



Palabras clave: *Varroa destructor*, control, timol

Key Words: *Varroa destructor*, control, thymol

# Efectividad del timol en el control de *Varroa destructor* Anderson y Trueman, en condiciones de laboratorio y en colonias de *Apis mellifera*

Martin Eguaras\*; Damian Cora\*\*; Sergio Ruffinengo\*\*\*; Claudia Faverin\*; Alejandra Palacio\*\*\* y Marina Basualdo\*\*.

\* CONICET. Laboratorio de Artrópodos. Fac. Cs. Exactas y Naturales. Univ. Nac. Mar del Plata.  
\*\* Lab. de Apicultura. Fac. Cs. Veterinarias, UNICEN. \*\*\*Cátedra de Apicultura, Fac. Cs. Agrarias. Univ. Nac. Mar del Plata  
e-mail: mguaras@mdp.edu.ar

## RESUMEN

Se evaluó el efecto acaricida del timol sobre *Varroa destructor* Anderson & Trueman, en condiciones naturales y de laboratorio y la toxicidad sobre cría y abejas adultas. El timol se administró por pulverización en una solución de agua y emulsionante al 3, 4 y 5%. A estas concentraciones, se mostró una mortalidad de ácaros mayor al 90%, mientras que en los grupos control (agua y agua + emulsionante) la mortalidad fue significativamente menor (20%,  $p < 0,05$ ). A concentraciones del 5%, el timol no mostró toxicidad en cría ni en abejas adultas. En colonias de *Apis mellifera*, administrado en dosis de 25 g bajo condiciones naturales mantuvo la efectividad mostrada en laboratorio. Estos resultados sugieren que esta sustancia puede jugar un rol importante en el manejo de la varroasis.

## ABSTRACT

*Thymol Effectiveness for the Varroa destructor Anderson and Trueman control in Laboratory test and Apis mellifera colonies*

*Miticide effects on Varroa destructor Anderson & Trueman mite and bee brood and adults bee toxicity of thymol were evaluated in Lab. and natural conditions. Thymol was sprayed at 3, 4 and 5% in water and emulsified solution. As control distilled water and water with emulsionant was sprayed. At this concentrations thymol shows a high mite mortality (>90%), while in control groups the mortality were lower (20%,  $p < 0.05$ ). At 5% concentration, the thymol did not show brood and bee toxicity. Treatment with 25 g. thymol in field trials in each hive was effective to keep low Varroa prevalence index. These results suggested that the thymol might play an important role in an IPM program for Varroa control.*



## INTRODUCCION

El ácaro *Varroa destructor* (ex *jacobsoni*) es en la actualidad el parásito más importante que afecta las colonias de *Apis mellifera* L., que completa su ciclo de vida en el interior de las colmenas, succionando la hemolinfa de abejas adultas y crías. Los apicultores deben realizar tratamientos con diferentes acaricidas para controlar las poblaciones del parásito y evitar la muerte de las colonias (Eguarás, 1993)

En la actualidad, el control del ácaro está basado principalmente, en la utilización de acaricidas de síntesis, en particular piretroides. Sin embargo, el uso reiterado y en muchos casos indiscriminado de estos principios activos a lo largo de los años, ha causado problemas tales como la contaminación de los diferentes productos de la colmena y un incremento en las poblaciones de ácaros resistentes a los distintos principios activos (Milani, 1995).

Los problemas planteados han llevado a profundizar las investigaciones sobre otros métodos de control alternativo. En este sentido, se han investigado productos de baja toxicidad en mamíferos y reconocidos como seguros para el hombre, tales como ácidos orgánicos y aceites esenciales o sus componentes (Colin et al., 1994; Eguarás et al., 1996, 2001; Imdorf et al., 1999; Ruffinengo et al., en prensa).

Alrededor de 150 aceites esenciales o sus componentes han sido utilizados como experimento contra *V. destructor* con resultados diversos. Se ha evaluado su toxicidad, su efecto repelente, atractivo o la influencia sobre la reproducción administrados en forma tópica, por pulverización o evaporación pasiva (Imdorf et al., op.cit.).

En particular, el 5-metil-2 (1metil-etil) fenol, corrientemente llamado timol, ha mostrado efectividad contra *Varroa* (Chiesa, 1991; Calderone, 1999). A pesar de estos resultados positivos existen en el mercado muy pocas formulaciones comerciales a base de timol (Imdorf et al. 1995; Mattila y Otis, 1999). Uno de sus principales problemas, al igual que la mayoría de las sustancias naturales, es la gran variabilidad en los resultados finales entre distintos ensayos y aún entre colmenas de uno mismo. La formulación del producto parece ser el factor más relevante en la eficacia final. Dosis iguales, han mostrado resultados diversos dependiendo de la forma en que el producto se incorpora (Chiesa, op. cit.). En este trabajo se evalúa la actividad varroacida del timol, en condiciones de laboratorio y se determina su eficacia en colmenas de abejas melíferas afectadas a una explotación comercial.

## MATERIAL Y METODOS

Las experiencias se realizaron en el Laboratorio de Investigación Apícola de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires, durante abril, mayo y junio de 2000. Los ensayos sobre eficacia en colmenas comerciales se llevaron a cabo en diciembre de 2000 y enero de 2001 en el Establecimiento Agropecuario Santa Isabel, en las cercanías de la ciudad de Ayacucho, Provincia de Buenos Aires. Durante ese período la temperatura promedio fue de 18 °C, aunque las máximas alcanzaron los 30 °C.

### Bioensayos de Laboratorio

#### I-Test de letalidad de ácaros

El timol fue utilizado bajo la forma de cristales con una pureza del 100% (Sigma). Se preparó en una solución de agua destilada y emulsionante (tween 20) y se aplicó sobre hembras de *Varroa* por pulverización, con una réplica de la torre de Burgerjon (Burgerjon, 1956). En cada ensayo se utilizaron 10 hembras del *V. destructor* colocadas en cápsulas de Petri sobre las cuales se pulverizaron 10 mg de timol al 3, 4 y 5% (grupos B, C y D, respectivamente) en solución de agua destilada y emulsionante. Como control, se pulverizaron otras 10 hembras de *Varroa* con solución de agua destilada y emulsionante (grupo A). Los ácaros utilizados para la experiencia fueron hembras provenientes del interior de celdas de cría de abejas obreras. Sólo se utilizaron los ácaros que luego de los 15 minutos siguientes a su extracción, presentaban un comportamiento normal en cuanto a su movimiento.

Luego de la pulverización, los ácaros permanecieron diez minutos en la cápsula de Petri, se colocaron 5 pupas de abejas en el estadio de ojos marrones para su alimentación y se mantuvieron en estufa de incubación a 70 % RH y 33 - 34°C por 3 días. Se contabilizaron los ácaros vivos y muertos, a las 24 y 48 hs posteriores a la pulverización. Para cada tratamiento y control se realizaron 5 repeticiones. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza y Test de Duncan. El cálculo de la eficacia final se realizó de acuerdo a la fórmula de Abbot (1925) que contempla la mortalidad natural de los ácaros, brindando una idea real del poder potencial del acaricida.

#### II-Test de toxicidad en abejas adultas

Se colocaron aproximadamente 100 abejas, sin



**Cuadro 1**

Promedio de hembras de *V. destructor* muertas y eficacia en los tratamientos de laboratorio realizados con timol en solución de agua y emulsionante administrado por pulverización (5 réplicas, n= 10); a y b indican diferencias significativas entre promedios de la misma columna (p<0,05)

Grupos	Tratamiento	Acaros muertos	Eficacia (%)
Control			
A	Agua + emulsionante	2,7 ± 0,21 a	
Con timol (%)			
B	3	8,8 ± 0,34 b	84
C	4	9,0 ± 0,32 b	86
D	5	9,4 ± 0,25 b	91

**Cuadro 2**

Porcentaje de mortalidad de abejas adultas y cría 72 horas después de haber sido pulverizadas en laboratorio con una solución al 5% de timol. A y B grupos control que recibieron agua y agua con emulsionante, respectivamente. Los grupos 1, 2, 3 y 4 indican los promedios de las distintas réplicas del mismo tratamiento. No se observaron diferencias significativas en la mortalidad de abejas de los distintos tratamientos ni entre los distintos grupos dentro de cada tratamiento (p<0,05).

Grupos	Abejas muertas luego de 72 horas	Abejas totales (n)	Mortalidad (%)
Control adultas			
A	0	94	0
B	2	90	2,20
Con timol			
1	2	84	2,38
2	7	110	6,36
3	4	93	4,30
4	1	107	0,93
Control crías			
A	2	108	1,85
B	2	104	1,92
Con timol			
1	1	91	1,09
2	3	98	3,06
3	2	105	1,90
4	1	97	1,03

**Cuadro 3**

Número promedio de ácaros caídos en las colmenas luego del tratamiento, medias mínimo cuadráticas y errores estándar para eficiencia final de volteo (EFIACU) en los distintos grupos: 1: única aplicación de 25 g de timol, 2: dos aplicaciones de 12,5 g y 3: control. a y b indican diferencias significativas entre promedios de la misma columna (p<0,05).

Grupo	Promedio de ácaros caídos totales	EFIACU ± e.e (%)
1	989,00	94,43 ± 3,66 a
2	476,51	91,05 ± 2,54 a
3	842,20	21,70 ± 4,21 b



diferenciación de edad, en jaulas de malla metálica de 17 x 10 cm y 1,5 cm de espesor y se pulverizaron con 10 mg de solución de timol al 5% en agua destilada y emulsionante. Se realizaron cuatro repeticiones, con dos grupos testigo: las abejas sólo fueron pulverizadas con agua destilada y con agua destilada más emulsionante (grupos A y B)

Luego de 10 minutos de aplicados los distintos tratamientos, las jaulas conteniendo las abejas fueron colocadas en estufa a 70% HR y 33 - 34°C. En el interior de cada jaula se colocaron recipientes conteniendo *candy* para su alimentación. Se contabilizaron las muertas y vivas a las 72 hs posteriores a la aplicación de los tratamientos. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el procedimiento PROC CATMOD del SAS (SAS, 1989).

### III - Test de toxicidad en cría de abejas

Se pulverizaron trozos de panal de abejas de aproximadamente 100 celdas de cría conteniendo larvas que no superaban los 5 días de desarrollo (generalmente L4) con la misma concentración utilizada para adultas (5%). Luego de 10 minutos, los trozos de panal se introdujeron en las colmenas de las que provenían. Se realizaron controles de supervivencia a las 24 y 48 horas. Dos secciones de panales de cría conteniendo aproximadamente 100 celdas con larvas de 4 días, se pulverizaron con agua y agua más emulsionante y se introdujeron en el interior de las colmenas en carácter de testigo (grupos A y B). La toxicidad en las abejas se analizó mediante el procedimiento PROC CATMOD del SAS (SAS *op. cit.*)

### Ensayos en colmenas

Previo al ensayo de campo, las colmenas se estandarizaron por población de abejas, área de cría y reservas de miel y polen y se acondicionaron con pisos rebatibles, para facilitar el conteo de ácaros. Se usaron 20 colmenas, divididas en 3 grupos. El 1 (n=7) recibió una única dosis de 25 g de timol, el 2 (n=7) una de 25 g, dividida en dos aplicaciones de 12,5 separados por 12 días, mientras que el 3 (n=6) no recibió ningún tratamiento y se utilizó como control. En todos los casos, se utilizaron barras de 10 x 1 x 1 cm de una mezcla de perlita expandida y vermiculita en proporción 1:2, como vehículo. Se colocaron sobre los cabezales de los cuadros centrales de la cámara de cría. Los ácaros muertos se contabilizaron dos veces por semana, a lo largo de toda la experiencia. Luego de 24 días de iniciado el ensayo, se aplicaron dos acaricidas de eficacia reconocida (fluvalinato y ácido oxálico) con el fin de determinar el tamaño de la población de parásitos. Los ácaros muertos a causa de este tratamiento fueron recolecta-

dos y contados durante los siguientes 15 días.

La efectividad del tratamiento (EFIACU) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:  $EF = N^{\circ} \text{ ácaros caídos por el tratamiento de timol} \times 100 / N^{\circ} \text{ de ácaros totales caídos al finalizar el ensayo}$ . Se compararon la eficacia final en cada grupo mediante ANOVA con un modelo que incluyó el efecto de tratamiento y el número de ácaros totales como covariable. Las medias mínimas cuadráticas se compararon por el test de LSD (least square difference). El nivel de significación usado fue de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Los valores de mortalidad de ácaros sometidos a pulverización con distintas concentraciones muestran que el timol exhibe una marcada toxicidad cuando los ácaros entran en contacto con él. Su efectividad no difirió significativamente entre concentraciones de 3, 4 y 5%, aunque sí se observó una diferencia significativa con el grupo testigo ( $p < 0,05$ ). En las concentraciones utilizadas, el timol mostró una efectividad superior al 90% (Cuadro 1).

A 5% no mostró toxicidad en abejas adultas ni en sus estadios larvales. La mortalidad de las abejas sometidas al tratamiento fue muy baja y no difirió significativamente de la registrada para los grupos control ( $p > 0,05$ ). En estos, el emulsionante utilizado no mostró ningún tipo de efecto sobre las abejas adultas ni la cría (Cuadro 2).

Bajo condiciones naturales se observó una alta eficacia del timol suministrado en dosis de 25 g que alcanzaron en promedio, valores cercanos al 94 y 91% para los grupos 1 y 2, respectivamente. La administración de timol en un único tratamiento de 25 g o en dos de 12,5 g c/u, no influyó sobre su eficacia final ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, la eficacia en las colmenas de los grupos 1 y 2 fue significativamente mayor que la mortalidad natural observada en las colmenas del grupo control (grupo 3), que permaneció cercana al 20% ( $p < 0,05$ ) (Cuadro 3).

No se observaron efectos adversos sobre la cría ni sobre la supervivencia de las abejas adultas, aún cuando se registraron en algunos días temperaturas superiores a 30°C. Sí se observó, poco tiempo después de la aplicación, un importante número de abejas fuera de la colmena en la parte frontal. Sin embargo, luego de unas horas las abejas volvieron al interior de la colmena. Al finalizar el ensayo, todas las barras conteniendo timol fueron totalmente desintegradas por la actividad de las abejas.



## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los bioensayos indican que el timol pulverizado sobre los ácaros es efectivo y presenta las propiedades de un excelente agente acaricida. En todos los casos, la eficacia en laboratorio se mantuvo cercana al 90% aún en la concentración más baja (3%). Los resultados logrados en el laboratorio se mantuvieron también en condiciones de campo. Entre ambas eficacias finales no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Este es un punto importante, fundamentalmente porque uno de los problemas principales en el control de plagas con estas sustancias, es extrapolar con éxito los resultados obtenidos en laboratorio a condiciones naturales. En particular, el sustrato en el cual se incorpora el timol dentro de las colmenas, es un factor muy importante y estrechamente ligado a la eficacia final del producto. Marchetti y Barbattini (1984) observaron alta variabilidad de los resultados con aplicaciones de 15 g de timol en cristales por colmena. Sin embargo, la misma dosis administrada en polvo, mostró eficacias tan altas como las de los mejores acaricidas de síntesis (Mladan *et al.*, 1985). Otros sustratos utilizados han sido vermiculita y matrices de gel. En ambos casos se observó una gran variación en la mortalidad final de los ácaros, dependiendo fundamentalmente de la temperatura y el volumen de cría presente en la colonia (Imdorf *et al.*, *op. cit.*). De acuerdo a Mattila y Otis (1999) altas temperaturas provocan una rápida vaporización del timol, causando efectos adversos sobre las abejas y evitando que una gran parte de la población de parásitos (aquellos que se encuentran en el interior de las celdas de cría) pueda ser alcanzada por la droga. El presente trabajo se desarrolló dentro del rango óptimo para este tipo de tratamiento (entre 15 y 20°C de acuerdo a Imdorf *et al.*, *op. cit.*). Calderone *et al.*, (1997) observaron en los tratamientos con grandes áreas de cría, que su efectividad se reducía por debajo de un 60%. Este mismo hecho fue observado por Gal *et al.*, (1992) para regiones subtropicales. En el presente trabajo, se observó una alta eficacia final, aún con un volumen de cría considerable (entre 6 y 7 cuadros por colmena). Esto es notorio en el grupo 1, dado que el timol debe permanecer en una concentración suficientemente alta, al menos dentro de los 10 días siguientes al tratamiento. A menor cantidad de droga, la realización de un segundo tratamiento poco tiempo después de la aplicación del primero (grupo 2) favorece la eficacia final del producto. La similitud en los

resultados finales de ambos grupos indica que la dosis suministrada en el 1 es suficiente como para cubrir el ciclo completo de la parasitosis. Se desconoce también el grado de importancia que tiene bajo condiciones naturales el efecto repelente del timol y como podría haber interferido éste, si existió, en ambos grupos.

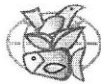
Un programa de manejo integrado de plagas requiere que el tratamiento realizado sea consistente y mantenga una alta efectividad. Esto es, un nivel aceptable de mortalidad que permita invernar las colonias de abejas con un índice de prevalencia de ácaros suficientemente bajo para no poner en duda la supervivencia de las colonias. Los resultados obtenidos incrementan la información existente sobre el timol y su posible utilización para el control de ácaros parásitos de abejas. Sin embargo, sólo deben limitarse a la región de estudio y en las condiciones ambientales del momento. Altas eficacias no siempre serán garantizadas y, en general, la dosis para un sustrato en particular deberá ajustarse a la región de estudio.

## AGRADECIMIENTOS

A CONICET, UNMdP y UNICEN.

## REFERENCIAS

- Abbot, W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 5: 11-16.
- Burgerjon, A. 1956. Pulverisation et poudrage au laboratoire par des préparations pathogènes insecticides. *Ann. Epiphyt.* (Paris), 4: 675-684.
- Calderone, N. 1999. Evaluation of formic acid and a thymol-based blend of natural products for the fall control of *Varroa jacobsoni* in colonies of *Apis mellifera*. *J. Econ. Entomol.* 92: 255-260.
- Calderone N.; W. Wilson and M. Spivak. 1997. Plant extracts used for the control of *Varroa jacobsoni* and *Acarapis woodi* in colonies of *Apis mellifera*. *J. Econ. Entomol.* 90: 1080-1086.
- Colin, M.E.; F. Ciavarella, G. Otero Colina and L. Belzunces. 1994. (109-114) A method for characterizing the biological activity of essential oils against *Varroa jacobsoni*. In: Ed.



- A. Matheson. New perspectives on *Varroa*. IBRA. Cardiff. UK. 146 pp.
- Chiesa, F. 1991. Effective control of varroaosis using powdered thymol. *Apidologie* 22: 135-145.
- Eguarás, M. 1993. Variaciones estacionales en la tasa de reproducción e incremento de *Varroa jacobsoni* O. (Acari: Gamasida), parásito de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Tesis Doctoral. FCEyN. UNMdP. 174 p.
- Eguarás, M., S. Quiroga and O. García. 1996. The control of *Varroa jacobsoni* Oud. (Acari: Gamasida) by means of Organic acids. *Apiacta*, 31: 51-54.
- Eguarás, M., M. Del Hoyo, A. Palacio, S. Ruffinengo and E. Bedascarrasbure. 2001. Beevar, a new product with formic acid for *Varroa jacobsoni* control. I Efficacy. *J. Med. Vet. B.* 48: 11-14
- Gal, H., Y. Slabezki and Y. Lensky. 1992. A preliminary report on the effect of origanum and thymol applications in honey bee colonies in a subtropical climate on population of *Varroa jacobsoni*. *Bee Science* 2: 175-179.
- Imdorf, A., S. Bogdanov, V. Kilchenmann and C. Maquelin. 1995. Apilife Var: a new miticide with thymol as the main ingredient. *Bee World* 76: 77-83.
- Imdorf, A., S. Bogdanov, R. Ibañez Ochoa and N. Calderone. 1999. Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* in honey bee colonies. *Apidologie*, 30: 209-229.
- Marchetti, S. and R. Barbattini. 1984. Comparative effectiveness of treatment used to control *Varroa jacobsoni*. *Apidologie* 15: 363-377.
- Mattila, H. and G. Otis. 1999. Trials of Apiguard, a thymol-based miticide. Part 1. Efficacy for control of parasitic mites and residues in honey. *Am. Bee J.* 139: 947-952.
- Mladan, V., M. Erski-Biljic, D. Jakic and M. Simic. 1985. Use of some preparations in the control of *Varroa*. *I. Vet. Glas* 39: 489-496.
- Milani, N. 1995. The resistance of *Varroa jacobsoni* to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie*, 26: 415-429.
- Ruffinengo, S., M. Eguarás, D. Cora, P. Bailac, E. Rodriguez, M. Ponzi and E. Bedascarrasbure. En Prensa. Biological Activity of *Heterotheca latifolia* Buckley (Compositae) Essential Oil against *Varroa jacobsoni* Oudemans (Acari). *J. Es. Oil Res.*
- SAS. 1989. SAS Institute Inc. SAS/STAT User's Guide. Version 6, Fourth Edition, Cary, NC. SAS Institute Inc. 1: 943 p.p.

Recibido /Received : 11 octubre 2001  
Aprobado / Accepted : 31 julio 2003