Control biológico

EVALUACIÓN DE UN PRODUCTO DE *BACILLUS THURINGIENSIS* PARA EL CONTROL DE LA VARROASIS

María Elena Márquez Gutiérrez,[1] Orietta Fernández-Larrea Vega,[1] Daimi Díaz Mena,[2] Adolfo Díaz,[2] Bertha Carreras Solís[1]

[1] *Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5ª. E y 5ª. F, Playa, Ciudad de La Habana.*
[2] *Estación Experimental Apícola (EEA). El Cano, Arroyo Arenas, La Lisa, Ciudad de La Habana. CP 19190.*

RESUMEN

La Varroa jacobsoni *Oud está considerada como la plaga más importante a nivel mundial para la apicultura. Su control se realiza empleando agentes químicos como la flumetrina (bayvarol,4%) que genera problemas de resistencia y residualidad en los productos de las colmenas, por lo que no puede ser aplicado en época de cosecha de miel. Desde 1996 este parásito se detectó en nuestro país en las provincias de La Habana y Matanzas. En el apiario El Vidrio, ubicado en La Lisa, fueron seleccionadas nueve colmenas para demostrar el efecto acaricida de un producto biológico a partir de* Bacillus thuringiensis *respecto al ácido fórmico, en cuanto a la cantidad de varroas desprendidas y la estabilidad del efecto. Se pudo apreciar que con una sola aplicación de* Bacillus thuringiensis *se mantuvieron los mayores valores en los conteos de ácaros muertos. Sin embargo, con las cinco aplicaciones realizadas del ácido fórmico se obtuvo un comportamiento irregular, la mayor cantidad de varroas colectadas se observaron a las 24 horas y a partir de la cuarta aplicación. Un año después de aplicado el producto en apiarios del Jardín Botánico Nacional, fue determinada la presencia de la bacteria y su concentración en las diferentes partes de la colmena. La mayor concentración de esporas viables se detectaron en la cría operculada, seguida de la cría no operculada y el polen. En la miel no operculada se encontró la menor concentración, la cual no sobrepasó de 10^4 esporas/mL. Estos valores se encuentran dentro del rango permisible en las normas cubanas de miel para la presencia de microorganismos.*

Palabras clave: *Varroa jacobsoni, Bacillus thuringiensis, honeybees, biological control*

ABSTRACT

Varroa jacobsoni *Oud is considered most important pest for apiculture in the world. Its control is realized using chemical agents as flumetrin (bayvarol, 4%), which generate resistance and residually problems in colmenas products. That is why; this product cannot be applied in honey cosecha season. Since 1996, this parasite was detected in our country in Havana and Matanzas provinces. In El Vidrio apiarium, located in La Lisa, nine colmenas were selected to demonstrate acaricide effect of a biological product of* Bacillus thuringiensis *with respect to formic acid, attend to quantity of desprendidas varroas and effect stability. Can be appreciate that only one* B. thuringiensis *application were maintained highest values in conteos of death mites. Sin embargo, with five applications of formic acid was obtained an irregular behaviour; most amounts of collected varroas were observed at 24 hours and at fourth application. After one year of application of the product in apiariums of National Botanical Garden, was determined the presence of the bacterium and its concentration in different parts of colmenas. Most concentration of viable spores were detected in operculated cría, follows of non-operculated and pollen. In honey non operculated was find minor concentration, which not surpassed 10^4 spores/mL. Those values are inside permissible range in honey Cuban normas for microorganisms presence.*

Key words: *Varroa jacobsoni, Bacillus thuringiensis, honeybees, biological control*

INTRODUCCIÓN

La varroasis es la principal enfermedad parasitaria de las abejas melíferas, cuyo agente etiológico, el ácaro *Varroa jacobsoni* O., constituye un problema sanitario de primer orden que limita de manera importante la viabilidad de las colonias de las abejas melíferas [Higes *et al.,* 1999]. Aún en países con alta tecnología de Europa y Norteamérica el problema persiste, y aumentan los esfuerzos por disminuir los daños, ya que las pérdidas han llegado a ser hasta del 90% de las colonias [Vicado, 1999]. Las prácticas intensivas de transhumancias han sido el medio más usual en la difusión de la enfermedad a larga distancia en diferentes latitudes del mundo [Cobos, 1986].

De forma general, la orientación actual y futura en la mayoría de los países afectados está encaminada a la combinación de la lucha biológica con la química, considerando que los productos que se utilicen con este fin deben ser de fácil degradación o poca permanencia en el medio, para permitir el control del ácaro sin afectar a las abejas ni representar una fuente de contaminación a los productos de la colmena [Pérez-Santiago, 2000].

Los productos a partir de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) han permitido controlar numerosas plagas, entre las que se incluyen varias especies de ácaros [Payne *et al.,*1995]. Muchos autores plantean que la actividad acaricida de Bt es debida fundamentalmente a la acción de la beta exotoxina, ya que en 1968 Krieg reportó acerca de la efectividad del sobrenadante de un cultivo de Bt contra adultos de *Tetranychus telarius*. Asi-

mismo, Neal *et al.* (1989) estudiaron la actividad por contacto que presentó esta toxina contra las formas móviles de *T. urticae* y *T. cinnabarinus*.

Desde 1992 en nuestro país se está probando en condiciones de laboratorio y de campo el bioproducto de la cepa LBT-13, aislado nativo de *Bt* para el control de *Polyphagotarsonemus latus, Phyllocoptruta oleivora* y *Tetranychus tumidus* con buenos niveles de efectividad, por lo cual actualmente se encuentra incluida como alternativa biológica dentro de los sistemas de manejo para estas plagas en cultivos de papa, cítrico y plátano [Almaguel, 1993].

A partir del momento en que el primer foco de *Varroa jacobsoni* fue localizado en Limonar, provincia de Matanzas [Sánchez *et al.,* 1996] y se extendió a todo el territorio nacional, motivó la búsqueda de distintas alternativas de control, entre ellas el uso de *Bacillus thuringiensis*. Por tanto, los objetivos de nuestro trabajo fueron realizar la caracterización de la cepa LBt-13 de *Bacillus thuringiensis*, evaluar el efecto acaricida del Thurisav-13 sobre *Varroa jacobsoni* en condiciones de producción y determinar la presencia de *Bt* en la colmena y sus productos.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Caracterización de la cepa LBt-13

Las características morfológicas y bioquímicas se determinaron mediante las siguientes pruebas:

- Caracterización de las colonias en placas con agar nutriente.
- Características morfológicas de células vegetativas de esporas y cristales mediante observación de preparaciones teñidas con solución de violeta cristal al 5%. Observación al microscopio óptico a 1000X.
- Respuesta de las células vegetativas a la tinción del GRAM.
- Determinación del tiempo de duplicación en caldo nutritivo.
- Hidrólisis de gelatina, almidón, Tween80, caseína, producción de acetil metil carbinol, fermentación de azúcares: glucosa, ramnosa, inositol, salicín, manosa, sacarosa y maltosa.

Las pruebas anteriormente mencionadas se realizaron según procedimientos descritos en el manual de Harrigan (1968).

Para la identificación del tipo y contenido de los ácidos grasos se siguió el protocolo de Miller y Berger (1985). En el análisis se utilizó un cromatógrafo ERBA con detector de ionización con llama y programador de temperatura LT Modelo 2000. Se empleó una columna de 2 m de longitud y 3 mm de diámetro interno rellena con SP2100 al 3% sobre chromosorb.HP AW DMCS 100/120 Mesh. Temp. 120-150°C y una velocidad de ascenso de 5°C por minuto. El gas portador fue argón con un flujo de 20 mL/min. Los picos se compararon con un estándar de referencia Supeico INC.1987.

Los cultivos se obtuvieron en medio líquido compuesto por glucosa, extracto de levadura, triptona, solución de sales minerales y buffer fosfato.

La determinación de la serología se realizó mediante la respuesta al antígeno flagelar por la técnica de IMEAMOC [Carreras *et al.,*1995]. Los antisueros se obtuvieron del Instituto Pasteur de Francia.

En la caracterización molecular se empleó la técnica de PCR para la determinación de los genes cry. Primeramente la cepa se sembró en placas con medio LB e incubadas a 29°C por 12 h. Se tomó una asada del crecimiento celular y se transfirió a un tubo eppendorf que contiene 0,1 mL de agua desionisada estéril. La muestra se congeló por 15 min a –70°C, y después se hirvió por 10 min para conseguir la lisis de las células bacterianas en suspensión. Se centrifugó a 10 000 r.p.m., 10 s.

La mezcla de la reacción tuvo un volumen final de 25 mL y estuvo constituida de agua desionisada estéril, solución amortiguadora diez veces concentrada (10X), $MgCL_2$ 25 mM, d-NTPs 200 nM cada uno, oligonucleotidos aproximadamente 20 nM cada uno, de los cuales se utilizaron los oligos generales Cry1, Cry3, Cyt, y Cry8, oligos específicos Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac (mezcla A), Cry1B, Cry1C, Cry1D (mezcla B), Cry1E, Cry1F (mezcla C), Taq Polimerasa 1,25 U/0,1 mL, 5 mL de muestra de lisado celular.

La amplificación fue efectuada en un termociclador utilizando un primer ciclo de 2 min a 95°C, seguido por un programa de 30 ciclos consistiendo cada uno de desnaturalización a 95°C por 1 min, alineación desde 48-57°C (en dependencia de los oligonucleotidos utilizados) y una extensión a 72°C por 1 min.

Geles de agarosa: Los productos de las reacciones de PCR se sometieron a separación por electroforesis en gel de agarosa al 2%, solución amortiguadora de tris-boratos 0,5 M, durante 30-35 min a 100-106V, seguido de una tinción con bromuro de ethidio para evidenciar las bandas bajo luz UV.

II. Desarrollo del producto Thurisav-13

El biopreparado se obtuvo por cultivo sumergido en un fermentador marca Applikon de 42L con capacidad y volumen efectivo de 30L.

Durante el proceso fermentativo se mantuvieron las condiciones de agitación y aireación que permitieron una concentración adecuada de oxígeno disuelto en el medio. La temperatura del proceso fue de 28 ± 2°C, y el pH final estuvo entre 6,8-7,2 hasta las 26 h de fermentación.

Como controles del proceso se tomaron muestras en condiciones estériles a las 8, 12, 16, 20, 24 horas y una final, la cual se determinó por la presencia de un porcentaje de esporas y cristales libres superior al 90. Se realizaron obser-

vaciones al microscopio óptico a 1000x, mediante preparaciones teñidas con solución de violeta cristal al 0,5% para determinar las características del cultivo. En cada muestra se midió el valor del pH y se realizaron siembras en placas con agar nutriente para determinar la pureza del cultivo.

El producto como fluido acuoso concentrado se obtuvo por sedimentación de la biomasa obtenida en el proceso de fermentación, mediante la adición de un ácido orgánico y una sal de alumbre como conservante y precipitante respectivamente. Para los ensayos biológicos con la varroa se evaluaron varios lotes del fluido concentrado.

III. Aplicación y evaluación del Thurisav-13 en condiciones de producción

En el apiario El Vidrio (La Lisa, Ciudad de La Habana) se seleccionaron nueve colmenas y se conformaron tres grupos al azar de tres colonias cada una, dos en cámara de cría simple y una doble. A estas se les colocaron fondos que permitían recoger sobre un papel engrasado los ácaros desprendidos.

Al grupo 1 se le asperjó el Thurisav-13, solamente por los cabezales de los cuadros y los maineles, nunca directamente sobre la superficie de los panales, a una concentración de 2,1 x 10^8 esporas/mL. El volumen empleado por colmena fue de 30 mL por cámara de cría y se realizó una sola aplicación.

El grupo 2 se trató con ácido fórmico (AF) al 88%, según la metodología de Bracey y Fischer (1989), con cinco aplicaciones de 25 mL cada una con cuatro días de intervalo entre ellas.

El grupo 3 se utilizó como testigo. Los tratamientos empleados se hicieron en época de hambre. Para la colecta de los ácaros se colocó una placa colectora de detritus, y la toma de muestras se hizo cada tres días durante julio.

Una vez llevadas las muestras al laboratorio se siguió un procedimiento de limpieza con solventes para eliminar la cera y la grasa. Luego se tamizaron para eliminar la mayor cantidad de suciedad y favorecer la extracción de los ácaros.

Concluida la etapa de muestreo, las colmenas fueron horfanizadas. A partir de este momento no se les permitió criar nuevas reinas; además toda la cría recién nacida fue sacrificada.

Para la comparación de los tratamientos se aplicó un Anova de Clasificación doble y el Test de Duncan. Se utilizó el paquete de programas TonyStat (1985).

IV. Detección de la presencia de *Bacillus thuringiensis* en la colmena y sus productos

Este experimento incluyó el análisis de las muestras colectadas de cuatro apiarios (El Japonés, El Chalet, Remember, Ronembus), con 54 colmenas del Jardín Botánico Nacional, al cabo de un año de haber aplicado el Thurisav-13 a una concentración de 5 x $l0^7$ esporas/mL.

De las colmenas seleccionadas, las muestras se tomaron de las siguientes partes: miel operculada (MO), miel no operculada (MNO), cría operculada (CO), cría no operculada (CNO) y polen (P).

Para desarrollar el aislamiento y detección de la cepa de *B. thuringiensis* se adicionaron 1,1 g de cada muestra a 9,9 mL del medio líquido, caldo de esporulación modificado, se incubaron durante 24 horas a 28 ± 2°C. Luego los cultivos se centrifugaron a 5 000 r.p.m. por 15 min, con dos lavados con solución salina peptonada (SSP). Al pellet obtenido se le adicionó 10 mL de medio caldo-corazón, y se inoculó en erlenmeyers de 100 mL que contenían acetato de sodio al 20%, y se mantuvieron con agitación por 48 horas, a 28 ± 2°C.

A partir del cultivo anterior se realizaron diluciones seriadas en placas de agar nutriente hasta obtener las colonias aisladas, típicas de *B. thuringiensis* para su posterior conteo.

Los resultados fueron procesados estadísticamente a través de un Anova Trifactorial y el Test de Duncan correspondiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. **Caracterización de la cepa LBt-13**

Los resultados de la caracterización bioquímica y morfológica de la cepa aparecen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Características morfológicas y bioquímicas de la cepa LBT-13

Características morfológicas	Características bioquímicas
Colonias con bordes ramificados, coloración blanco-grisácea Cristales con formas bipiramidal y cuadrados. Esporas ligeramente alargadas Gram +	Amoniaco, indol, ureasa: + SH_2 : – Reducción de nitrato a nitrito: + Rojo de metilo, VPH, la hemólisis, la catalasa: + Oxidasa: –

El tiempo de duplicación en caldo nutritivo fue de 77'40'' para otras cepas de *Bt* oscila entre 50 min y 2 h, lo cual se corresponde con nuestros resultados [Márquez *et al.,* 1997].

La cepa respondió a las características bioquímicas y fisiológicas propias de la especie, ya que no produjo amoníaco, indol y ureasas; produjo SH_2; redujo el nitrato a nitrito; hidrolizó la caseína, la gelatina y el almidón. Fueron positivas la prueba rojo de metilo, la prueba VPH, la hemólisis, la catalasa, sin embargo fue oxidasa negativa. No utilizó la celobiosa, sacarosa, salicina ni manosa. Fue resistente a la penicilina, ampicillina y triplesulfa, resultó sensible a estreptomicina, kanamicina, eritromicina, tetraciclina y cloranfenicol. Se comprobó que las respuestas obtenidas coinciden con las características propuestas para la clasificación de *Bt*. [Bergey's, 1984].

El análisis de ácidos grasos es un instrumento taxonómico valioso que ha permitido la caracterización de *Bacillus thuringiensis* de las variedades *kurstaki*, *israelensis* y productos comerciales de esta última. La determinación de los patrones de ácidos grasos constituye una prueba lo suficientemente estable y específica para diferenciar géneros, especies y subespecies de bacterias.

En nuestro estudio de 22 ácidos grasos presentes en el patrón de referencia, nueve estuvieron presentes en la cepa LBT-13, en la cual el ácido graso predominante fue el metil12-metil tetradecanoico (a-15:0) con 30,87%. Además, la clase o tipo de ácido graso presente es hidroxi sustituido y de cadena ramificada (clase D).

De Barjac y Frachon en 1990 demostraron que las subespecies de *Bacillus thuringiensis* pueden ser divididas en serovares según la clasificación basada en la reacción del antígeno flagelar H. La selección de cepas efectivas para el control de insectos y organismos plaga de diferentes hábitats ha conllevado a la expansión del espectro de toxicidad de esta bacteria y a un rápido incremento en el número de nuevos serovares flagelares. Hasta la fecha se han identificado más de 55 [Ohba, 1996].

El serotipo de la cepa LBT-13 no fue identificado, se testaron todos los serotipos productores de beta exotoxina y con ninguno obtuvimos una respuesta positiva. Hasta el momento se han probado desde el serotipo H1- H28. Actualmente se sigue determinando el serotipo de esta cepa.

Respecto a la caracterización molecular, la cepa LBT13 dio productos de reacción con los oligos generales Cry1, y el tamaño fue de aproximadamente 560 pb , pero no con los oligos generales Cry3, Cyt y de Cry8. Para identificar los genes cry1 específicos presentes en la cepa de estudio se utilizaron tres mezclas de reacción (A, B y C) descritas en Cerón *et al.* (1995). La mezcla A amplifica regiones específicas de los genes cry1Aa, cry1Ab y cry1Ac. La mezcla B amplifica regiones específicas de los genes cry1B, cry1C y cry1D, y la mezcla C de los genes cry1E y cry1F. Los resultados muestran cómo la cepa LBT13 dio los tres productos de reacción de la mezcla A (cry1Aa, cry1Ab y cry1Ac). Además, presentó el gen cry1B y cry1D no dio producto de reacción con la mezcla C que reconoce a genes cry1E y cry1F .

II. Desarrollo del producto Thurisav-13

El producto obtenido Thurisav-13 tiene las siguientes características, incluyendo su presentación al consumidor y almacenamiento:

- Fluido acuoso concentrado compuesto por esporas y cristales tóxicos, residuos del medio de cultivo, ácido sórbico y sulfato de aluminio.
- Concentración: 3-7 x 10^9 esporas y cristales/mL pH: 3-4.
- Viscosidad: 8-10 mpascl/s
- Densidad: 1,042 g/mLs.
- Sólidos totales: 5-6%.
- Tamaño promedio de partículas: 0,4-0,6 micras.
- Presentación: Envases plásticos de 1 y 5 L. Tanques plásticos de 100 L.
- Almacenamiento: seis meses a temperatura hasta 28°C.

III. Aplicación y evaluación del Thurisav-13 en condiciones de producción

A inicios del experimento existía un estado de debilitamiento en las colmenas, ya que el crecimiento vertical era de 2C y 1C. Precisamente la decisión de aplicar los tratamientos con el biopreparado estuvo dada porque las familias de abejas morían con facilidad.

Los valores medios diarios de ácaros contados en el grupo 1 (tratado con el Thurisav-13) alcanzaron valores superiores con 229,98 v/col/día, seguido por el tratado con el ácido fórmico con 175,92 v/col/día, y finalmente el grupo testigo tuvo 142,3 v/col/día. Al aplicar el análisis de varianza entre los días no se detectaron diferencias significativas, lo que significa que la cantidad de ácaros desprendidos dentro de cada grupo fue similar; en cambio, entre los tratamientos se encontraron diferencias altamente significativas. Con el uso del Thurisav-13 se mantuvieron los mayores valores en los conteos, a pesar de haberse realizado una sola aplicación y se evidenció su efecto prolongado durante todo el transcurso del experimento.

En nuestros estudios el Thurisav-13 se mostró inocuo frente a las abejas, ya que durante el desarrollo del experimento y hasta 12 meses después, las colmenas que recibieron el tratamiento se comportaron igual que las testigos. Muchos autores coinciden en que *B. thuringiensis* no es patógeno para las abejas, y que para que provoquen mortalidad en ellas se requiere de dosis jamás alcanzadas en condiciones de campo [Cantwell, 1989].

En las diferentes aplicaciones que se realizaron del producto químico se apreció un comportamiento irregular. La mayor cantidad de varroas desprendidas se observaron 24 horas después de cada aplicación y después disminuían, respecto al Thurisav-13. Por eso hubo que hacer

cinco aplicaciones, y sólo fue a partir de la cuarta aplicación que aumentó la cantidad de varroas desprendidas. Esto puede deberse a un aumento de su velocidad de evaporación y concentración en el interior de las colmenas, favorecido por altas temperaturas, lo que nos demuestra su poca estabilidad y constituye un inconveniente, como es el caso de los ácidos láctico y oxálico [Immnodorf *et al.,* 1997].

IV. Detección de la presencia de *Bacillus thuringiensis* en la colmena y sus productos

Como se observa en la *Fig. 1*, las muestras de cría operculada difieren de las muestras evaluadas, y es donde hallamos las mayores concentraciones de *B. thuringiensis,* favorecido por la disposición de nutrientes llamados en su conjunto *papilla larval,* que garantizan el alimento y desarrollo de los estadios larvales presentes en esta parte de la colmena.

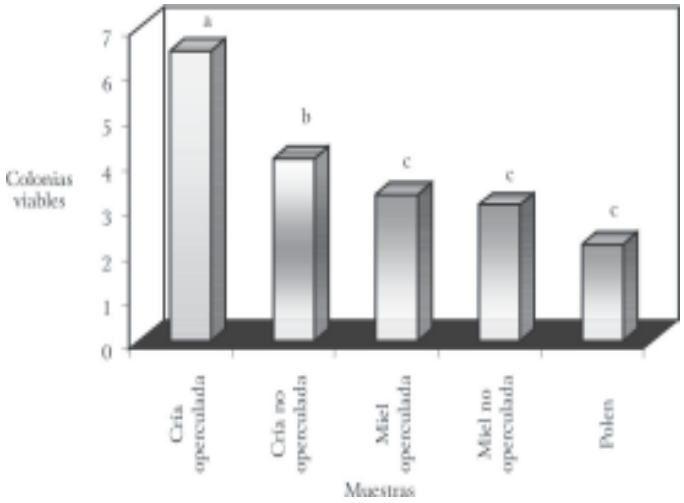

Figura 1. Concentraciones de *Bt* en los productos y partes de las colmenas.

Este resultado es muy importante debido a que en la cría sellada el ácaro ocasiona los mayores problemas a la colmena, ya que al extraerles la hemolinfa a las larvas el sistema inmunológico se les deprime y comienza el ataque de enfermedades oportunistas. En este mismo lugar la bacteria encuentra las condiciones óptimas para multiplicarse, producir las toxinas y los metabolitos con actividad biológica, y su acción acaricida es mucho más segura, a pesar de conocer que el modo de acción más conocido de *Bacillus thuringiensis* es por ingestión [Galán, 1996]. Sin embargo, en el caso de los ácaros puede existir también un efecto por contacto a causa de las exotoxinas [Neal, 1989].

En la cría no operculada prevalecieron los valores de 10^6 esporas/mL. No se encontraron diferencias significativas entre la miel no operculada, la operculada y el polen. Además, en estas partes de la colmena se detectaron las menores concentraciones del bacilo originado posiblemente por las diferencias de humedad y la presencia de pequeñas cantidades de antibióticos. Los valores de concentración de esporas viables encontradas en la miel, estuvieron en el orden de 10^4 y 10^5 unidades formadoras de colonias, que resultan permisibles dentro de las normas cubanas para la presencia de microorganismos en las mieles.

VI. Valoración económica

Una valoración económica acerca del costo de la aplicación del Thurisav-13 en las colmenas arrojó los siguientes datos:

Una dosis de Bayvarol cuesta 4.00 dólares y sirve para tratar una colmena. Por otra parte un litro del Thurisav-13 sirve para tratar ocho colmenas dobles, y tiene un costo en moneda nacional de 3.90 y un componente en divisa del 12%.

Tabla 2. Análisis del porcentaje de reducción del costo de aplicación del Bayvarol y el Thurisav-13

Tratamiento	Costo/colmena dólares	Reducción (%)
Bayvarol	4.00	–
Thurisav-13	0.06	98

Como puede apreciarse en la *Tabla 2,* con la aplicación del Thurisav-13 se reduce en un 98% el costo en divisa respecto al producto químico convencional. Estos resultados nos brindan las posibilidades de uso como acaricida que tiene este biopreparado, ya que no sólo es ventajoso por no ser tóxico al hombre ni al ambiente y ser producido nacionalmente, sino por el efecto económico que lleva implícito.

CONCLUSIONES

- El producto Thurisav-13 en forma de fluido concentrado resultó efectivo en el control de la varroa.
- El Thurisav-13 mostró ser más efectivo que el ácido fórmico en cuanto a la cantidad de varroas desprendidas y la durabilidad de su efecto.

- En la cría operculada fue donde se encontró la mayor concentración de *B. thuringiensis*, respecto a las demás partes de la colmena.
- Se comprobó la estabilidad del producto Thurisav-13, después de un año de aplicado el producto en las colmenas del Jardín Botánico Nacional.

REFERENCIAS

Almaguel Rojas, Lérida: «Ácaros de importancia económica en Cuba», *Boletín Técnico* no. 2, CID INISAV, La Habana, 1996.

Bergy's Manual of Determinative Bacteriology, 1984, pp. 530-536.

Bracey, S.; F. Fischer: «Initial Results of the Field Treatment of Honeybee Colonies Infested with *Varroa jacobsoni* using Acid in Hot Climates», *Am. Bee J.* 129:735-737, 1989.

Cantwell, G.E.; T. Lehnert; J. Fowler: «Are Biological Insecticides Harmful to the Honey Bee?», *Am. Bee J.* 112: 255-258, 1989.

Carreras, Bertha; Orietta Fernández-Larrea: «Identificación serológica de *B. thuringiensis* utilizando la técnica del DOT-ORO», *Rev. Protección Vegetal* 10:213-215, 1995.

Cobos, A.: «La varroasis en Andalucía», *Albariza* 1 (4): 49, 1986.

DeBarjac, H.; E. Frachon: «Classification of *Bacillus thuringiensis* strains», *Entomophaga* 35, 1990, pp. 233-240.

Galán J. L.; S. S. García; M. E. Santos; I. Quintero: *Producción de B. thuringiensis en avances recientes en la biotecnología de Bacillus thuringiensis*., Ed. Ciencia Universitaria, Universidad de Nuevo León, Monterrey, México., 1996, pp. 139-155.

Harrigan, W. F.; M. Mc Camce, M.: *Métodos de laboratorio en microbiología*, Ed. Acad. León. España, 1968, pp. 441-463.

Higes, M.; J. Llorente; A. Sanz, J. L. Pérez: «Rotenona. Eficacia acaricida en el control de la varroasis», *Vida Apícola* no.95, pp.45-48.

Imdorf, A.; J. D. Charrier; C. Maquelen; V. Kiicherman: «Alternative Varroa Control», *American Bee Journal,* 136 (3):189-193, 1996.

Krieg, A.: «Effectiveness of Beta Exotoxins on *Tetranychus telarius* (Acarina)», *Jornal of Inv. Patholo.* 12:478, 1968.

Márquez, María Elena: «Caracterización de un aislado de *Bt* (Berliner) con efecto acaricida», *Rev. Protección Vegetal* 12 (2): 89-932, 1997.

Miller, L. T.; T. Berger: «Bacteria Identification by Gas Chromatography of Whole Cell Fatty Acid», *Hewlett-Packard Application Note*: 228-241, 1985.

Neal, J. W., Jr.; R. K. Lindquist; K. M. Gott; M. L. Casey: «Activity of the Thermostable B-exotoxin of *B thuringiensis* Berliner on *T. urticae* and *T. cinnabarinus*», *J. Agric. Entomol.* 4(1):33-40, 1989.

Ohba, M.: «Identification of Flagellar (H) Antigenic Subfactors in *Bacillus thuringiensis* H Serotypes 10, 18 and 24 Isolated in Japan», *Letters Appl. Microbiol.* 23(5):287-289, 1996.

Payne, J. R.; A. Bagley: «*B. thuringiensis* Isolates Controlling Acarides», *US Patent International Publication*, Number 5425510, 1995.

Pérez-Santiago; G. Valenzuela; R. González; M. Celina: «Empleo de aceite de orégano para el control de *V. jacobsoni*, parásito de abejas melíferas», XXXV Congreso Nacional de Entomología, Memorias, 2000.

Sánchez, U.; O. García; A. León; M. Márquez; O. Fernández: Comunicación personal, 1996.

Tony Stat: *Paquete de programas para el procesamiento estadístico*, Fac. Biología, Universidad de La Habana, 1985.

Trujillo, F. J. : Comunicación personal, 1996.

Vicado Mejía, E.: *Uso del ácido fórmico y el timol en el control del ácaro V. jacobsoni en Yucatán*, XIII Seminario Americano de Apicultura, Memorias, 26-28 de agosto, Durango, México, 1999.