

Eficacia de dos acaricidas naturales, ácido fórmico y timol, para el control del ácaro *Varroa destructor* de las abejas (*Apis mellifera* L.) en Villa Guerrero, Estado de México, México

Effectiveness of two natural miticides, formic acid and thymol, for control of the mite *Varroa destructor* in honey bees (*Apis mellifera* L.) in Villa Guerrero, Mexico

Laura G. Espinosa-Montaño* Ernesto Guzmán-Novoa***

Abstract

This study was conducted to determine the effectiveness of two natural miticides, formic acid and thymol, for controlling infestations of the mite *Varroa destructor* in honey bee colonies (*Apis mellifera* L.). An apiary with 36 infested colonies was established and four groups of nine colonies each were formed. Treatments were assigned randomly to those groups as follows: 65% formic acid (group 1), 12.5 g of thymol per application (group 2), 25 g of thymol per application (group 3), and control colonies without treatment (group 4). At the end of the experiments, colonies were treated with four strips of a synthetic miticide (flumethrin) to kill remaining mites and to assess the relative effectiveness of the treatments tested. The highest effectiveness was obtained with two applications of 12.5 g of thymol (92.1%), whereas with the formic acid the effectiveness was 66.4%. Both miticides killed a significant number of mites ($P < 0.0001$), but their effectiveness decreased after the first application. The total cost of treating each colony was 70.81, 37.76 and 70.21 pesos (6.48, 3.45 and 6.42 dollars), for formic acid, thymol single concentration, and thymol double concentration, respectively. These results suggest the use of two treatments of a single concentration of a thymol-based product (12.5 g).

Key words: *APIS MELLIFERA* L., HONEY BEE, *VARROA DESTRUCTOR*, THYMOL, FORMIC ACID, STATE OF MEXICO.

Resumen

Se evaluó la eficacia de dos acaricidas naturales, el ácido fórmico y el timol, para el control del ácaro *Varroa destructor* en colonias de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.). Se establecieron 36 colonias infestadas con el ácaro y se dividieron en cuatro grupos con nueve repeticiones cada uno. El primer grupo fue tratado con ácido fórmico al 65%, el segundo recibió 12.5 g de timol por aplicación, el tercero fue tratado con 25 g de timol por aplicación, el cuarto no recibió tratamiento contra la parasitosis. Al final de los experimentos, las colonias fueron tratadas con cuatro tiras de un acaricida sintético (flumetrina) para matar a los ácaros remanentes y determinar la eficacia relativa de los acaricidas naturales. La mayor eficacia se obtuvo con dos aplicaciones de 12.5 g de timol (92.1%), mientras que con el ácido fórmico, la eficacia fue de 66.4%. Ambos acaricidas mataron un número significativo de parásitos ($P < 0.0001$), pero su eficacia disminuyó después de la primera aplicación. El costo total por colmena fue de 70.81, 37.76 y 70.21 pesos (6.48, 3.45 y 6.42 dólares), respectivamente, para tratamiento con ácido fórmico, timol concentración sencilla, y timol concentración doble. Estos resultados sugieren el uso de dos tratamientos con productos que contengan 12.5 g de timol como ingrediente activo principal.

Palabras clave: *APIS MELLIFERA* L., ABEJAS, *VARROA DESTRUCTOR*, ÁCIDO FÓRMICO, TIMOL, ESTADO DE MÉXICO.

Recibido el 19 de abril de 2006 y aceptado el 4 de octubre de 2006.

*Departamento de Producción Animal Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F., correo electrónico: laugespi@servidor.unam.mx

**Department of Environmental Biology, University of Guelph, Guelph, ON N1G2W1, Canadá.

Introduction

Varroosis in honey bees, *Apis mellifera* L., is an external parasitosis caused by the mite *Varroa destructor*.¹ It is the most serious worldwide problem that the beekeeping industry faces, since varroa parasitizes adult bees as well as brood.² The first report of the presence of this mite in Mexico was in Veracruz in 1992,³ while in the State of Mexico it was reported until 1994. Nowadays, *Varroa* is distributed practically all over the country.

The damage that varroosis causes depends on the infestation level of the affected colonies. Reports from other countries estimate that the negative effect over productivity starts when the mite population reaches 10% of the adult bees in a colony. When infestations increase up to 30% to 40%, it usually leads to the death of the colony.² The development of infested brood is also affected because emerged bees have a low weight and a shorter life span. This has a negative effect on honey production and other beehive products.⁴ In Mexico it has been proved that this disease may cause losses of over 60% in honey production.⁵

Efforts to control varroosis have been focused on the use of synthetic miticides. Some of these have a high degree of control on the mite; however, these miticides have important disadvantages: they may promote the mites to develop resistance against their active ingredient, they are toxic to bees and humans, and may leave chemical residues in honey which is a product for human consumption.⁶⁻⁸ The best solution for *Varroa* control will be the development of genetically modified bees, resistant to the mite in the long term. Unfortunately, this alternative is still far and would have to be used along with other measures.^{9,10} In the short term, mite control may be achieved by using natural miticides, which have low toxicity and low environmental impact, because no residues are left in honey or because these break down or volatilize rapidly.^{11,12} Few natural products have shown effectiveness against *Varroa*, formic acid^{13,14} and thymol essential oil are among them.¹⁵⁻¹⁷ These natural miticides have already been evaluated in Mexico,¹⁸⁻²³ but no one has compared their miticide effectiveness in the area where the present study was conducted. Additionally, no analysis of the expenses associated to the use of these products has been carried out.

The present study evaluated the miticide effectiveness and application costs of 65% formic acid and thymol at 12.5 g and 25 g concentrations.

Materials and methods

The experiments were conducted at the Mexican high plateau, beekeeping region (the second most

Introducción

La varroosis de las abejas melíferas, *Apis mellifera* L., constituye una parasitosis externa causada por el ácaro *Varroa destructor*,¹ y representa el problema más serio al que se enfrenta la actividad apícola en el mundo, debido a que *Varroa* parasita tanto a las abejas adultas como a su cría.² El primer informe del ácaro en México se presentó en Veracruz en 1992,³ mientras que en el Estado de México fue a principios de 1994. Actualmente, *Varroa* se encuentra prácticamente distribuido en todo el país.

El daño que la varroosis causa depende del grado de infestación de las colonias afectadas. Informes de otros países estiman que el efecto negativo sobre la productividad comienza cuando la población de ácaros alcanza 10% de las abejas adultas en una colonia; en este sentido, cuando la infestación llega a ser de 30% a 40%, normalmente termina con la colonia.² El desarrollo de las crías parasitadas se ve afectado, por lo que las abejas presentan menor peso corporal y un promedio de vida más corto, ello ocasiona que la producción de miel y otros productos de la colmena se vean perjudicados.⁴ En México se ha demostrado que esta parasitosis puede ocasionar pérdidas de más de 60% en la producción de miel.⁵

Los esfuerzos para controlar la varroosis se han enfocado al uso de acaricidas sintéticos, varios de éstos proveen alto grado de control del ácaro. Sin embargo, estos acaricidas tienen serios inconvenientes; pueden promover el desarrollo de resistencia a su principio activo en los ácaros, son tóxicos para las abejas y para el hombre y dejan residuos químicos en la miel para consumo humano.⁶⁻⁸ La mejor solución a largo plazo para el control de *Varroa* será el desarrollo de abejas genéticamente resistentes al ácaro, pero esta alternativa está aún lejana y tendría que usarse en combinación con otras medidas.^{9,10} Un acercamiento de corto plazo al control de la varroosis es el uso de algunos acaricidas naturales, ya que tienen baja toxicidad y bajo impacto ambiental, porque no dejan residuos en la miel, o porque sus residuos se degradan o volatilizan en poco tiempo.^{11,12} Pocos productos naturales han mostrado eficacia contra *Varroa*, entre ellos están el ácido fórmico^{13,14} y el aceite esencial de timol.¹⁵⁻¹⁷ Estos dos acaricidas naturales ya se han evaluado en México,¹⁸⁻²³ pero ningún estudio los ha comparado paralelamente en la región donde se realizó este trabajo, ni tampoco se ha hecho un análisis de costos asociados con el uso de estos productos.

El presente trabajo evaluó la eficacia y el costo del ácido fórmico al 65% y del timol en concentraciones de 12.5 g y 25 g.

important after the southeast region), within the Villa Guerrero municipality. Villa Guerrero is located in the southwest part of the State of Mexico, Mexico, at 19°14'65" North latitude and 100°06'23" West longitude, 2 050 m above sea level, and has a mild sub-humid weather (w), with summer rains.²⁴ The mean temperature during the evaluation period ranged from 18°C to 29°C and the relative humidity varied from 46% to 55%.

More than 100 colonies were initially evaluated for their population strength.²⁵ Samples were taken to assess *Varroa* infestation levels.²⁶ In March 2004, 36 colonies with similar adult bee infestation levels (11.5%) and similar bee population strength (eight frames covered with bees) were selected to be evaluated. Colonies were headed by queens reared from a breeding program conducted in the region by the National Institute for Forestry, Agriculture and Animal Research. Once the colonies were established, they were managed in a similar way during the course of the study. Each colony was fed 2 L of 50% sugar syrup (sucrose and water in a 1:1 weight ratio).

The 36 colonies were randomly divided into four groups (with nine repetitions each) established according to their treatment. Treatments were based on the evaluation of commercial products containing two natural miticides as follows:

a) Thymol. 12.5 g and 25 g concentrations (these doses have been tested in Europe²⁷), melted in a gel carrier, in order to maintain a slow release and guarantee an appropriate dose.

b) Formic acid. Sixty five percent concentration; 80 mL of the product stored in two polyethylene bags with a release wick were used.

Group 1 comprised colonies that were treated with two applications of 12.5 g of thymol each. To do this, 25 g of the commercial gel containing the active ingredient were spread over a polyethylene plate (10 × 20 cm) that was placed over the top bars of the brood chamber's frames in each colony treated. Another plate with the same amount of the product was placed in the colonies one week after the first application. Both plates were removed from the hives five weeks after the first application.

Colonies in group 2 were treated with 25 g doses of thymol. The application of the product was similar to that described for group 1, except that the applications were done two weeks apart and plates contained 50 g of the product instead of 25. The plates were removed from the colonies five weeks after the administration of the first dose.

In group 3, colonies received four treatments of 65% formic acid at four-day intervals each, as recommended by the manufacturer. For this, a bag containing the product was introduced between the lower

Material y métodos

El desarrollo de los experimentos tuvo lugar en la región apícola del altiplano mexicano (la segunda en importancia después de la zona sureste), en el municipio de Villa Guerrero, que se encuentra en la región suroeste del Estado de México, México, a 19°14'65" de latitud Norte y a 100°06'23" de longitud Oeste. El municipio está a 2 050 msnm y tiene clima templado-subhúmedo (w), con lluvias en verano.²⁴ La temperatura media durante el periodo de evaluación varió entre 18°C y 29°C y la humedad relativa tuvo rangos promedio de entre 46% y 55%.

Más de 100 colonias fueron inicialmente evaluadas en cuanto a la fortaleza de su población;²⁵ se tomaron muestras de ellas para determinar los niveles de infestación del parásito *Varroa*.²⁶ En marzo de 2004 se seleccionaron 36 colonias de abejas con niveles similares de infestación en abejas adultas (11.5%) y con similar fortaleza de población de abejas (ocho panales cubiertos con abejas), para evaluarlas. Las colonias poseían una reina procedente de un programa de selección que ha seguido el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias en la región. Al quedar establecidas, todas las colonias tuvieron un manejo uniforme y similar durante el estudio. Cada colonia fue alimentada con 2 L de jarabe de azúcar al 50% (sacarosa y agua en partes iguales por peso).

Las 36 colonias se dividieron y asignaron aleatoriamente entre cuatro grupos (con nueve repeticiones cada uno) establecidos de acuerdo con su tratamiento.

Los tratamientos se basaron en la evaluación de productos comerciales de acaricidas naturales, cuyas presentaciones se describen a continuación:

a) Timol. Concentraciones de 12.5 g y 25 g (dosis a las que se ha probado este producto en Europa²⁷), ambas integradas en un sustrato de gel de 25 y 50 g, respectivamente, para mantener una liberación lenta y asegurar una correcta dosificación.

b) Ácido fórmico. Concentración de 65%; se usaron 80 mL del producto, contenidos en un empaque compuesto por dos bolsas de polietileno con mecha de liberación.

El grupo 1 se formó con colonias que fueron tratadas con dos aplicaciones de 12.5 g de timol cada una. Para ello, 25 g del producto comercial en gel con el ingrediente activo integrado, fue esparcido sobre una lámina de plástico (10 × 20 cm) que se colocó sobre los cabezales de los bastidores de la cámara de cría de cada colonia tratada. Una semana después de la primera aplicación se colocó otra lámina con la misma cantidad del producto. Ambas láminas se retiraron cinco semanas después de la primera aplicación.

Las colonias del grupo 2 fueron tratadas con dos

frames of the beehive. A careful perforation of the internal container was made before introducing the bag, to avoid acid licking from it that could potentially burn the operator, brood or adult bees.

Colonies in group 4 did not get any treatment (control colonies); but the natural mortality of *Varroa* was monitored.

Two colonies were not considered for the analysis: one of the colonies treated with the double doses of thymol absconded (left the hive) and the other, treated with single doses of thymol, swarmed (the queen and half the workers left the beehive). Because of this, results show data of 34 beehives.

Varroa mortality and population were estimated by the number of collected mites from galvanized plates (28 × 43.5 cm), impregnated with petrolatum (to attach mites to the plates when they fell from the bees), that were put on wooden trays (33 cm × 44.5 cm) installed between the bottom board and the brood chamber of each beehive. These trays had a wire-mesh screen (3 mm) over the collector plate to avoid removal of mites by the bees. Mites were collected from the plates once a week, replacing the old plate with a clean one at the same time.

At the end of the fifth week after initiating the treatments, and in order to evaluate the treatments' effectiveness, all experimental colonies were treated with four plastic strips impregnated with flumethrin, a synthetic miticide with an effectiveness of over 99%.²⁸⁻³⁰ Flumethrin strips were left for six weeks in the beehives to eliminate the remaining mites. The percentage of treatment effectiveness was calculated by dividing the total number of mites collected during the evaluation period by the total number of mites in each colony; the result of this operation was then multiplied by 100. The total number of mites in the colonies was calculated by adding the number of mites that fell during treatments to the number of mites fallen during the flumethrin treatment.³¹

The percentage of effectiveness obtained for all the treatments and applications were analyzed using an analysis of variance (ANOVA) with two factors: treatments and applications. Data were arcsine transformed before being subjected to ANOVA and Fisher separation tests.³²

Additionally, a cost analysis of the miticide applications was made taking into consideration the costs of the products (commercial price), labor and transportation expenses. Transportation expenses were calculated considering fuel price, the efficiency of an eight cylinder vehicle (km per L of fuel), maintenance costs per km and the distance to the experimental apiaries (12 km). Labor costs were assessed based on the time spent on moving and applying of the products, as well as on the number of applications required for each

dosis de 25 g de timol. La forma de aplicar el producto fue similar a la que se describió para las colonias del grupo 1, excepto que las aplicaciones se espaciaron por dos semanas y que se usaron láminas con 50 g de producto. Finalmente, las láminas fueron retiradas cinco semanas después de haberse proporcionado la primera dosis.

Las colonias del grupo 3 recibieron cuatro tratamientos de ácido fórmico al 65% a intervalos de cuatro días cada uno, como lo recomienda el fabricante. Para tal efecto, a cada colmena se le introdujo una bolsa con el producto entre los bastidores inferiores de la colmena, previa perforación cuidadosa del contenedor interno para evitar derrames del ácido que pudieran provocar quemaduras al operador, a la cría o a las abejas adultas.

Las colonias del grupo 4 no recibieron tratamiento alguno (colonias testigo), pero sí se observaron en cuanto a la mortalidad natural de *Varroa*.

Dos colonias no se tomaron en cuenta para el análisis, debido a que una colonia tratada con doble concentración de timol se evadió (abandonó la colmena), y otra, tratada con concentración sencilla del mismo producto, enjambró (la reina y la mitad de las obreras abandonaron la colmena). Como consecuencia de lo anterior, en los resultados se presentan datos de 34 colmenas.

La mortalidad y población de *Varroa* se estimaron por medio del conteo de ácaros recolectados de láminas galvanizadas (28 × 43.5 cm) impregnadas con petrolato (para que los ácaros se pegaran en las láminas al caer de las abejas), que estaban instaladas dentro de charolas de madera de 33 cm × 44.5 cm, que se colocaron entre el piso y la cámara de cría de cada colmena. Estas charolas tenían una malla criba (3 mm) sobre la lámina recolectora, para evitar que las abejas removieran los ácaros caídos. Los ácaros fueron recolectados de las láminas semanalmente, colocando una lámina limpia en cada charola al mismo tiempo que se retiraba una lámina anterior.

Al final de las cinco semanas de iniciadas las pruebas y con el fin de evaluar la eficacia de los productos y tratamientos ensayados, todas las colonias experimentales fueron tratadas con cuatro tiras plásticas impregnadas de flumetrina, un acaricida sintético con eficacia superior a 99%.²⁸⁻³⁰ Las tiras de flumetrina se dejaron durante seis semanas en las colonias para asegurar que la totalidad de los ácaros remanentes murieran. La eficacia porcentual de los tratamientos experimentales se determinó dividiendo el número total de ácaros recolectados durante el periodo de las evaluaciones, entre el número total de ácaros de las colonias y multiplicando el resultado por 100. El número total de ácaros de las colonias se obtuvo sumando el número de ácaros caídos en los tratamien-

treatment. Labor costs were estimated by transforming the value of four minimum wages for the "C" geographical area of Mexico in 2004³³ to minutes, and by multiplying it by the number of minutes spent on the applications for each product.

Results

Significantly high effects on *Varroa* mortality were found for treatments, as well as for number of applications. Furthermore, interaction effects between treatments and applications were observed ($P < 0.0001$; Table 1). The first application of all treatments was significantly more effective than the second or the following ones ($P < 0.0001$). The 25 g thymol dose was the treatment that decreased the most in effectiveness after the first application (Figure 1).

More mites were recovered with two applications of 65% formic acid (1050.8) than with the two applications of thymol at both doses, 12.5 g and 25 g (685 and 635.6, respectively). However, after applying the flumethrin acaricide, a higher mortality of the remaining mites was observed in the colonies treated with formic acid (627.7) than in those treated with the two concentrations of thymol (64.5 and 60.6, respectively, Table 2). Both thymol treatments were significantly more effective (92.1% and 88.8%, respectively) than the one with formic acid (66.4%); though no difference was found between the thymol treatments. Formic acid effectiveness was significantly higher than that of the control colonies (21.9%), since it caused a higher mite drop. Significantly fewer mites were collected from the control colonies (390.7) than in the experimental ones in all cases (Figure 1, Table 2).

The cost of each treatment, including the product, labor and transportation expenses, was lower for the 12.5 g thymol treatment (37.76 pesos, 3.45 USD) than for the 25 g thymol treatment (70.21 pesos, 6.42 USD), for 65% formic acid, the cost was 70.81 pesos (6.48 USD), and for the flumethrin it was 60.15 pesos (5.50 USD). All of the products tested, including flumethrin, required an average of 4 min for their application. Formic acid was applied four times and thus required four trips to the apiaries, while thymol treatments required two trips and flumethrin treatments just one (Table 3).

Discussion

Results show that all treatments caused significant mortality of *Varroa destructor* mites and that this mortality was also influenced by the number of applications as well as by the interaction between treatments and applications. Thymol was the most effective treatment, especially at 12.5 g dose, which yielded

tos, al número de ácaros caídos durante las seis semanas de tratamiento con flumetrina.³¹

Los porcentajes de eficacia obtenidos de todos los tratamientos y aplicaciones se analizaron por medio de análisis de varianza con dos factores: tratamiento y aplicación. Los datos fueron transformados mediante arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción antes de ser sometidos al análisis de varianza y a pruebas de separación de medias de Fisher.³²

Además de lo anterior, se efectuó un análisis de costos de la aplicación de los acaricidas experimentales, mediante la estimación del valor de los productos (su precio comercial), de la mano de obra empleada y de los gastos de transportación. Estos últimos fueron calculados tomando en cuenta el valor de la gasolina, el rendimiento (en km por L de combustible) de un vehículo de ocho cilindros, el costo de su mantenimiento por km recorrido y la distancia a los apiarios experimentales (12 km). El costo de la mano de obra se calculó con base en el tiempo de movilización y aplicación de productos, así como con el número de aplicaciones requeridas para cada uno de los tratamientos. El valor de la mano de obra se estimó transformando el concepto de cuatro salarios mínimos para el área geográfica "C" en 2004³³ a minutos, y multiplicando los minutos empleados en la aplicación de cada producto por este factor.

Resultados

Se hallaron efectos altamente significativos en la mortalidad de *Varroa*, debidos tanto a los tratamientos como al número de aplicación. Además, se encontraron efectos de interacción entre tratamientos y aplicaciones ($P < 0.0001$; Cuadro 1). Todos los tratamientos fueron significativamente más eficaces en la primera aplicación, en comparación con la segunda o posteriores ($P < 0.0001$). El tratamiento con 25 g de timol fue el que disminuyó su eficacia en mayor grado después de la primera aplicación (Figura 1).

Se recuperaron más ácaros con dos aplicaciones de ácido fórmico al 65% (1050.8) que con las dos aplicaciones de los tratamientos de timol de 12.5 g y 25 g (685 y 635.6, respectivamente), pero después de aplicar el acaricida flumetrina se registró mayor mortalidad de ácaros remanentes en las colonias tratadas con ácido fórmico (627.7), que en las tratadas con las dos presentaciones de timol (64.5 y 60.6, respectivamente, Cuadro 2). Los dos tratamientos con timol fueron significativamente más eficaces (92.1% y 88.8%, respectivamente) que el tratamiento con ácido fórmico (66.4%), aunque no se encontraron diferencias entre los dos tratamientos con timol. La eficacia del ácido fórmico fue significativamente diferente a la del tratamiento de las colonias testigo (21.9%), ya que

Cuadro 1

ANÁLISIS DE VARIANZA PARA EFECTOS DE TRATAMIENTO, APLICACIÓN E INTERACCIÓN (TRATAMIENTO-APLICACIÓN) DE DOS ACARICIDAS NATURALES CONTRA *Varroa destructor* EN COLONIAS DE ABEJAS MELÍFERAS. LOS TRATAMIENTOS FUERON ÁCIDO FÓRMICO (65%), TIMOL A CONCENTRACIÓN SENCILLA (12.5 g), TIMOL A DOBLE CONCENTRACIÓN (25 g) Y TESTIGO (SIN ACARICIDA)

ANALYSIS OF VARIANCE FOR TREATMENT, APPLICATION AND INTERACTION EFFECTS (TREATMENT-APPLICATION) OF TWO NATURAL MITICIDES AGAINST *Varroa destructor* IN HONEY BEE COLONIES. TREATMENTS WERE FORMIC ACID (65%), THYMOL AT A SINGLE CONCENTRATION (12.5 g), THYMOL AT A DOUBLE CONCENTRATION (25 g) AND CONTROL (NO MITICIDE)

Source of variation	D.F.	Sum of squares	Mean squares	F Value	Probability
Treatment	3	1.746	0.582	17.604	< 0.0001
Application	1	1.380	1.380	41.733	< 0.0001
Treatment x application	3	0.987	0.329	9.947	< 0.0001
Residual	60	1.984	0.033		

Data on percent mite mortality was arcsine transformed and subjected to ANOVA.

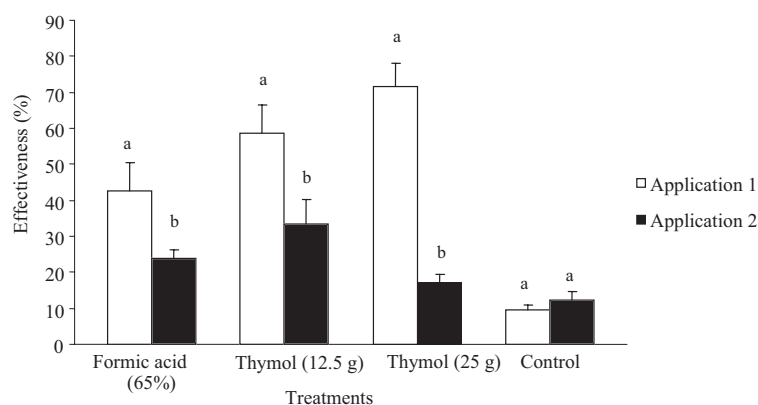


Figura 1: Eficacia promedio (% $\pm$ E.E.) de tres tratamientos y uno testigo (sin acaricida) contra *Varroa destructor* aplicados dos o más veces en colonias de abejas melíferas. La eficacia se determinó con respecto al acaricida flumetrina. Literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.0001$) basadas en un análisis de varianza y pruebas de separación de medias de Fisher a partir de datos porcentuales transformados mediante arcoseno.

Figure 1: Mean efficacy (% $\pm$ S.E.) of three treatments and a control one (no miticide) against *Varroa destructor* applied two or more times to honey bee colonies. Efficacy was determined relative to the miticide flumethrin. Different letters indicate significant differences ($P < 0.0001$) based on ANOVA and Fisher separation tests from arcsine transformed percent data.

the best results, followed by the treatment with the same product at a 25 g dose. Nevertheless, there was no significant difference among these two doses; this result agrees with the reported by May-Itza *et al.*²³ Other researchers have found that the effectiveness of thymol varies according to its formulation from 65% to 99.5%.^{14,16,34,35} Best results have been achieved during times of the year when there is little or no brood in the treated colonies. In the present study colonies had large amounts of brood, but in spite of this, thymol efficacy was high.

Formic acid had a lower effectiveness than thymol, but higher than the natural mite fall observed in control colonies. Literature reports that formic acid effectiveness ranges from 51% to 70% in studies that evaluated this product alone,^{13,36} but only one study compared the effectiveness of thymol and formic acid side by side, showing that formic acid was less effective than thymol.¹⁴ Stanghellini and Raybold¹⁴ found

ocasionó una mayor caída de ácaros. Se recuperaron significativamente menos ácaros muertos de las colonias testigo (390.7) que de las colonias experimentales en todos los casos (Figura 1, Cuadro 2).

El costo de los tratamientos con cada acaricida, incluyendo el precio del producto y los gastos de mano de obra y transportación, fue menor con timol a dosis de 12.5 g (37.76 pesos, 3.45 dólares) que con timol a dosis de 25 g (70.21 pesos, 6.42 dólares), con ácido fórmico al 65% (70.81 pesos, 6.48 dólares) o con flumetrina (60.15 pesos, 5.50 dólares). Todos los productos ensayados, incluyendo la flumetrina, requirieron, en promedio, cuatro minutos para su aplicación en cada tratamiento. El ácido fórmico se aplicó en cuatro ocasiones y requirió de cuatro viajes al apiario, mientras que los tratamientos con timol requirieron de dos viajes y el de flumetrina de uno (Cuadro 3).

Cuadro 2

NÚMERO PROMEDIO ($\pm$ E. E.) DE ÁCAROS *V. destructor* RECOLECTADOS EN 34 COLONIAS DE ABEJAS MELÍFERAS DESPUÉS DE APLICAR TRES TRATAMIENTOS NATURALES, UNO TESTIGO (SIN ACARICIDA) Y UNO DE FINALIZACIÓN (FLUMETRINA)

MEAN NUMBER OF *V. destructor* MITES ($\pm$ S. E.) COLLECTED FROM 34 HONEY BEE COLONIES AFTER THREE NATURAL TREATMENTS, A CONTROL (NO MITICIDE) AND A FINISHING ONE (FLUMETHRIN)

	<i>Treatments</i>			
	<i>Formic acid</i> (65%)	<i>Thymol</i> (12.5 g)	<i>Thymol</i> (25 g)	<i>Control</i>
First application	643.4 $\pm$ 152.1	446.9 $\pm$ 98.9	510.9 $\pm$ 116.4	160.4 $\pm$ 67.6
Second application	407.3 $\pm$ 81.9	238.1 $\pm$ 69.7	124.7 $\pm$ 35.5	230.2 $\pm$ 124.1
Total (two applications)	1050.8 $\pm$ 209.9	685 $\pm$ 120.75	635.6 $\pm$ 142.1	390.7 $\pm$ 188.9
Flumethrin	627.7 $\pm$ 236.3	64.5 $\pm$ 23.7	60.6 $\pm$ 25.4	1174 $\pm$ 297.4
Total (two applications) + flumethrin	1678.4 $\pm$ 311.4	749.5 $\pm$ 138.1	696.2 $\pm$ 137.6	1564.7 $\pm$ 474.8

n = nine colonies for the formic acid treatments and the control; n = eight for each of the thymol treatments.

Cuadro 3

COMPARACIÓN DE COSTOS ESTIMADOS PARA DIFERENTES TRATAMIENTOS CONTRA *Varroa destructor* APLICADOS A 34 COLONIAS DE ABEJAS MELÍFERAS EN VILLA GUERRERO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

COMPARISON OF ESTIMATED COSTS FOR DIFFERENT TREATMENTS AGAINST *Varroa destructor* APPLIED TO 34 HONEY BEE COLONIES IN VILLA GUERRERO, MEXICO

<i>Treatment</i>	<i>Costs per hive</i>							
	<i>Product</i>		<i>Labor</i>		<i>Transportation</i>		<i>Total</i>	
	M.N.	(US \$)	M.N.	(US \$)	M.N.	(US \$)	M.N.	(US \$)
Formic acid (65%)	60.00	(5.49)	5.61	(0.51)	5.20	(0.48)	70.81	(6.48)
Thymol (12.5 g)	32.45	(2.97)	2.81	(0.26)	2.50	(0.23)	37.76	(3.45)
Thymol (25 g)	64.90	(5.94)	2.81	(0.26)	2.50	(0.23)	70.21	(6.42)
Flumethrin	57.50	(5.26)	1.40	(0.13)	1.25	(0.11)	60.15	(5.50)

Costs were estimated considering the commercial value of the products, plus labor and transportation costs required for their application. How these expenses were estimated is described in the material and methods section.

an effectiveness of between 66% and 79% for formic acid when applied in pads placed over the top bars of the brood chamber frames, and reported 69% to 91% efficacy for a commercial combination of thymol (76%), eucalyptol (16.4%), menthol (3.8%) and camphor (3.8%). Results of the present study coincide with what has been found in other parts of the world and suggest that the effectiveness of the tested products is similar to that found in other countries.

The initial application of the natural treatments eliminated more mites than the following ones.

Discusión

Los resultados muestran que todos los tratamientos causaron una mortalidad significativa en la población de ácaros *Varroa destructor* y que esta mortalidad también estuvo influenciada por efectos del número de aplicación y de la interacción entre los tratamientos y las aplicaciones. El timol fue el tratamiento más eficaz, y la concentración de 12.5 g fue la que mejores resultados dio, seguida por el tratamiento del mismo producto a concentración de 25 g, aunque no hubo

Thymol results were different to those obtained by May-Itza *et al.*,²³ whom observed a higher effectiveness during the second application of the product. In the present study, the mite drop observed after the second application of thymol (25 g) was not different to that of natural parasite fall in the control colonies. This result shows that the effectiveness of the products decreased dramatically after their first application, which may be explained by the fact that more than 70% of the mites died in the colonies with the first product's application, leaving only a few mites to eliminate during the second treatment. Melathopoulos and Gates¹⁷ found that the same commercial thymol gel preparation that was used has an elevated evaporation rate during the first three days after application and that during this period, the highest mite mortality occurs. Their results agree with the ones observed in the present study.

The results presented suggest that products based on thymol, at a 12.5 g dose per beehive, per application, offer a promising alternative for *Varroa* control. At least two applications are recommended, although more trials are required to determine if a third dose would enhance the effectiveness of this natural miticide. Even when 25 g of thymol yielded similar results to those obtained with 12.5 g of the product, this dose is not recommended because the cost of applying it is twice as high and its effectiveness is lost after the second application.

Because of all the disadvantages that synthetic miticides have and because of good thymol results at killing mites, this natural miticide may be used alone or in combination with synthetic miticides (synthetic miticide one season and thymol the next one), in order to obtain a good control over *Varroa* mite levels. This schedule would reduce the risk of resistance development to miticides, since the frequency to which mites would be exposed to synthetic miticides would be decreased. Besides, honey contamination with synthetic miticides would be diminished too.

Despite the promising results encouraging thymol use, more research must be conducted, aimed to evaluate secondary effects that might affect the colonies. Some studies have reported a slight mortality of adult bees and brood in treated colonies.^{15-17,35} Moreover, this and another previous study³⁷ suggest that thymol may cause colonies to abscond and swarm.

Formic acid is still a good natural choice for *Varroa* control, but it is necessary to test different application methods of this product. Perhaps the release wick used in the present study did not allowed a high and constant evaporation rate of the product, enough to reach a good mite control. Formic acid effectiveness increases when it is placed in open containers and

diferencias significativas en la eficacia entre estas dos opciones, este resultado concuerda con el obtenido por May-Itzá *et al.*²³ Otros investigadores han encontrado que el timol en diferentes presentaciones comerciales varía en su eficacia de 65% a 99.5%.^{14,16,34,35} Los mejores resultados se han obtenido en épocas del año con muy poca o ninguna cría en las colonias tratadas. En el presente estudio las colonias contenían muchas crías, a pesar de ello la eficacia del timol fue alta.

El ácido fórmico tuvo una eficacia menor que el timol, pero mayor que la caída natural de ácaros en las colonias testigo. La literatura registra rangos de eficacia entre 51% y 70% en estudios que evaluaron únicamente este producto,^{13,36} pero sólo un estudio previo comparó la eficacia del timol y del ácido fórmico conjuntamente; en él se encontró que el ácido fórmico era menos eficaz que el timol.¹⁴ Stanghellini y Raybold¹⁴ publicaron una eficacia de entre 66% y 79% para el ácido fórmico aplicado en almohadillas colocadas sobre los cabezales de la cámara de cría, y documentaron una eficacia de 69% a 91% para una formulación comercial compuesta por timol (76%), eucaliptol (16.4%), mentol (3.8%) y alcanfor (3.8%). Los resultados del presente trabajo concuerdan con los encontrados en otras regiones del mundo y sugieren que la eficacia de los productos probados es similar a la encontrada en otros países.

Las aplicaciones iniciales de todos los tratamientos naturales eliminaron más ácaros que las posteriores. En el caso del timol, este resultado fue diferente al obtenido por May-Itzá *et al.*,²³ quienes observaron mayor eficacia en una segunda aplicación. La caída de ácaros debida a la segunda aplicación de timol (25 g) no fue diferente a la caída natural de parásitos en las colonias testigo, ello sugiere que su eficacia disminuyó drásticamente luego del primer tratamiento. Esto último pudo deberse a que con la primera aplicación murieron más del 70% de los ácaros existentes en las colonias, quedando muy pocos por eliminar en el segundo tratamiento. Melathopoulos y Gates¹⁷ encontraron que la preparación de timol en gel tiene alta evaporación durante los primeros tres días posteriores a su aplicación, y que durante ese periodo ocurre la mayor mortalidad de ácaros. Estos resultados concuerdan con lo observado en este estudio.

Los resultados que aquí se presentan sugieren que los productos a base de timol a dosis de 12.5 g por colmena por aplicación, ofrecen una alternativa promissoria para el control de *Varroa*. Se recomiendan al menos dos aplicaciones, aunque hacen falta más ensayos para determinar si una tercera incrementaría aún más la eficacia de este acaricida natural. La aplicación de 25 g de timol no se recomienda, porque aunque se logra una eficacia similar a la obtenida con la dosis de 12.5 g, el costo del producto se duplica y se pierde eficacia en la segunda aplicación.

Dados los inconvenientes que los acaricidas sintéticos

outside temperatures are high, because in that way product evaporation is incremented.³⁸ Probably, the low effectiveness found in this study may be attributed to the fact that formic acid concentration used was lower than that recommended for temperatures below 30°C (70% a 80%).²¹ Prolonged treatments (45 days) have been reported to increase formic acid effectiveness.¹⁴ Because the container used here does not provide enough control and also represents risk of burns to the operator (when perforation is exceeded and bags are ripped), another kind of container should be tested. Longer treatments should also be assayed with different acid concentrations to asses the proper dose for each locality.

Regarding the advantages and disadvantages of application and cost, the economic analysis shows that the treatment cost per beehive is lower using 12.5 g of thymol. In both concentrations, thymol was as easy applying as flumethrine strips; however, flumethrin requires a single application while thymol requires two, which increases transport (fuel) and labor expenses.

The fact that different studies recommend applying formic acid three or four times with four or seven-day intervals,¹⁹⁻²² makes it more expensive than thymol because more trips to the apiaries are required. Besides, as previously mentioned, it is controversial and burdensome for beekeepers the fact that 65% formic acid and 25 g of thymol treatments have higher costs than the synthetic miticide (flumethrin). The high miticide treatment costs may be due to the gradual emerging of commercial brands of these products; nevertheless, they are still a good choice since they keep some advantages such as leaving low residues in honey and posing no toxicity risks for humans.

It is concluded that the 12.5 g thymol medicament was the most effective product tested for *Varroa destructor* control, at the lower application cost, for which its use is recommended. However, the intertwined use with different miticides is also recommended while more research is conducted to investigate about the secondary effects of these products on honey bee colonies.

Acknowledgements

Authors thank the Support Program for Technological Research and Innovation Projects of the National Autonomous University of Mexico (project code: IN222203), for the partial finance given to this study. MVZ Carlos Alberto Robles Rios, technician Eusebio Sanchez Castañeda and CP Nora Nancy Rodriguez Muñoz, are also acknowledged for their valuable support on the field tests.

tienen y de la buena eficacia del timol, este acaricida natural podría usarse solo o alternado con acaricidas sintéticos (una temporada el acaricida sintético y otra el timol) para un buen control de los niveles de *Varroa*, y reducir así los riesgos de desarrollo de resistencia del parásito a los acaricidas, ya que se estaría disminuyendo la frecuencia de exposición del ácaro a los pesticidas sintéticos. Además, mediante esta operatividad se disminuiría el riesgo de contaminación de la miel con residuos de los acaricidas sintéticos.

A pesar de lo promisorio que resulta el uso del timol, debe incrementarse la investigación enfocada a la evaluación de los efectos secundarios que pudieran presentarse en las colonias. Algunos estudios han registrado ligera mortalidad de abejas adultas y de la cría de colonias tratadas;^{15-17,35} además, este estudio y otro previo³⁷ sugieren que el timol puede provocar la evasión y “enjambrazón” de algunas colonias.

El ácido fórmico sigue siendo una buena alternativa natural para el control de *Varroa*, pero es necesario ensayarlo con otros métodos de aplicación. La mecha liberadora contenida en el producto evaluado en este estudio, probablemente no permitió una evaporación lo suficientemente alta y constante para proveer un buen control. El ácido fórmico aumenta su eficacia cuando es proporcionado en contenedores abiertos y cuando las temperaturas externas son altas, debido a que se incrementa la evaporación del producto.³⁸ La baja eficacia de ácido fórmico utilizado en este trabajo posiblemente ocurrió porque la concentración que se usó fue menor a las recomendadas (70% a 80%) para temperaturas inferiores a 30°C.²¹ Se ha documentado también que los tratamientos prolongados (45 días) incrementan la eficacia del ácido fórmico.¹⁴ Quizá deba intentarse su administración en otro tipo de contenedor, ya que el actual no provee suficiente control y además representa riesgos de quemaduras para quien lo aplica, esto último ocurre cuando por descuido se sobrepasa la perforación y se rompen las bolsas contenedoras. Adicionalmente, deberían ensayarse tratamientos por periodos más largos y a diferentes concentraciones, para estimar la dosis adecuada para cada localidad.

En cuanto a las ventajas y desventajas de aplicación y costos, el análisis económico muestra que el costo por colmena es menor al usar el timol a concentración de 12.5 g. El timol en las dos diferentes concentraciones fue tan fácil de aplicar como las tiras plásticas de flumetrina; sin embargo, la flumetrina sólo se aplica una vez, a diferencia de los tratamientos con timol, que se aplican dos veces, lo cual incrementa los gastos de transporte (combustible) y mano de obra.

El ácido fórmico resulta más costoso para usar en los apiarios desde el punto de vista práctico que el timol, ya que diferentes investigaciones sugieren apli-

Referencias

1. Anderson DL, Trueman JWH. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp Appl Acarol* 2000;24:165-189.
2. De Jong D. Mites: *Varroa* and other parasites of brood. In: Morse RA, Flottum K, editors. *Honey bee pests, predators and diseases*. Ithaca New York: Root Publishing, 1997:279-328.
3. Chihu AD, Rojas ALM, Rodríguez DSR. Presencia en Veracruz, México, del ácaro *Varroa jacobsoni*, causante de la varroasis de la abeja melífera (*Apis mellifera* L.). *Tec Pecú Méx* 1992;30:133.
4. De Jong D, De Jong PH, Gonçalves LS. Weight loss and other damage to developing worker honey bees (*Apis mellifera*) due to infestation with *Varroa jacobsoni*. *J Apic Res* 1982a;20:37-40.
5. Arechavaleta-Velasco ME, Guzmán-Novoa E. Producción de miel de colonias de abejas (*Apis mellifera* L.) tratadas y no tratadas con fluvalinato contra *Varroa jacobsoni* Oudemans en Valle de Bravo, Estado de México. *Vet Méx* 2000;31:381-384.
6. Slabazki Y, Gal H, Lensky Y. The effect of fluvalinate application in bee colonies on population levels of *Varroa jacobsoni* and honey bees (*Apis mellifera* L.) and on residues in honey and wax. *Bee Science* 1991;1:189-195.
7. Wallner K. The use of varroacides and their influence on the quality of bee products. *Am Bee J* 1995;135:817-821.
8. Milani N. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie* 1999;30:229-234.
9. Guzmán-Novoa E, Correa-Benítez A. Selección de abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) resistentes al ácaro *Varroa jacobsoni* O. *Vet Méx* 1996;27:149-158.
10. Page RE, Guzman-Novoa E. The Genetic Basis of Disease Resistance. In: Morse RA, Flottum K, editors. *Honey Bee Pests, Predators, and Diseases*. 3rd ed. Medina, Ohio USA: A.I. Root Co, 1997:469-492.
11. Bogdanov S, Imdorf A, Kilchenmann V. Residues in wax and honey after Apilife VAR treatment. *Apidologie* 1998;29:513-524.
12. Mattila HR, Otis GW. Trials of Apiguard, a thymol-based miticide. Part 1. Efficacy for control of parasitic mites and residues in honey. *Am Bee J* 1999;139:947-952.
13. Calderone NW, Nasr ME. Evaluation of a formic acid formulation for the fall control of *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) in colonies of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in a temperate climate. *J Econ Entomol* 1999;92:526-533.
14. Stanghellini MS, Raybold P. Evaluation of selected biopesticides for the late fall control of *Varroa* mites in a northern temperate climate. *Am Bee J* 2004;144:475-480.
15. Chiesa F. Effective control of varroaosis using powdered thymol. *Apidologie* 1991;22:135-145.
16. Imdorf A, Bogdanov S, Ochoa RI, Calderone N. Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. *Apidologie* 1999;30:209-228.

car este producto de tres a cuatro veces, a intervalos de cuatro a siete días,¹⁹⁻²² ello ocasiona mayores gastos en función del número de recorridos al apiario. Aunado a lo anterior, resulta controversial y oneroso para los apicultores, el hecho de que los costos del ácido fórmico al 65% y el timol a concentración de 25 g fueron mayores que el acaricida sintético empleado (flumetrina). Este incremento en el costo de los acaricidas naturales quizá se deba a que paulatinamente se han registrado marcas comerciales de estos productos; sin embargo, siguen siendo una buena opción, pues aún conservan dentro de sus bondades el hecho de dejar bajos residuos en la miel y que no representan riesgos de toxicidad para las abejas ni para el ser humano.

Se concluye que el timol a concentración de 12.5 g fue el producto más eficaz para el control de *Varroa destructor* con menor costo de aplicación, por lo que se sugiere su uso. Sin embargo, es prudente recomendar el empleo alternado de diferentes acaricidas, en tanto no se profundice la investigación sobre los efectos colaterales que éstos pudieran ocasionar a las colonias de abejas.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (clave del proyecto: IN222203), el financiamiento parcial otorgado para la realización de este trabajo, así como al MVZ Carlos Alberto Robles Ríos, al técnico Eusebio Sánchez Castañeda y a la CP Nora Nancy Rodríguez Muñoz, por su valioso apoyo en la realización de las pruebas de campo.

17. Melathopoulos AP, Gates J. Comparison of two thymol-based acaricides, Apilife VAR and Apiguard, for the control of *Varroa* mites. *Am Bee J* 2003;143:489-493.
18. Vivas RJA, Otero CG, Rodríguez BD. Aplicación de tratamientos con ácido fórmico para el control de la varroasis. *Memorias del X Seminario Americano de Apicultura*; 1996 agosto 2-4; Veracruz (Veracruz) México. México (DF): Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, 1996:s/p.
19. Pérez-Santiago G, González CM, Marrufo OJ, Zapata MS. Mortalidad de *Varroa jacobsoni* con tratamientos de Apistan y ácido fórmico en abejas melíferas. *Memorias del XI Seminario Americano de Apicultura*; 1997 agosto 7-10; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, 1997:s/p.
20. Reyes SA, Delabra-Vaca G, Fragoso SH, Bojorques NL, Castell BH. Uso del Api-plus para el control de varroa en abejas melíferas (*Apis mellifera*). *Memorias del 5º Congreso Internacional de Actualización Apícola*; 1998 mayo 29-31; Guadalajara (Jalisco) México. México

- (DF): Asociación Nacional de Médicos Veterinarios Especialistas en Abejas, AC, 1998:s/p.
21. De Felipe HM, Guzmán CS, Vandame R. Control alternativo de *Varroa* con ácidos orgánicos y timol. Investigación y capacitación en el Estado de Veracruz. Memorias del XIII Seminario Americano de Apicultura; 1999 agosto 26-28; Morelia (Michoacán) México. México (DF): Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, 1999:s/p.
 22. Vicario ME, Medina ML. Uso del ácido fórmico y timol en el control del ácaro *Varroa jacobsoni* en Yucatán, México: Resultados preliminares. Memorias del XIII Seminario Americano de Apicultura; 1999 agosto 26-28; Morelia (Michoacán) México. México (DF): Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, 1999:s/p.
 23. May-Itzá WJ, Marrufo-Olivares JC, Delabra-Vaca G, Quezada-Euán J. Control del ácaro *Varroa destructor* con un gel a base de timol en colonias de abejas africanizadas (*Apis mellifera* L.) bajo condiciones de clima tropical en Yucatán. Memorias del XVII Seminario Americano de Apicultura y 7ª Expo-Apícola; 2003 agosto 7-9; Aguascalientes (Aguascalientes) México. México (DF): Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, 2003:158-160.
 24. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Carta de climas de México. México (DF): INEGI, 1981.
 25. Nasr ME, Thorp RW, Tyler TL, Briggs DL. Estimating honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony strength by a simple method: Measuring cluster size. J Econ Entomol 1990;83: 748-754.
 26. De Jong D, Roma DA, Gonçalves LS. A comparative analysis of shaking solutions for the detection of *Varroa jacobsoni* on adult honey bees. Apidologie 1982b;13:297-306.
 27. Floris I, Satta A, Cabras P, Garau VL, Angioni A. Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: Effectiveness, persistence, and residues. J Econ Entomol 2004;97:187-191.
 28. Milani N, Barbattani R. Treatment of varroaosis with Bayvarol strips (flumethrin) in northern Italy. Apicultura 1989;5:173-192.
 29. Ferrer-Dufol M, Martinez VAI, Sanchez AC. Comparative tests of fluvalinate and flumethrin to control *Varroa jacobsoni* Oudemans. J Apic Res 1991;30:103-106.
 30. Ferrer-Dufol M, Moreno MC, Martinez VAI, Sanchez AC, Garcia SMJ. Field trials of treatments against *Varroa jacobsoni* using fluvalinate and flumethrin strips in honey bee colonies containing sealed brood. J Apic Res 1995;34:147-152.
 31. Higes M, Llorente J. Ensayo de eficacia en el control de la varroasis en colmenas de producción: timol. Vida Apícola 1997;81:14-17.
 32. Microsoft. Statview (Computer program) for Macintosh. Version 4.0. California USA, 1996.
 33. Secretaría de Gobernación. Comisión Nacional de los Salarios Mínimos. Salario mínimo para el área geográfica C. México (DF):Diario Oficial de la Federación, 2003.
 34. Mattila HR, Otis GW. The efficacy of Apiguard against varroa and tracheal mites, and its effect on honey production: 1999 trial. Am Bee J 2000;140:969-973.
 35. Ellis JD, Delaplane KS, Hood WM. Efficacy of a bottom screen device, Apistan®, and Apilife VAR®, in controlling *Varroa destructor*. Am Bee J 2001;141:813-816.
 36. Feldlaufer MF, Pettis JS, Kochansky P, Shimanuki H. A gel formulation of formic acid for the control of parasitic mites of honey bees. Am Bee J 1997;137:661-663.
 37. Calderone NW, Spivak M. Plant-extracts for control of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) in colonies of the Western honey bee (Hymenoptera: Apidae). J Econ Entomol 1995;88:1211-1215.
 38. Underwood RM, Currie RW. The effects of temperature and dose of formic acid on treatment efficacy against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), a parasite of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Exp Appl Acarol 2003;29:303-313.