

**TÍTULO DEL PROYECTO:** Evaluación de los efectos de la exposición crónica de las colonias de *Apis mellifera iberiensis* a los principales agentes nosógenos presentes en las colmenas. Propuesta de medidas paliativas.

**Entidades participantes:** Centro de Investigación Apícola y Agroambiental de Marchamalo CIAPA-IRIAF, Universidad Complutense de Madrid, INIA.

**Investigador Coordinador (OPI al que pertenece):** Mariano Higes Pascual. CIAPA-IRIAF.

**TÍTULO DEL SUBPROYECTO PARTICIPADO POR EL IRIAF:** Modelización de los efectos crónicos de los agentes nosógenos más frecuentes en la apicultura nacional.

**Organismo Financiador:** AEI ejecutado por el INIA

**Duración:** desde: 01/2018 hasta: 31/12/2021

**Nº de Proyecto:** RTA2017-00004-C02-01

**Financiación:** Total: 197.151€ / Subproyecto IRIAF: 96.171 €

#### PERSONAL INVESTIGADOR DEL SUBPROYECTO PARTICIPADO POR EL IRIAF:

EQUIPO PARTICIPANTE	SITUACIÓN ADMINIST. (*)	DEDICACIÓN (UNICA O COMPARTIDA)	CENTRO
<b>INVESTIGADOR PRINCIPAL:</b> Mariano Higes Pascual	Funcionario	Compartida	CIAPA-IRIAF
<b>PERSONAL INVESTIGADOR:</b> Raquel Martín Hernández Amelia V. González Porto Carlos García-Villarrubia Almudena Urbietta Elena Alonso Prados Pilar García Palencia	Contratada Contratada Funcionario Investigado en formación Funcionario Funcionario	Compartida Compartida Compartida Compartida Compartida Compartida	Investigadora INCRECYT en CIAPA CIAPA-IRIAF CIAPA-IRIAF CIAPA-IRIAF INIA FACULTAD VETERINARIA UCM

#### OBJETIVOS

**Objetivo 1:** Establecer el valor de la **DL50 oral crónica** para los diferentes individuos de la colonia de abejas, fundamentalmente obreras y larvas, de los plaguicidas más frecuentes en el polen almacenado (pan de abeja o beebread), a saber cumafos, fluvalinato, clorvenfinfos, acrinatrina y clorpirifos, más los residuos que se detecten en láminas de cera estampada comercial en el objetivo 1 del subproyecto 2. Determinar posible acción sinérgica entre ellos.

**Objetivo 2:** Establecer la **posible acción sinérgica** entre estas **sustancias** y alguno de los **patógenos** más prevalentes, como *Nosema ceranae* y *Lotmaria passim*, en base a los valores determinados de DL50 crónica y mediante experimentos de exposición crónica.

**Objetivo 3:** Estudio de la evolución de los agentes nosógenos en colmenas sometidas a un manejo apícola estándar, en condiciones de campo y bajo diferentes escenarios (presencia/ausencia de plaguicidas y patógenos) en colaboración con el subproyecto 2 objetivos 2 y 3. Modelización del impacto de éstos agentes sobre las colonias de abejas y propuesta de medidas correctoras.

## RESULTADOS FINALES

El proyecto concluye en diciembre de 2021

Resultados parciales:

**PT1 (Paquetes de Tareas): Determinación de la DL50 oral crónica en abejas.**

### Tarea 1.2: Determinación de valor de la LDD 50 crónica en individuos adultos

Durante esta anualidad se han realizado tres ensayos de toxicidad crónica siguiendo las recomendaciones de las "OECD Guideline for testing chemicals. Honey bee (*Apis mellifera*) chronic oral toxicity test 10 day feeding test y laboratory conditions".

Para la realización de los ensayos de toxicidad se seleccionaron los compuestos: tau-fluvalinoto, cumafos, cholorfenviphos, chlorpyrifos, por ser los xenobióticos más frecuentes en las diferentes matrices de las colmenas (cera y polen almacenado). El dimetoato fue utilizado como sustancia de referencia.

Para considerar el ensayo válido, la mortalidad de las abejas expuestas a las sustancias en ensayo y de referencia debe ser  $\geq 50\%$  y en el control  $\leq 10\%$ .

Se prepararon 3 réplicas de 10abejas por tratamiento ensayado.

Las abejas se mantuvieron en una estufa a 33°C y 61% humedad relativa durante todo el experimento.

Las soluciones de sacarosa utilizadas para alimentar a las abejas y adicionadas o no con las sustancias a ensayar, fueron preparadas en el SIDI – UAM para asegurar las dosis a ensayar. Las soluciones se prepararon un día antes de su aplicación y se mantenían a -20°C hasta su llegada al laboratorio de CIAPA-IRIAF donde:

- 1.- Las soluciones se atemperaban y se dejaban alícuotas de 1 ml preparadas para alimentar cada día a cada uno de los replicados con abejas. Los alimentadores se mantenían congelados hasta su uso a  $< -20^{\circ}\text{C}$ .
- 2.- Cada día del ensayo, las alícuotas se atemperaban, para evitar el rechazo por las abejas, y se determinaba su peso.
- 3.- Cada día se pesaba el sobrante con el fin de valorar el consumo y se volvía a congelar a  $< -20^{\circ}\text{C}$  para su determinación analítica.

Los principales resultados y conclusiones para cada uno de los ensayos se resumen a continuación.

## Ensayo 1: marzo 2019: Ensayo preliminar con dimetoato y fluvalinato

Se realizó un ensayo preliminar de toxicidad para el tau-fluvalinato y el dimetoato como sustancia de referencia, con el fin de determinar:

a) El efecto de los diferentes tratamientos en el consumo y la mortalidad acumulada de abejas.

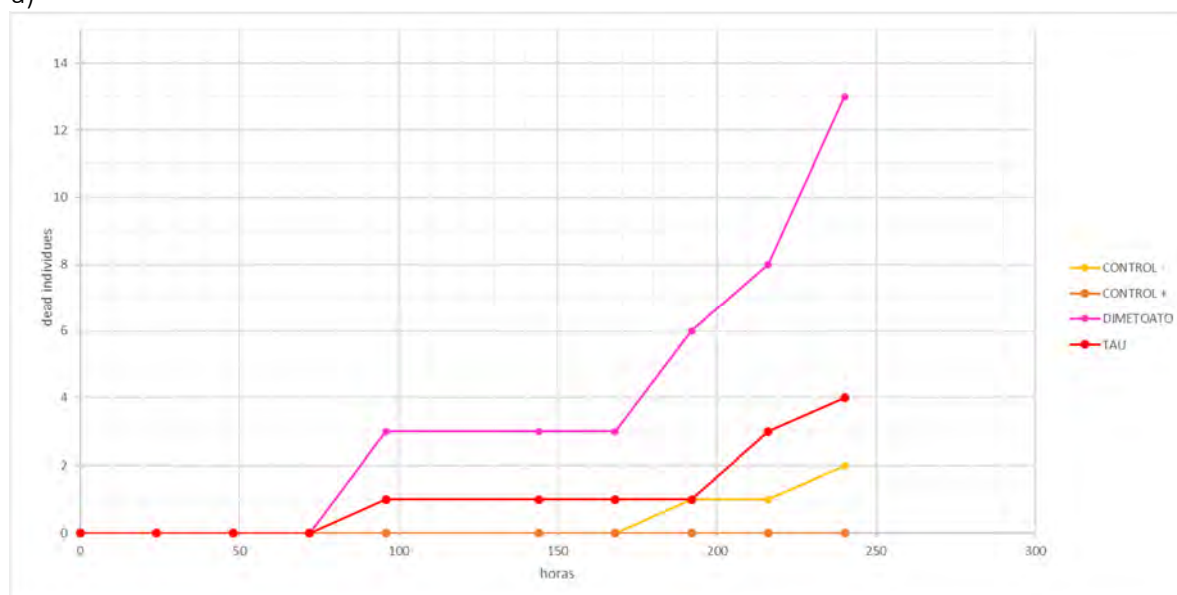
b) La dosis mínima de la sustancia de referencia para validar el ensayo de toxicidad. En este ensayo preliminar se ensayó la dosis mínima de la sustancia de referencia (dimetoato) establecida en el protocolo (0.5 mg/bee/d).

c) El efecto de la evaporación en las condiciones del experimento.

### a) Efecto de los diferentes tratamientos en el consumo y la mortalidad acumulada

En la figura 1 se muestra la mortalidad y consumo medio acumulados en el experimento

a)



b)

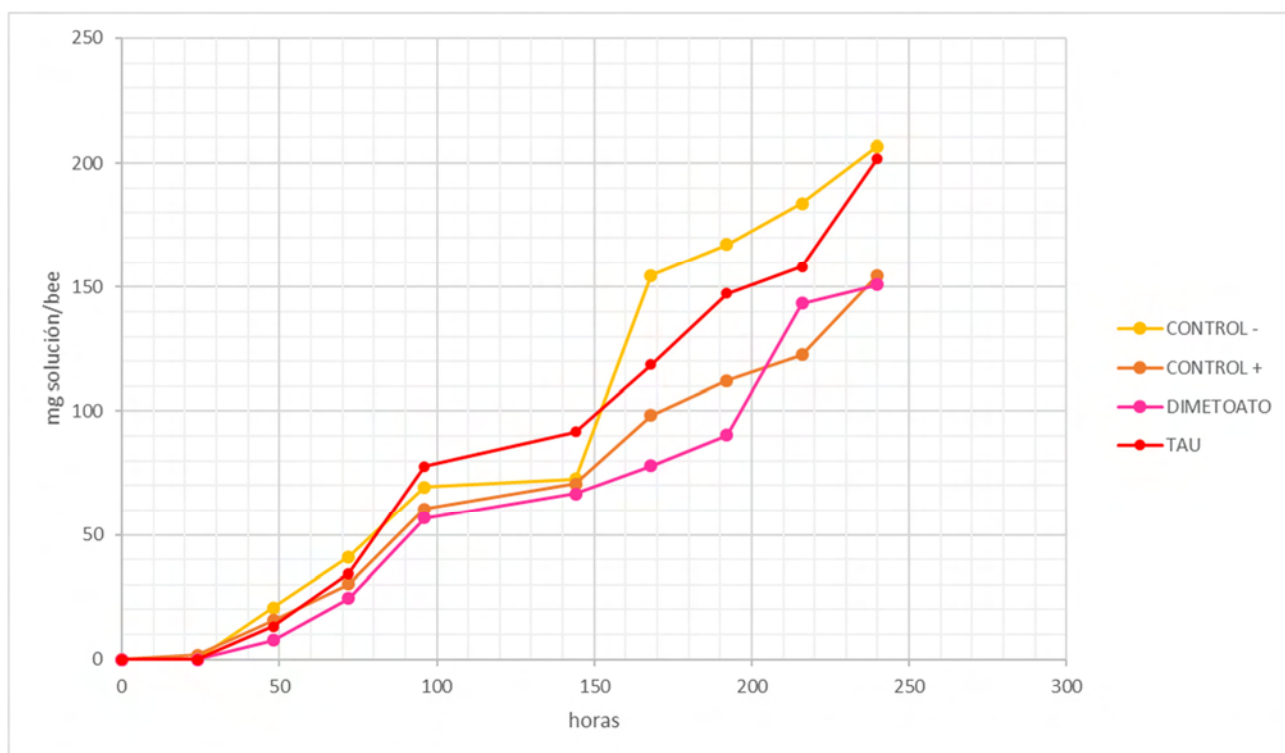


Figura 1 a) mortalidad acumulada y b) consumo medio acumulado en el 1<sup>er</sup> ensayo de toxicidad crónica realizado con tau fluvalinato a una concentración de 77.5 ppm y dimetoato a una concentración de 0.5 mg/kg

La mortalidad acumulada al final del ensayo en los diferentes tratamientos (Figura 1a) fue como sigue:

- 1.- 6% en el caso del control – y 0% en el caso del control +.
- 2.- En la sustancia de referencia fue del 43.3%.
- 3.- En el caso del tau-fluvalinato a una concentración del 77.5 ppm, del 13.3%.

El consumo medio acumulado al final del ensayo varió entre 206 mg/bee 151 mg/bee (Figura 1b y tabla 1)

Tabla 1: Consumo medio acumulado en los diferentes tratamientos considerados en el 1<sup>er</sup> ensayo de toxicidad.

horas	CONTROL -	CONTROL +	DIMETOATO	TAU FLUVALINATO
0	0,00	0,00	0,00	0,00
24	0,20	1,68	0,00	0,00
48	20,80	15,75	7,75	13,21
72	41,18	30,34	24,46	34,39
96	69,27	60,50	56,69	77,83
144	72,78	70,64	66,66	91,61
168	154,69	98,41	77,89	118,64
192	167,26	112,20	90,33	147,27
216	183,75	122,71	143,29	158,23
240	206,84	154,71	150,92	201,98

b) Dosis de la sustancia de referencia (dimetoato).

Teniendo en cuenta que la mortalidad al final del ensayo fue del 43% a una concentración de 0.5 mg/kg, se decidió incrementar esta concentración a 0.7 mg/kg en los ensayos siguientes para cumplir con el criterio de validación del protocolo OCDE.

c) Efecto de la evaporación en las condiciones del experimento.

Adicionalmente se prepararon 3 réplicas de control negativo (sin acetona que es el solvente utilizado para vehiculizar los xenobióticos) y otras de control positivo (con acetona), sin abejas para valorar el efecto de la evaporación en las condiciones del experimento (30° C y 61%HR).

La evaporación media en el ensayo varió entre 1.4% y 5.6%, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre las evaporaciones del control + y control – (Kolmogorov-Smirnov,  $P < 0.0001$ ), evaporándose más el jarabe con acetona.

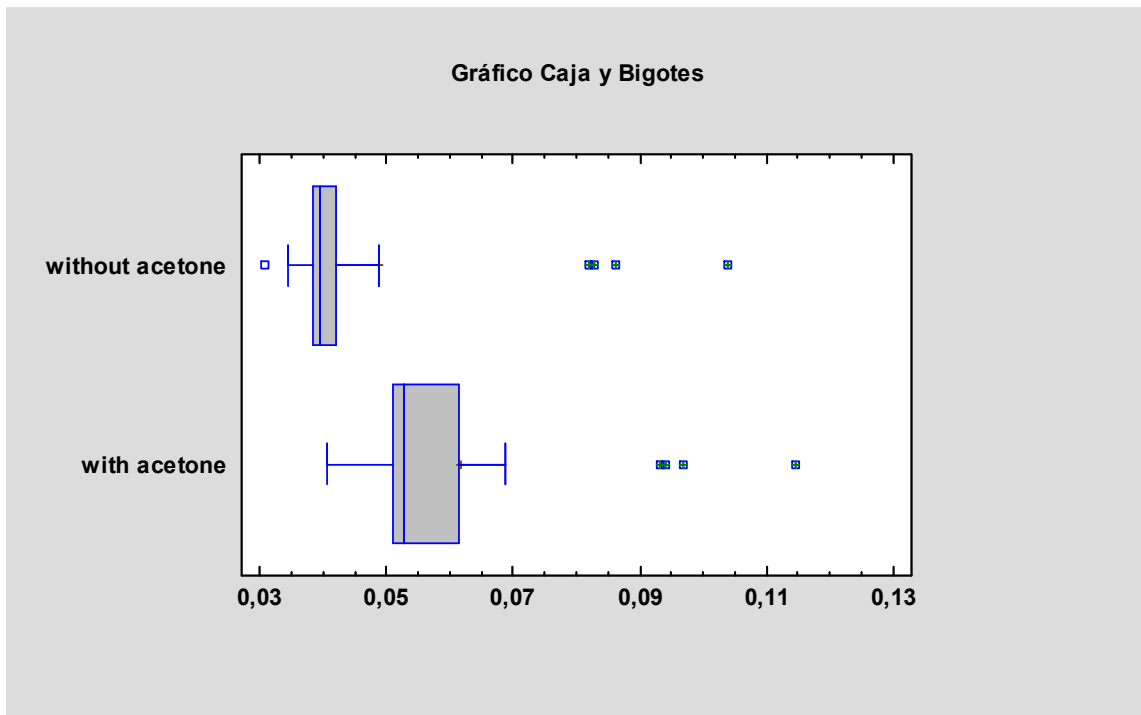


Figura 2.- Comparación de medianas en controles (sin abejas) para medir la evaporación.

Los datos de consumo fueron corregidos teniendo en cuenta estos valores.

### Ensayo 2: Abril 2019 : Ensayo de toxicidad definitivo con fluvalinato y preliminar con cumafós.

En base a los resultados anteriores se diseñó un nuevo ensayo de toxicidad con el tau-fluvalinato para la estimación de LDD50 y la NOEC del tau-fluvalinato. Se tomó como base la concentración de 77.5 ppm y un factor de 2.0 entre concentraciones. Las concentraciones testadas fueron: 78,156, 232, 350, 524 ppm. Adicionalmente, en base a la LD50 aguda del cumafós encontrada en la literatura, se realizó un ensayo preliminar con esta sustancia a una concentración de 59,8 ppm.

La mortalidad acumulada se muestra en la figura 3.

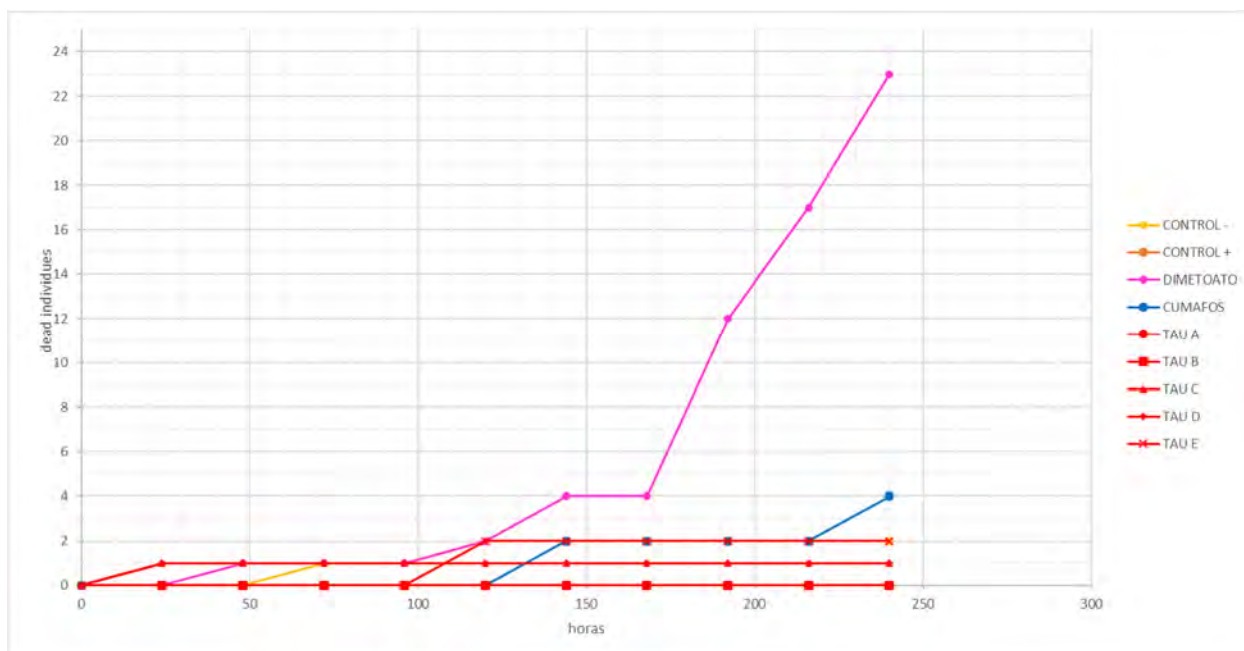


Figura 3.- Mortalidad acumulada en el 2º ensayo de toxicidad, realizado a diferentes concentraciones de tau fluvalinato (TAU A= 78 ppm; TAU B= 156 ppm; TAU C= 232 ppm; TAU D= 350 ppm; TAU E= 524 ppm) y a 59.8 ppm de cumafós.

La mortalidad acumulada a una concentración de 0.7 mg/kg de dimetoato fue de 76.6% y del 6,6% y 0% para el control negativo y el control positivo, respectivamente.

La mortalidad acumulada a las diferentes concentraciones de tau fluvalinato estuvo en el rango de los controles, y en el caso del cumafós la mortalidad acumulada fue del 13,3%



El consumo medio acumulado de jarabe en los diferentes tratamientos, se muestra en la siguiente figura:

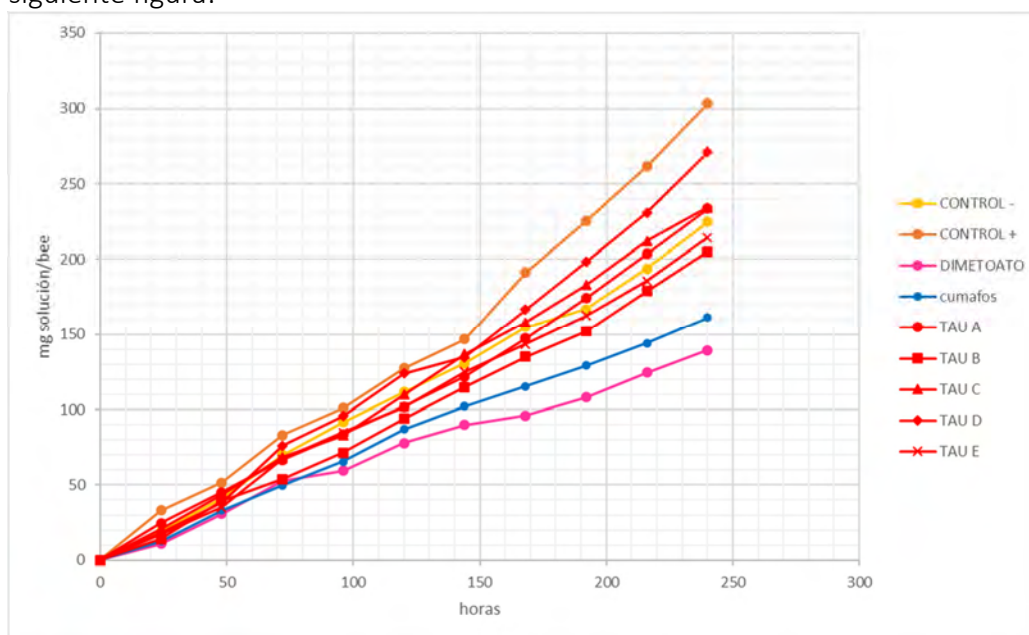


Figura 4: Consumo medio acumulado (corregido el efecto de evaporación) en los diferentes tratamientos del 2º ensayo de toxicidad. Compuestos ensayados: tau fluvalinato (TAU A= 78 ppm; TAU B= 156 ppm; TAU C= 232 ppm; TAU D= 350 ppm; TAU E= 524 ppm), cumafos (59.8 ppm) y dimetoato (0.7 mg/kg)

Se observa que el consumo en el caso del tau estuvo en el rango de los controles, siendo menor en el caso de cumafos y dimetoato.

Aunque se observaron efectos subletales a todas las concentraciones ensayadas, no se pudo derivar la LDD50 ni una NOEC del tau-fluvalinato.

En base a estos resultados se decidió:

- Hacer una analítica de los sobrantes de las diferentes dosificaciones de jarabes para comprobar la estabilidad de los compuestos durante el ensayo.
- Realizar un tercer ensayo incrementado las concentraciones: considerando como dosis más baja 500 ppm y un factor de 2.0 entre concentraciones.
- 

### Estudio analítico de las muestras

Para comprobar analíticamente las concentraciones a las que se exponían las abejas individuales se contactó con el SIDI-UAM para realizar las correspondientes analíticas. En primer lugar, se realizó un scan de los estándares de los compuestos.



Los cromatogramas a 10 ppbs de se muestran en la figura 5:

Print Date: 04 Feb 2019 16:05:31

**Chromatogram Plots**

File: ...muestras 2019\febrero\lctq190047\_01\_6416.d\lctq190047\_01\_6416.d.xmls  
Sample: LCTQ190047  
Scan Range: 1 - 27020 Time Range: 0.02 - 10.40 min.  
Sample Notes: NE: 01349. Patron-mezcla T-F, DMT, CFVP, CMP y CPF I 10ppb aprox

Operator:  
Date: 2/4/2019 12:58 PM

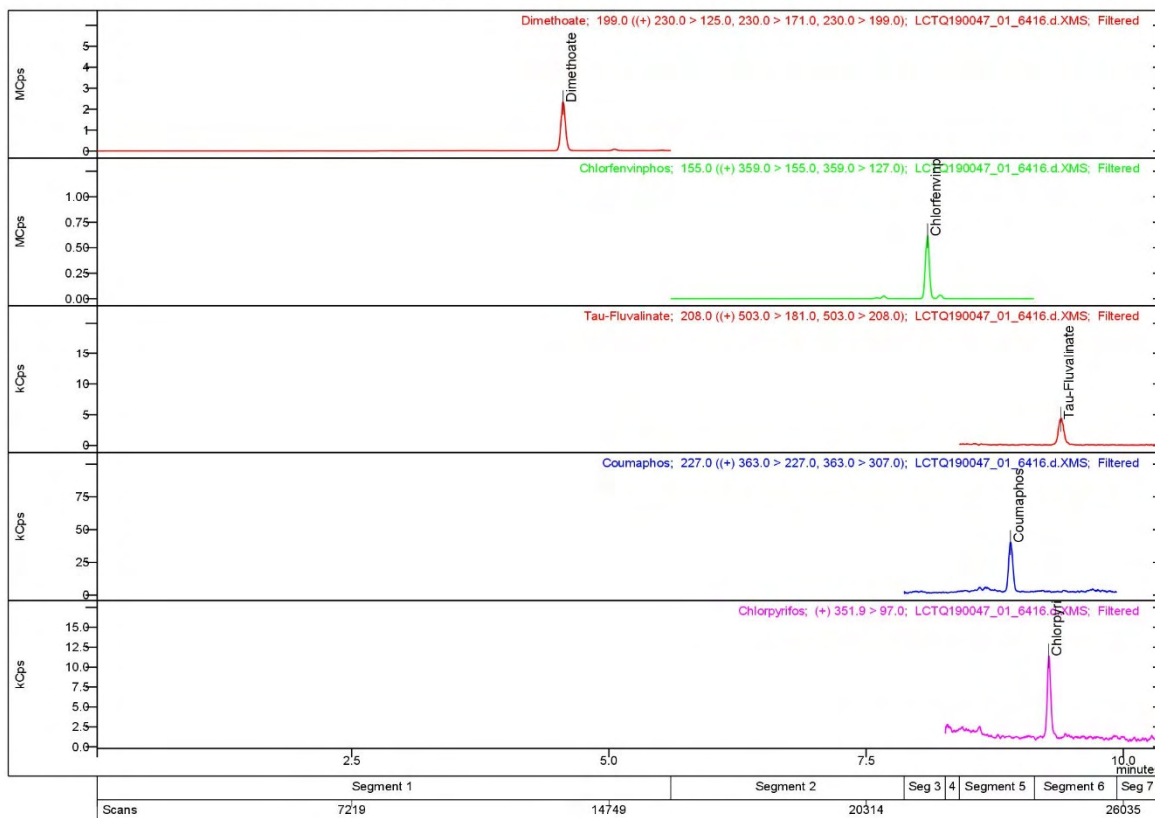


Figura 5.- Cromatogramas con los tiempos de retención de los estándares de los compuestos seleccionados para los estudios de toxicidad crónica en individuos adultos de *Apis melifera iberiensis*.

La analítica cualitativa de las muestras del segundo ensayo se realizó en LC/MS. De cada una de las soluciones preparadas, una alícuota se mantuvo congelada a -20°C en el SIDI UAM para posteriores comprobaciones analíticas.

Un resumen de los resultados se muestra en las tablas siguientes:

Tabla 2: Comprobación analítica de concentraciones de dimetoato (0.7 mg/kg) en el 2 ensayo de toxicidad. Datos en unidades de área

horas	Muestra fresca		Muestra congelada mantenida en SIDI UAM			Muestras de ensayo		
	u. área	CV%	u. área	CV%	% (1)	u. área	CV%	% (1)
	490676± 89507	18	732671± 85793	12	100			
24						228240± 125360	55	31
24						94350 ± 29369	31	13
24						106550 ± 25499	24	15
96						47453± 1361	3	6
96						62446± 27743	44	9
96						160742± 20667	13	22
240						965776±224127	23	132
240						36238±1938	5	5
240						163038± 34034	21	22
	u. área	CV%	u. área	CV%	% (1)	u. área	CV%	% (1)
	10886667±287460	3	764334±26397	3	7			
24						813540± 22408	3	7
24						731370± 201919	28	7
24						715703± 83640	12	7
96						1337333± 254551	19	12
96						815019± 143937	18	7
96						793918± 7598	1	7
240						678630± 84806	12	6
240						681677± 38909	6	6
240						705942± 33593	5	6

(1) % área de pico con respecto a la muestra fresca

Tabla 3: Comprobación analítica de concentraciones de tau fluvalinato (524 ppm) en el 2 ensayo de toxicidad. Datos en unidades de área

(1) % área de pico con respecto a la muestra congelada mantenida en el SIDI- UAM

Tabla 4: Comprobación analítica de concentraciones de coumafos (59.8 ppm) en el 2 ensayo de toxicidad. Datos en unidades de área

horas	Muestra fresca		Muestra congelada mantenida en SIDI UAM			Muestras de ensayo		
	u. área	CV%	u. área	CV%	% (1)	u. área	CV%	% (1)
	1244333± 36019	3	1669500± 64347	4	100			
24						1750333± 341368	20	105
24						3182667± 805928	25	191
24						2141000± 330828	15	128
96						5408667± 812691	15	324
96						3107000± 488347	16	186
96						3655667± 615149	17	219
240						2876000± 176511	6	172
240						1339333± 365098	27	80
240						1165333± 65516	6	70

(1) % área de pico con respecto a la muestra congelada mantenida en el SIDI- UAM

Los resultados muestran una diferencia significativa entre las áreas de los cromatogramas de las muestras frescas y las mantenidas congeladas en todos los casos. Con una mayor variación en el caso del tau fluvalinato y coumafos. Estos resultados muestran un posible problema de homogeneidad de los compuestos en el jarabe en las muestras congeladas.

Adicionalmente, el SIDI UAM realizó una prueba de estabilidad de los compuestos en una solución acuosa de sacarosa al 50% w/w (alimento que se da a las abejas y es el vehículo de los tóxicos), mantenida a 4 °C durante 7 días. Los resultados (Tabla 2) mostraron la necesidad de renovar la solución madre al menos una vez durante la duración del ensayo, dada la degradación de las sustancias en las condiciones experimentales:

Tabla 2.- Resultados de los ensayos de estabilidad de los compuestos en una solución acuosa de sacarosa al 50% w/w.

	Dimethoate (%Area)	T- Fluvalinate (%Area)	Chlorfenvinphos (%Area)	Coumaphos (%Area)	Chlorpyrifos (%Area)
día 1	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
día 2	100,2	99,4	101,5	89,6	94,1
día 3	100,0	91,3	101,2	91,4	92,8
día 4	93,7	82,9	100,9	86,0	81,7
día 5	85,9	72,0	91,7	85,4	73,9
día 6	81,8	67,2	92,2	89,8	70,2
día 7	70,1	66,0	76,4	72,4	51,7

En base a estos resultados se decidió mantener las soluciones de jarabe tratadas refrigeradas a 4 °C antes de su uso en los siguientes ensayos de toxicidad y sustituirlas cada 4 d para mantener la estabilidad.

### Ensayo 3: Mayo 2019: Nuevo ensayo de fluvalinato con soluciones refrigeradas.

Las dosis testadas en este ensayo fueron: 500 y 1000 ppm

Los tratamientos se renovaron 3 veces durante el ensayo:

	Preparación en SIDI UAM	renovación
1	-1 d	0 d
2	72 h	96 h
3	192 h	192 h

Los resultados se muestran en las figuras siguientes

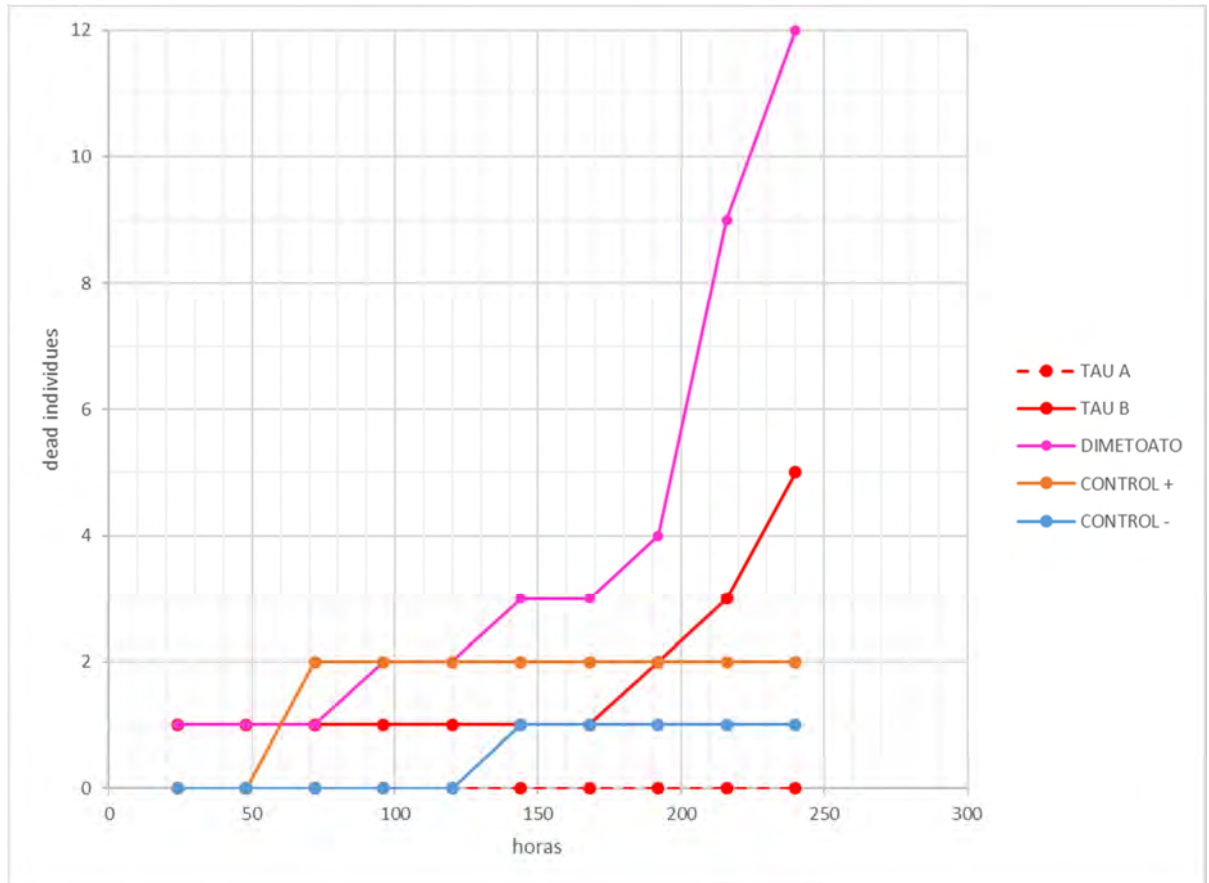


Figura 5.- Mortalidad acumulada en el 3er ensayo de toxicidad, realizado a diferentes concentraciones de tau fluvalinato (TAU A= 500 ppm; TAU B= 1000ppm) y a 0.7 mg/kg de dimetoato

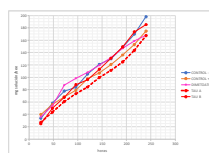


Figura 6: Consumo medio acumulado (corregido el efecto de evaporación) en los diferentes tratamientos del 3er ensayo de toxicidad. Compuestos ensayados: tau fluvalinato (TAU A=500 ppm; TAU B= 1000 ppm) y dimetoato (0.7 mg/kg)

En las tablas siguientes se muestran los resultados analíticos:

Tabla 5: Comprobación analítica de concentraciones de dimetoato (0.7 mg/kg) en el 3 ensayo de toxicidad. Datos en unidades de área

preparación	inyección	Muestra refrigerada mantenida en SIDI UAM			Muestras de ensayo			
		u. área	CV%	%		u. área	CV%	% (1)
13/05	13/05	860473± 17584	2	100				
13/05	14/05	767496± 150000	20	89				
13/05	16/05	744867± 119120	16	87				

	18/05				48 h (15/05)	768559± 135264	18	89
					48 h	721459±142225	20	84
					48 h	828628±72914	9	96
16/05	16/05	1017699± 241594	24	100				
16/05	17/05	1306000± 28792	2	128				
16/05	21/05	906847± 63856	7	69				
	23/05				168 h	564353±68218	12	55
					168 h (20/05)	594346±17625	3	58
20/05	21/05	630251± 50075	8	100				
	24/05				216 h (22/05)	725141±31571	4	115
	24/05				216 h	673293±74732	11	107

(1) % área de pico con respecto a la muestra recién preparada

Tabla 6: Comprobación analítica de concentraciones de tau fluvalinato (500 ppm) en el 3 ensayo de toxicidad. Datos en unidades de área.

preparación	inyección	Muestra refrigerada mantenida en SIDI UAM			Muestras de ensayo			
		u. área	CV%	%	u. área	CV%	% (1)	
14/05	14/05	55983± 2152	4	100				
	18/05				48h (15/05)	71312± 20345	29	127
	18/05				48h	69832± 19775	28	125
	18/05				48h	77505± 8928	12	138
16/05	16/05	389916± 33591	9	100				
	23/05				168 h (20/05)	191138± 10621	6	49
	23/05				168 h	158534± 6598	4	41
	23/05				168 h	59607± 2402	4	15
20/05		91190± 1422	2	100				
	24/05				216 h (22/05)	58497± 18933	32	64
	24/05				216 h	37136± 5520	15	41
	24/05				216 h	264761±33650	13	290



(1) % área de pico con respecto a la muestra recién preparada

Tabla 7: Comprobación analítica de concentraciones de tau fluvalinato (1000 ppm) en el 3 ensayo de toxicidad. Datos en unidades de área

preparación	inyección	Muestra refrigerada mantenida en SIDI UAM			Muestras de ensayo			
		u. área	CV%	%		u. área	CV%	% (1)
14/05	14/05	598028±180456	30	100				
	18/05				48h (15/05)	463183± 69871	15	77
	18/05				48h	141497±15458	11	24
	18/05				48h	227317±42451	19	38
16/05	16/05	346829±35114	10	100				
	23/05				168 h (20/05)	177210±10706	6	51
	23/05				168 h	89831±33446	37	26
	23/05				168 h	278088±43280	16	80
21/05	21/05	140639±12220	9	100				
	24/05				216 h (22/05)	215714±17753	8	153
	24/05				216 h	115223±25928	23	82
	24/05				216 h	111237±8717	8	79

En muestras refrigeradas se mejora la estabilidad del dimetoato, no así para el tau-fluvalinato, en la que se observa degradación, en parte, debido al lapso entre la preparación de la muestra y posterior analítica.

Atendiendo a los resultados analíticos obtenidos para tau-fluvalinato se están buscando alternativas para mejorar la estabilidad, homogeneidad de los compuestos en la solución de sacarosa, y puesta a punto de un protocolo para el manejo de las soluciones para la siguiente primavera. Así mismo, está planificado estudiar la estabilidad y homogenización de los compuestos en el alimento para determinar el valor de la LDD 50 crónica en larvas en la segunda anualidad.

**PT3: Estudio de la evolución de los agentes nosógenos en campo y modelización del efecto sobre las colonias de abejas, en colaboración con el subproyecto 2.**

**Tarea 3.1: Establecimiento de los colmenares experimentales en los diferentes escenarios**  
**Hito: Preparación de colmenares con láminas de cera con y sin residuos de plaguicidas. Obtención de colonias de abejas y comienzo del manejo apícola. Toma de muestras bimensual para ver evolución de agentes nosógenos.**

Dado lo excepcional del año climatológico y apícola (fuerte sequía y altas temperaturas en primavera/verano), no ha sido posible instaurar los colmenares experimentales, ya que no se han podido conseguir paquetes de abejas necesarios. Se contactó con un apicultor profesional de la CCAA de Valencia, que cuenta con experiencia en este tipo de tareas, con el fin de conseguir núcleos desnudos para introducir en colmenas nuevas, exentas de residuos de plaguicidas, en las que se introducirían las correspondientes láminas de cera libres de residuos. Sin embargo, en el mes de mayo y posteriormente en junio, el apicultor nos comunicó la imposibilidad de servirnos el citado material, no encontrando alternativas en ese momento tan avanzado del año.

De otra parte, se ha realizado un seguimiento de la evolución de residuos de acaricidas en cera y polen, en coordinación con el subproyecto 2, de 10 colmenas experimentales ubicadas en los colmenares experimentales de CIAPA. De estos se recogían ácaros Varroa ( $n = 45$ ) en las diferentes estaciones del año y se analizaban por PCR para determinar la presencia de ácaros mutantes resistentes a piretroides (Tau-fluvalinato) y determinar el efecto que la presencia de residuos de acaricidas tiene sobre la selección de ácaros resistentes.

Los primeros datos indican que la alta presión de selección que ejerce la presencia constante de Tau-fluvalinato en las diferentes matrices de la colmena (cera y polen almacenado, valores de hasta 1000 ppm en colmenas no tratadas con fluvalinato en 24 meses) determina la presencia constante en las colonias de abejas de ácaros resistentes a los piretroides.

## FORMACIÓN DE PERSONAL EN RELACIÓN AL PROYECTO.

Tesis doctoral en realización:

Título: no título actualmente.

Doctorando: María Benito Murcia

Directores de Tesis: Mariano Higes, Cristina Botías, Aránzazu Meana.