

Tesina para optar al título de Licenciado en Bioquímica

***Efecto de la administración de un probiótico  
sobre distintos patógenos que afectan la  
salud de las abejas melíferas***



VIESINSH/ISTOCKPHOTO

**Bach. Guillermo Añón**

Tutora: Dra. Karina Antúnez  
Co-Tutora: Mag. Daniela Arredondo  
Departamento de Microbiología  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, Uruguay  
2018

## **Índice**

|  |        |
|--|--------|
| <b>Agradecimientos</b> .....   | - 3 -  |
| <b>Resumen</b> .....   | - 4 -  |
| <b>Introducción</b> .....  | - 5 -  |
| <b>-Importancia de la polinización</b> .....                                     | - 5 -  |
| <b>-Historia de la apicultura</b> .....  | - 6 -  |
| <b>-Apicultura en Uruguay</b> .....  | - 7 -  |
| <b>-Principales patógenos que afectan la salud de las abejas melíferas</b> ..... | - 7 -  |
| <b>-Nosema spp.</b> .....  | - 9 -  |
| <b>-Varroa destructor</b> .....  | - 11 - |
| <b>-Virus ARN</b> .....  | - 14 - |
| <b>-Comunidad microbiana intestinal de la abeja</b> .....                        | - 15 - |
| <b>-Probióticos</b> .....  | - 17 - |
| <b>Hipótesis</b> .....   | - 19 - |
| <b>Objetivo general</b> .....  | - 19 - |
| <b>Objetivos específicos</b> .....   | - 19 - |
| <b>Materiales y Métodos:</b> .....   | - 20 - |
| <b>Aislamientos bacterianos y condiciones de cultivo:</b> .....                  | - 20 - |
| <b>Preparación del probiótico:</b> .....   | - 20 - |
| <b>Ensayo de campo:</b> .....  | - 21 - |
| <b>Fortaleza de la colmena</b> .....   | - 21 - |
| <b>Cuantificación de <i>Varroa destructor</i>:</b> .....                         | - 22 - |
| <b>Cuantificación de <i>Nosema ceranae</i>:</b> .....                            | - 22 - |
| <b>Determinación y cuantificación de los virus ABPV y DWV:</b> .....             | - 22 - |
| <b>Análisis estadístico</b> .....  | - 24 - |
| <b>Resultados</b> .....  | - 25 - |
| <b>Efecto del probiótico en la fortaleza de la colmena</b> .....                 | - 25 - |
| <b>Efecto del probiótico en el ácaro <i>V. destructor</i></b> .....              | - 27 - |
| <b>Efecto del probiótico en la infección por <i>Nosema ceranae</i></b> .....     | - 28 - |
| <b>Efecto del probiótico en la carga viral de los virus ABPV y DWV</b> .....     | - 29 - |
| <b>Discusión</b> .....   | - 31 - |
| <b>Conclusiones y Perspectivas</b> .....   | - 34 - |
| <b>Bibliografía</b> .....  | - 35 - |

## ***Agradecimientos***

Primero quiero agradecerles a Karina y Daniela por abrirme las puertas del laboratorio de Microbiología, enseñarme de este mundo y dejarme ser parte del proyecto bajo su dirección.

En particular a Daniela, que me dedicó muchísimo tiempo, que me enseñó las tareas del laboratorio, las técnicas, me explicó todo siempre para que entendiera el porqué, que me impulso a que empiece a hacer cosas solo y darme más herramientas, que no me dejo ahogarme nunca en una tapita de coca cola y que cuando me tuvo que bajar a tierra lo hizo, fuera como fuera.

La gente del West-coast, Majito, Paola, Viqui, Anita, Susan, Gonza, Viqui U que siempre le encuentran la vuelta para que todo tenga mucho humor.

Al toda la colonia, por siempre estar dispuestos a darme una mano y estar atentos en cuanto a las tareas de laboratorio, sobre todo Belén que cada tanto le pedía que me confirmara si eran o no las esporas.

A mi amigos de la vida, la facultad e incluso los que se volvieron más que amigos para convertirse en socios: Mateo, Cata, Matias, Joaco Garcia, Marcos, Lu, Flo, Marcio, Sofi, Joaco Garat, Anita, Santi, Clarita, Matilde, Tania, Vera, Cami, Ali, Juli, Alejo, Cristian, Vale, Rosina, Pablito, Gonza, Nico, Rodri, Caro, Emi, Paula, Santi, Vale, Nico G, Enzo G, Tincho y Maru que de alguna forma siempre estuvieron ahí, estudiando, dando una mano, preguntando o simplemente escuchando las historias y cuentos que tenía para hacer, impulsándome a que llegue a la meta y que sirvieron para despejar la mente tantas veces.

A Jime que me banco en momentos de estrés extremo y no me dejo bajar los brazos en ningún momento.

Por último, mi Familia: Miguel, Virginia, Igna, Ale, Adriana, Antonio, Trinidad, Mabel, Luis y el pequeño Thor siempre preguntando como me está yendo, si me pueden ayudar, llenándome el alma con pequeñas atenciones en momentos de exámenes y parciales, dando alternativas y mostrando otra perspectiva de las cosas, enseñándome y haciendo la persona que soy hoy.

## **Resumen**

Las abejas son los principales insectos polinizadores de diferentes especies vegetales favoreciendo la diversidad biológica, la conservación de las especies amenazadas y a la producción agrícola. Además las abejas melíferas son importantes por la producción de miel, polen, propóleos, jalea real y apitoxina, que son ampliamente utilizados por el hombre con diversos fines. Actualmente la sanidad de las abejas conforma uno de los problemas más grandes a los cuales se enfrentan los apicultores. Existe una variedad de patógenos que pueden afectar las abejas melíferas aumentando la mortandad de las colonias, entre ellos se destacan, el microsporidio *Nosema ceranae*, el ácaro *Varroa destructor* y diversos virus ARN. El uso de antibióticos y acaricidas en la apicultura no es recomendado ya que su utilización trae aparejadas diversas desventajas, entre ellas la generación de cepas bacterianas resistentes, el desbalance de la homeostasis de la abeja y residuos que pueden permanecer en la miel afectando su calidad para el consumo.

La administración de probióticos como aditivos en alimentos es una estrategia ampliamente utilizada para mejorar la salud tanto en humanos como en animales. Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al hospedero un beneficio para la salud. En estudios previos de nuestro laboratorio, se aislaron, caracterizaron e identificaron 4 cepas bacterianas a partir del intestino de abejas de colmenas históricamente sanas con potencial probiótico. La administración de esta mezcla en modelos de cría e infección de larvas y abejas en el laboratorio, fue capaz de disminuir la mortalidad de larvas infectadas con *Paenibacillus larvae* y el número de esporas de *N. ceranae*. La hipótesis de este trabajo postula que la aplicación de una mezcla de microorganismos con potencial probiótico, puede mejorar la fortaleza y estado sanitario de colmenas de producción. Para evaluar esto, se realizó un ensayo a campo en colmenas de producción, donde un grupo recibió el tratamiento con el probiótico en jarabe, otro grupo solo recibió jarabe, y el tercero no recibió tratamiento.

La aplicación de probióticos en colmenas de producción disminuyó el nivel de infestación de los patógenos *N. ceranae* y *V. destructor*, aunque no modificó la fortaleza de la colmena ni la infección por el virus de la parálisis aguda (ABPV) o el virus de las alas deformes (DWV).

Los resultados obtenidos en esta tesis son auspiciosos, y alientan a continuar investigando en esta línea.

## ***Introducción***

### **-Importancia de la polinización**

La polinización es la transferencia de polen (célula masculina) desde los estambres (parte masculina de la flor) hasta el estigma (parte femenina de la flor). Este proceso hace posible la fecundación, y por lo tanto la producción de frutos y semillas. La polinización puede ser mediada tanto por vectores abióticos (agua o viento) como bióticos (animales). La gran mayoría de las angiospermas (plantas con flores) dependen de los animales para su fecundación, y dentro de estos se destaca la polinización mediada por insectos (FAO 2014).

El 75% de los cultivos de frutas, verduras o semillas necesarias para la alimentación humana dependen o se ven beneficiadas por los polinizadores, ya sea en tamaño de fruto, cantidad y calidad (FAO, 2018; Klein et al., 2007). La polinización aumenta la producción de 87 de los principales cultivos alimentarios, así como de muchos medicamentos derivados de plantas en todo el mundo (FAO, 2018). El volumen de producción agrícola que depende de los polinizadores aumentó un 300% en los últimos 50 años, dos ejemplos de esto son el cacao y el café (FAO, 2018).

Muchas especies de insectos visitan las flores y colaboran en la polinización (avispas, polillas, mariposas, escarabajos y mosquitos), pero las abejas melíferas son el principal insecto polinizador de cultivos y flores silvestres. El tamaño de su cuerpo y el largo de probóscide les ayuda a pecorear una gran variedad de flores. En su búsqueda de nutrientes (proteínas, lípidos, minerales y vitaminas) las abejas suelen recorrer largas distancias y visitar periódicamente las flores para recolectar néctar y polen (Abrol, 2011).

Se ha observado que en Uruguay la polinización mediada por abejas favorece la producción de manzanas, zapallitos de tronco, melones y otros productos de la granja, produciendo frutos de mayor tamaño y mejor calidad (Santos 2014). Se estima que el valor económico del servicio de la polinización de abejas en Uruguay aumenta la producción de estos cultivos en un 70% y en términos monetarios asciende a 1,6 billones de pesos uruguayos (Santos, 2014).

## -Historia de la apicultura

Los primeros registros de la domesticación de las abejas melíferas se remontan a los pueblos egipcios, donde se encontraron jeroglíficos del año 2400aC con la figura de la abeja y dónde se observa el uso de colmenas horizontales de barro cocido al sol (Figura 1). En la titulación del Rey de Egipto en el año 3100 aC, aparece la figura de la abeja, por lo que estas deben haber sido importantes incluso antes de su domesticación. Los pueblos persas, sirios, griegos y romanos cuentan con pruebas de la práctica de la apicultura. La miel, la cera y propóleos eran muy usados, tanto en la elaboración de alimentos, como en medicinas, cosméticos e incluso en el ámbito religioso. La miel era utilizada como endulzante natural o para agregarle a las bebidas alcohólicas; también era muy utilizada en los rituales sagrados, en las ofrendas a los dioses y en el proceso de embalsamamiento de los nobles egipcios. En esta primera etapa el hombre comenzó a sacar las colmenas de su hábitat natural y transportarlas. Las colmenas eran construidas con diferentes materiales, como por ejemplo barro, troncos de árboles ahuecados, paja o mimbre y cada vez que se extraía la miel, en general se mataban las abejas y se perdía la colmena (Crane, 1999).

La apicultura moderna tal y como la conocemos en la actualidad comienza en 1851 con la creación de la colmena móvil estándar, desarrollada por Lorenzo Langstroth, quien describe el "espacio abeja" (más de 6mm y menos de 9mm), concepto que permanece vigente al día de hoy (Langstroth, 1857). Posteriormente aparece la primera prensa para estampar cera en los cuadros móviles, los extractores mecánicos de miel y hacia fines del siglo XIX las colmenas ya eran iguales a las que se utilizan en la actualidad (Crane, 1999).

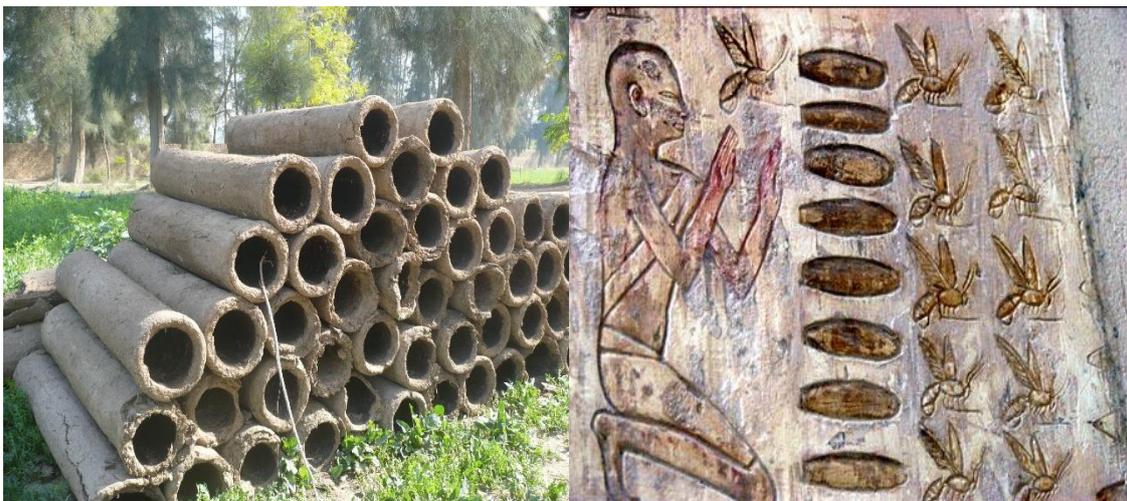


Figura (1)- Colmenas horizontales de barro y el jeroglífico que se encontró, donde se evidencia el uso de las colmenas horizontales junto a las abejas.

## -Apicultura en Uruguay

El sector apícola en Uruguay cuenta con cerca de 3000 productores que poseen 500.000 colmenas, y un nivel de producción anual de miel en el entorno de las 12.000 toneladas por año, de acuerdo al Sistema Nacional de Trazabilidad de la Miel y los Productos Apícolas (MGAP,2018; Figura 2). La miel es el segundo producto de granja más exportado, ya que más del 85% de la producción es comercializada.

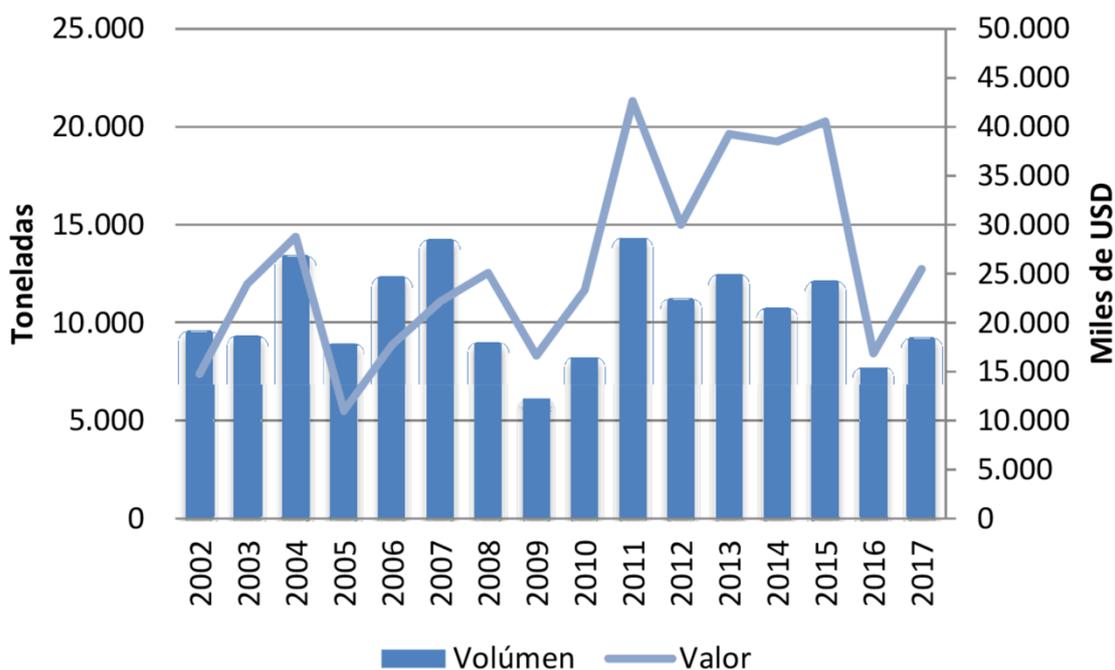


Figura (2)- Gráfico de barras donde se observan según los años, la cantidad de miel (en toneladas) exportada por Uruguay y las ganancias (en miles de USD). (MGAP, 2018)

## -Principales patógenos que afectan la salud de las abejas melíferas

En los últimos años se ha observado la pérdida de colonias de abejas melíferas en muchos países del mundo. Los reportes de estas pérdidas son principalmente en países en el hemisferio Norte, entre ellos Estados Unidos y países europeos (Neumann & Carreck, 2010; Potts et al., 2010). En algunos casos esta pérdida de colmenas se definió como “Colony Collapse Disorder” (CCD) donde se observaban colonias muertas o débiles. Los síntomas del CCD son el abandono de la cría y reservas de miel y polen, la falta de abejas muertas dentro o alrededor de la colmena y la invasión retardada de plagas (Oldroyd, 2007).

El término que mejor se ajusta al panorama actual es “Despoblación de colmenas”, y entre las principales causas están la co-existencia de múltiples patógenos de las

abejas adultas y de la cría, a la emergencia de patógenos más virulentos, sumado a una contaminación química con pesticidas y agrotóxicos (Goulson *et al.*, 2015; Steinhauer *et al.*, 2018).

Los países del hemisferio sur cuentan con escasa información sobre la despoblación de colmenas. En la primer encuesta de pérdidas de colonias realizada en Uruguay (temporada 2013-2014) se observó que la tasa de pérdida anual era del 28% (Antúnez *et al.*, 2017). Esta tasa de pérdida es similar a la descrita para EE.UU. durante la misma temporada (34.1%, Lee *et al.*, 2015). En la segunda edición de la encuesta (temporada 2015-2016) la tasa de pérdida fue del 19% y en la temporada 2017-2018 ascendió a 27% (Antunez, comunicación personal). En todas las ediciones, entre los principales motivos expuestos por los apicultores se encontró la presencia de parásitos, patógenos y la intoxicación con pesticidas (Antúnez *et al.*, 2017).

### -Nosema spp.

Los microsporidios son hongos unicelulares, parásitos intracelulares obligados. La vida del microsporidio fuera de la célula hospedera ocurre en forma de esporas (estructura de resistencia y única forma infectiva). Estas esporas pueden presentar un tamaño de entre 1  $\mu\text{m}$  en el caso de *Enterocytozoon bieneusi* y hasta 40  $\mu\text{m}$  en *Bacillidium filiferum*. Existen microsporidios con distintas formas, esféricas, ovoides, en forma de vara o en forma de media luna, aunque la mayoría son ovoides (Keeling y Fast, 2002). Dos microsporidios han sido reportados como agentes causales de enfermedades en *Apis mellifera* (la abeja europea), *Nosema apis* y *Nosema ceranae* (Fries, 2010; Fries et al, 1996).

Al principio del siglo XX sólo se conocía a *N. apis*, uno de los primeros microsporidios en ser descritos, y afectaba a *A. mellifera* (Fries et al, 2007). Por otro lado *N. ceranae* fue descubierto en 1995 asociado a la abeja asiática *Apis cerana* (Fries et al, 1996). En España y Taiwan se reportaron las primeras infecciones naturales de *N. ceranae* en *A. mellifera* (Higes et al, 2006; Wang et al., 2007). Al día de hoy *N. ceranae* se encuentra distribuido a nivel mundial (Paxton et al., 2007). Ambas especies infectan a las abejas a través de la ingestión de esporas y esta ingesta puede producirse durante las actividades de limpieza o por trofalaxis. Las esporas germinan al llegar al intestino medio, infectando y reproduciéndose dentro de las células del ventrículo, completando su ciclo de vida en 3 días (Fries, 2010; Higes et al, 2010). Las esporas de *Nosema* spp. poseen una estructura que les permite invadir a la célula hospedera llamada filamento polar y el número de vueltas que tiene el filamento polar puede variar de acuerdo a la especie de *Nosema*. El mecanismo de infección se basa en la inyección mecánica de un filamento polar que sobresale de la espora germinante (Figura 3). El filamento penetra una membrana de la célula hospedera. A través del mismo, el esporoplasma infeccioso se inyecta en el citoplasma de la célula hospedera, donde se inicia la replicación del parásito (merogonia) y luego se inicia la producción de esporas (esporogonia, Fries et al., 1996; Larsson, 1988). La infección de *Nosema* spp. afecta la función digestiva generando problemas de desnutrición, el pecoreo prematuro de las abejas y una reducción en la longevidad de las mismas (Meana et al., 2010).

Se ha descrito que *N. ceranae* es más virulento que *N. apis* (Higes et al, 2007), aunque este es un punto polémico ya que existen estudios en los cuales no se encuentran diferencias en cuanto a la virulencia a nivel de abeja individual (Fries, 2010).

## Nosema

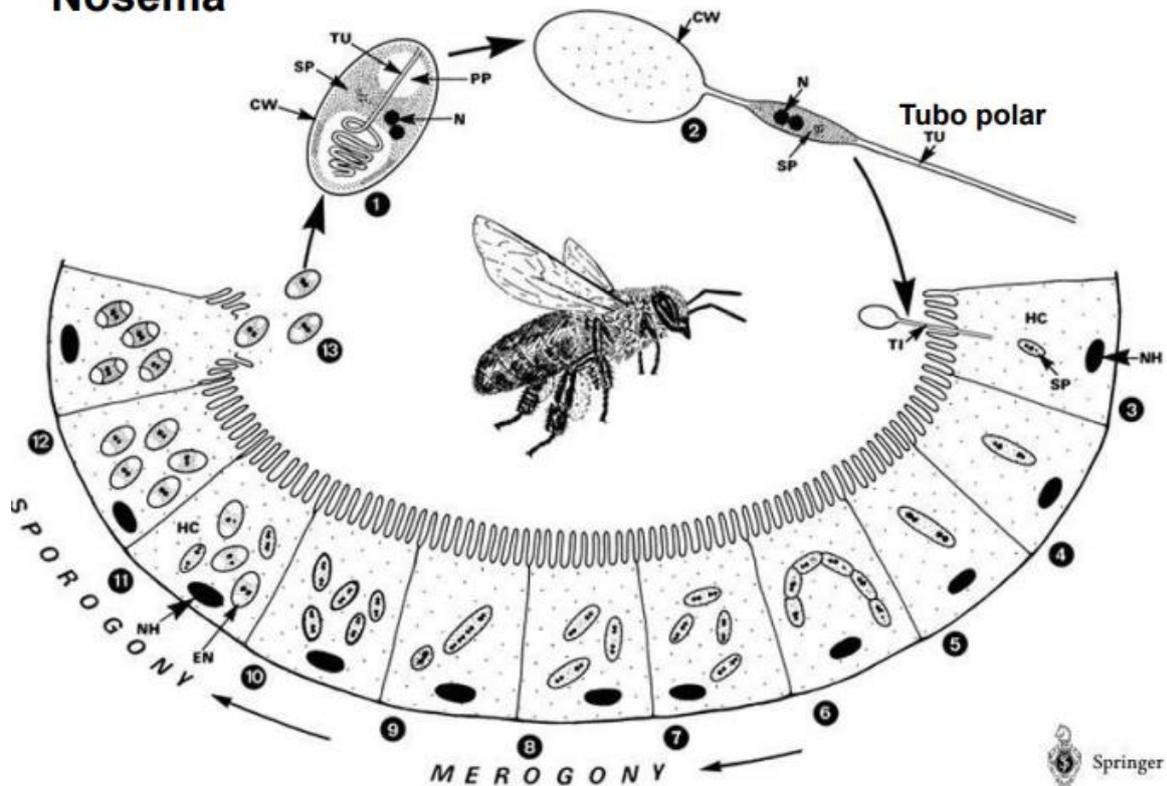


Figura (3)-Ciclo de reproducción de *Nosema* spp. Luego de ingerida la espora y estando la misma en el intestino, se da la reversión del filamento polar el cual es inyectado en células intestinales. Posteriormente ingresa a las células el esporoplasma con todo el contenido de la espora y comienza allí la etapa de multiplicación. Dichas esporas son liberadas debido a lisis celular y reinfectan células vecinas o son eliminadas con las heces generando de esta forma una fuente de contaminación.

CW: pared de la espora. SP: esporoplasma. TU: túbulo polar. N: núcleo. PP: polaroplasto. HC: citoplasma celular. NH: núcleo celular

En nuestro país el agente causal de nosemosis es principalmente *N. ceranae*, que se encuentra presente al menos desde 1990 (Invernizzi *et al.*, 2009). En el último relevamiento que se hizo en Uruguay, se observó que se encuentra ampliamente distribuido y su prevalencia se estimó en 14,6 % a nivel nacional (Figura 4), con porcentajes mayores en los departamentos con plantaciones de *Eucalyptus grandis* (Anido *et al.*, 2015). La única medida terapéutica para controlar la nosemosis es el uso de fumagilina (Fries, 2010). El uso de este compuesto está prohibido en Europa (Fries, 2010) y en Uruguay, está habilitado solo para los criaderos de reinas (MGAP, 2010).



Figura (4)- Distribución de *N. ceranae* en Uruguay, 2011. Los departamentos en naranja son aquellos en los que se detectó la presencia del microsporidio. Modificado de Anido, 2013.

#### -Varroa destructor

*Varroa destructor* es un ácaro parásito con una aparición relativamente reciente en *A. mellifera*, siendo su hospedador original la abeja asiática *A. cerana*. Este parásito se ha dispersado en todo el mundo en un corto período de tiempo, excepto en Australia, donde no se ha detectado aún (Boecking y Genersch, 2008; Rosenkrants *et al*, 2010). Se ha descrito que el parásito presenta mayor patogenicidad en *A. mellifera* que en su hospedador original. En la abeja asiática el ácaro se reproduce solo en las larvas de los zánganos (producidos por temporadas). Además, las celdas de éstos pueden ser "voluntariamente descuidadas" por las abejas para contener a las varroas dentro ya que ellos son muy débiles para abrir el opérculo (Rath, 1999). Pero en *A. mellifera*, *V. destructor* se reproduce en larvas de zánganos y de obreras, lo que hace que el ácaro se reproduzca durante todo el año y no pueda ser contenido dentro de las celdas (Martin, 1998, 2001).

Sin un tratamiento periódico con acaricidas, la mayoría de las colonias de abejas melíferas en climas templados podrían llegar a colapsar en un periodo de uno o dos años (Martin, 1998), generando grandes pérdidas económicas para los apicultores.

Este ácaro carece de una etapa de vida libre, el ciclo de su vida posee una fase forética sobre las abejas adultas (Figura 5A) y una fase reproductiva dentro de las celdas de las larvas (Figura 5B). El ácaro se alimenta succionando la hemolinfa de la pupa operculada y posteriormente de la abeja adulta, provocando que, zánganos y

abejas obreras parasitadas nazcan con bajo peso e incluso pudiendo causar su muerte (van Dooremalen *et al.*, 2012).

A



B



Figura (5)- A: Se observa una abeja con una varroa adulta forética infestando el tórax de una abeja. B: Ciclo de vida resumido de *V. destructor* (Rosenkrants *et al* 2010).

La reproducción de varroa ocurre en dos etapas: el ácaro se acopla a una abeja nodriza que la transporta a las celdas con cría abierta y posteriormente ingresa a una celda que contiene una larva del quinto estadio de desarrollo (previo al sellado del opérculo). Las varroas hembras son capaces de reconocer la edad o función de la abeja adulta así como de las crías que posteriormente parasitará (Kuenen y Calderone, 1997; Rosenkranz *et al.*, 2010). Este reconocimiento es posible porque las varroas son capaces de sensar compuestos químicos procedentes de la cutícula de las abejas (Le Conte y Trouiller, 1994). Las larvas de las abejas secretan ésteres, que alcanzan un máximo en el quinto estadio y los zánganos producen cantidades ligeramente mayores de ésteres durante un período tiempo más largo. Esto explica la

preferencia de las varroas por las celdas de zánganos (Calderone y Lin, 2001; Le Conte *et al.*, 1989; Trouiller *et al.*, 1991). Las larvas de obreras son parasitadas de 15 a 20 horas previo al sellado del opérculo, mientras que en los zánganos ocurre de 40 a 50 horas antes (Boot *et al.*, 1992).

#### Daño a nivel de colonia

La infección de la colonia con *V. destructor* es capaz de disminuir la capacidad reproductiva de las abejas. Los zánganos que fueron parasitados durante su desarrollo tienen menos probabilidades de copular (Duay *et al.*, 2002) y a su vez las colonias infestadas producen menos enjambres (Olofsson *et al.*, 2009a; Villa *et al.*, 2008; Fries *et al.*, 2003). Cuando los niveles de infestación son bajos, no se observan síntomas, sin embargo, durante el otoño (donde la población de ácaros sigue aumentando mientras la población de hospedadores disminuye) se comienzan a observar los síntomas y si no se aplican tratamientos, la infestación puede llevar a la pérdida de la colonia (Fries *et al.*, 2003). El colapso final de una colmena se asocia con el "síndrome del ácaro parásito", en donde se evidencian las crías dispersas, abejas que se arrastran o incluso lisiadas, la superposición de reinas y la reducción de la población de abejas (Shimanuki *et al.*, 1994).

#### Patología a nivel individual

Las abejas obreras que fueron parasitadas durante su desarrollo, presentan comportamientos distintos a las abejas que no fueron parasitadas. Se ha observado que éstas abejas muestran una menor capacidad de aprendizaje, comienzan a pecorear antes, se ausentan de la colonia por largos períodos y poseen una menor tasa de retorno. A su vez la vida media de estas abejas se ve reducida significativamente (Amdam *et al.*, 2004; De Jong, 1982; Kralj *et al.*, 2007).

También se ha demostrado que este ácaro es capaz de deprimir la respuesta inmune de las abejas facilitando la entrada de diferentes patógenos (Shen *et al.*, 2005; Yang y Cox-Foster, 2005), y actuando como transmisor de virus, entre ellos el Virus Kashmir (KBV), el Virus de la cría ensacada (SBV), el Virus de la Parálisis Aguda ABPV, el Virus de la Parálisis Aguda Israelí (IAPV) y el Virus de las alas deformes (DWV) (Boecking y Genersch, 2008; Yue y Genersch, 2005).

El umbral de daño no está correlacionado con un número fijo de ácaros por colonia. Es variable y depende de la población de abejas y cría, la estación y la presencia de virus de abejas (Rosenkranz *et al.*, 2010).

*V. destructor* está ampliamente distribuido en nuestro país, estando presente en la mayoría de las colonias (Anido *et al.*, 2016), lo que lleva a la necesidad de aplicar

productos acaricidas en forma sistemática para evitar la pérdida de las mismas. Los tratamientos disponibles para el ácaro se basan en el uso de acaricidas sintéticos (Maggi *et al.*, 2011; Rosenkranz *et al.*, 2010). Los acaricidas sintéticos habilitados para su uso en Uruguay son el organofosforado cumafós, los piretroides fluvalinato y flumetrina, y la formamida amitraz, que son administrados en otoño luego de la cosecha (Campá y Harriet, 2007). Uno de los inconvenientes de la utilización de acaricidas sintéticos es que sus residuos permanecen en la cera. La exposición prolongada a estos residuos alteran la homeostasis, el metabolismo y el sistema inmune de las abejas (Boncristiani *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2013). Por otro lado estos residuos pueden permanecer en la miel u otros productos de la colmena, pudiendo incluso afectar la salud humana.

Como alternativa a los acaricidas sintéticos se han evaluado acaricidas orgánicos como el ácido oxálico, ácido fórmico, ácido láctico y timol para el control de *V. destructor* (Rosenkranz *et al.*, 2010). Los acaricidas orgánicos se pueden aplicar antes de la primavera (en ausencia de la cría para asegurar mayor efectividad) porque una de las ventajas de estos compuestos es que son volátiles y no permanecen en la cera y miel (Rosenkranz *et al.*, 2010).

#### -Virus ARN

Se han descrito más de 18 virus ARN que infectan las abejas melíferas (Allen y Ball, 1996). Todos ellos pertenecen a la superfamilia de virus tipo picorna, poseen un genoma simple hebra positiva y están libres de envoltura lipídica (Chen y Siede, 2007). Sólo 7 virus son considerados de relevancia sanitaria para la apicultura: el virus de la parálisis aguda (ABPV), el virus de las celdas reales negras (BQCV), el virus de la parálisis crónica (CBPV), el virus de las alas deformadas (DWV), el virus israelí de la parálisis aguda (IAPV), el virus kashmir (KBV) y el virus de la cría ensacada (SBV) (Chen y Siede, 2007).

La mayoría de estos virus persisten en las abejas como infecciones “no aparentes” (Anderson y Gibbs, 1988), solamente los virus CBPV, SBV y DWV pueden llegar a producir síntomas clínicos que podrían ser identificados por los apicultores (Figura 6). Incluso los virus que producen síntomas pueden causar infecciones persistentes en colmenas aparentemente sanas (Chen y Siede, 2007; de Miranda y Genersch, 2010). Determinados estímulos pueden activar la replicación de los virus, causando infecciones agudas y frecuentemente letales (Ribière *et al.*, 2010). Los virus pueden transmitirse de manera horizontal, vertical o ambas; la transmisión horizontal ocurre entre individuos de la misma colmena a través de la comida o el aire, tal es el caso de

ABPV, BQCV, CBPV, DWV, KBV, SBV (Chen y Siede, 2007; Ribière *et al.*, 2008). La transmisión vertical se da desde la línea materna hacia la cría a través de la superficie de los huevos, o dentro de los mismos. Esta vía se ha propuesto para los virus BQCV, CBPV, DWV, KBV y SBV (Shen *et al.*, 2005).

Es importante recalcar la asociación entre el ácaro *V. destructor* y los diferentes virus. Se ha visto que la presencia del ácaro puede aumentar la incidencia de los virus (Martin *et al.*, 2012).



Figura (6)-En la imagen se observa una abeja adulta con alas deformadas producto de la infección con DWV, uno de los ácaros que parasitó la pupa aún se encuentra adherido a la abeja. Imágenes e información tomada de Miranda y Genersch, 2010.

La aplicación de acaricidas o antibióticos para el tratamiento o prevención de estas u otras enfermedades de las abejas puede provocar el desbalance en la homeostasis entérica de las abejas, afectando también su metabolismo y la respuesta inmune, la aparición de organismos resistentes y la generación de residuos que permanecen en la miel afectando su calidad para el consumo (Boncristiani *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2013; Harriet *et al.*, 2017; Rosenkranz *et al.*, 2010).

Por estos motivos, la búsqueda de una estrategia saludable para la mejora de la salud de las abejas es un punto clave para el mantenimiento y el desarrollo de la apicultura a nivel nacional y mundial.

### **-Comunidad microbiana intestinal de la abeja**

Los microorganismos que forman parte de la comunidad microbiana del intestino de un individuo son esenciales para mantener su correcta nutrición, salud e inmunidad (Gill *et al.*, 2006). Esto se ha visto incluso en el hombre, lo que ha dado lugar a una gran cantidad de estudios de la microbiota del intestino humano. En insectos se ha demostrado experimentalmente los efectos beneficiosos de las comunidades

bacterianas nativas de los mismos. Cuando se utilizan antibióticos o tratamientos térmicos que causan la pérdida de simbioses, se ha observado una disminución del crecimiento, supervivencia y pérdida de las capacidades reproductivas. Además los simbioses bacterianos, en algunos casos permiten que su hospedador tenga la disponibilidad de nutrientes que están ausentes en la dieta o no se encuentran disponibles para su asimilación (Moran y Telang, 1998).

En el caso de las abejas, las mismas poseen un sistema digestivo sencillo, con una comunidad microbiana estable en diferentes regiones geográficas, como Alemania (Mohr y Tebbe, 2006), Suiza (Babendreier *et al.*, 2007) y Sudáfrica (Jeyaprakash *et al.*, 2003). Estos estudios permitieron identificar especies de los seis grupos filogenéticos mayoritarios:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ - Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacterias (Babendreier *et al.*, 2007; Jeyaprakash *et al.*, 2003; Mohr y Tebbe, 2006; Yoshiyama y Kimura, 2009).

Los microorganismos que forman parte de la comunidad microbiana intestinal pueden proveer protección a su hospedero mediante tres mecanismos: 1) pueden producir compuestos químicos con efectos directos sobre microorganismos antagónicos; 2) colonizar nichos vulnerables en o sobre los hospedadores, excluyendo competitivamente a los patógenos o 3) pueden interactuar con el sistema inmune y potenciar la resistencia frente a patógenos o parásitos (Kaltenpoth y Engel, 2014; Reenen y Dicks, 2011).

Los huevos, las prepupas, las pupas y las abejas adultas recién emergidas generalmente no poseen una microbiota asociada (Gilliam *et al.*, 1997). Las larvas adquieren los microorganismos que están asociados con las adultas, el polen o el cuadro (Gilliam *et al.*, 1997; Kačániová *et al.*, 2004). Previo al comienzo de la metamorfosis las pupas eliminan estos microorganismos mediante las deyecciones. Luego de que emergen, en los primeros cuatro días su intestino es recolonizado al ingerir polen y néctar que intercambian con las abejas mayores (Gilliam *et al.*, 1997; Gilliam *et al.*, 1977; Kačániová *et al.*, 2004). La microbiota intestinal de las abejas puede variar según la edad, la época del año y algunas veces con la localización geográfica, pero los grupos filogenéticos permanecen estables (Gilliam *et al.*, 1997; Hamdi *et al.*, 2011). El grupo de mayor importancia que ha sido aislado de abejas melíferas son las bacterias del ácido láctico (BAL) así como cepas de *Shingomonas* y *Escherichia coli* cuya abundancia puede variar dependiendo de los diferentes tipos de néctar que se encuentren disponibles (Olofsson y Vásquez 2009b; Kaltenpoth y Engel, 2014).

Las BAL se caracterizan por ser microorganismos Gram positivos, con un bajo contenido de Guanina y Citosina (GC), muy heterogéneos en cuanto a su morfología,

son fisiológicamente tolerantes a condiciones ácidas, y cuya característica principal es la producción de ácido láctico como principal producto del metabolismo fermentativo de los carbohidratos (Hamdi *et al.*, 2011).

Son habitantes del tracto gastrointestinal tanto de insectos como de vertebrados y se encuentran implicadas en el mantenimiento de la comunidad microbiana intestinal así como de la inmunomodulación (Mitsuoka, 1992). Se ha observado que cuando se modifican las proporciones de la comunidad intestinal, en comparación con las que se encontrarían habitualmente, pueden generarse deficiencias o enfermedades en el hospedador (Sartor, 2008). En abejas de colmenas que sufrieron episodios de despoblación, se observó una importante disminución en la abundancia de Firmicutes y  $\alpha$ -Proteobacteria (principalmente representados por BAL y bacterias del ácido acético respectivamente) en comparación a las colmenas sanas. Esta observación sugiere que el desbalance en la distribución de especies de la comunidad microbiana, especialmente la baja presencia de BAL, influyen de forma negativa la salud de las abejas (Hamdi *et al.*, 2011).

### **-Probióticos**

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al hospedero un beneficio para la salud (FAO, 2002).

El uso de probióticos es una práctica ampliamente utilizada tanto en seres humanos como en otros animales, han sido utilizados miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Bacillus* y *Propionibacterium*, entre otros (Cross, 2002; Ducatelle *et al.*, 2014).

Para que una cepa bacteriana se considere con el potencial de ser utilizada como probiótico la misma debe cumplir con determinadas características. El o los microorganismos que se van a administrar no deben ser potencialmente patógenos y deberían formar parte del nicho ecológico sobre el cual se pretenderá influir y preferentemente ser aislados del huésped destinatario (Reid, 1999; Salminen *et al.*, 1998). También se busca que posean propiedades de adhesión a epitelios para favorecer la permanencia en el huésped, exclusión o reducción de adherencia de patógenos, persistencia y multiplicación, producción de ácidos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas que tengan efecto antagonista sobre el crecimiento del patógeno y resistencia a la acción de ácidos durante el pasaje por el tracto gastrointestinal (Reid 1999).

En el caso de las abejas melíferas, se han realizado varios estudios de la microbiota intestinal con el fin de identificar y caracterizar las bacterias que se podrían utilizar como probióticos (Alberoni *et al*, 2016).

Ensayos *in vitro* han demostrado que las bacterias aisladas de la colmena y la microbiota intestinal pueden inhibir el crecimiento de patógenos, tales como *Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius* o *Ascosphaera apis*, agentes causales de la Loque Americana, Loque Europea y Ascospferiosis (Forsgren *et al.*, 2009b; Vásquez *et al.*, 2012; Yoshiyama y Kimura, 2009).

Se han realizado estudios *in vivo*, donde se observó que la administración de diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, a larvas infectadas con *P. larvae*, redujeron de manera significativamente la mortalidad de las mismas (Forsgren *et al.*, 2009b). Se observaron resultados similares en el caso de infección con el patógeno bacteriano *M. plutonius* (Vásquez *et al.*, 2012). La administración de cepas de *L. kunkeei* en abejas adultas consiguió disminuir el número de esporas de *N. ceranae*, demostrándose así un posible efecto antiparasitario (Arredondo *et al*, 2018).

Por otro lado, las bacterias probióticas podrían actuar de forma indirecta sobre los patógenos mediante la estimulación de la respuesta inmune innata (Evans y Lopez, 2004). Esto también es importante para el control de *N. ceranae* y *V. destructor*, ya que estos patógenos, son capaces de deprimir la respuesta inmune de la abeja (Antúnez *et al.*, 2009; Yang y Cox-Foster, 2005).

## **Hipótesis**

La hipótesis de este trabajo postula que la aplicación de una mezcla de microorganismos con potencial probiótico puede mejorar la fortaleza y estado sanitario de colmenas de producción.

## **Objetivo general**

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar el efecto de la administración de un probiótico, obtenido previamente por nuestro grupo de investigación, sobre aspectos sanitarios y productivos de colmenas en el campo.

## **Objetivos específicos**

- Analizar el efecto de la administración del probiótico en la población de abejas adultas, cría y cantidad de miel de colmenas de producción.
- Analizar el efecto de la administración del probiótico en el nivel de infestación con *V. destructor*, *N.ceranae* y distintos virus ARN en colmenas de producción.

## ***Materiales y Métodos:***

### **Aislamientos bacterianos y condiciones de cultivo:**

En este trabajo se utilizaron los aislamientos *Lactobacillus kunkeei* 35, 37, 67 y 110, obtenidos a partir del intestino de abejas de colmenas históricamente sanas y pertenecientes a la colección del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Las características de estos aislamientos se examinaron previamente por Arredondo *et al* (2018) quienes evaluaron la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos, la capacidad de sobrevivir en distintas concentraciones de acidez, temperatura y azúcar. La administración de estas cepas consiguió disminuir la mortalidad ocasionada por *P. larvae* en larvas y disminuir el número de esporas de *N. ceranae* en abejas adultas.

Estos aislamientos se cultivaron en medio semi-selectivo de Mann Rogosa Sharp agar o caldo (MRS agar o MRS caldo) y se incubaron a 37°C durante 24 horas en condiciones de microaerofilia.

### **Preparación del probiótico:**

A partir de un cultivo fresco de cada aislamiento, se inoculó por azuada 50 mL de caldo MRS y se incubó a 37°C durante 24 horas en agitación y microaerofilia. A las 24 horas se realizó la cuantificación del número de bacterias de cada cultivo utilizando un espectrofotómetro de placas (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific Inc™ Finlandia). Se colocaron 200 µL de cada caldo en distintos pocillos, utilizando caldo MRS sin inocular como blanco y se midió la absorbancia a 600 nm. Se estandarizó la densidad óptica (D.O) de cada cultivo al equivalente a 4 de la escala McFarland ( $1,2 \times 10^9$  ufc/ml, D.O. = 0,669).

Se inocularon 5 mL de cada precultivo de manera individual en 300 mL de caldo MRS y se incubaron a 37°C durante 24 horas en agitación. A las 24 horas se midió la absorbancia de los cultivos para comprobar que poseían la misma D.O. utilizando la metodología descrita anteriormente.

Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se realizó para cada uno de los aislamientos. Finalmente los *pellet* de los 4 aislamientos se mezclaron y se resuspendieron en 5 L de Jarabe 1:1 (1 kg de azúcar en 1 L de agua).

Se realizó el recuento del número de células en la preparación final del probiótico en jarabe, antes de su aplicación en el campo, y al finalizar la jornada de trabajo, para

corroborar su viabilidad. Para ello se tomaron 100 µL del jarabe conteniendo el probiótico y se realizaron diluciones seriadas en Buffer Salino Fosfatado (PBS 1X). Se sembraron por triplicado 100 µL de cada dilución en placas de MRS agar y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

### **Ensayo de campo:**

El ensayo de campo se realizó en colmenas de producción localizadas en Marindia, en el departamento de Canelones, Uruguay (km 40 de la ruta Interbalnearia).

Se realizó un muestreo previo de abejas nodrizas de cada colmena para determinar el nivel de infección con *N. ceranae*. En base al número de esporas de este patógeno por colmena, el apiario se dividió en tres grupos homogéneos de 15 colonias cada uno.

El grupo 1 (Probiótico) recibió jarabe 1:1 inoculado con el probiótico a una concentración de  $1 \times 10^7$  ufc/mL mediante asperjado en cada cuadro (50 mL) y en alimentador (200 mL), el grupo 2 (Vehículo) recibió jarabe 1:1 sin inocular mediante asperjado en cada cuadro (50 mL) y en alimentador (200 mL) y el grupo 3 (Control) no recibió tratamientos.

Los tratamientos se aplicaron una vez por semana durante 3 semanas consecutivas entre los meses marzo y abril del 2017.

El día de la primera aplicación del probiótico se tomaron muestras de abejas nodrizas y pecoreadoras que se colocaron por separado en recipientes plásticos con alcohol 70% para evitar su descomposición y permitir su almacenamiento hasta el momento del análisis. A su vez, se tomaron muestras de abejas nodrizas que se colocaron en sobres de papel de manila y se mantuvieron vivas hasta llegar al laboratorio donde se almacenaron en un freezer a -80°C, con el fin de evitar la degradación del ARN viral.

El segundo y tercer muestreo se realizaron al mes y a los dos meses de la primera aplicación del probiótico. Se consideraron abejas nodrizas aquellas abejas tomadas cerca del nido de cría y pecoreadoras las abejas del interior pero ubicadas lejos del nido de cría (Fries *et al.*, 2013).

### **Fortaleza de la colmena**

La fortaleza de la colmena se estimó mediante inspección visual, de acuerdo a lo recomendado por Delaplane *et al.*,(2013). El encargado de estas observaciones fue un técnico de la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE, MGAP) con amplia trayectoria en apicultura. Se estimó la cantidad de población (adulta y cría), la calidad de la cría, las reservas de miel. La población de abejas adultas y reservas de miel se

registraron cómo número de cuadros cubiertos. La cantidad de cría se midió como cuarto de cuadro cubierto. Posteriormente todos estos datos se transformaron a cm<sup>2</sup> (Delaplane *et al.*, 2013). Estos parámetros fueron tomados como variables de respuesta durante el seguimiento del experimento.

#### **Cuantificación de *Varroa destructor*:**

Para la cuantificación de *V. destructor* se utilizaron las muestras de abejas nodrizas conservadas en alcohol 70%. Se agitó la muestra de abejas nodrizas en agua tibia y detergente durante 1 minuto para provocar el desprendimiento de los ácaros adheridos. Luego las abejas se colocaron sobre un tamiz donde se recogieron los ácaros y se realizó el recuento de abejas y de ácaros. El nivel de infestación se obtuvo del cociente entre el número de ácaros obtenidos y el número de abejas analizadas, multiplicado por cien (Dietemann *et al.*, 2013).

#### **Cuantificación de *Nosema ceranae*:**

La cuantificación de *N. ceranae* se realizó utilizando las muestras de abejas pecoreadoras conservadas en alcohol 70%. En primer lugar se diseccionaron 60 abdómenes y se homogeneizaron en 60 mL de agua (destilada y esterilizada) durante 2 min a máxima velocidad en un homogeneizador Stomacher 80 LabBlender (Seward, London, UK). Posteriormente se colocaron 10 µL del homogeneizado en una cámara de Neubauer y se observó en microscopio óptico a 400x de acuerdo a lo descrito en el manual del COLOSS Beebook (Fries *et al.*, 2013).

Se determinó el número de esporas de acuerdo a la fórmula:

$$N^{\circ} \text{ esporas} \times \text{Factor de dilución} / \left( \text{Área de los cuadrados contados} \times \text{Profundidad de la cámara} \right)$$

(Human *et al.*, 2013)

#### **Determinación y cuantificación de los virus ABPV y DWV:**

De cada muestra de abejas nodrizas conservadas a -80 °C, se seleccionaron de forma aleatoria 10 abejas con pinza estéril y se homogeneizaron en 10 mL de PBS 1X frío durante 2 min a máxima velocidad en un homogeneizador Stomacher 80 LabBlender (Seward, London, UK). El homogeneizado del paso anterior se filtró con gazas y se centrifugó a 1500 x g durante 15 min a 4°C, posteriormente a 1700 x g por 15 min a 4°C. La purificación del ARN viral se realizó utilizando el kit comercial PureLink™ Viral RNA/DNA MiniKit (Invitrogen, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Posteriormente se realizó la retrotranscripción a ADN complementario (ADNc) utilizando el kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, USA).

La detección de virus las muestras de abejas se realizó utilizando el kit comercial Power SYBR<sup>R</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) y primers específicos tanto para los genes de referencia como para los virus estudiados (Tabla 1). La media geométrica de los dos genes de referencia (RPS5 y  $\beta$ -actina) se utilizó para normalizar y estimar la expresión de los virus mediante el método de (Pfaffl, 2001). La mezcla para una reacción consistió en 10  $\mu$ L de Sybr, 0.6  $\mu$ M de cada primer del par 4.76  $\mu$ L agua libre de RNAsas y 5  $\mu$ L de ADNc. En todas las corridas se incluyeron controles negativos y se utilizaron diluciones seriadas de una mezcla de todas las muestras para realizar la curva de calibración de los virus y de los genes de referencia.

Las reacciones de PCR en Tiempo Real se realizaron en un termociclador Bio-Rad CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, USA). El programa de ciclado consistió en una activación inicial a 50 °C durante 2 min y 95 °C durante 15 min, y 40 ciclos de 94 °C durante 15 s, 50 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s. La especificidad de la reacción se verificó mediante la inclusión de una curva de desnaturalización o *melting* de los productos amplificados (de 65 a 95 °C).

Tabla 1.- Primers utilizados para la cuantificación de virus en las muestras mediante qPCR.

| Primer  | Secuencia 5' – 3'         | Virus/Gen       | Referencia                       |
|---------|---------------------------|-----------------|----------------------------------|
| ABPV1   | ACCGACAAAGGGTATGATGC      | AVPB            | Johnson <i>et al.</i> ,<br>2009  |
| ABPV2   | CTTGAGTTTGCGGTGTTCCCT     |                 |                                  |
| DWV1    | CTGTATGTGGTGTGCCTGGT      | DWV             | Kukielka <i>et al.</i> ,<br>2008 |
| DWV2    | TTCAAACAATCCGTGAATATAGTGT |                 |                                  |
| BACTIN1 | ATGCCAACACTGTCCTTTCTGG    | $\beta$ -actina | Yang y Cox-Foster, 2005          |
| BACTIN2 | GACCCACCAATCCATACGGA      |                 |                                  |
| RPS5-F  | AATTATTTGGTCGCTGGAATTG    | Proteína        | Evans, 2006                      |
| RPS5-R  | TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA    | Ribosomal 5s    |                                  |

## **Análisis estadístico**

Se evaluó si los datos cumplían con los supuestos para el uso de la estadística paramétrica. En caso de no cumplir, estos parámetros se estudiaron utilizando tests no paramétricos.

Las diferencias entre los grupos se analizaron utilizando el test no paramétrico Kruskal–Wallis, En los casos que se observaron diferencias significativas se profundizó en éstas utilizando test no paramétrico Mann–Whitney.

En todos los casos se estableció que los valores de  $p$  menores a 0,05 eran significativos.

Los análisis de normalidad y los gráficos de dispersión tipo *box-plot* se realizaron utilizando el *software* Statsoft Statistica v7.0.61.0 ENdvd.

## **Resultados**

### **Efecto del probiótico en la fortaleza de la colmena.**

Antes de la aplicación del probiótico a campo, así como uno y tres meses luego de su aplicación se colectaron muestras de abejas pecoreadoras y nodrizas y se estimó la fortaleza de las colmenas.

Se realizó la exploración de los datos y se verificó que los mismos no cumplían con la estadística paramétrica por lo que se utilizó estadística no paramétrica (Kruskal – Wallis y Mann-Whitney).

Al comienzo del ensayo los tres grupos de colmenas presentaron similar cantidad de población de abejas adultas, cría y reservas de miel, indicando que se partió de tres grupos homogéneos de colmenas.

La población de abejas adultas disminuyó durante el transcurso del experimento (marzo a julio) en los tres grupos, coincidiendo con el ciclo anual de la colonia (Figura 7a). Al mes de la primera aplicación, se observó que el grupo tratado con probióticos presentó menor población que el grupo control ( $p < 0.01$ ).

La población de cría (Figura 7b) y las reservas de miel (Figura 7c) también disminuyeron hacia el invierno, de acuerdo al ciclo normal de la colonia. No se encontraron diferencias significativas en estos parámetros entre tratamientos ( $p > 0.05$  en todos los casos)

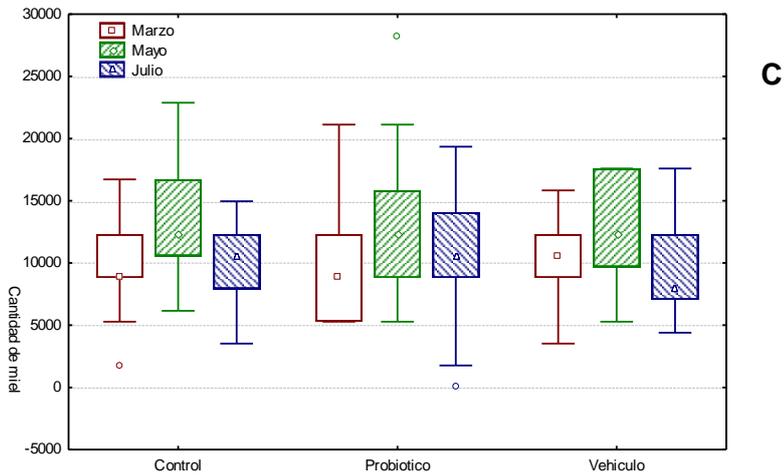
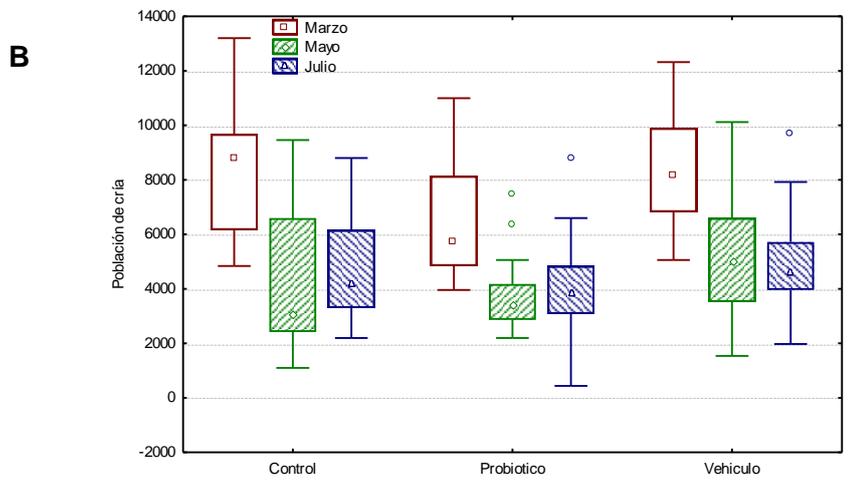
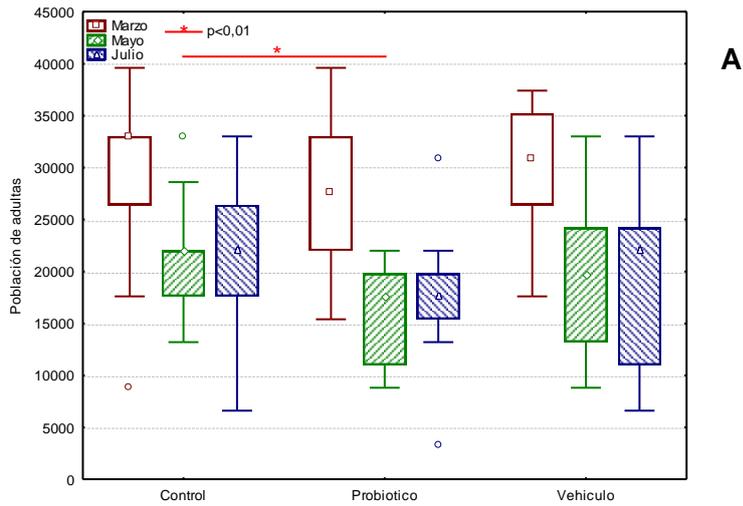


Figura (7) – **A**- Población de abejas adultas (cm<sup>2</sup>), **B**- Población de cría (cm<sup>2</sup>) y **C**- Cantidad de miel (cm<sup>2</sup>) en función del tratamiento. Las cajas del gráfico muestran la dispersión intercuartil de los datos (contiene el 50% central de los datos de la distribución). En el interior de las cajas se marca la posición de la mediana.

### Efecto del probiótico en el ácaro *V. destructor*

Con el fin de analizar si el probiótico tiene un efecto sobre el desarrollo de patógenos, se evaluó el efecto sobre el ácaro *V. destructor*. Los datos obtenidos de porcentaje de infestación en los distintos grupos se analizaron y se verificó que los datos no cumplían con los supuestos para el uso de estadística paramétrica. Por ese motivo los datos se analizaron mediante los test no paramétricos Kruskal – Wallis y Mann Whitney.

En el comienzo del ensayo no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, por lo que se partió de grupos homogéneos.

En el mes de julio (3 meses post aplicación de los tratamientos), las colmenas que recibieron el tratamiento con probióticos presentaron menor nivel de infestación con *V. destructor*, respecto a las colmenas que recibieron el vehículo o a las del grupo control (Mann-Whitney U Test  $p = 0,01$ ; y  $p = 0,06$ , respectivamente, Figura 8).

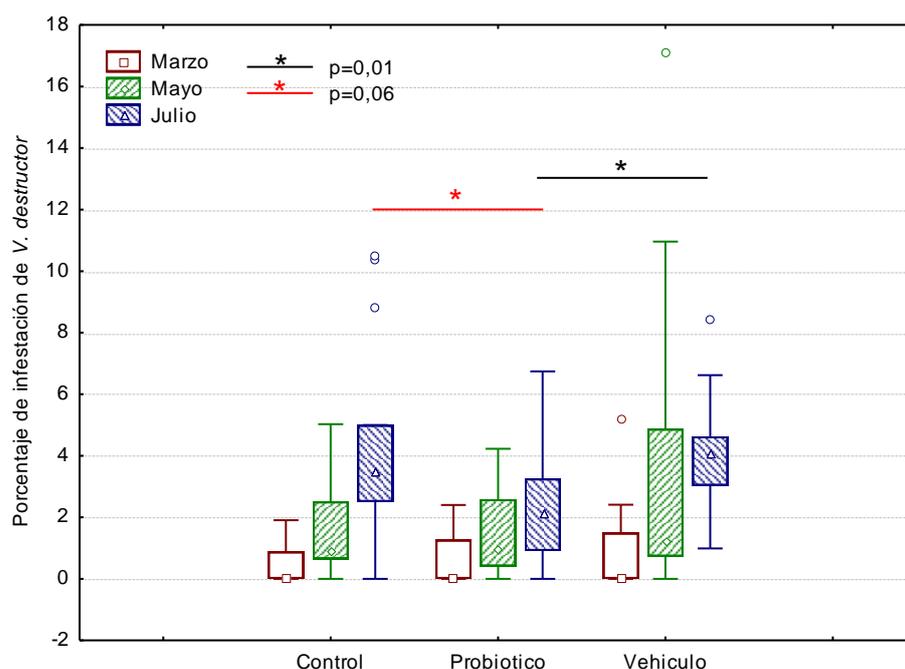


Figura (8) -Porcentaje de infestación de *V. destructor* en las colmenas analizadas según el tratamiento. Las cajas del gráfico muestran la dispersión intercuartil de los datos (contiene el 50% central de los datos de la distribución). En el interior de las cajas se marca la posición de la mediana.

## Efecto del probiótico en la infección por *Nosema ceranae*

Con el fin de determinar el nivel de infestación con *N. ceranae* en los distintos grupos se utilizó el protocolo descrito en la sección 6 de Materiales y Métodos. Los datos obtenidos se analizaron por mes y por tratamiento, utilizando los test estadísticos no paramétricos Kruskal – Wallis y Mann-Whitney.

Al inicio del ensayo los tres grupos de colmenas presentaron similar nivel de infección por *N. ceranae* ( $p > 0,05$ ). Uno y tres meses luego de la aplicación de los tratamientos, el número de esporas fue menor en el grupo tratado con probióticos respecto a los dos grupos controles (control y vehículo), pero esta diferencia no fue significativa.

En cuanto a la dinámica del microsporidio en el tiempo, las colmenas que recibieron el tratamiento con el probiótico presentaron una disminución significativa del nivel de infestación con *N. ceranae* al mes de la aplicación (Mann-Whitney U Test  $p < 0,05$ ), manteniendo la tendencia en siguiente mes. Por otro lado, las colmenas de los grupos control y vehículo evidenciaron una disminución más gradual con diferencias significativas pero tres meses luego de la aplicación de los tratamientos (Mann-Whitney U Test  $p < 0,05$ ) (Figura 9).

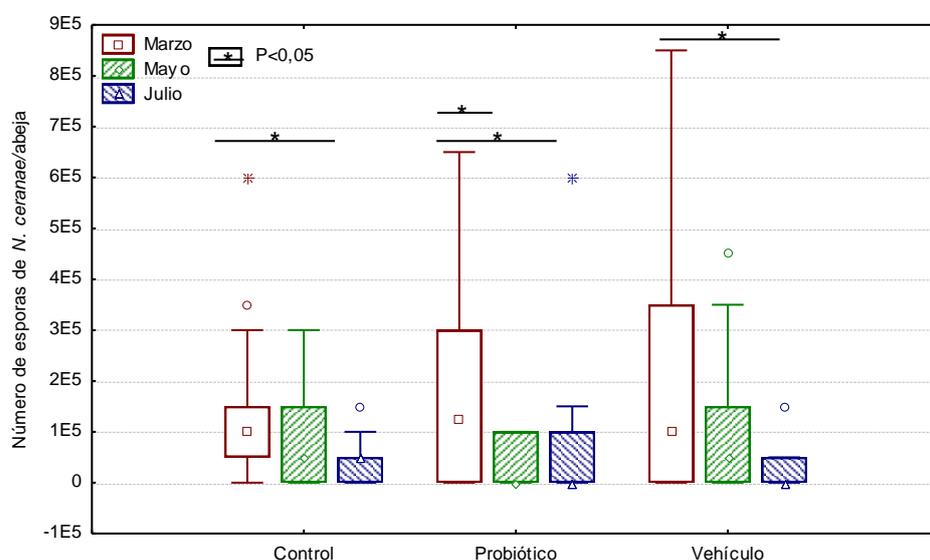


Figura (9) -Número de esporas de *N. ceranae* en las colmenas analizadas según el tratamiento. Las cajas del gráfico muestran la dispersión intercuartil de los datos (contiene el 50% central de los datos de la distribución). En el interior de las cajas se marca la posición de la mediana.

## **Efecto del probiótico en la carga viral de los virus ABPV y DWV**

La determinación de la carga viral dentro de las colonias se realizó mediante la colecta de abejas nodrizas, extracción de ARNm, retranstrucción a ADNc y posterior amplificación mediante qPCR de genes de referencia y de genes para detectar específicamente los virus ABPV y DWV

Se detectó exitosamente la presencia de los virus ABPV y DWV en las muestras obtenidas de las diferentes colmenas en los distintos tiempos. Posteriormente se evaluaron los resultados de la cuantificación de la carga viral.

Al inicio del ensayo los tres grupos de colmenas presentaron similar nivel de carga viral. En el caso del ABPV (Figura 10A) se observó que en todos los grupos la carga viral aumentó significativamente de marzo a mayo, disminuyendo hacia el mes de julio en el grupo control y vehículo, y permaneciendo constante en el grupo al que se le administró el probiótico.

En el caso del DWV (Figura 10B) también se observó que en todos los grupos la carga viral aumentó significativamente de marzo a mayo, disminuyendo hacia el mes de julio en el grupo control y probiótico, y aumentando en el mes de julio para el grupo vehículo.

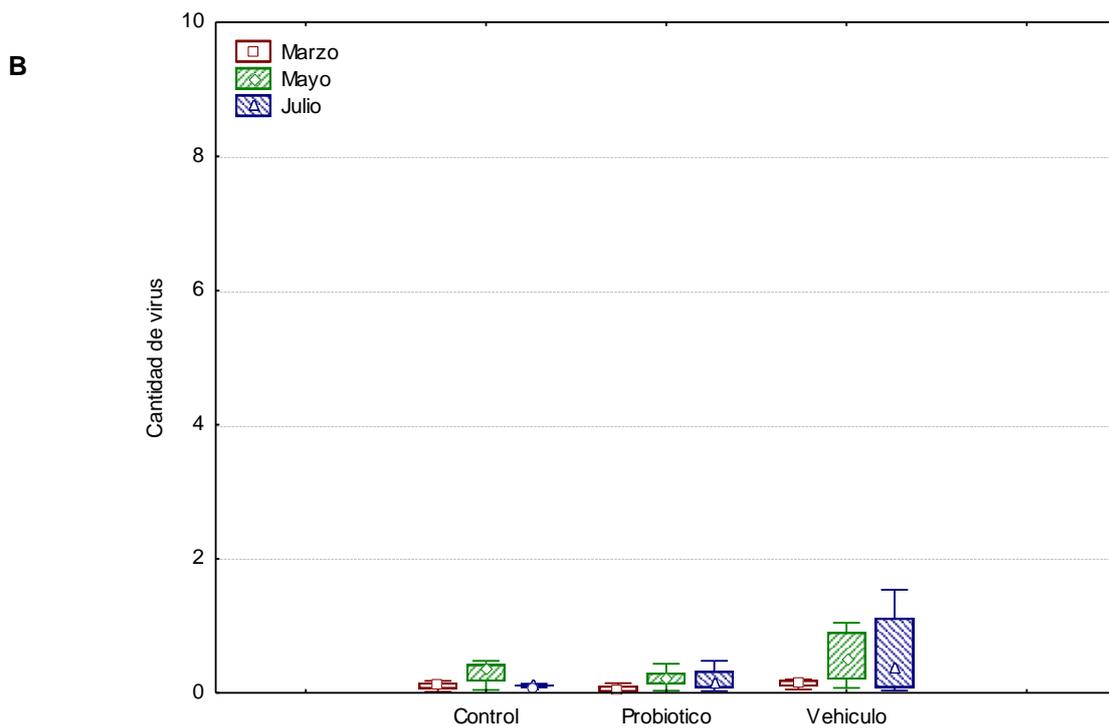
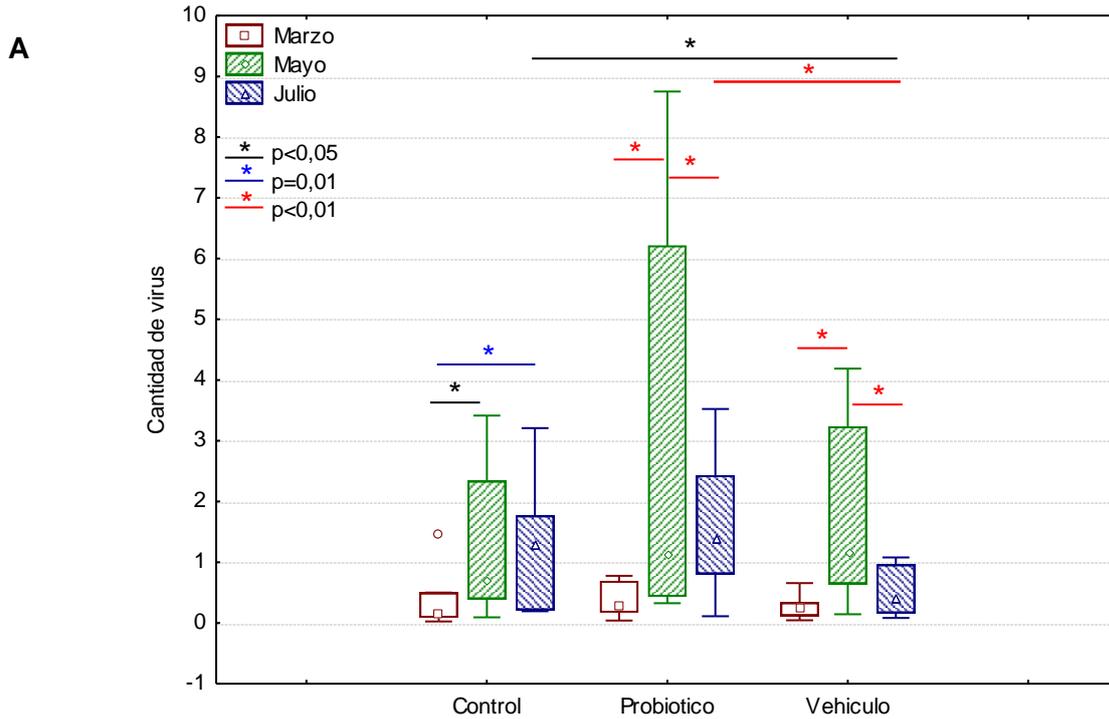


Figura (10) A- ABPV y B- DWV -Cantidad de virus relativa a los genes de referencia en las colmenas analizadas según el tratamiento. Las cajas del gráfico muestran la dispersión intercuartil de los datos (contiene el 50% central de los datos de la distribución). En el interior de las cajas se marca la posición de la mediana.

## **Discusión**

Las abejas melíferas son insectos valiosos, porque además de brindar diversos productos (miel, polen, etc), cumplen un rol muy importante en la polinización, tanto de cultivos agrícolas como de especies silvestres (FAO, 2018). Como se describió anteriormente en la actualidad las abejas se enfrentan continuamente a patógenos, como lo son *V. destructor*, *N. ceranae* y los distintos virus ARN. La presencia de estos patógenos dificulta y encarece el trabajo de los apicultores a la hora de mantener sus colmenas. Como ejemplo, en caso de infestación por *V. destructor* el productor debe aplicar tratamientos acaricidas para evitar el colapso de sus colmenas (Boecking y Genersch, 2008; Martin, 1998).

En el presente trabajo se estudió la acción de un probiótico compuesto por cuatro cepas diferentes de *L. kunkeei* sobre los principales patógenos que afectan a las abejas melíferas en Uruguay en colmenas de producción. Las características de estas cepas se examinaron previamente por Arredondo *et al*, (2018), quienes evaluaron la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos, la capacidad de sobrevivir en distintas concentraciones de acidez, temperatura y azúcar. La administración de estas cepas fue segura para larvas y abejas adultas en condiciones controladas de laboratorio. Por otro lado, el probiótico consiguió disminuir la mortalidad ocasionada por *P. larvae* en larvas y disminuir el número de esporas de *N. ceranae* en abejas adultas (Arredondo *et al*, 2018).

En este trabajo, se encontró que las colmenas que recibieron el probiótico presentaron menor nivel de infestación por el ácaro *V. destructor* que los grupos control y vehículo. Estos resultados presentan interés, ya que no hay registros previos de este tipo de acción. Entre los mecanismos que podrían estar involucrados, se destaca la producción de compuestos químicos. La producción de compuestos antimicrobianos es la forma más común mediante la cual los microorganismos participan en la protección de los insectos (Alberoni *et al.*, 2016; Kaltenpoth y Engl, 2014).

Como *V. destructor* es un ectoparásito que se alimenta de la hemolinfa de la abeja, una posible hipótesis del mecanismo de acción de este probiótico podría ser que, los microorganismos produzcan, o induzcan la producción de alguna sustancia. Las sustancias producidas pueden ser transportadas por medio de la hemolinfa y ocasionar el desprendimiento del ectoparásito.

Por otro lado, la adición de bacterias que promuevan una mejora en la salud de las abejas podría llegar a mejorar los comportamientos higiénicos (como el aseo) y de esta forma potenciar que las abejas se quiten los ácaros entre ellas mismas (Boecking y Spivak, 1999).

Por otro lado, también se encontró que el probiótico disminuye el nivel de infección por *N. ceranae*. Resultados similares se obtuvieron por Corby-Harris *et al*, (2016), quienes estudiaron el efecto de *Parasaccharibacter apium* como posible probiótico, y observaron una disminución en el nivel de infestación por este microsporidio. Alberoni *et al.*,(2016) compararon diferentes probióticos, en este caso en ensayos a nivel de campo, y reportaron que si bien lograban reducir el nivel de infestación por *Nosema*, esta disminución no era significativa.

El mecanismo de inhibición de patógenos por parte de las bacterias del ácido láctico en el caso de las abejas sigue siendo desconocida. En otros estudios de inhibición de crecimiento de patógenos, como *Paenibacillus larvae* y *Ascospaera apis* por ejemplo, se ha hipotetizado que se debe a la participación de ácidos orgánicos así como de péptidos antimicrobianos y ácidos grasos (Gilliam *et al.*, 1997; Kaltenpoth y Engl, 2014; Vásquez *et al.*, 2012). Como ejemplo, la cutícula de las hormigas *Attine* posee *Actinobacteria* que generan antibióticos que les sirven como mecanismo de defensa frente a patógenos del genero *Escovopsis* (Currie *et al*, 2006; Mattoso *et al*, 2011).

Por otro lado, los microorganismos podrían estar interactuando con el sistema inmune del hospedador y estimulando una mayor respuesta. Estudios realizados por Evans y Lopez, (2004) mostraron que la administración de bacterias del ácido láctico en la dieta de las larvas estimula la transcripción de los genes implicados en la respuesta inmune. A la vez, Cross (2002) estudió como la microbiota intestinal interactúa directamente con células implicadas en la respuesta inmune, generando así protección. En el caso de las cepas de *L. kunkeei* utilizadas en este trabajo, Arredondo *et al*, (2018) estudio el efecto de su administración en la expresión de diferentes genes involucrados en la respuesta inmune de abeja sanas ((pro)fenol-oxidasa, lisozima, vitelogenina, los péptidos antimicrobianos y la glucosa deshidrogenasa). Se observó que la expresión de estos genes no se modificó luego de la administración de las cepas, por lo que estas no modificarían la inmunidad de la abeja, probablemente porque esos aislados pertenecen a la microbiota nativa. Sería interesante evaluar qué efectos puede tener el probiótico sobre el sistema inmune en el caso de la infección con *Nosema spp*, ya que se ha observado que el microsporido es capaz de suprimir el sistema inmune (Antúnez *et al.*, 2009).

Una posible hipótesis del mecanismo por el cual las bacterias probióticas pueden reducir el nivel de infestación por *N. ceranae*, es que las mismas podrían estar alterando la fisiología del intestino de la abeja, formando un biofilm que no permite la interacción del microsporido con el intestino (Vásquez *et al.*, 2012). Otro posible mecanismo es que estas bacterias del ácido láctico, secreten compuestos

antifúngicos, como el ácido acético o láctico lo que podría dañar directamente a *Nosema* (Cabo *et al*, 2002).

En cuanto a los virus ARN, el probiótico no tuvo un efecto en su nivel de infección, encontrando una alta variabilidad en la carga viral independientemente del grupo. Esta variabilidad puede estar vinculada con las condiciones ambientales, y no se encontrarían relacionadas al tratamiento. Las abejas no poseen respuesta inmune adaptativa, pero aun así se sabe que los virus persisten en colonias aparentemente sanas como infecciones latentes, por lo que las abejas poseen algún mecanismo que les permite resistir la multiplicación de las infecciones virales (Chen y Siede, 2007). Li y Ding, (2002) estudiaron el efecto de la infección con un virus que pertenece a la familia Nodaviridae en la mosca *Drosophila* y evidenciaron que la infección era contenida por ARN interferentes (ARNi). Este sistema de ARNi puede trasladarse a la abeja, como mecanismo de retención de los virus ya que el genoma de los mismos está compuesto por moléculas de ARN de cadena positiva.

Por último, el probiótico no tuvo un efecto sobre la fortaleza de la colmena (población adulta, cría y reservas de miel). Al mes de la primera aplicación, se observó que el grupo tratado con probióticos presentó menor población de abejas adultas que el grupo control. Sin embargo no creo que esta disminución significativa se deba a la aplicación del probiótico, ya que a pesar de que en el comienzo (marzo) los grupos no tuvieron diferencias entre ellos, se puede observar que la media del grupo probiótico es menor que la población de los otros grupos y que disminuiría conforme a lo esperado cuando comienza el invierno.

Estos resultados coinciden con los encontrados por Corby-Harris *et al.*, 2016, en la que estas medidas tampoco variaron con la aplicación de *P. apium* como bacteria probiótica. Sin embargo, estos resultados no son categóricos ya que Alberoni *et al.*, 2016 encontraron un aumento significativo en la producción de miel después de la administración de una mezcla de lactobacilos y bifidobacterias en colmenas. Así mismo Audisio, (2011) utilizó una cepa de *Lactobacillus johnsonii* aislada del intestino de abeja como probiótico y observó que el área de cría, población adulta y almacenamiento de miel fueron significativamente mayores en los grupos tratados.

Los resultados obtenidos en este trabajo reflejan y refuerzan el potencial de estas cepas de *L. kunkeei* de disminuir de forma significativa el nivel de infección por *V. destructor* y *N. ceranae*, a pesar que no encontramos diferencia en cuanto a los niveles de los virus estudiados. Esta estrategia es sin dudas una gran alternativa para poder controlar los niveles de infección de forma saludable y natural, evitando los posibles efectos secundarios de los acaricidas y antibióticos de síntesis.

## ***Conclusiones y Perspectivas***

La aplicación del probiótico en colmenas de producción infectadas naturalmente por diferentes patógenos, es capaz de disminuir significativamente el nivel de infección por *V. destructor* y *N. ceranae*. Este tratamiento no afectó el nivel de infección por virus ni la fortaleza de la colmena.

El mecanismo por el cual el probiótico disminuyó los niveles de infestación de *N. ceranae* y *V. destructor* aún queda por dilucidar. Sería interesante profundizar en el estudio de este mecanismo de acción; ej. evaluar los compuestos secretados por estas bacterias; evaluar el efecto sobre la microbiota nativa de las abejas, o evaluar la producción de biofilms.

En este trabajo se demostró el efecto benéfico del probiótico en colmenas de producción a corto plazo. Sería interesante evaluar su efecto a largo plazo.

## **Bibliografía**

- Abrol, D. P. (2011). *Pollination Biology: Biodiversity conservation and agricultural production. Pollination Biology: Biodiversity Conservation and Agricultural Production*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1942-2>
- Alberoni, D., Gaggia, F., Baffoni, L., & Di Gioia, D. (2016). Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(22), 9469–9482. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7870-4>
- Allen, M., & Ball, B. (1996). The incidence and world distribution of honey bee viruses. *Bee World*, *77*(3), 141–162. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1996.11099306>
- Amdam, G. V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A., & Omholt, S. W. (2004). Altered Physiology in Worker Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Infested with the Mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): A Factor in Colony Loss During Overwintering? *Journal of Economic Entomology*, *97*(3), 1086–1095. [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2004\)097](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2004)097)
- Anderson, D. L., & Gibbs, A. J. (1988). Inapparent Virus Infections and their Interactions in Pupae of the Honey Bee (*Apis mellifera* Linnaeus) in Australia. *Journal of General Virology*, *69*(7), 1617–1625. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-7-1617>
- Anido, M., Branchiccela, B., Castelli, L., Harriet, J., Campá, J., Zunino, P., & Antúnez, K. (2015). Prevalence and distribution of honey bee pests and pathogens in Uruguay. *Journal of Apicultural Research*, *54*(5). <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1175731>
- Antúnez, K., Invernizzi, C., Mendoza, Y., vanEngelsdorp, D., & Zunino, P. (2017). Honeybee colony losses in Uruguay during 2013–2014. *Apidologie*, *48*(3), 364–370. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0482-2>
- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., & Higes, M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, *11*(9), 2284–2290. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x>
- Arredondo, D. (2018). Guillermo Añón, Daniela Arredondo, Pablo Zunino, Karina Antúnez, 2018.
- Audisio, M. C. (2011). 2011 Audisio lactobacillus.pdf.
- Babendreier, D., Joller, D., Romeis, J., Bigler, F., & Widmer, F. (2007). Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiology Ecology*, *59*(3), 600–610. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00249.x>

- Boecking, O., & Genersch, E. (2008). Varroosis - The ongoing crisis in bee keeping. *Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 3(2), 221–228.  
<https://doi.org/10.1007/s00003-008-0331-y>
- Boecking, O., & Spivak, M. (1999). Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30(2–3), 141–158.  
<https://doi.org/10.1051/apido:19990205>
- Boncristiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J. D., Pettis, J., & Vanengelsdorp, D. (2012). Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 58(5), 613–620. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.12.011>
- Boot, W. J., Calis, J. N. M., & Beetsma, J. (1992). Differential periods of *Varroa* mite invasion into worker and drone cells of honey bees. *Experimental and Applied Acarology*, 16(4), 295–301. <https://doi.org/10.1007/BF01218571>
- Cabo, M. L., Braber, a F., & Koenraad, P. M. F. J. (2002). Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *Journal of Food Protection*, 65(8), 1309–1316.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.8.1309>
- Calderone, N. W., & Lin, S. (2001). Behavioural responses of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to extracts of larvae, cocoons and brood food of worker and drone honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Physiological Entomology*, 26(4), 341–350. <https://doi.org/10.1046/j.0307-6962.2001.00254.x>
- Campá, J., & Harriet, J. (2007). Pautas sanitarias para manejar correctamente la varroosis.
- Chen, Y.-P., & Siede, R. (2007). Honey Bee Viruses, 70(07), 309–323.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/rwvi.1999.0139>
- Corby-Harris, V., Anderson, K. E., Rodrigues, P. A. P., Mott, B. M., & Maes, P. (2016). Ecological Succession in the Honey Bee Gut: Shift in *Lactobacillus* Strain Dominance During Early Adult Development. *Microbial Ecology*, 71(4), 1008–1019. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0716-2>
- Corby-Harris, V., Snyder, L., Meador, C. A. D., Naldo, R., Mott, B., & Anderson, K. E. (2016). *Parasaccharibacter apium*, gen. Nov., sp. Nov., Improves Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) resistance to *Nosema*. *Journal of Economic Entomology*, 109(2), 537–543. <https://doi.org/10.1093/jee/tow012>
- Crane, E. (1999). Recent research on the world history of beekeeping. *Bee World*, 80(4), 174–186. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1999.11099453>
- Cross, M. L. (2002). Microbes versus microbes: Immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS*

- Immunology and Medical Microbiology*, 34(4), 245–253.  
[https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00377-2](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00377-2)
- Currie, C. R., Poulsen, M., Mendenhall, J., Boomsma, J. J., & Billen, J. (2006). Coevolved crypts and exocrine glands support mutualistic bacteria in fungus-growing ants. *Science*, 311(5757), 81–83.  
<https://doi.org/10.1126/science.1119744>
- De Jong, D., De Jong, D., De Jong, P. H., & Gonçalves, L. S. (1982). Weight Loss and Other Damage to Developing Worker Honeybees from Infestation with *Varroa Jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*, 21(3), 165–167.  
<https://doi.org/10.1080/00218839.1982.11100535>
- de Miranda, J. R., & Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S48–S61. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012>
- Delaplane, K. S., Steen, J. Van Der, & Guzman-novoa, E. (2013). Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies Métodos estándar para estimar parámetros sobre la fortaleza de las colonias de *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–12.  
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.03>
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S. J., Anderson, D. L., Locke, B., Delaplane, K. S., ... Ellis, J. D. (2013). Standard methods for varroa research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–54. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>
- Duay, P., De Jong, D., & Engels, W. (2002). Decreased flight performance and sperm production in drones of the honeybee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genetics and Molecular Research*, 1(3), 227–232.
- Ducatelle, R., Eeckhaut, V., Haesebrouck, F., & Van Immerseel, F. (2014). A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: Present status and future perspectives. *Animal*, 9(1), 43–48. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002584>
- Evans, J., & Lopez, D. (2004). J Econ Entomol induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 97(3), 752–756.
- FAO. (2002). Probiotics in Food, 413–426.  
<https://doi.org/10.1201/9781420009613.ch16>
- FAO. (2018). FAO 2018. FAO, (May).
- FAO 2014. (2014). *Sobre polinización como servicio ambiental para la agricultura sostenible en países de Latinoamérica y el Caribe. Principios y avances.*
- Forsgren, E., Olofsson, T. C., Vásquez, A., & Fries, I. (2009a). Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*, 41(1), 99–

108. <https://doi.org/10.1051/apido/2009065>
- Forsgren, E., Olofsson, T. C., Vásquez, A., & Fries, I. (2009b). Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*, *41*(1), 99–108. <https://doi.org/10.1051/apido/2009065>
- Fries, I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*(SUPPL. 1), S73–S79. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.017>
- Fries, I., Chauzat, M.-P., Chen, Y.-P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., ... Williams, G. R. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, *52*(1), 1–28. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14>
- Fries, I., Feng, F., Da Silva, A., Slemenda, S. B., & Pieniazek, N. J. (1996). *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *European Journal of Protistology*, *32*(3), 356–365. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(96\)80059-9](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(96)80059-9)
- Fries, I., Huazhen, W., Wei, S., & Jin, C. S. (1996). Grooming behavior and damaged mites (*Varroa jacobsoni*) in *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. *Apidologie*, *27*, 3–11. <https://doi.org/10.1051/apido:19960101>
- Garrido, P. M., Antúnez, K., Martín, M., Porrini, M. P., Zunino, P., & Eguaras, M. J. (2013). *Immune-related gene expression in nurse honey bees (Apis mellifera) exposed to synthetic acaricides*. *Journal of Insect Physiology* (Vol. 59). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.10.019>
- Gill, S. R., Pop, M., DeBoy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., ... Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, *312*(5778), 1355–1359. <https://doi.org/10.1126/science.1124234>
- Gilliam, M., Hayden, C., & Road, E. A. (1997). Identification and roles of non-pathogenic microorganisms associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, *155*(1997).
- Gilliam, M., Morton, H. L., Prest, D. B., Martin, R. D., & Wickerham, L. J. (1977). The mycoflora of adult worker honeybees, *Apis mellifera*: Effects of 2,4,5-T and caging of bee colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*, *30*(1), 50–54. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(77\)90036-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(77)90036-2)
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, *347*(6229). <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Hamdi, C., Balloi, A., Essanaa, J., Crotti, E., Gonella, E., Raddadi, N., ... Cherif, A. (2011). Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. *Journal of Applied*

- Entomology*, 135(7), 524–533. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2010.01609.x>
- Harriet, J., Campiñá, J. P., Grajales, M., Lhiritier, C., Gómez-Pajuelo, A., Mendoza-Spina, Y., & Carrasco-Letelier, L. (2017). Agricultural pesticides and veterinary substances in Uruguayan beeswax. *Chemosphere*, 177, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.131>
- Higes, M., García-Palencia, P., Martín-Hernández, R., & Meana, A. (2007). Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.11.001>
- Higes, M., Martín, R., & Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(2), 93–95. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.02.005>
- Human, H., Brodschneider, R., Diemann, V., Dively, G., Ellis, J. D., Forsgren, E., ... Zheng, H.-Q. (2013). Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1–53. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.10>
- Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I. H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., ... Mendoza, Y. (2009). Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(2), 150–153. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.03.006>
- Jeyaprakash, A., Hoy, M. A., & Allsopp, M. H. (2003). Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84(2), 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.08.007>
- Kačániová, M., Chlebo, R., Kopernický, M., & Trakovická, A. (2004). Microflora of the honeybee gastrointestinal tract. *Folia Microbiologica*, 49(2), 169–171. <https://doi.org/10.1007/BF02931394>
- Kaltenpoth, M., & Engl, T. (2014). Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. *Functional Ecology*, 28(2), 315–327. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12089>
- Keeling, P. J., & Fast, N. M. (2002). Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 93–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160854>
- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Kralj, J., Brockmann, A., Fuchs, S., & Tautz, J. (2007). The parasitic mite *Varroa*

- destructor affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 193(3), 363–370. <https://doi.org/10.1007/s00359-006-0192-8>
- Kuenen, L. P. S., & Calderone, N. W. (1997). Transfers of Varroa mites from newly emerged bees: Preferences for age- and function-specific adult bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior*, 10(2), 213–228. <https://doi.org/10.1007/BF02765554>
- Langstroth, L. L. (1857). A Practical Treatise on the Hive and Honey-bee. *Animals*, 572. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=hLBIAAAAMAAJ>
- Le Conte, Y., Arnold, G., Trouiller, J., Masson, C., Chappe, B., & Ourisson, G. (1989). Attraction of the parasitic mite Varroa to the drone larvae of honey bees by simple aliphatic esters. *Science*, 245(4918), 638–639. <https://doi.org/10.1126/science.245.4918.638>
- Le Conte, Y., Sreng, L., & Trouiller, J. (1994). The recognition of larvae by worker honeybees. *Naturwissenschaften*, 81(10), 462–465. <https://doi.org/10.1007/s001140050110>
- Lee, K. V., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, M. E., Tarpy, D. R., Caron, D. M., ... vanEngelsdorp, D. (2015). A national survey of managed honey bee 2013-2014 annual colony losses in the USA. *Apidologie*, 46(3), 292–305. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0356-z>
- Li, H., Li, W. X., & Ding, S. W. (2002). Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science*, 296(5571), 1319–1321. <https://doi.org/10.1126/science.1070948>
- Maggi, M. D., Ruffinengo, S. R., Mendoza, Y., Ojeda, P., Ramallo, G., Floris, I., & Eguaras, M. J. (2011). Susceptibility of Varroa destructor (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: Varroa mites' potential to develop acaricide resistance. *Parasitology Research*, 108(4), 815–821. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2122-5>
- Martin, S. J. (1998). A population model for the ectoparasitic mite Varroa jacobsoni in honey bee ( *Apis mellifera* ) colonies . *Ecological Modelling* 109, 109(August), 267–281. [https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(98\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(98)00059-3)
- Martin, S. J. (2001). The role of Varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: A modelling approach. *Journal of Applied Ecology*, 38(Allen 1960), 1082–1093.
- Martin, S. J., Highfield, A. C., Brettell, L., Villalobos, E. M., Budge, G. E., Powell, M., ... Schroeder, D. C. (2012). Global honey bee viral landscape altered by a parasitic

- mite. *Science*, 336(6086), 1304–1306. <https://doi.org/10.1126/science.1220941>
- Mattoso, T. C., Moreira, D. D. O., & Samuels, R. I. (2011). Symbiotic bacteria on the cuticle of the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus* protect workers from attack by entomopathogenic fungi. *Biology Letters*, 8(3), 461–464. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0963>
- Meana, A., Martín-Hernández, R., & Higes, M. (2010). The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 49(2), 212–214. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.2.12>
- MGAP. (2018). Sector Apícola : Estadísticas de Comercio Exterior, 1–8.
- Mitsuoka. (1992). Homofermentative *Lactobacillus* species predominately isolated from canine feces.
- Mohr, K. I., & Tebbe, C. C. (2006). Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology*, 8(2), 258–272. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00893.x>
- Moran, N. A., & Telang, A. (1998). Bacteriocyte-associated symbionts of insects - A variety of insect groups harbor ancient prokaryotic endosymbionts. *Bioscience*, 48(4), 295–304. <https://doi.org/10.2307/1313356>
- Neumann, P., & Carreck, N. L. (2010). Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 1–6. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.01>
- Oldroyd, B. P. (2007). What's killing American honey bees? *PLoS Biology*, 5(6), 1195–1199. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050168>
- Paxton, R. J., Klee, J., Korpela, S., & Fries, I. (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, 38(6), 558–565. <https://doi.org/10.1051/apido>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e–45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Potts, S. G., Roberts, S. P. M., Dean, R., Marris, G., Brown, M. A., Jones, R., ... Settele, J. (2010). Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 15–22. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.02>
- Rath, W. (1999). Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30(2–3), 97–110. <https://doi.org/10.1051/apido:19990202>
- Reid, G., & Reid, G. (1999). The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus* MINIREVIEW The Scientific Basis for Probiotic Strains of *Lactobacillus*, 65(9), 3763–3766.
- Ribièrè, M., Ball, B. V., Aubert, M., Eds, Aubert, M., Ball, B. V., ... Bernardinelli, I.

- (2008). *Natural History and Geographical Distribution of Honey Bee Viruses. Virology and the Honey Bee*. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Natural+history+and+geographical+distribution+of+honeybee+viruses#0%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Natural+history+and+geographical+distribution+of+honey+bee+v>
- Ribière, M., Olivier, V., & Blanchard, P. (2010). Chronic bee paralysis: A disease and a virus like no other? *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S120–S131. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.013>
- Ronny Larsson, J. I. (1988). Identification of Microsporidian Genera (Protozoa, Microspora) - a Guide with Comments on the Taxonomy. *Archiv Fur Protistenkunde*, 136(1), 1–37. [https://doi.org/10.1016/S0003-9365\(88\)80032-0](https://doi.org/10.1016/S0003-9365(88)80032-0)
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of Varroa destructor. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S96–S119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>
- Salminen, S., Von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., De Vos, W. M., ... Mattila-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1–2), 93–106. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00128-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00128-7)
- Santos, E. (2014). Jornada de Apicultura, (April).
- Sartor, R. B. (2008). Therapeutic correction of bacterial dysbiosis discovered by molecular techniques. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16413–16414. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809363105>
- Shen, M., Yang, X., Cox-Foster, D., & Cui, L. (2005). The role of varroa mites in infections of Kashmir bee virus (KBV) and deformed wing virus (DWV) in honey bees. *Virology*, 342(1), 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.07.012>
- Steinhauer, N., Kulhanek, K., Antúnez, K., Human, H., Chantawannakul, P., Chauzat, M. P., & vanEngelsdorp, D. (2018). Drivers of colony losses. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.004>
- Trouiller, J., Arnold, G., Le Conte, Y., Masson, C., & Chappe, B. (1991). Temporal pheromonal and kairomonal secretion in the brood of honeybees. *Naturwissenschaften*, 78(8), 368–370. <https://doi.org/10.1007/BF01131612>
- van Dooremalen, C., Gerritsen, L., Cornelissen, B., van der Steen, J. J. M., van Langevelde, F., & Blacquière, T. (2012). Winter survival of individual honey bees and honey bee colonies depends on level of varroa destructor infestation. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036285>
- Van Reenen, C. A., & Dicks, L. M. T. (2011). Horizontal gene transfer amongst

- probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: What are the possibilities? A review. *Archives of Microbiology*, 193(3), 157–168.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-010-0668-3>
- Vásquez, A., Forsgren, E., Fries, I., Paxton, R. J., Flaberg, E., Szekely, L., & Olofsson, T. C. (2012). Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS ONE*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033188>
- Villa, D., Bustamante, D. M., Dunkley, J. P., & Anderson, V. (2008). Changes in Honey Bee ( Hymenoptera : Apidae ) Colony Swarming and Survival Pre- and Postarrival of *Varroa destructor* ( Mesostigmata : Varroidae ) in Louisiana. *Ann. Entomol. Soc. Am*, 101(5), 867–871. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2008\)101\[867:CIHBHA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2008)101[867:CIHBHA]2.0.CO;2)
- Wang, J. Y., Chambon, C., Lu, C. De, Huang, K. W., Vivarès, C. P., & Texier, C. (2007). A proteomic-based approach for the characterization of some major structural proteins involved in host-parasite relationships from the silkworm parasite *Nosema bombycis* (Microsporidia). *Proteomics*, 7(9), 1461–1472.  
<https://doi.org/10.1002/pmic.200600825>
- Yang, X., & Cox-Foster, D. L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), 7470–7475. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501860102>
- Yoshiyama, M., & Kimura, K. (2009). Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(2), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.005>
- Yue, C., & Genersch, E. (2005). RT-PCR analysis of Deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*, 86(12), 3419–3424. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81401-0>