	8	4
Varroa forética	Si	Si	Si	No	Si
Abejas con alas deformes	No	Si	Si	No	No

TABLA 9. *Panales de cría inicial y celdillas con cría operculada iniciales, panales de miel y panales con abeja de las colmenas del Grupo V del estudio.*

Inicialmente se observaba *Varroa* forética sobre las abejas en 4 de las 5 colmenas del Grupo V objeto del estudio, concretamente las colmenas nº 21, nº 22, nº 23 y nº 25. Asimismo, era evidente la presencia de abejas con alas deformadas y el abdomen más reducido en las colmenas nº 22 y nº 23.

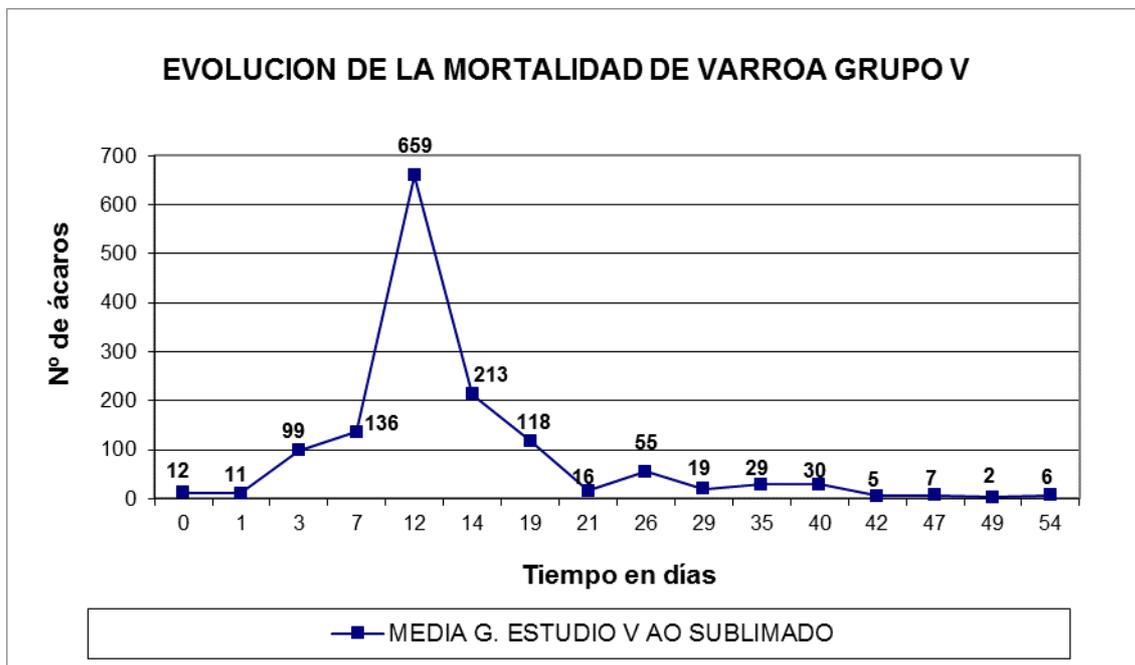
A lo largo del estudio no se ha observado ningún efecto adverso sobre las colonias a causa de la aplicación del tratamiento acaricida con ácido oxálico sublimado.

6.6.2.- Evolución de la mortalidad de Varroa

En la **Gráfica 24** se han representado los valores medios de la mortalidad de Varroa en cada periodo de seguimiento del Grupo V (media de las 5 colmenas).

El valor a tiempo cero corresponde a la mortalidad natural previa. Los siguientes puntos hasta el día 12, representan la mortalidad media después de haber sublimado las colmenas con ácido oxálico en dos ocasiones, el día 1 y el día 7, y el resto hasta el final, se debe al efecto del acaricida de contraste, cumafós en este caso, que nos sirve para estimar la eficacia.

En este mismo estudio se ha podido comprobar que la administración del ácido oxálico sublimado no produce un efecto inmediato sobre la Varroa ni causa directamente su muerte. De hecho, se colocaron láminas de cartulina impregnadas con vaselina filante en los fondos sanitarios en las colonias que iban a ser tratadas, se administró el ácido orgánico sublimado y se retiraron de nuevo las láminas de los fondos a los 15 minutos de la sublimación, pudiéndose verificar una mínima caída de ácaros.

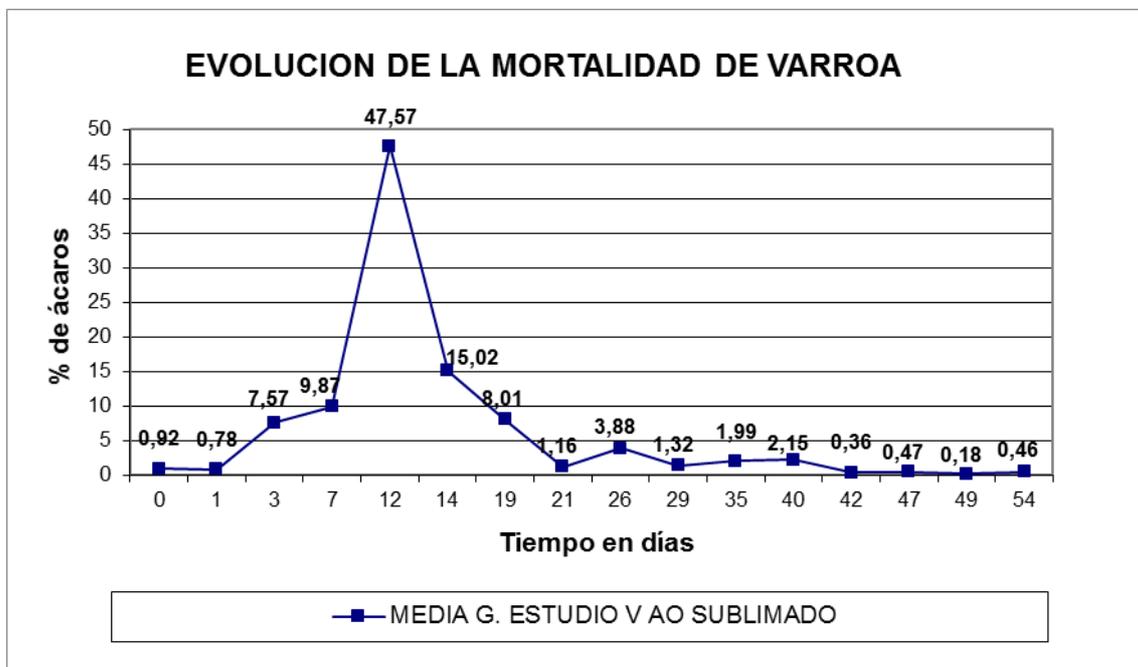


GRÁFICA 24

El aumento de la mortalidad de Varroa después de la primera sublimación de ácido oxálico administrado a las colmenas es realmente bajo teniendo en cuenta que en las colonias no hay cría operculada después de haber mantenido a la reina enjaulada más de 3 semanas, y que todas las Varroas presentes son foréticas y accesibles por tanto al efecto del ácido orgánico sublimado.

A los 7 días se realizó una segunda administración de ácido oxálico sublimado, obteniéndose un mejor resultado de mortalidad de Varroa, pero aun así resultó ser escaso, teniendo en cuenta la situación de ausencia total de cría en las colmenas tratadas.

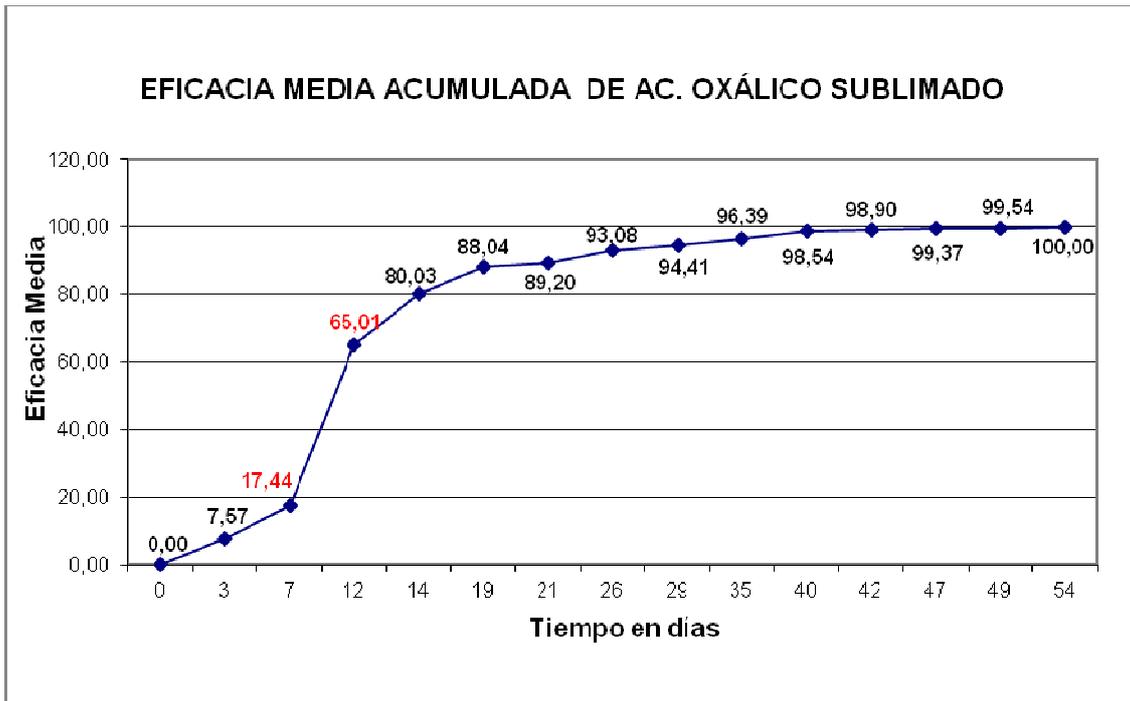
En la **Gráfica 25** se han representado los valores medios normalizados de la mortalidad de Varroa expresados en porcentaje en cada periodo de seguimiento de las 5 colmenas del Grupo V. Al igual que en la gráfica anterior, el valor a tiempo cero se corresponde con la mortalidad natural previa. Los siguientes puntos hasta el día 12 representa la mortalidad media después de administrar dos veces ácido oxálico sublimado en las colmenas, y el resto hasta el día 54 al efecto del acaricida de contraste (cumafós).



GRÁFICA 25

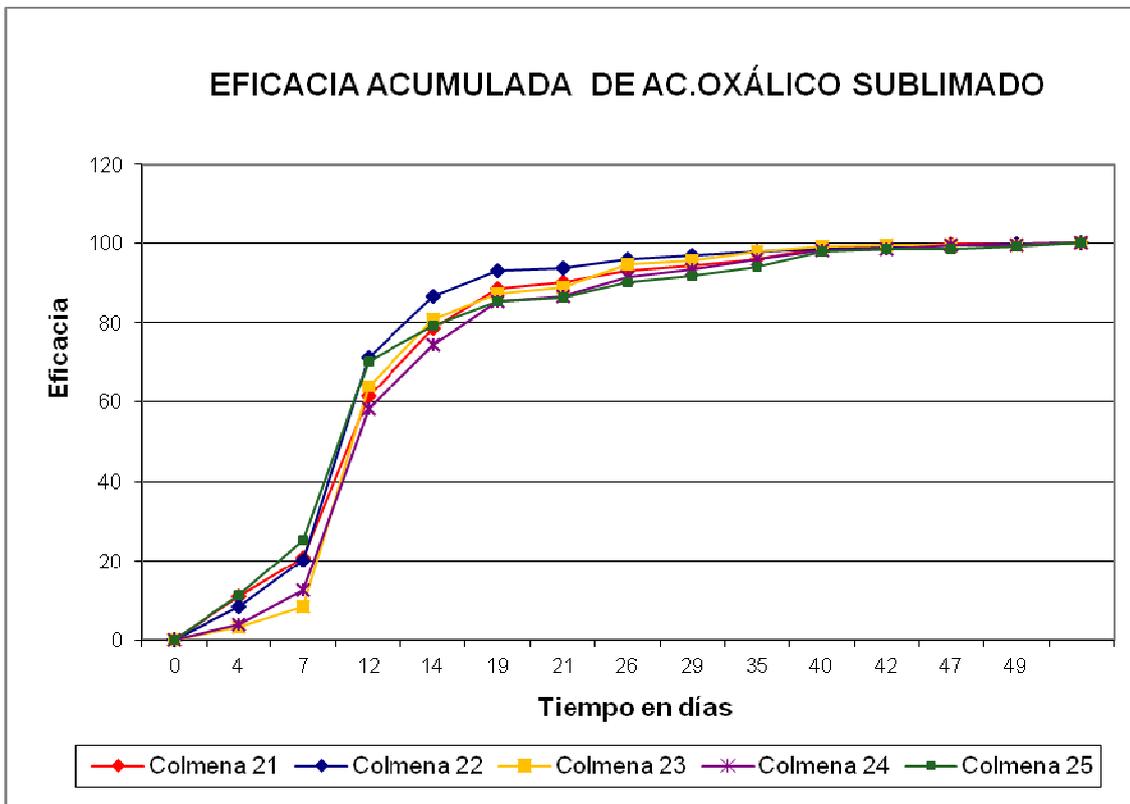
6.6.3.- Eficacia del ácido oxálico sublimado

En la **Gráfica 26** se ha representado la eficacia media acumulada de las colmenas que integran el Grupo V del estudio, alcanzándose a la semana de la primera administración de ácido oxálico sublimado una eficacia media de 17,44% y a los 5 días después de la segunda sublimación una eficacia media de 65,01%.



GRÁFICA 26

En la **Gráfica 27** se ha representado la eficacia acumulada de cada una de las 5 colmenas del Grupo V para poder apreciar las diferencias en la evolución de la eficacia del acaricida.



GRÁFICA 27

El trazo de las curvas de eficacia de las 5 colmenas que integran el Grupo V tiene un comportamiento similar. Se puede comprobar que a la semana de la aplicación del ácido oxálico sublimado, la eficacia se sitúa en un rango entre el 8,42% (valor más bajo correspondiente a la colmena nº 23) y el 25,22% (valor más elevado correspondiente a la colmena nº 25), situándose la media de las 5 colmenas en 17,44%. A los 12 días, habiendo administrado una segunda sublimación del ácido orgánico, la eficacia alcanza su valor más bajo en la colmena nº 24, con un 58,08%, y el máximo en la colmena nº 22, que presentó 71,29%, situándose la eficacia media de todo el Grupo V en 65,01%.

En la siguiente tabla se presentan los valores de la población de Varroa total al final del estudio y la eficacia alcanzada a la semana (tras una administración de ácido oxálico sublimado) y a los 12 días, tras haber aplicado a las colmenas una segunda sublimación de este ácido orgánico.

GRUPO ESTUDIO V ÁCIDO OXÁLICO SUBLIMADO				
COLMENA	VARROAS CAÍDAS CON AC.OXÁLICO SUBLIMADO	POBLACIÓN TOTAL DE VARROA	EFICACIA (%) A 7 DÍAS	EFICACIA (%) A 12 DÍAS
21	714	1.163	20,81	61,39
22	976	1.369	20,23	71,29
23	669	1.045	8,42	64,02
24	1.322	2.276	12,52	58,08
25	791	1.126	25,22	70,25
Media ± desv.	894 ± 266	1.395 ± 506	17,44 ± 6,81	65,01 ± 5,68

TABLA 10. Varroas caídas con ácido oxálico sublimado, población total de Varroa y eficacia en las colmenas a los 7 y 12 días en el Grupo V

Con el objetivo de poder comparar con datos de otros ensayos similares de oxálico sublimado, se comentan los obtenidos por los Servicios Técnicos de la Agrupación de Defensa Sanitaria apiADS en Valencia, durante el otoño de 2014 y el otoño de 2015 y utilizando una metodología comparable. El primer ensayo se realizó en 5 colmenas Layens en las que se retiraron todos los panales de cría e inmediatamente después se realizó una aplicación de oxálico sublimado. Al contabilizar los ácaros caídos durante 8 días después de la aplicación y realizar el tratamiento de contraste, la eficacia media el oxálico sublimado fue de 20,3%, un valor muy próximo al obtenido en el presente trabajo con el primer sublimado.

En otoño de 2015, apiADS realizó un segundo ensayo. Esta vez se enjaularon las reinas de 4 colmenas Layens durante 40 días, para simular una ausencia de cría comparable a una invernada de climas fríos. Luego se realizó una aplicación de oxálico sublimado. La eficacia media obtenida en estas condiciones fue del 67,2 %, valor muy próximo al obtenido con la segunda sublimación del presente trabajo.

La eficacia obtenida en colmenas Layens en todos los casos es claramente insuficiente para el control de la Varroosis en ausencia de cría. Es muy llamativo que ni siquiera con 2 aplicaciones consecutivas, ni con un periodo de ausencia de cría de unos 20 días, en el que los ácaros están más susceptibles por su estado forético prolongado, la sublimación de oxálico no haya conseguido una eficacia aceptable. En todo caso, sería conveniente realizar más ensayos en colmenas Layens, cambiando las condiciones y dosis aplicadas, para intentar llegar a las eficacias obtenidas por este método en otros países europeos, aunque bajo otras condiciones climáticas y otros tipos de colmena muy diferentes a la Layens.

6.6.4.- Conclusiones

En el Grupo V de colmenas sometido a este estudio, la administración de ácido oxálico sublimado no ha mostrado una buena eficacia contra la varroosis.

Si bien no se ha comprobado la evolución de su eficacia si se hubieran seguido aplicando más sublimaciones de este ácido orgánico a las colonias, lo cierto es que se encontraban en una situación idónea para permitir a este producto expresar su máxima efectividad frente al parásito en su fase forética, dada la ausencia total de cría que se ha forzado en las colmenas.

Al igual que ocurre con la administración del ácido oxálico goteado en solución azucarada, la sublimación de este ácido orgánico no presenta tanta problemática de acumulación de residuos en la cera y otros productos de la colmena ni de generación de resistencia por parte de Varroa como en el caso de los acaricidas de síntesis. Por lo tanto, se puede concluir que el ácido oxálico administrado por sublimación podría ser en todo caso usado como un método complementario a otro método de control de la varroosis, pero no el de elección ya que la eficacia ha sido insuficiente en las colmenas estudiadas, al menos hasta la realización de nuevos ensayos. Tampoco hay que olvidar que para la aplicación de oxálico sublimado se necesita invertir mucho más en el material necesario y que requiere la protección integral del apicultor por su peligrosidad.

7.- VALORACIÓN DE EFICACIA DEL HONGO *TOLYPOCLADIUM CYLINDROSPORUM*

Los hongos entomopatógenos que se utilizaron para ensayar la capacidad de controlar poblaciones de *Varroa* en colmenas fueron dos aislados de *Tolytocladium cylindrosporium* denominados Tc11 y Tc3398. La capacidad patógena de estos dos aislados sobre dos especies de garrapatas, *Ornithodoros erraticus* y *Ornithodoros moubata* había sido demostrada anteriormente, aunque con un método de aplicación del hongo diferente del utilizado en este estudio contra *Varroa*.



Foto 56. Placa de Petri con hongo *T.cylindrosporium* cepa Tc3398



Foto 57. Placa de Petri con hongo *T.cylindrosporium* cepa Tc3398

En este ensayo se eligió un método eficaz y sencillo de distribución del hongo en las colonias de abejas, mediante la colocación sobre los cuadros de las colmenas de una placa Petri de 9cm de diámetro de agar de patata y dextrosa, cuya superficie estaba cubierta de micelio del hongo.



*Foto 58. Placa de Petri con *Tolyposcladium cylindrosporum* colocado en una colmena*

Previamente, para comprobar la viabilidad de este método se introdujeron en las colonias placas Petri, únicamente con agar de patata y dextrosa para evaluar el crecimiento de los hongos presentes de forma natural en las colmenas. Se pudo comprobar que a los 5 días no quedaba agar en las placas y no existía crecimiento de ningún hongo existente en las colmenas.

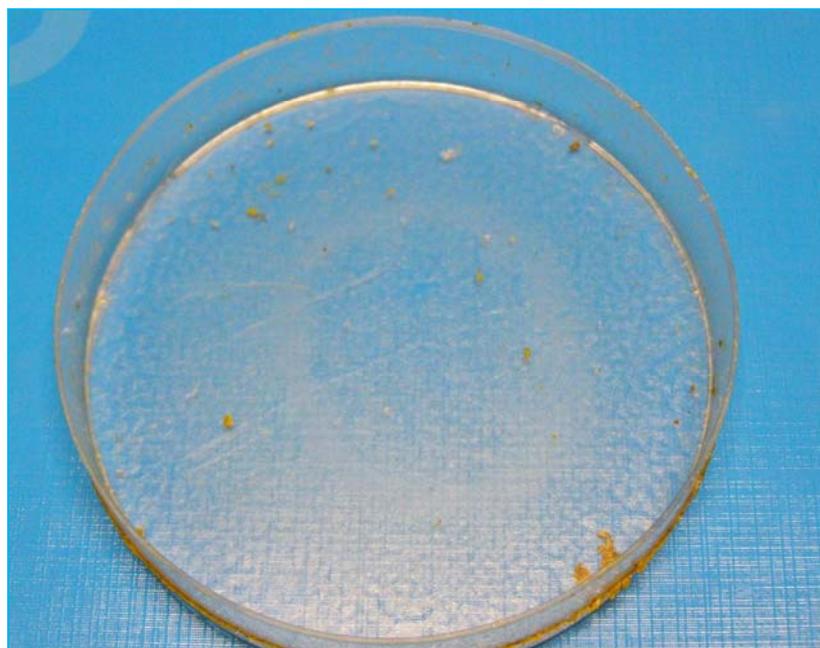


Foto 59. Placa de Petri con agar a los cinco días de su introducción en la colmena

7.1.- Administración del hongo *Tolypocladium cylindrosporum* Ceba Tc11 en las colmenas del Grupo III y de la cepa Tc3398 en las colmenas del Grupo VII

El inóculo de *T. cylindrosporum* depositado en las colmenas consistió de una placa Petri de agar de patata y dextrosa cuya superficie estaba cubierta de micelio del hongo, de la cepa Tc11 en las colmenas del Grupo III y de la cepa Tc3398 en las colmenas del Grupo VII.

Para preparar el inóculo en cada una de estas placas se esparció sobre la superficie del agar, con la ayuda de una varilla de vidrio, una gota de 50µl de una suspensión de conidios. Esta operación se realizó aproximadamente 10 días antes de introducir las placas en las colmenas, permitiendo en este periodo de tiempo que las esporas germinaran y el micelio cubriera la superficie del agar en la placa Petri.

Las suspensiones de conidios se obtuvieron añadiendo 5 ml de agua estéril conteniendo 0.005% tween 80 a la superficie de un cultivo de *T. cylindrosporum*, a continuación se pasó una varilla de vidrio sobre la superficie para liberar esporas. La suspensión de esporas se recogió con pipeta.

Este hongo esporula abundantemente y se ha estimado que los aislados en este experimento pueden producir unos 1.5×10^7 conidios por placa de micelio fresco.



Foto 60. Placa de Petri con hongo *T.cylindrosporum* cepa Tc11

Se realizó un primer control antes del tratamiento de las colonias sometidas al ensayo con el hongo *T. cylindrosporum*, tanto a las que se iba a administrar la cepa Tc11 como la cepa Tc3398, al objeto de establecer la tasa de mortalidad natural previa. Este dato pone de manifiesto el efecto acaricida del hongo mediante el contraste entre la mortalidad natural previa y la que se produce después de administrar el producto ensayado, 2 cepas diferentes de *T. cylindrosporum* en este caso.

Posteriormente se procedió al enjaulado de las reinas de las colmenas pertenecientes a los Grupo III y VII, para poder valorar la eficacia de este hongo en ausencia total de cría. Tras 25 días, en cada una de las 5 colmenas del Grupo III se colocó semanalmente una placa Petri con el micelio del hongo *T. cylindrosporum* cepa Tc11, sobre los cuadros, durante 3 semanas consecutivas.



Foto 61. Placas de Petri con hongo *T.cylindrosporum* cepa Tc11 preparadas para su introducción en las colmenas del Grupo III



Foto 62. Placa de Petri con *T.cylindrosporum* cepa Tc11 sobre los cuadros de una colmena del Grupo III

Este mismo procedimiento se realizó en las colmenas del Grupo VII, introduciendo una placa Petri con el micelio del hongo, pero de la cepa Tc3398.



Foto 63. Placas de Petri con hongo *T.cylindrosporium* cepa Tc3398 preparadas para su introducción en las colmenas del Grupo VII



Foto 64. Placa de Petri con hongo *T.cylindrosporium* cepa Tc3398 sobre los cuadros de una colmena del Grupo VII

Cada semana se retiraba la placa introducida, que había sido limpiada por las abejas y con signos evidentes de propolización de la misma.



Foto 65. Placa de Petri con hongo *T.cylindrosporum* propolizada después de una semana sobre los cuadros de una colmena

7.2.- Seguimiento de la mortalidad de Varroa

Se contabilizaron las Varroas recogidas en las láminas del fondo de las colmenas de los Grupos III y VII en cada intervalo, usando una lupa con luz para facilitar el conteo y contadores manuales.

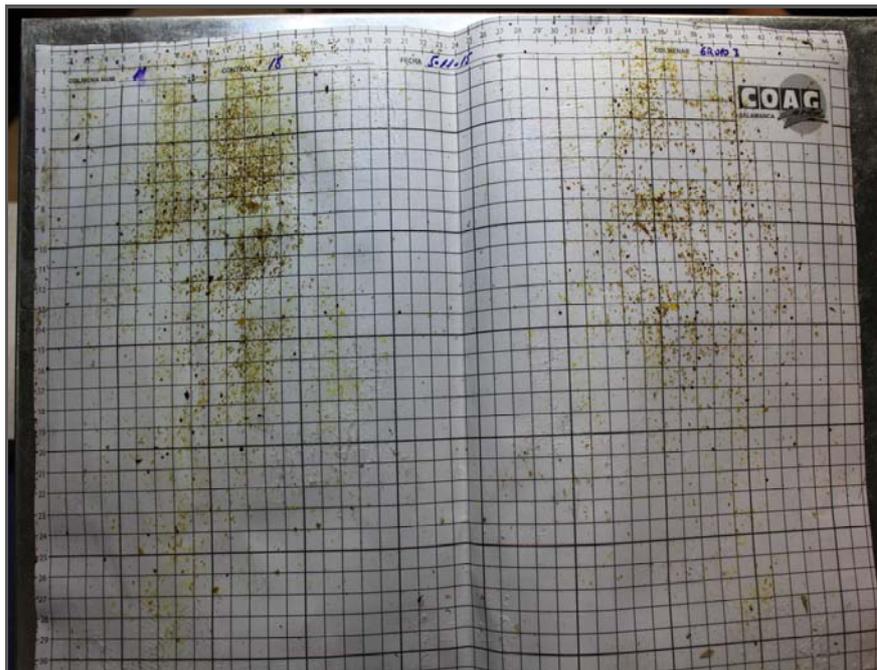


Foto 66. Observación posterior de una lámina de un fondo sanitario de una colmena del grupo III

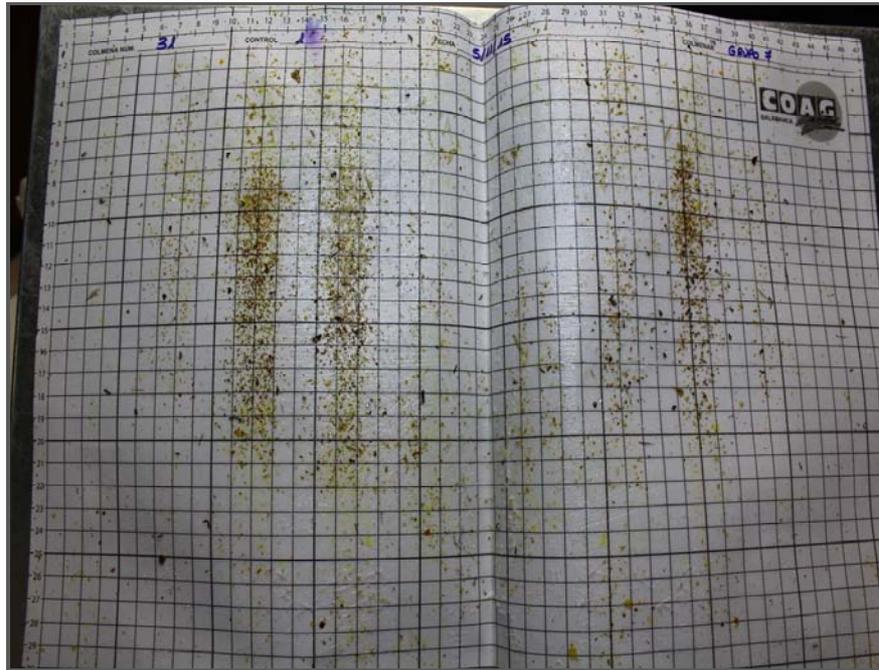


Foto 67. Observación posterior de una lámina de un fondo sanitario de una colmena del grupo VII

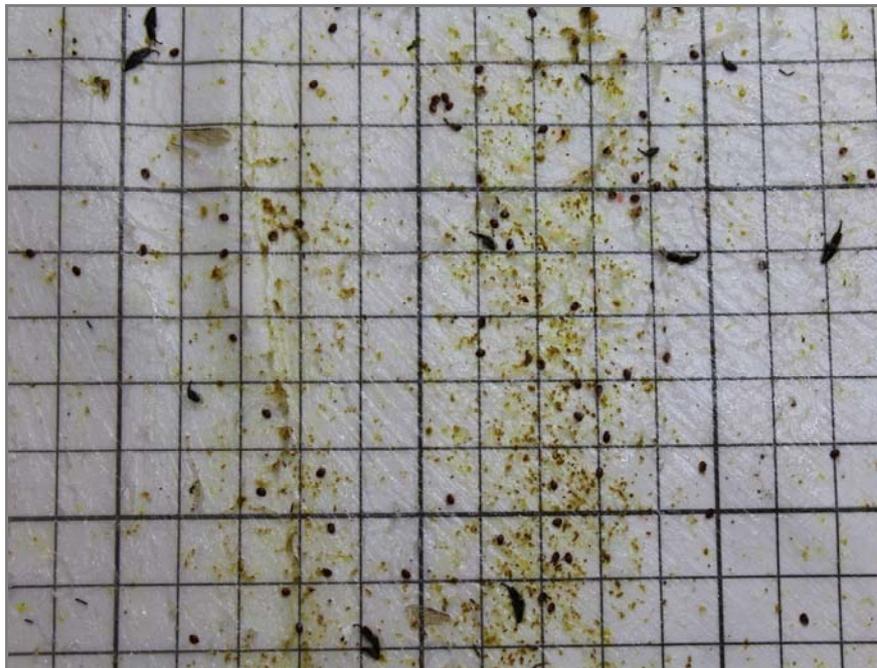


Foto 68. Imagen de lámina de cartulina con Varroas y restos de la colmena

A la vista de los pocos ácaros que caían y se recogían en las láminas de los fondos sanitarios, se decidió a la semana de haber introducido la tercera placa Petri con el hongo cepa Tc11 en las colmenas del Grupo III la finalización del seguimiento de la mortalidad de Varroa, prolongándose durante un mes más en las colmenas del Grupo VII en las que se había introducido *T. cylindrosporum* cepa Tc3398.

7.3.- Cultivo y análisis de los ácaros Varroa muertos

Con el fin de comprobar si se podía recuperar el hongo *Tolypocladium cylindrosporum* de los cadáveres de Varroas, durante los distintos intervalos de tiempo del periodo de seguimiento de mortalidad de Varroa se recogieron los ácaros caídos de las láminas de los fondos sanitarios de las colmenas de los grupos III y VII.

Las Varroas de cada colmena recolectadas en un tubo, se esparcieron sobre una o dos placas Petri con agar de agua. Varios días tras esta incubación en condiciones de cámara húmeda se comprobó que se producía esporulación de hongos en los cadáveres.

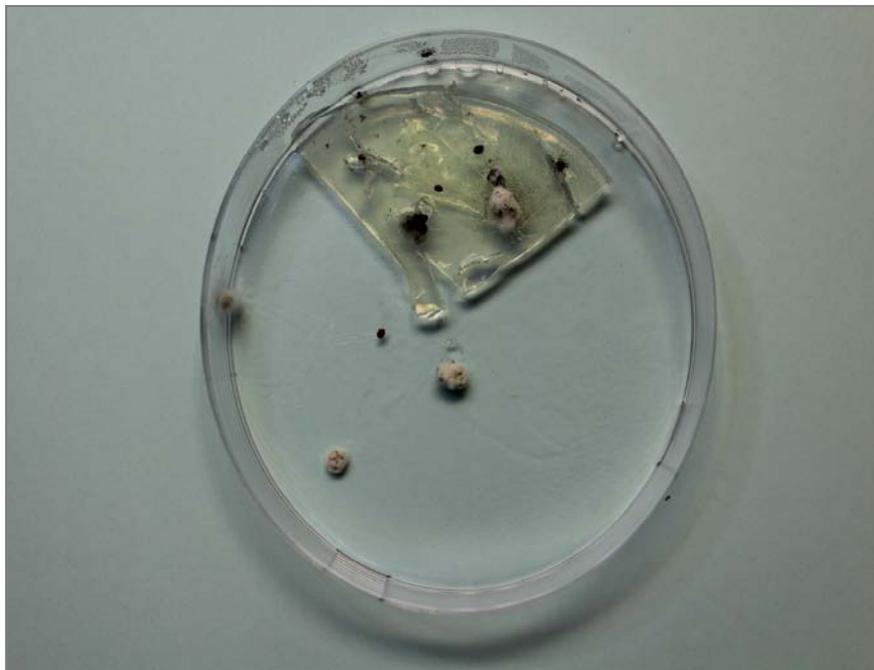


Foto 69. Cultivo de Varroa para comprobar crecimiento de *T.cylindrosporum*



Fotos 70 y 71. Cultivo de Varroa para comprobar crecimiento de *T.cylindrosporum* cepas Tc11 y Tc3398

En muchas muestras se observó esporulación de hongos como *Penicillium*. Sólo en una muestra se observó esporulación de un hongo blanco, que posteriormente se identificó como *T. cylindrosporum*.



Foto 72 (izq.). Micelio de *T. cylindrosporium* creciendo sobre un cadáver de *Varroa*. Foto 73 (cto) Hongo sin identificar colonizando un cadáver de *Varroa*. Foto 74 (Dcha). Cadáver de *Varroa* en agar de agua.

7.4.- Aplicación de un acaricida de contraste

A la semana de haber introducido la tercera placa de Petri con el micelio del hongo cepa Tc11 en las colmenas del Grupo III y a los 30 días de haber colocado la última placa de Petri con el *T. cylindrosporium* cepa Tc3398 en las colonias del Grupo VII, en ambos grupos se administró un acaricida de contraste, eligiéndose la flumetrina (Bayvarol®) en este caso. Para ello se introdujeron 4 tiras con este principio activo en cada colmena de ambos grupos, de la forma recomendada para las colmenas Layens, de forma que toda la superficie de las tiras fueran accesibles a las abejas, y se mantuvieron durante 42 días en el interior de las mismas.

Este tratamiento de contraste, actuando en ausencia de cría debe provocar la caída de todas las Varroas que superaron la acción acaricida del hongo cepa Tc11 en el caso de las colmenas del Grupo III y del hongo cepa Tc3398 en las colmenas del Grupo VII. Este método es muy fiable y no implica la destrucción de la colmena.



Foto 75 y 76. Colocación de tiras de contraste de flumetrina en las colonias de los Grupos III y VII

7.5.-Evaluación de la eficacia de las dos cepas del hongo *T. cylindrosporium* probado

Contabilizando las Varroas caídas en los controles realizados en las colmenas a lo largo de todo el estudio hasta su finalización, se pudo determinar el número de Varroas totales presentes en las colonias de abejas. El conocimiento de este dato, así como las Varroas caídas durante las 3 semanas en las que se administraron 3 placas de Petri con micelio del hongo cepa Tc11 en las colmenas del Grupo III y durante los 44 días en los que se introdujeron 3 placas de Petri con micelio del hongo cepa Tc3398 en las colmenas del Grupo VII, permitieron evaluar la eficacia de estos dos aislados del hongo *T. cylindrosporium*.

De esta forma se pudo calcular la eficacia acumulada del hongo *T. cylindrosporium*, cepas Tc11 y Tc3398, siendo el cociente entre las Varroas caídas durante 3 semanas en las colmenas de los Grupos III, y durante los 44 días en las colmenas del Grupo VII; y las Varroas totales contabilizadas en cada colmena durante los días en los que se llevó a cabo un seguimiento de la mortalidad, que incluía los periodos de tratamiento más los 42 días del tratamiento de contraste en los dos grupos.

7.6.- Resultados y discusión de la cepa Tc11 de *T. cylindrosporium*

7.6.1.- Evolución de las colmenas

Al comienzo del estudio todas las colmenas del Grupo III presentaban actividad de cría, con una media en las 5 colmenas de 3 cuadros de cría, en consonancia con su vigor y con la climatología.

En la siguiente tabla se resumen, los datos relativos a la cría de las colmenas del Grupo III en el inicio del estudio, antes de administrar el hongo *T. cylindrosporium* cepa Tc11, las reservas de miel y la población de abejas presentes; así como la presencia de Varroa forética y de abejas con alas deformadas.

COLMENA	GRUPO ESTUDIO III				
	11	12	13	14	15
Panales de cría inicial	3	3	3,5	2,5	3
Celdillas con cría operculada iniciales	6.840	8.265	6.175	5.700	4.323
Panales de miel	6	8	6	6	3
Panales con abeja	5	8	7,5	7,5	4,5
Varroa forética	Si	Si	Si	Si	No
Abejas con alas deformes	No	Si	No	No	No

TABLA 11. *Panales de cría inicial y celdillas con cría operculada iniciales, panales de miel y panales con abeja de las colmenas del Grupo III del estudio.*

La superficie de panal ocupada por cría fue transformada en celdillas mediante la aplicación del factor 380 celdillas/dm².

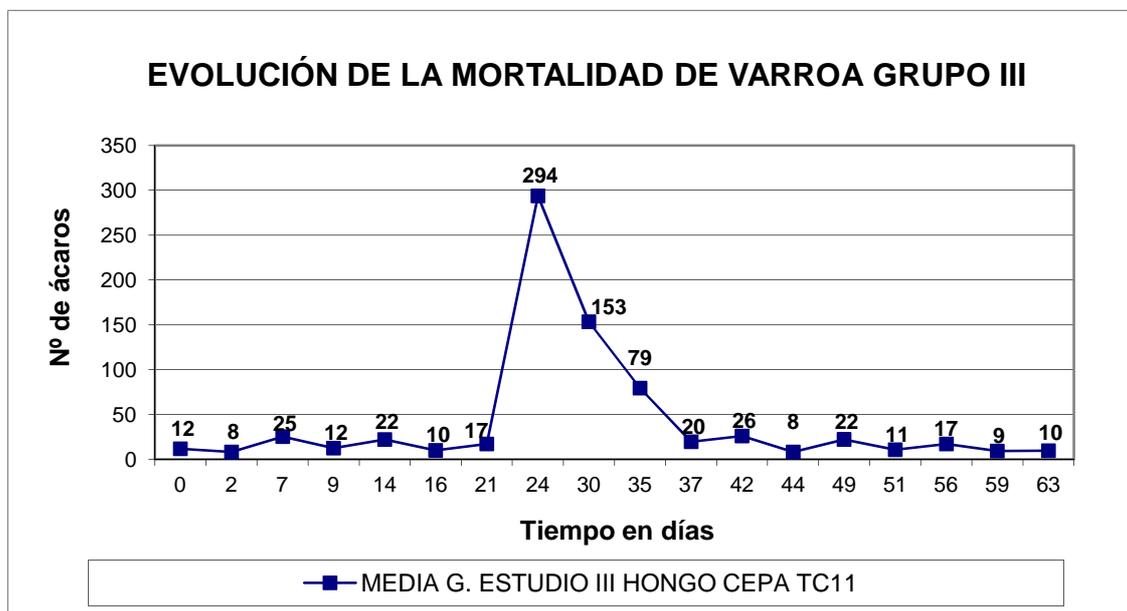
A la vista de los datos, destaca la presencia de *Varroa* forética en 4 de las 5 colmenas del Grupo III objeto del estudio. Asimismo, era evidente la presencia de abejas con alas deformadas y abdomen más reducido en alguna de las colmenas, especialmente en la colmena nº 12.

A lo largo del estudio no se ha observado ningún efecto adverso sobre las colonias a causa de la administración de la placa Petri con la cepa Tc11 del hongo *T. cylindrosporum*; tal como se había podido comprobar previamente en la prueba preliminar realizada en la primavera.

7.6.2.- Evolución de la mortalidad de Varroa

En la **Gráfica 28** se han representado los valores medios de la mortalidad de *Varroa* en cada periodo de seguimiento en las 5 colmenas del Grupo III.

El valor a tiempo cero corresponde a la mortalidad natural previa. Los siguientes puntos hasta el día 21, representan la mortalidad media después de administrar 3 placas Petri con el hongo cepa Tc11 en las colmenas, el resto se debe al efecto del acaricida de contraste, flumetrina en este caso, que nos sirve para estimar la eficacia.

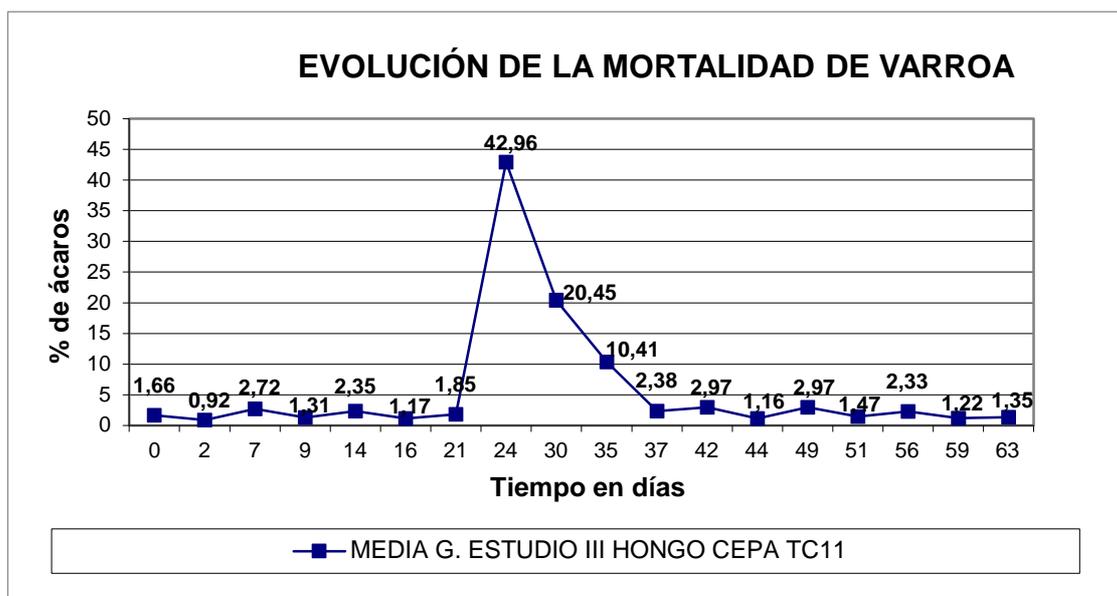


GRÁFICA 28

Tal como se puede observar en la gráfica la curva de mortalidad se mantiene a niveles muy bajos, como la que mostrarían unas colmenas que no hubieran sido sometidas a ningún tratamiento frente a varroosis. Este hecho pone de manifiesto una escasa, nula eficacia de la cepa Tc11 del hongo *T. cylindrosporum* frente a *Varroa*, teniendo en cuenta que en el momento de su administración no había cría operculada en las colmenas y toda la *Varroa* presente era forética, más susceptible por lo tanto a cualquier tratamiento, agente biológico en esta ocasión.

Por este motivo, a partir del día 21 se decidió no continuar con el seguimiento de los ácaros caídos en las colmenas de este grupo y se introdujo el acaricida de contraste. En este momento se observa una caída importante de Varroas que han superado el posible efecto acaricida de la cepa Tc11 del hongo *T. cylindrosporum* pero que han sido afectadas por la flumetrina. Posteriormente y hasta los 42 días en los que se han mantenido las tiras del acaricida de contraste dentro de las colmenas se observa un perfil descendente de la curva de mortalidad.

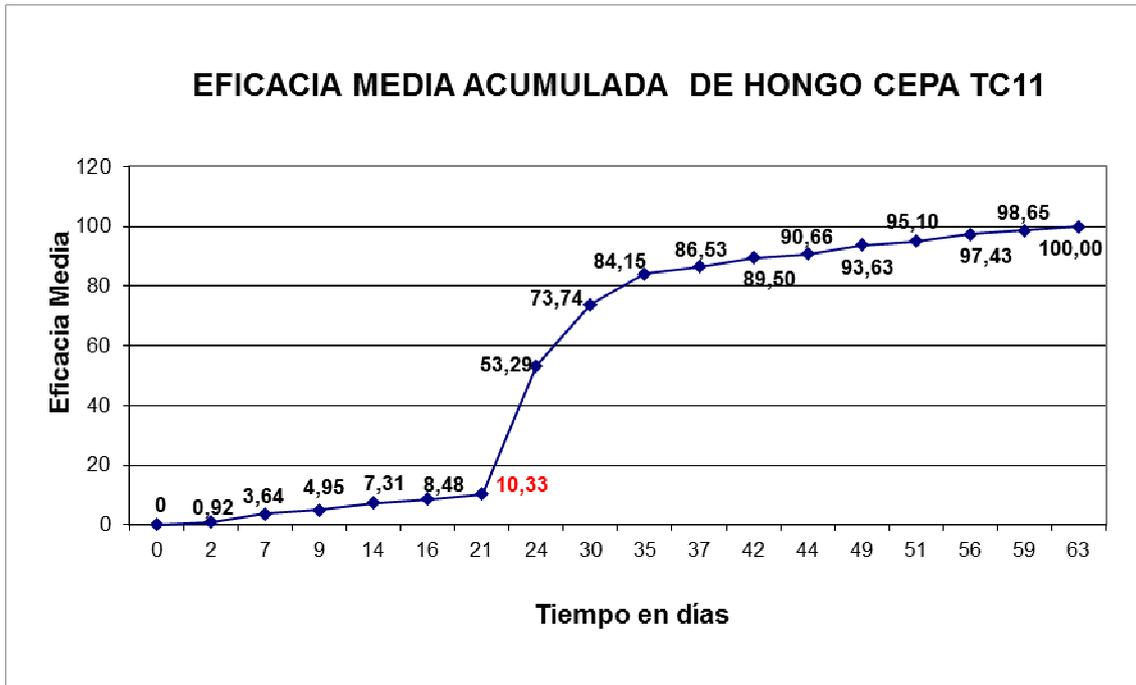
En la **Gráfica 29** se han representado los valores medios normalizados de la mortalidad de Varroa expresados en porcentaje en cada periodo de seguimiento de las 5 colmenas del Grupo III. Al igual que en la gráfica anterior, el valor a tiempo cero se corresponde con la mortalidad natural previa. Los siguientes puntos hasta el día 21 representan la mortalidad media después de introducir en las colmenas las placas Petri con la cepa Tc11 del hongo *T. cylindrosporum*, y el resto hasta el día 63 al efecto del acaricida de contraste (flumetrina).



GRÁFICA 29

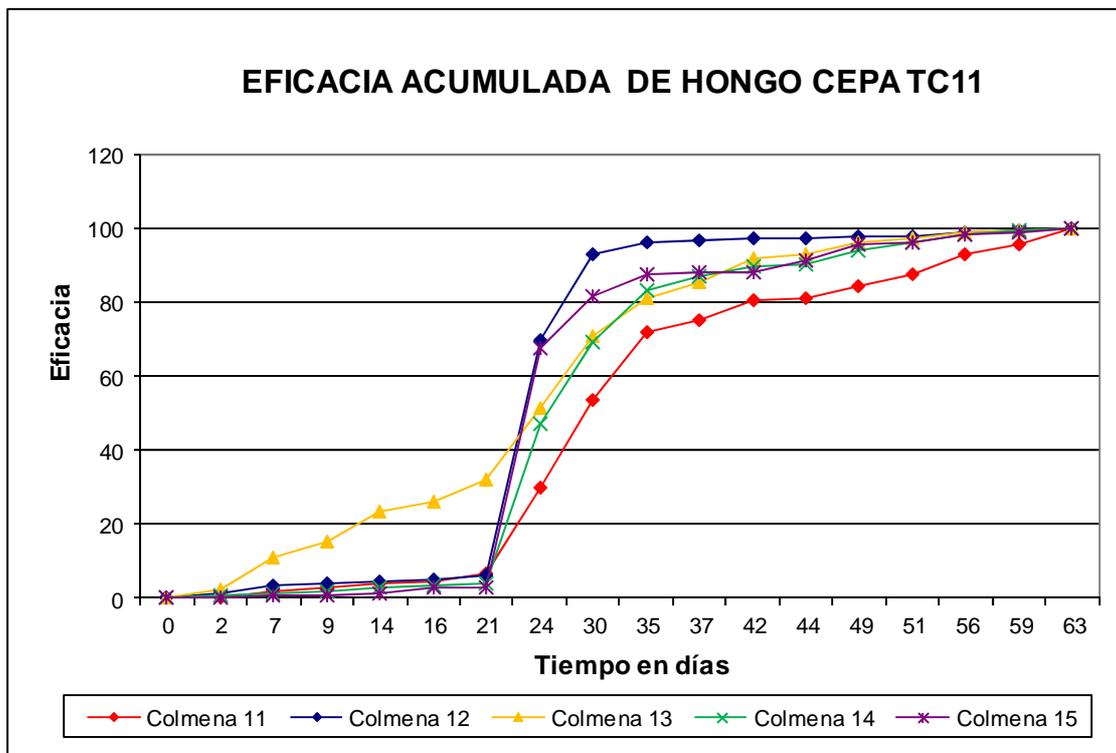
7.6.3.- Eficacia del hongo *T.cylindrosporum* cepa Tc11

En la **Gráfica 30** se ha representado la eficacia media acumulada de las 5 colmenas que integran el Grupo III del estudio, alcanzándose a las 3 semanas después de introducir 3 placas Petri con la cepa fúngica Tc11, una eficacia media de 10,33%.



GRÁFICA 30

En la **Gráfica 31** se ha representado la eficacia acumulada de las 5 colmenas del Grupo III para poder apreciar las diferencias en la evolución de la eficacia acaricida del hongo.



GRÁFICA 31

Se puede comprobar que exceptuando la colmena nº 13, en la que la eficacia se sitúa en 31,89% a los 21 días, en el resto de las colonias los valores de eficacia obtenidos en este momento son muy bajos.

En la siguiente tabla se presentan los valores de la población de Varroa total al final del estudio y la eficacia alcanzada a los 21 días tras haber introducido 3 placas Petri con *T. cylindrosporum* cepa Tc11 en las colmenas del Grupo III.

GRUPO ESTUDIO III HONGO CEPA TC11			
COLMENA	VARROAS CAÍDAS CON HONGO TC11	POBLACIÓN TOTAL DE VARROA	EFICACIA (%) A 21 DÍAS
11	50	742	6,74
12	43	684	6,29
13	339	1.063	31,89
14	26	680	3,82
15	16	550	2,91
Media ± desv.	95 ± 137	763 ± 197	10,17 ± 12,22

TABLA 12. *Varroas caídas con hongo T. cylindrosporum cepa Tc11, población total de Varroa y eficacia en las colmenas a los 21 días en el Grupo III*

7.6.4.- Conclusiones

La cepa Tc11 del hongo *T.cylindrosporum* en el Grupo III de colmenas sometido a este estudio ha mostrado una eficacia indistinguible de la mortalidad natural del ácaro.

Por ello se puede concluir que la cepa Tc11, por lo menos a estas concentraciones del inóculo, y mediante la vía de administración en las colonias utilizada en este estudio, no se puede considerar un método biológico eficaz para el control de la varroosis.

7.7.- Resultados y discusión de la cepa Tc3398 de T. cylindrosporum

7.7.1.- Evolución de las colmenas

En el inicio del estudio, todas las colonias del Grupo VII exceptuando la colmena nº 35 presentaban actividad de cría, con una media en las 4 colmenas que sí disponían de ella de 2,6 cuadros de cría.

En la tabla nº 19 se resumen los datos relativos a la cría de las colmenas del Grupo VII antes de administrar el *T. cylindrosporum* cepa Tc3398, las reservas de miel y la población de abejas presentes; así como la presencia de Varroa forética y de abejas con alas deformadas.

COLMENA	GRUPO ESTUDIO VII				
	31	32	33	34	35
Panales de cría inicial	2,5	3	2	3	0
Celdillas con cría operculada iniciales	5.605	7.410	4.085	5.653	0
Panales de miel	5	5	5	8	11
Panales con abeja	7,5	8	7	9	7
Varroa forética	Si	Si	Si	Si	Si
Abejas con alas deformes	Si	Si	No	No	No

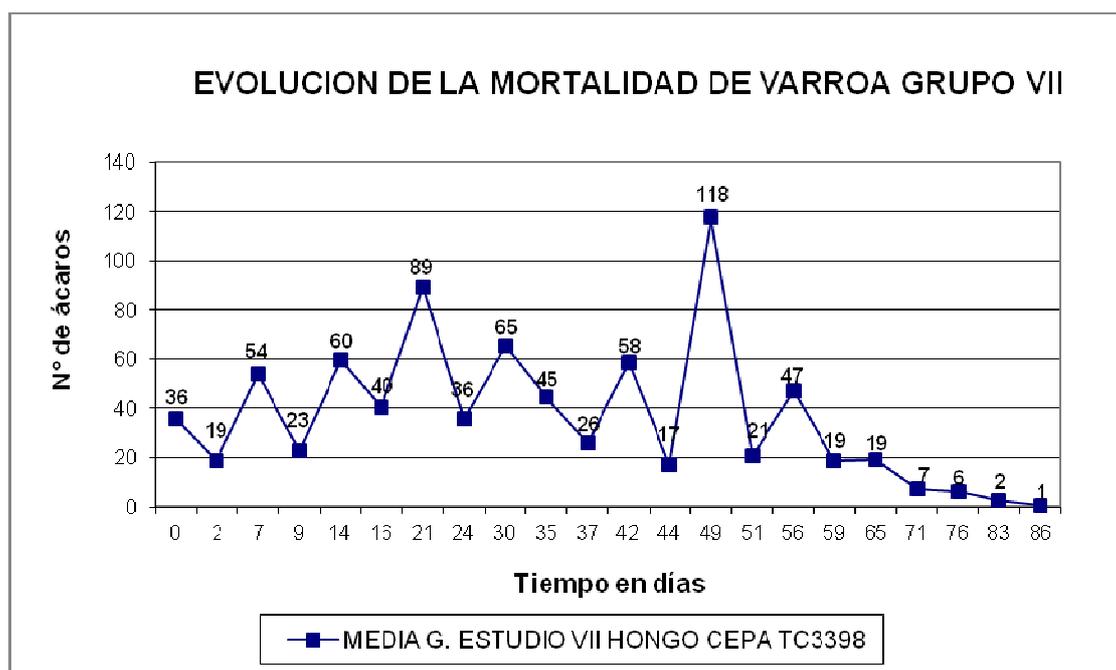
TABLA 13. Panales de cría inicial y celdillas con cría operculada iniciales, panales de miel y panales con abeja de las colmenas del Grupo VII del estudio.

Inicialmente se observaba Varroa forética sobre las abejas en las 5 colmenas que conforman el Grupo VII objeto del estudio. Asimismo, era evidente la presencia de abejas con alas deformadas y el abdomen más reducido en las colmenas nº 31 y nº 32.

A lo largo del estudio no se ha observado ningún efecto adverso sobre las colonias a causa de la administración de la placa Petri con la cepa Tc3398 del hongo *T. cylindrosporum*; tal como ya se había comprobado anteriormente en la prueba preliminar realizada en primavera.

7.7.2.- Evolución de la mortalidad de Varroa

En la **Gráfica 32** se han representado los valores medios de la mortalidad de Varroa en cada periodo de seguimiento en las 5 colmenas del Grupo VII.



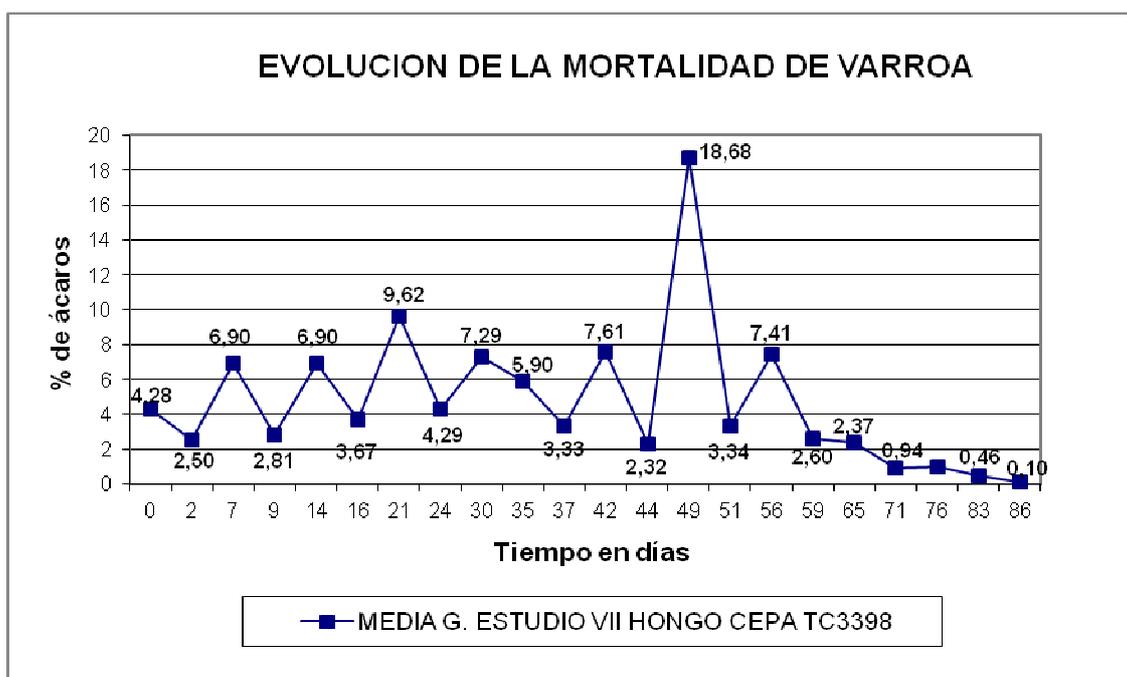
GRÁFICA 32

El valor a tiempo cero corresponde a la mortalidad natural previa. Los siguientes puntos hasta el día 44, representan la mortalidad media después de administrar 3 placas Petri con el hongo cepa Tc3398 en las colmenas, el resto se debe al efecto del acaricida de contraste, flumetrina en este caso, que nos sirve para estimar la eficacia.

Tal como se puede observar en la gráfica la curva de mortalidad muestra una forma de dientes de sierra, los días 7 y 14, momento en el que se introduce una nueva placa de Petri en las colonias con el micelio del hongo *T. cylindrosporum* cepa Tc3398.

Por este motivo, a partir del día 21 se decidió continuar con el seguimiento de los ácaros caídos en las colmenas de este grupo hasta el día 44, momento en el que se introdujo el acaricida de contraste. En este periodo de tiempo se observa la misma tendencia de la gráfica, mostrando unos picos de sierra en la mortalidad de Varroa.

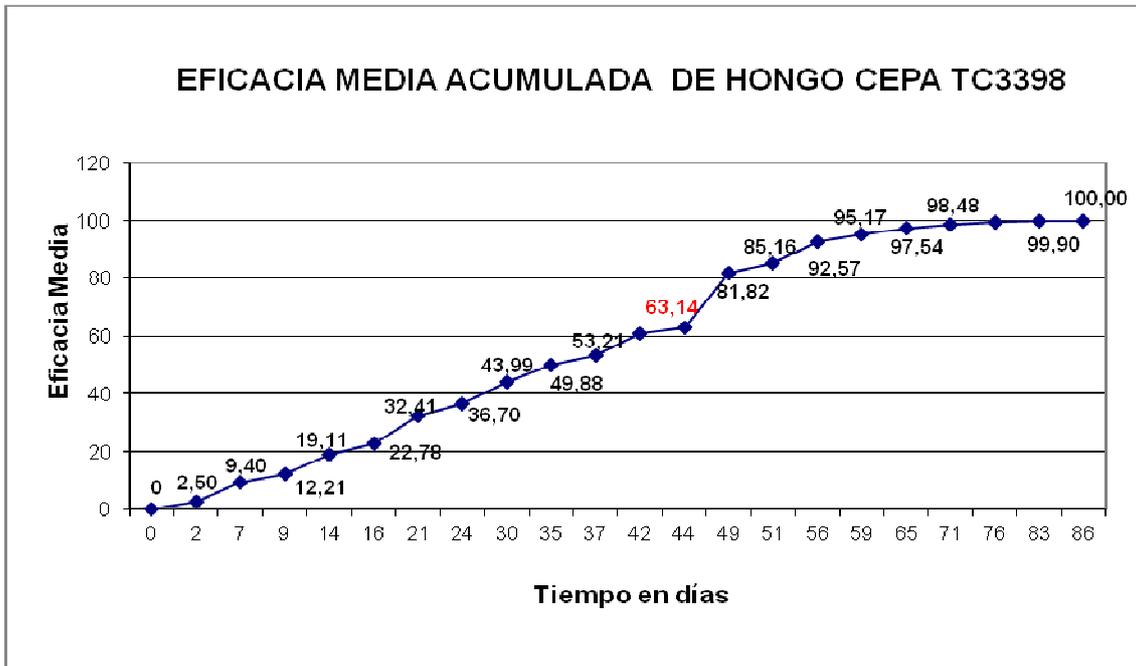
En la **Gráfica 33** se han representado los valores medios normalizados de la mortalidad de Varroa expresados en porcentaje en cada periodo de seguimiento de las 5 colmenas del Grupo VII. Al igual que en la gráfica anterior, el valor a tiempo cero se corresponde con la mortalidad natural previa. Los siguientes puntos hasta el día 44 representan la mortalidad media después de introducir en las colmenas las placas Petri con la cepa Tc3398 del hongo *T. cylindrosporum*, y el resto hasta el día 86 al efecto del acaricida de contraste (flumetrina).



GRÁFICA 33

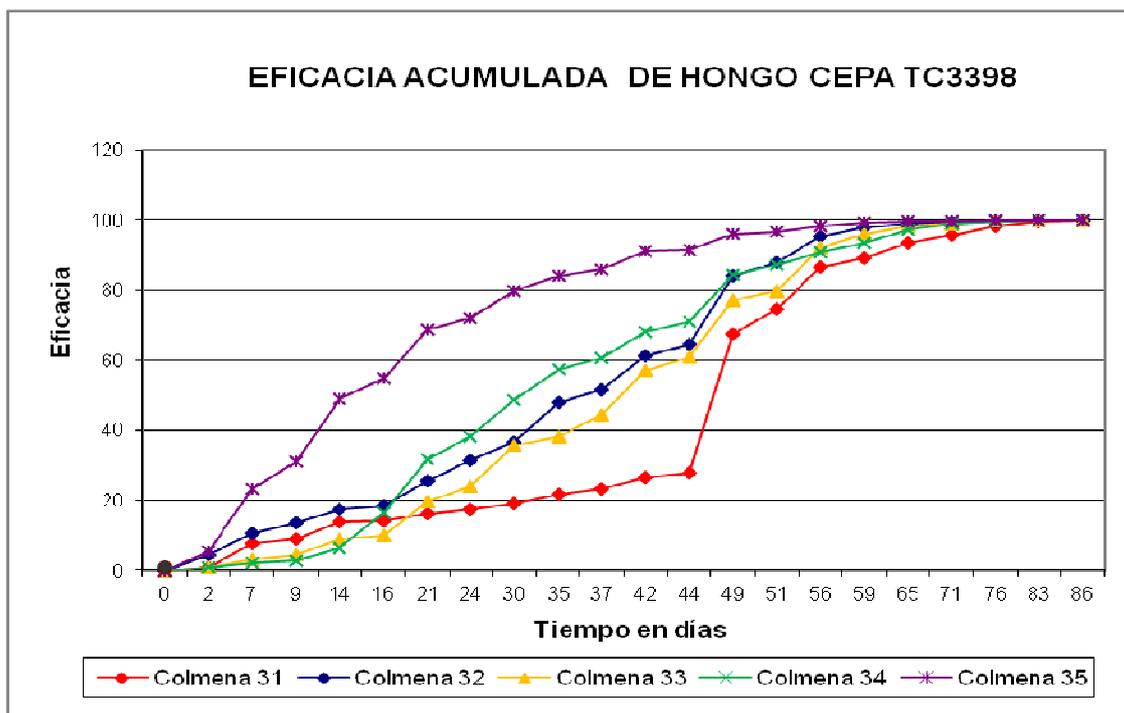
7.7.3.- Eficacia del hongo *T.cylindrosporium* cepa Tc3398

En la **Gráfica 34** se ha representado la eficacia media acumulada de las 5 colmenas que integran el Grupo VII del estudio, alcanzándose a los 44 días después de introducir 3 placas Petri con la cepa fúngica Tc3398, una eficacia media de 63,14%.



GRÁFICA 34

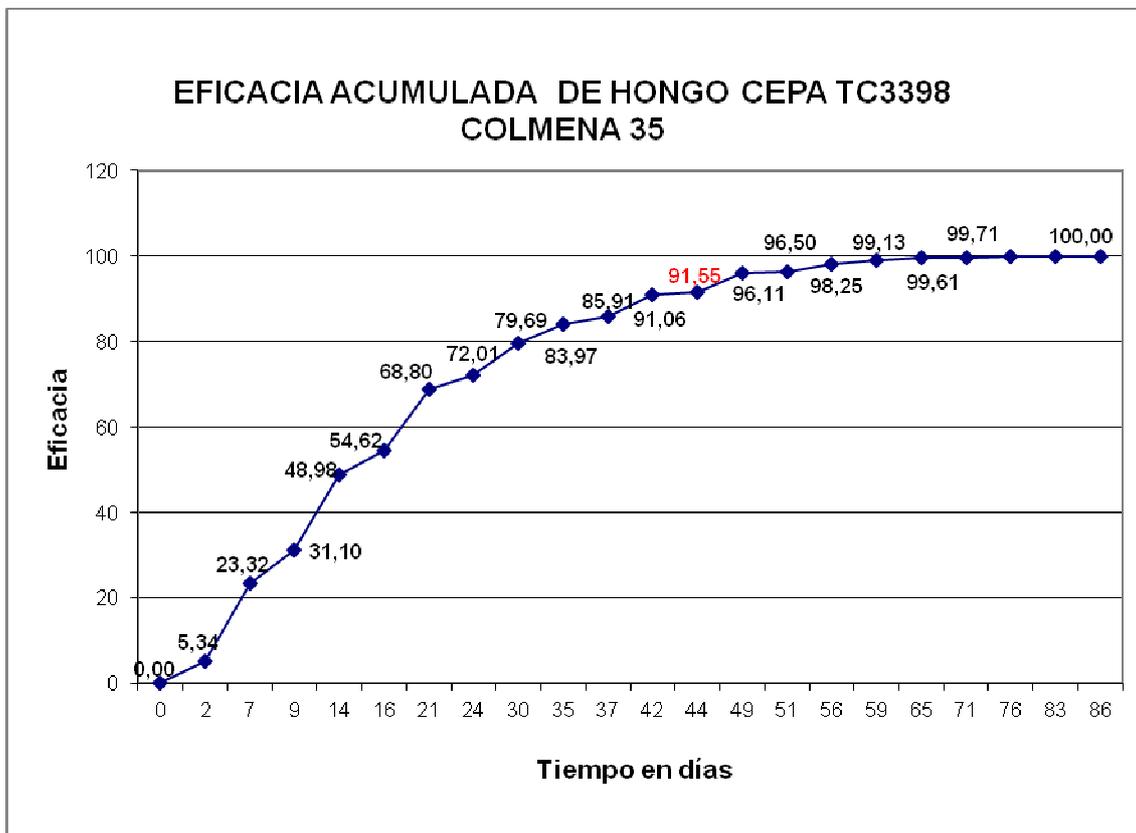
En la **Gráfica 35** se ha representado la eficacia acumulada de las 5 colmenas del Grupo VII para poder apreciar las diferencias en la evolución de la eficacia acaricida del hongo.



GRÁFICA 35

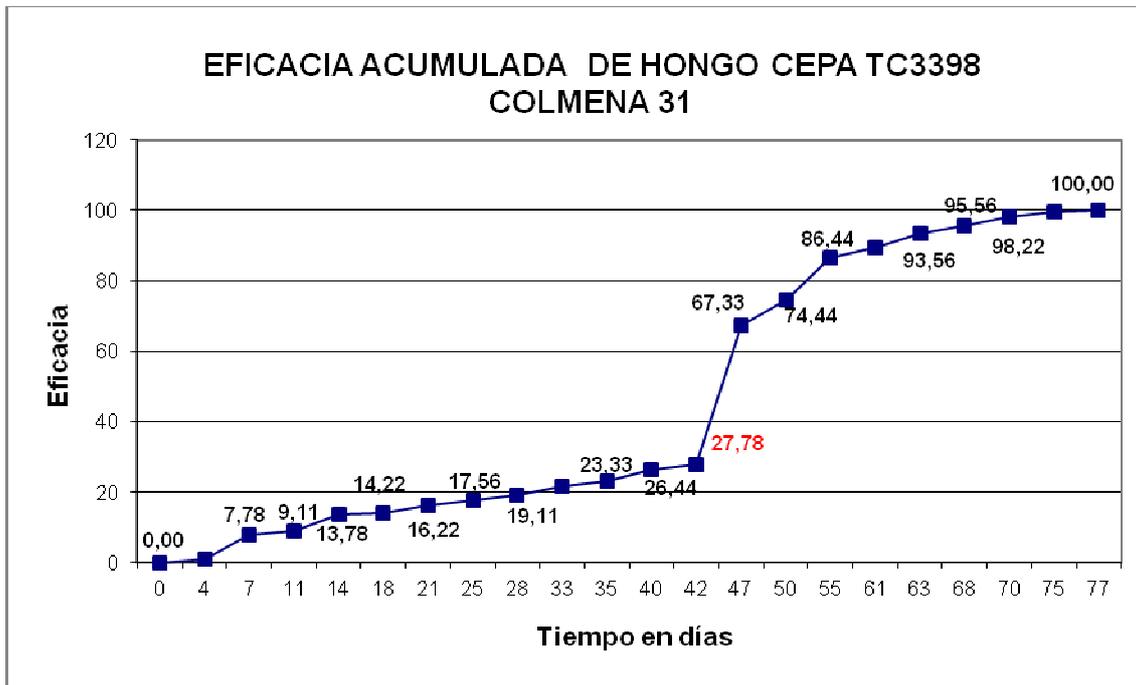
Las diferencias entre las colonias se dan en los valores de cada intervalo. Se pueden observar unas gráficas diferentes en las colmenas, que demuestran un comportamiento heterogéneo del grupo expuesto a la cepa Tc3398 del hongo. A los 44 días de la administración del inóculo fúngico, la eficacia se sitúa en un rango entre el 27,78% (valor más bajo correspondiente a la colmena nº 31) y el 91,55% (valor más elevado correspondiente a la colmena nº 35). En las colmenas nº 32, nº 33 y nº 34 la eficacia obtenida es similar, de 64,60%, 60,79% y 70,96% respectivamente, situándose la media de las 5 colmenas en un 63,14%.

Destaca entre las 5 colonias del grupo la colmena nº 35, de la que se ha obtenido mejor respuesta frente a la cepa Tc3398 del hongo, alcanzando una eficacia de 91,55%, tal como se observa en la **Gráfica 36**, que muestra una curva ascendente.



GRÁFICA 36

Sin embargo, en el extremo opuesto se sitúa la colonia nº 31, que muestra la eficacia más baja de las colmenas de su grupo, 27,78% a los 44 días, tal como se observa en la **Gráfica 37**.



GRÁFICA 37

En la siguiente tabla se presentan los valores de la población de Varroa total al final del estudio y la eficacia alcanzada a los 44 días tras haber introducido 3 placas Petri con *T. cylindrosporum* cepa Tc3398 en las colmenas del Grupo VII.

Se puede observar como la eficacia alcanzada es mayor en las colmenas más parasitadas por Varroa.

GRUPO ESTUDIO VII HONGO CEPA TC 3398			
COLMENA	VARROAS CAÍDAS CON HONGO TC 3398	POBLACIÓN TOTAL DE VARROA	EFICACIA (%) A 44 DÍAS
31	125	450	27,78
32	219	339	64,60
33	462	760	60,79
34	914	1.288	70,96
35	942	1.029	91,55
Media ± desv.	532 ± 381	773 ± 395	63,14 ± 23,06

TABLA 14. Varroas caídas con hongo *T. cylindrosporum* cepa Tc3398, población total de Varroa y eficacia en las colmenas a los 44 días en el Grupo VII

7.7.4.- Conclusiones

La cepa Tc3398 del hongo *T. cylindrosporum* en el Grupo VII de colmenas sometido a este estudio ha mostrado una baja eficacia media, aunque aceptable, teniendo en consideración que se trata de un agente biológico.

A la vista de los resultados se puede concluir que esta cepa Tc3398, puede tomarse como punto de partida para realizar más estudios encaminados al desarrollo de un producto basado en un preparado fúngico para el control de la varroosis, barajando distintas vías de administración así como diferentes cantidades del agente biológico de las que se han utilizado en este estudio para mejorar su eficacia.

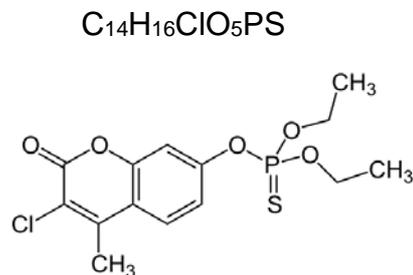
8.- EVALUACIÓN DE CONTENIDO DE CUMAFÓS RESIDUAL EN TIRAS DE CHECKMITE® ANTES Y DESPUÉS DEL PERIODO DE RESIDENCIA EN LAS COLMENAS

Otro de los objetivos de este estudio era realizar un análisis para valorar la liberación de los principios activos de los soportes usados en los medicamentos veterinarios autorizados. Para ello se escogió entre las materias activas el cumafós y se analizó la liberación de las tiras del medicamento Checkmite®.

8.1.- Material

En este estudio se utilizó cumafós estándar analítico Pestanal (>99.5 % de pureza) suministrado por Sigma-Aldrich para: 1) Evaluar cualitativamente la naturaleza del cumafós presente en las tiras Checkmite® comercial suministradas por los técnicos de COAG Salamanca y 2) Determinar la cantidad de cumafós en las tiras de Checkmite® antes y después de su utilización en las colmenas del Grupo VIII, en las que se calculó la eficacia de este principio activo.

8.1.1.- Fórmula estructural del cumafós



8.1.2.- Fórmula molecular del cumafós

O, O-diethyl fosforotioato de O-(3-cloro-4-metil-2-oxo-2H-1-benzopiran-7-ilo)

8.1.3.- Propiedades físicas del cumafós

- ✓ Masa molecular: 362.77 g/mol
- ✓ Punto de fusión: 95°C
- ✓ Presión de vapor: 0.013 kPa (20°C)
- ✓ Solubilidad en agua: 1.5 mg/L (20°C). Limitada solubilidad en disolventes orgánicos

8.1.4.- Aplicaciones

- ✓ Inhibidor de la colinesterasa
- ✓ Uso como acaricida y como insecticida no-sistémico

8.1.5.- Toxicidad

- ✓ DL50 abejas: 3000 ng/abeja
- ✓ LD50 oral: 13-41 mg/kg en ratas, 28-55 mg/kg en ratones y 80 mg/kg en conejos.
- ✓ LD50 dérmico: 860 mg/kg en ratas y 500-2400 mg/kg en conejos

8.2.- Métodos experimentales

8.2.1.- Evaluación cualitativa

Se obtuvieron espectros de infrarrojos de muestras de cumafós patrón puro suministrado por Sigma-Aldrich y de cumafós obtenido de tiras de Checkmite® suministrado por los técnicos de COAG Salamanca.

Los espectros IR de las muestras se registraron en un aparato Midac M Series FTIR spectrometer (Midac Corporation, California, USA). Se obtuvieron pastillas de BrK (1 mg de compuesto orgánico y 300 mg de BrK) y los espectros se midieron en el rango 4000–600 cm^{-1} mediante la co-adición de 64 scans con una resolución de 4 cm^{-1} . Los espectros se evaluaron usando el software GRAMS/32 (ThermoGalactic, Wobum USA).

8.2.2.- Evaluación cuantitativa

La determinación cuantitativa del cumafós se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-MS). El aparato utilizado fue un cromatógrafo Waters (Waters Assoc., Milford, MA, USA), equipado con módulo de distribución de disolventes e2695 y un sistema automático de análisis de muestras unido a un detector array de fotodiodos (DAD), un detector de espectrometría de masas (MS) de cuadrupolo simple Micromass-ZQ con interfase ESI y el software Empower como sistema de adquisición de datos y procesamiento.



Foto 77. Baño de ultrasonidos para la extracción del cumafós de las tiras de Checkmite®



Foto 78. Equipamiento del laboratorio del CSIC-IRNASA

La detección por DAD se llevó a cabo a 290 nm y la detección por MS se llevó a cabo utilizando los siguientes parámetros: voltaje capilar, 3.1 kV; temperatura de la fuente, 120 °C; voltaje de cono y temperatura de desolvatación 20 y 300 °C, respectivamente. El flujo del gas de solvatación fue 400 L h⁻¹ y el flujo de gas de cono fue 60 L h⁻¹.

Se utilizó una columna Luna PFP2 (Phenomenex, Torrance, CA, USA) de 150 mm × 4.60 mm empaquetada con partículas de 3.0 µm y fue usada a temperatura ambiente. La fase móvil fue acetonitrilo/agua-ácido fórmico (90/10-1%). La velocidad de flujo fue 0.4 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 µL.

La detección fue llevada a cabo por HPLC/DAD a 290 nm y por HPLC/MS monitorizando el ion positivo molecular (m/z) 363.08. El tiempo de retención de cumafós en estas condiciones fue de 6.6 min. La cuantificación del compuesto se llevó a cabo por calibración externa con patrones de concentraciones desde 1 µg/mL a 20 µg/mL. Las muestras fueron analizadas por triplicado.



Foto 79. Tiras de Checkmite propolizadas introducidas en colmenas (izda) y tiras a las que se ha extraído el cumafós (dcha)

8.3.- Resultados obtenidos

8.3.1.- Evaluación cualitativa

En la **Figura 1** se incluyen los espectros de IR de las muestras de cumafós patrón y comercial separadas (A) y superpuestas (B). Ambos espectros fueron idénticos lo que confirma la identidad de la naturaleza del cumafós comercial con el cumafós patrón puro.

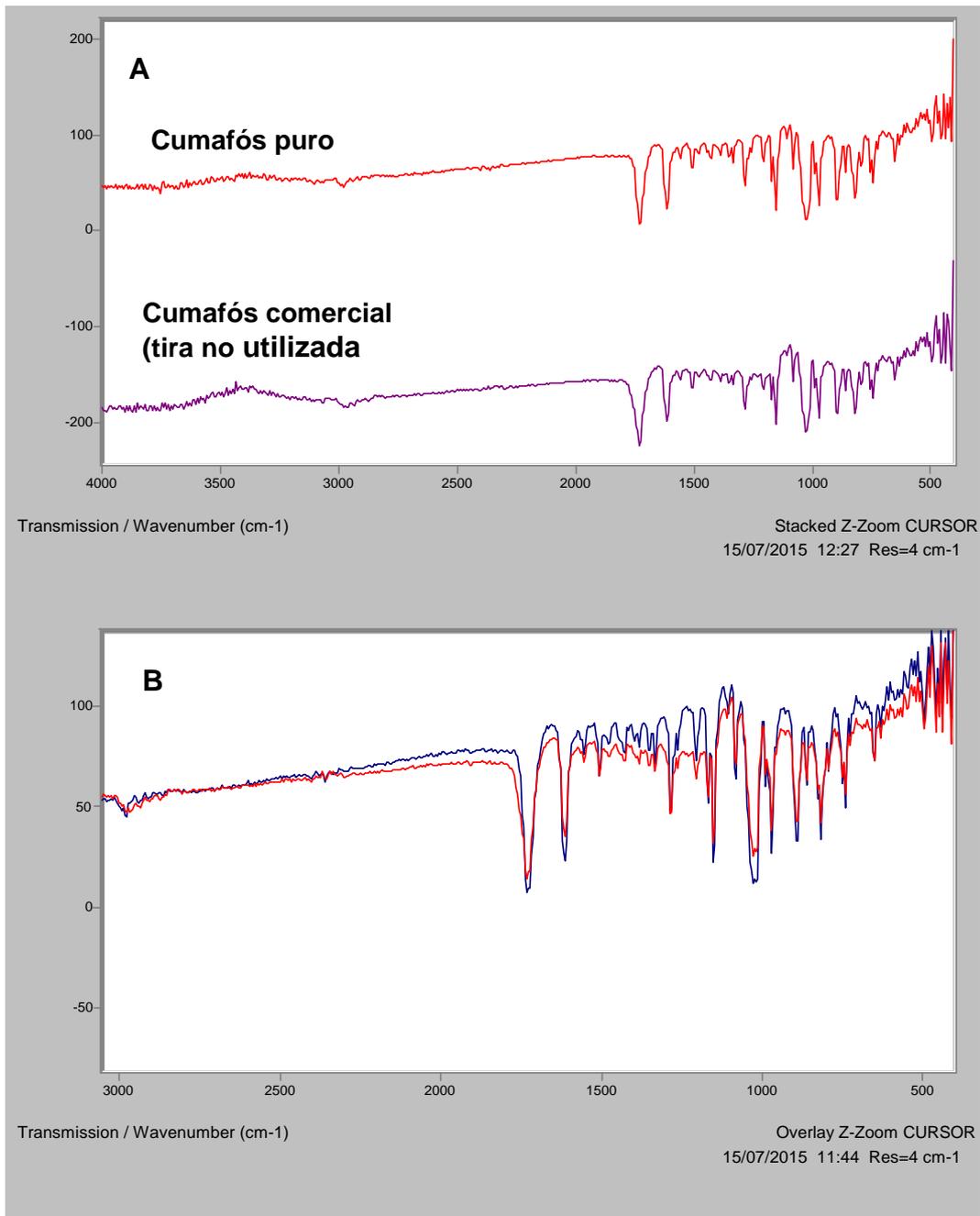


Figura 1. Espectro de infrarrojo de muestras de cumafós puro y comercial.

8.3.2.- Evaluación cuantitativa

En la **Figura 2** se incluyen los cromatogramas de un patrón de cumafós puro de 10 µg/mL y de muestras de la misma concentración preparadas a partir de cumafós antes y después de su utilización en las colmenas. Los espectros UV confirman la identidad del compuesto analizado.

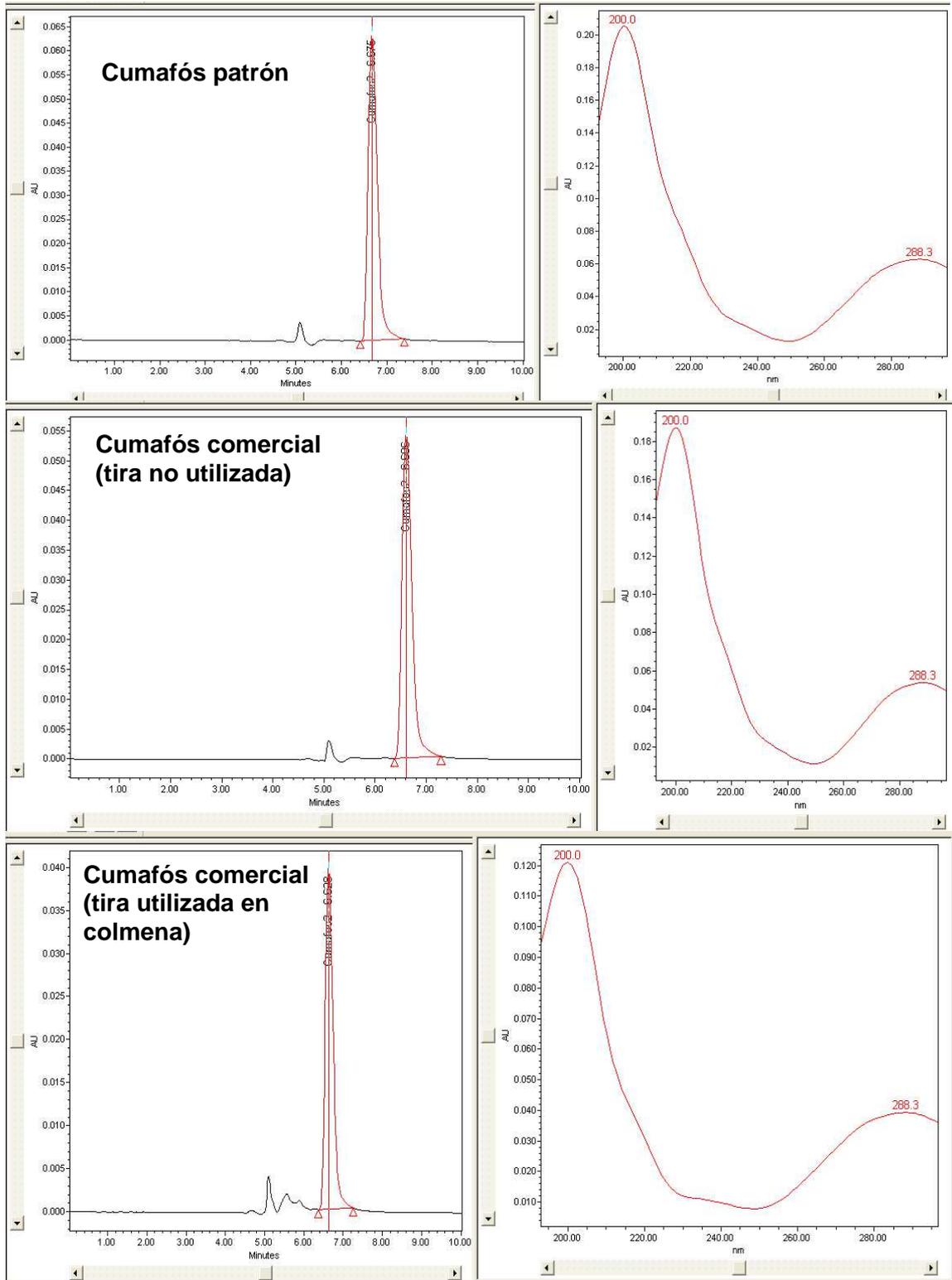


Figura 2. Cromatogramas de cumafós puro y comercial y espectros de UV.

En la **Figura 3** se incluyen los cromatogramas de un patrón de cumafós puro de 10 µg/mL y de muestras de la misma concentración de cumafós antes y después de su utilización en las colmenas. Los espectros de masas obtenidos de un scan de las muestras confirman la identidad del compuesto analizado.

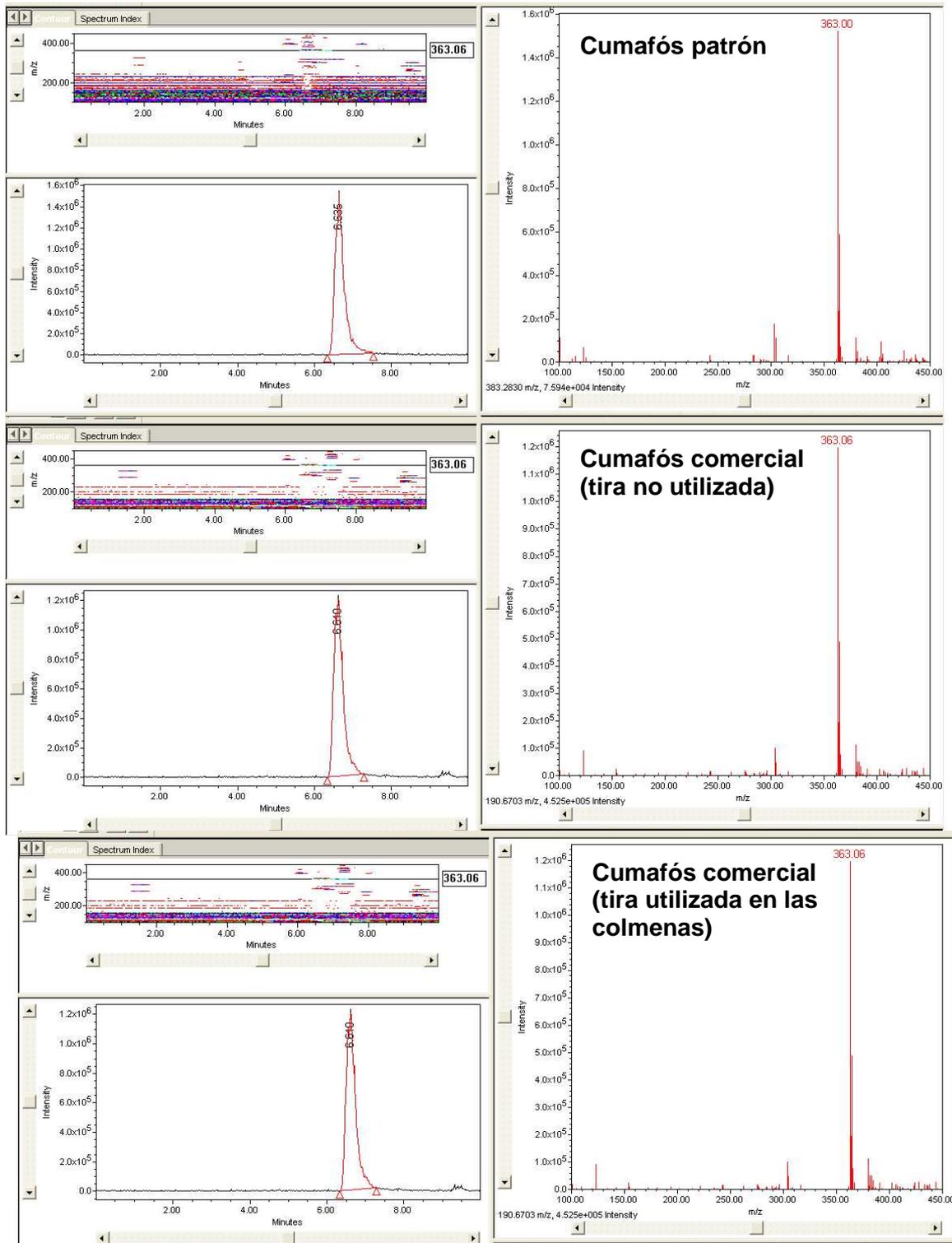


Figura 3. Cromatogramas de cumafós puro y comercial y espectros de MS.

En la **Figura 4** se incluyen las curvas de calibrado del análisis de cumafós utilizando el detector DAD (A) y el detector de MS (B) para la cuantificación del compuesto.

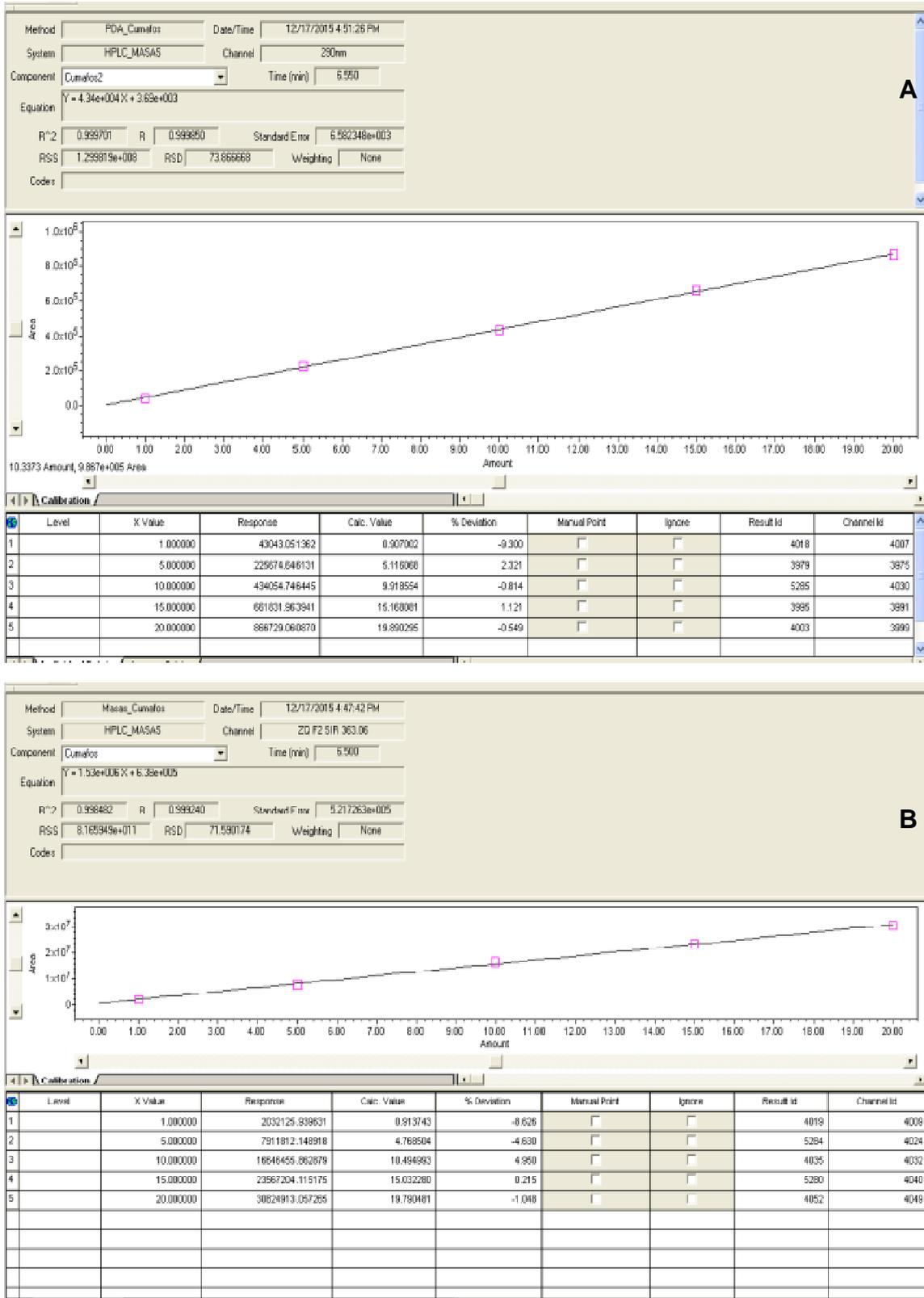


Figura 4. Curvas de calibrado de cumafós

8.4.- Evaluación de resultados

8.4.1.- Evaluación de cumafós en las tiras de Checkmite® iniciales suministradas por los técnicos de COAG Salamanca para análisis inicial (M0)

Se llevó a cabo la extracción de cumafós de las tiras mediante agitación en baño de ultrasonidos de la tira de Checkmite® con metanol. Posteriormente se determinó por pesada la cantidad de cumafós contenida en la tira y se evaluó su pureza a partir del análisis por HPLC preparando una solución de 10 µg/mL.

Los resultados obtenidos por pesada del producto obtenido por evaporación del metanol indicaron una recuperación de cumafós comercial de las tiras próxima al 100%, determinada respecto al peso de producto teóricamente contenido en las tiras (1.356 g).

Peso obtenido Tira 1= 1.304 g	Recuperación producto = 95.9 %
Peso obtenido Tira 2 = 1.296 g	Recuperación producto = 95.3 %

Sin embargo, la determinación de la pureza del producto contenido en las tiras determinada por análisis de HPLC indicó una riqueza en cumafós inferior al 100%:

M0-T1 recuperación del 95.9%	Riqueza en cumafós	81.40%
M0-T2 recuperación del 95.3%	Riqueza en cumafós	82.90%

8.4.2.-Evaluación de cumafós en las tiras de Checkmite® correspondientes a los lotes de tiras que fueron introducidas en las colmenas (M1 y M2)

Se llevó a cabo una extracción del producto comercial de las tiras como se ha indicado anteriormente. Los resultados correspondientes a las 2 tiras de cada uno de los lotes puestos en las colmenas M-1 y M-2 se indican a continuación:

M1-T1 recuperación de producto 78.68%	Riqueza en cumafós 75.36%
M1-T2 recuperación de producto 76.47 %	Riqueza en cumafós 77.19%
M2-T1 recuperación de producto 75.74 %	Riqueza en cumafós 75.08%
M2-T2 recuperación de producto 79.41 %	Riqueza en cumafós 77.09%

Recuperación media sobre cantidad indicada en envase: 77.57%
Riqueza en cumafós del producto obtenido: 77.00%

8.4.3.- Evaluación de cumafós en las tiras de Checkmite® correspondientes a los lotes de tiras que fueron introducidas en las colmenas (M1 y M2) después de ser retiradas de las colmenas (42 días en contacto con las abejas)

Se analizó el producto contenido en 12 tiras. Dos de ellas se consideran blancos y fueron introducidas en colmenas sin abejas para ver la pérdida ambiental del producto.



Foto 80. Tiras de cumafós preparadas para introducirse en una colmena sin abejas

Las 10 tiras restantes se introdujeron en las 5 colmenas del Grupo VIII, 2 en cada una de ellas, durante 6 semanas.



Foto 81. Tira de cumafós suspendida en un cuadro de una colmena

A continuación se retiraron y se evaluó la cantidad de cumafós residual y su pureza como anteriormente se había llevado a cabo. Cabe señalar que la recuperación del producto no se corresponde realmente con la recuperación de cumafós comercial como ocurría en los ensayos 1 y 2, ya que las tiras introducidas en las colmenas se contaminaron con otros productos depositados en ellas por las abejas al entrar en contacto con las tiras.

Los resultados obtenidos se incluyen en la **Tabla 15** donde se indica el peso total del producto disuelto en metanol (cumafós más otros productos dejados por las abejas), riqueza en cumafós del producto disuelto en metanol, cantidad de cumafós extraído de las tiras y cantidad de cumafós perdido de las tiras como resultado del contacto con las abejas calculado respecto a la cantidad de producto indicado en los envases respectivos de las tiras de Checkmite® (1.36 g).

Muestra	Peso (g)	Riqueza (%)	Cumafós tira (g)	Cumafós perdido tira (g)
T-1(blanco)	1.15	70.30	0.81	0.55
T-2(blanco)	1.12	75.29	0.84	0.52
T-3	1.18	58.27	0.69	0.67
T-4	1.20	62.29	0.75	0.61
T-5	1.29	53.78	0.69	0.67
T-6	1.30	49.82	0.65	0.71
T-7	1.08	59.76	0.65	0.71
T-8	0.84	65.23	0.55	0.81
T-9	1.07	59.07	0.63	0.73
T-10	1.15	54.83	0.63	0.73
T-11	1.19	57.34	0.68	0.68
T-12	1.19	62.08	0.74	0.62

Tabla 15. Pérdida de cumafós después del contacto con las abejas

Los resultados obtenidos indican una pérdida de cumafós de 47,3%, 50,6%, 56,1%, 53,5% y 47,7% (valores medios de las 2 tiras de cada colonia) de las tiras introducidas en las colmenas del grupo VIII del estudio y en contacto con las abejas, mientras que la cantidad de cumafós perdida en las colmenas control "sin abejas" fue del 39,2%.

Tras la realización de todos los análisis correspondientes, se han mantenido tiras de Checkmite® en invernadero durante 3 meses para estudiar y evaluar la liberación del cumafós en condiciones ambientales; sin embargo, no se ha detectado ninguna pérdida del principio activo respecto a la concentración inicial. Quizás la explicación más plausible para este hecho sean las bajas temperaturas típicas del invierno en la provincia de Salamanca.

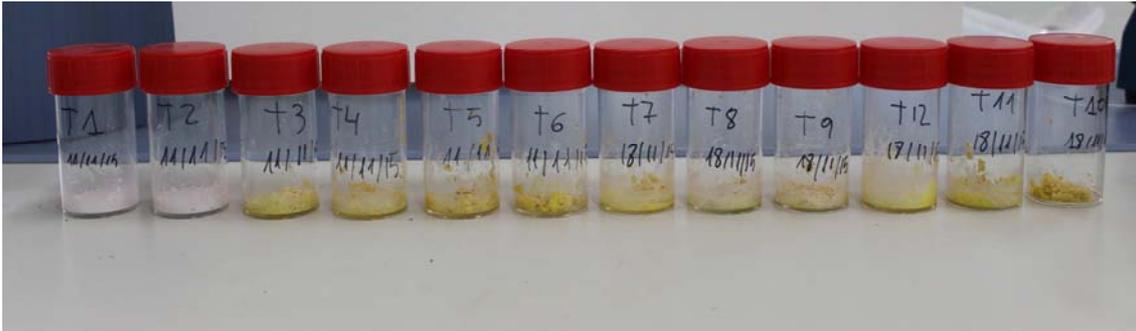


Foto 82. Cumafós extraído de las diferentes muestras de tiras usadas y de control de Checkmite®

9.- DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN CERA ANTES Y DESPUÉS DE REALIZAR LOS TRATAMIENTOS FRENTE A VARROA

El acúmulo de residuos de plaguicidas en la cera y los efectos perjudiciales que provocan sobre la colonia de abejas es otro de los graves problemas a los que se enfrentan los apicultores a día de hoy. Por este motivo, el último de los objetivos de este estudio era realizar un análisis de residuos de plaguicidas de cera y conocer los residuos acumulados en las colmenas que manejamos, tanto cualitativa como cuantitativamente.

Asimismo, para realizar una estimación de los posibles residuos de acaricidas acumulados después de su utilización para el control de la varroosis, se tomaron muestras de cera después de aplicar los tratamientos en las colonias de abejas, pudiendo comparar de esta forma la acumulación de residuos al iniciar y al finalizar este estudio.

9.1.- Toma de muestras de cera de las colmenas

Para poder determinar los residuos de plaguicidas en cera, inicialmente se tomó una muestra de todas las colmenas, agrupándolas de 5 en 5 para obtener una muestra homogénea de cada uno de los 8 grupos de colmenas que han conformado este estudio.



Fotos 83 y 84. Toma de muestra de cera de un panal de una colonia objeto de estudio



Fotos 85 y 86. Toma de muestra de cera de un panal de una colonia objeto de estudio

9.2.- Técnicas de análisis de cera

Para el análisis de los residuos de plaguicidas de las muestras de cera tomadas se ha utilizado el método de extracción QuEChERS y determinación mediante cromatografía líquida espectrofotometría de masas utilizando un analizador de triple cuadrupolo (LC-MS/MS).

9.3.- Resultados obtenidos

9.3.1.- Resultados de las muestras de cera tomadas al inicio del estudio

La concentración de los distintos plaguicidas está expresada en ng/g.

Pesticide	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
3-HYDROXYCARBOFURAN	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ACETOCHLOR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ACRINATHRIN	1180	1234	1202	1432	1075	1116	1127	1172
ALACHLOR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AMITRAZ _{TOTAL}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2,4-dimetil anilina (DMA)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2,4-Dimetilformamida (DMF)	9.5	11	7.5	2	5.5	5.2	8	3.2
N-2,4-dimetilfenil-N-fomamidina (DMFF)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
N-(bis)-2,4-dimetilfenil formamidina (BDMPPF)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Amitraz	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ATRAZINE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ATRAZINE-DEETHYL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ATRAZINE-DEISOPROPYL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AZINPHOS ETHYL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AZINPHOS METHYL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BUPROFEZIN	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CARBENDAZIM	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CARBOFURAN	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CHLORFENVINPHOS	209	314	300	412	205	196	365	331
CHLORPYRIFOS	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1805	N.D.	N.D.
λ-CIALOTRYN	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
COUMAPHOS	3786	7290	6016	10278	5746	5746	5778	5435
DIAZINON	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DICHLOFENTHION	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DIMETHOATE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DIURON	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ETHION	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FENITROTHION	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FENOXON	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FENOXON SULFONE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FENOXON SULFOXIDE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FENTHION	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FENTHION SULFONE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FENTHION SULFOXIDE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FIPRONIL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FLUMETHRIN	N.D.	N.D.	N.D.	360	N.D.	455	N.D.	N.D.
FLUVALINATE	1307	1207	626	813	678	1396	1511	845
HEXYTHIAZOX	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IMAZALIL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IMIDACLOPRID	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ISOPROTURON	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MALATHION	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
METHIOCARB	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
METOLACHLOR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MOLINATE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
OMETHOATE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PARATHION-ETHYL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PARATHION-METHYL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PROCHLORAZ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PROPANIL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PROPAZINE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PYRIPROXYPHEN	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
SIMAZINE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TEBUCONAZOLE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TERBUMETON	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TERBUMETON-DEETHYL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

9.3.2.- Resultados de las muestras de cera tomadas al finalizar el estudio

La concentración de los distintos plaguicidas está expresada en ng/g.

Pesticide	C1	C2	C3	C4	C5	C7	C8
3-HYDROXYCARBOFURAN	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ACETOCHLOR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ACRINATHRIN	2390	2231	1628	3039	1422	1447	1630
ALACHLOR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AMITRAZ _{TOTAL}	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2,4-dimetil anilina (DMA)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
2,4-Dimetilformamida (DMF)	39	420	51	35	32	41	510
N-2,4-dimetilfenil-N-fomamidina (DMFF)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
N-(bis)-2,4-dimetilfenil formamidina (BDMPF)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Amitraz	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ATRAZINE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ATRAZINE-DEETHYL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ATRAZINE-DEISOPROPYL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AZINPHOS ETHYL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
AZINPHOS METHYL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
BUPROFEZIN	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CARBENDAZIM	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CARBOFURAN	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
CHLORFENVINPHOS	380	315	365	597.5	308	360	450
CHLORPYRIFOS	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
λ-CIALOTRYN	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
COUMAPHOS	5820	6820	5030	13075	41575	4385	23250
DIAZINON	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DICHLOFENTHION	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DIMETHOATE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
DIURON	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ETHION	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FENITROTHION	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FENOXON	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FENOXON SULFONE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FENOXON SULFOXIDE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FENTHION	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FENTHION SULFONE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FENTHION SULFOXIDE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FIPRONIL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
FLUMETHRIN	338	245	260	95	100	140	N.D.
FLUVALINATE	2538	1987	1018	1148	1335	1982	1440
HEXYTHIAZOX	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IMAZALIL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
IMIDACLOPRID	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ISOPROTURON	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MALATHION	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
METHIOCARB	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
METOLACHLOR	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
MOLINATE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
OMETHOATE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PARATHION-ETHYL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PARATHION-METHYL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PROCHLORAZ	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PROPANIL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PROPazine	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PYRIPROXYPHEN	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
SIMAZINE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TEBUCONAZOLE	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TERBUMETON	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TERBUMETON-DEETHYL	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

9.4.- Evaluación de resultados

9.4.1.- Evaluación de plaguicidas en cera al inicio del estudio

De los resultados de estos análisis de las muestras de cera tomadas al inicio del estudio se desprende que la mayor parte de los plaguicidas detectados son acaricidas usados para el control de la varroosis en las colonias de abejas.

Estos acaricidas, utilizados recientemente o hace tiempo por los apicultores, autorizados o no para el control de la varroosis, aplicados en las colmenas a través de medicamentos veterinarios o de productos artesanales, se detectan en los análisis como consecuencia del proceso de acumulación que se produce en esta matriz, debido a que la cera, al ser tan liposoluble, absorbe los distintos principios activos utilizados frente a Varroa.

A la vista de los resultados analíticos se observa la presencia de fluvalinato, con una media alcanzada en su conjunto de 1.048 ng/g, muy elevada si tenemos en cuenta que este principio activo no se había utilizado en las colmenas usadas para realizar este estudio desde muchos años atrás. La persistencia de este acaricida en la cera puede influir en los resultados obtenidos en las colmenas del Grupo I y la falta de eficacia del fluvalinato frente a la Varroa. También se ha detectado acrinatrina y clorfenvinfós (productos no autorizados para el control de Varroa) en todas las muestras tomadas, alcanzando una media de 1.192 ng/g y 292 ng/g respectivamente. La flumetrina se detecta únicamente en dos de las ocho muestras y en cantidades bajas. Igualmente se detectan cantidades insignificantes de 2,4 -Dimetilformamida, un producto de la degradación del amitraz. La rápida degradación del amitraz y su ausencia como tal en la cera puede que sirva para explicar el mantenimiento de la eficacia de este acaricida después de su uso durante muchos años en las colonias de abejas, tal como se ha podido comprobar en las colmenas del Grupo II de este estudio.

PLAGUICIDA	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV	GRUPO V	GRUPO VI	GRUPO VII	GRUPO VIII	MEDIA
Acrinatrina	1.180	1.234	1.202	1.432	1.075	1.116	1.127	1.172	1.192
Dimetilformamida*	9,5	11	7,5	2	5,5	5,2	8	3,2	6
Clorfenvinfós	209	314	300	412	205	196	365	331	292
Clorpirifós	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.805	N.D.	N.D.	226
Cumafós	3.786	7.290	6.016	10.278	5.746	5.746	5.778	5.435	6.259
Flumetrina	N.D.	N.D.	N.D.	360	N.D.	455	N.D.	N.D.	102
Fluvalinato	1.307	1.207	626	813	678	1.396	1.511	845	1.048

Tabla 16. Resumen de los resultados positivos de plaguicidas en el primer análisis de cera (Producto de la degradación del amitraz)*

Destaca la elevada concentración de cumafós en todas las muestras de cera, alcanzándose 6.259 ng/g de media del conjunto. Esto se debe a que este principio activo ha sido el más utilizado en las colmenas de Castilla y León para el control de la varroosis en los últimos años, y quizás sea un factor que también influya en la falta de sensibilidad o pérdida de eficacia del cumafós frente a la *Varroa* que se ha observado en las colmenas del Grupo VIII de este mismo estudio.

En una única muestra de las ocho se ha detectado clorpirifós, insecticida organofosforado que causa envenenamiento por colapso del sistema nervioso del insecto y que se utiliza ampliamente en la agricultura, obteniéndose un gran efecto de choque aplicándose mediante pulverización para el control de plagas de las cosechas (cochinillas, moscas, trips, orugas, escarabajos y otros insectos); que a su vez es uno de los plaguicidas que tiene más presencia en la cera a nivel nacional y en las muestras de abeja y de polen analizadas.

9.4.2.- Evaluación de plaguicidas en cera al finalizar el estudio

En los resultados de los segundos análisis practicados a las muestras de cera tomadas al finalizar el estudio se puede observar como los plaguicidas detectados siguen siendo acaricidas usados frente a la varroosis, ya que la ubicación del asentamiento de las colmenas sometidas a estudio, en una zona adehesada, no ha permitido el contacto de las abejas con ningún otro pesticida. Además se observa un incremento de las cantidades detectadas de todos los acaricidas usados en el presente estudio.

Las cantidades detectadas de los plaguicidas varían un poco si las comparamos con los resultados del análisis inicial. Estas variaciones observadas en el caso de la acrinatrina (1.970 ng/g) o clorfenvinfós (397 ng/g), se deben a que en ocasiones aunque las muestras se tomaron de la misma colmena, no se cogieron del mismo cuadro que se utilizó para tomar las muestras de cera sobre las que se hizo el análisis inicial de plaguicidas, y que en este segundo análisis no se analizó la cera del Grupo VI.

Cabe destacar el importante incremento de la concentración de algunos principios activos usados en este estudio para valorar su eficacia frente a *Varroa*, como es el cumafós. En este caso, se detecta un elevado incremento precisamente en los grupos de colmenas en los que se introdujeron las tiras con esta materia activa, ya fuera para estudiar su eficacia o fuera como acaricida de contraste en el ensayo de eficacia de otros productos. En el conjunto la cantidad media de cumafós en todas las muestras de cera alcanzan 14.279 ng/g, más del doble de la concentración detectada al inicio del estudio (6.259 ng/g).

En el caso del fluvalinato se detecta un ligero incremento en la cantidad detectada en este segundo análisis de plaguicidas que asciende a 1.635 ng/g, frente a 1.048 ng/g que resultaron en el análisis inicial, debido probablemente

a la utilización de las tiras con este principio activo en las colmenas del Grupo I, precisamente para valorar su eficacia. Lo mismo ocurre en el caso de la flumetrina, con una concentración en el segundo análisis de 168 ng/g frente a los 102 ng/g del primer análisis.

PLAGUICIDA	GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV	GRUPO V	GRUPO VII	GRUPO VIII	MEDIA
Acrinatrina	2.390	2.231	1.628	3.039	1.422	1.447	1.630	1.970
Clorfenvinfós	380	315	365	597,5	308	360	450	397
Dimetilformamida*	39	420	51	35	32	41	510	161
Cumafós	5.820	6.820	5.030	13.075	41.575	4.385	23.250	14.279
Flumetrina	338	245	260	95	100	140	N.D.	168
Fluvalinato	2.538	1.987	1.018	1.148	1.335	1.982	1.440	1.635

Tabla 17. Resumen resultados positivos de plaguicidas en el segundo análisis de cera
(* Producto de la degradación del amitraz)

También en este segundo análisis de residuos de plaguicidas se ha detectado 2,4 -Dimetilformamida, alcanzando 161 ng/g de media del conjunto de las muestras de cera tomadas, aunque su concentración es superior en las colmenas que se trataron con este principio activo para valorar su eficacia (Grupo II) o como contraste para valorar la eficacia de otros acaricidas (Grupo VIII).

10.- VALORACIÓN DE LA EFICACIA DE ATRAYENTE PARA AVISPA Y AVISPÓN

Aunque no estaba previsto inicialmente dentro de los objetivos de este estudio, se aprovechó el mantenimiento del colmenar ensayado para probar, durante parte de septiembre y octubre, la eficacia y especificidad del atrayente AvispaClac®, un cebo concentrado polivalente para avispas, moscas y avispones. Para ello se colocó en una trampa, que se colgó en una encina situada a unos 30 metros del colmenar estudio, renovando este líquido atrayente cada 10 días en 4 ocasiones.



Foto 87. Jaula con atrayente colgada de encina cercana al colmenar estudio

Inmediatamente tras colocar la trampa con el líquido atrayente se podía observar su gran capacidad de atracción de avispones. En el momento de la renovación de este líquido, se recuperó el contenido de la jaula para comprobar los distintos insectos que habían caído en la misma. En las 4 ocasiones, se comprobó que había en su interior una elevada cantidad de *Vespa crabro*, a pesar de que aparentemente en el colmenar no se observaba la presencia de avispones, con una media de 60 individuos por control. También había abundantes cadáveres de *Vespula vulgaris* (88 individuos de media en cada control). En ninguno de los casos se capturó ningún individuo de *Apis mellifera* ni de *Vespa velutina*.



Foto 88 y 89. Imágenes de *Vespa crabro* recogida de la trampa

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- ALIANO N.P., ELLIS M.D., 2008.- Bee-to-bee contact drives oxalic acid distribution in honey bee colonies,- *Apidologie* 39 (2008) 481–487.
- ANDERSON D.L., TRUEMAN J.W., 2000.- *Varroa jacobsoni* (Acari:Varroidae) is more than one species.- *Experimental and Applied Acarology*, 24: 165-189.
- CALATAYUD F. y SIMO, E., 2003.- La Varroosis de las abejas y sus patologías asociadas.- Publicado por La Unió-COAG-Sector Apícola, Editado por EDICAMP, València, 2003, 87 pp.
- CALATAYUD F., SIMO E., 2005.- Eficacia del Bayvarol en colmenas Layens.- *Vida Apícola*, 132: 14-20.
- CALATAYUD F. y SIMO, E., 2007.- La persistencia de la Varroosis y sus secuelas. *Vida Apícola*, 146: 35-41.
- DIETEMANN V., F. NAZZI, S. J. MARTIN, D. L. ANDERSON, B. LOCKE, K. S. DELAPLANE, Q. WAUQUIEZ, C. TANNAHILL, E. FREY, B. ZIEGELMANN, P. ROSENKRANZ AND J. D. ELLIS, 2013.- Standard methods for varroa research.-*Journal of Apicultural Research* 52(1): (2013).
- ELZEN P.J., BAXTER J.R., SPIVAK M., WILSON W.T., 2000.- Control of *Varroa jacobsoni* Oud. Resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos.- *Apidologie*, 31:437-441.
- HERRERO N., PEREZ R., OLEAGA A., ZABALGOGEAZCOA I., 2011. Tick pathogenicity, thermal tolerance and virus infection in *Tolypocladium cylindrosporum*. *Annals of Applied Biology* 159:192-201.
- KANGA L.H.B., JONES W.A., GARCIA C. ,2006.- Efficacy of strips coated with *Metarhizium anisopliae* for control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee colonies in Texas and Florida.- *Exp. Appl. Acarol.* 40, 249–258.
- LODESANI M., MILANI, N, DELLA VEDOVA G., CALVARESE S., 2004.- Monitoraggio della resistenza al fluvalinate e al coumafos in *Varroa destructor* in Italia.- *APOidea*, 1:60-65.
- MARTIN, S.J., 2004.- Acaricide (pyrethroid) resistance in *Varroa destructor*.- *Bee World*, 85(4): 67-69.
- MATÍAS D. MAGGI, SERGIO R. RUFFINENGO, LIESEL B. GENDE, MARTÍN J. EGUARAS & NORMA H. SARDELLA, 2008.- LC50 baseline levels of amitraz, coumaphos, fluvalinate and flumethrin in populations of *Varroa destructor* from Buenos Aires Province, Argentina, *Journal of Apicultural Research*, 47:4, 292-295

- MATHIEU L. y FAUCON, J.P., 2000.- Changes in the response time for *Varroa jacobsoni* exposed to amitraz.- *Journal of Apicultural Research*, 39: 155-158.
- MEIKLE W.G., G. MERCADIER, N. HOLST, C. NANSEN, V. GIROD, 2008.- Impact of a treatment of *Beauveria bassiana* (Deuteromycota: Hyphomycetes) on honeybee (*Apis mellifera*) colony health and on *Varroa destructor* mites (Acari: Varroidae).- *Apidologie*, Springer Verlag, 2008, 39 (2), pp.247-259.
- MILANI N., 1999.- The resistance of *Varroa jacobsoni* OUD. to acaricides.- *Apidologie*, 30: 229-234.
- NANETTI A, BÜCHLER R., CHARRIERE J.D., FRIES I., HELLAND S., IMDORF A., KORPELA S., KRISTIANSEN P., 2003. – Oxalic acid treatments for *Varroa* control (Review).- *Apiacta*, 3: 81-87.
- PETTIS J., 2004.- A scientific note on *Varroa destructor* resistance to coumaphos in the United States.- *Apidologie*, 35:91-92.
- PUERTA PUERTA, F., FLORES SERRANO, J.M., RUIZ MARTINEZ, J.A., RUZ LUQUE, J.M., CAMPANO CABANES, F., 2001. Enfermedades de las abejas. Prevención, diagnóstico y tratamiento.- Editado por COAG Andalucía y Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía, Córdoba, 2001, 189 pp.
- RADEMACHER E, HARZ M., 2006.- Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies - a review. -*Apidologie*, Springer Verlag, 2006, 37 (1), pp.98-120.
- ROSENKRANZ P., P. AUMEIER , B. ZIEGELMANN, 2010.- Biology and control of *Varroa destructor*.- *Journal of Invertebrate Pathology* 103 (2010) S96–S119.
- THOMPSON H., BALL R., BROWN M., BEW M., 2003.- *Varroa destructor* resistance to pyrethroid treatments in the United Kingdom.- *Bulletin of Insectology*, 56:175-181.
- WEBSTER T.C., THACKER, E.M. y VORISEK, F.E., 2000.- Live *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae) Fallen from Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies.- *Journal of Economic Entomology*, 93(6): 1596-1601.
- YAÑEZ K.P, BERNAL, J.L., NOZAL M.A.J., MARTIN M.T. and BERNAL J. Determination of seven neonicotinoid insecticides in beeswax by liquid chromatography coupled to electrospray-mass spectrometry using a fused-core column. *Journal of Chromatography A* 1285:110-117, 2013.

Entidad colaboradora para la difusión del estudio

