

23  
2ij



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**PRINCIPALES ENFERMEDADES FUNGALES DE LA ABEJA  
Apis mellifera L. (ESTUDIO RECAPITULATIVO)**

**T E S I S**

presentada ante la

**División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
de la**

**Universidad Nacional Autónoma de México  
para la obtención del título de  
Médico Veterinario Zootecnista**

por

**Martha Elena Castro Guzmán**

**MVZ. Adriana Correa Benítez  
MVZ. Fernando Cristóbal Aquino**



México, D. E.

Septiembre de 1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

A mi mami Doña Judith Guzmán Ríos con todo mi amor por tu entusiasmo, esfuerzo y enseñanzas, porque estas en mi mente siempre.

A mis hermanos Elisa por tu interés, Miguel Ángel y Liliana por su alegría, Idalia por tu apoyo, Rosalinda por el cariño y ternura que te caracterizan tanto,

A mis primos Gabriel, Judith, Rocío, Emilio, Lourdes y a mi tía Angeles porque forman parte de mí.

A Oscar Uribe Fragoso por permanecer unido a mí desde el inicio de mi carrera, por tu comprensión, comentarios certeros, pero sobre todo por tu amor.

A mis maestros que forman parte de lo que soy Xochitl, Evaristo, Rolando, Carmen y sin excepción a todos los profesores que contribuyeron para mi formación profesional como Médico Veterinario Zootecnista.

A mis amigos especialmente a Víctor Sebastián y Bernardo

## AGRADECIMIENTOS

A todo el personal de la biblioteca

A Cande y a Isa del Centro de Cómputo

A mis asesores Adriana Correa Benítez y Fernando Cristóbal Aquino por su tiempo y paciencia dedicados a mi y al presente trabajo, espero que el resultado final corresponda a sus esfuerzos y espera.

A mis Asesores

PhD Roberto Cervantes por su apoyo al proyecto de laboratorio.

PhD Ernesto Guzmán por su tiempo tan valioso dedicado a este trabajo

M.V.Z Daniel Prieto por sus sugerencias tan acertadas.

M.V.Z Angel López por su entusiasmo

A la química Carolina Segundo por su ayuda en la realización de las diapositivas en lo que se refiere a laboratorio de micología.

A Angélica Gris y Leandro

Al M.V.Z. Antonio Zozaya Rubio por su colaboración

CONTENIDO

Página

RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	2
PROCEDIMIENTO .....	3
ANALISIS DE LA INFORMACION .....	45
LITERATURA CITADA .....	46
APENDICE .....	50

## RESUMEN

CASTRO GUZMAN MARTHA ELENA. Principales Enfermedades Fungales de la abeja *Apis mellifera* L. (Estudio Recapitulativo). (bajo la dirección de la MVZ. Adriana Correa Benitez y el MVZ. Fernando Cristóbal Aquino)

Los hongos hallados en abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) y sus colmenas, son comúnmente microorganismos saprófitos. Sin embargo, existen algunos como *Ascosphaera apis* y los del género *Aspergillus* spp., que causan cría de cal y cría de piedra respectivamente, que en ocasiones muestran una alta incidencia, teniendo como consecuencia fuertes problemas económicos para la apicultura, especialmente en zonas húmedas y frías. Hace algunos años se consideraba que la cría de cal era una enfermedad de poca importancia, pero en los últimos 15 años se ha convertido en un problema de relevancia económica, debido a lo común que es encontrarla y a que la mortalidad de la cría en ocasiones rebasa el 30%. Los *Aspergillus* spp. son aislados con menor frecuencia y son considerados de menor importancia para los apicultores. No obstante, por el hecho de causar enfermedad en el hombre, deben tomarse en cuenta para el adecuado manejo de las colmenas y de la miel. *Aspergillus flavus* se ha encontrado más frecuentemente asociado a casos de cría de piedra que *Aspergillus fumigatus*. Se han encontrado otros hongos asociados a las patologías apícolas pero la información disponible es escasa y dispersa. Este estudio recapitulativo pretende proporcionar información organizada y actualizada que ayude a los Apicultores y Médicos Veterinarios Zootecnistas a prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades fungales en las abejas melíferas.

## INTRODUCCION

Desde hace miles de años el hombre se ha interesado por las enfermedades que se presentan en las abejas melíferas. Aristóteles (384 - 322 A. C.) describió algunas alteraciones en estas, pero sus descripciones fueron insuficientes para poder identificarlas con certeza.<sup>33</sup> La gran cantidad de parásitos y microorganismos que se han encontrado en abejas, llevaron a la creencia de que éstas, eran afectadas por una amplia gama de ellos, sin embargo, no todos son causantes de enfermedad.<sup>9,63,1</sup> Actualmente, gracias a los estudios de patología apícola, se sabe que existen más de 20 enfermedades que afectan a las abejas *Apis mellifera*, pero menos de 10 son de verdadera importancia. En México, Centroamérica y Panamá, el apicultor debe mantenerse en constante lucha contra nueve enfermedades que causan grandes daños económicos año tras año. Estas enfermedades en orden de importancia son: varroasis, loque americana, acariosis, loque europea, nosemiasis, cría de cal, cría de piedra, parálisis y cría ensacada. 64, 65

De las enfermedades anteriormente enlistadas, la cría de cal y la cría de piedra son causadas por los hongos *Ascospaera apis* y *Aspergillus spp.*, respectivamente. 64

La cría de cal no causa daños al ser humano, se limita a afectar únicamente a la cría de abejas y por lo mismo disminuye el desarrollo de las colonias, pudiendo llegar a reducir o suprimir la recolección de néctar.<sup>62</sup> Aunque la mortalidad de las crías generalmente es baja, en ocasiones puede llegar a rebasar el 30%, un nivel de infección detrimental para la productividad de las colonias. 65

La cría de piedra es causada por dos principales especies de *Aspergillus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus*, los cuales se diagnostican

con menos frecuencia que *Ascosphaera apis*.<sup>63</sup> *Aspergillus fumigatus* infecta tanto a la cría como a las abejas adultas,<sup>9, 54</sup> *Aspergillus flavus* puede además infectar al hombre, causándole serias inflamaciones en las mucosas del tracto respiratorios.<sup>62</sup> La cría de piedra ha sido reportada en Europa, Norteamérica, Venezuela y Brasil, pero se sugiere que existe en todo el mundo dado lo común que es encontrar hongos del género *Aspergillus spp.* en cualquier país.<sup>63</sup> Debido a las diferencias en patogenicidad que existen entre la cría de cal y la de piedra, tanto para las abejas como para el hombre, el diagnóstico diferencial es importante. Sin embargo, este se dificulta a nivel de campo, especialmente cuando el agente causal de la cría de cal (*Ascosphaera apis*), se encuentra en su etapa reproductiva, debido a que el color que confiere a las crías infectadas es parecido al que confieren los hongos *Aspergillus spp.* Bajo estas circunstancias, el diagnóstico de laboratorio resulta esencial.<sup>80</sup>

## **OBJETIVO**

El objetivo del presente trabajo fue seleccionar la información más actualizada sobre las enfermedades fungales de las abejas melíferas, para organizarla, con el propósito de presentarla de una manera sistemática para que el apicultor y el Médico Veterinario Zootecnista puedan apoyarse, tanto para diagnosticar correctamente estas enfermedades fungales, como para aplicar medidas de prevención y control.

## **PROCEDIMIENTO**

La información presentada en este trabajo, fue obtenida, analizada y ordenada a partir de consultar literatura especializada y actualizada en libros y revistas científicas.

La tesis cubre los siguientes puntos:



Descripción de las principales enfermedades fungales de las abejas melíferas (y cría de piedra).

## 1. Ascosferosis

### 1.1 Definición

### 1.2 Sinonimias

### 1.3 Historia

1.4 Agente etiológico, (clasificación, morfología, reproducción, cultivo *in vitro*, pruebas de identificación)

1.5 Apizootiología (distribución mundial, factores predisponentes, formas de transmisión)

### 1.6 Patogenia

### 1.7 Cuadro clínico

### 1.8 Diagnóstico

### 1.9 Tratamiento

1.10 Medidas de control y formas de prevención.

## 2. Aspergilosis

### 2.1 Definición

### 2.2 Sinonimias

### 2.3 Historia

2.4 Agente etiológico, (clasificación, morfología, reproducción, cultivo *in vitro*, pruebas de identificación)

2.5 Apizootiología (distribución mundial, factores predisponentes, formas de transmisión)

### 2.6 Patogenia

### 2.7 Cuadro clínico

### 2.8 Diagnóstico

### 2.9 Tratamiento

2.10 Medidas de control y formas de prevención.

## 3. Otras enfermedades fungales de las abejas melíferas

### 4. Levaduras

## PRINCIPALES ENFERMEDADES FUNGALES DE LAS ABEJAS MELIFERAS

### 1 ASCOSFEROSIS

#### 1.1 DEFINICION

Enfermedad infectocontagiosa causada por el hongo *Ascosphaera apis*, el cual afecta a la cría de las tres castas de abejas melíferas, especialmente a la de zángano. Además, afecta algunas especies de abejas solitarias como las del género *Megachile*. Esta enfermedad se presenta con más frecuencia durante las lluvias y época de frío; el principal signo es la formación de momias con aspecto de gis.<sup>64</sup>

#### 1.2 SINONIMIAS

Nombres comunes: cría de cal, enfermedad de tiza, cría de yeso, cría yesificada, cría encalada, cría calcificada, cría de gis, cría calcárea, 21, 55, 65, 68

#### 1.3 HISTORIA

En 1913, Maassen publicó en Alemania el primer estudio sobre la enfermedad de cría de cal y en 1916 nombró al agente etiológico *Pericystis apis*.<sup>65</sup> Betts en 1919, examinó el hongo de la cría de cal y notó que este no era igual a *Pericystis alvei*, que había aislado de una colmena en 1912.<sup>17</sup> Por otra parte, Moreover et al. demostraron que existen dos diferentes tipos de *Pericystis apis*, con base en el tamaño de sus cuerpos fructíferos.<sup>65</sup> La forma del fruto grande fue descrita y nombrada por Maurizio en 1934 y en 1935 como *Pericystis apis*, variedad mayor.<sup>64</sup> Prokschl en 1953, designó el nombre de *Pericystis apis* para el hongo del fruto pequeño.<sup>64</sup> Spiltoir y Oliver, reclasificaron el hongo en 1955, dándole el nombre de *Ascosphaera apis*.<sup>64</sup> Skou,<sup>72</sup> comparó cultivos de diferentes *Ascosphaeraceae* y designó a la *Ascaphaeraceae* como la única

familia en Ascophaerales bajo la serie *Plectomycetes* en la clase *Ascomycetes*. El le asignó el nombre de *Ascophaera apis* al tipo del fruto pequeño y, a la variedad mayor, el de *Ascophaera mayor*, mientras que nombró *Ascophaera proliperda* a la nueva especie de *Ascophaera* encontrada en asociación con la abeja solitaria *Megachile centuncularis* L. El mismo autor nombró *Bettsia alvei* (antes *Pericystis alvei*), al hongo saprófito del polen, el cual es el único miembro de otro género dentro de los *Ascophaeraceae*. Stejskal,<sup>74</sup> describe el *Arrhenosphaera cranei* como un nuevo miembro de los *Ascophaeraceae*. Este organismo causa cria de cal en abejas melíferas en Venezuela.

#### 1.4 AGENTE ETIOLOGICO

Existen diversas variedades de *Ascophaera apis*, cada una de ellas específica para una determinada especie de abeja.<sup>9</sup>

##### 1.4.1 CLASIFICACION.<sup>65</sup>

REINO	<i>Fungi</i>
SUBREINO	<i>Septomycetes</i> (fungi superior)
SUPERDIVISION	<i>Ascomycotera</i> (con ascosporas; septo central, cerca del 50% de hongos son ascomicetos)
DIVISION	<i>Euascomycota</i> (ascas en ascocarpos)
CLASE	<i>Plectomycetes</i> (ascocarpo globoso y cerrado: Cleistotecio)

ORDEN	<i>Ascosphaerales</i> (ascogonio se torna en quiste esporico, membranoso, bicapilar que rodea hifas ascógenas y ascosporas).
FAMILIA	<i>Ascosphaeraceae</i> (única), cinco especies.
ESPECIES	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. <i>Ascosphaera apis</i> (Sin: <i>Percystis apis</i> var. menor)</li> <li>b. <i>A. major</i> (Sin: <i>Pericystis apis</i> var. mayor)</li> <li>c. <i>A. proliperda</i> (Asociada con <i>Megachile centuncularis</i> L.)</li> <li>d. <i>Bettsia alvei</i> (Causante del "Moho del polen").</li> <li>e. <i>Arrhenosphaera cranei</i> (Causa cría calcárea en Venezuela)</li> </ul>

#### 1.4.2 MORFOLOGIA

Existen dos variedades de *Ascosphaera apis* que no pueden reproducirse entre sí, la variedad mayor y la variedad menor.

**La variedad menor:** Esta variedad posee esporas que miden 1 a 2  $\mu$  de diámetro, con pared espesa. Las esporas tienen forma de riñón o son elípticas y muy pegajosas; forman agregados esféricos (bolas de esporas), que miden en promedio 16  $\mu$ ; estas pelotitas a su vez se encuentran englobadas en un quiste de color verde-castaño oscuro ("cuerpos fructíferos"). Los quistes en la variedad menor miden 46-88  $\mu$  de diámetro

(promedio 60  $\mu$ ).<sup>78</sup> Al examen microscópico, el cultivo muestra hifas blancas que en el caso de *Ascosphaera apis* son largas con ramificaciones sucesivas y con un diámetro de 2.5 a 6  $\mu$ .<sup>9,65,79</sup> *Ascosphaera apis* presenta papilas diseminadas que son visibles con el microscopio electrónico<sup>43</sup> (ver apéndice 7.6).

**La variedad mayor:** Esta presenta esporas de 2 a 3  $\mu$  de diámetro. Los cuerpos fructíferos miden 140  $\mu$  de diámetro y son muy resistentes, manteniéndose infectivos hasta por 15 años.<sup>65</sup> En el caso de *Ascosphaera major* las hifas son blancas o grises.<sup>9,65,79</sup>

La variedad *Ascosphaera major*, se encuentra comúnmente en casos secundarios, particularmente en larvas muertas por loque europea y se sugiere que es un agente saprófito que actúa como invasor secundario de las larvas moribundas. Presenta cuerpos fructíferos lisos de 130 a 140  $\mu$  de diámetro.<sup>43</sup> Skou,<sup>72</sup> nombró al hongo *Ascosphaera major* y lo consideró como el agente causal de la cría encalada al igual que *Ascosphaera apis*, aunque lo aisló de la abeja cortadora de hojas, *Megachile centuncularis*. Esta variedad de hongo prefiere temperaturas bajas, especialmente durante la formación de cuerpos fructíferos.<sup>64</sup>

**El hongo del polen:** Llamado *Bettsia alvei*,<sup>9,16</sup> es un hongo bastante similar a *Ascosphaera apis*, pero sus quistes de esporas tienen solo 20  $\mu$  de diámetro y no forman agregados de pelotas de esporas. Crece alrededor de los 18°C y queda limitado al polen almacenado en los panales. La apariencia macroscópica del cultivo muestra un color blanco puro y su textura es como de algodón. El cultivo forma un contorno circular.<sup>79</sup>

### 1.4.3 REPRODUCCION

Según Oliver y Spiltoir *Ascophera apis* es un organismo heterotálico que se reproduce únicamente cuando los hifas (micelios) de sexos opuestos (designados + y -), entran en contacto entre sí, creando una línea negra en el sitio de contacto, donde los cuerpos fructíferos se desarrollan y dan lugar a la formación de esporas de color oscuro, siendo esta la forma contaminante del hongo; los micelios o hifas de color blanco son su forma de crecimiento.<sup>64</sup> *Ascosphaera apis* y *Ascosphaera major* son capaces de causar la enfermedad de cría de cal, pero no son capaces de aparearse una con otra.<sup>64, 79</sup>

### 1.4.4 CULTIVO IN VITRO Y PRUEBAS DE IDENTIFICACION

*Ascosphaera apis* puede cultivarse en Agar dextrosa-papa con 0.4% de extracto de levadura. También crece en cultivos que contienen 1% de extracto de levadura, 2.0% de glucosa, 20% de agar y sales de hidrócloruro en diferentes concentraciones.<sup>63</sup> En agar malta (0.5 a 2% de malta), el hongo desarrolla órganos de fructificación.<sup>20</sup> Se ha descubierto que *Ascosphaera apis* precisa fuentes complejas de nitrógeno y crece mejor en medios con 0.1% de asparragina y 0.5% de extracto de levadura con pH casi neutro, aunque inferior a un pH de 7.2.<sup>9</sup> Algunos inóculos de esporas muy pequeños no germinan bien sobre los medios mencionados anteriormente, aunque crecen perfectamente en agar semisólido con un medio de levadura-glucosa-fosfato, como el descrito para el cultivo de *Streptococcus pluton*, incubado a 35°C.<sup>9</sup> La hifa no crece por debajo de 15 mm en el medio, a menos que sea incubado a temperaturas menores de 35°C, lo que permite que el oxígeno penetre a mayor profundidad. Esto es similar a lo que sucede naturalmente. La hifa es incapaz de crecer con vigor suficiente para atravesar los tejidos en el contenido intestinal casi anaerobio, a menos que las larvas hayan muerto. No obstante, por lo general germinan bajo condiciones aerobias a 25°C y

37°C.<sup>9,64</sup> *Ascosphaera apis* crece bien en agar levadura de cerveza. En general el medio de cultivo más utilizado es el Agar-dextrosa de Saboureaud sin ciclohexamida para identificar estructuras, la ciclohexamida se sustituye con 0.1 mg/ml de gentamicina.<sup>20,65,79,82</sup>

La temperatura óptima para la formación de quistes en *Ascosphaera major* es de 20 °C y para la variedad del fruto pequeño es de 30° C.<sup>65</sup>

Después de obtener el cultivo se procede a su identificación (ver apéndice 7.6).

## 1.5 EPIZOOTIOLOGIA

### 1.5.1 DISTRIBUCION MUNDIAL DE LA ENFERMEDAD

La cría de cal ha sido reportada en todos los países europeos incluyendo las islas británicas, Nueva Zelanda,<sup>65</sup> y Alemania.<sup>11</sup> Baker y Torchio<sup>10</sup> reportaron las primeras incidencias de *Ascosphaera apis* en los Estados Unidos, Rossi y Carranza, reportaron por primera vez cría de cal en Argentina,<sup>65</sup> Gochnauer et al.,<sup>42</sup> reportaron la primera incidencia de cría de cal en Canadá, en la Columbia Británica.

Barker, et al. revisaron 5,374 colonias en cinco provincias de Canadá, hallando que el 32% de estas colonias tenían mias en los panales. Sin embargo, el 75% de las colonias infectadas tuvieron menos de 10 celdas con cría de cal, por lo que es probable que esta enfermedad haya estado presente sin reportarse desde hace varios años en Canadá y Estados Unidos.<sup>64</sup>

En los países Centroamericanos y en México fue encontrada durante un estudio epizootiológico llevado a cabo por el OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria) entre 1987 y 1989. Sin

embargo reportes anecdóticos de apicultores y profesionales ya habían detectado la ascosferosis en la región muchos años antes.<sup>46</sup>

La cría de cal se consideraba una enfermedad poco importante, pero durante los últimos 15 años se ha convertido en un problema de cierta relevancia económica para la apicultura, pues se ha vuelto bastante común de acuerdo a comentarios de apicultores e investigadores. La mortalidad de las crías generalmente es baja, pero hay ocasiones en que llega a sobrepasar el 30%, lo cual se considera grave.<sup>65</sup> La enfermedad suele ser recurrente durante las lluvias y épocas de frío, con la mayor incidencia en verano e invierno.<sup>20</sup>

## 1.6.2 FACTORES PREDISPONENTES

La susceptibilidad en las colonias varía notoriamente. El hongo puede sobrevivir en las larvas sin causar signos aparentes, hasta que se presentan factores predisponentes.<sup>40</sup> Varios factores parecen contribuir a la presentación de la enfermedad.<sup>65</sup> Los factores predisponentes son los siguientes:

### a. Humedad

Dallmann,<sup>30</sup> encontró que la cría de cal ocurre particularmente durante los veranos lluviosos en apiarios que están localizados en lugares húmedos y fríos. Gochnauer,<sup>41</sup> estableció que las infecciones por hongos aparecen en colonias de abejas con excesiva humedad en la colmena y a las que se les proporciona alimento acuoso. La miel altamente hidratada crea humedad y provee un ambiente adecuado que permite el desarrollo de la cría de cal.<sup>27</sup>



### **b. Mala ventilación**

Las colonias mal ventiladas y débiles favorecen la presencia de humedad, proporcionando un medio adecuado para el desarrollo de las esporas de *Ascosphaera apis*.<sup>64,65</sup>

### **c. Temperaturas bajas**

Las bajas temperaturas facilitan la difusión de oxígeno en el intestino de las larvas, condición necesaria para el desarrollo del hongo. Se considera enfriamiento, cuando la temperatura del nido de cría baja de 35°C a 30°C o menos. La temperatura ideal para el desarrollo del hongo y la consecuente formación de cuerpos fructíferos es de 30°C en el nido de cría. A estas temperaturas las larvas son más susceptibles a desarrollar la enfermedad.<sup>64</sup> La cría de cal es evidente durante las épocas en que las colonias inician un crecimiento rápido, debido a que la baja población de abejas adultas impide incubar correctamente a las crías.<sup>9,64,65,73</sup> Las larvas de zánganos son más susceptibles a desarrollar la enfermedad por el "factor de enfriamiento", debido a que estas se localizan generalmente en la periferia de los panales. Por esta razón, se creyó equivocadamente que el hongo solo afectaba a las larvas de zánganos.<sup>9</sup> El efecto de las bajas temperaturas en el desarrollo de la enfermedad fue demostrado por Puerta et al.<sup>69</sup> quienes alimentaron larvas de una colonia de abejas melíferas con altas dosis de esporas de *Ascosphaera apis*. El inóculo de  $5 \times 10^5$  esporas/larva no indujo cría de cal, ni las esporas estuvieron presentes en el tracto digestivo antes de la etapa de pupa en colonias con temperaturas normales en su nido de cría. En un segundo experimento, las larvas alimentadas con la misma cantidad de esporas recibieron como estrés, temperaturas de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 h. Cuando el frío fue aplicado 24 h antes o después de la operculación, ocurrió momificación en el 59.6 y 65.5 % de las larvas, respectivamente. Esto confirma que para el desarrollo de esta enfermedad, las condiciones predisponentes como las

bajas temperaturas, son necesarias en un periodo determinado del desarrollo de la cría.

#### **d. Colonias débiles**

La cría de cal se presenta en colonias que primero son debilitadas por otros factores. Una baja población de abejas trae como consecuencia incapacidad para mantener la temperatura del nido de cría por arriba de los 30°C. Deans halló casos serios de cría de cal en colonias donde era común encontrar muy pocas abejas pecoreadoras debido a una infestación de ácaros. <sup>64</sup> Hichcock y Christensen<sup>50</sup> encontraron cría de cal en una colonia severamente debilitada por loque americana.

Cuando las abejas son debilitadas por otras causas, disminuye la conducta higiénica y las abejas no limpian las celdas del panal para mantener la enfermedad controlada o para erradicarla. Maurizio, encontró casos secundarios de esta enfermedad en colmenas afectadas con loque europea.<sup>65</sup> Wille,<sup>81</sup> notó que esta enfermedad puede aparecer conjuntamente con la enfermedad de nosema, septicemia bacteriana y riketsiosis, además de una posible relación entre la enfermedad de la cría ensacada y la cría de cal. Esta enfermedad se presenta en apiarios donde factores secundarios tales como un manejo deficiente u otra enfermedad han ocurrido.<sup>64, 65</sup> El estres también influye. Gilliam,<sup>40</sup> reportó esta enfermedad en colonias excesivamente manejadas por el apicultor.

En 1983 Shimanuki et al.,<sup>71</sup> en un estudio de loque europea notaron que la cría de cal incrementó su nivel hasta considerarse un problema serio, mientras los casos de loque europea disminuyeron hasta un punto donde fue difícil encontrarla. Durante el periodo de 1980-1990, ellos reportaron que el número de muestras de loque europea declinó en un 60%, mientras que el número de muestras de cría de cal recibidas para su diagnóstico

aumentaron. Cabe mencionar que la cría de cal es fácilmente identificada en campo y los apicultores no acostumbran someterla a pruebas de identificación en laboratorio. Shimanuki<sup>71</sup> et al. mencionan cuatro posibles razones por las que se presentó este caso:

1. La incidencia natural de loque europea declinó independientemente del incremento de la cría de cal.
2. Los apicultores trataron loque europea con oxitetraciclina, lo que no controla cría de cal.
3. La loque europea predispone a las larvas de abejas melíferas a sufrir cría de cal.
4. *Ascosphaera apis* produce una sustancia que inhibe el crecimiento de *Melisococcus pluton* y *Bacillus larvae*, agentes causales de las loques,<sup>71</sup>

Foldlauer et al.<sup>35</sup> aislaron e identificaron un agente antimicrobiano obtenido de hifas y esporas de *Ascosphaera apis* en 1993. Este agente bactericida inhibió el desarrollo de *Bacillus larvae*. El componente activo del agente es el 9-12-ácido-octadecadienóico (ácido linoléico).

#### **e. Abuso de antibióticos**

Los antibióticos destruyen la flora microbiana normal del tracto digestivo en larvas, por ello la administración de antibióticos al jarabe favorece el desarrollo del hongo.<sup>64 65</sup> Giauffet et al.,<sup>39</sup> atribuyen la diseminación de las enfermedades por hongos en abejas al uso de antibióticos que afectan el equilibrio de la flora intestinal de las abejas y por lo tanto permiten a los hongos reproducirse.

### f. Factores genéticos

Las razas de abejas con excesiva tendencia a la enjambrazón son más susceptibles a cría de cal, ya que la salida de las abejas deja una cámara de cría demasiado grande para las abejas que permanecen en ella las cuales no pueden mantener una temperatura adecuada en el nido de cría.<sup>64</sup> También Guillian encontró que las abejas poco higiénicas son más susceptibles.<sup>40</sup>

### g. Presencia de vectores

Se ha sugerido que otros insectos tales como abejas solitarias o silvestres son un factor en la diseminación de esta enfermedad. Bailey,<sup>7</sup> encontró el hongo *Ascospaera apis* en pupas muertas de abejas cortadoras de hojas.

Baker y Torchio<sup>10</sup> reportaron que *Ascospaera apis* estaba asociado a las heces de dos especies de abejas cortadoras de hojas, *Megachile inermis* y *Anthophora pacifica* las cuales hacen nidos en el suelo; las celdas de ambas especies de abejas contenían prepupas vivientes no infectadas. El hongo fue también aislado de las heces de otras abejas, *Anthophora peritomae* y *Megachile rotundata*.<sup>63</sup>

Batra et al.,<sup>12</sup> también encontraron que *Ascospaera apis* está asociado con *Anthophora pacifica*, y con la abeja alcalina *Nomia melanderi*. Ellos notaron la importancia del reservorio del hongo en los nidos de abejas silvestres y de varias especies que intercambian el inóculo de las flores; se aisló el hongo de los buches melarios de estas abejas.

### **h. Equipo y material contaminado**

La cera y panales viejos son un foco potencial de infección, ya que constituyen un reservorio importante de esporas debido a que estas quedan viables por un largo tiempo (más de 15 años) y se asegura que las esporas no se destruyen en su totalidad cuando la cera es fundida a 63°C.<sup>65, 79</sup>

### **i. Escasez y calidad del alimento**

Lunder en 1972, atribuyó la frecuencia de cría de cal a condiciones pobres de floración por largos periodos. Las esporas germinan más fácilmente cuando las abejas están bajo estrés por una escasez de alimento, o cuando la calidad y cantidad del polen son deficientes.<sup>64, 79</sup>

#### **1.5.3 FORMA DE TRANSMISION**

De Jong y Morse<sup>31</sup> encontraron *Ascosphaera apis* en el buche de miel de abejas obreras adultas y sugirieron que las esporas pasaron de abeja en abeja en el intercambio de alimento debido al comportamiento de trofalaxia (paso de alimento de boca a boca). Estos autores sugieren que también las reinas pueden transmitir la enfermedad. Se estableció que las esporas del hongo se mantuvieron latentes tanto en abejas como en la miel.<sup>64</sup> Los resultados de algunos estudios indican que la enfermedad también puede ser transmitida por el polen de las flores contaminado con heces de abejas (sobre todo de abejas silvestres que funcionan como vectores),<sup>25, 82</sup> La transmisión de cría de cal además puede presentarse entre abejas de varias especies en el campo. Los resultados de Koenig et al.,<sup>59</sup> muestran que las abejas melíferas pueden llevar el hongo de *Ascosphaera apis* en sus cuerpos cuando salen de la colmena a las flores y éste puede ser depositado en agua y otras superficies.

En 1986 Koenig,<sup>59</sup> reportó los primeros resultados que demuestran por cultivo directo que en la superficie de las flores hay contaminación de

*Ascosphaera apis*. Stejskal,<sup>74</sup> reportó que las larvas de abeja pueden infectarse con *Arrhenosphaera cranei* cuando el néctar contiene esporas o por medio de obreras que limpian los panales infectados. Además de lo anterior, se ha aislado *Ascosphaera apis* de una fuente de agua cercana al apiario y sugieren que este también puede ser considerado un medio de transmisión.<sup>59,64</sup> El pillaje y deriva también son factores de gran importancia en la transmisión de la enfermedad.<sup>9</sup>

Puede ocurrir que el apicultor transfiera las esporas al intercambiar panales, herramientas y colmenas contaminadas que son un foco potencial de infección, especialmente los panales viejos, debido a que se consideran un reservorio importante de esporas.<sup>64,65</sup> Sin embargo la larva adquiere la enfermedad cuando consume el alimento contaminado con esporas en presencia de los factores predisponentes.<sup>9</sup>

La larva de abeja melífera es más susceptible a la cría de cal si ingiere las esporas de *Ascosphaera apis* cuando tiene tres a cuatro días de edad, debido a que la hifa al crecer será privada de oxígeno por un tiempo y el hongo crece mejor en ambientes con poco oxígeno.<sup>9,64,65</sup>

## 1.6 PATOGENIA

La infección natural ocurre en dos formas, por ingestión de esporas en el alimento o por adherencias de las esporas en la superficie del cuerpo de las larvas.

Las esporas de *Ascosphaera apis* contenidas en el alimento son ingeridas por las larvas. Dentro de ellas, germinan las esporas y se inicia el crecimiento de las hifas.<sup>64</sup> En estudios histológicos de larvas de *Apis mellifera* se observaron esporas germinadas afectando las células epiteliales del lumen del ventrículo y luz del intestino, particularmente

en su extremo posterior. Las hifas desarrolladas no colonizan mucho el intestino, crecen directamente a través de la membrana invadiendo el hemocele (cavidad del cuerpo que contiene la hemolinfa). Esto ocurre después de 48 h. de haber sido inoculadas las larvas, mientras que a las 72 h. se observan las primeras hifas penetrando al tegumento, generalmente en la superficie del extremo posterior de la larva. Posteriormente, crecen aéreamente, frecuentemente sin dañar la cabeza.<sup>6</sup>

En estudios experimentales realizados por Alonso *et al.*,<sup>5</sup> las larvas de abejas melíferas fueron infectadas con esporas de *Ascosphaera apis*. Cuando los micelios crecieron, se aislaron las momias de 47 casos para analizar las enzimas. La N-acetil-B-glucosaminidasa se presentó en el 74.4% de los aislamientos; esta enzima se descompone en N-acetilglucosamina, la molécula básica del polímero. Parece ser que esta molécula contribuye a que la hifa penetre la cutícula del insecto, en adición a la presión ejercida por la hifa desde el interior del cuerpo de la larva.

Las larvas infectadas mueren invariablemente. La hifa continúa su crecimiento aéreo y esporula dentro de la siguiente semana post-inoculación, los cuerpos fructíferos invaden los músculos y causan degeneración del tejido de la pupa y abeja adulta.<sup>64</sup> Se sugiere que el vuelo anormal de las abejas adultas es causado por la invasión de *Ascosphaera apis* al tejido muscular.<sup>6, 9, 40, 64</sup>

La otra forma de infección se presenta cuando las esporas presentes en las celdillas se adhieren a la superficie de las larvas y posteriormente con la influencia de los factores predisponentes, las hifas del hongo empiezan a crecer a partir de las esporas que están en la piel de las larvas. Las hifas atraviesan las paredes y los tejidos corporales de la

cria, hasta envolverla completamente como si fueran raíces en desarrollo, dándole un aspecto de momia. La cría puede morir en una celdilla abierta o recién operculada. Después de morir se seca y endurece, adquiriendo la consistencia y color de un pedazo de yeso. En esta última etapa una sola larva momificada puede contener 1000 millones de esporas.<sup>64, 79</sup>

### 1.7 CUADRO CLINICO

Pueden diferenciarse varios estadios en la evolución de la enfermedad. En un primer momento se observan las larvas muertas cubiertas por una capa blanca de aspecto afelpado, después, las larvas se hinchan hasta llenar totalmente la celda, aún cubiertas con un crecimiento veloso de hifas que le dan un aspecto blanquecino, algodonoso, tumefacto y con la forma hexagonal de la celdilla. Luego al secarse las larvas muertas se encogen y endurecen, dando una apariencia de trozos de gis blanco para las cuales se aplica el nombre de crías "momificadas". Las crías momificadas se pueden observar en celdillas abiertas o recién operculadas, en el piso de la colmena y en el suelo frente a la piquera de las colonias enfermas, debido a que las obreras limpiadoras las sacan de los panales.<sup>9, 64, 65, 79</sup> La mayoría de las larvas mueren en el último estadio larval.<sup>70</sup> Cuando los hongos están reproduciéndose las crías se observan duras y presentan un color verde oscuro, gris oscuro o negro debido a la presencia de esporas.<sup>64</sup>

Las larvas de los zánganos suelen ser más afectadas que las larvas de las obreras, pero es común encontrar panales en los que únicamente aparecen afectadas las larvas de las obreras.<sup>9</sup> Muchas de las celdas en colonias fuertemente infectadas pueden permanecer selladas y las momias desprendidas golpean las paredes de la celda si el bastidor es agitado.<sup>9, 64, 65</sup>



El polen enmohecido con *Bettsia alvei* puede confundirse con la cria encalada, aunque este enmohecimiento suele presentarse al inicio de la primavera y las masas que son las cargas originales de polen se descomponen fácilmente en fragmentos.<sup>9</sup>

## **1.8 DIAGNOSTICO**

### **1.8.1 DIAGNOSTICO DE CAMPO**

El diagnóstico presuntivo se puede realizar con base al cuadro clínico. La presencia de larvas con aspecto de gris blanquecino o verde oscuro en celdillas operculadas o abiertas y en el suelo frente a la piquera así como el sonido que se escucha al sacudir el bastidor el cual es causado por las larvas muertas que no están adheridas a la pared pueden sugerir la presencia de ascosferosis.<sup>65</sup>

### **1.8.2 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO**

El laboratorio de micología puede ser de gran utilidad, debido a que con el manejo de técnicas sencillas es posible establecer un diagnóstico confiable y práctico. El método más sencillo de hacerlo es a través de un frotis húmedo que muestre los quistes y las esporas. Se requiere un examen microscópico de los órganos de fructificación formados sobre las momias<sup>28</sup> (Ver apéndices 7.2, 7.3, 7.4, 7.5 y 7.6).

## **1.9 TRATAMIENTO**

Generalmente las pérdidas causadas por la cria de cal no se consideraban serias como para justificar la inversión de un tratamiento, puesto que las abejas adultas generalmente extraen las pocas crías muertas de la colmena.<sup>7</sup> Sin embargo, en algunos casos, los niveles de infección son tan altos que justifican un tratamiento.

El equipo apícola puede desinfectarse con humo de azufre o formalina al 40%, durante tres semanas.<sup>43</sup> La fumigación con óxido de etileno mata a *Ascosphaera apis* en colmenas infectadas.<sup>39</sup>

Se han realizado experimentos sobre algunos químicos para el control de la cría de cal. El timol al 0.7% previene el crecimiento de *Ascosphaera apis* en los cultivos, por lo que se han ensayado fumigaciones con este producto en los panales, mostrando buenos resultados.<sup>64, 65</sup> Cuando la solución de timol se esparció en colmenas infectadas y en el interior de la cámara de cría, la enfermedad desapareció. Sin embargo, las abejas pueden rechazar el jarabe con 0.7% de timol. En otro experimento se descubrió que la solución de timol al 2% tenía un efecto fungioestático en 20 minutos contra *Ascosphaera apis in vitro*.<sup>70</sup>

Dallmann,<sup>30</sup> probó el desinfectante "Fesia-Form" (formaldehído 4%) en colonias de abejas infectadas con cría de cal. Esparció la solución en la cría enferma, bastidores y parte interna de la colmena; una semana después, las abejas adultas de las colonias severamente infectadas habían removido las momias y no fue observada reinfección durante el año. Barthell,<sup>11</sup> realizó estudios *in vitro* sobre la actividad del fungicida en contra de *Ascosphaera apis* y reportó que "Fesia-Form" al 4% mata las esporas después de 30 minutos.

Glauffret y Taliercio,<sup>38</sup> reportaron que la anfotericina B fue el agente más efectivo contra *Ascosphaera apis*, no obstante esta no se mantiene estable, es cara y manifestó tener gran toxicidad para las abejas. Los antisépticos probados fueron más estables, pero muy tóxicos para las abejas. Por ejemplo, el etil-trimetil amonio fue tóxico a niveles de aproximadamente 0.5 g por colmena.<sup>64, 65</sup>

Thomas y Luce,<sup>77</sup> reportaron que el ácido sórbico y el metil-para-hidroxibenzoato inhibe *Ascosphaera apis* en cultivo.

Durante los últimos años se ha probado el uso de nistatina (Micostatin) y tiabendazol (Thiabendazole), a razón de 2 g del producto comercial por tratamiento y por colmena, aplicandose de tres a cuatro tratamientos por colmena, con intervalos de ocho a 14 días entre uno y otro. También el enilconazole es un antimicótico 100% activo contra *Ascosphaera apis* en concentraciones tan bajas como 0.1 mg/ml. Estos tratamientos se proporcionan en jarabe o en pasta.<sup>64, 65</sup>

La actividad antifungal de algunos derivados imidazólicos (miconazole, econazole, ketoconazole, isoconazole, bifonazole y thioconazole) y anfotericina B fueron evaluados *in vitro*. Estos estudios revelan que casi todos los derivados imidazólicos poseen una apreciable propiedad antifungal contra los hongos. El isoconazole y bifonazole fueron las sustancias más activas.<sup>48</sup>

Para las fumigaciones de los panales se han utilizado productos que han dado buenos resultado como el timol al 0.7%, el paradiclorobenceno, el cuaternario de amonio y el propionato de sodio.<sup>40, 64, 65</sup>

En el año de 1985 Herbert Jr.,<sup>48</sup> publicó un artículo detallado con los efectos de tres alquil-aminas contra *Ascosphaera apis*. El estudio se realizó en abejas melíferas localizadas en el sur de New Jersey, E.U.A. Las tres sustancias analizadas fueron las siguientes: N-N-dimetil-3, 7, 11-trimetildodecanamina (IPL-7); N-N-dimetildodecanamina (IPL-12) y el N-etildodecanamina (IPL-13), de las cuales el IPL-12 ofreció el mejor tratamiento de control durante el estudio de campo. Para cada componente, la concentración mínima que inhibió el crecimiento de *Ascosphaera apis in*

*vitro* fue aproximadamente de 1 mg/ml. De los tres componentes el IPL-7 fue el inhibidor de crecimiento más potente, disminuyendo hasta el 50% de crecimiento de *Ascosphaera apis*, a una concentración de 5 mg/ml. Las dosis del IPL-12 y el IPL-13 fueron 10 mg/ml y 15 mg/ml respectivamente.

En el año de 1986 Herbert, *et al.*,<sup>49</sup> reportaron los resultados de un segundo estudio para el componente IPL-12. Este fue preparado disolviendo 350 mg del componente en un frasco de agua caliente y suministrándolo con 3,500 ml de jarabe preparado con sacarosa (50% de sólidos). Las abejas se alimentaron tres veces en un periodo de 60 días. Los resultados mostraron una disminución en el número de momias en las colonias medicadas. Además, se detectó que estas abejas removieron más momias que las abejas alimentadas únicamente con soluciones de sacarosa.<sup>40</sup>

Gochnauer, *et al.*,<sup>41</sup> en infecciones experimentales analizaron varios químicos entre los cuales se encuentran el citral, ácido octanóico, ácido salicílico y el  $\text{Ca(OH)}_2$  o cal

utilizadas como barniz en la superficie interior de cada colmena. El mejor resultado se obtuvo con el tratamiento con  $\text{Ca(OH)}_2$ . El Dr. Gochnauer *et al.*,<sup>41</sup> señalan que el efecto de este tratamiento puede ser debido a las condiciones alcalinas producidas por la cal.

Calderone *et al.*,<sup>25</sup> evaluaron los efectos bactericidas y fungicidas de extractos de plantas en el crecimiento de tres patógenos de abejas melíferas, *Ascosphaera apis*, *Bacillus larvae* y *Bacillus alvei*. El aceite de canela (*Cinnamomum* sp.) inhibe completamente el crecimiento de *Ascosphaera apis* a 100 ppm. El aceite de Pimienta racemosa, aceite de clavo (*Syzygium aromaticum*), aceite de órgano español (*Thymus capitatus*) y el timol inhiben totalmente el crecimiento a 1000 ppm. El alfa-

terpinene inhibe totalmente el crecimiento a 10 000 ppm. Las evaluaciones sugieren que los extractos de plantas puede jugar un papel importante en el tratamiento de las enfermedades de las abejas melíferas debido a que presentan menos riesgos para el consumo de productos apícolas.<sup>25</sup>

Se ha estudiado también el uso de la radiación gama en la industria de la apicultura. La radiación gama es un tipo de radiación electromagnética que puede ser usada como medio de esterilización. El cobalto 60 fuente de la radiación gama es producido por bombardeos de Cobalto 59 con neutrones en un reactor atómico y los rayos gama son el producto resultante. Los efectos destructivos de la radiación en las bacterias es conocido desde hace más de 80 años y hasta la segunda guerra mundial se usó con fines antibacterianos.<sup>52</sup> En 1983 comenzó a usarse como un medio de esterilización en el equipo apícola con bases comerciales. La radiación gama tiene la ventaja de no producir residuos o radioactividad y no tiene efectos en la persona que utiliza el equipo si lo maneja en forma adecuada.<sup>52</sup>

La sensibilidad de *Ascosphaera apis* a la radiación gama no ha sido determinada, no obstante basados en los reportes de la inactivación de las esporas de *Bacillus larvae* en aplicación de 10 - 15 kg. Katznelson y Robb, sugieren que su aplicación destruye los hongos.<sup>52</sup> Por lo tanto *Ascosphaera apis* y *Aspergillus flavus* pueden ser destruidos por este método. Cabe mencionar que el uso de este método en la apicultura de México es inusual debido a los costos que este representa.

En general los controles químicos son limitados contra el hongo de la cría de cal debido a la alta resistencia y a la pared gruesa que presentan las esporas; algunos antifungales resultan tóxicos para las abejas por presentar reacción contra la quitina y el esterol. Además, se

debe diferenciar si el químico es efectivo contra el patógeno o simplemente incrementa el comportamiento higiénico de las abejas.<sup>73</sup> Se requiere mucho más investigación en el área del control químico de la ascosferosis.

### 1.10 PREVENCIÓN Y CONTROL

Las siguientes medidas de control se resumen de la literatura

- a. Colocar las colmenas en bases de alrededor de 30 cm de altura.<sup>64</sup>
- b. Instalar los apiarios en lugares protegidos del viento.<sup>64</sup>
- c. Proporcionar una ventilación adecuada.<sup>73</sup>
- d. Colocar las colmenas inclinadas hacia las piqueras para evitar que el agua entre y se acumule en época de lluvias.<sup>64</sup>
- e. Proteger las colmenas con techos telescópicos laminados.<sup>36</sup>
- f. Reforzar o unir las colmenas débiles, ya que la enfermedad no es problema en colonias fuertes.<sup>64</sup> Se recomienda reforzar las colonias enfermas adicionándole abejas adultas y cría aunado a la alimentación estimulante para excitar el instinto natural de limpieza de las colonias.<sup>20, 73</sup>
- g. Evitar la consanguinidad y mantener un programa de mejoramiento genético y cría de reinas.<sup>64</sup>

Holm, reportó el uso de la genética que determina el comportamiento higiénico de éstas como control de cría de cal. Menciona que las colonias con reinas seleccionadas durante 4 generaciones mostraron 9.1% de cría de cal comparado con 71.4% de existencia original.<sup>40</sup> Este método no ha sido adoptado por los apicultores, pero el comportamiento higiénico de las abejas es la principal medida de control.<sup>64</sup>

El control genético de la cría de cal es prometedor. Algunas colonias tienen una excelente tendencia a quitar y remover las larvas muertas. Las

abejas resistentes remuevan más rápidamente las larvas muertas que las abejas no resistentes. Tal comportamiento es aparentemente controlado por dos genes uno para destapar las celdillas y otro para la remoción de abejas muertas. Ambos genes son efectivos solo cuando se presentan en la obrera como homocigótico recesivo, por ello es posible seleccionar y criar abejas para la resistencia a la cría de cal. Las colonias resistentes muestran más comportamiento higiénico por parte de las abejas nodrizas. La simple adición de obreras jóvenes higiénicas a una colonia de abejas no puede mejorar la resistencia a la cría de cal ya que el disturbio de la introducción reduce el comportamiento higiénico de la colonia. Sin embargo, muchas estrategias de combinación pueden ser usadas para el control de cría de cal, incluyendo la crianza de reinas resistentes seleccionadas; Gilliam et al, en 1983 demostraron que es posible la selección de abejas reinas para la resistencia a la enfermedad por el elevado comportamiento higiénico de las abejas nodrizas y la disminución del tiempo de vida de la espora en la colmena. Además de los suplementos alimenticios que contengan sustancias o microorganismos antagonistas, aunados al buen manejo para reducir el estrés. 4, 5, 64, 73 h. Cambiar a la reina anualmente, para mantener colonias con poblaciones fuertes. 64

i. Cambiar los panales viejos de las colmenas. Además Gochnauer, 43 sugiere proporcionar colmenas en buen estado y exponer al sol las que estén infectadas.

j. Evitar el uso desmedido de antibióticos. 64

k. Quemar las momias. Dreher, recalca la importancia remover y quemar las momias evitando que éstas se acumulen. 64, 73

l. Tomar medidas que disminuyan el pillaje. 65

m. Evitar portar el hongo en el equipo, quemando la cuña en el ahumador y evitar el paso indiscriminado de equipo contaminado a colonias sanas. 64

n. Proveer de jarabes de azúcar y de polen en periodos de escasez.<sup>73</sup>

## 2. CRIA DE PIEDRA

### 2.1 DEFINICION

Enfermedad infectocontagiosa de origen fúngal que afecta a las larvas de tres a cuatro días de edad y a las abejas adultas. Es causada por varios tipos de hongos del género *Aspergillus*. La causa más común es el *Aspergillus flavus* y la menos frecuente, el *Aspergillus fumigatus*.<sup>9,64,65</sup>

### 2.2 SINONIMIAS

Cria de piedra, Cria pétrea, Aspergilosis, Pollo pétreo.<sup>65</sup>

### 2.3 HISTORIA

El *Aspergillus fumigatus* fue descubierto por Fresenius y el *Aspergillus flavus* por Link en el año de 1809.<sup>33,67</sup>

La cria de piedra fue analizada y descrita por Maassen en 1906 en Alemania. Maassen aisló e identificó *Aspergillus flavus* de las abejas muertas y notó que atacaba a larvas y pupas de abejas transformándolas en momias duras.<sup>51, 64</sup>

Vincens,<sup>80</sup> reportó la cria de piedra en Francia. Morgenthaler, describe la cria de piedra causada por *Aspergillus niger* Van Tieghem en 1927.<sup>3</sup>

### 2.4 AGENTE ETIOLOGICO

Los agentes etiológicos son *Aspergillus flavus*, ocasionalmente *Aspergillus fumigatus* y otras especies de *Aspergillus*. Estos hongos infectan a las larvas y abejas adultas, llegando a causarles la muerte.



Los hongos *Aspergillus* son comúnmente hallados en el suelo y en el medio ambiente, son patógenos para algunos insectos y pueden causar trastornos respiratorios e intoxicaciones en el hombre y otros animales, si las esporas son aspiradas o ingeridas cuando el hongo está en periodo de reproducción.<sup>64, 65</sup>

Los tipos de *Aspergillus* que se han relacionado con la muerte de abejas inoculadas experimentalmente son:<sup>63</sup>

*Aspergillus flavus*,

*Aspergillus Oryzae* (Ahlburg) Cohn,

*Aspergillus effusus* Tiraboschi (*Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn  
variedad *effusus* (Tirabosch) Ohara),

*Aspergillus parasiticus* Speare,

*Aspergillus flavus-Oryzae*,

*Aspergillus fumigatus*,

*Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter,

*Aspergillus ochraceus* Wilhelm,

*Aspergillus glaucus*

Sin embargo, de todos los hongos del género *Aspergillus*, el *Aspergillus flavus* ataca más frecuentemente a las abejas que otros; pero *Aspergillus fumigatus* es sumamente patógeno; *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, miembros de el *Aspergillus glaucus* y *Aspergillus ochraceus* atacan abejas en forma natural.<sup>64</sup> Estos hongos producen sustancias venenosas denominadas micotoxinas las cuales se caracterizan por ser altamente tóxicas y carcinogénicas para los animales y el hombre.<sup>54</sup>

### 2.4.1 CLASIFICACION<sup>65</sup>

REINO	Fungi
SUBREINO	Septomycetes (fungi supericr)
SUPERDIVISION	Deuteromycotera
DIVISION	Deuteromycota
CLASE	Hyphomycetes
ORDEN	Moniliales
FAMILIA	Aspergillaceae
ESPECIES	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. <i>Aspergillus flavus</i></li> <li>b. <i>A. fumigatus</i></li> <li>c. <i>A. nidulans</i></li> <li>d. <i>A. niger</i></li> <li>e. <i>A. ochraceus</i></li> <li>f. <i>A. glaucus</i></li> <li>g. Otros <i>Aspergillus</i> spp</li> </ul>

### 2.4.2 MORFOLOGIA

La forma de contagio de *Aspergillus* es a través de esporas. Estas son caracterizadas por ser de color verde-amarillento (*Aspergillus flavus*) y verde-grisáceo (*Aspergillus fumigatus*), con un tamaño inferior a 2  $\mu$  de

diámetro. Ambos tienen un aspecto similar observados al microscopio. Las esporas están arracimadas en unas estructuras conocidas como conidióforos<sup>65</sup> (Ver apéndice 7.7).

### 2.4.3 REPRODUCCION

Al igual que *Ascosphaera apis*, los hongos del género *Aspergillus* se reproducen heterotáticamente.<sup>65, 79</sup>

### 2.4.4 CULTIVO IN VITRO Y PRUEBAS DE IDENTIFICACION

El diagnóstico de las enfermedades causadas por *Aspergillus* requiere de un cuidadoso enfoque por que estos hongos son los contaminantes más comunes en el laboratorio y por lo tanto, únicamente es evidencia presuntiva de Aspergilosis el aislamiento repetido de una especie de *Aspergillus* del material clínico, en ausencia de otros agentes patógenos. Para el examen microscópico directo se utilizan las preparaciones húmedas que bien pueden ser teñidas por el método de Gram o con Azul de Algodón de lactofenol, que permite la observación de la hifas y resalta la variación típica de los conidióforos. La solución de KOH y el cloruro de lactofenol pueden ser usadas para observar las hifas, ya que las aclaran,<sup>76, 56, 79</sup> (Ver. apéndice 7.2, 7.3, 7.4 y 7.5)

Como regla general el *Aspergillus fumigatus* y el *Aspergillus flavus*, así como otras especies de *Aspergillus* crecen bien en el Agar-dextrosa Sabouraud. Los antibióticos pueden ser usados en el medio, pero no debe utilizarse la ciclohexamida, debido a que la mayor parte de los *Aspergillus* son sensibles a este antibiótico.<sup>28</sup>

*Aspergillus flavus*. Se ha comprobado que las colonias de hongos crecen y se desarrollan en medios ordinarios, pero el *Aspergillus flavus* crece con

facilidad en el cultivo agar glucosa sabouraud, agar-extracto de malta (1000 ml de agua, 30 g de extracto de malta y 30g de agar) y agar maltosa sabouraud.<sup>33</sup> El color de las áreas conidiales varía del verde amarillento claro al verde oscuro. La coloración verde puede desaparecer en los cultivos viejos, los cuales muestran un color amarillo a café amarillento en su superficie del cultivo.<sup>9, 20, 75</sup>

En el estudio microscópico, los *Aspergillus* se caracterizan por presentar hifas septadas y conidióforos soportados por vesículas o esterigmata que miden 400 a 1000  $\mu$  de largo y 5 a 10  $\mu$  de diámetro. Las paredes del conidióforo pueden estar excavadas y rugosas. La esterigmata está dispuesta ya sea en una serie simple o en varias series simples o dobles sobre la misma vesícula. Las conidias tienen 3 a 5  $\mu$  de diámetro, piriformes o redondas, excavadas y equinuladas, pueden variar de casi incoloras a verde amarillentas<sup>19, 47, 56, 57</sup> (ver apéndice 7.8).

En los cultivos de *Aspergillus flavus* aparece una toxina soluble en éter, particularmente en aquellos que acaban de llegar a la madurez. El característico color verde-amarillento intenso que presentan la mayoría de los conidios es indicativo de la presencia de la toxina. La toxina es inestable y llega a perder la mayor parte de su potencia en 15 días.<sup>28</sup>

*Aspergillus fumigatus*. El aislamiento del *Aspergillus fumigatus* en agar dextrosa sabouraud o glucosa sabouraud permite observar el crecimiento de las colonias en forma plena. Las colonias se observan blancas y ligeramente vellosas en un inicio, pero conforme se desarrollan, adquieren un color verde azulado, oscuro, con aspecto polvoso. Los cultivos viejos se caracterizan por tener una apariencia "ahumada".<sup>57</sup>

El examen microscópico muestra hifas de 4 a 6  $\mu$  de ancho, septadas y con diámetro regularmente uniforme, aunque no es posible (a menos que una cabeza conidial esté presente) distinguir estas hifas. La presencia de grandes cantidades de hifas es sugestiva de aspergilosis.<sup>56</sup> En este examen también es posible observar una vesícula con forma parecida a la de un matrás invertido con fondo redondeado y cuello alargado. Una fila de esterigmata está situada en la mitad superior de la vesícula, en una formación más o menos paralela; esto da una apariencia columnar o de bandera a las cabezas<sup>18, 47, 56</sup> (ver apéndice 7.8).

*Aspergillus* crece bien a temperatura ambiente pero es mejor incubarlos a 37°C. Solo *Aspergillus fumigatus* crece bien a 42-45°C. La incubación a 37°C da un crecimiento después de 24 h y la característica de *Aspergillus* es que las cabezas pueden formarse después de 48 h post-inoculación.<sup>79</sup>

## 2.5. EPIZOOTIOLOGIA

### 2.5.1 DISTRIBUCION MUNDIAL

Los *Aspergillus* están presentes como saprófitos en la mayoría de los climas y la humedad excesiva favorece su proliferación. Son considerados ubicuos (de distribución mundial).

La cría de piedra ha sido reportada en Europa, Norteamérica, Brasil y Venezuela.<sup>64</sup> McLellan,<sup>62</sup> halló una epidemia de cría de piedra por *Aspergillus flavus* en Escocia. Fue reportada en Europa por Maassen,<sup>61</sup> Zander,<sup>83</sup> Vincens,<sup>80</sup> Dreher,<sup>32</sup> Bailey,<sup>7</sup> Giauffret y Taliercio,<sup>38</sup> y en Norte América por Burnside.<sup>22</sup>

Bahr en 1961, reportó cría de piedra en Dinamarca.<sup>64</sup> Betts<sup>17</sup> propuso la teoría de que la enfermedad pudo haber sido importada de Gran Bretaña, o

del continente Europeo. En Gran Bretaña esta enfermedad es poco comun a pesar de la alta incidencia de los hongos y del clima húmedo, por lo que se sugiere que solo puede presentarse en abejas debilitadas a causa de otros factores.<sup>9</sup>

La presencia de *Aspergillus flavus* fue detectada por primera vez en México en un caso de cria de piedra diagnosticado en un apiario del municipio de Jonacatepec, en el Estado de Morelos en 1992.<sup>76</sup>

El hecho de que la enfermedad es rara siendo los gérmenes comunes en muchas partes, sugiere que los hongos del género *Aspergillus* germinan y causan la enfermedad debido a una mayor dependencia de los factores predisponentes. La enfermedad se presenta con mayor frecuencia en épocas de lluvia y durante el invierno.<sup>65</sup>

En Australia Hornitzky,<sup>51</sup> reportó en 1987, que las pérdidas causadas por esta infección varían del 1 al 5% de las colonias, en las cuales ocurre una reducción de la cosecha del 23% y una reducción en la capacidad de pecoreo del 49%.

La aspergilosis adquiere mayor interés con la presencia de *Varroa jacobsoni* O., por que cuando se establece una estrecha relación entre el ácaro y el hongo, se presenta gran mortalidad en la colonia de abejas.<sup>76</sup>

## 2.6.2 FACTORES PREDISPONENTES

La cria de piedra suele ser transitoria, sin embargo, se torna riesgosa, ya que inóculos muy abundantes pueden matar las colonias.<sup>22</sup> Además, el paso de *Aspergillus flavus* a través de insectos hospedadores aumenta la virulencia del hongo.<sup>9</sup> Las larvas y pupas son las más afectadas, pero la mayoría de las larvas infectadas mueren selladas en la etapa cercana a

pupa.<sup>9</sup> Las abejas adultas tienen particular susceptibilidad en invierno.<sup>33</sup>

Giauffret y Taliercio,<sup>38</sup> publicaron en 1967 un artículo donde indican que la diseminación de la enfermedad fungal está relacionada al uso de antibióticos que alteran el equilibrio de la flora normal de las abejas. Además, la presencia de humedad, la falta de ventilación, el alimento contaminado, el jarabe de azúcar con mucha agua y efectos genéticos, son factores que ayudan al desarrollo de las enfermedades fungales en general. Cury<sup>29</sup>, informó que las larvas y abejas adultas son atacadas cuando el microorganismo es transmitido por el polen o miel contaminada con esporas del hongo al ser ingeridas como alimento. Grigortsovskaya y Grigortsovskaya y Borodai,<sup>45</sup> alimentaron abejas de varias edades con esporas de *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus niger* en el jarabe de azúcar; después de tres o cuatro días, las abejas no podían volar y las abejas jóvenes murieron primero.

El intento de infectar colonias artificialmente no ha tenido éxito, pero se sugiere que las abejas estresadas o anormales sí son susceptibles.<sup>7</sup> Burnside<sup>22</sup> señala que las aflatoxinas producidas por el hongo pueden ser responsables de la enfermedad y concluyó que la patogenicidad del hongo que ataca a las abejas melíferas atravesando la pared intestinal es determinada por la habilidad del hongo y de los micelios de resistir las secreciones intestinales de las abejas.<sup>64</sup>

### 2.6.3 FORMA DE TRANSMISION

Las esporas de los *Aspergillus* son muy ligeras. El movimiento de aire más leve es capaz de desprenderlas de los conidióforos y dispersarlas en la colmena.<sup>20</sup> Además, indudablemente es diseminado por los apicultores al intercambiar bastidores infectados a colonias saludables, Betts<sup>17</sup>

sugiere que la miel de colmenas infectadas también es causa de la enfermedad.

## 2.6. PATOGENIA

Las larvas y abejas adultas son atacadas cuando la espora del hongo es ingerida con el alimento.<sup>22</sup> Después las esporas germinan dentro del canal digestivo y la hifa ataca todos los tejidos blandos. Los tejidos internos son saturados rápidamente con hifas que atraviesan la cutícula cerca del extremo anterior del cuerpo para formar un característico collar o halo blanco-amarillento en la cabeza. El crecimiento continúa sobre la cutícula para formar una falsa piel que en dos o tres días envuelve totalmente a la larva. Los conidióforos con gran cantidad de esporas comienzan a formarse al mismo tiempo donde la hifa queda expuesta al aire y el color de la larva muerta cambia a verde.<sup>64</sup>

Otra forma de invasión, aunque menos frecuente, sucede cuando las esporas germinan en la cutícula de las larvas, especialmente entre el tórax y el abdomen. Algunas veces el hongo penetra en el tejido subcuticular, produciendo hifas aéreas locales y conidióforos. La enfermedad causa una momificación de la cría. Las momias son duras. Tiempo después, las esporas del hongo se producen en tal número, que llenan las celdas de la colmena que contienen las larvas momificadas, dando el aspecto de polen. La enfermedad puede diferenciarse de la cría de cal porque las momias se ponen duras y quebradizas y son más difíciles de sacar que las calcificadas; por eso las abejas las recubren generalmente con propóleo.<sup>9, 20, 61, 74</sup>

Burnside,<sup>22</sup> menciona que la acción patógena del hongo es tanto química como física, debido a que los tejidos son penetrados por la hifa y digeridos por las enzimas producidas por el hongo. Además, demostró que



una sustancia tóxica en un filtrado de *Aspergillus flavus* fue la causa de la muerte en abejas inoculadas con este filtrado.

Los hongos pueden multiplicarse en abejas adultas y experimentar en ellas un desarrollo similar al que se produce en las larvas;<sup>22</sup> sin embargo, la cantidad de hifas formadas en el intestino de los individuos afectados, que no vuelan y aparecen perezosos y separados de los miembros de la colonia de abejas, no parece ser suficiente para explicar estos síntomas iniciales, que son probablemente causados por toxinas liberadas por las hifas.<sup>9</sup>

## 2.7 CUADRO CLINICO

Las larvas infectadas pueden o no estar operculadas, al principio son blancas y esponjosas, posteriormente se vuelven de color castaño pálido gris-verdoso o amarillo-verdoso, con mayor énfasis en la cabeza. La mayoría mueren después de ser operculadas en sus celdillas antes de transformarse en pupa. A diferencia de la cría de cal, las momias se encuentran adheridas al fondo de las celdillas, por lo que las abejas obreras las extraen en pedazos. Los restos que no pueden sacar, los cubren con propóleo. Sin embargo, bajas cantidades de éste no parecen afectar el crecimiento de *Aspergillus niger*. La cría más afectada es la que se encuentra en la periferia del panal, en su mayoría es la de zángano.<sup>9, 65</sup> Por lo antes mencionado es más fácilmente reconocida la infección en larvas que en abejas adultas.

Una vez que mueren, las pupas y larvas infectadas son transformadas en momias duras, parecidas a piedras. En las abejas adultas se puede apreciar una momificación en el tejido del abdomen, similar al de las larvas.<sup>64</sup>

Las abejas adultas usualmente dejan en la colmena algunas crías muertas o restos de ellas por algún tiempo, o sacan parte de ellas destruyendo las paredes de la celda.<sup>22</sup>

Los signos aparentes de la aspergilosis en abejas adultas son: nerviosismo, debilidad, parálisis y el que las abejas no pueden volar o dirigirse, el abdomen generalmente está dilatado, las esporas se forman pronto y abundan mas cerca de la cabeza. Como se menciono anteriormente, el abdomen de las abejas melíferas adultas frecuentemente muestra una momificación similar al de el cuerpo entero de la larva. El hongo forma esporas en las abejas adultas, especialmente entre el tórax y el abdomen.<sup>64</sup>

## **2.8 DIAGNOSTICO**

### **2.8.1 DIAGNOSTICO DE CAMPO**

Se basa en el cuadro clínico, Las momias son oscuras y con consistencia de piedra. Además, al agitar el panal no se distingue ningún sonido debido a que los micelios causan adherencia de las larvas a la pared de las celdillas.<sup>65</sup>

### **2.8.2 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO**

Se requiere que sean enviadas al laboratorio crías y abejas adultas para su estudio.<sup>65</sup>

**Panales de cría:** La muestra se toma de la misma manera que para cría de cal.<sup>65</sup> (Ver apéndice 7.1)

**Abejas adultas:** La muestra debe consistir por lo menos de 30 abejas colectadas en la piquera de las colmenas sospechosas. Las abejas se

envían en un frasco pequeño que contenga alcohol etílico al 70%, es decir aproximadamente tres partes de alcohol de 96° y una parte de agua.<sup>65</sup>

Para procedimientos de diagnóstico en laboratorio pueden seguirse procedimientos como el montaje húmedo, la técnica de KOH y tinciones (Ver apéndice 7.2, 7.3, 7.4 y 7.5).

En laboratorio se hace la identificación de los conidióforos. El Saboureaud-Agar-Dextrosa fortificado con 2 g/l de extracto de levadura, es el medio de cultivo más comúnmente usado para observarlos.<sup>65</sup>

El diagnóstico positivo de esta enfermedad requiere de habilidad. Por esta razón, es importante considerar los signos generales. El montaje húmedo preparado de la cría, muestra micelios penetrando el cuerpo del insecto, eventualmente los hongos se despegan del tegumento interno del insecto formando una piel falsa (momia). Generalmente las esporas se presentan de manera abundante en la parte proximal de la cabeza de la larva muerta. Debido a que otros hongos habitan la colmena y otras especies de *Aspergillus* también son causa de la cría de piedra, es necesaria una correcta identificación.<sup>64</sup> Para ello, se requiere la aplicación de las técnicas de diagnóstico en laboratorio. (Ver apéndice 7.3, 7.4, 7.5)

## 2.9. TRATAMIENTO

No se conoce ningún tratamiento para la cría de piedra.<sup>7, 43</sup> Para salvar a una colonia de una enfermedad ligera se sugiere pasar la colonia a una colmena limpia para posteriormente desinfectar la colmena vieja.<sup>64, 65</sup>

Giauffret, et al.,<sup>39</sup> hallaron que fumigar las colmenas con óxido de etileno por 15 h a 22°C mata al *Aspergillus flavus*. Además, ellos

estudiaron la posibilidad de tratar las enfermedades fungales con antimicóticos y antisépticos. Para ello determinaron la sensibilidad de dos filtrados de *Aspergillus flavus* a los antimicóticos *in vitro*, comparando incluso la toxicidad de estos productos para las abejas adultas y la cría. Encontraron que la nistatina y el tiabendazol fueron los productos más efectivos contra *Aspergillus flavus*, sin embargo, presentaron la desventaja de ser tóxicos para las larvas y abejas adultas.

Gochnauer,<sup>43</sup> mencionan que no hay tratamiento para la cría de piedra, por lo tanto es necesario que las abejas retiren las crías muertas de las celdas, para que la colonia tenga una recuperación rápida. Lo anterior es difícil de acuerdo con Zander,<sup>83</sup> quien menciona, que cuando las abejas intentan remover las larvas afectadas con cría de piedra, roen por afuera las paredes de la celda y alcanzan parte de las momias con dificultad, por lo que solo retiran parte de la cría afectada. Las larvas que no son removidas son cubiertas con propóleo.

Es necesario que cuando se manejen equipo contaminado el apicultor se cubra la nariz con un pañuelo con el fin de evitar la aspiración de las esporas del hongo y así evitar una posible patología.<sup>76</sup> La miel de colonias infectadas con cría de piedra no debe usarse para el consumo humano, ya que se conoce que *Aspergillus flavus* crece en vías respiratorias de humanos.<sup>64 65</sup>

## **2.10. PREVENCIÓN Y CONTROL**

El manejo recomendado para el control de la cría de piedra es igual al indicado para cría de cal.

### 3. ENFERMEDADES FUNGALES POCO COMUNES

#### 3.1 H-MELANOSIS

Fyg,<sup>37</sup> descubrió una esterilidad en las abejas reinas, debido a una enfermedad que afecta el sistema reproductor. A esta enfermedad se le asignó el nombre de H-melanosis, (de el Alemán "Hefe" que significa levadura) para distinguirla de otras melanosis (B-melanosis) causadas por bacterias.

Esta alteración se define como una enfermedad infecciosa que afecta el sistema reproductor de las abejas reinas, causándoles esterilidad; es causada por el hongo *Aureobasidium pullulans* (*Pullularia pullulans*, *Mellanosella mors apis*).<sup>64</sup>

Se desconoce la distribución mundial de este hongo, aunque se sabe de su presencia en Alemania e Inglaterra.<sup>65</sup>

Afecta a las reinas de las abejas melíferas pero las obreras suelen ser quienes portan el hongo, el cual llega a las colmenas a través del polen. El hongo es saprófito y para su desarrollo requiere de algunos factores predisponentes.<sup>65</sup>

Orósi-Pál,<sup>66</sup> halló una reina viva que no ponía huevos. El orificio genital se taponó con una sustancia oscura de la que se tomó una muestra obteniendo un cultivo de esporas. El hongo fue aislado de la muestra y de los ovarios de esta reina. Además, se halló el mismo organismo en la parte inferior del intestino de abejas obreras infectadas. No obstante Fyg,<sup>37</sup> examinó 224 casos de atrofia ovárica de reinas y no lo encontró. La taxonomía del hongo aislado por Orósi Pál aun no ha sido determinada.<sup>65</sup>

Gontarski,<sup>44</sup> halló melanización en la glándula hipofaríngea en aproximadamente un 15% de las abejas que recolectan polen en una colonia. Gontarski, sugirió que las reinas presentan la infección cuando son alimentadas con las secreciones de las glándulas hipofaríngeas de abejas obreras infectadas. Las abejas que colectan néctar de la misma colonia no se infectan, lo que sugiere que el polen puede ser la fuente de infección.<sup>64, 79</sup>

Las reinas sanas pueden ser infectadas por inoculación vaginal en el laboratorio,<sup>37</sup> y las abejas obreras adultas y zánganos de la colmena infectarse con cultivos inyectados dentro del tórax. La alimentación directa del patógeno en las abejas no ha producido la infección, por ello nada se sabe acerca de la incidencia de la enfermedad.<sup>8</sup>

Fyg,<sup>37</sup> sugiere que el hongo también puede penetrar a la reina por la cámara del aguijón, pero cualquiera que sea su vía de entrada, el hongo se aloja en los órganos reproductivos de las reinas, causándoles cambios en la glándula y saco del veneno que se observa de color oscuro. Posteriormente se obstruyen los oviductos, presentándose una esterilidad. Las reinas cesan su postura y los órganos reproductivos se atrofian; estas reinas son reemplazadas por otras.<sup>8, 29</sup>

El único signo de la enfermedad en abejas obreras fue una invaginación de el intestino posterior.<sup>64</sup>

El diagnóstico se basa en la observación de la melanosis localizada en los órganos reproductivos de las abejas reinas.<sup>65</sup>

En la actualidad no se conoce ningún tratamiento, únicamente se recomienda realizar el cambio de reinas como medida de control.<sup>65</sup>

### 3.2. OTROS HONGOS

La mayoría de los hongos colectados por las abejas pecoreadoras son probablemente incapaces de llegar a establecerse dentro de las abejas o en el interior de la colmena. No obstante después de la muerte de las abejas, algunos hongos germinan y desecan los tejidos blandos internos y su exoesqueleto.<sup>75</sup> Burnside,<sup>23</sup> notó que los hongos del grupo *Penicillia* son los más comunes dentro de la colmena.

Fielitz,<sup>34</sup> reportó que el *Trichoderma lignorum* (Tode) y el *Mucor mucedo* fueron hallados en momias de abejas y se consideraron agentes patógenos para la cría y abejas adultas en Tasmania. El hongo se ha presentado en asociación con *Nosema apis*.<sup>64</sup> Las abejas alimentadas con esporas de *Trichoderma lignorum* en jarabe de azúcar murieron, las hifas fueron halladas en el epitelio del intestino medio y en músculos. En el intestino también se observaron muchas esporas del hongo.<sup>64</sup>

*Mucor hiemalis* Wehmer fue reportado como patógeno para las abejas adultas jóvenes cuando éstas eran sometidas a temperaturas de 20°C; sin embargo, se considera que la temperatura normal del nido de cría es tolerado por este hongo.<sup>15, 64, 79</sup>

Se han reportado larvas de reinas operculadas que han sido atacadas por *Aspergillus niger*.<sup>24</sup> Prest et al.,<sup>68</sup> en 1974 aislaron el hongo de larvas de reinas muertas y encontraron otras especies de hongos en obreras y cría de zánganos. Sin embargo, ellos aislaron en 1977 *Aspergillus niger* y otros hongos de reinas adultas sanas.<sup>64</sup> Por lo anterior, la patogenicidad del hongo no es conclusiva.

En Dinamarca fue descrito el caso de una enfermedad similar a la cría de piedra y se atribuyó a un hongo del género *Claviceps* que primero atacó a la cría de zángano, después la cría de obreras y finalmente las abejas adultas. <sup>65</sup>

Cury,<sup>29</sup> describió una enfermedad en larvas y abejas adultas causada por *Rhizopus equinus* que fue transmitida por vía polen de las flores contaminadas con estiércol de caballo.

Se ha encontrado el hongo *Scopulariopsis brevicaulis* (Saccardo) Bainier en lugares fríos. Este hongo es causante de una enfermedad llamada cría amarilla o cría negra. Afecta larvas muertas, las cuales se tornan amarillas o negras. Las hifas adhieren a las larvas a las paredes de la celda. El hongo no afecta a la cría operculada y generalmente desaparece cuando la temperatura aumenta. <sup>64</sup>

En 1983, Kunchev et al., hallaron *Geotrichum candidum utilis* (*G. candidum* Link) y *Aspergillus niger* en abejas muertas y concluyeron que el polen contaminado con hongos fue el responsable de la muerte de las abejas. <sup>64</sup>

Una inspección de hongos fue realizada en ocho colonias de abejas melíferas en el occidente de Puerto Rico, en agosto de 1987 a febrero de 1988. Se aislaron e identificaron 11 géneros y 21 especies de hongos procedentes de muestras tomadas de la pared y piso de las colmenas, polen, larvas y pupas de obreras y larvas y pupas de zánganos. Las especies identificadas fueron: <sup>64</sup>

*Alternaria alternaria*, *Ascosphaera apis*, *Aspergillus candidus*, *A. carbonarius*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus ellipticus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia crepinii*,



*Chaetomium senegalense*, *Epicoccum purpurascens*, *Mucor hiemalis*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium brevicompactus*, *P. citrinum*, *P. citreonigrum*, *P. janthinellum*, *P. melinii*, *P. restrictum* y *Trichoderma koningii*; de las cuales solo *Ascosphaera apis*, *Aspergillus sp.* y *Mucor hiemalis* son considerados como patógenos de las abejas melíferas en Puerto Rico.<sup>14</sup>

#### 4. LEVADURAS

Las levaduras han sido halladas en el néctar de las flores, miel, pan de las abejas o provisión de polen, colmenas, suelo del apiario y abejas.<sup>64</sup> Generalmente las levaduras no se consideran agentes patógenos de las abejas melíferas, aunque algunas especies fermentan la miel y causan enfermedad o muerte de larvas o abejas adultas que ingieren estos microorganismos. Como el caso de la levadura perteneciente al género *Torulopsis* del tracto digestivo de una abeja que sufría una enfermedad de naturaleza desconocida. Cuando esta levadura se usó como alimento de abejas en colonias sanas, éstas se desarrollaron en el tracto digestivo de las abejas y les causaron la muerte.<sup>64</sup>

En realidad la mayoría de las levaduras son benéficas para las abejas melíferas por jugar un papel en la producción y preservación del pan de las abejas, por proporcionar vitaminas y otros factores de crecimiento.<sup>12</sup> Giordani en 1957, alimentó abejas con levadura de *Tórula* (*Candida utilis* (Henneberg) Loder y Kreger - van Rij) en jarabe de azúcar y de estos experimentos concluyó que las levaduras tienen aproximadamente el mismo valor nutricional para las abejas que el polen.<sup>64</sup> La levadura de *Tórula* da mejores resultados para el desarrollo de las colonias que el polen.<sup>64</sup>

## 5 ANALISIS DE LA INFORMACION

Debido a que las enfermedades fungales se consideran de poca importancia económica para el apicultor, no se han apoyado suficientes programas de investigación, ya que existe información de los años 80s que sigue aún manejándose en libros de ediciones recientes.

En lo que se refiere a artículos se dificulta obtener las revistas debido a que muchas de ellas no llegan a México y solamente un pequeño grupo privilegiado de personas tiene acceso a la poca información actualizada que existe.

En este estudio recapitulativo se concentró la información de una manera sistematizada para que el apicultor, el Médico Veterinario Zootecnista y el estudiante cuenten con mayor información acerca de las enfermedades fungales que afectan a las abejas.

Desgraciadamente en México no hay estudios epizootiológicos que nos permitan inferir que tan serio es el problema de fungosis en los apiarios del país. Es importante por ello, llevarlos a cabo. Esto contribuiría al control de las fungosis donde sean enzoóticas y afecten la producción.

## 6. LITERATURA CITADA

1. ABE-AL-FATTAN, M. A.: La actividad antimicrobial y antioxidante del propóleo como un producto natural de las abejas melíferas. Boletín de la Facultad de Agricultura. Universidad del Cairo. (1993). (3) 637-646.
2. Ajello, L.; Georg, F. L.; Kaplan, W.; Kaufman, L.: Manual de Laboratorio para Micología Médica. Departamento de Salud, Educación y Bienestar Público. U.S. (1975).
3. Aiba, F. J.; Garza, G. D.; Martínez, C. E.; Osorio, F. M.; Ruiz, R. A.: Manual de Micología Médica. I.P.N. Departamento de Micología. México. (1982).
4. Alexopoulos, C. J.: Introducción a la Micología. 1ª Edición, E.U.D.E.B.A. Argentina. (1966).
5. Alonso, J. M.; Rey, J.; Puerta, F.; Mendoza, J. H. De; Mendoza, M. H. De; Flores, J. D.: Componentes enzimáticos y el desarrollo de la infección por *Ascosphaera apis* en abejas *Apis mellifera*. Apidologie. 24:(4) 383-390. (1993).
6. Banford, S.; Heath, L. A.: The infection of *Apis mellifera* larvae by *Ascosphaera apis* Journal of Apicultural Research. (1989). 28:(1) p.p. 30-35.
7. Bailey, L. Gibbs, and R. D. Woods.: Infectious Diseases of the Honey Bee. Land Books. London. (1963).
8. Bailey, L.: Honey Bee Pathology. Annual Rep. Entomol. 13: 191-212. (1968).
9. Bailey, L.: Patología de las Abejas Melíferas. Academia Press London. U.S.A. (1986).
10. Baker, G. N. and Torchio, P. F.: New records of *Ascosphaera apis* from North America. Micologia. 60:189-190. (1968).
11. Barthell, B.: Der Kalkbrut auf der Spur (On the trail of chalkbrood). Garten und Kleintierzucht. C. Imker. 1:(4)12-13. (1971).
12. Batra, L. R., Batra, S. W. T. and Bohart, G. E.; The microflora of domesticated and wild bees (Apoidea). Micopathologia et Mycologia Applicata. 49: 13-44. (1973).
13. Bencke, E. S., Rogers, A. L.: Manual de Micología Médica. 3ª Edición, Burgess Publishing Company. Minnesota, U.S.A. (1970).
14. Berrios, A.; Seguí, C. D.; Betancourt, C.; Pérez-Lagüillo, O.; Pasante, D.: Catastro de hongos presentes en colmenas de *Apis mellifera* en el occidente de Puerto Rico. Caribbean Journal of Science. Puerto Rico. 27:(1,2) 75-79. (1991).
15. Berrios, A.; Seguí, C. D.; Betancourt, C.; Pérez-Lagüillo, O.; Pasante, D.: Inspección de levaduras en colmena de abejas melíferas (*A. mellifera*) en el occidente de Puerto Rico. Caribbean Journal of Science. Puerto Rico. 27:(3, 4) 198-200. (1991).
16. Betts, A. D.: A bee-hive fungus *Pericystis alvei*, gen. et sp. nov. Annals of Botany. 26:795-799. (1912).
17. Betts, A. D.: Fungus diseases of bees. Bee World. 1:132. (1919).
18. Binford, Ch. H.; Emmons, Ch. W.; Utz, J. P.: Micology Medic. Lea an Fabiger. Philadelphia, U.S.A. (1970).
19. Bión de México, S.A. de C.V.: Medios de Cultivo y Reactivos de Diagnóstico. Bioxon de México. México. (1984).
20. Brenet, R.; Fritzsche, W.: Higiene y Profilaxis en Apicultura. 1ª Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. (1975).
21. Burnside, C. E.: Saprophytic fungi associated with the honey bee. Papers of the Michigan Academy of Science, Arts and Letters. 8:59-86. (1927).
22. Burnside, C. E.: Fungus diseases of the honeybee. United States Department of Agriculture Technical Bulletin. 149. (1930).
23. Burnside, C. E.: A disease of young bees caused by a *Mucor*. American Bee Journal. 75:75-76. (1935).
24. Burnside, C. E.: Fungus attacking queen larvae and sealed cells. News Letter, Bureau of Entomology and Plant Quarantine. 6:28. (1939).
25. Calderone, N. W.; Shimanuki, H.; Wardell, G. A.: An *in vitro* evaluation of botanical compounds for the control of the honeybee pathogens, *Bacillus larvae* and *Ascosphaera apis* and the secondary invader *Bacillus Alvei*. Journal of Essential Oil Research. 6:(3) 279-287. (1994).
26. Campbell, C. M.; Stewart, J. L.: Micology medic Mark. A Wiley Medical Publication. N. Y., U.S.A. (1980).

27. Chang, Y. D.; Lee, M. Y.: Characteristics of the honeybee Chalkbrood disease and isolation of antifungal strains from soil in Korea. Korean Journal of Apiculture. Japon. (1993) 8:(1) 29-34.
28. Cordoba P. P.: Manual ilustrado de las técnicas de laboratorio utilizadas en la micología veterinaria. SENAM. 1965).
29. Cury, R.: Micoses das abelhas e fungos das colméias (Mycoses of honey bees and fungi of beehives). Biologico (Brazil) 17:214-220. (1951).
30. Dallmann, H.: Neue wege bei der bekämpfung der kalkbrut in bienenvölkern (New methods for the control of chalkbrood in bee colonies). Garten und Kleintierzucht. C. Imker, 5(9):10. (1966).
31. De Jong, D. and Morse, R. A.: Chalk brood: A new disease of honey bees in the U.S. New York's. Food and Life Sciences. 9:12-14. (1976).
32. Dreher, K.: Zur Steinbrut (Aspergillusmykose) der honigbiene (On stonebrood of the honey bee). Zeitschrift für Bienenforschung. 2:92-97. (1953).
33. Estrada, C.J.: Las Micosis o Fungosis en Medicina Veterinaria. 1ª Edición. Editorial Gims. Barcelona, España. (1970).
34. Fielitz, H.: Untersuchungen über die pathogenität einiger im bienenstock vorkommendem schimmelpilze bei bienen (Investigations on the pathogenicity to bees of some molds occurring in beehives). Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. 66:26-50. (1925).
35. Foldlauer, M. F.; Lushy, W. R.; Knox, D. A.; Shimanuki, H.: Isolation and identification of linoleic acid as an antimicrobial agent from the chalkbrood fungus *Ascosphaera apis*. Apidologie. 24 (2), p.p. 85-94. (1993).
36. Furgala, B.; Gochbauer, T. A.; Shimanuki, H.: Diseases and enemies of the honey bee. In The hive and the honey bee. Dadant and Sons, Editors. Rev. ed. Dadant and Sons. Hamilton Illinois. (1975).
37. Fyfe, M.I. Anomalies and diseases of the queen honey bee. Annual. Review of Entomology. 9:207-224. (1964).
38. Giauffret, A., and Tallercio, Y. P.: Les mycoses de l'abeille (*Apis mellifica* L.) etude de quelques antimycosiques (Fungal diseases of the honey bee (*Apis mellifera* L.): a study of some antimycotics) Bulletin Apicole. 10:163-174. (1967).
39. Giauffret, A. Tostain-Caucat, and Tallercio, Y. P.: Possibilités de desinfection par l'oxyde d' ethylene en pathologie apicole (possibilities of desinfection by ethylene oxide in bee pathology). Bulletin Apicole. 12:45-52. (1969).
40. Gilliam, M.: Chalkbrood Disease: Presentation at the XXXth International Apicultural Congress in Nagoya, Japon. American Bee Journal. 7:(126) p.p. 493-496. (1966).
41. Gochbauer, T. A.; Furgala, B.; and Shimanuki, H.: Diseases and enemies of the honey bee. In The hive and the honey bee. R. A. Grout, editor. Rev. ed Dadant and Sons. Hamilton. Illinois. (1963).
42. Gochbauer, T. A.; Hughes, S. J.; Corner, J.: Chalkbrood disease of honeybee larvae: a threat to Canadian beekeeping?. Canada. Agriculture. 17:36-37. (1972).
43. Gochbauer, T. A.: Enfermedades y Enemigos de las Abejas. En la Colmena y en la Miel. Rev. ed. Dadant and Sons. No. 17. p.p. 36-37. (1975).
44. Gontarski, H.: Ein fall. von parasitärer Melanose der pharynxdrüsen bei pollen-sammelnden bienen (A case of parasitic melanosis of the pharyngeal glands of pollen-gathering bees). Zeitschrift für Bienenforschung. 1:7-12. (1950).
45. Grigortsovskaya, T. P; Borodal, N. I.: A study of the toxicity of cultures of fungi *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Trichoderma lignorum* on bees of Primorsk (U. S. S. R.) (In Russian). Mikologia i Fitopatologiya. 6:345-346. (1972).
46. Guzman, N. E. Investigador de INIFAP. Comunicación personal.
47. Hazen, E.; Gordon, M.: Simplificación de la identificación en laboratorio de hongos patógenos. 3ª edición. American Lecture Series. U.S.A. (1970).
48. Herbert, E. W.: New compounds with potenti for the control of chalkbrood. American Bee Journal. (1985). p.p. 430-431.
49. Herbert, E. W.: The effect of a candidate compound on chalkbrood disease in New Jersey. American Bee Journal. (1985). p.p. 430-431.
50. Hitchcock, J. D., and Christensen, M.: Chalk brood disease of honey bees in the United States. American Bee Journal. 112:248-249-254. (1972).
51. Hornitzky, M.: Un caso de cría de piedra en abejas melíferas en Australia. Australian Veterinary Journal. No. 66: (21). (1989).

50. Hornitzky, Z. M.: Commercial use of gamma radiation in the beekeeping industry. Bee World. (1994). No. 3 (75). p.p.137-142.
51. I.M.S.S. Direccion General.: Laboratorio Clinico: Procedimientos. 3ª Edición. México. (1978).
52. Jawetz, E.; Melnick, E. A.: Manual de Microbiología Médica. 9ª Edición. Editorial El Manual Moderno. México. (1983).
53. Jean Prost, P.: Apicultura. 3ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. España. (1989).
54. Jungerman, F. P.; Schwartzman, M. R.: Micología Médica Veterinaria. 1ª Edición. Compañía Editorial Continental. S.A. México. (1977).
55. Jungerman, F. P.; Schwartzman, R. H.: Micología Veterinaria. Editorial Lea and Fabiger. U.S.A. (1972).
56. Kassai, T.: What in a name?. Bee Word. No. 3: (75) p.p.101-103. (1994).
57. Koenig, P. J.: Isolation of the chalkbrood pathogen, *Ascosphaera apis*, from Honey Bee (*Apis mellifera*): surfaces, pollen loads, and a water source. American Bee Journal. 1 p.p. 581-583. (1987).
58. Laub, E.; Marx, R.: Glycerine, a natural constituent of honey. Lebensmittelchemie und Gerichtliche Chemie. (1987). 41:110-112.
59. Maassen, A.: Die aspergillusmykose der bienen (The Aspergillus mycosis of bees) mitteilungen aus der kaiserlichen biologischen Anstalt für Land-und Forstwirtschaft. 2:30-31. (1906).
60. Mc Lellan, A. R.: Fifteen years' bee disease in the east of Scotland. I. "Brood disease". Scottish Beekeeper. 41:37-39. (1964).
61. Moritz, R. A.: Enciclopedia ilustrada de Apicultura. Editorial El Ateneo. Argentina (1992).
62. Morse and Nowogrodzky.: Honey Bee Pests, Predators and Diseases. (cap 5) 2ª Ed. Cornell University Press, Constock. (1990).
63. O.I.R.S.A., Enfermedades y Plagas de la Abeja Melifera. Banco Interamericano de Desarrollo, El Salvador. (1990).
64. Orosi-Pál, Z.: Über die melanosekrankheit der honigbiene (On the melanosis disease of the honey bee). Zeitschrift für Parasitenkunde. 9:125-139. (1936).
65. Petrefyette G. A.: Diccionario de micología veterinaria. UNAM. (1991).
66. Prest, D. B.; Gilliam, M.; Taber III, S. and Mills, J. P.: Fungi associated with discolored honey bee, *Apis mellifera*, larvae and pupae. Journal of Invertebrate Pathology, 24:253-255. (1974).
67. Puerta, F.; Flores, J. M.; Buston, M.; Padilla, F.: Chalkbrood development in honeybee brood under controlled conditions. Apidologie. Francia. 25:(6) 540- 546. (1994).
68. Root, A. I.: El ABC y XYZ de la apicultura. Ed. Hemisferio Sur, 37a ed. 5a. reimprisión. Buenos Aires Argentina. (1990).
69. Shimanuki, H.: Bee fungus leads to new control for foulbrood disease, agricultural. Research Service. p.p. 701. (1993).
70. Skou, J. T.: ASCOSPHAERALS. Fortyrk Afriesian. 10: 1-24. (1972).
71. Southwick, E. E.: Chalkbrood control. American Bee Journal. (1994). 263-264.
72. Stejskal, M.: *Arreanofaera cranei*, Gen. et sp. nov., a beehive fungus found in Venezuela. Journal Apicultural Research, 13:39-45. (1974).
73. Polnar Jr., G. O.; Thomas, G. M.: Report of diagnoses of diseased insects. Hilgardia. 42:261-359. (1973).
74. Tanus, S. E.; Cortes, B. A.: Primer reporte en México de la presencia de *Aspergillus flavus* causante de la enfermedad conocida como cria de piedra en las abejas *Apis mellifera*. Memorias del VII Seminario de Apicultura. Toluca, Edo. México, (1993).
75. Thomas, G. M.; Luce, A.: An epizootic of chalk brood, *Ascosphaera apis* (Maassen ex Claussen) Olive and Spiltoir in the honey bee, *Apis mellifera* L. in California. American Bee Journal. 112:88-90. (1972).
76. Toumanoff, C.: Les maladies des abeilles (The diseases of bees). La Revue Française d' Apiculture. Numero Spécial 68; (1951).
77. Van, C. J.: Nicosis en animales domésticos. Jensen Research Foundation. (1991).

80. Vincens, F.: Sur l'aspergillomycose des abeilles ou *aspergillus* mycosis of bees. Comptes Rendus d l'Academie des Sciences. Paris. 177:540-542. (1923).
81. Wille, H.: Bekämpfung der kalkbrut (Control of chalkbrood). Schweizerische Bienen-Zeitung. 87:381. (1964).
82. Jakobson, B. A.: Chalkbrood (Ascospheomycosis) in apiaries in Israel. Journal Veterinary Med. 1:143 p.p. 28-33. (1987).
83. Zander, E.: Die Brutkrankheiten und ihre bekämpfung (The brood diseases and their control (Handbuch der bienenkunde in einzeldarstellungen. Volume I. 2a. ed. Eugen Ulmer, Stuttgart. (1919).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## 7. APENDICE

### 7.1 RECOLECCION Y ENVIO DE MUESTRAS.<sup>28</sup>

En la recolección y envío de muestras, es recomendable observar los siguientes puntos:

- La muestra seleccionada para ser enviada al laboratorio debe ser representativa del proceso infeccioso en cuestión. En el caso de cría de cal deben enviarse panales con cría de abejas con aspecto de gis. Es mejor remitir varias muestras del mismo lugar. Deberá ser una cantidad suficiente (10 - 15 cm<sup>2</sup> de panal con cría en caso de ser una enfermedad que afecte a la cría y por lo menos 30 abejas adultas por colmena si se sospecha de una enfermedad que afecte a las abejas adultas) con el fin de lograr un estudio lo más completo posible.

- Tomar muestras con valor confirmativo (larvas o abejas sospechosas de presentar alguna enfermedad fungal), antes de la administración de cualquier medicamento. Para obtener la muestra deben emplearse pinzas, frascos y bolsas de papel con la mayor asepsia posible, a fin de no contaminar la muestra recolectada.

- Evitar la desecación de la muestra, empleando papel estraza en el caso de transportar panales con cría y utilizar alcohol al 70% para la conservación de abejas adultas.

- Las muestras deberán ser enviadas al laboratorio para su diagnóstico a la mayor brevedad. Las muestras deberán llegar antes de 24 h después de haber sido obtenidas, para evitar el crecimiento de otros organismos ajenos a la causa de la enfermedad.

- En el envío de una muestra al laboratorio deben ser considerados dos puntos básicos:<sup>28</sup>

a. Identificación de la muestra con el nombre y dirección del apicultor, nombre del apiario, número de registro de la colmena, municipio, estado,

fecha y hora de la obtención de la muestra, así como el nombre de quien tomó la muestra.

b. Historia clínica, debiendo incluir el curso de la enfermedad, número de colmenas afectadas, morbilidad y mortalidad, mencionando si son afectadas las abejas adultas, la larva o ambas.

### **7.2 MONTAJE HUMEDO.** <sup>13</sup>

Para cualquier enfermedad que se sospeche sea de origen fungal, se recomienda:

- Suspender un poco de la muestra en agua y macerarla.
- Colocar una asada del macerado en un portaobjetos y cuidadosamente poner encima un cubreobjetos para evitar las burbujas. No es necesario tefir.
- La laminilla debe ser examinada con el objetivo de seco débil (no más de 40X).

### **7.3 TECNICA DE KOH AL 10%.** <sup>13</sup>

El método de laboratorio más sencillo para realizar un diagnóstico presuntivo de las micosis, consiste en realizar un examen directo de la muestra sobre un portaobjetos utilizando una solución aclaradora de hidróxido de potasio al 10 ó 20%. Si a la observación microscópica, el resultado a hongos es negativo, la posibilidad de que exista una infección micótica no debe ser descartada.<sup>13</sup> Este método permite mostrar la presencia de estructuras características: esporas, ascosporas, hifas, filamentos largos o cortos, ramificados, fragmentados y con diámetro regular de 3, <sup>18, 53</sup> Se recomienda examinar el material a bajo aumento con el diafragma parcialmente cerrado para obtener contraste visual. La ventaja del método directo para el diagnóstico, es la rapidez para establecer un diagnóstico definitivo.<sup>56</sup>



**Precauciones.<sup>26</sup>**

- Evitar colocar una cantidad excesiva de muestra sobre el portaobjetos debido a que esto impide la observación de los elementos fungales.

- En términos generales, mientras más tiempo permanezca el material en el hidróxido de potasio, es más exacto el examen; el dejar reposar las preparaciones durante toda la noche en una cámara húmeda facilita ampliamente la observación de las estructuras.

**Procedimiento.<sup>28</sup>**

Con el mechero encendido y cerca de este se deposita una pequeña cantidad de muestra obtenida sobre un portaobjetos. Se agrega dos o tres gotas de la solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10 ó 20% sobre la muestra.

La preparación se deja en reposo por un periodo de 10 ó 15 min., antes de colocar el cubreobjetos; un calentamiento ligero de la laminilla acelera el aclaramiento de las muestras. El frotis se observa al microscopio con el objetivo seco fuerte (40 x) para la identificación de estructuras.

**7.4 CULTIVO DE LOS HONGOS**

En general los hongos patógenos de las abejas son difíciles de identificar, a menos que se tenga experiencia en esta especialidad. Pueden ser confundidos con hongos que habitan normalmente las colmenas. Por eso es necesario el cultivo de los hongos para una identificación precisa por medio del aislamiento y selección.<sup>65</sup>

La mayoría de los hongos se desarrollan entre los 0 y 35°C, pero las temperaturas óptimas están entre 20° y 30°C. En contraste con las bacterias, los hongos prefieren un medio ácido para su crecimiento, siendo el óptimo alrededor de 6.0 de pH para la mayoría de los géneros.<sup>4</sup>

Existe una gran variedad de medios de cultivo específicos para cada género, y aún para cada especie de hongo, pero las cajas o los tubos con agar dextrosa sabouraud (pH 5.6), son el medio estándar utilizado para el

aislamiento de los hongos, aunque para el caso de *Ascosphaera apis* y de *Aspergillus spp.*, se fortifica con 2g/l de extracto de levadura.<sup>65</sup>

El medio de cultivo se obtiene de la siguiente manera:<sup>19</sup>

- Se hace un macerado de las muestras de larvas o abejas que pese 10 g.
- Posteriormente la muestra se mezcla con 10 ml agua destilada.
- De la mezcla preparada se toma 1 ml para hacer diluciones de  $10^{-1}$  a la  $10^{-6}$ , sin olvidar tirar un mililitro del último tubo (dilución  $10^{-6}$ ).
- Una vez obtenidas estas mezclas se procede a sembrar cada una de las diluciones en medios de cultivo correspondientes (ver sección de cultivo in vitro).

El sembrado de las placas y tubos conteniendo el medio de cultivo, se realiza empleando un asa de inoculación en forma de L, o bien, utilizando el asa bacteriológica. La técnica es igual a la recomendada para bacteriología.<sup>28</sup>

El examen de los medios de cultivo para las formas miceliales requieren de una prolongada incubación, pero para *Ascosphaera apis* es de aproximadamente una semana, siendo esta una de las características que permiten una identificación preliminar.<sup>28</sup>

## 7.5 TINCIONES

**7.5.1- TINCION CON AZUL DE ALGODON LACTOFENOL:** Es una preparación utilizada para la tinción de hongos miceliales.<sup>2, 3, 26</sup>

### Reactivos

<b>Solución A:</b>	Solución	Aclarante (Lactofenol)
		Cristales de fenol 20 g
		Ácido láctico 20 g
		Glicerina 40 g
		Agua destilada 20 ml

Se disuelve fenol en el agua destilada en baño María, agregando el ácido láctico y la glicerina.

**Solución B:** Azul de Algodón Lactofenol  
Colorante azul de algodón 0.05 g

A 80 ml de la solución A se le adiciona el colorante azul de algodón y se filtra antes de usarse.

### Procedimiento 2

- Poner un portaobjetos sobre una superficie transparente e iluminada, si esto no es posible, poner el portaobjetos sobre una hoja de papel blanco. Agregar una pequeña gota de azul de algodón- lactofenol en el centro del portaobjetos.
- Remover un fragmento de la colonia del hongo (aproximadamente 1-2 mm dentro de la periferia ) con un asa y depositarlo sobre la gota del colorante.
- Desbaratar el fragmento de la colonia utilizando el asa de inoculación o una aguja de disección.
- Montar la preparación dejando caer un cubreobjetos sobre ella, sin presionar el cubreobjetos, porque esto podría desprender algunas estructuras del hongo.

### 7.5.2 TINCION CON AZUL DE ALGODON ACETICO.<sup>28</sup>

#### Reactivos

Azul de algodón	0.5 g
Ácido acético	3.0 g
Agua destilada	100 ml

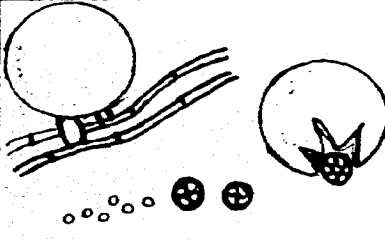
**Procedimiento.<sup>3</sup>**

- Preparar el frotis y fijarlo con alcohol metílico cubriendo el portaobjetos y dejando evaporar (microcultivo).
- Agregar la solución de azul de algodón acético por 20 minutos, calentando hasta la emisión de vapores.
- Lavar rápidamente con agua corriente.
- Pasar por alcohol absoluto de 96°.
- Pasar por alcohol absoluto.
- Poner en xilol hasta que se transparente la preparación.
- Montar en bálsamo de Canadá o resina sintética.
- Observar al microscopio, empleando primero, el objetivo seco fuerte.

El aislamiento del agente micótico basado en medios de cultivo especiales es por lo general el diagnóstico definitivo. Sin embargo, algunos casos pueden ser diagnosticados por pruebas inmunológicas y técnicas de anticuerpos fluorescentes como métodos de confirmación.<sup>13</sup>

Las características macroscópicas de las colonias y la pigmentación, son medios útiles para la identificación, pero en la identificación final se hace necesario el desarrollo pleno de todas las estructuras de los hongos, para así realizar una apreciación exacta de ellas.<sup>28</sup>

### 7.6 IDENTIFICACION DE Ascosphaera apis.

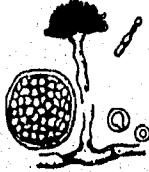



ESPECIE	MORFOLOGIA MACROSCOPICA COLONIA	MORFOLOGIA MICROSCOPICA	MORFOLOGIA VISTA AL MICROSCOPIO
<u>A. apis</u>	Los filamentos miceliales pueden crecer aproximadamente dos dias despues de haber inoculado el hongo, se obseva blanca, parecido al algodón con un contorno circular.	Presenta hifas blancas septadas con distancia grande entre sus ramificaciones, con cuerpos fructiferos y bolas de esporas.	

7.7 APARIENCIA MICROSCOPICA DE LOS Aspergillus.

ESPECIE	MORFOLOGIA MACROSCOPICA COLONIA	MORFOLOGIA MICROSCOPICA	MORFOLOGIA VISTA AL MICROSCOPIO
<u>Aspergillus</u>	VARIABLE según la especie según la especie de <u>Aspergillus</u>	Se caracterizan por tener hifas septadas con conidiosporas soportadas por las vesículas y esterigmatas. Una forma de distinguir las diferentes especies se basa en la observación microscópica de la cabeza de estos.	

a) Conidia b) Vesícula c) Conidioforo d) Célula pie e) Esterigma

7.8 ESPECIES DE Aspergillus MAS COMUNES.

ESPECIE	MORFOLOGIA MACROSCOPICA COLONIA	MORFOLOGIA MICROSCOPICA CONIDIOSPORAS Y ESTERIGMA	MORFOLOGIA VISTA AL MICROSCOPIO
<u>A. flavus</u>	Aterciopelado, amarillo verdoso a café. Reverso dorado o rojo castaño.	Conidiosporas con tamaño variable rugosas y con apariencia esponjosa. Esterigma uniseriada y biseriada, cubre totalmente la vesícula.	
<u>A. fumigatus</u>	Aterciopelado o pulverulento, primero blanco después gris oscuro, al reverso blanco o marrón.	Conidiosporas pequeñas y lisas. Esterigma uniseriada generalmente y cubre dos terceras partes de la vesícula.	
<u>A. nidulans</u>	Aterciopelada, verde a amarilla, al reverso rojo púrpura.	Conidiosporas pequeñas, lisas y de color castaño. Esterigma biseriada, columnar.	
<u>A. niger</u>	Algodonosa, primero blanco o amarilla, después se torna negra, al reverso blanco o anarilla.	Conidiosporas largas y lisas con esterigma biseriada y cubren totalmente la vesícula cabeza radiada.	
<u>A. glaucus</u>	Verde con áreas amarillas, al reverso amarillo a marrón.	Conidiosporas de tamaño variable y lisas. Esterigma uniseriada y radiada, columnar. Cubre totalmente la vesícula.	