

# ASPECTOS BIOQUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DE ABELHAS AFRICANIZADAS (*APIS MELLIFERA AFRICANIZADA*) ACOMETIDAS PELO ECTOPARASITA *VARROA (VARROA DESTRUCTOR)*

Yan Angelo Miri<sup>1</sup>; Junior César Ferron<sup>1</sup>; Luan de Almeida Althaus<sup>1</sup>; Pedro Simão de Oliveira Flores Junior<sup>1</sup>; Daniela Kriek do Nascimento<sup>1</sup>; Giovani Jacob Kolling<sup>2</sup>; Alan Eduardo Bazzan<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Acadêmicos do curso de Medicina Veterinária. IMED. yanmiri53@gmail.com; ferronjuniorcesar@gmail.com; luanalthaus@gmail.com; pedroflores41004@gmail.com; danikriekpf@gmail.com

<sup>2</sup> Orientador. Médico veterinário, doutor em produção animal. Docente do curso de Medicina Veterinária. IMED. giovani.kolling@imed.edu.br

<sup>3</sup> Orientador. Médico veterinário, mestre em produção e sanidade animal. Docente do curso de Medicina veterinária do CESURG. alanbazzan@hotmail.com

## 1 INTRODUÇÃO

As abelhas surgiram a cerca de cem milhões de anos, junto com o desenvolvimento das flores, e desde então estes dois grupos mantem dependência recíproca. A atividade apícola no Brasil teve início em 1839, quando o padre Antônio Carneiro trouxe algumas colmeias da região do Porto em Portugal para o Rio de Janeiro (KADRI et al., 2016).

O Rio Grande do Sul se destaca no cenário nacional como um dos estados com mais influência na produção apícola (TURCATTO et al., 2012).

Poucas enfermidades e pragas afetando o desenvolvimento das abelhas, porém mesmo em pequena escala, destaca-se o ectoparasita *Varroa destructor*, conhecido popularmente como carrapato da abelha ou *ácaro varroa* (COUTO et al., 2006).

As colmeias acometidas por este ectoparasita exibem como principais sinais clínicos a redução do número de operárias, enfraquecimento dos indivíduos e por consequência diminuição da produção e polinização, comumente associados ao ácaro há a presença de fungos, bactérias e vírus alterando a fisiologia natural do apiário (FREIRE et al., 2013).

O *Varroa destructor* é um ácaro ectoparasita que pertence ao reino Animalia, superordem, parasiformes e família varroidae, que acomete larvas e abelhas adultas da espécie *Apis cerana* e *Apis mellifera* causando a doença varroose ou varroatose, destruindo as colmeias expostas a uma alta infestação. Seu ciclo de vida possui fases distintas, sendo estas o desenvolvimento, reprodução e fase forética. Este ácaro apresenta dimorfismo sexual entre o macho e a fêmea onde a cor, o tamanho e o formato do corpo são divergentes (PIRES et al., 2016).

O presente trabalho tem como objetivo principal avaliar os aspectos fisiológicos, bioquímicos e microbiológicos de amostras oriundas de *Apis mellifera africanizadas* acometidas pelo ectoparasita *Varroa destructor*, realizando isolamento bacteriano a partir do local da lesão causada pelo parasita e discutir os aspectos imunológicos envolvidos no quadro clínico avaliado.

## 2 METODOLOGIA

A coleta das abelhas *Apis mellifera africanizadas* acometidas com ectoparasita *Varroa destructor* foi realizada na cidade de Vitória das Missões-RS, em uma propriedade particular. Para auxiliar uma coleta segura foram utilizados macacões de proteção, um fumegador aceso produzindo fumaça não tóxica, luvas de proteção, pinças anatômicas de dissecação, um balde para alojar os favos de mel coletados para análise, álcool 70% e soro fisiológico para soltar o ácaro do dorso das abelhas coletadas, potes de coleta esterilizados para alojar ácaros

capturados, uma lupa para ajudar na visualização, coador e pano branco para contagem e separação dos ácaros.

As 628 abelhas coletadas foram extraídas de uma única colmeia com o auxílio do produtor e, em seguida foram colocadas no álcool 70% para que os ácaros presentes se soltassem das mesmas e logo após passadas em um coador sobre um pano branco para melhor visualização dos parasitas. Os ácaros coletados foram contados e separados em recipientes de coletas esterilizados e imersos em soro fisiológico.

Um dos favos de mel coletados foi aberto para coleta de pupas e análise da quantidade de ácaros presentes nas larvas. Os ectoparasitas *Varroa destructor* encontrados nas larvas foram colocados em frascos de coleta esterilizados e, por fim, realizado uma coleta de material com *swab* na região onde o ácaro foi encontrado em uma das larvas infectadas para fim de estudo microbiológico.

Após a coleta do material o *swab* foi imerso em soro fisiológico e mantido sob refrigeração até a sementeira em uma placa de crescimento bacteriano com meio de cultura BHI (*brain heart infusion*). No momento da sementeira o mesmo foi retirado da solução salina com o auxílio de uma pinça, e logo após realizado o esfregaço mantendo a placa próxima a um bico de Bunsen para evitar contaminação bacteriana ambiental e para proteção do manipulador, em seguida a placa foi incubada a 37°C em uma estufa por 24 horas e após levada a geladeira para conservação.

Após ocorrer crescimento bacteriano pode-se realizar coloração de GRAN, para identificar bactéria gram positivas e negativas. O teste consiste em fixar uma colônia de bactérias que se desenvolveu no meio de cultura BHI, com o auxílio de uma alça de platina flambada (para que se evite o contágio com meio), a colônia foi recolhida e fixada em uma lâmina histológica junto a solução salina, e após alguns minutos foi passada pela chama do fogo por 4 vezes para que ocorresse a fixação das bactérias na lâmina. Em seguida realizou-se a coloração colocando algumas gotas de violeta de genciana sobre a lâmina e deixada em repouso por 2 minutos, enxaguando-a e acrescentando algumas gotas de iodo deixando por mais 2 minutos, repetindo o processo de enxágue e adicionando acetona por 20 segundos sendo lavada e adicionada fuxina por mais 1 minuto e realizada a última lavagem.

Após observado as bactérias no microscópio realizou-se uma nova sementeira em meio seletivo um em Ágar sangue e outro em Ágar Maconchy, sendo estes armazenados por 24 horas na estufa a 37°C. Por conseguinte, efetuou-se testes bioquímicos para identificação bacteriana, baseados nas reações enzimáticas que ocorrem nos meios empregados. O primeiro foi o teste de catalase, onde se há a homogeneização de uma colônia de bactéria com peróxido de hidrogênio 3% onde observa-se características referentes a microrganismos fermentadores ou de ciclo não fermentativo. O segundo teste é de oxidase: bactérias que produz a enzima oxidase+, mudam de cor em contato com uma fita reagente, a reação é imediata. O próximo foi o teste de motilidade: onde microrganismos móveis turvam o meio SIM (sulfato indol motilidade) e é incubado na estufa a 37 °C durante 18 horas, para este teste foi utilizado uma agulha de platina flambada para se realizar a picada no meio de cultura SIM. O quarto e último teste foi de TSI (*triple sugar and iron*) composto por 3 açúcares: glicose, sacarose e lactose+ferro, identifica bactérias fermentadoras ou não de açúcares, e produtoras ou não de gás e H<sub>2</sub>S (enxofre), com auxílio de uma agulha de platina flambada para se realizar a picada e estrias no bisel do meio e incubado a 37 °C na estufa durante 18 horas.

A hemolinfa foi retirada das larvas de *Apis mellifera africanizada* coletados com o auxílio de três agulhas e seringas de um ml, e armazenadas em tubo ependorfe, foi possível a coleta de 500 µl, a mostra foi pesada e centrifugada para separar o plasma das células, o plasma foi retirado com uma pipeta automática de 100µl.

Para a análise foram utilizados quatro tubos de ensaio, sendo um branco com dois ml de reagente de trabalho, um tubo padrão com dois ml de reagente de trabalho e 20 µl de

padrão e dois tubos de amostra com dois ml de reagente de trabalho e 20 µl de plasma da hemolinfa em cada.

A partir das amostras 1 e 2 uma diluição foi realizada com 1800 µl de reagente de trabalho e 200 µl da solução das amostras 1 e 2. Os seis tubos de ensaio foram levados a banho maria a 37°C por dez minutos e depois levados ao espectrofotômetro para análise de glicose.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a coleta realizada das 628 abelhas (*Apis mellifera africanizadas*), foram encontrados 33 ácaros, sendo 32 fêmeas e 1 macho, equivalente a 5,2% de incidência na população de abelhas da colmeia analisada, considerada baixa quando comparada aos parâmetros citados por Costa et al. (2005), conforme Gráfico 1.

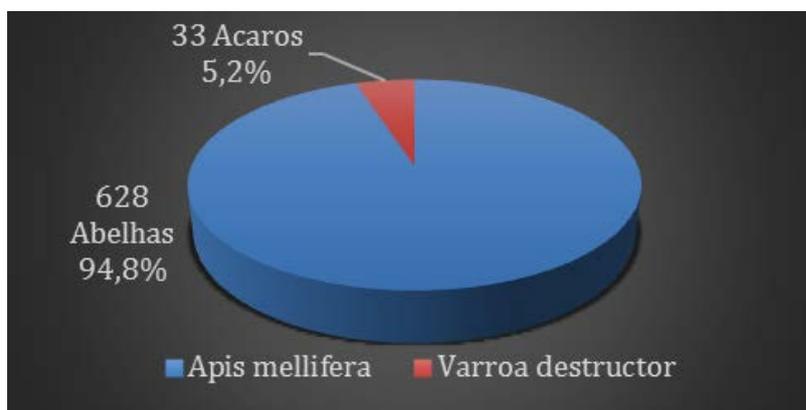


Gráfico 1. Porcentagem de infestação pelos ácaros na colmeia.

Observou-se o dimorfismo sexual entre o macho e a fêmea do *Varroa destructor*, a partir das características específicas de cada indivíduo, como mostra Figura 1. Sendo que o macho apresenta coloração mais esbranquiçada, tem aparelho bucal atrofiado, em relação a alimentação resumindo-se apenas para carregar os ovos, apresenta diâmetro corpóreo reduzido em relação e fêmea, tendo o macho forma arredondada. Já fêmea possui forma ovalada, aparelho bucal picador-sugador que permite sugar a hemolinfa de seu hospedeiro, tem coloração acastanhada escura, características estas que analisadas através do auxílio de uma lupa e assim dita pela literatura de Silva (2010).

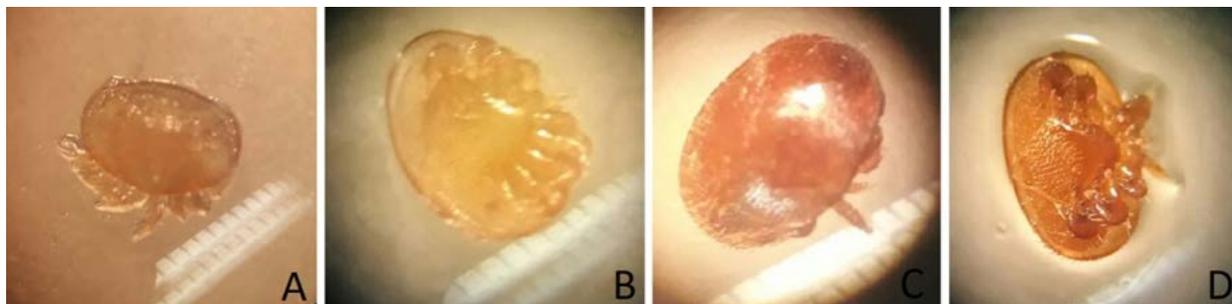


Figura 1. O ácaro *Varroa destructor* macho e fêmea vista com lupa eletrônica em aumento 4x - imagem A: macho vista dorsal - imagem B: macho vista ventral - imagem C: fêmea vista dorsal - imagem D: fêmea vista ventral.

Durante a amostragem das abelhas pode-se observar que o exame se apresentava tanto em número quanto em escore corporal menor em relação a colmeias não infectadas. Por

consequente, ao crescimento bacteriano na placa BHI, segundo Figura 2, observou-se o desenvolvimento de colônias de coloração branca com aparência viscosa, onde foi realizada a coleta de colônias isoladas para a coloração de gram.

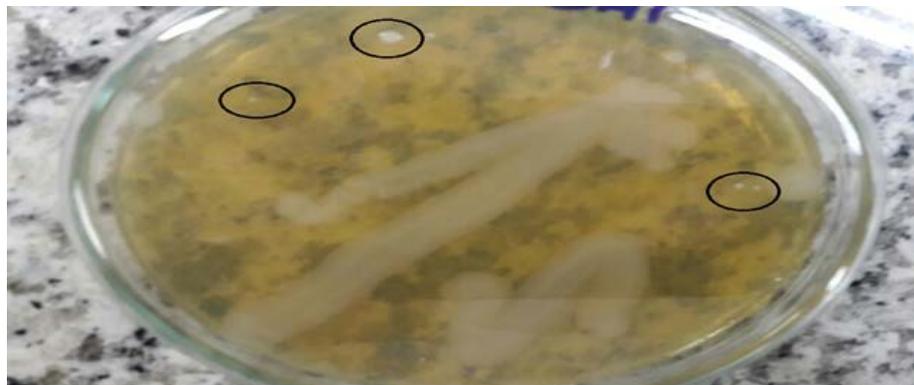


Figura 2. Crescimento bacteriano em meio BHI

As bactérias coradas e visualizadas no microscópio óptico apresentaram morfologia arredondada e coloração roxa, sendo estas características de bactérias *Staphylococcus spp.* gram positivas, segue Figura 3. Conforme citado por Queiroz (2017) comprova-se a coexistência de microrganismos virais associados ao ácaro *Varroa* que podem acometer as abelhas causando-lhes vários danos, sendo citado principalmente o *Varroa destructor virus-1-VDV-1*. Porém não foram obtidos resultados na literatura referentes a presença associativa de bactérias *Staphylococcus spp.* gram-positivas relacionadas ao ácaro *V. destructor*.

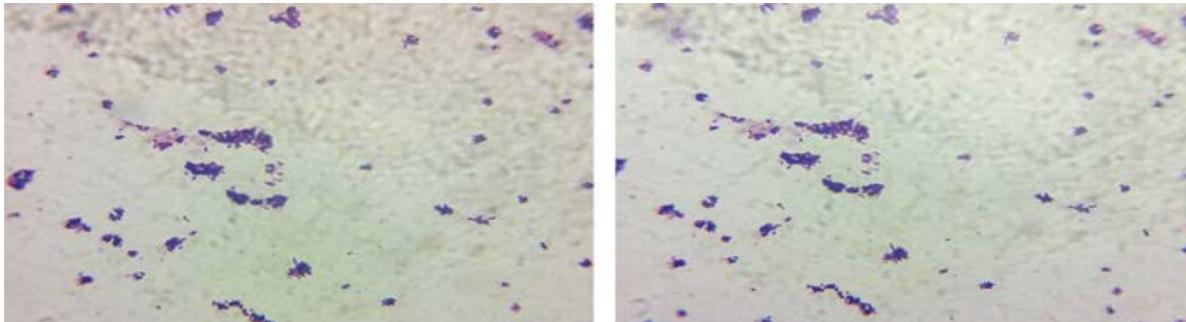


Figura 3. Bactérias *Staphylococcus spp.* GRAM positiva vista em microscopia ótica no aumento em 1.000 vezes.

As bactérias *Staphylococcus spp.* GRAM positivas foram submetidas aos testes de catalase e apresentaram resultado positivo, pois ao entrar em contato com peróxido de hidrogênio houve formação de bolhas devido a ação fermentadora da bactéria. A colônia submetida ao teste de oxidase, onde esta foi exposta a uma fita impregnada com p-fenil enodiamina, não apresentou mudanças na coloração, sendo assim negativa. As bactérias expostas ao teste SIM (Sulfato Indol Motilidade) crescerem somente no local onde a colônia foi aplicada, sendo então imóveis e sem a presença de flagelos. O último teste realizado foi o de TSI (triple sugar andiron) que apresentaram coloração amarela no ápice do tubo de ensaio e vermelho na base, sendo então fermentadora de glicose apenas e não apresentou gás no tubo nem produção de enxofre.

Os testes bioquímicos realizados para dosagem de glicose a partir da hemolinfa coletadas das larvas infectadas apresentaram 2,720 mg/dL em 2000 µl, sendo 1800 µl de reagente e 200 µl de amostra diluída. Segundo Ladim (2009) as larvas apresentam maior teor

de glicose na hemolinfa do que as abelhas na fase adulta. Porém não foram encontrados parâmetros para comparação para os índices glicêmicos identificado nas amostras.

#### **4 CONCLUSÕES**

Tendo em vista os aspectos observados, pode-se concluir que o ectoparasito *Varroa destructor* possui uma vasta gama de enfermidades ocasionadas pela varroatose, detendo-se a cálculos mensurados constatou-se uma baixa infestação do ácaro, em relação a total população da colmeia. Em conseguinte aos testes laboratoriais realizados obteve-se resultados significativos para a identificação de microrganismos associados ao ácaro, não tendo eficiência aos resultados dos níveis de virulência e patogenicidade da bactéria *Staphylococcus spp.* em relação ao hospedeiro (*Apis mellifera*).

#### **5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

COSTA, P. S. C.; OLIVEIRAS, J. S. **Manual prático de criação de abelhas**. 22. ed. São Paulo: Aprenda Fácil, 2012.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e cultura**. Funep: São Paulo, 2006.

FREIRE, N. M.; SOUZA, R. C. P. **Ácaro parasitas de abelhas melíferas na região de Itaborai estado do Rio de Janeiro**. Uniabeu: Rio de Janeiro, 2013.

KADRI, S. M. **Identificação de regiões polimórficas para alta produtividade de mel e sequenciamentogenômico em abelhas *Apis mellifera africanizadas***. Unesp. São Paulo, 2016

LANDIM, C. C. **Abelhas; morfologia e função de sistemas**. UNESP: São Paulo. 2009.

PIRES, C. S. S. et al. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa agropecuária Brasília**. v. 51, n. 5, p. 422-442. 2016.

QUEIROZ, G. S, et al. Infestação do ácaro *Varroa destructorem* colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera L.*) no cenário potiguar, nordeste do Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. 2017.

SILVA, C.M.R. **Luta contra o *Varroa destructor* Anderson e Treumam: avaliação de estratégias biotecnias e bioquímicas com óleo de *Mentha cervina L.*** Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2010.

TURCATTO, A, P; ISSA; M, C; MORAIS, M, M; ALMEIDA, R. **Infestação pelo Ácaro *Varroa Destructor* (Anderson & Trueman) (Mesoatigmata: Varroidae) em operarias adultas e em células de abelhas africanizadas *Apis mellifera Linnaeus* (Hymenoptera: Apidae) na região de Franca-SP**. Projeto entomologia do Brasil. São Paulo, 2012.