

# Eficacia del aceite esencial de ajedrea (*Satureja montana*) en el control de la ascosferosis de la abeja (*Apis mellifera*) en condiciones de campo

Mariano Higes Pascual<sup>1</sup>, Miguel Suárez Robles<sup>1</sup>, Jesús Llorente Martínez<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Jesús Payá Vicens<sup>2</sup> y Ana Vicente Montaña<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Apícola Regional, Servicio de Investigación Agraria, JJ CC Castilla-La Mancha y <sup>2</sup>Departamento de Patología Animal I, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España

## Resumen

Con el fin de comprobar el efecto que ejerce en el control de la ascosferosis de *Apis mellifera*, el aceite esencial de ajedrea (*Satureja montana*) se han probado tres tipos de alimentos que actúan como vehículo de cinco concentraciones diferentes de este aceite. El jarabe (agua y miel v/v) con el 0,1% fue el mejor tolerado por las abejas, no comprobándose ninguna alteración en las colonias una vez consumido.

Posteriormente, la ascosferosis fue instaurada de manera controlada en ocho colmenas. Para ello, una suspensión de esporas (10<sup>6</sup>/ml) fue aplicada por nebulización, tres veces por semana durante cuatro semanas, para asegurar su presencia abundante en el interior de las colmenas. Las cuatro semanas siguientes, se prosiguió con la nebulización a la vez que se seleccionaron porciones de cría de edad conocida (24 horas antes de su operculación), para extraerlas de las colmenas y someterlas a un choque térmico (22 ± 2°C) durante 24 h, reintroduciéndolas a continuación en las colmenas para su operculación, extrayéndolas finalmente y manteniéndolas en estufa a 35°C y 70% de humedad relativa, hasta la aparición de los síntomas típicos de la enfermedad (larvas momificadas). Durante este periodo, las colmenas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos de cuatro colmenas, uno recibía 500 ml de jarabe con 0,1% de aceite esencial de ajedrea, dos veces por semana, durante cuatro semanas, permaneciendo el otro como control (recibían jarabe sin medicar). Las larvas seleccionadas en las colmenas tratadas presentaron una momificación en el 27,6% de los casos, frente al 79,1% de las colmenas control que solamente recibieron el jarabe. El tratamiento aplicado fue perfectamente tolerado por las colonias de abejas, no observándose alteración alguna en su evolución posterior.

*Ascosphaera apis*, abeja, aceite de ajedrea, eficacia

## Efficiency of essential oil (*Satureja montana*) in controlling the ascospherosis in the honey bee (*Apis mellifera*) under field conditions

## Summary

With the aim of testing its effect in the control of ascospherosis in bees, the essential oil of ajedrea was incorporated into three types of feed in five different concentrations. Syrup (water and honey) with 0.1% were the best tolerated by the bees, with no colonial changes after a single feed.

Later, the ascospherosis was introduced in a controlled manner into eight hives. For this, a 10<sup>6</sup>/ml spore suspension was applied by nebulizer three times a week for four weeks to ensure its abundant presence inside the hives. This was continued for the next four weeks period, and at the same time portions of brood-comb in a known state (24 h before operculation) were removed from the hives and heat shocked for 24h (22 ± 2°C), then replaced in the hives for their operculation, finally removing them and maintaining them at 35°C and 70% relative humidity until the appearance of typical disease symptoms (mummification of the larvae). The hives were randomly divided into two groups of four. One group received 500 ml of syrup with 0.1% oil of ajedrea, twice a week for four weeks. The other was kept as the control, receiving syrup without medication. 27.6% of the selected larvae in the treated hives showed mummification, compared with 79.1% in the control hives. The treatment was perfectly tolerated by the bee colonies, showing no changes in their subsequent development.

## Key words

*Ascosphaera apis*, bee, *Satureja montana* essential oil, effectiveness

## Dirección para correspondencia

Dr. Mariano Higes Pascual  
Centro Apícola Regional, San Martín s/n,  
19180 Marchamalo, Guadalajara, España  
Tel.: +34-949 25 00 26; Fax: +34-949 25 01 76

Aceptado para publicación el 19 de mayo de 1998

La ascosferosis es una de las principales enfermedades que actualmente afecta a las larvas de las abejas melíferas (*Apis mellifera*), cuyo agente etiológico es el hongo *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) Olive and Spiltoir.

Se han probado diferentes fungicidas para su control [1-3], pero ninguno de ellos ha resultado totalmente eficaz en condiciones de campo, además de la problemática que sus residuos pueden representar para los productos de la colmena.

El aceite esencial de *Satureja montana* mostró una interesante acción antifúngica *in vitro* e *in vivo*, en condiciones de laboratorio, frente a *A. apis* [4]. Sin embargo, solo sería susceptible de ser utilizado en el control de la ascosferosis si se consigue aplicar vehiculado en un alimento apropiado, al resultar fundamental la llegada del principio activo al interior del intestino medio de la larva, lugar donde se produce la germinación de las esporas del hongo [5,6] a la vez que el tratamiento resulte de fácil aplicación por parte del apicultor. Para ello, el alimento medicado debe ser tolerado por la colonia de abejas e incorporado en la cadena alimentaria de la colonia (trofalaxia) para llegar a las larvas en el momento de ser alimentadas por las abejas nodrizas.

Por tratarse de una sustancia natural, extraída de plantas melíferas (*S. montana*), su utilización en colmenares en producción no tendría repercusiones negativas en los productos apícolas debido a residuos de la misma.

En nuestro trabajo, intentamos determinar la mejor vía de administración del aceite esencial de *S. montana* a las colmenas y su eficacia en el control de la ascosferosis en condiciones de campo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Colmenas y colonias de abejas.** Las colmenas utilizadas fueron tipo Langstroth, colocadas sobre banquillos metálicos para aislarlas del suelo, y ubicadas en el Colmenar Experimental perteneciente al Centro Apícola Regional (Marchamalo, Guadalajara, España). Esta localidad se encuentra situada en la zona Centro de España, a una altitud media de 680 m, siendo las principales plantas melíferas algunos tipos de labiadas (*Lavandula latifolia*, *Thymus* spp.), y plantaciones de maíz y girasol, que determinan una única cosecha en el tardío (septiembre/octubre).

Todas las colmenas fueron pobladas por colonias de abejas (*Apis mellifera mellifera*) homogéneas y con reinas de la misma edad.

**Aceite esencial empleado.** El aceite esencial de ajedrea (*S. montana*) ha sido obtenido por los laboratorios Radix (Zaragoza, España), con una pureza del 100%.

**Tipos de alimentos utilizados.** Los alimentos utilizados en este estudio como vehículos del aceite esencial de ajedrea, fueron aplicados a las colmenas en bolsas de plástico alimentario (40x35 cm y 100 galgas de espesor) que se colocaban en la parte superior de los cuadros, a disposición de las abejas para su consumo. Tres tipos de alimentos fueron probados: jarabe (J), alimento semisólido (S), pasta de polen (P) (Tabla 1).

Cada tipo de alimento fue aplicado a tres grupos de 11 colmenas; 10 recibían el alimento adicionado con diferentes concentraciones de aceite esencial de ajedrea (0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2%) y una permanecía como control, recibiendo solamente alimento (Tabla 1). Diariamente se registraba la cantidad de alimento consumido por las abejas.

**Instauración de la ascosferosis de manera controlada y pruebas de eficacia en campo.** Durante cuatro semanas (mayo de 1996) un grupo de ocho colmenas fue inoculado tres veces por semana (lunes, miércoles, viernes) con 8 ml de una suspensión de esporas de *A. apis* (cinco momias negras fueron maceradas en 5 ml de agua destilada con un 5% de sacarosa, añadiendo posteriormente 95 ml del mismo jarabe [7], obteniéndose de esta manera una concentración de esporas de 10<sup>6</sup>/ml) por cada panal poblado de abejas, para asegurar su abundante presencia en todas las estructuras de la colmena (cría, adultos, reservas de miel y polen).

Posteriormente, las colmenas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos de cuatro colmenas cada uno. Ambos grupos siguieron recibiendo la suspensión de esporas en las cuatro semanas siguientes (junio de 1996) a la vez que se seleccionaban en los panales porciones homogéneas de cría con 30-100 larvas de la misma edad (24 h antes de la operculación), en dos zonas diferentes del área de cría. Estas porciones eran extraídas de las colmenas para someterlas a un choque térmico de 22 ± 2°C durante 24 h [8]. Transcurrido este tiempo, los lotes de cría eran devueltos a su ubicación original, en los panales con cría, para su operculación. Una vez operculadas, eran extraídas nuevamente de los cuadros y mantenidas en estufa a 35°C y 70% de humedad relativa, durante 7 días. Posteriormente las celdillas fueron desoperculadas para verificar la presencia de los síntomas característicos de la ascosferosis en las prepupas (momificación por desarrollo de las estructuras reproductivas del hongo). Esta técnica fue repetida dos veces en cada una de las ocho colmenas.

Paralelamente a la instauración de la ascosferosis de manera controlada, cada uno de los grupos de cuatro colmenas recibía dos veces por semana (lunes y viernes), durante cuatro semanas (junio 1996), alimento adicionado de la concentración de aceite de ajedrea mejor consumido por las colonias de abejas (jarabe con 0,1% de aceite esencial de ajedrea). El otro grupo de cuatro colmenas permanecía como control recibiendo jarabe exclusivamente.

La eficacia del aceite de ajedrea en el control de la ascosferosis se determinaba comparando el porcentaje de larvas sanas y con sintomatología típica en las colmenas medicadas y control, mediante desoperculación de las porciones de cría seleccionadas en cada grupo de colmenas en el periodo de aplicación del tratamiento propuesto.

## RESULTADOS

**Aceptación de los diferentes tipos de alimentos.** El único alimento adicionado de aceite esencial de ajedrea consumido en su totalidad por las abejas en el período de tiempo en que se desarrolló el ensayo fue el jarabe (50% agua - 50% miel, 500 ml por colmena) con un 0,1% de este aceite. Todo el alimento era consumido en 24 h. El jarabe con concentraciones superiores del aceite esencial era rechazado por las abejas, al igual que el resto de alimentos independientemente de la concentración del aceite esencial.

Las colmenas control consumieron la totalidad del jarabe en 24 h, mientras que el alimento semisólido y la pasta de polen eran parcialmente consumidos (30% y 10%) en el intervalo de una semana (Tabla 1).

**Instauración de la ascosferosis y pruebas de eficacia en campo.** Durante las cuatro semanas (junio de 1996) que duró esta fase del ensayo, en el grupo de las colmenas control, se desopercularon un total de 522 celdillas en las 16 porciones de cría seleccionadas, de las que el 20,8% de las larvas habían seguido un normal desarrollo.

**Tabla 1.** Tipos de alimentos y concentraciones de aceite esencial aplicados en cada grupo de colmenas.

Alimento	Nº de colmenas	Concentración (%)	Dosis por colmena	Consumo	
				en 24h (%)	en 1 semana (%)
J: Jarabe	2	0,1	500 ml	100	100
	2	0,5		0	0
	2	1,0		0	0
	2	1,5		0	0
	2	2,0		0	0
50% Agua	2	1,5		0	0
50% Miel	2	2,0		0	0
	1	Control		100	100
S: Alimento semi-sólido	2	0,1	750 g	0	0
	2	0,5		0	0
	2	1,0		0	0
	2	1,5		0	0
	2	2,0		0	0
48,5% miel	2	1,5		0	0
48,5% azúcar	2	2,0		0	0
3% agua	1	Control		1	30
P: Pasta de polen	2	0,1	100 g	0	0
	2	0,5		0	0
	2	1,0		0	0
	2	1,5		0	0
	2	2,0		0	0
50% polen	2	1,5		0	0
25% azúcar	2	2,0		0	0
25% dextrosa	1	Control		0,5	10

llo y el 79,1% mostraban claros síntomas de padecer ascosferosis. En las colmenas medicadas, se desopercularon un total de 450 celdillas en las 16 porciones de cría seleccionadas, de las que el 72,4% de las larvas habían seguido un desarrollo normal frente al 27,6% que mostraban síntomas de la enfermedad.

## DISCUSIÓN

El principal problema que plantea el tratamiento de la ascosferosis en condiciones de campo, es vehicular las moléculas fungicidas al interior del aparato digestivo de las larvas en las 24 h anteriores a la operculación, momento en el que presentan una mayor susceptibilidad a desarrollar la enfermedad [8]. Para ello, es fundamental que la colonia de abejas incorpore estas sustancias en su cadena alimentaria y mediante el intercambio alimentario (trofalaxia) las haga llegar a las abejas nodrizas, encargadas de alimentar a las larvas hasta el momento de la operculación. El método de aplicación del aceite esencial de ajedrea vehiculado en jarabe y aplicado en la colmena mediante una bolsa de plástico alimentario colocada en la zona superior de los cuadros, cumple estos requisitos. Este tipo de alimento es utilizado normalmente durante la primavera y mejor aceptado que otros por las abejas en esta época, en que la incidencia de la enfermedad en nuestro país es mayor [9]. Por otra parte cumpliría un beneficioso efecto de estímulo de la colonia y evitaría el fenómeno de pillaje [10]. El método de aplicación propuesto, facilita la tarea del apicultor evitando los problemas de manejo que plantean los métodos de aplicación de tratamientos mediante nebulización [11] y se evita el enfriamiento de la cría, uno de los factores predisponentes de primera magnitud [1,12].

Por ser la ascosferosis una enfermedad claramente multifactorial, la correcta interpretación de los ensayos clínicos en campo, precisa contar con una técnica que asegure la instauración controlada de la enfermedad y la presencia de sintomatología típica en un número conocido de larvas [8]. Con la técnica propuesta, hemos conseguido desarrollar la ascosferosis en el 79,1% de las larvas en las porciones de cría seleccionadas. En estas condiciones las variaciones de este porcentaje, tras la aplicación de un determinado tratamiento, serían atribuibles al mismo y no a la influencia de otros factores predisponentes (climatología, comportamiento de limpieza, cambio de reina, aportes de néctar, manejo, etc.).

Nuestros resultados confirman la utilidad del aceite esencial de ajedrea en el control de la ascosferosis, coincidiendo con lo apuntado por Colin [4], si bien en nuestro caso los trabajos en campo se desarrollaron en primavera, momento de máxima incidencia de la enfermedad y mayor desarrollo de las colonias y no a finales de invierno, momento elegido por el anterior autor, y que nos parece poco adecuado, dado que es un periodo con poca actividad de las colonias y escasa o nula presencia de cría, lo que determina una muy baja incidencia de la enfermedad.

A pesar que la utilización de jarabe adicionado al 0,1% con aceite esencial de ajedrea permite reducir la momificación, la presencia de un 27,6% de larvas enfermas en las colmenas medicadas, hace necesario desarrollar otros métodos de control (selección de instinto de limpieza, medidas profilácticas, cambio de reinas seleccionadas, etc.) que combinados con esta u otras sustancias fungicidas permitan mantener los colmenares libres de esta patología.

## Bibliografía

1. Heath LAF. Development of chalkbrood in honey bee colonies: a review. *Bee World* 1982;63:119-130.
2. Nelson DL, Gochnauer TA. Field and laboratory studies on chalkbrood disease of honey bees. *Am Bee J* 1982;122:29-32.
3. Thomas GM, Luce A. An epizootic of chalkbrood, *Ascosphaera apis* (Maassen ex Clausen) Olivie and Spiltoir in the honey bee, *Apis mellifera* L. in California. *Am Bee J* 1972;112:88-90.
4. Colin ME, Ducos de Lahitte J, Larribau E, Boué T. Activité des huiles essentielles de Labiées sur *Ascosphaera apis* et traitement d'un rucher. *Apidologie* 1989; 20:221-228.
5. Carrera P, Sommaragha A, Vailiti G. The development of *Ascosphaera apis* within larvae of *Apis mellifera*. *J Apicultural Res* 1987;26:59-63.
6. Bamford S, Heath L. The infection of *Apis mellifera* larvae by *Ascosphaera apis*. *J Apicultural Res* 1989;28:30-35.
7. Gilliam M, Taber S. Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. *Apidologie* 1983;14:29-39.
8. Puerta F, Flores JM, Bustos M, Padilla F, Campano F. Chalkbrood development in honey brood under controlled conditions. *Apidologie* 1994;25:1-7.
9. Higes M. El pollo escayolado (ascosferosis) en la abeja. *El Colmenar* 1995;40:13-15.
10. Robles ME, Salvachúa JC. Técnicas para la producción intensiva de miel. En: *Jornadas Técnicas XIV FERIA Apícola de Castilla-La Mancha*. Pastrana. Patronato Rector de la FERIA Apícola de Castilla-La Mancha, 1995:125-154.
11. Gilliam M. Chalkbrood disease of honey bee caused by fungus *Ascosphaera apis*. A review of past and current research. En: *Proceedings of the XXII annual meeting of the Society for Invertebrate Pathology in Adelaide*. Adelaide, 1990:398-402.
12. Flores JM, Ruiz JA, Ruz JM, *et al.* Effect of temperature and humidity of sealed brood on chalkbrood development under controlled conditions. *Apidologie* 1996;27:185-192.