

AUS VARROA DESTRUCTOR ISOLIERTE MIKROORGANISMEN UND PRÜFUNG IHRER PATHOGENITÄT

J. HRABÁK

Lučni 255, 338 28 Radnice, TSCHECHISCHE REPUBLIK
e-mail: hrabakj@seznam.cz

Resümee

Unsere Untersuchungen dienten der Identifizierung der Milbe *Varroa destructor*, ihrer pathologischen Symptomatologie und der Isolierung ihrer Mikroorganismen. Die toten Milben wurden vom Beuteboden eingesammelt und mit einem Stereomikroskop studiert. Die Milben, von denen angenommen wurde, daß sie infolge eines Pathologieprozesses eingegangen sind, wurden bakteriologisch und mykologisch untersucht. In weiteren Tests wurde die Pathogenität der isolierten Mikroorganismen kontrolliert. Im Laufe der Untersuchung fanden wir Weibchen mit schwarzen Formationen in der Nähe des Verdauungstrakts und mit weißen Pilzen in und auf der Idiosoma. Aus diesen isolierten wir die Bakterien *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus albus haemolyticus* und die Pilze *Aspergillus flavus*, *Penicillium multicolor* und *P. simplicissimum*. Von den Milben mit Mykosen wurde auch das Bakterium *Enterobacter cloacae* und die Pilze *Mucor ramosissimus*, *M. inducus* und *M. hiemalis* isoliert. Die Labortests für die Prüfung der Pathogenität der isolierten Mikroorganismen erfolgten in Laborkäfigen mit je 50 Bienen und 15 *Varroa-destructor*-Weibchen. Die Laborkäfige, die von *Varroa destructor* befallene Bienen enthielten, wurden mit einem Inokulum und einer sterilen Kochsalzlösung (Kontrollkäfige) besprüht. Die Versuche erfolgten bei 35 °C. Die Labortests ergaben eine Pathogenität nur im Falle der Bakterie *Enterobacter cloacae*, die in den Laborkäfigen eine durchschnittliche Mortalität von 77,4% verursachte. Die Mortalität in den Kontrollkäfigen betrug nur 15,9%. Die statistische Differenz gegenüber den Kontrollkäfigen wurde durch das Testen der anderen Mikroorganismen nicht bewiesen. Die von *Enterobacter cloacae* befallenen und vernichteten Milben hatten charakteristische pathologische Veränderungen der Malpighi Gefäße erlitten (makroskopische Vergrößerung dieser Organe und der Idiosoma), während die Membran zwischen Genital- und Sternalschild gewöhnlich explodierte. Trotzdem wurden in unseren Labortests keine schwarzen Flecke beobachtet.

Einleitung

Die Forschungen über biologische Bekämpfungsmittel von *Varroa destructor* konzentrieren sich vor allem auf:

- 1). das Testen von Mikroorganismen, deren Pathogenität für andere Milbenarten bewiesen worden ist;
- 2). die Verwendung von Milben, die die Milben anfallen, die auf den Futterreserven des Bienenvolkes leben;
- 3) das Auffinden von Milben mit Ansteckungssymptomen im Bienenvolk.

Wir befaßten uns mit dem Auffinden von Milben mit pathologischen und ansteckenden Symptomen, die im Gemüll oder von den Bienenlarven leben. Wir konzentrierten uns nur auf die pathogenen Bakterien und Pilze.

Die pathogenen Mikroorganismen, bei anderen Milben (*Laelapidae*, *Iphipsidae*) und Zecken (*Ixodia*, *Holothyridia*) beschrieben, können als biologische Bekämpfer der Varroose getestet werden, da diese Organismen mit den Varroidae-Milben verwandt sind.

Die Forschung konzentrierte sich auf den üblichen Wirt der Milbe *Varroa jacobsoni*, d.h. *Apis cerana*. Die Forschungen von ANDERSON und TRUEMANN (ANDERSON et al., 2000) bewiesen aber, daß *Varroa jacobsoni* eine andere Spezies als *Varroa destructor* ist und die Honigbienenvölker (*Apis mellifera*) befällt. Diese Tatsache unterstreicht die notwendige Suche nach Krankheitserreger, die gewisse Varroaspezies befallen.

Die Krankheitserreger, die für *Varroa destructor* in Frage kommen, können gemäß der Taxonomie der Mikroorganismen in Gruppen eingeteilt werden: Nematodae, Protozoa, Viren, Rickettsiae und Pilze. Wir werden uns nur auf die Krankheitserreger beziehen, die in der Literatur als bedeutend erwähnt werden.

Viren

Die Viren können günstige Erreger sein, da sie gewöhnlich Standardgruppen von identischen Zellen befallen und diese anstecken. Der erste Nachteil der Viren ist ihre schwere Kultivierung in großen Mengen. Die meisten Viren werden *in vivo* kultiviert.

Polydnviridae, Ascoviridae und Baciloviridae sind spezifische Erreger für die Arthropoda (CHANDLER et al., 2001). Die Baculoviren sind eine Gruppe, die sich durch die biologische Bekämpfung auszeichnen (MARTIGNONI, 1984). Sie befallen die Därme und dringen durch die Epithelzellen in den Organismus.

Virusähnliche Partikel wurden im Fettkörper der Milben gefunden, die die *Apis-mellifera*-Bienenvölker befallen hatten. Die Tests über die Weitergabe dieser Partikel verzeichneten einen Mißerfolg. Die Milben, bei denen virusähnliche Partikel festgestellt worden sind, weisen schwarzgefärbte Veränderungen der Darmgewebe und des Fettkörpers auf (KLEESPIES, 2000).

Ein möglicher Iridovirus wurde aus Varroamilben isoliert, die sich in den USA in Honigbienenvölkern befanden, doch wurde keine Pathogenität für die Milben festgestellt (CAMAZINE et al., 1998).

Rickettsiae

Wurden bei Milben und Zecken in großer Menge gefunden. Sie können sowohl für die Menschen als auch andere Wirbeltiere gefährlich sein. Ein weiterer Nachteil ist ihre schwere massenhafte Produktion und deshalb werden sie nicht wie die Viren als potentielle Krankheitserreger klassifiziert.

Nicht identifizierte, rickettsiae-ähnliche Organismen wurden in der Kotblase der Varroamilbe gefunden (LIU et al., 1988). Diese Organismen wurden in allen Entwicklungsstadien entdeckt.

Bakterien

Die Bakterien gehören der Kategorie von Krankheitserregern der Insekten an. Die charakteristischen Familien dieser Krankheitserreger der Insekten sind Bacillaceae, Enterobacteriaceae und Streptococcaceae. Die pathogene Wirkung der Bacillaceae wird gewöhnlich durch die Synthese des Toxins verursacht, das sich bei der Sporulation des Mikrobs bildet.

Bacillus thuringiensis wird weltweit in der biologischen Bekämpfung verwendet, wie z.B. in der Bienenzucht bei der Bekämpfung von *Galleria mellonella* L. Er tötete adulte Milben und Larven der *Tetranychid*-Milben (HALL et al., 1971) und einige *Mesostigmata*- und *Prostigmataspezies* (CHANDLER et al., 2001).

Aus dem Darm von *V. destructor* wurden *Bacillus-thuringiensis*-Stämme isoliert, deren Pathogenität noch nicht bekannt ist (GLIŃSKI et al., 1990).

Wie dem auch sei, sind die Bakterien keine charakteristischen Erreger der Milben. Ihre Kultur erfolgt gewöhnlich zwischen 30 und 35 °C, eine für die Bruttätigkeit charakteristische Temperatur. Auch die Feuchtigkeit innerhalb des Bienenvolkes begünstigt die Entwicklung von Bakterien.

Pilze

Die Pilze werden als die bedeutendsten Krankheitserreger der Arthropodae beschrieben. Die optimale Temperatur ist diejenige über 25 °C (BIRCHER et al., 1990). Sie können in den Honigbienenvölkern vor allem im Winter angewendet werden. Nur einige wenige Spezies können bei Temperaturen über 35 °C wachsen. Achtung muß ihrer Pathogenität für die Menschen geschenkt werden, z.B. *Aspergillus*.

Die Mortalität erfolgt im Falle der Pilzinfektionen durch die mechanische Zerstörung der Gewebe, der Ausscheidung von Wasser und der Aktivität der Mykotoxine (BIRCHER et al., 1990).

Die *Beauveria-bassiana*-Pilze wurden als Mykopestizide in der Bekämpfung von über 700 Arthropodae-Spezies verwendet (GOETTEL et al., 1992). Ein weiterer bedeutender Pilz für die Insekten ist *Metarhizium anisopliae* wie auch andere Spezies der Gattung *Metarhizium*. Ihre maximale Wachstumstemperatur beträgt 38 °C.

Der Vorteil der Verwendung von Pilzen in der biologischen Bekämpfung liegt in ihrer leichten massenhaften Kultivierung. Obwohl *B. bassiana* und *M. anisopliae* unter Laborbedingungen Infektionen verursachen können, wurde bis jetzt noch keine Infektion bei der Biene festgestellt (CHANDLER et al., 2001; WEISER, 1966).

Hirsutella thompsonii und *Metarhizium anisopliae* wurden sowohl im Labor als auch in Beobachtungsbeuten eingeschätzt und die Ergebnisse waren vor allem positiv (KANGA et al., 2002).

Parasitoiden

Die Verwendung dieser befallenden Milben hängt von der Feuchtigkeit und der Temperatur der Umwelt ab. Sie befallen adulte und verschiedene Entwicklungsstadien und Eier. Ihre Verwendung stellt für die Bienen ein Risiko dar, da sie sich mit Vorliebe mit den Eiern der Bienen füttern.

Material und Methode

Identifizierung der Krankheitserreger

Einsammeln der Milben

Die *Varroa-destructor*-Milben wurden schon seit 1999 aus den Bienenständen von Radnice (Westtschechien) eingesammelt. Die *Apis-mellifica*-Bienenvölker waren in Beuten untergebracht, auf deren Boden sich ein Bodenbrett mit Mull (Mesh \varnothing 10 mm) und über diesen ein anderer Mull befand (Mesh \varnothing mm) (Abb.1).

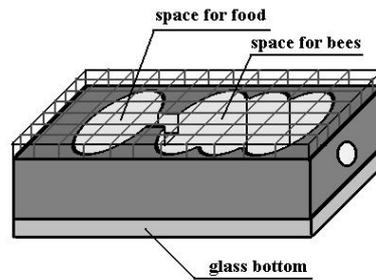


Abb.1 – Laborkäfig (schematische Darstellung)
Space for food = Futterstelle, space for bees – Bienenraum, glass bottom – Glasboden

Die eingegangenen Weibchen blieben am Bodenbrett kleben, ohne von den Bienen entfernt werden zu können. Die Bodenbretter wurden beobachtet und die Milben mit einem Stereomikroskop analysiert. Die pathologischen Veränderungen äußerten sich durch eine schwarze Färbung oder durch das Wachsen von Pilzen auf ihrer Oberfläche.

Isolierung

Die eingegangenen *Varroa-destructor*-Weibchen, bei denen ein pathologischer Vorgang vermutet wurde, wurden mit Äthylalkohol (70%) behandelt und danach in die Hälfte sektioniert. Ein Teil kam in 1 ml Kochsalzlösung, der andere in ein Probierröhrchen bei 4 °C, um später analysiert zu werden. Der Milbenteil in Kochsalzlösung wurde 2 Stunden in einen Brutschrank bei 36 °C getan. Danach wurde auf einer Petrischale inokkuliert und bei 36 °C inkubiert.

Bei der Bakterienkultur wurde Columbiaagar mit 5% SB verwendet, bei den Pilzen Sabouraudagar mit Dextrose.

Versuchsteil

Versuchsinfektionen

Das Inokkulum, das 1×10^7 Zellen in mm^3 der Kochsalzlösung mit 5% Glukose enthielt, wurde auf die von *Varroa destructor* befallenen Bienen im Laborkäfig gesprüht (Abb.1). Der obere Teil der Käfige bestand aus Mull (Mesh \varnothing 0,5 mm), der untere Teil aus Glas. In diesem Laborkäfig befanden sich 40 Bienen und 15 Milben. Sie wurden mit einer bakterienfreien Kochsalzlösung plus 5% Glukose besprüht.

Isolierung

Die eingegangenen Milben wurden dem Laborkäfig entnommen und ihre Oberfläche wurde auf die gleiche Weise desinfiziert wie bei den normal abgefallenen Milben. Danach wurde das Idiosoma durchgestochen und die gewonnene Flüssigkeit wurde kultiviert und mit dem Mikroskop analysiert.

Ergebnisse

Die Milben mit pathologischen schwarzen Flecken auf ihrem Darm wurden in dem Gemüll gefunden (Abb.2). Das Komplex der distalen und seitlichen Darmdiventrikeln war mit einer schwarzen einheitlichen harten Flüssigkeit gefüllt. Diese Flüssigkeit wurde gemäß der beschriebenen Methoden kultiviert.

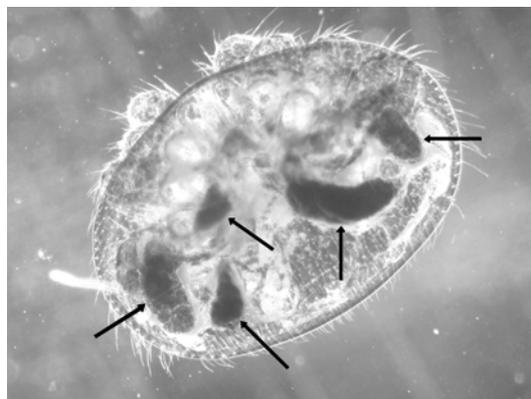


Abb.2 – *Varroa destructor* mit massiver schwarzer Substanz in den Darmdiventrikeln.
(Originalpräparat, Stereomikroskop, 20X Vergrößerung)

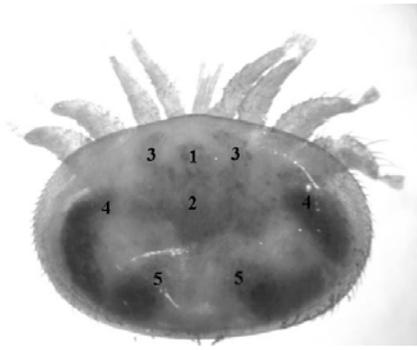


Abb.3 – Schwarze Substanz im Verdauungstrakt und schwarze Formationen in den distalen und seitlichen Darmdiventrikeln.
1 – Oesophag, 2 – proximaler Darmdiventrikel, 3 – vorderes Mezentheron, 4 – seitliches Darmdiventrikel, 5 – distaler Darmdiventrikel
(Originalpräparat, Stereomikroskop, 20X Vergrößerung)

Von diesen Milben wurden folgende Mikroorganismen isoliert:

Pilze: *Aspergillus flavus*,
Mucor ramosissimus,
Mucor indeicus,
Mucor hiemalis,
Penicillium multicolor,
Penicillium simplicissimum

Bakterien: *Enterobacter cloacae*,
Staphylococcus albus.

Das Besprühen der Bienen mit dem aus den isolierten Mikroorganismen präpariertem Inokkulum bewies, daß *Enterobacter cloacae* ein Erreger ist, der bei den Milben eine Infektion verursachen kann. Die Mortalität bewegte sich zwischen 70 und 88,9%. Die Milben gingen in 48 bis 72 Stunden ein, wobei sich ihr Idiosoma spezifisch aufblähte. Die Membran zwischen dem ventralen Genitalschild und dem Sternalschild war gewöhnlich beschädigt und eine Flüssigkeit floß heraus (Abb.4). Die Flüssigkeit wurde mit einer sterilen hypodermischen Nadel aus einem intakten Idiosoma aufgesogen und *Enterobacter cloacae* sowohl mikroskopisch als auch in der Bakterienkultur festgestellt.



Abb.4 – Pathologische Veränderungen einer Malpighi Röhre nach der künstlichen Ansteckung – als Folge Bersten der Membran zwischen den dorsalen und metapodalen Schildern.

1 – Aufschwellen der rechten Malpighi Röhre, 2 – Dorsalschild, 3 – Metapodalschild
(Originalpräparat, Stereomikroskop, 20X Vergrößerung)

Die Mortalität der Milben aus den Kontrollkäfigen betrug 0 – 45% (Durchschnitt 15,9%). Die Mortalität anderer in den Laborkäfigen getesteten isolierten Mikroorganismen ergab keine Pathogenität:

	durchschn. Mortalität
<i>Aspergillus flavus</i>	22,5%,
<i>Mucor ramosissimus</i>	25,2%,
<i>Mucor indicus</i>	22,1%,
<i>Mucor hiemalis</i>	18,6%,
<i>Penicillium multicolor</i>	12,5%,
<i>Penicillium simplicissimum</i>	18,6%,
<i>Staphylococcus albus</i>	23,8%.

Alle Ergebnisse wurden mit einer Kontingenztafel statistisch analysiert, wobei $p > 0,95$.

Enterobacter cloacae wuchs 12 Stunden nach der Inokkulation auf Columbiaagar. Die Kolonien waren rund, 2-4 mm groß, hatten eine dicke Mitte, waren grau und von schleimiger Konsistenz. Die Bakterien waren gramnegativ, hatten das Aussehen von kurzen Stäbchen und Ausmaße von 0,5-1 x 1-2 µm, wie es im Mikroskop ersichtlich war. Ihre Identifizierung wurde durch biochemische Tests bestätigt. Unsere

Ergebnisse wurden durch die Tschechische Mikroorganismen-Sammlung (Masaryk-Universität in Brno) bestätigt, wo dieser Stamm erneut identifiziert wurde.

Enterobacter cloacae entwickelte sich sehr gut auf einem Nähragar (1% Kalbextrakt, 1% Pepton, 0,5% NaCl, 2% Agar, pH 7,2), der in Zukunft für eine industrielle Produktion verwendet wird.

Tabelle I

Biochemische Aktivität von *Enterobacter cloacae*

	Standardergebnisse für <i>Enterobacter cloacae</i>	Ergebnisse des Stammes, aus <i>Varroa destructor</i> isoliert
Urease	d	+
Indol	-	-
Phenylalaninaminase	-	-
H ₂ S	-	-
VP	+	+
Gelatine (22 C)	-	-
Malonat	D	+
Dulzit	(d)	-
Raffinose	+	+
Rhamnose	+	+
Trehalose	+	+
Mannitol	+	+
Saccharose	+	+
Glukose/Gas	+	+

- = < 10% positive Stämme, (d) = 11-50% positive Stämme, d = 51-89% positive Stämme, + = >90% positive Stämme

Tabelle II

Biochemische Aktivität der Spezies *Enterobacter*

	Argininhydrolase	Lysin-dekarboxylase	Ornithin-dekarboxylase	Adonitol	Sorbitol
<i>E. aerogenes</i>	-	+	+	+	+
<i>E. agglomerans</i>	-	-	-	-	d
<i>E. sakazakii</i>	+	-	+	-	-
<i>E. gergoniae</i>	-	+	+	-	-
<i>E. cloacae</i>	+	-	+	d	+
Aus <i>Varroa</i> isolierter Stamm	+	-	+	+	-

- = <10% positive Stämme, (d) = 11-89% positive Stämme, d = 51-89% positive Stämme, + = >90% positive Stämme

Diskussion

Enterobacter cloacae wurde von JORDAN 1891 beschrieben. 1910 schildert D'HERELLE diese Bakterie als einen Krankheitserreger der Insekten auf der Yucatan-Halbinsel. Er nannte sie *Coccobacillus acridiorum*. Dieser Stamm verursachte Epizootien der Heuschrecken, die massiv von Mexiko nach Yucatan migrierten. Die Forscher stellten bei den Heuschrecken schwarzfarbige Veränderungen und die Zersetzung des Epitheliums der Verdauungsorgane fest. 8 Stunden nach der Ansteckung waren die Heuschrecken tot. Die Virulenz der Bakterie stieg nach aufeinanderfolgenden Passagen an (D'HERELLE, 1911, 1912).

D'HERELLE verwendete zwischen 1910 und 1912 die von ihm isolierte Bakterie bei der biologischen Bekämpfung der Heuschrecken in Algerien, Argentinien und Tunesien (D'HERELLE, 1911, 1912).

Während 1914-1916 waren SERGENT und L'HÉRITIER gezwungen, die Zahl der Passagen zu vergrößern (von 12 auf 50), damit die Insekten in 8 Stunden nach der Ansteckung eingehen. Seit damals wurde kein einziger Stamm von solch einer Virulenz wie der von D'HERELLE isolierte erhalten (WEISER, 1966).

Wir bewiesen, daß der im Verdauungstrakt der Milbe *Varroa destructor* aufgefundene *Enterobacter cloacae* für diese pathogen ist. CHANDLER führte in seiner Übersicht diese Bakterie nicht als eines der biologischen Bekämpfungsmittel von *Varroa destructor* an (CHANDLER et al., 2001).

Taxonomisch wird *Enterobacter cloacae* als gramnegativ, aerobisch und nicht sporenbildend definiert. Ihre antigene Struktur ist ein typisches Mosaik. Ihre optimale Wachstumtemperatur bewegt sich zwischen 30 und 37 °C. Eine Temperatur von 100 °C tötet sie in 2 Minuten. Die für die Spezies *Enterobacter cloacae* typische biochemische Aktivität ist in den Tabellen angeführt.

LITERATUR

- Anderson D.L., Trueman J.W.H. (2000) *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species, *Experimental and Applied Acarology* 24, 165-189
- Bircher S. et al. (1990) *Medical Microbiology*, The C.V. Mosby Company, Maning, USA.
- Camazine S., Liu T.P. (1998) A putative iridovirus from the honey bee mite, *Varroa jacobsoni* Oudemans, *Journal of Invertebrate Pathology* 71, 177-178.
- Chandler D., Sunderland K.D., Ball B.V., Davidson G. (2001) Prospective Biological Control Agents of *Varroa destructor* n.sp., an Important Pest of the European Honeybee, *Biocontrol Science and Technology* 11, 429-448.

- Glinski Z.F., Jarosz J. (1990) Micro-organisms associated fortuitously with *Varroa jacobsoni*, *Microbios* 62, 59-68.
- Goettel M.S., Johnson D.L. (1992) Environmental impact and safety of fungal biocontrol agents, in Lomer C.J. (Ed.), *Biological control of locusts and grasshoppers*, International Wallingford, pp. 356-361.
- Hall I.M., Hunter D.K., Arakawa K.Y. (1971) The effect of the β -exotoxin fraction of *Bacillus thuringiensis* on the citrus red mite, *Journal of Invertebrate Pathology* 18, 359-362.
- D'Herelle F.H. (1911) Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur les sauterelles du Mexique, *C.R.Acad.Sci.* 152, 1413-1415.
- D'Herelle F.H. (1912) Sur la propagation dans la République Argentine de l'épizootie des sauterelles, *C.R.Acad.Sci.* 152, 1413-1415.
- Kanga L.H.B., James R.R., Boucias D.G. (2002) *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential microbial control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite, *Journal of Invertebrate Pathology* 81, 175-184.
- Kleespies R.G., Radtke J., Bienefeld K. (2000) Virus -like particles found in the ectoparasitic bee mite *Varroa jacobsoni* Oudemans, *Journal of Invertebrate Pathology* 15, 87-90.
- Lindberg C.M., Melathopoulos A.P., Winston M.L. (2000) Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite, *Journal of economic entomology* 93(2), 189-198.
- Liu T.P., Ritter W. (1988) Morphology of some microorganisms associated with the female mite *Varroa jacobsoni*, a survey by electron microscopy, in Needham E. et al. (Ed.), *Africanized honeybees and bee mites*, Ellis Horwood, Chichester, pp. 467-474.
- Martignoni M.E. (1984) Baculoviruses: an attractive biological alternative, in Burges H.D. (Ed.), *Chemical and Biological Controls in Forestry*, Seattle Washington, pp. 55-67.
- Weiser J. (1966) *Nemoci hmyzu*, Academia, Praha.