

# Desarrollo de un probiótico para mejorar la salud de las abejas melíferas



Lic. Daniela Arredondo Papiol

Tesis de Maestría, PEDECIBA

2015

## **Desarrollo de un probiótico para mejorar la salud de las abejas melíferas**

Lic. Daniela Arredondo Papiol

Tesis de Maestría, PEDECIBA

Área Biología,

Sub- Área Microbiología

2015

Tutor: Dr. Pablo Zunino.

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Co-Tutor: Dra. Karina Antúnez

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Tribunal: Dra. Inés Ponce de León (Presidente)

Dra. Carmen Rossini (Vocal)

Dra. Mariela Bollati (Vocal)

Este trabajo fue financiado por PEDECIBA, proyecto ANII-Fondo María Viñas 2011\_6406, ANII-Beca Posgrado Nacional 2012\_8721 y Cooperación bilateral con Argentina MEC - DICYT, Convocatoria 2012.

# 1.- Indice

---

<b>1.- Indice .....</b>	<b>2</b>
<b>2.- Agradecimientos.....</b>	<b>5</b>
<b>3.- Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>4.- Introducción .....</b>	<b>8</b>
<b>4.1.- Breve reseña de las abejas y la apicultura.....</b>	<b>8</b>
<b>4.2.- Generalidades e importancia de las abejas melíferas en Uruguay.....</b>	<b>11</b>
<b>4.3.- Patógenos que afectan a las abejas melíferas en Uruguay .....</b>	<b>14</b>
4.3.1.- <i>Paenibacillus larvae</i> .....	14
4.3.2.- <i>Nosema ceranae</i> .....	17
4.3.3.- <i>Varroa destructor</i> y virus ARN .....	19
<b>4.4.- Inmunidad de las abejas.....</b>	<b>21</b>
<b>4.5.- Comunidad microbiana intestinal de la abeja melífera y su rol en la salud de la colmena .....</b>	<b>24</b>
<b>4.6.- Probióticos y su uso en abejas melíferas.....</b>	<b>27</b>
<b>5.- Hipótesis.....</b>	<b>30</b>
<b>6.- Objetivo general .....</b>	<b>31</b>
<b>7.- Objetivos específicos .....</b>	<b>31</b>
<b>8.- Materiales y métodos.....</b>	<b>32</b>
<b>8.1.- Obtención de aislamientos bacterianos y condiciones de cultivo .....</b>	<b>32</b>
<b>8.2.- Caracterización <i>in vitro</i> del potencial probiótico de los aislamientos .....</b>	<b>33</b>
8.2.1.- Ensayos de inhibición de <i>P. larvae</i> .....	33
8.2.2.- Tasa de crecimiento bacteriano .....	34
8.2.3.- Resistencia osmótica al jarabe. ....	35
8.2.4.- Tolerancia a distintas condiciones de acidez. ....	35
<b>8.3.- Caracterización molecular de los aislamientos.....</b>	<b>36</b>
8.3.1.- Extracción de ADN .....	36
8.3.2.- Reacciones de PCR, programas y visualización. ....	36

## INDICE

8.3.3.- Purificación de ADN y secuenciación .....	38
<b>8.4.- Pre-Selección de los aislamientos bacterianos .....</b>	<b>39</b>
<b>8.5.- Ensayos de inhibición entre los aislamientos. ....</b>	<b>39</b>
<b>8.6.- Perfil de ácidos grasos volátiles secretados. ....</b>	<b>40</b>
<b>8.7.- Evaluación del efecto en la supervivencia de los potenciales probióticos en larvas y su capacidad de prevenir la infección por <i>P. larvae</i> .....</b>	<b>41</b>
8.7.1.- Obtención y cuantificación de esporas de <i>P. larvae</i> .....	41
8.7.2.- Administración oral de los potenciales probióticos en larvas e infección con <i>P. larvae</i> ...43	
<b>8.8.- Efecto de los potenciales probióticos sobre la supervivencia de abejas adultas.....</b>	<b>44</b>
<b>8.9.- Evaluación de la capacidad de los potenciales probióticos de modificar el sistema inmune de abejas adultas .....</b>	<b>45</b>
8.9.1.- Obtención de de ARN y ADN complementario (ADNc).....	46
8.9.2.- PCR en tiempo real.....	46
8.9.3.- Cuantificación de la expresión de genes involucrados en la inmunidad .....	48
<b>8.10.- Evaluación de la capacidad de los aislamientos de prevenir la infección por <i>N. ceranae</i> en abejas adultas. ....</b>	<b>49</b>
8.10.1.- Obtención y cuantificación de esporas de <i>N. ceranae</i> .....	49
8.10.2.- Administración oral del probiótico e infección con <i>N. ceranae</i> en abejas adultas .....	50
<b>8.11.- Análisis estadístico .....</b>	<b>51</b>
<b>9.- Resultados .....</b>	<b>53</b>
<b>9.1.- Obtención de aislamientos bacterianos y análisis de su potencial probiótico .....</b>	<b>53</b>
<b>9.2.- Pre-Selección de los aislamientos bacterianos .....</b>	<b>58</b>
<b>9.3.- Caracterización molecular de los aislamientos obtenidos .....</b>	<b>59</b>
9.3.1.- Identificación bacteriana .....	59
9.3.2.- Análisis de la diversidad genética de <i>L. kunkeei</i> mediante <i>rep</i> -PCR.....	61
<b>9.4.- Ensayos de inhibición entre los aislamientos. ....</b>	<b>65</b>
<b>9.5.- Perfil de ácidos grasos volátiles secretados. ....</b>	<b>65</b>

## INDICE

9.6.- Supervivencia de las larvas alimentadas con los potenciales probióticos y su capacidad de prevenir la infección por <i>P. larvae</i> .....	66
9.7.- Supervivencia de abejas adultas alimentadas con los potenciales probióticos. ....	70
9.8.- Capacidad de los aislamientos de prevenir la infección por <i>N. ceranae</i> en abejas adultas.....	71
9.9.- Capacidad de los potenciales probióticos de modificar el sistema inmune de abejas adultas.....	73
10.- Discusión.....	81
11.- Conclusiones.....	91
12.- Perspectivas .....	92
13.- Bibliografía .....	93
15.- Anexo I.....	113

## 2.- Agradecimientos

---

En primer lugar quiero agradecer a Pablo Zunino y Karina Antúnez por mantener las puertas del laboratorio abiertas y permitirme realizar este trabajo bajo su dirección.

En particular quiero agradecerle a Karina por guiarme durante estos años, repasar conmigo cada protocolo y discutir los resultados hasta el cansancio.

A las abejas: Florencia, Belen y Loreley por colaborar en el trabajo diario.

A la ex abeja Matilde por cederme su escritorio y recordarme que así como Mirtha: “trae suerte”.

A toda la colonia, por prestarme de todo cuando lo necesite, por soportar mi canto desafinado, los lindos momentos mientras trabajamos y por brindar por cada cosa buena que nos pasa, en particular a Vito y Pao por los mates, las bancadas de cabeza y los papers que el timbó no me dejaba bajar pero Pao igualmente los conseguía.

A la gente del laboratorio de Artrópodos de la Universidad de Mar del Plata por recibirme allá, especialmente a Melisa y Martin.

A Yamandú Mendoza y Enrique Nogueiras por las muestras de abejas que fueron la piedra fundamental de este trabajo.

A Gustavo Ramallo por los núcleos que me ha enviado y siempre seleccionar las abejas menos agresivas haciendo mi trabajo significativamente menos doloroso.

A Marce por ser la mejor compañera de caminatas y noches en el instituto, ¡gracias por las charlas, la “pasada de muestras” y sobre todo por ser mi amiga incondicional!.

A toda mi familia (postiza incluida), por apoyarme en todo momento aunque todavía no entienden por qué me gusta tanto lo que hago. Les agradezco por reír y festejar conmigo cada vez que me salió un proyecto, un curso o salvé un examen.

A mi sobrino Emilio por creer que soy Sam Chispas pero queriendo salvar a las abejas.

A Pablo por ser mi compañero y mi cable a tierra, por sacarle el fondo o el brillo a las imágenes aún cuando se lo pedía a las 3 am, por escucharme repetir una y otra vez las mismas presentaciones, por preguntarme todos los días “¿Cómo te fue hoy en el lab?” aunque supiera que le iba a contestar con una chorrera de cosas inentendibles.

A mis amigos de siempre, por estar y alegrarme la vida. Especialmente a Caro, Lau, Mauri, Cacho, Jen, Gonza, Pablo, Ana, Lucila, Luley y Pompa, gracias chiquilines por estar en las buenas y en las malas todos estos años.

**Por último quiero agradecerle especialmente a mamá, Seba y Adri, porque a ellos les debo todo lo que soy, lo que hice y lo que haré, ¡gracias por el apoyo incondicional!.**

## 3.- Resumen

---

Las abejas melíferas (*Apis mellifera*) desempeñan un rol esencial para el hombre y el medio ambiente ya que además de su papel en la producción de miel, son los principales agentes polinizadores de cultivos comerciales y de flora silvestre. Debido a su estilo de vida colonial, las abejas pueden infectarse con una gran variedad de patógenos, entre los cuales se encuentran la bacteria *Paenibacillus larvae* y el microsporidio *Nosema ceranae* agentes causales de la Loque Americana y nosemosis, respectivamente. El uso de antibióticos como estrategia para el tratamiento o prevención de estas u otras enfermedades de las abejas puede provocar el desbalance en la homeostasis entérica, la aparición de organismos resistentes y la generación de residuos que permanecen en la miel afectando su calidad para el consumo. La búsqueda de una estrategia saludable e integrada para mejorar la salud de las abejas es clave para el mantenimiento y el desarrollo de la apicultura.

La comunidad microbiana intestinal nativa es esencial para mantener una adecuada nutrición, salud e inmunidad. Diversos estudios realizados en diferentes especies animales han revelado que las bacterias intestinales desempeñan funciones beneficiosas específicas y la administración de probióticos como aditivos en alimentos es una estrategia ampliamente utilizada con el fin de mejorar la salud tanto en humanos como en animales.

La hipótesis de este trabajo postula que la administración de microorganismos probióticos a abejas melíferas puede mejorar la supervivencia de las larvas y las abejas adultas en caso de infección con patógenos como *P. larvae* o *N. ceranae*.

Con el objetivo de desarrollar una mezcla de microorganismos probióticos nativos capaz de mejorar la salud de las abejas melíferas se sembró el contenido intestinal de abejas melíferas provenientes de apiarios históricamente sanos en

## RESUMEN

agar MRS y Rogosa. De los 151 aislamientos potencialmente probióticos obtenidos, se seleccionaron 65 al azar y se observó que 57 de ellos consiguieron inhibir el crecimiento de *P. larvae in vitro*. Por otro lado, algunos de estos aislamientos fueron capaces de sobrevivir a distintas condiciones de acidez y concentraciones de azúcar.

Luego de identificar los aislamientos mediante la secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S, se encontró que la mayoría correspondían a la especie *Lactobacillus kunkeei*. Sin embargo mediante *rep*-PCR se observó una gran diversidad intraespecífica entre éstos aislamientos. Posteriormente se pre-seleccionaron los 10 aislamientos que presentaron las características biotecnológicas más prometedoras para ser utilizados como probióticos y a continuación se realizó una mezcla con cuatro aislamientos identificados como *L. kunkeei*.

Se observó que la administración oral de esta mezcla en condiciones de laboratorio no afectó la supervivencia de larvas y disminuyó la mortalidad asociada a *P. larvae*. Además la administración de la mezcla en abejas adultas no afectó la supervivencia ni modificó la expresión de diferentes genes vinculados al sistema inmune, mientras que por otro lado consiguió disminuir el nivel de infección de *N. ceranae*.

Los resultados obtenidos en esta tesis son auspiciosos, y sugieren que esta mezcla de 4 aislamientos de *L. kunkeei* podría ser empleada en las colmenas para mejorar la salud de las abejas melíferas.

## 4.- Introducción

---

### 4.1.- Breve reseña de las abejas y la apicultura

Los primeros himenópteros, orden al cual pertenecen las abejas melíferas, hicieron su aparición hace unos 140 millones de años hacia fines de la era mesozoica. Los primeros indicios de la existencia de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) en la tierra se remontan a 100 millones de años surgiendo simultáneamente con las primeras Angiospermas (plantas con flor) en el período Cretácico (Crane, 1999).

Dentro de la familia *Apidae*, la sub familia *Apinae* incluye los géneros de abejas eusociales: *Apis* (abejas melíferas); *Bombus* (abejorros) y *Meliponinae* (abejas tropicales sin aguijón) y otros géneros de abejas que no son sociales.

Los nidos de las abejas sociales están conformados por castas. Existe solamente una hembra fértil (la reina) que en general es la única capaz de poner huevos en la colonia. La casta de hembras funcionalmente estériles (las obreras) es la encargada de la producción de cera para las celdillas, la colecta y almacenamiento de polen, néctar y propóleos, la alimentación de las larvas y de la reina, así como la limpieza y defensa de la colonia. La tercera casta esta constituida por los machos haploides (los zánganos) que son los encargados de fecundar a las hembras fértiles (Crane, 1999).

Los primeros registros de la domesticación de las abejas melíferas se remontan a los pueblos persas, sirios y egipcios, a su vez tanto griegos como

## INTRODUCCION

romanos también practicaron y veneraron 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 se comenzaron a sacar las colmenas de su hábitat natural y empezaron a ser transportadas por el hombre. 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 movilista estándar desarrollada por Lorenzo Langstroth, quien describe el "espacio abeja" (más de 6mm y menos de 9mm), concepto que revolucionaría los paradigmas apícolas de tal forma que permanece vigente (Langstroth, 1857). Posteriormente aparece la primera prensa para estampar cera en los cuadros móviles, los extractores mecánicos y hacia fines del siglo XIX las colmenas ya eran iguales a las que se utilizan actualmente (Crane, 1999).

La importancia que poseen las abejas melíferas (*Apis mellifera*) a veces no es reconocida, ya que además de la producción y comercialización de los diversos productos derivados de las colmenas (miel, polen, jalea real, propóleos,

## INTRODUCCION

venta de reinas, núcleos y paquetes), la abeja melífera es el principal insecto polinizador que existe en la naturaleza; su abundancia puede variar entre el 60 y el 95 % de todos los polinizadores en diferentes ambientes naturales (Batra, 1995; Dedej y Delaplane, 2003; Hamdi *et al.*, 2011; Mendoza *et al.*, 2010; Morse y Calderone, 2000; Santos *et al.*, 2009; Simó, 2002).

Las abejas visitan grandes cantidades de flores diariamente para satisfacer los requerimientos nutricionales de la colmena. Su dieta consiste básicamente en polen y néctar, ya que estos les aportan todas las proteínas, lípidos, minerales y vitaminas que necesitan (Jean-Prost, 2007; Keller *et al.*, 2005; Michener, 1974). Es junto con esta actividad que las abejas llevan a cabo la polinización tanto de cultivos agrícolas como de especies silvestres, manteniendo de esta forma los diversos ecosistemas (Bradbear, 2004; Jean-Prost, 2007; López y Sotomayor, 1992).

Se ha reportado que el 35 % de los cultivos comerciales (frutas, verduras, plantas oleaginosas, leguminosas y forrajes) dependen en algún grado de la polinización entomófila (Abrol, 2011; Klein *et al.*, 2007). Cincuenta y dos de los 115 cultivos más importantes para la dieta humana son estrictamente dependientes de la polinización por abejas o son favorecidos por la misma en términos de tamaño de fruto, cantidad y calidad (Klein *et al.*, 2007). A pesar de que la abeja no es el único insecto polinizador, sigue siendo el más importante para la mayoría de los cultivos en el mundo (Klein *et al.*, 2007; vanEngelsdorp y Meixner, 2010). El impacto de *A. mellifera* en la economía mundial vinculado a

## INTRODUCCION

su acción polinizadora ha sido estimado en 153.000 millones de euros (Gallai *et al.*, 2009).

Por este motivos, además del inmenso valor económico de la actividad apícola, la contribución de las abejas en el mantenimiento de la biodiversidad en diferentes ecosistemas y en la producción de alimentos es inestimable (Hamdi *et al.*, 2011).

En los últimos años ha ocurrido una severa disminución en las poblaciones de abejas melíferas, principalmente en países del hemisferio norte. Las causas de estas pérdidas no han sido identificadas y se adjudican a una combinación de diferentes agentes o factores como el estrés ambiental (inundaciones, sequías, falta de fuentes de néctar y polen, y al uso de insecticidas en la agricultura) así como el estrés biótico que incluye infecciones por parásitos (*Varroa destructor*, *Acarapis woodi*, *Tropilaelaps* spp.), microsporidios (*Nosema* spp.), hongos patógenos (*Ascosphaera apis*), bacterias (*Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*) y más de 18 virus (Evans y Schwarz, 2011; Genersch y Aubert, 2010; Hamdi *et al.*, 2011).

### **4.2.- Generalidades e importancia de las abejas melíferas en Uruguay**

La apicultura en Uruguay comenzó a desarrollarse luego que Bernardino Rivadavia ingresara la primera colmena de *Apis mellifera* procedente de Francia al departamento de Colonia en 1834. Posteriormente esta actividad se extendió por todo el territorio nacional (Cordara, 2010)

## INTRODUCCION

En las últimas décadas la actividad apícola ha venido adquiriendo cada vez mayor relevancia dentro del sector agro-exportador de nuestro país, siendo la miel uno de los principales productos de exportación. Se estima que se producen alrededor de 12000 toneladas anuales, y el 95% de la producción es exportada a la Unión Europea y Estados Unidos (Uruguay-XXI, 2014).

El servicio de polinización es una actividad poco desarrollada, aunque cada vez más los productores agropecuarios están teniendo en cuenta este servicio. Santos *et al.* (2009) realizaron en 2008 un estudio preliminar para determinar cuál es el valor económico de la polinización por abejas en cultivos de interés comercial en Uruguay. Se estimó que la producción de manzana, girasol, pera, durazno, tomate, zapallo kabutiá, zapallitos, ciruelo, membrillo, otros zapallos y frutilla aumentó aproximadamente 70 % debido al aporte de las abejas.

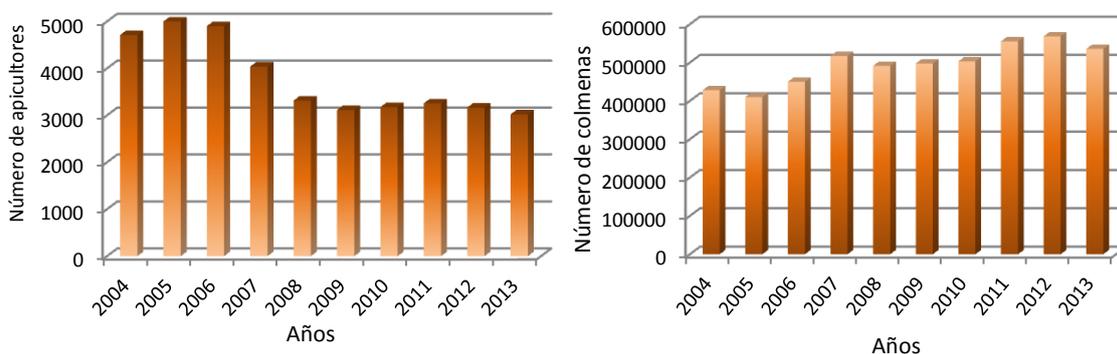


Figura 4.1.- Evolución de la Apicultura en Uruguay desde 2004 a 2013. A la izquierda el número de apicultores en función del año, a la derecha el número de colmenas en función del año (Datos tomados de MGAP, DIGEGRA 2004 a 2014).

## INTRODUCCION

El perfil de los apicultores en el Uruguay es variado, pero se puede afirmar que la apicultura constituye una actividad agropecuaria que involucra mano de obra familiar, en predios relativamente pequeños y en su mayoría cedidos por terceros. Se ha observado un aumento sostenido de propietarios menores de 29 años así como de mujeres y por lo general los apicultores tienen otros rubros como actividad económica principal lo que se corresponde con el hecho de que menos del 20 % posee más de 200 colmenas y menos del 10% tiene más de 500 colmenas (Uruguay-XXI, 2014). Sin embargo, los desafíos que ha debido enfrentar el sector en los últimos años, ha hecho que para mantener la productividad por colmena se requiera cada vez mayor inversión y mayor trabajo (Espino, Sociedad Apícola del Uruguay, comunicación personal). Esto ha llevado a una disminución en el número total de apicultores aunque se ha logrado mantener estable el número de colmenas (Figura 4.1; MGAP/DIGEGRA, 2014).

En nuestro país, si bien no se han reportado episodios de despoblación masiva de colmenas como los ocurridos en países del hemisferio norte, se estima que se pierden cerca del 20% de las colmenas cada temporada. Para sobreponerse a estas pérdidas, cada año los apicultores dividen sus colmenas y así la producción apícola consigue permanecer constante. Sin embargo, con esta práctica se genera una disminución en la productividad por colmena (Errea y Licandro, 2009).

## INTRODUCCION

Entre las principales causas de pérdidas de colmenas en nuestro país se encuentra la presencia de diferentes patógenos, así como cambios en el uso de la tierra debido a la agricultura intensiva. Como ejemplo, se ha descrito que la producción de cultivos anuales en Uruguay crece continuamente desde el año 2002, lo que resulta de dos procesos: la intensificación en el área agrícola tradicional (litoral oeste), y expansión hacia nuevas zonas del país (Ernst *et al.*, 2013), generando una disminución de la diversidad de polen y néctar disponible para las abejas. Estas carencias nutricionales pueden influir severamente en la disminución de polinizadores (Naug, 2009).

### 4.3.- Patógenos que afectan a las abejas melíferas en Uruguay

Los patógenos de mayor importancia apícola se encuentran presentes y ampliamente distribuidos en nuestro país, como la bacteria *Paenibacillus larvae*, el ácaro *Varroa destructor*, el microsporidio *Nosema ceranae* y diferentes virus ARN (Anido, 2013; Antúnez *et al.*, 2012a; Antúnez *et al.*, 2005; Antúnez *et al.*, 2006; Antúnez *et al.*, 2012b; Invernizzi *et al.*, 2009; Invernizzi *et al.*, 2011).

#### 4.3.1.- *Paenibacillus larvae*

*Paenibacillus larvae* es el agente causal de la Loque Americana, la enfermedad más severa y destructiva que afecta a la cría de las abejas. *P. larvae* es un bacilo Gram positivo, catalasa negativo, anaerobio facultativo, con bajo porcentaje de GC (Guanina y Citosina) y formador de endosporas (Genersch *et al.*, 2006).

## INTRODUCCION

El manejo que realiza el apicultor es muy importante ya que puede propagar las esporas al alimentar las abejas con miel y polen, al intercambiar cuadros de cría de una colmena a otra, al comprar, vender o trasladar paquetes, núcleos, colmenas y reinas sin control sanitario, así como al utilizar palancas, guantes y otros equipos contaminados (Hansen y Brodsgaard, 1999; Hornitzky y Karlovskis, 1989). Se considera que la transmisión de esporas por la utilización de cera estampada y la deriva de abejas tiene menor importancia en la diseminación de este patógeno (Goodwin *et al.*, 1994; Lindström *et al.*, 2008).

Las larvas de las abejas obreras, reinas y zánganos se infectan al ingerir alimento contaminado con esporas, cuando son alimentadas por las abejas nodrizas (Hornitzky, 1998). Una vez ingeridas, las esporas llegan al lumen del intestino larval donde germinan dando lugar a células vegetativas. Éstas proliferan y se mueven hacia el epitelio, destruyendo las interacciones célula-célula e invadiendo el espacio intercelular, llegando a la hemolinfa del hospedero de manera muy veloz (Yue *et al.*, 2008). Posteriormente la larva muere, lo que es acompañado por la esporulación de las células vegetativas. Las esporas se diseminan dentro de la colmena cuando las abejas encargadas de la limpieza contaminan su aparato bucal al remover las larvas muertas y posteriormente las transmiten a las larvas sanas cuando las alimentan.

Se ha demostrado que la edad de las larvas está relacionada con la susceptibilidad de contraer Loque Americana. Las larvas con menos de 24 hs son las más propensas a infectarse y a medida que la larva se desarrolla la

## INTRODUCCION

susceptibilidad disminuye (Brodsgaard et al., 1998; Crailsheim and Riessberger-Gallé, 2001; Wedenig et al., 2003; Woodrow, 1942; Woodrow and Holst, 1942).

En la década pasada la Loque Americana causó grandes pérdidas de colmenas en todo el país. La primera detección de esta bacteria en Uruguay fue en el año 1999 (Piccini y Zunino, 2001) y rápidamente se extendió mostrando una prevalencia de esporas de *P. larvae* en miel de 51% en 2003 (Antúnez *et al.*, 2004). La distribución que se observa en la Figura 4.2A, sugiere que la bacteria ingresó a Uruguay desde el litoral oeste y que desde allí se dispersó al resto del territorio, afectando a casi todo el país (Antúnez *et al.*, 2004). La aplicación de las medidas de control basadas en las mejoras del manejo recomendadas por el MGAP ha disminuído significativamente la prevalencia a 2% en 2011, restringiendo a este patógeno al litoral oeste del país (Figura 4.2B; Anido, 2013; Antúnez *et al.*, 2012a).

## INTRODUCCION

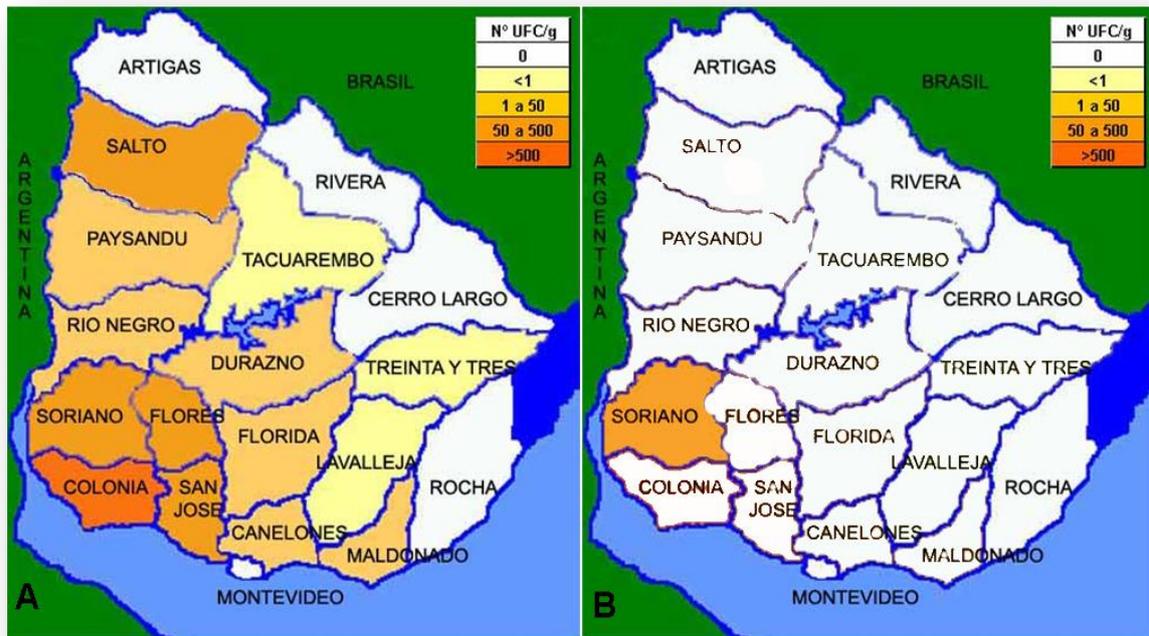


Figura 4.2.- Distribución y nivel de infección de la bacteria *P. larvae* (promedio departamental del nº esporas de *P. larvae* por gramo de miel) **A.** Se señala el nivel de infección por departamento en 2002. **B.** Se señala el nivel de infección por departamento en 2012. (Anido, 2013; Antúnez *et al.*, 2012a)

### 4.3.2.- *Nosema ceranae*

Las abejas también son blanco de microsporidios, un grupo altamente diverso de patógenos intracelulares obligados que en general se reproducen asexualmente y se transmiten a través de esporas (Haag *et al.*, 2013; Keeling y Fast, 2002). Los microsporidios que infectan a las abejas son *Nosema apis* y *Nosema ceranae* (Fries *et al.*, 1996; Higes *et al.*, 2006; Higes *et al.*, 2013; OIE, 2004b).

*N. ceranae* es un parásito intracelular que se desarrolla exclusivamente en la células epiteliales del ventrículo de las abejas adultas (Bailey y Ball, 1991; Fries, 1997, 2010; Higes *et al.*, 2010). Las esporas de *Nosema* spp. ingresan a las

## INTRODUCCION

abejas adultas a través de múltiples actividades (ingesta de miel contaminada o en la limpieza de la colmena al remover los excrementos de abejas infectadas). Estas esporas germinan en el lumen del ventrículo y a través del filamento polar penetra el esporoplasma al citoplasma de la célula epitelial del ventrículo. Allí comienzan a multiplicarse, liberándose nuevamente al lumen intestinal y reingrediendo a otras células del ventrículo afectando las funciones digestivas, lo que conduce a la desnutrición, envejecimiento fisiológico y reducción de la longevidad de las mismas (Keeling y Fast, 2002).

La parasitosis causada por ambas especies de *Nosema* spp. es denominada nosemosis. En nuestro país el agente etiológico es principalmente *N. ceranae*, que se encuentra presente al menos desde 1990 (Invernizzi *et al.*, 2009). Actualmente se encuentra ampliamente distribuido (Figura 4.3) y su prevalencia se estimó en 14,6 % a nivel nacional, con porcentajes mayores en los departamentos con plantaciones de *Eucalyptus grandis* (Anido, 2013; Mendoza *et al.*, 2013).

La nosemosis es un grave problema en las plantaciones de *E. grandis*. Cada año, los apicultores trasladan sus colmenas a dichas plantaciones en febrero, al inicio de la floración, con el fin de extender la temporada de producción de miel. Sin embargo, todas las colmenas que son trasladadas a dichas plantaciones adquieren esporas de *N. ceranae* y si no son retiradas a tiempo esas colmenas mueren (Invernizzi *et al.*, 2011; Mendoza, 2012). Hasta el momento el único tratamiento disponible para el control de la nosemosis es la

## INTRODUCCION

fumagilina, pero en Uruguay, su uso se encuentra restringido a los criaderos de reinas (MGAP, 2010).



Figura 4.3.- 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.

### 4.3.3.- *Varroa destructor* y *virus ARN*

*V. destructor* es un ácaro parásito que causa daños en la abeja, debilitándola, deprimiendo su sistema inmune y favoreciendo la infección por otros patógenos, y es letal si no es tratado adecuadamente (OIE, 2004a; Rosenkranz *et al.*, 2010). *V. destructor* está ampliamente distribuido en nuestro país, estando presente en el 76 % de las colmenas (Antúnez *et al.*, 2013), lo que lleva a la necesidad de aplicar productos acaricidas en forma sistemática para evitar la pérdida de colmenas. Los tratamientos disponibles para el tratamiento

## INTRODUCCION

del ácaro se basan principalmente en el uso de acaricidas sintéticos (Campa *et al.*, 2007b; Campa *et al.*, 2007a; Mendoza *et al.*, 2008; Rosenkranz *et al.*, 2010).

De acuerdo a lo expresado en el punto anterior, la presencia de *V. destructor* en las colmenas no sólo es un problema en sí mismo, sino que su virulencia aumenta por la asociación con diferentes virus ARN. Los virus de la parálisis aguda, virus de la parálisis crónica, virus de la celda real negra, virus de la cría ensacada y virus de las alas deformadas están presentes y ampliamente distribuidos en Uruguay (Anido, 2013; Antúnez *et al.*, 2013; Antúnez *et al.*, 2005; Antúnez *et al.*, 2006). Sin embargo, hasta el momento no existen opciones que permitan su control.

El uso de antibióticos como estrategias para el tratamiento o prevención de estas u otras enfermedades de las abejas puede provocar el desbalance en la homeostasis entérica de las abejas, la aparición de organismos resistentes y la generación de residuos que permanecen en la miel afectando su calidad para el consumo.

Por estos motivos, la búsqueda de una estrategia saludable e integrada 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.

### 4.4.- Inmunidad de las abejas

Por su estilo de vida colonial, las abejas son blanco de diferentes parásitos y patógenos, ya que ofrecen una alta densidad de hospederos genéticamente similares en un espacio limitado (Schmid-Hempel, 1998). Por este motivo, las abejas han desarrollado mecanismos de defensa social e individual (Figura 4.4).

Entre los mecanismos de defensa social podemos encontrar el aseo, el comportamiento higiénico, la fiebre social en respuesta a ciertas enfermedades y la remoción de abejas muertas de la colmena. Estas actividades pueden reducir el impacto de las bacterias patógenas, hongos y ácaros parásitos (Evans *et al.*, 2006; Starks *et al.*, 2000).

Los mecanismos de defensa individual implican la resistencia o la tolerancia a los patógenos inherentes de cada individuo. Las vías clásicas de resistir a los patógenos son las barreras mecánicas, los inhibidores fisiológicos y el sistema inmune (Evans *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2008; Wilson-Rich *et al.*, 2008).

Las barreras mecánicas incluyen la cutícula y la membrana peritrófica, que en muchos casos previenen la adhesión y hasta la entrada de los microorganismos al organismo. Los inhibidores fisiológicos incluyen por ejemplo los cambios en el pH y otras condiciones en el intestino que limitan o inhiben su crecimiento (Crailsheim y Riessberger-Gallé, 2001; Evans y Spivak, 2010). Por

## INTRODUCCION

último, las abejas poseen una respuesta inmune innata que se activa frente a la exposición a patógenos (Evans y López, 2004).

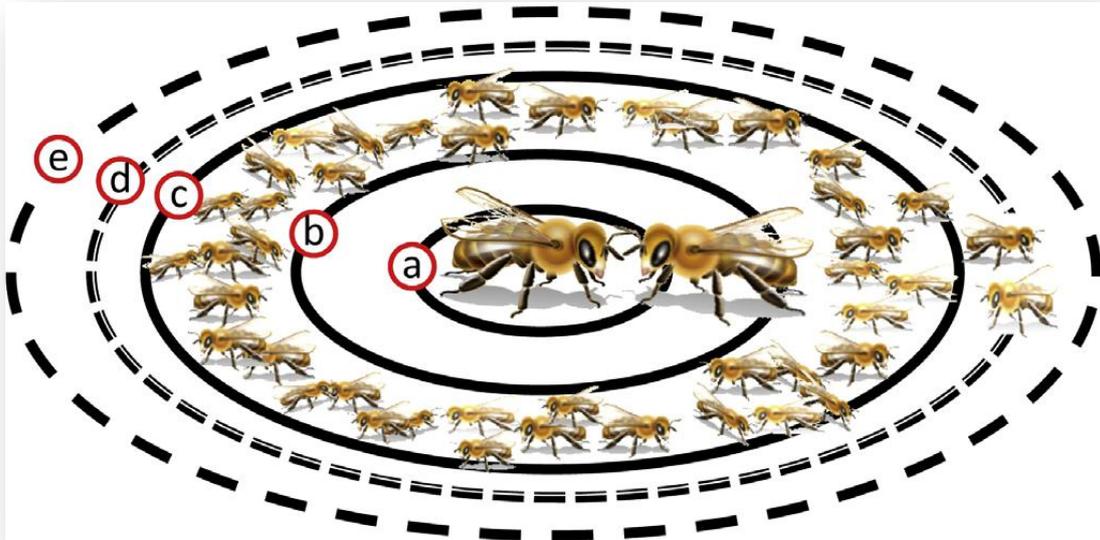


Figura 4.4.- Niveles de defensa en las colonias de abejas melíferas: (a) defensas individuales, (b) defensa entre pares, incluido el aseo (c) defensas de la colonia incluyendo la diferenciación del trabajo (d) minimizar la entrada de agentes infecciosos y (e) el uso de resinas para sellar la colonia (Evans y Spivak, 2010).

La activación del sistema inmune innato comienza con la adhesión a MAMP'S (Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos) por parte de las proteínas de reconocimiento. Luego se activan cuatro grandes cascadas (vinculadas tanto a la inmunidad humoral como celular) interconectadas que les ayudan a defenderse ante la exposición a parásitos; Toll, Imd, Jak/STAT y Jnk (Gillespie *et al.*, 1997; Theopold y Dushay, 2007). Estas vías consisten en proteínas que reconocen señales del parásito invasor, proteínas para modular y amplificar las señales de reconocimiento, y proteínas efectoras o metabolitos involucrados directamente en la inhibición del patógeno (Lemaitre y Hoffmann, 2007).

## INTRODUCCION

La inmunidad humoral funciona principalmente por la producción en los cuerpos grasos de péptidos antimicrobianos que son secretados a la hemolinfa (Glinski y Jarosz, 2001; Hoffmann, 2003). Hasta el momento en las abejas melíferas se han descrito cuatro, la abaecina, la himenoptecina, la defensina que presenta 2 isoformas y la apiadecina que presenta 12 isoformas (Casteels-Josson *et al.*, 1993; Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990; Qu *et al.*, 2008). Se ha descrito que los péptidos antimicrobianos eliminan a las bacterias mediante la permeabilización de la membrana plasmática, formando poros que alteran su estructura; mediante inhibición de la biosíntesis de macromoléculas del citoplasma o de la pared celular; o mediante la unión a los lipopolisacáridos y los ácidos lipoteicoicos de la pared celular del patógeno que lleva a una desestabilización de la misma y la posterior muerte del microorganismo (azzaq Belaaouaj *et al.*, 2000; Jenssen *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009).

La inmunidad celular está relacionada con la fagocitosis, nodulación y encapsulación y en este proceso se encuentran involucradas las enzimas: (profenol-) fenoloxidasas, que participa en la cicatrización de heridas y en la neutralización de agentes invasores y en la melanización, la glucosadeshidrogenasa, que está involucrada en la eliminación de patógenos junto con la profenoloxidasas y en la encapsulación a través de la generación de radicales libres, y la lisozima, que tiene actividad bactericida y bacteriostática al hidrolizar los enlaces  $\beta$  1-4 del peptidoglicano de los microorganismos (Daffre *et al.*; Gillespie *et al.*, 1997; Lavine y Strand, 2002; Lovallo y Cox-Foster, 1999; Osta

## INTRODUCCION

*et al.*, 2004; Yang y Cox-Foster, 2007). Por otro lado, la vitelogenina es sintetizada por los cuerpos grasos y liberada a la hemolinfa (Arrese y Soulages, 2010). Esta proteína está relacionada esencialmente con la oogenesis, aunque en las abejas melíferas también es expresada en las obreras que no participan en la reproducción. La vitelogenina influye en el comportamiento, la división de labores, el pecoreo, la longevidad y la inmunidad (Amdam, 2011; Amdam *et al.*, 2012; Amdam *et al.*, 2004; Corona *et al.*, 2007; Havukainen *et al.*, 2011; Nelson *et al.*, 2007). Por otro lado Seehuss *et al.* (2006) reportaron que la vitelogenina es capaz de eliminar los radicales libres y por lo tanto reducir el estrés oxidativo, prolongando la vida media de las obreras y de la reina.

### **4.5.- Comunidad microbiana intestinal de la abeja melífera y su rol en la salud de la colmena**

Los microorganismos que forman parte de la comunidad microbiana nativa intestinal 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 visto que los microorganismos nativos pueden manipular la reproducción del huésped, contribuir a la nutrición o a la defensa frente a patógenos (Douglas, 1998; Feldhaar y Gross, 2009; Gibson y Hunter, 2010; Moran y Telang, 1998).

## INTRODUCCION

Los primeros estudios sobre la microbiota intestinal de las abejas se basaron en el uso de medios de cultivo selectivos y posterior caracterización de los aislamientos mediante microscopia y pruebas bioquímicas (Gilliam, 1997). Posteriormente se emplearon diferentes técnicas de análisis molecular (t-RFLP, DGGE, clonado y secuenciado del gen que codifica para el ARNr 16S) para de esta forma estimar la abundancia y diversidad de los taxos presentes (Cox-Foster *et al.*, 2007; Martinson *et al.*, 2011).

Las abejas poseen un sistema digestivo sencillo, con una comunidad microbiana simple y estable en diferentes regiones geográficas, como Sudáfrica (Jeyaprakash *et al.*, 2003), Alemania (Mohr y Tebbe, 2006) y Suiza (Babendreier *et al.*, 2007). Estos estudios permitieron identificar especies de los 6 grupos filogenéticos mayoritarios:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ - Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacterias (Babendreier *et al.*, 2007; Jeyaprakash *et al.*, 2003; McFrederick *et al.*, 2012; Mohr y Tebbe, 2006; Yoshiyama y Kimura, 2009).

En el caso de *A. mellifera* los huevos, las prepupas, las pupas y las abejas adultas recién emergidas no poseen una microbiota asociada. Las larvas adquieren microorganismos que están asociados con los alimentos o el cuadro mismo (Gilliam, 1971; Gilliam y Prest, 1987) pero al final del período larval eliminan los microorganismos en las deyecciones y comienza la metamorfosis de las pupas. Luego de que emergen, en los primeros cuatro días se recoloniza su intestino ya que se alimentan de polen e intercambian polen y néctar con abejas mayores (Gilliam, 1971; Gilliam *et al.*, 1977). La microbiota intestinal de

## INTRODUCCION

las abejas varía con la edad, con la época del año y algunas veces con la localización geográfica, pero los grupos filogenéticos permanecen estables (Gilliam, 1997; Gilliam *et al.*, 1988; Mrazek *et al.*, 2008). Olofsson y Vasquez (2008) reportaron que la microbiota intestinal de la abeja varía dependiendo de las fuentes de néctar y de la presencia de otros generos bacterianos.

El grupo de mayor importancia que ha sido aislado de abejas melíferas son las bacterias del ácido láctico (BAL; Olofsson y Vasquez, 2008). Éstas, son microorganismos Gram positivos, de bajo contenido de Guanina y Citosina (GC), tolerantes a altas concentraciones de acidez, muy heterogéneos desde el punto de vista morfológico y fisiológico, y cuya característica principal es la producción de ácido láctico como principal producto del metabolismo fermentativo de los carbohidratos.

Las BAL, son habitantes normales del tracto gastrointestinal tanto de insectos como de vertebrados y están implicadas en la inmunomodulación así como en el mantenimiento de una comunidad microbiana intestinal saludable (Mitsuoka, 1992) y de la defensa del hospedero frente a diversos problemas y enfermedades (Sartor, 2004; 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 (Cox-Foster y vanEngelsdorp, 2009). Esta observación sugiere que el desbalance en la

## INTRODUCCION

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). Esta hipótesis fundamenta el uso de bacterias del ácido láctico, como una alternativa interesante para el tratamiento de las colmenas enfermas.

### 4.6.- Probióticos y su uso en abejas melíferas

La palabra probiótico proviene del griego: "pro" y "bios" que significa "a favor de la vida".

Se denomina probiótico a un monocultivo o un cultivo mixto vivo de microorganismos cuya administración ejerce algún efecto beneficioso sobre animales o humanos al ser consumido (Klaenhammer y Kullen, 1999). El uso de probióticos es una práctica ampliamente utilizada, miembros de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Bacillus* y *Propionibacterium* han sido utilizados tanto en humanos, como en animales (Cross, 2002; Ducatelle *et al.*, 2015; Reid, 1999).

Para que una cepa bacteriana se considere con el potencial de ser utilizada como probiótico se busca que cumpla con determinadas características. Para que la administración sea segura, él o los microorganismos 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

## INTRODUCCION

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). Estas características , entre otras son específicas de cada cepa por lo que no es suficiente determinar la filiación de un aislamiento para poder establecer predicciones acerca del potencial probiótico (Dunne *et al.*, 1999).

Se ha visto que microorganismos aislados de la colmena son capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de patógenos como *P. larvae* o *Ascosphaera apis*. En general, se trata de bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Providencia* y *Sphingomonas* (Alippi y Reynaldi, 2006; Cherif *et al.*, 2008; Evans y Armstrong, 2006; Forsgren *et al.*, 2010; Olofsson y Vasquez, 2008; Sabate *et al.*, 2009; Yoshiyama y Kimura, 2009; Yoshiyama *et al.*, 2013).

A pesar del gran número de ensayos *in vitro*, sólo se han realizado dos estudios *in vivo* empleando larvas de abejas melíferas. En estos trabajos se observó que la administración de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* al alimento larval reduce significativamente la infección por *P. larvae* (Evans y Lopez, 2004; Forsgren *et al.*, 2010). Este resultado sugiere que las bacterias probióticas pueden modular la homeostasis del intestino de las larvas, para protegerlas frente a patógenos. El mecanismo de acción podría ser por una

## INTRODUCCION

actividad antagonista directa mediante la producción de compuestos antimicrobianos, bacteriocinas, surfactinas o ácidos grasos volátiles como el ácido láctico (Audisio y Benítez-Ahrendts, 2011; Sabate *et al.*, 2009). Este último podría ser interesante para combatir a *V. destructor*, ya que el ácido láctico es uno de los tratamientos recomendados (OIE, 2004a). 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).

## 5.- Hipótesis

---

La hipótesis de este trabajo postula que la administración de microorganismos probióticos puede mejorar la supervivencia de larvas y abejas adultas en casos de infección con patógenos.

## 6.- Objetivo general

---

El objetivo general de este proyecto consiste en desarrollar una mezcla de microorganismos probióticos nativos capaz mejorar la supervivencia de larvas y abejas melíferas adultas en casos de infección con *P. larvae* o *N. ceranae*.

## 7.- Objetivos específicos

---

7.1.- Obtener aislamientos bacterianos potencialmente probióticos a partir de la comunidad microbiana nativa de abejas melíferas de apiarios libres de patógenos.

7.2.- Caracterizar *in vitro* el potencial probiótico de los aislamientos y seleccionar e identificar aquellos que posean características más favorables.

7.3.- Obtener una mezcla de microorganismos probióticos.

7.4.- Evaluar el efecto de la administración de los microorganismos probióticos en la supervivencia de larvas de abejas melíferas.

7.5.- Evaluar el efecto de la mezcla de microorganismos probióticos frente a la infección por *P. larvae* en larvas de abejas melíferas.

7.6.- Evaluar el efecto de la administración de los microorganismos probióticos en la supervivencia de abejas melíferas adultas.

7.7.- Evaluar el efecto de la mezcla de microorganismos probióticos en la respuesta inmune de las abejas melíferas adultas.

7.8.- Evaluar el efecto de la mezcla de microorganismos probióticos frente a la infección por *N. ceranae* en abejas melíferas adultas.

## 8.- Materiales y métodos

---

### 8.1.- Obtención de aislamientos bacterianos y condiciones de cultivo

Se colectaron abejas vivas de colmenas históricamente sanas pertenecientes a dos apiarios experimentales de INIA (La estanzuela; Colonia y la estación experimental del este; Treinta y Tres) y de la sección de Apicultura de la Facultad de Veterinaria (Montevideo, Uruguay). Se extrajeron asépticamente los intestinos de 59 abejas y se homogeneizaron en 1ml de solución tampón salina fosfatada (PBS) estéril (NaCl 8,2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,7g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,41g por litro de agua destilada). Se realizaron cuatro diluciones seriadas en base 10 y 100µl de cada dilución se sembraron en placas conteniendo agar Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Merck, Alemania) o agar Rogosa (Merck, Alemania). Las placas se incubaron a 37°C durante 48h en condiciones de microaerofilia. Posteriormente se seleccionaron entre 2 y 7 colonias por placa al azar y se repicaron en agar MRS. Una vez obtenidos cultivos puros de cada aislamiento, se conservaron en 1,5ml de caldo MRS suplementado con 15% de glicerol a -80 y -20°C.

En primera instancia los aislamientos se clasificaron de acuerdo a la morfología de la colonia, tinción de Gram y análisis microscópico. Posteriormente se llevaron a cabo las reacciones de catalasa y oxidasa (Gerhardt *et al.*, 1994). La reacción de catalasa se determinó colocando una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un portaobjetos y posteriormente picando una colonia tomada

## MATERIALES Y METODOS

de un cultivo fresco. La reacción de oxidasa se determinó utilizando los discos *Bio- Rad*® siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 8.2.- Caracterización *in vitro* del potencial probiótico de los aislamientos

#### 8.2.1.- Ensayos de inhibición de *P. larvae*

En este trabajo se utilizó el aislamiento bacteriano *P. larvae* 44 (ampliamente caracterizado en nuestro laboratorio) que fue obtenido de una muestra de miel del departamento de Durazno en el año 2002 y que pertenece a la colección del Departamento de Microbiología del IIBCE (Antúnez *et al.*, 2004; Antúnez *et al.*, 2007).

Para estudiar la capacidad antimicrobiana de los aislamientos obtenidos a partir del intestino de abejas melíferas frente a *P. larvae*, se utilizó la técnica de inhibición de crecimiento en placa (Pascual Anderson y Calderón y Pascual, 2000). Previamente, se verificó el crecimiento de los aislamientos obtenidos en el medio semiselectivo agar J (Tryptona 0,5g [Difco, Maryland, EU], Extracto de levadura 1,5g [Oxoid, Hampshire, Inglaterra],  $C_6H_{12}O_6$ (Glucosa) 0,3g, agar 1,2g,  $K_2HPO_4$  0,3g por 100ml de agua destilada) a 37°C durante 48h en condiciones de microaerofilia (Hornitzky y Nicholls, 1993). Una vez confirmado que estos aislamientos eran capaces de crecer en estas condiciones se prosiguió con el ensayo.

El aislamiento *P. larvae* 44 se cultivó en agar J a 37°C durante 48h en condiciones de microaerofilia. A partir de esta placa se realizó una suspensión

## MATERIALES Y METODOS

de células vegetativas en PBS equivalente a 1 de la escala McFarland ( $OD_{600} = 0.257$  [Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific Inc™, Finlandia],  $3 \times 10^8$  ufc/ml) y se inoculó por hisopado en placas de agar J. La suspensión se dejó secar durante 10min a temperatura ambiente y en las mismas placas se inocularon mediante picadura los aislamientos bacterianos obtenidos a partir de los intestinos de abejas. Luego de la incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante 48h en condiciones de microaerofilia las placas se examinaron y se midieron los halos de inhibición. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada aislamiento y se calculó la media y el desvío estandar.

### ***8.2.2.- Tasa de crecimiento bacteriano***

A partir de cultivos frescos a  $37^\circ\text{C}$  durante 24h en caldo MRS de los diferentes aislamientos, se prepararon diluciones en el mismo medio con una turbidez equivalente al estandar 0,5 de la escala McFarland ( $OD_{600} = 0,132$ ,  $1,5 \times 10^8$  ufc/ml), y se emplearon  $20\mu\text{l}$  de las mismas para inocular placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos, conteniendo  $180\mu\text{l}$  de caldo MRS. Las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ , realizandose medidas de absorbancia a 600 nm en el tiempo inicial y sucesivamente cada dos horas hasta las 12h, y una medida final a las 24h.

Estas medidas de absorbancia se utilizaron para evaluar el tiempo de generación de los aislamientos. El ensayo se realizó por triplicado para cada aislamiento.

### **8.2.3.- Resistencia osmótica al jarabe.**

Se prepararon suspensiones de los aislamientos obtenidos en PBS, a partir de cultivos en agar MRS a 37°C durante 24h. La turbidez de las suspensiones se igualó con el estándar 4 de la escala Mc Farland ( $OD_{600} = 0,669, 1 \times 10^9$  ufc/ml;). Paralelamente se preparó jarabe en concentraciones de 1000 o 2000g de azúcar por litro de agua (1:1 y 2:1 respectivamente) utilizadas habitualmente por los apicultores en el campo. A partir de las suspensiones originales de los aislamientos en PBS se realizaron dos suspensiones bacterianas en jarabe 1:1 y 2:1 a una concentración final de  $1 \times 10^7$  ufc/ml y se incubaron a 4 y 28°C durante 72h.

El número de células bacterianas viables en cada tratamiento se determinó por recuento en placa en agar MRS a las 0 y 72h. Las placas se incubaron a 37°C durante 24h en condiciones de microaerofilia.

### **8.2.4- Tolerancia a distintas condiciones de acidez.**

Para estimar la supervivencia bacteriana bajo diferentes condiciones de acidez se realizó una modificación del método descrito por Jacobsen *et al.* (1999). Se prepararon suspensiones en PBS de los aislamientos a partir de cultivos en MRS con 24h de incubación a 37°C. La turbidez de las suspensiones se igualó con el estándar 0,5 de la escala Mc Farland y se emplearon 20µl de las mismas para inocular placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos conteniendo 180µl de caldo MRS a tres pH diferentes: 3, 5 y 7 (modificados con

## MATERIALES Y METODOS

HCl o NaOH). Las placas se incubaron a 37°C, se realizaron medidas cada 30min durante 4h y una medida final a las 24h. Se realizó recuento de las células viables mediante siembra en superficie a las 0 y 4h Las placas se incubaron a 37°C durante 24h en condiciones de microaerofilia.

Este ensayo se realizó por triplicado para cada aislamiento.

### **8.3.- Caracterización molecular de los aislamientos**

#### **8.3.1.- Extracción de ADN**

Se extrajo el ADN genómico total de los aislamientos a partir de un cultivo fresco en caldo MRS, utilizando el kit comercial GenElute Bacterial Genomic (Sigma™, EU) de acuerdo al protocolo del fabricante.

#### **8.3.2.- Reacciones de PCR (Polymerase Chain Reaction), programas y visualización.**

##### **8.3.2.1.- Identificación bacteriana**

La identificación de los aislamientos se llevó a cabo mediante la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S utilizando los cebadores universales 27F y 1492R (Lane, 1991), y 518F (Muyzer et al., 1993; Tabla 8.1).

El PCR se realizó en un volumen final de 25µl conteniendo PCR *buffer* 1 X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP Mix 0,2 mM, cada cebador 0,5 µM, 1µl de ADN y 1U Taq ADN polimerasa (Invitrogen™, Life Technologies, Brasil). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador MultiGeneOptiMax Thermal Cycler (Labnet

## MATERIALES Y METODOS

International, EU). El programa consistió en un paso de desnaturalización inicial de 3min a 95°C, 40 ciclos de 30seg a 95°C, 55seg a 55°C y 1min a 72°C, y un paso final de extensión de 10min a 72°C (Tajabadi *et al.*, 2013).

Para analizar la cantidad y calidad del ADN obtenido, así como de los productos de PCR, se corrieron 8µl de cada producto en un gel de agarosa 1% en TBE (Tris 5,4g, ácido bórico 2,75g, 2ml EDTA 0,5M pH 8,0 por litro) a 120 V durante 50 - 60min (Sambrook *et al.*, 1989).

Las bandas se visualizaron mediante tinción con GelRed (Biotium™, EU) según las indicaciones del fabricante, se analizaron en un transiluminador de luz UV (MacroVueUvis-20, Hoefer Inc., EU) y se fotografiaron con una cámara Kodak modelo DC290. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen™).

### 8.3.2.2.- *rep-PCR (repetitive-PCR)*

La diversidad genética de los aislamientos obtenidos se evaluó mediante *rep-PCR*. La reacción se llevó a cabo de acuerdo a una modificación de la técnica descrita por Versalovic *et al.*, (1994), utilizando los cebadores BOX y ERIC (Tabla 8.1). El PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20µl conteniendo PCR buffer 1 X, MgCl<sub>2</sub> 5mM, dNTP Mix 0,2mM, cada cebador 3µM, 1µl de ADN y 1 U de Taq ADN Polimerasa (Invitrogen™). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador MultiGeneOptiMax Thermal. El programa consistió en un paso de desnaturalización inicial de 5min a 94°C, 40 ciclos de 1min a 94°C, 2min a 40°C y 8min a 65°C, y un paso final de extensión de 16min a 65°C.

## MATERIALES Y METODOS

Para analizar la calidad y cantidad del ADN obtenido, así como de los productos de PCR, se corrieron 10µl de cada producto en un gel de agarosa 0,8 % en TBE a 100 V durante 50 - 70min (Sambrook *et al.*, 1989).

Las bandas se visualizaron mediante tinción con GelRed y se fotografiaron con el escaner de geles FujiFilm Starion FLA 9000 Image Scanner (EquipNet™). Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb plus.

Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el *Software GelCompar II* (Applied Maths, Brasil). Los patrones de bandas se marcaron manualmente muestra por muestra y se utilizó el método de inferencia filogenética UPGMA para generar los agrupamientos basados en los patrones de bandas.

**Tabla 8.1-** Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S (negro) y para los análisis de diversidad mediante *rep*-PCR (rojo).

Cebador	Secuencia 5'-3'	Referencia
<b>27F</b>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Lane, 1991
<b>518F</b>	CCAGCAGCCGCGGTAATACG	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
<b>1492R</b>	GGTTACCTTGTTACGACTT	Lane, 1991
<b>BOXA1R</b>	CTACCGCAAGGCGACGCTGACG	Versalovic <i>et al.</i> ,1994
<b>ERIC2</b>	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	Versalovic <i>et al.</i> ,1994
<b>ERIC1R</b>	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	Versalovic <i>et al.</i> ,1994

### 8.3.3.- Purificación de ADN y secuenciación

Los amplicones del gen que codifica para el ARNr 16S se purificaron con el kit comercial QIAquick PCR (Qiagen™, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La calidad del ADN se analizó mediante

## MATERIALES Y METODOS

electroforesis en gel de agarosa 1% y posterior tinción con Gelred y visualización con luz UV. Los productos de purificación se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc. (Seul, Corea del Sur). Las secuencias obtenidas se compararon con aquellas disponibles en las bases de datos del GenBank (NCBI) mediante el programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) y del *Ribosomal Database Project* (RDP; Maidak *et al.*, 2001).

### **8.4.- Pre-Selección de los aislamientos bacterianos**

Basados en los resultados obtenidos en los ensayos descritos previamente, se seleccionaron los 10 aislamientos potencialmente probióticos que presentaron las características biológicas o biotecnológicas más prometedoras, para seguir caracterizándolos en los ensayos posteriores.

### **8.5.- Ensayos de inhibición entre los aislamientos.**

Se prepararon suspensiones en PBS de los 10 aislamientos preseleccionados, a partir de cultivos en agar MRS a 37°C durante 24h. La turbidez de las suspensiones se igualó con el estándar 0,5 de la escala McFarland. Cada aislamiento se sembró por hisopado en una placa de agar MRS, se dejó secar durante 10min a temperatura ambiente y en dicha placa se inocularon los otros 9 aislamientos mediante picadura (Pascual Anderson y Calderón y Pascual, 2000). Luego de la incubación a 37°C durante 24h en condiciones de microaerofilia las placas se examinaron y se midieron los halos

## MATERIALES Y METODOS

de inhibición. Los ensayos se realizaron por duplicado para cada aislamiento y se calculó la media y el desvío estandar.

### **8.6.- Perfil de ácidos grasos volátiles secretados.**

La producción de ácidos grasos volátiles (AGV) de los aislamientos incubados en caldo MRS se evaluó utilizando cromatografía líquida de alta performance (HPLC) en la plataforma de Servicios Analíticos del IIBCE.

En primer lugar se determinaron los tiempos de retención de los ácidos cítrico, pirúvico, succínico, láctico, acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico y valérico por medio de la inyección de estándares (0,5 µg/ml, Sigma-Aldrich, EU) que se utilizaron como referencia para calcular las concentraciones de estos ácidos en las muestras.

Se prepararon suspensiones de los aislamientos en PBS a partir de cultivos en agar MRS incubado a 37°C durante 24h. La turbidez de las suspensiones se igualó con el estándar 0,5 de la escala Mc Farland y se inoculó 1ml de estas suspensiones en tubos con 9ml de caldo MRS; como control se inoculó 1ml de PBS estéril. Los cultivos se incubaron con agitación a 37°C durante 24h y de cada tubo se tomó una alícuota de 500 µL a la que se le adicionó un volumen igual de ácido perclórico 0,1M e inmediatamente se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

Las muestras se centrifugaron a 5°C a 20627xg durante 15min y se inyectaron 100µL de cada sobrenadante en un equipo HPLC modular Waters

## MATERIALES Y METODOS

(Waters Associates, Milford, EU), compuesto por una bomba binaria (Waters 1525), detector de arreglo de diodos (Waters 2998; rango 210-500nm) e inyector automático (Waters 717 plus). Se utilizó una columna de intercambio iónico (estireno-divinilbenceno sulfonado; modelo Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%), Phenomenex, EU) de 300 x 7,80mm.

La fase móvil que consistió en ácido sulfúrico 0,025M (Backer, Analyzed, EU) se inyectó con un flujo de 0,7ml/min en modo isocrático. La temperatura del horno de columna se mantuvo a 59°C y la del inyector en 10°C.

Los picos de interés en los cromatogramas se integraron a 210nm (Parrott *et al.*, 1997).

### **8.7.- Evaluación del efecto en la supervivencia de los potenciales probióticos en larvas y su capacidad de prevenir la infección por *P. larvae***

El efecto en la supervivencia de los microorganismos probióticos seleccionados, así como su capacidad de inhibir el desarrollo de patógenos, se evaluó utilizando un modelo de cría e infección de larvas en el laboratorio.

#### **8.7.1.- Obtención y cuantificación de esporas de *P. larvae***

Para la obtención de una suspensión de esporas se sembraron placas de agar J con *P. larvae* y se incubaron a 37°C durante 48h. Posteriormente estas mismas placas se incubaron a temperatura ambiente durante 15 días. Luego las células se suspendieron en 1ml de PBS estéril y se centrifugaron a 11.336xg

## MATERIALES Y METODOS

durante 40min descartando el sobrenadante. Este procedimiento se realizó 3 veces consecutivas. La suspensión final en PBS se incubó a 4°C durante 30 días (Antúnez, 2009; Arredondo, 2010).

Para evaluar la presencia de esporas y células vegetativas de *P. larvae* en la suspensión y realizar su cuantificación, se colocaron 20µl en un portaobjetos sobre una superficie de 1cm<sup>2</sup>, luego el preparado se dejó secar y se fijó por calor. Posteriormente se cubrió con 100µl de PFA (Paraformaldehído, Sigma-Aldrich, EU) 3% y se incubó durante 20min a temperatura ambiente. Se lavó con PBS y se incubó con 100µl de buffer de permeabilización (Sero Albúmina Bovina [BSA] 2%, NH<sub>4</sub>Cl 50mM, Tritón X100 0,3% en PBS 1X con Ca/Mg) a temperatura ambiente durante 20min. Se enjuagó con PBS y se cubrió con 200µl de DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich, EU) concentración final 1µg/ml. El preparado se incubó durante 5min en oscuridad, se enjuagó con abundante agua destilada y se montó con Citifluor.

Para estimar el número de esporas en la suspensión se estableció un promedio de las esporas en 40 campos (área del campo = 100µm<sup>2</sup>) utilizando un microscopio de epifluorescencia invertido Olympus IX81 acoplado con cámara CCD modelo DP71.

**8.7.2.- Administración oral de los potenciales probióticos en larvas e infección con *P. larvae*.**

Los ensayos se realizaron con larvas de una única reina híbrida (*Apis mellifera mellifica* con *Apis mellifera scutellata*) mantenidas en un apiario experimental libre de enfermedades ubicado en el IIBCE (Montevideo, Uruguay). La cría e infección de larvas se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Evans (2004) y puesto a punto en nuestro laboratorio (Antúnez, 2009; Arredondo, 2010).

En primer lugar se tomaron cuadros de cría con larvas menores a 24h (período de susceptibilidad a la infección por *P. larvae*) y se trasladaron al laboratorio. Las larvas se colocaron individualmente en placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo plano, donde previamente se habían colocado 10µl de alimento larval (jalea real pura 66%, glucosa 6%, fructosa 6% y extracto de levadura 1% en agua destilada estéril) suplementado con las suspensiones bacterianas de los microorganismos potencialmente probióticos ( $1 \times 10^7$  ufc/ml) (Máchova *et al.*, 1997). Se emplearon 10 grupos de 12 larvas, y cada grupo recibió una suspensión generada de un aislamiento particular. Otros 10 grupos de 12 larvas se alimentaron con alimento larval suplementado con los microorganismos potencialmente probióticos e inoculado a la vez con una suspensión de esporas de *P. larvae* a una concentración final de 1000 esporas/µl de alimento. Un grupo de larvas alimentadas solo con el alimento larval y otro grupo alimentado con el alimento larval inoculado con 1000 esporas/µl.

## MATERIALES Y METODOS

Las larvas se incubaron a 34,5°C con alto porcentaje de humedad (para emular las condiciones normales de la colonia) durante 48h. Posteriormente se inspeccionaron las placas cada día, se calculó el porcentaje de mortalidad y las larvas vivas se traslaron a nuevas placas de microtitulación con alimento fresco. El ensayo se continuó hasta alcanzar el quinto estadio de desarrollo larval.

### **8.8.- Efecto de los potenciales probióticos sobre la supervivencia de abejas adultas**

Con el fin de evaluar el efecto de la administración de los microorganismos potencialmente probióticos o la mezcla de estos sobre la supervivencia de abejas adultas se empleó el modelo descrito por Rinderer (1976) y modificado por Porrini *et al.* (2010).

Los ensayos se realizaron con cuadros de pupas operculados de reinas híbridas (*Apis mellifera mellifica* con *Apis mellifera scutellata* y *Apis mellifera mellifera* con *Apis mellifera ligustica*) mantenidas en apiarios libres de enfermedades ubicados en INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay) y en la estación costera J. J. Nágera del Laboratorio de Artrópodos de la Universidad Nacional de Mar del Plata (Mar del Plata, Argentina) respectivamente.

Los cuadros extraídos se incubaron a 35°C y las abejas recién emergidas se removieron y se confinaron en cajas especiales (16 x 12 x 6 cm) dentro de una incubadora, con jarabe 1:1 como única fuente de alimentación (*ad libitum*).

## MATERIALES Y METODOS

Dos días luego de emerger, las abejas pertenecientes a la reina híbrida del apiario de J. J. Nágera (*Apis mellifera mellifera* con *Apis mellifera ligustica*) se separaron en nueve grupos de 15 individuos, se mantuvieron en ayunas durante 3h y posteriormente se alimentaron individualmente con 20µl de jarabe 1:1 suplementado con una suspensión bacteriana de los aislamientos seleccionados a una concentración de  $1 \times 10^7$  ufc/ml. Cada grupo de abejas recibió una suspensión de microorganismos diferente. Luego de que ingirieron todo el jarabe, las abejas se colocaron en sus respectivas cajas (Máchova *et al.*, 1997). Las abejas utilizadas como control se alimentaron solo con 20µl de jarabe 1:1. Las cajas de abejas se examinaron diariamente para registrar la supervivencia y se retiraron los individuos muertos. Este ensayo se realizó por triplicado para cada aislamiento.

Posteriormente, se evaluó la supervivencia de las abejas adultas alimentadas con la mezcla de microorganismos probióticos. Este ensayo se realizó en el apiario de INIA La Estanzuela de acuerdo a lo descrito previamente. Los individuos se alimentaron con 20µl de la mezcla a una concentración de  $1 \times 10^7$  ufc/ml de jarabe y el grupo control con 20µl de jarabe 1:1.

### **8.9.- Evaluación de la capacidad de los potenciales probióticos de modificar el sistema inmune de abejas adultas**

Dos días luego de la aplicación de los tratamientos descritos en el punto anterior (8.8), 10 abejas de cada grupo se seleccionaron al azar, se removieron

## MATERIALES Y METODOS

de la incubadora y colocaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  en  $500\mu\text{l}$  de *ARN later* (Qiagen™) hasta su posterior análisis. En el caso del ensayo realizado en Colonia, las abejas se enviaron vivas a Montevideo y se congelaron inmediatamente a  $-80$  hasta su posterior análisis.

### **8.9.1.- Obtención de de ARN y ADN complementario (ADNc)**

Las muestras de abejas en *ARN later* se centrifugaron durante 15min a  $6700 \times g$  y se descartó el sobrenadante, con el fin de eliminar los restos de este agente preservante.

Posteriormente se realizó la extracción del ARN total de cada abeja, de forma individual, utilizando el kit comercial *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen™) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Inmediatamente se utilizaron  $5\mu\text{L}$  de cada extracción de ARN para generar ADNc utilizando el kit comercial *Quantitect Reverse Transcription Kit* (Qiagen™) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se diluyó diez veces en agua destilada estéril libre de RNasas y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **8.9.2.- PCR en tiempo real**

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos (Bio-Rad Laboratories™, EU) utilizando el kit comercial *QuantiTect SYBR PCR Kit* (Qiagen™) y cebadores específicos para evaluar la expresión de diferentes genes vinculados a la respuesta inmune humoral y celular mediante PCR en tiempo real.

## MATERIALES Y METODOS

Se analizaron los niveles de transcripción de los genes que codifican para los péptidos antimicrobianos abaecina, himenoptecina, defensina, las enzimas profenol oxidasa, glucosa deshidrogenasa, lisozima y la proteína vitelogenina utilizando los cebadores de la tabla 8.2 (Corona *et al.*, 2007; Evans, 2006; Yang y Cox-Foster, 2005). Para normalizar las variaciones en los niveles de ADNc se utilizaron dos genes de referencia: el gen que codifica para la proteína RPS5 (proteína ribosomal de la subunidad menor) y  $\beta$ -actina (Chaimanee *et al.*, 2012; Evans, 2006).

La mezcla de reacción consistió en *QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix* 1 X, 0,5  $\mu$ M de cada cebador (un par de cebadores por reacción), agua libre de RNAasas y 5  $\mu$ L de ADNc en un volumen final de 25  $\mu$ L. En todas las corridas se incluyeron controles negativos y un estándar para cada gen. El estándar se realizó mediante diluciones seriadas en base 10 a partir del ADNc de una muestra escogida al azar.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador en tiempo real BIO-Rad CFX96 (Bio-Rad Laboratories™) y el programa de ciclado consistió en una activación inicial a 50°C durante 2min, 95°C durante 15min, 39 ciclos de 94°C durante 15seg, 52°C durante 30seg y 72°C durante 30seg.

## MATERIALES Y METODOS

Tabla 8.2.- Cebadores utilizados para cuantificar la expresión génica de genes relacionados con la inmunidad de las abejas

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Gen	Referencia
Abaecin-F	CAGCATTTCGCATACGTACCA	<i>abaecina</i>	Evans, 2006
Abaecin-R	GACCAGGAAACGTTGGAAAC		
Defensin-F	TGTCGGCCTTCTCTTCATGG	<i>defensina</i>	Yang & Cox-Foster, 2005
Defensin-R	TGACCTCCAGCTTTACCCAAA		
Hymenopt-F	CTCTTCTGTGCCGTTGCATA	<i>himenoptecina</i>	Johnson <i>et al.</i> , 2009
Hymenopt-R	GCGTCTCCTGTCATTCCATT		
VgMC-F	AGTTCCGACCGACGACGA	<i>vitelogenina</i>	Corona <i>et al.</i> , 2009
VgMC-R	TTCCCTCCCACGGAGTCC		
GLD-F	CTGCACAACCACGTCTCGTT	<i>glucosa</i>	Yang & Cox-Foster, 2005
GLD-R	ACCGCCGAAGAAGATTTGG	<i>deshidrogenasa</i>	
PO-F	AATCCATTACCTGAAATTGATGCTTAT	<i>profenol oxidasa</i>	Yang & Cox-Foster, 2005
PO-R	TAATCTTCCAATAATTCATACGCTCTT		
LYS-F	ACACGGTTGGTCACTGGTCC	<i>lisozima</i>	Yang & Cox-Foster, 2005
LYS-R	GTCCCACGCTTTGAATCCCT		
RPS5-F	AATTATTTGGTCGCTGGAATTG	<i>Proteína ribosomal s5 (RPS5)</i>	Evans, 2006
RPS5-R	TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA		
BACTIN1	ATGCCAACACTGTCCTTCTGG	<i>β-actina</i>	Yang & Cox-Foster, 2005
BACTIN2	GACCCACCAATCCATACGGA		

### 8.9.3.- Cuantificación de la expresión de genes involucrados en la inmunidad

Para analizar los datos proporcionados por el termociclador se utilizó el *software* del equipo (Bio-Rad CFX Manager 2.1; Bio-Rad Laboratories™). La especificidad de la amplificación se verificó en todos los casos mediante la inclusión de una curva de desnaturalización de los productos amplificados (de 65 a 95°C).

## MATERIALES Y METODOS

En todos los casos los resultados de las amplificaciones para los genes analizados se expresaron como valores de ciclo de cuantificación (Cq) y para cada gen analizado se obtuvo un valor de eficiencia de reacción para la amplificación, calculado en base a la curva estándar. La media geométrica de los dos genes de referencia (RPS5 y  $\beta$ -actina) se utilizó para normalizar y estimar la expresión de los genes involucrados en la inmunidad mediante el método de Pfaffl (2001).

### **8.10.- Evaluación de la capacidad de los aislamientos de prevenir la infección por *N. ceranae* en abejas adultas.**

#### **8.10.1.- Obtención y cuantificación de esporas de *N. ceranae***

Para la obtención de una suspensión de esporas de *N. ceranae* se extrajeron los tubos digestivos de cuatro abejas naturalmente infectadas, se disecaron los ventrículos y se homogeneizaron individualmente en 1ml agua destilada estéril. Las suspensiones de esporas resultantes se filtraron a través de una malla plástica de 10 $\mu$ m, las 4 suspensiones se mezclaron para infectar posteriormente a las abejas recién emergidas (Human *et al.*, 2013).

Para estimar la cantidad de esporas de *N. ceranae* se colocaron 10 $\mu$ l de la suspensión de esporas en cámara de Neubauer y se realizó la cuantificación utilizando un microscopio óptico a 400X de acuerdo a lo descrito en el manual del COLOSS *Beebook* (Human *et al.*, 2013).

**8.10.2.- Administración oral del probiótico e infección con *N. ceranae* en abejas adultas**

Con el fin de evaluar el efecto de la administración de los potenciales probióticos sobre el desarrollo de patógenos en abejas adultas, se evaluó su actividad sobre el desarrollo de *N. ceranae*. Para esto se obtuvieron cuadros de pupas operculados de una única reina híbrida (*Apis mellifera mellifera* con *Apis mellifera ligustica*) perteneciente a la estación costera J. J. Nágera (Mar del Plata, Argentina), y se repitió el ensayo detallado en el punto 6.8.

Luego de dos días de emergidas, las abejas se mantuvieron en ayunas durante 3h y se alimentaron individualmente con 20µl de jarabe suplementado con una suspensión bacteriana ( $1 \times 10^7$  ufc/ml de jarabe; Máchova *et al.*, 1997). Las abejas utilizadas como control se alimentaron solo con 20µl de jarabe.

Las abejas se colocaron en sus respectivas cajas conteniendo aproximadamente 3g de polen y se alimentaron *ad libitum* con 4ml de jarabe 1:1 inoculado con  $5 \times 10^5$  esporas de *N. ceranae* (extraídas de abejas infectadas naturalmente; Fries *et al.*, 2013; Human *et al.*, 2013). A las 24h se cambiaron los alimentadores y se colocaron nuevos conteniendo 4ml de jarabe fresco sin inocular. Las cajas de abejas se examinaron diariamente para registrar la supervivencia, cambiar el jarabe de los alimentadores y retirar los individuos muertos. Este ensayo se realizó por triplicado para cada aislamiento.

Para evaluar la multiplicación de *N. ceranae*, las abejas se sacrificaron 7 días post infección, se extrajeron los tubos digestivos de 30 abejas de cada

## MATERIALES Y METODOS

grupo, se disecaron los ventrículos y se homogeneizaron individualmente en 1ml agua destilada estéril. Posteriormente se colocaron 10 $\mu$ l de las suspensiones de esporas en cámara de Neubauer y se realizó la cuantificación utilizando un microscopio óptico a 400X.

### 8.11.- Análisis estadístico

Para evaluar la supervivencia de las larvas y abejas adultas alimentadas con los aislamientos bacterianos se realizaron análisis de supervivencia de los distintos grupos utilizando el test no paramétrico de Gehan–Breslow (teniendo en cuenta las correcciones necesarias en los días en los que se extrajeron las abejas para PCR en tiempo real) y las comparaciones a posteriori se realizaron con el test Holm–Sidak.

En el caso de la evaluación de la capacidad de los potenciales prebióticos de prevenir o controlar la infección por patógenos (*P. larvae* y *N. ceranae*) se utilizó el mismo procedimiento.

Con el fin de analizar eventuales diferencias en la expresión de los genes vinculados a la inmunidad entre las abejas adultas que recibieron o no potenciales probióticos, se evaluó en primer lugar la normalidad (Kolmogorov-Smirnov, corrección de Lilliefors) y homogeneidad de varianza (test de Levene) para los datos obtenidos de cada gen. En los casos en que no se cumplieron los supuestos paramétricos, se transformaron los datos  $\text{Log}_{10}(x+1)$  y se repitieron los test de normalidad y homogeneidad de varianza. De no cumplirse con los

## MATERIALES Y METODOS

supuestos de la estadística paramétrica se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney para comparar entre grupos.

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

## 9.- Resultados

---

### 9.1.- Obtención de aislamientos bacterianos y análisis de su potencial probiótico

Con el objetivo de desarrollar una mezcla de microorganismos probióticos nativos capaz de mejorar la salud de las abejas melíferas se sembró el contenido intestinal de 59 abejas melíferas provenientes de colonias históricamente sanas de los apiarios de INIA La Estanzuela y Facultad de Veterinaria en agar MRS y Rogosa. A partir del contenido intestinal de 36 abejas melíferas se obtuvo una colección bacteriana de 151 aislamientos potencialmente probióticos (Anexo 1), mientras que de las restantes 23 abejas no se obtuvieron colonias en los medios de cultivo utilizados en este trabajo.

A partir de esta colección, se seleccionaron 65 aislamientos al azar y se observó que 52 fueron bacilos gram positivos, KOH (hidróxido de potasio), catalasa y oxidasa negativo, es decir potenciales *Lactobacillus* spp., mientras que el resto de los aislamientos presentaron diferentes combinaciones de estas características.

Con el fin de evaluar si los aislamientos obtenidos eran capaces de inhibir el crecimiento de *P. larvae*, se realizaron ensayos de inhibición. Previamente se analizó si los 65 aislamientos eran capaces de crecer en agar J (medio semiselectivo para *P. larvae*). Se observó que estos aislamientos fueron capaces de crecer y multiplicarse no solo en MRS o Rogosa sino que también fueron

## RESULTADOS

capaces de hacerlo en medio J (Figura 9.1 A). Esto permitió la realización del ensayo de inhibición del crecimiento de *P. larvae* *in vitro* y se observó que 57 de los 65 aislamientos seleccionados consiguieron inhibir su crecimiento (Figura 9.1 B y C). Este ensayo permitió realizar una primera preselección de los aislamientos, y sólo se continuó trabajando con los aislamientos que inhibieron a *P. larvae*.

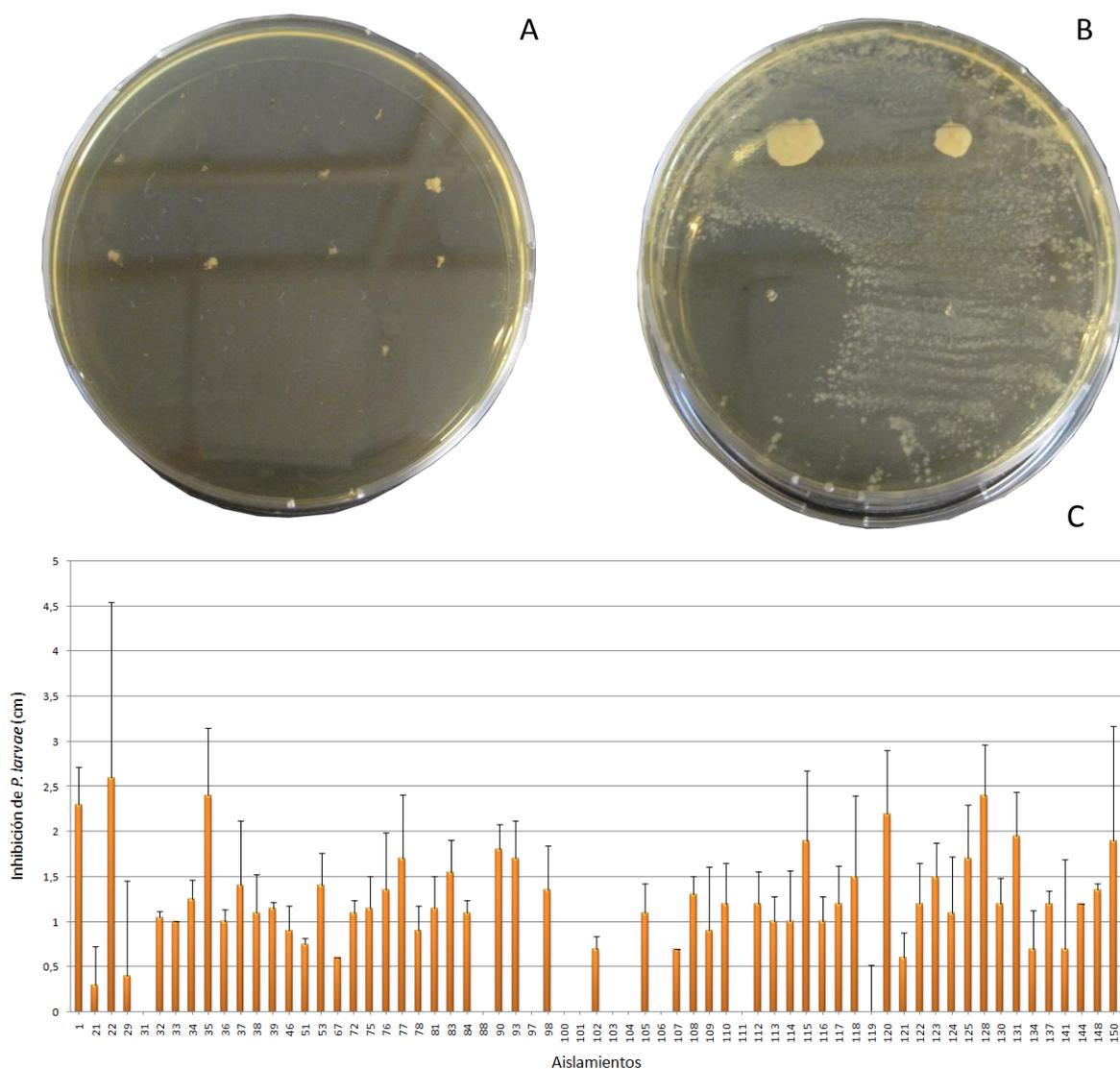


Figura 9.1.- Ensayo de inhibición de *Paenibacillus larvae* *in vitro*. **A.** Diagrama de barras de los halos de inhibición de los 65 aislamientos (media+desvío); **B.** Crecimiento de los aislamientos en medio J; **C.** Inhibición del crecimiento de *P. larvae* en medio J.

## RESULTADOS

Posteriormente se construyeron las curvas de crecimiento de los 57 aislamientos seleccionados (mediante espectrofotometría, Figura 9.2) y se calculó el tiempo de generación de cada uno. La mediana de los tiempos de generación fue  $109,3 \pm 46\text{min}$ , el aislamiento que exhibió el crecimiento más rápido mostró un tiempo de generación de 63min mientras que el más lento fue de 289min (Figura 9.3 y Anexo 1).

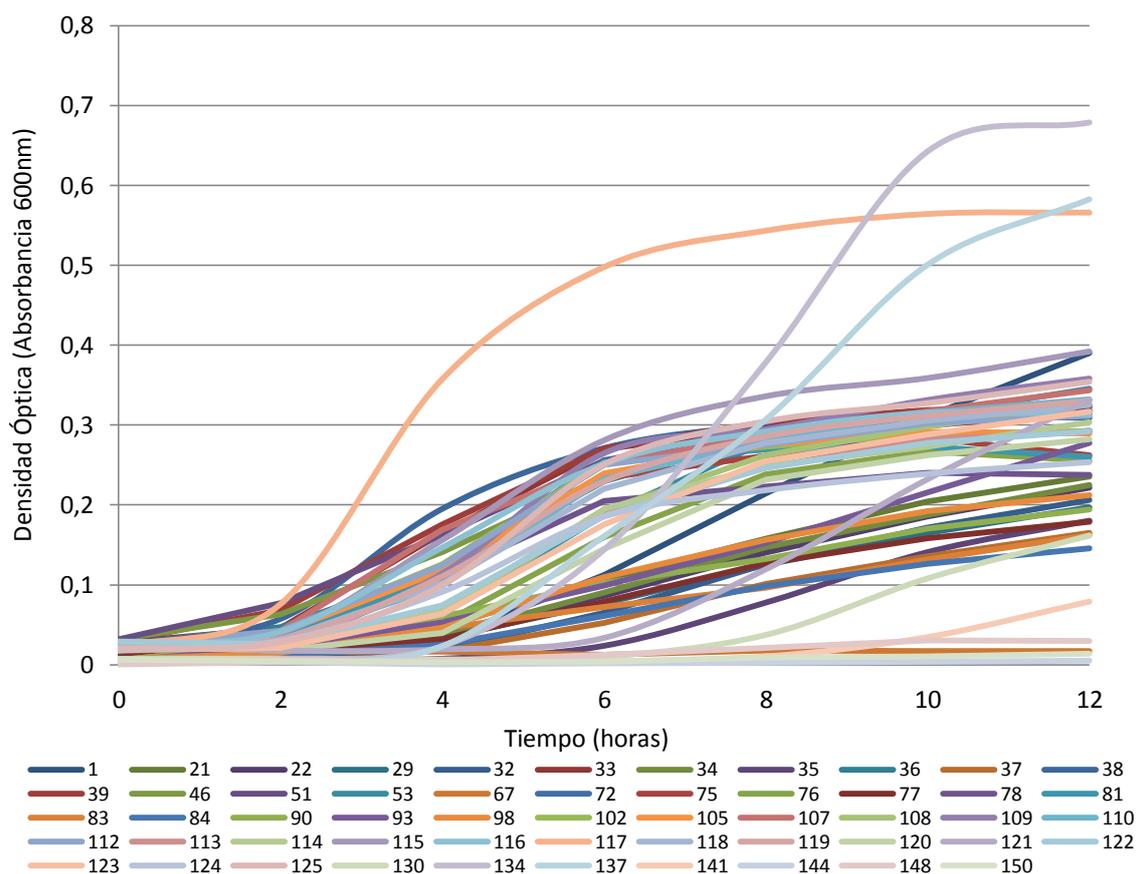


Figura 9.2.- Curvas de crecimiento de los 57 aislamientos analizados, cada aislamiento esta representado con un color. Los ensayos se realizaron por triplicado, en cada punto se presenta el valor de la media.

## RESULTADOS

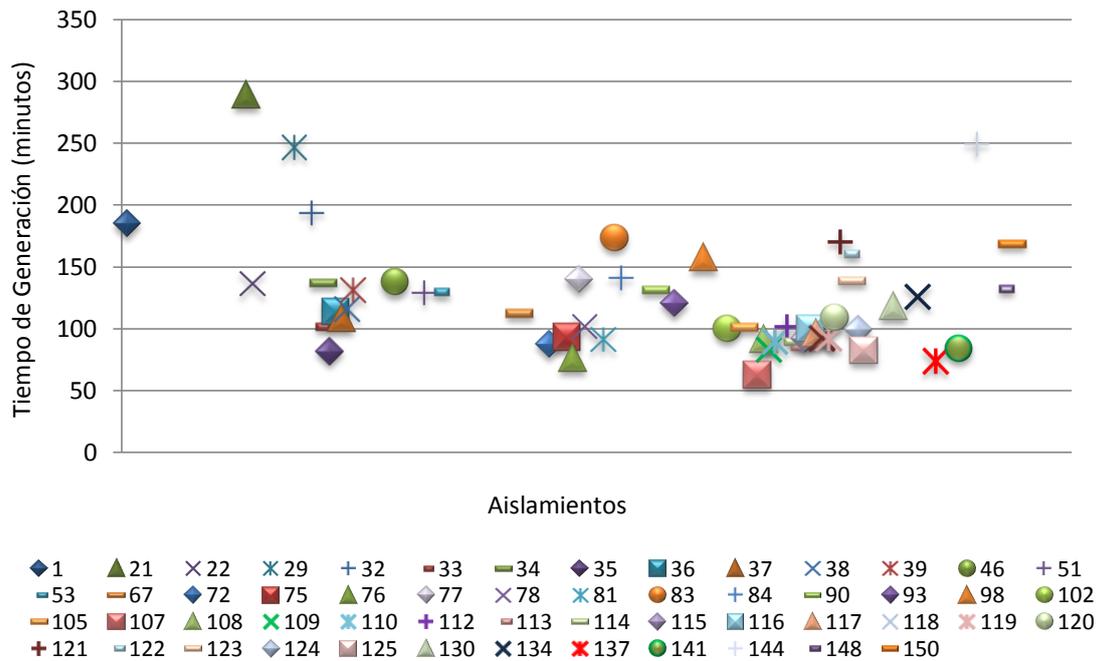


Figura 9.3.- Diagrama de dispersión de los tiempos de generación de los aislamientos analizados. Cada aislamiento está representado con un ícono y color distinto. Estos datos fueron calculados a partir de las curvas de crecimiento.

Posteriormente se analizó el porcentaje de supervivencia bacteriana luego de permanecer 72h en altas concentraciones de azúcar (jarabe 1:1 y 2:1) a 4 y 28°C (Figura 9.4) y se observó que los aislamientos poseían un comportamiento diferencial ya que los porcentajes de supervivencia variaron entre 0 y 100% dependiendo de la temperatura de incubación y de la concentración de azúcar (Anexo 1). Se observó que la temperatura influye significativamente en la supervivencia, ya que las células incubadas a 4°C lograron sobrevivir significativamente más que aquellas incubadas a 28°C (Mann-Whitney test  $p < 0,01$  en jarabe 1:1 y 2:1). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia al variar las

## RESULTADOS

concentraciones del jarabe, ya sea a 4 o 28°C (Mann-Whitney test  $p = 0,25$  y  $p = 0,12$  respectivamente).

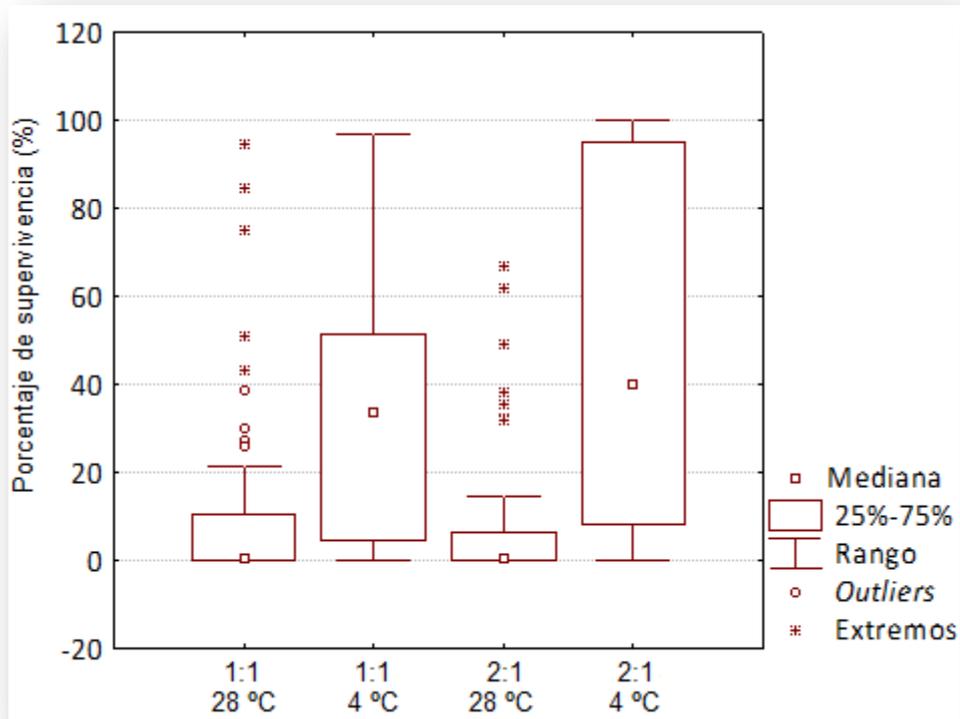


Figura 9.4.- Gráfico tipo Box plot de la supervivencia de los 57 aislamientos sometidos a diferentes concentraciones de azúcar (jarabe 1:1 o 2:1) y temperatura (4 y 28°C). El porcentaje de supervivencia de cada aislamiento se calculó como:  $((ufc/ml)_{t72h} \cdot 100) / (ufc/ml)_{t0h}$ .

También se estudió la supervivencia de los diferentes aislamientos seleccionados frente a diferentes condiciones de acidez (pH3, pH5 y pH7). Se observó que la acidez del medio influye significativamente en la viabilidad de las células, encontrándose un crecimiento significativamente menor en los aislamientos incubados en caldo MRS a pH3 comparados con los cultivos en MRS a pH5 o pH7 (Mann-Whitney test  $p < 0,01$  en ambos casos). Si bien la supervivencia de la mayoría de los aislamientos se vió afectada a pH3, algunos aislamientos lograron mantenerse viables (Tabla 9.1). Por otro lado no se

observaron diferencias significativas en la supervivencia entre los aislamientos incubados en medio MRS a pH5 y pH7 (Mann-Whitney test  $p = 0,66$ ; Figura 9.5).

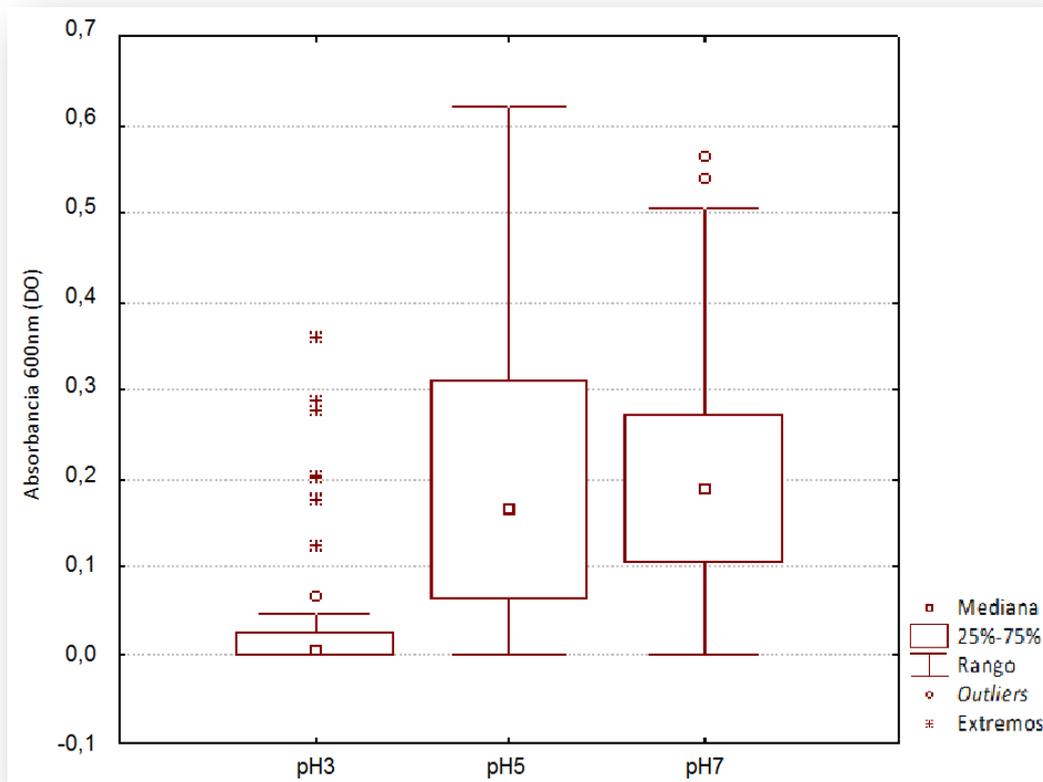


Figura 9.5.- Gráfico tipo Box plot de la supervivencia de los 57 aislamientos sometidos a diferentes condiciones de acidez (pH 3, 5 y 7). Los datos que se representan corresponden al  $\Delta_{\text{Absorbancia } 600\text{nm}} = \text{Absorbancia } 600\text{nm}_{t0h} - \text{Absorbancia } 600\text{nm}_{t4h}$ .

## 9.2.- Pre-Selección de los aislamientos bacterianos

En base a los resultados obtenidos se realizó la elección de aquellos aislamientos capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de *P. larvae*, de sobrevivir en altas concentraciones de azúcar o capaces de sobrevivir a distintas condiciones de acidez (Tabla 9.1).

**Tabla 9.1-** .Atributos vinculados al potencial probiótico de los 10 aislamientos seleccionados.

Aislamiento	Inhibición de <i>P. larvae</i> (cm)	% de supervivencia en azúcar*				% de supervivencia a distintas condiciones de acidez**		
		1:1		2:1		pH 3	pH 5	pH 7
		28°C	4°C	28°C	4°C			
1	2,3 ± 0,42	15	22	14	48	6	100	100
22	2,1 ± 1,94	0,1	2,1	0,2	0,7	52	100	100
35	2,0±0,75	75	76	35	32	100	100	100
37	1,2 ± 0,72	20	19	3,1	23	54	100	100
51	0,8 ± 0,07	43	45	38	75	23	100	100
67	0,6 ± 0	84	65	67	64	100	100	100
78	0,9 ± 0,28	30	0,05	0,1	2,4	100	100	69
110	1,2 ± 0,45	38	34	0	38	100	100	71
117	0,8 ± 0,75	51	97	5	100	100	100	100
122	1,2 ± 0,45	94	23	0,02	100	100	100	28

\* Se muestra  $(T_0 * 100) / T_{72h}$ . \*\* Se muestra  $(T_0 * 100) / T_{4h}$ .

### 9.3.- Caracterización molecular de los aislamientos obtenidos

#### 9.3.1.- Identificación bacteriana

Se realizó la identificación de los aislamientos obtenidos mediante la amplificación y secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S. En todos los casos se logró amplificar una única banda de 1500 pb, correspondiente al tamaño esperado (Figura 9.6). Dicha banda fue purificada y secuenciada.

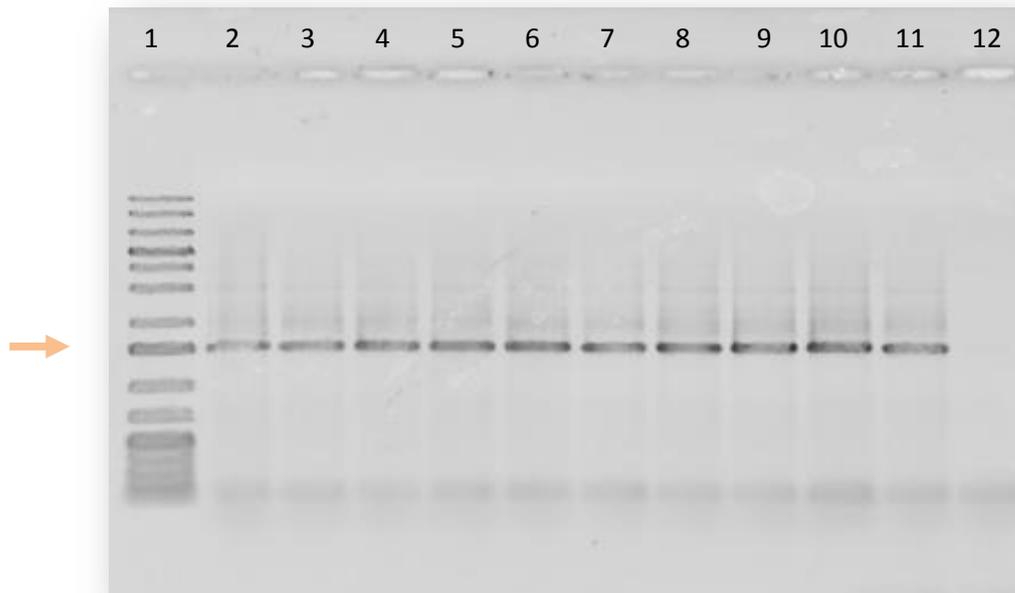


Figura 9.6.- Electroforesis en gel de agarosa 0.8 % donde se muestran las bandas producto de la amplificación de un fragmento de 1500 pb del gen que codifica para el ARNr 16S. 1.- Marcador de peso molecular, 2.- 1, 3.- 22, 4.- 35, 5.- 37, 6.- 51, 7.- 67, 8.- 78, 9.- 110, 10.- 117, 11.- 122, 12.- Control Negativo. La flecha indica el fragmento amplificado.

La búsqueda de similitud de secuencias indicó que la mayor parte de los aislamientos presentaron un alto porcentaje de similitud (entre 97% y 100%), con *Lactobacillus kunkeei*. En la tabla 9.2 se detalla la filiación asignada a los 10 aislamientos más prometedores desde el punto de vista biotecnológico, su porcentaje de identidad y el número de acceso de la referencia en el *GenBank* del NCBI.

**Tabla 9.2-** Identificación de los productos amplificados en la base de datos del Genbank (NCBI).

Aislamiento	Identidad	% de identidad (GenBank)	Número de acceso *
1	<i>Lactobacillus helsingborgensis</i>	98%	NR_126253.1
22	<i>Acetobacteraceae bacterium</i>	99%	AB777207.1
35	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	99%	NR_026404.1
37	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	100%	NR_026404.1
51	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	98%	NR_026404.1
67	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	100%	NR_026404.1
78	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	99%	NR_026404.1
110	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	100%	NR_026404.1
117	<i>Enterococcus faecalis</i>	97%	NR_074637.1
122	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	97%	NR_026404.1

\*Se presentan los números de acceso del microorganismo más cercano en la base de datos del *GenBank* del NCBI

### 9.3.2.- Análisis de la diversidad genética de *L. kunkeei* mediante *rep-PCR*

Dado que de los 57 aislamientos seleccionados 41 fueron identificados como *L. kunkeei*, se intentó determinar si estos aislamientos pertenecían a una misma cepa, o presentaban variaciones genéticas. Con este fin se analizó el perfil de amplificación mediante *rep-PCR*, utilizando los cebadores ERIC y BOX.

El análisis con estos cebadores permitió obtener en ambos casos perfiles compuestos por entre 3 y 22 bandas con distinto tamaño molecular. Se observó que en la misma abeja los distintos aislamientos de *L. kunkeei* obtenidos exhibieron patrones de bandas diferentes, sugiriendo que en un mismo

individuo pueden coexistir diferentes variantes genéticas de la misma especie. A su vez se observaron patrones de bandas similares entre aislamientos de *L. kunkeei* obtenidos de distintas colmenas, sugiriendo que la misma variante genética podría estar presente en diferentes abejas (Figuras 9.7 y 9.8). Por otro lado también se observó que la inhibición de *P. larvae* no está asociada a una variante genética en particular ya que los aislamientos que fueron o no capaces de inhibirlo se encuentran mezcladas en el dendrograma.

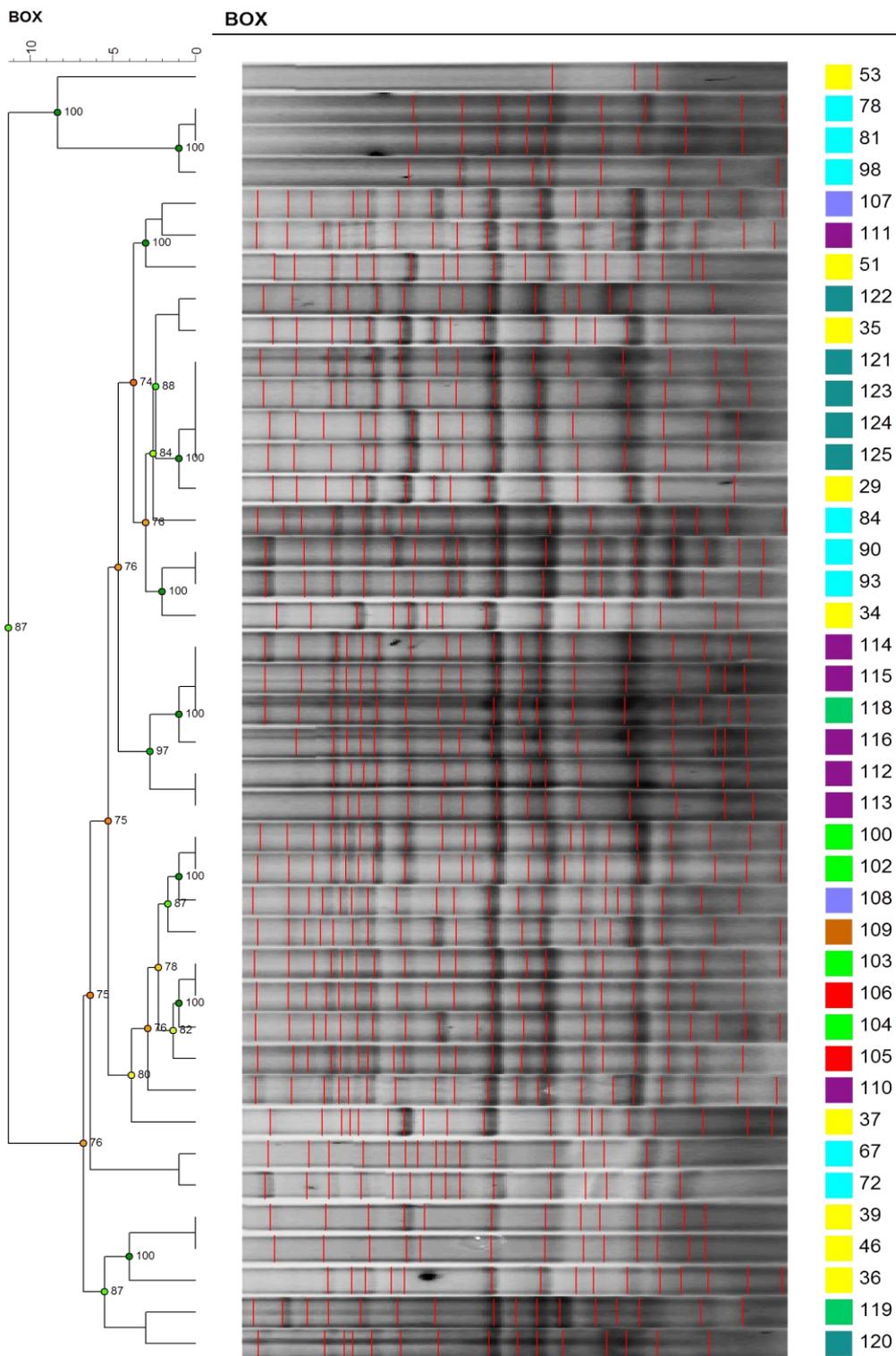


Figura 9.7.- Electroforesis en gel de agarosa 0.8 %. *rep*-PCR utilizando el cebador BOXA1R. De izquierda a derecha se observa el dendrograma generado por UPGMA utilizando el programa *GelCompare*, luego los carriles de los distintos aislamientos con las bandas que fueron seleccionadas. Los distintos colores indican de que abeja fue obtenido el aislamiento y el número de identificación esta a la derecha.

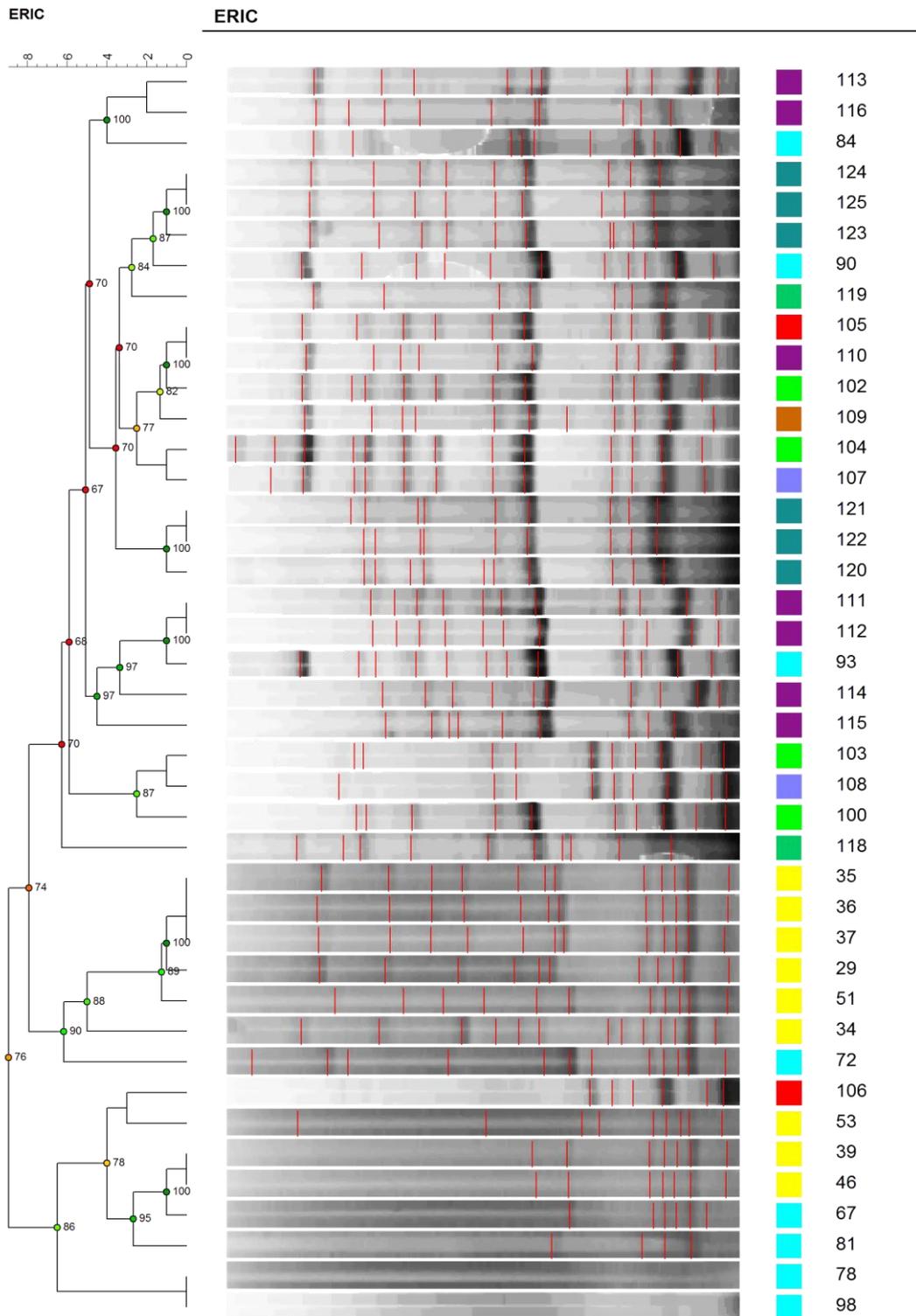


Figura 9.8.- Electroforesis en gel de agarosa 0.8 %. *rep*-PCR utilizando los cebadores ERIC 1R y ERIC 2. De izquierda a derecha se observa el dendrograma generado por UPGMA utilizando el programa *GelCompare*, luego los carriles de los distintos aislamientos con las bandas que fueron seleccionadas. Los distintos colores indican de que abeja fue obtenido el aislamiento y el número de identificación esta a la derecha.

### **9.4.-Ensayos de inhibición entre los aislamientos.**

Una vez seleccionados los 10 aislamientos con características más prometedoras, se realizó un ensayo de inhibición para evaluar si existía antagonismo entre ellos. Se observó que los aislamientos 78 y 117 inhibían completamente el crecimiento de los otros, los aislamientos 1, 22, 51, y 122 inhibían parcialmente el crecimiento del resto y los aislamientos 35, 37, 67 y 110 no inhibían el crecimiento de ninguno de los otros.

Con el fin de contar con una mezcla de microorganismos que pudiera presentar diferentes propiedades probióticas y coexistir, se escogieron estos últimos 4 aislamientos. Si bien los 4 fueron identificados como *L. kunkeei*, presentaron variaciones genéticas así como fenotípicas, sugiriendo que se trata de cepas diferentes. Se continuó trabajando tanto con los 10 aislamientos seleccionados de forma individual, así como con esta mezcla de 4 que no inhibían el crecimiento de los otros aislamientos analizados.

### **9.5.- Perfil de ácidos grasos volátiles secretados.**

La producción de ácidos grasos volátiles de los aislamientos seleccionados se evaluó mediante HPLC.

Todos los aislamientos produjeron ácido láctico, aunque además de esto se detallan otras características. El aislamiento 1 fue productor de ácido acético y propiónico; el 22 de ácido succínico, acético y propiónico; los aislamientos 37 y 51 fueron productores de ácido acético y el aislamiento 122 fue el único

productor de ácido cítrico y también produjo ácido succínico, acético y propiónico (Figura 9.9).

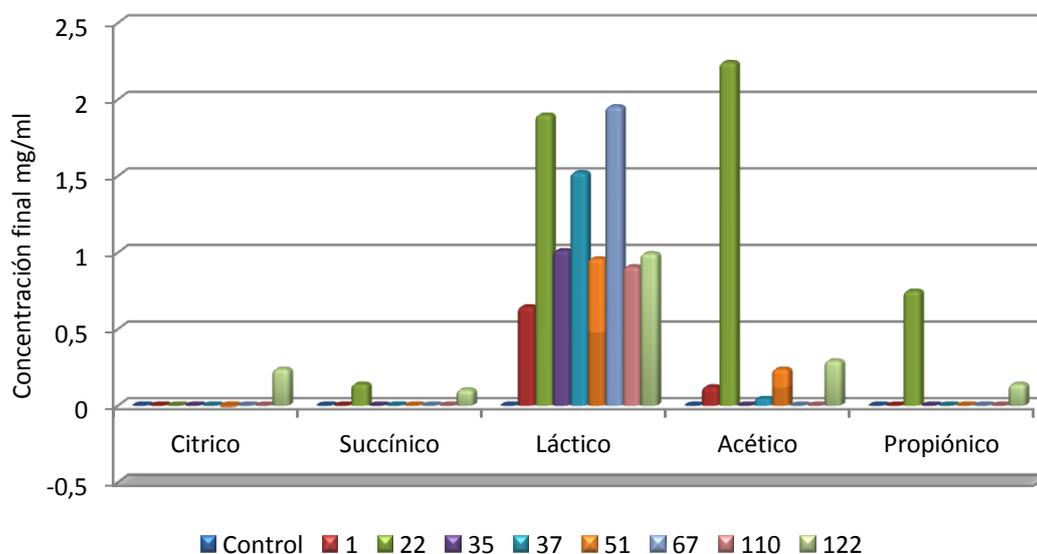


Figura 9.9.- Gráfico que muestra los niveles de producción de los distintos ácidos grasos volátiles (Cítrico, Succínico, Láctico, Acético y Propiónico).

### 9.6.- Supervivencia de las larvas alimentadas con los potenciales probióticos y su capacidad de prevenir la infección por *P. larvae*

Con el fin de confirmar que los aislamientos seleccionados no causaran daño en el huésped, se llevó a cabo un ensayo de administración oral en larvas. Este ensayo se realizó exitosamente obteniendo larvas sanas del quinto estadio (Día 6). El tamaño y el aspecto de las larvas coincidieron con lo descrito para este estadio del desarrollo (Figura 9.10). No se encontraron diferencias significativas en la mortalidad entre las larvas que consumieron el alimento larval control y las larvas que consumieron el alimento larval inoculado con la mezcla de *L. kunkeei* o con los aislamientos individuales (1, 22, 35, 37, 51, 67,

## RESULTADOS

110 y 122; Gehan - Breslow,  $p > 0,05$ ; Figura 9.12). Esto indica que la administración de estos aislamientos no alteró la supervivencia de las larvas.

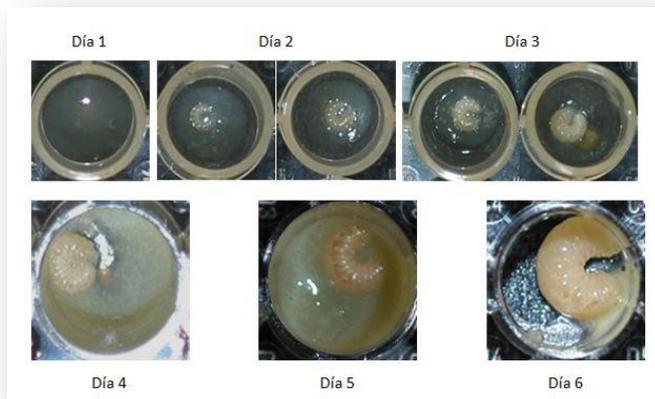


Figura 9.10.- Desarrollo larval de *A. mellifera* en condiciones controladas de laboratorio en placas de microtitulación.

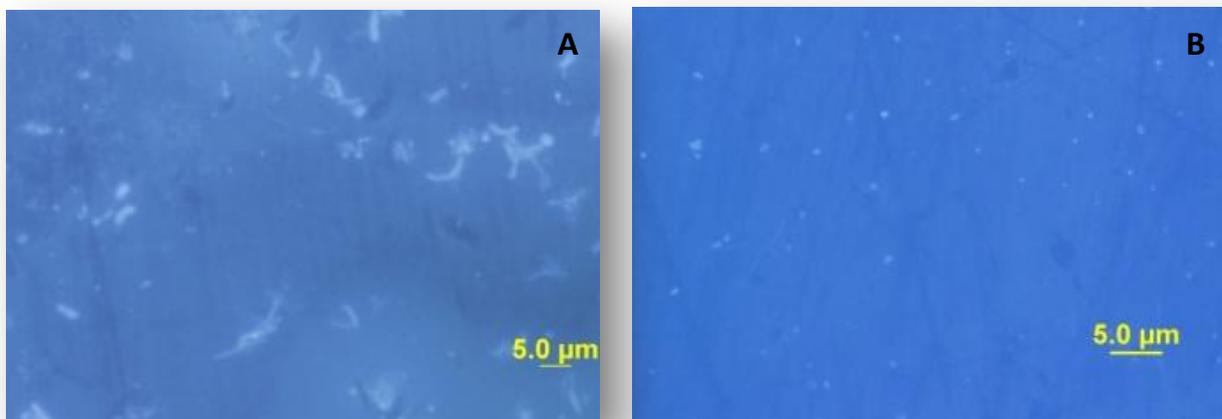


Figura 9.11.- Tinción con DAPI de la suspensión de esporas de *P. larvae*. Imágenes tomadas a 100x. **A.** 15 días de incubación **B.** 30 días de incubación.

Posteriormente se ensayó el efecto antimicrobiano frente a *P. larvae in vivo*, empleando el mismo modelo que en el caso anterior. En primer lugar se preparó una suspensión de esporas de *P. larvae* para utilizar en los ensayos de infección. Luego de 15 días de incubación en la suspensión se observaron

células vegetativas y un bajo número de esporas (Figura 9.11 A); mientras que a los 30 días se observó un importante aumento en el número de esporas (Figura 9.11 B), alcanzando un valor de  $1,38 \times 10^6$  esporas de *P. larvae*/μl de PBS.

El proceso de infección de larvas empleando el modelo de laboratorio se realizó de forma exitosa mediante la administración de alimento larval inoculado con 1000 esporas /μl de alimento a larvas menores a 24h.

Se evaluó la supervivencia de las larvas alimentadas con los aislamientos potencialmente probióticos e infectadas con *P. larvae*, y se comparó con las larvas que sólo recibieron esporas de *P. larvae*. Al sexto día de desarrollo, las larvas alimentadas con la mezcla de 4 aislamientos de *L. kunkeei* (35, 37, 67 y 110) e infectadas con *P. larvae* mostraron una mortalidad significativamente menor que las larvas infectadas con *P. larvae* (Gehan - Breslow,  $p = 0,03$ ; Figura 9.13). La administración de los aislamientos individuales no consiguió disminuir significativamente la mortalidad ocasionada por *P. larvae* (Gehan - Breslow,  $p > 0,05$  en todos los casos).

## RESULTADOS

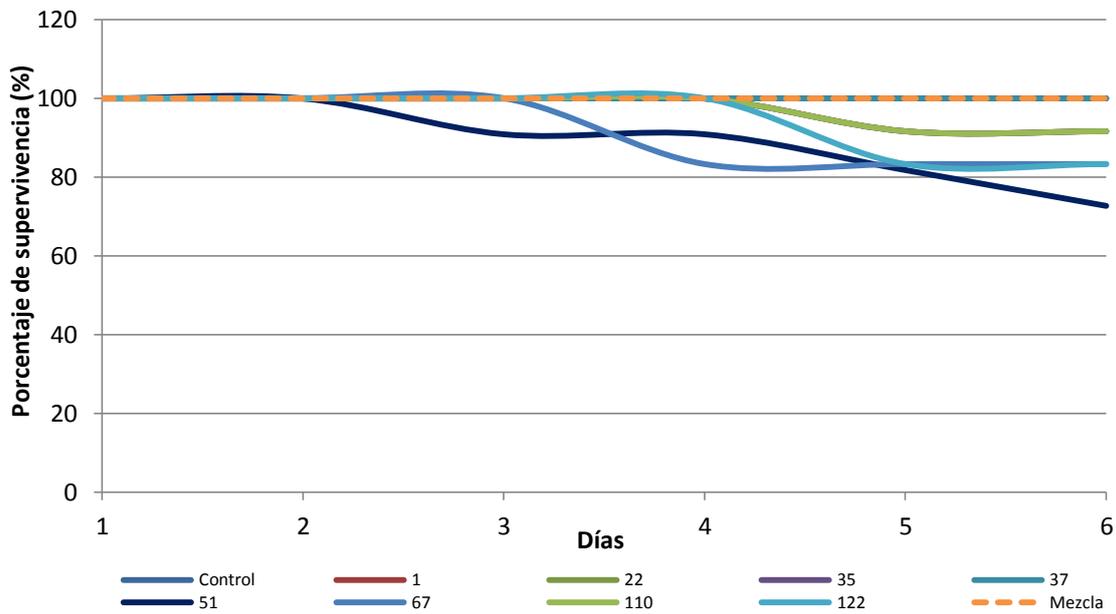


Figura 9.12.- Gráfico de la mortalidad de las larvas que consumieron el alimento larval suplementado con distintos aislamientos o la mezcla, o solo alimento larval (control).

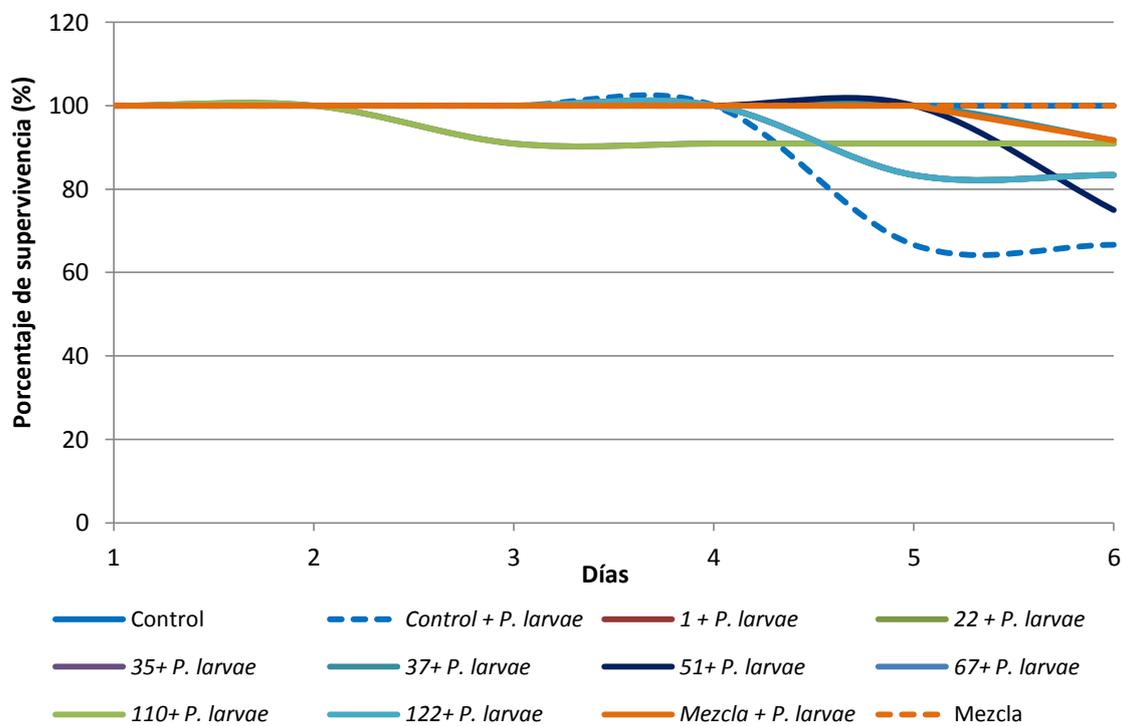


Figura 9.13.- Gráfico de la mortalidad de las larvas que consumieron el alimento larval suplementado con distintos aislamientos o la mezcla de microorganismos probióticos, o solo alimento larval (control) e inoculadas con una suspensión de esporas de *P. larvae*.

### 9.7.- Supervivencia de abejas adultas alimentadas con los potenciales probióticos.

En los ensayos de supervivencia de abejas adultas en condiciones controladas de laboratorio, se administraron los aislamientos potencialmente probióticos y se evaluó la supervivencia de las abejas.

No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de las abejas adultas luego de la administración de jarabe 1:1 suplementado con los potenciales probióticos (de forma individual o la mezcla de 4 *L. kunkeei*) cada dos días durante quince días (Gehan – Breslow,  $p > 0,05$ ) comparado con el grupo control.

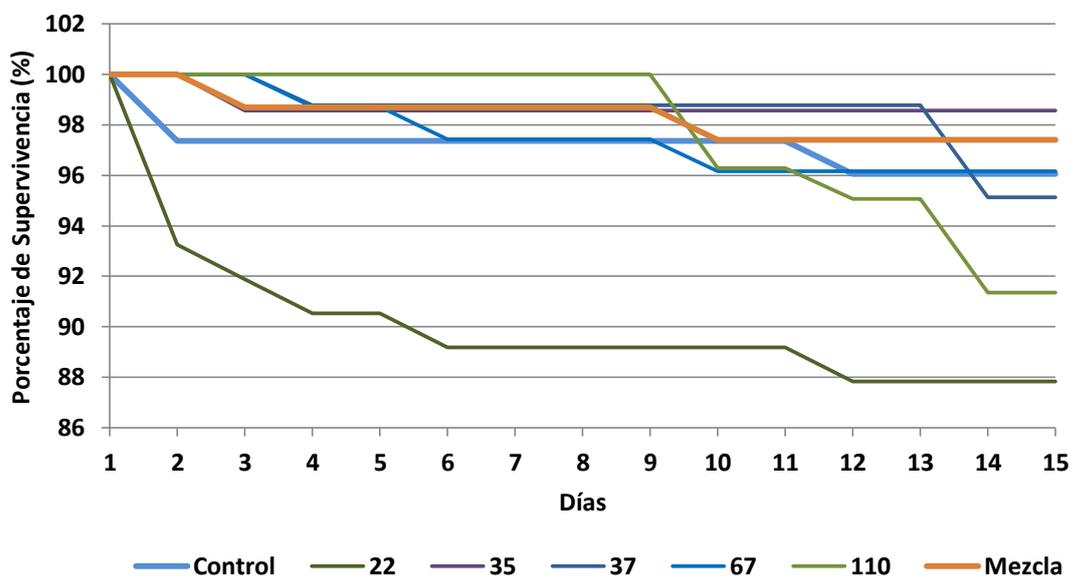


Figura 9.14.- Curvas de mortalidad de las abejas adultas alimentadas con jarabe 1:1 suplementado con distintos aislamientos o la mezcla de *L. kunkeei*. Se utilizaron entre 70 y 82 abejas adultas para cada grupo.

Por otro lado también se evaluó la alimentación individual de las abejas adultas con una sola dosis de 20µl de jarabe 1:1 suplementado con las

diferentes suspensiones bacterianas o la mezcla de cuatro *L. kunkeei*. No se encontraron diferencias significativas entre las abejas alimentados con los potenciales probióticos (de forma individual o la mezcla de 4 *L. kunkeei*) con el control (Gehan - Breslow;  $p > 0,05$  en todos los casos). Estos resultados sugieren que estos microorganismos potencialmente probióticos no alteran la supervivencia de las abejas adultas.

### **9.8.- Capacidad de los aislamientos de prevenir la infección por *N. ceranae* en abejas adultas**

Con el fin de evaluar la posible actividad de los microorganismos potencialmente probióticos sobre el desarrollo de *N. ceranae* se infectaron abejas adultas con esporas de *N. ceranae* tal como se describió en Materiales y Métodos.

La supervivencia de las abejas fue similar tanto en el grupo control (sin infectar) como en los grupos infectados con *N. ceranae* y alimentadas con los aislamientos individuales o la mezcla (Gehan – Breslow,  $p > 0,05$ ). La supervivencia de las abejas infectadas con *N. ceranae* (Control + *N. ceranae*) fue menor que en los otros grupos de abejas, pero esta diferencia no fue significativa (Figura 9.15).

Posteriormente se analizó el desarrollo de este microsporidio en las abejas, mediante conteo de esporas. Ninguna de las abejas pertenecientes al grupo control sin inocular mostró presencia de esporas de *N. ceranae* (Figura

## RESULTADOS

9.16). En cuanto a las abejas infectadas con *N. ceranae*, se encontró que las abejas alimentadas con la mezcla de *L. kunkeei* tenían un número significativamente menor de esporas (Mann-Whitney,  $p = 0,006$ ) que las abejas control (Figura 9.16), sugiriendo que estos microorganismos son capaces de disminuir la multiplicación de *N. ceranae*.

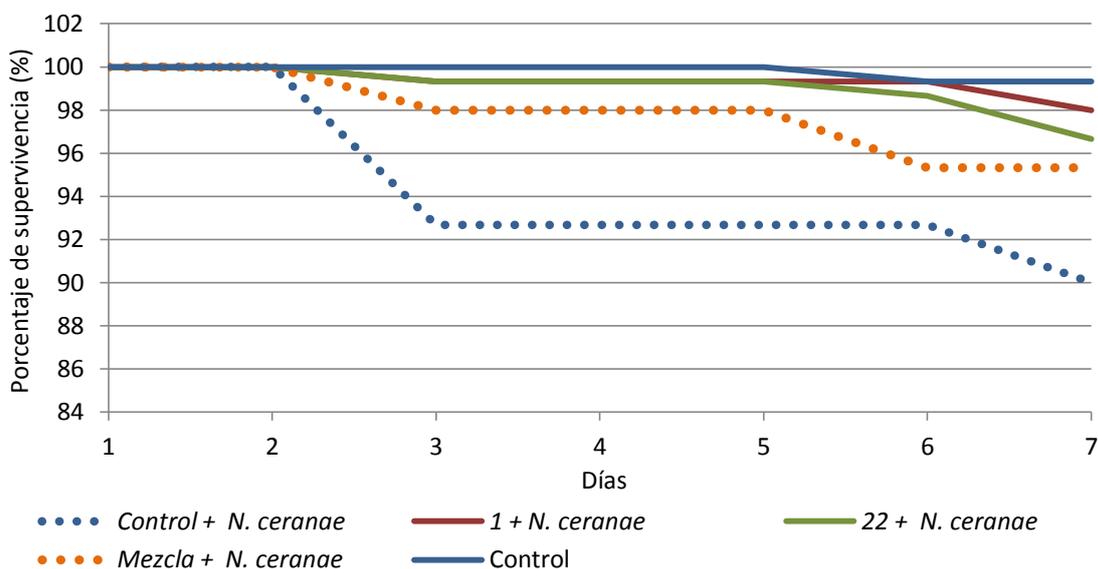


Figura 9.15.- Curvas de mortalidad de las larvas alimentadas con los aislamientos durante 7 días.

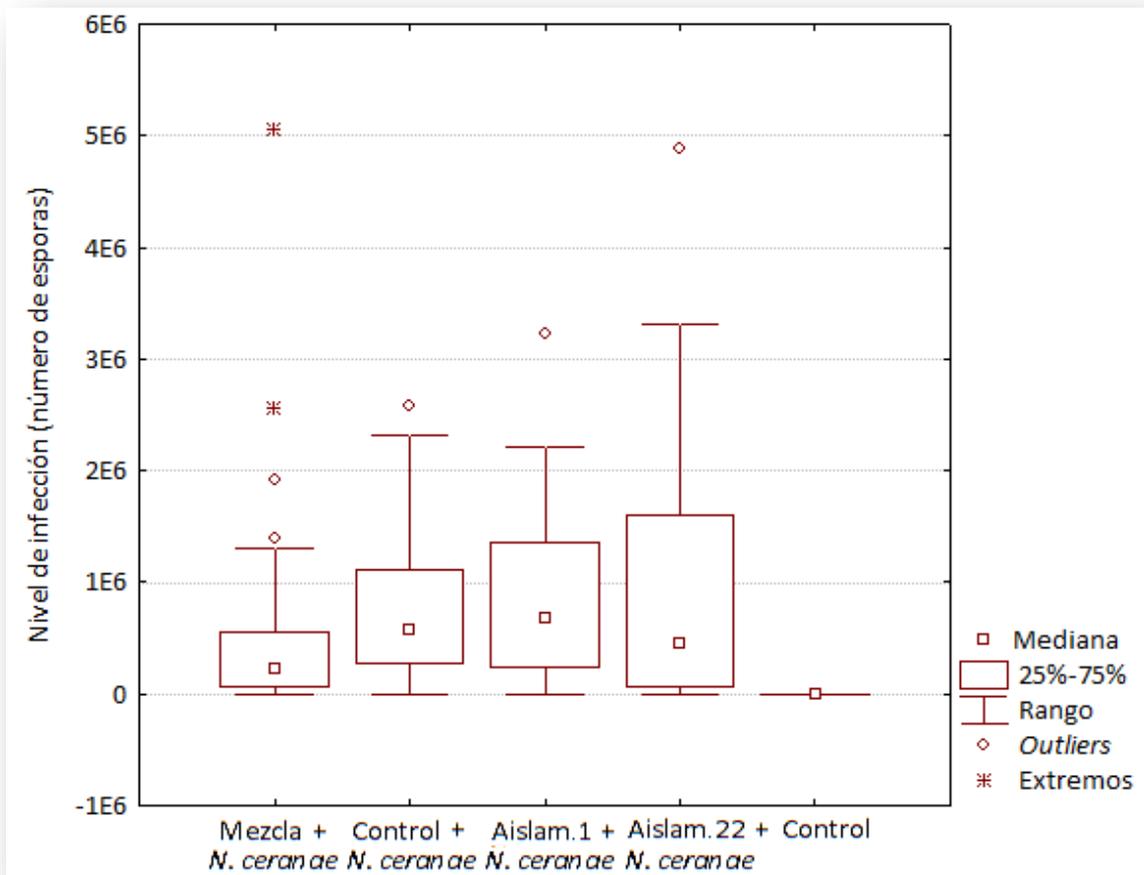


Figura 9.16.- Gráfico tipo *Box plot* del nivel de infección de abejas infectadas con *N. ceranae* y alimentadas con los aislamientos 1, 22 o la mezcla. Se utilizaron 30 abejas por cada grupo.

### 9.9.- Capacidad de los potenciales probióticos de modificar el sistema inmune de abejas adultas

Posteriormente se evaluó si la administración oral de las diferentes suspensiones bacterianas o la mezcla de cuatro *L. kunkeei* afectaba la expresión de los genes involucrados en la inmunidad humoral y celular de las abejas.

Luego de realizar el ensayo, se realizó la extracción de ARNm, se retrotranscribió a ADNc y se amplificaron los distintos genes relacionados con la inmunidad (*abaecina*, *himenoptecina*, *defensina*, *profenol oxidasa*, *glucosa deshidrogenasa*, *lisozima*) y *vitelogenina*, así como los genes de referencia ( $\beta$

*actina* y *rps5*). Los resultados de Cq obtenidos se procesaron de acuerdo a lo descrito por Pfaffl (2001), permitiendo la obtención de valores de expresión relativa de los ARNm que codifican para diferentes proteínas.

En todos los casos se evaluó si existían diferencias significativas en los niveles de expresión de diferentes genes entre las abejas que recibieron microorganismos probióticos y las abejas control, utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney.

En el caso de las abejas alimentadas con jarabe suplementado con las diferentes suspensiones bacterianas, los niveles de expresión de los genes que codifican para la abaecina, himenoptecina y defensina no se modificó con respecto a la del control (Figura 9.17).

## RESULTADOS

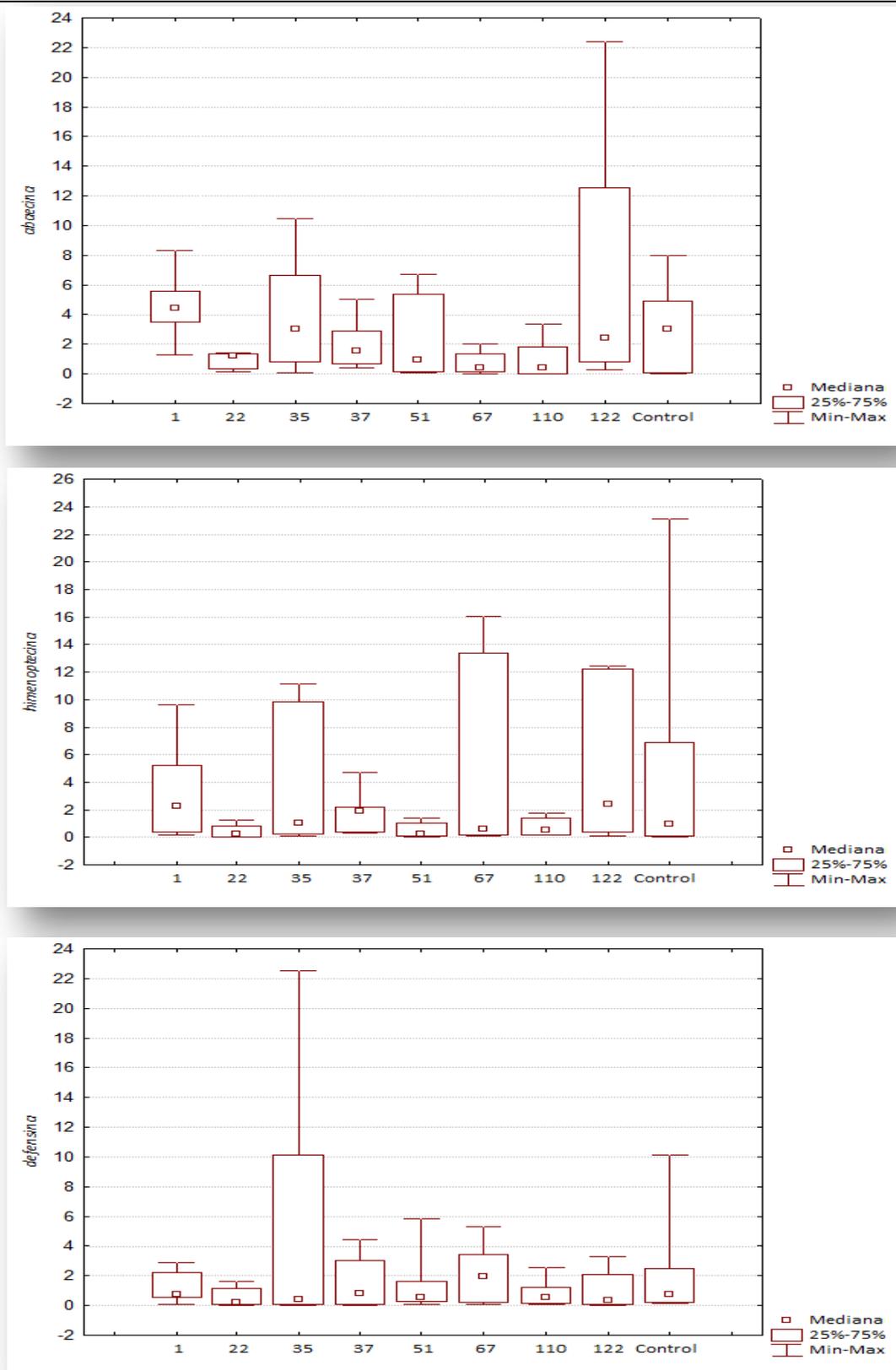


Figura 9.17.- Gráfico tipo *Box plot* de la expresión relativa del ARNm de genes relacionados con la inmunidad en las abejas alimentadas con los distintos aislamientos probióticos. Desde arriba para abajo: abaecina, himenoptecina y defensina.

Los aislamientos 1, 22 y 35 indujeron una disminución significativa del nivel de expresión del gen que codifica para la profenol oxidasa con respecto al control, mientras que los aislamientos 51 y 67 la aumentaron (Figura 9.18).

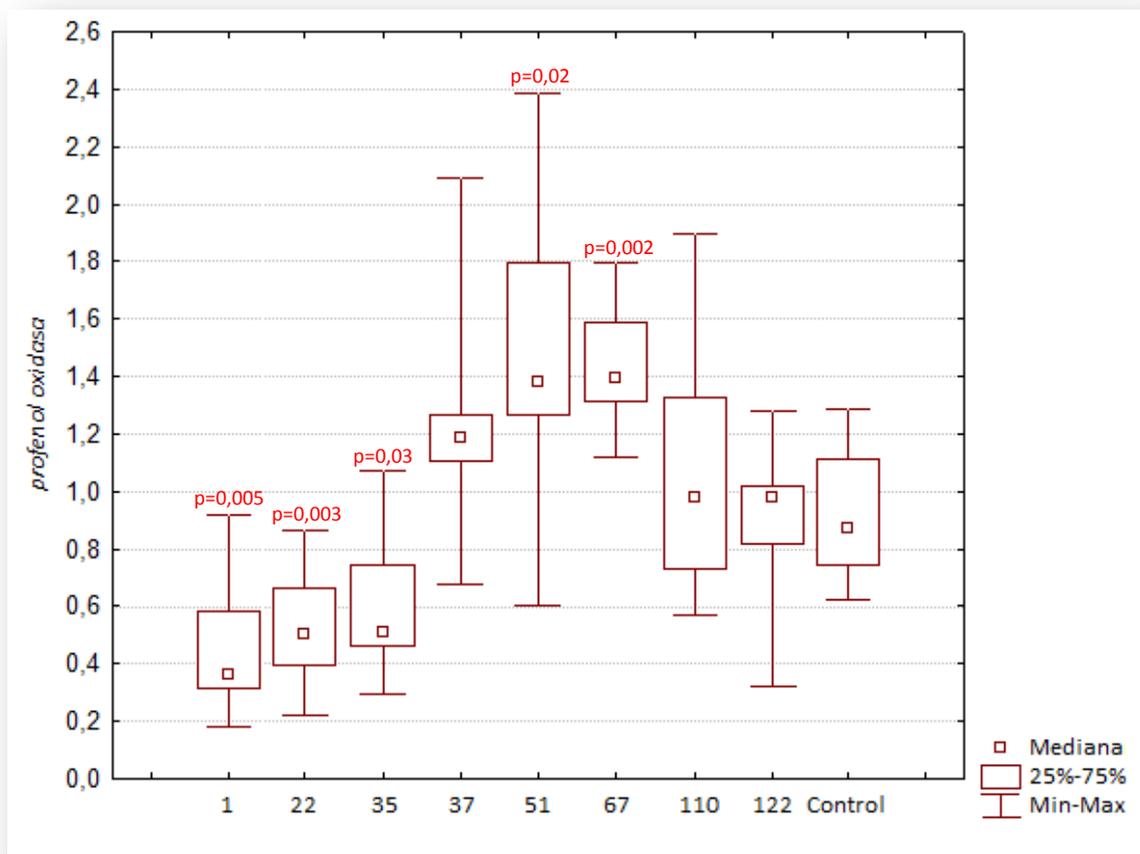


Figura 9.18.- Gráfico tipo *Box plot* de la expresión relativa del ARNm del gen que codifica para la profenol oxidasa en las abejas alimentadas con los distintos aislamientos probióticos.

El aislamiento 51 indujo una disminución significativa del nivel de expresión del gen que codifica para la glucosa deshidrogenasa con respecto al control, mientras que el resto de los aislamientos no modificaron la expresión en comparación con el control (Figura 9.19).

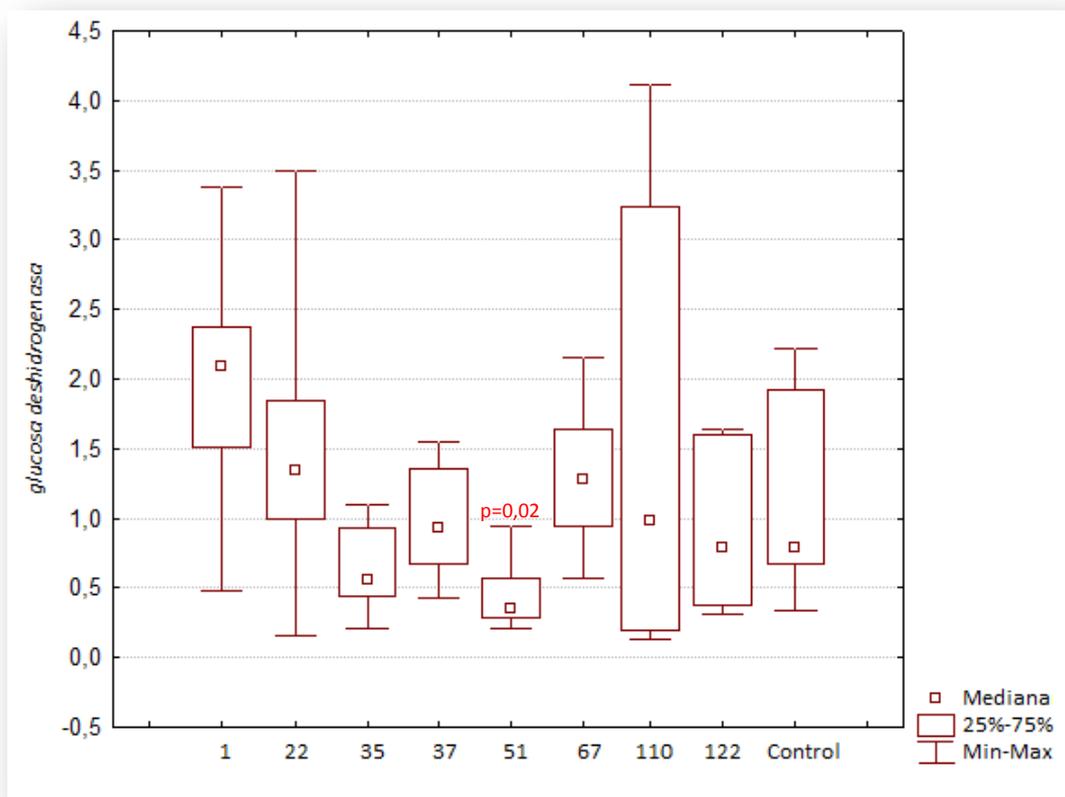


Figura 9.19.- Gráfico tipo *Box plot* de la expresión relativa del ARNm del gen que codifica para la glucosa deshidrogenasa en las abejas alimentadas con los distintos aislamientos probióticos.

## RESULTADOS

Los aislamientos 37 y 67 indujeron una disminución significativa del nivel de expresión del gen que codifica para la lisozima mientras que el resto de los aislamientos no modificaron la expresión en comparación con el control (Figura 9.20).

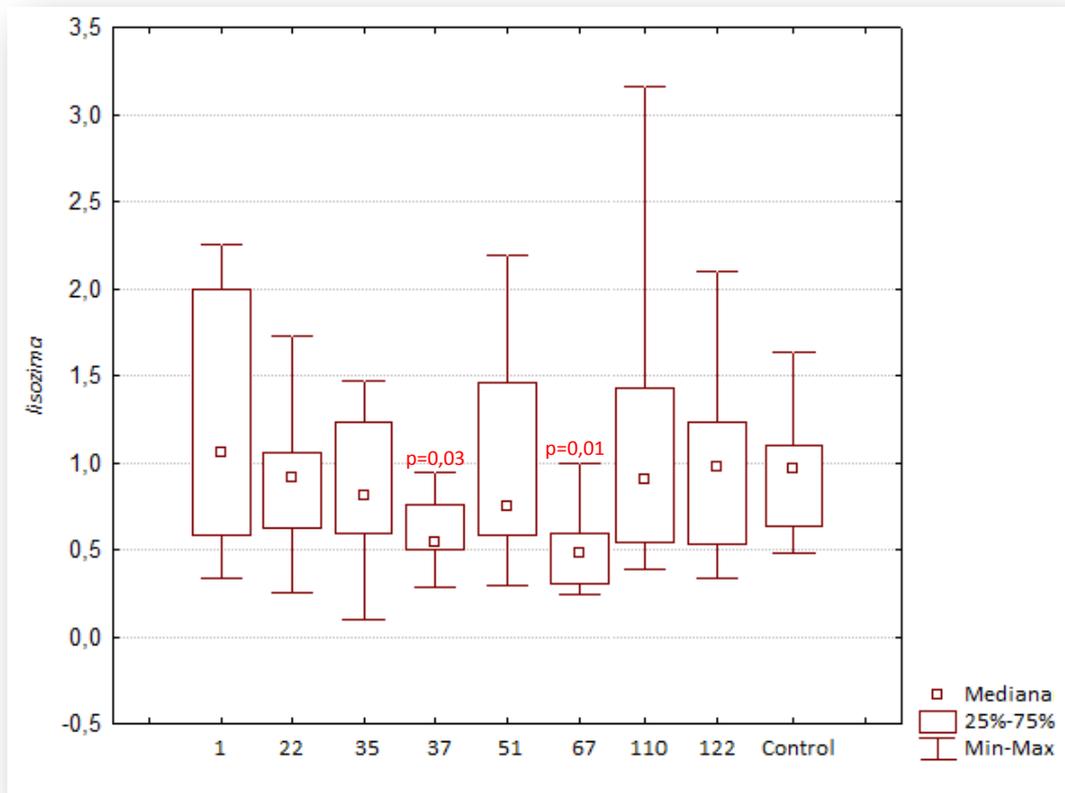


Figura 9.20.- Gráfico tipo *Box plot* de la expresión relativa del ARNm del gen que codifica para la lisozima en las abejas alimentadas con los distintos aislamientos probióticos.

## RESULTADOS

Los aislamientos 22, 35, 37, 51, 67 y 110, indujeron una disminución significativa del nivel de expresión del gen que codifica para la *vitelogenina*, mientras que los aislamientos 1 y 122 no modificaron la expresión en comparación con el control (Figura 9.21).

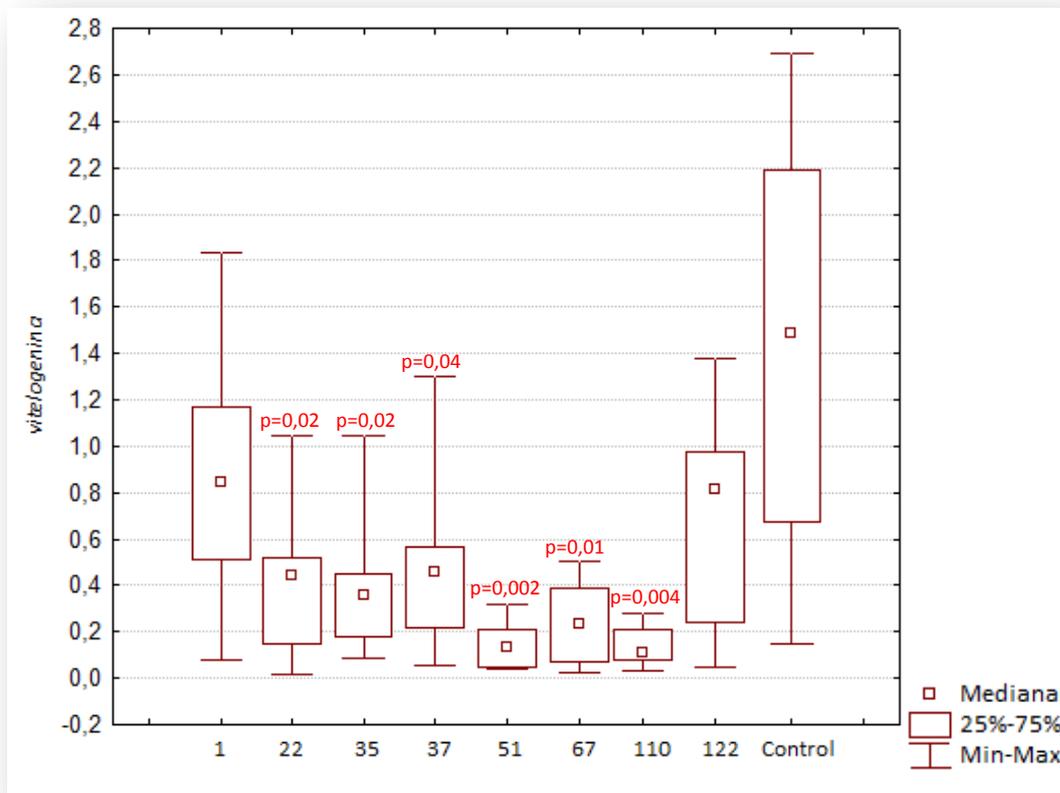


Figura 9.21 Gráfico tipo *Box plot* de la expresión relativa del ARNm del gen que codifica para la vitelogenina en las abejas alimentadas con los distintos aislamientos probióticos.

En el caso de la abejas alimentadas jarabe 1:1 suplementado con la mezcla de *L. kunkeei*, la expresión de los genes estudiados no se vió modificada significativamente con respecto a la expresión de los genes del grupo de abejas control (Figura 9.22).

## RESULTADOS

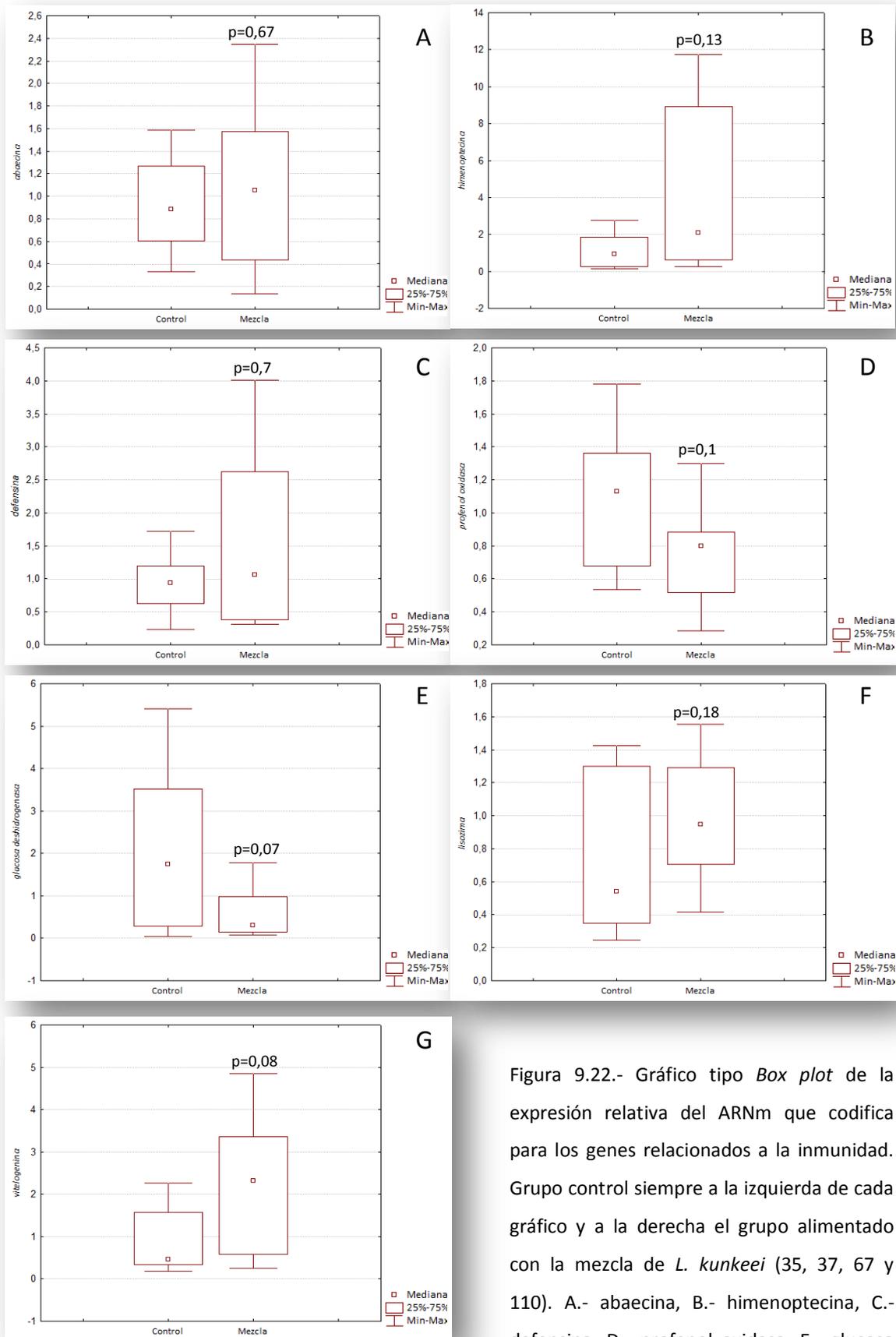


Figura 9.22.- Gráfico tipo *Box plot* de la expresión relativa del ARNm que codifica para los genes relacionados a la inmunidad. Grupo control siempre a la izquierda de cada gráfico y a la derecha el grupo alimentado con la mezcla de *L. kunkeei* (35, 37, 67 y 110). A.- abaecina, B.- himenoptecina, C.- defensina, D.- profenol oxidasa, E.- glucosa deshidrogenasa, F.- lisozima y G.- vitelogenina.

## 10.- Discusión

---

La salud de los animales está fuertemente influenciada por la comunidad microbiana de su intestino, y en el caso de *A. mellifera*, *A. dorsata* y *Bombus* spp. las especies bacterianas predominantes son las pertenecientes al género *Lactobacillus* (Babendreier *et al.*, 2007; Cox-Foster *et al.*, 2007; Engel y Moran, 2013; Martinson *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012; Olofsson y Vasquez, 2008; Tajabadi *et al.*, 2013; Vasquez y Olofsson, 2009).

El género *Lactobacillus* es uno de los géneros más importantes dentro de las bacterias ácido lácticas e incluye actualmente 241 especies incluyendo subespecies (DSMZ, 2015). Se los puede encontrar en distintos hábitats, incluyendo el tracto intestinal de diversas especies animales (Fujisawa y Mitsuoka, 1996; Schrezenmeir y de Vrese, 2001; Tannock, 2004). Los lactobacilos son considerados GRAS (*Generally Recognised As Safe*) y son utilizados en la industria alimentaria como aditivos en la producción de quesos y yogures, para la fermentación de bebidas alcohólicas como el vino y la sidra así como en la preparación de vegetales en conserva (Caplice y Fitzgerald, 1999; Centeno *et al.*, 1996; Rhee *et al.*, 2011; Zacharof *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta los antecedentes previamente mencionados, este estudio se enfocó en la búsqueda e identificación de lactobacilos del tracto intestinal de abejas melíferas con potencial probiótico. Se obtuvieron 151 aislamientos, de los que se seleccionaron 65 al azar y se evaluaron diferentes

## DISCUSIÓN

características, como su capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos, la capacidad de sobrevivir en distintas concentraciones de acidez y a distintas concentraciones de azúcar y temperatura. Estas características varían entre especies bacterianas e incluso entre cepas de una misma especie, por lo que es importante que sean evaluadas de forma individual para cada aislamiento (Jacobsen *et al.*, 1999; Kailasapathy y Chin, 2000; Suzuki *et al.*, 2008).

Luego de la caracterización inicial mediante tinción de Gram, catalasa y oxidasa, el primer atributo evaluado fue la inhibición de *P. larvae in vitro*. Este microorganismo es el agente causal de la Loque Americana, una severa enfermedad que afecta a la cría de las abejas melíferas (Genersch *et al.*, 2006). Debido al carácter altamente infeccioso de este patógeno, ante la aparición de síntomas clínicos la recomendación es quemar la colmena. Esta práctica genera grandes pérdidas económicas a los productores, por lo que es interesante que un futuro probiótico posea la capacidad de inhibir o disminuir su crecimiento. Se ha reportado que determinadas bacterias aisladas del intestino de la abeja, de la colmena o la miel poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de *P. larvae* en ensayos *in vitro* (Alippi y Reynaldi, 2006; Forsgren *et al.*, 2010; Sabate *et al.*, 2009; Yoshiyama *et al.*, 2013). En el presente trabajo se observó que la mayoría de las bacterias del ácido láctico seleccionadas mostraron antagonismo contra *P. larvae*.

La miel y el néctar que consume *A. mellifera* contiene altas concentraciones de azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa, levulosa, dextrosa

## DISCUSIÓN

entre otros). Por otro lado, la forma de administración más práctica de los productos apícolas es por medio del jarabe con azúcar de caña, en concentraciones de 1000 o 2000g/l. Por ambos motivos es importante que los microorganismos a emplear en el diseño de productos en base a probióticos, tengan la capacidad de sobrevivir en estas condiciones. Audisio y Benitez - Ahrendts (2011) evaluaron la supervivencia de una cepa de *Lactobacillus johansonii* a concentraciones de azúcar de 125g/l, 250g/l y 500g/l. Estos autores observaron que la cepa no perdía viabilidad a las 24h al ser incubada en 125 g de azúcar/l, mientras que, en concentraciones de azúcar superiores no había crecimiento (500 g/l) o se veía muy disminuido (250g/l). Máchová *et al.* (1997) analizaron la supervivencia de 5 aislamientos de bacterias del ácido láctico de distintos orígenes en 500g de azúcar/l. Luego de 72h a 28°C observaron que el número de microorganismos se redujo entre uno y dos órdenes de magnitud. En el presente trabajo, se evaluó la supervivencia de los aislamientos a dos concentraciones de azúcar (1000g/l y 2000g/l) y dos temperaturas (28°C y 4°C) y se observó que la mayoría de los aislamientos fueron capaces de sobrevivir a las concentraciones utilizadas. Hay que tener en cuenta que debido a la viscosidad de los jarabes utilizados en estos ensayos, se debe mantener particular cuidado al homogeneizar las suspensiones para que el ensayo sea reproducible. Cabe destacar que no se observaron diferencias en la supervivencia de los microorganismos entre las distintas concentraciones de azúcar, aunque si se observó una mayor supervivencia de los aislamientos

## DISCUSIÓN

incubados durante 72h a 4°C. Esto indicaría que los apicultores podrían preparar el jarabe con el probiótico 3 días antes y almacenarlo a 4°C hasta 3 días antes de utilizarlo.

La vía de administración del probiótico a las abejas será oral, por lo tanto es necesario que los microorganismos que se utilizarán para un futuro probiótico logren sobrevivir durante el paso por el tracto gastrointestinal del hospedero (Reid, 1999). En este caso los probióticos deben sobrevivir a un amplio rango de acidez, desde el néctar y la miel, que poseen un pH de 3,9, al interior de las larvas que puede llegar a tener un pH superior a 7 (Bignell y Heath, 1985; Snowdon y Cliver, 1996). Está descrito que muchas especies de lactobacilos pueden hacer frente a medios ácidos ya que poseen mecanismos que les permiten mantener el pH intracelular cercano a la neutralidad. Un ejemplo de estos mecanismos pueden ser las bombas de protones y las enzimas involucradas en la producción de compuestos alcalinos (Ljungh y Wadström, 2009; Piard y Desmazeaud, 1991, 1992). En este trabajo, gran parte de los aislamientos obtenidos fueron capaces de sobrevivir e incluso multiplicarse luego de 4h de incubación bajo estas condiciones de acidez ( pH3, pH5,y pH7), sugiriendo que podrían resistir el paso por el tracto digestivo y llegar viables al intestino de las larvas y de las abejas adultas.

En estudios previos Tajabadi *et al.* (2011) y Olofsson y Vazquez (2008) reportaron que la especie predominante en *A. mellifera* y *A. dorsata*, es *Lactobacillus kunkeei* y que está presente en el intestino de las abejas sólo

## DISCUSIÓN

durante el verano (Rangberg *et al.*, 2015). Este microorganismo fructofílico (utiliza fructosa antes que glucosa como fuente de carbono) fue aislado por primera vez a partir de jugo de uva destinado a la preparación de vino y se describió como un microorganismo perjudicial para la industria vitivinícola ya que inhibe la fermentación de *Saccharomyces bayanus* y *Saccharomyces cerevisiae*, dos de las levaduras utilizadas para la fermentación del jugo de uva (Huang *et al.*, 1996). Pero para las abejas, la presencia de *L. kunkeei* dentro de la colmena es favorable ya que evita el crecimiento de hongos que pueden fermentar el néctar, permitiendo de esta forma que la miel conserve su características organolépticas y nutricionales (Olofsson y Vasquez 2008; Snowden y Cliver 1996).

Al identificar los aislamientos seleccionados mediante la amplificación y secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S, la mayoría de los aislamientos que en principio fueron identificados como presuntos lactobacilos por sus características fenotípicas, resultaron ser pertenecientes al género *Lactobacillus* y en particular corresponden a la especie *Lactobacillus kunkeei*, coincidiendo con lo descrito por Tajabadi *et al.* (2011) y Olofsson y Vasquez (2008). Otras especies identificadas fueron *Lactobacillus helsingborgensis*, *Acetobacteraceae bacterium* y *Enterococcus faecalis*.

Rangberg *et al.* (2012) describió a *L. kunkeei* como una especie genéticamente heterogénea luego de analizar el contenido plasmídico de 40 cepas de este microorganismo aisladas del intestino de abejas melíferas;

## DISCUSIÓN

observaron una gran variabilidad tanto en el tamaño de los plásmidos como en el número que contenía cada aislamiento (entre 0 y 6). Posteriormente Rangberg *et al.* (2015) estudiaron la capacidad de 8 de esos aislamientos de *L. kunkeei* de ser transformados, encontrando nuevamente diferencias ya que solamente 4 fueron capaces de ser transformados. Cuando en este trabajo se observó que existían diferencias muy notorias en las características fenotípicas de los aislamientos a pesar de haber sido identificados como *L. kunkeei*, se decidió analizar la diversidad genética intraespecífica por medio de *rep*-PCR. Esta técnica permitió comprobar que existe una gran diversidad genética entre los aislamientos seleccionados ya que se obtuvieron diversos patrones de bandas distintos. No fue posible asociar las características fenotípicas observadas a un perfil de bandas determinado.

Este ensayo permitió observar que en una abeja coexisten distintas variantes genéticas de *L. kunkeei* y que la misma variante genética puede estar presente en diferentes abejas melíferas. Sería interesante evaluar el contenido plasmídico de los aislamientos obtenidos para compararlos con los descritos por Rangberg *et al.* (2012, 2015), e incluso con la primer cepa descrita (*L. kunkeei* YH-15; Edwards *et al.*, 1998) y analizar si existe alguna correlación entre la diversidad observada por *rep*-PCR y el número o tamaño de plásmidos encontrados.

En este trabajo se planteó desarrollar una mezcla de microorganismos probióticos para complementar las ventajas brindadas por cada aislamiento

## DISCUSIÓN

individual. Para ello se analizaron los resultados obtenidos y se seleccionaron los 10 aislamientos que resultaron más prometedores desde el punto de vista biológico y biotecnológico. Posteriormente se evaluó la capacidad de los aislamientos de inhibirse entre ellos y se observó que cuatro aislamientos identificados como *L. kunkeei* no inhibían el crecimiento del resto de los microorganismos. Esto sugiere que estos cuatro aislamientos producen algún compuesto difusible capaz de inhibir el crecimiento de *P. larvae*, pero no sería capaz de inhibir el crecimiento de otros aislamientos emparentados. Esto podría ser una ventaja importante, ya que no alteraría la comunidad de BAL presentes naturalmente en el tracto gastrointestinal de las abejas.

Muchos factores pueden estar involucrados la actividad antibacteriana de las BAL, incluyendo metabolitos como el ácido láctico o ácido acético, que son capaces de inhibir el crecimiento de otras bacterias al aumentar la acidez del medio. Las BAL también son capaces de producir peróxido de hidrógeno y bacteriocinas que actúan sobre la membrana plasmática de los otros microorganismos (Ljungh y Wadström, 2009). La producción de esta clase de sustancias es una característica a tener en cuenta al momento de elegir una cepa probiótica ya que puede participar en el control de microorganismos patógenos (O'Sullivan *et al.*, 2005). En este trabajo se encontró que todos los aislamientos seleccionados son productores de ácido láctico y algunos aislamientos producen otros ácidos grasos volátiles. Estos compuestos podrían colaborar en el mantenimiento del alimento y la colmena en general, ya que a

## DISCUSIÓN

modo de ejemplo el ácido acético es utilizado para el control de las larvas y huevos de *Galleria mellonella* (polilla de la cera), que destruyen los cuadros de cera (Charriere e Imdorf, 1999).

Por otro lado luego de analizar el perfil de AGV en el medio de cultivo se encontraron discrepancias con lo descrito por Endo *et al.* (2009; 2012) ya que en los aislamientos identificados como *L. kunkeei* no se obtuvieron cantidades equimolares de ácido láctico y ácido acético, como lo proponía ese autor.

Una vez culminada la etapa de laboratorio, y contando con 10 aislamientos potencialmente probióticos, se realizaron ensayos *in vivo*, en larvas y abejas adultas con el fin de evaluar el efecto de su administración *in vivo*. Tanto los distintos aislamientos individuales como la mezcla de los 4 *L. kunkeei* no causaron efectos deletéreos ni en larvas ni en abejas adultas. Resultados similares fueron reportados por Yoshiyama, *et al.* (2013) al analizar el efecto de BAL aisladas de materiales fermentados sobre la salud de las abejas melíferas. Estos resultados sugieren que la administración de los aislamientos individuales e incluso de la mezcla es segura para la cría y las abejas adultas.

Otra de las características buscadas en un probiótico es la capacidad para modular el sistema inmune. En mamíferos las BAL pueden modular directamente las cascadas de citoquinas y el sistema inmune innato (Yasui *et al.*, 1999).

En este trabajo se observó que la administración de los probióticos individuales en abejas adultas no modificó la expresión de los péptidos

## DISCUSIÓN

antimicrobianos ni de la glucosa deshidrogenasa. Por otro lado se observó que la alimentación con algunos aislamientos disminuyó significativamente los niveles de expresión de (pro)fenol-oxidasas, lisozima y vitelogenina, lo que podría influir negativamente en la defensa contra patógenos. Al repetir el ensayo utilizando la mezcla de microorganismos probióticos, se observó que no se alteró la expresión de estos genes. Esto sugiere que la mezcla de aislamientos de *L. kunkeei* contrarresta el efecto que cada microorganismo produce por separado sobre el sistema inmune de la abeja, y que podría ser administrado en abejas adultas sin tener efectos negativos en su inmunidad.

Como se mencionó anteriormente, la capacidad de la microbiota nativa de proteger al hospedero contra los microorganismos patógenos es dependiente de múltiples factores, y la exclusión competitiva por parte de los microorganismos nativos es una de las principales barreras que posee el intestino (Reid, 1999). Por otra parte, se ha descrito que las esporas de *P. larvae* colonizan el intestino medio de las larvas, siendo éste el paso más importante en la infección (Yue *et al.*, 2008). Por estos motivos el primer requisito para seleccionar los aislamientos fue la capacidad de inhibir el crecimiento de *P. larvae in vitro* e *in vivo*. La administración de la mezcla de *L. kunkeei* logró disminuir la mortalidad de larvas infectadas con *P. larvae*. Este resultado coincide con lo reportado por Forsgren (2010) que al administrar lactobacilos y bifidobacterias en el alimento larval observó una reducción significativa de la infección por *P. larvae*.

## DISCUSIÓN

Por otro lado, la mezcla de *L. kunkeei* también logró disminuir la infección por *N. ceranae*, y mostró una tendencia a reducir la mortalidad de las abejas infectadas con el microsporidio. Este último no pudo ser estadísticamente corroborado ya que el ensayo se llevó a cabo hasta el día 7 post infección y las diferencias en mortalidad se ven en general después de ese día.

Los resultados obtenidos en esta tesis podrían considerarse como prometedores, ya que se logró desarrollar una mezcla de 4 aislamientos de *L. kunkeei* que son capaces de sobrevivir en altas concentraciones de azúcar y acidez, su administración es segura en larvas y abejas adultas, no afectan el sistema inmune y son capaces de inhibir el desarrollo de patógenos como *P. larvae* y *N. ceranae*, logrando mejorar la supervivencia de larvas y abejas adultas.

Los experimentos realizados en este trabajo dan la pauta de que el uso de esta mezcla de 4 aislamientos de *Lactobacillus kunkeei* puede ser efectiva para el control de *Nosema ceranae* y *Paenibacillus larvae*, lo que mejoraría la salud de las abejas melíferas en campo.

## 11.- Conclusiones

---

Se obtuvieron 151 aislamientos a partir de abejas de colmenas históricamente sanas, los que en su mayoría fueron identificados como *Lactobacillus kunkeei*.

A pesar de pertenecer a la misma especie estos aislamientos presentaron diferencias fenotípicas y genotípicas.

Se obtuvo una mezcla de 4 *L. kunkeei* que consiguieron inhibir *in vitro* el crecimiento de *P. larvae*, presentaron una alta supervivencia a distintas condiciones de acidez y de azúcar.

La administración de esta mezcla no afectó la viabilidad de larvas y abejas adultas en condiciones de laboratorio, mejoró la supervivencia de las larvas infectadas con *P. larvae*, consiguió disminuir el número de esporas de *N. ceranae* y no influyó sobre el sistema inmune de las abejas adultas.

Es posible especular que la administración de esta mezcla de 4 *L. kunkeei* tendría efectos benéficos en las colmenas, mejorando la salud de las abejas melíferas.

## 12.- Perspectivas

---

El presente trabajo de tesis abre diversas perspectivas en el campo de los probióticos y la promoción de la salud de las abejas melíferas, en un contexto problemático con respecto a las pérdidas a nivel mundial.

Una posible línea de acción podría radicar en profundizar el análisis genético y de diversidad de los aislamientos candidatos identificados como *L. kunkeei*. Es importante dilucidar las características de cepas que serán, eventualmente, liberadas al ambiente a través de su administración.

Por otra parte, se procurará avanzar en la dilucidación de la respuesta tanto individual como colonial frente a la administración de la mezcla de *L. kunkeei*. En este sentido se evaluará en ensayos de laboratorio la respuesta de algunos genes relacionados a la inmunidad de larvas y abejas adultas luego de la infección con *P. larvae* y *N. ceranae* respectivamente. Posteriormente se aplicará esta mezcla de *L. kunkeei* en colmenas en el campo y se evaluará el efecto sobre la fortaleza, producción y la prevalencia de patógenos en las colmenas.

## 13.- Bibliografía

---

Abrol, D.P., 2011, Pollination biology: biodiversity conservation and agricultural production. Springer Science & Business Media.

Alippi, A.M., Reynaldi, F.J., 2006, Inhibition of the growth of *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. *Journal of Invertebrate Pathology* 91, 141-147.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.

Amdam, G.V., 2011, Social context, stress, and plasticity of aging. *Aging Cell* 10, 18-27.

Amdam, G.V., Fennern, E., Havukainen, H., 2012, Vitellogenin in honey bee behavior and lifespan, In: *Honeybee Neurobiology and Behavior*. Springer, 17-29.

Amdam, G.V., Simões, Z.L., Hagen, A., Norberg, K., Schroeder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T.B.L., Omholt, S.W., 2004, Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental gerontology* 39, 767-773.

Anido, M., 2013. Epidemiología de los principales patógenos de interés apícola en Uruguay. PEDECIBA. Uruguay.

Antúnez, K., 2009. Una aproximación a la patogenicidad de *Paenibacillus larvae* en larvas de abejas melíferas. PEDECIBA. Uruguay.

Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campá, J., Zunino, P., 2012, American Foulbrood in Uruguay: twelve years from its first report. *Journal of Invertebrate Pathology* 110, 129-131.

## BIBLIOGRAFIA

Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campá, J., Invernizzi, C., Martin-Hernandez, R., Higes, M., Zunino, P. 2013. Despoblación de colmenas: determinación de sus causas en Uruguay. INIA Serie de difusión N°41

Antúnez, K., D' Alessandro, B., Corbella, E., Zunino, P., 2005, Detection of chronic bee paralysis virus and acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology* 90, 69-72.

Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G., Zunino, P., 2006, Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology* 93, 67-70.

Antúnez, K., D'Alessandro, B., Piccini, C., Corbella, E., Zunino, P., 2004, *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. *Journal of Invertebrate Pathology* 86, 56-58.

Antúnez, K., Invernizzi, C., Zunino, P., 2012b, Why massive honeybee losses do not occur in Uruguay? , In: *Bees: Biology, Threats and Colonies* Nova Science, 7 10.

Antúnez, K., Martin-Hernandez, 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, 2284-2290.

Antúnez, K., Piccini, C., Castro-Sowinski, S., Rosado, A.S., Seldin, L., Zunino, P., 2007, Phenotypic and genotypic characterization of *Paenibacillus larvae* isolates. *Veterinary Microbiology* 124, 178-183.

Arredondo, D., 2010. Estudio de la interacción hospedero- patógeno (*Paenibacillus larvae*) mediante técnicas de fluorescencia. Universidad de la República, Uruguay.

Arrese, E.L., Soulages, J.L., 2010, Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual review of entomology* 55, 207.

Audisio, M.C., Benitez-Ahrendts, M.R., 2011, *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. *Beneficial microbes* 2, 29-34.

## BIBLIOGRAFIA

azzaq Belaouaj, A., Kim, K., Shapiro, S.D., 2000, Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* 289, 1185-1187.

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, 600-610.

Bailey L. & Ball B. V. 1991. Honey bee pathology. Academic Press. 193 p.

Batra, S., W.T., 1995, Bees and pollination in our changing environment. *Apidologie* 26, 361-370.

Bignell, D.E., Heath, L.A.F., 1985, Electropositive redox state of the fifth-instar larval gut of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*.

Bradbear, N., 2004, La apicultura and los medios de vida sostenibles, Vol 1. FAO.

Brodsgaard, C., Ritter, W., Hansen, H., 1998, Response of in vitro reared honey bee larvae to various doses of *Paenibacillus* larvae spores. *Apidologie* 29, 569-578.

Campa, J., Harriet, J., Coll, F., Roth, R., Bonunous, C., Roth, F., 2007b, Control de varroa. Evaluación de productos orgánicos y de síntesis. *Jornada de Manejo Sanitario en Apicultura* 500, 13-20.

Campa, J., Harriet, J., Mendoza, Y. 2007a. Pautas sanitarias para manejar correctamente la Varroasis.

Caplice, E., Fitzgerald, G.F., 1999, Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50, 131-149.

Casteels-Josson, K., Capaci, T., Casteels, P., Tempst, P., 1993, Apidaecin multipetide precursor structure: a putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response. *The EMBO journal* 12, 1569-1578.

Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., Tempst, P., 1989, Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO journal* 8, 2387.

## BIBLIOGRAFIA

Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Van Damme, J., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F., Tempst, P., 1990, Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry* 187, 381-387.

Centeno, J.A., Menéndez, S., Rodríguez-Otero, J.L., 1996, Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology* 33, 307-313.

Cordara, J.J. 2010. *Apicultura: La primer colonia de abejas*. 1 -21.

Corona, M., Velarde, R.A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K.A., Robinson, G.E., 2007, Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 7128-7133.

Cox-Foster, D., vanEngelsdorp, D., 2009, Saving the honeybee. *Scientific American Magazine* 300, 40-47.

Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P.L., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalkstein, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I., 2007, A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318, 283-287.

Crailsheim, K., Riessberger-Gallé, U., 2001, Honey bee age- dependent resistance against American Foulbrood. *Apidologie* 32.

Crane, E., 1999, *The world history of beekeeping and honey hunting*. Duckworth, London.

Cross, M.L., 2002, Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Medical Microbiology and Immunology* 34, 245-253.

Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J.D., Pettis, J.S., 2012, Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis*

## BIBLIOGRAFIA

*mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. Journal of Insect Physiology 58, 1090-1097.

Charriere, J.D., Imdorf, A., 1999, Protection of honey combs from wax moth damage. American Bee Journal.

Cherif, A., Rezgui, W., Raddadi, N., Daffonchio, D., Boudabous, A., 2008, Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. Entomocidus HD110. Microbiological Research 163, 684-692.

Daffre, S., Kylsten, P., Samakovlis, C., Hultmark, D., 1994, The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. Molecular and General Genetics MGG 242, 152-162.

Dedej, S., Delaplane, K.S., 2003, Honey bee (Hymenoptera: Apidae) pollination of rabbiteye blueberry *Vaccinium ashei* var. 'Climax' is pollinator density-dependent. Journal of Economic Entomology 96, 1215-1220.

Douglas, A.E., 1998, Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria Buchnera. Annual Review of Entomology 43, 17-37.

DSMZ 2015. Bacterial Nomenclature Up-to-Date, Genus: *Lactobacillus*. [http://www.dsmz.de/microorganisms/pnu/bacterial\\_nomenclature\\_info\\_mm.php?genus=Lactobacillus](http://www.dsmz.de/microorganisms/pnu/bacterial_nomenclature_info_mm.php?genus=Lactobacillus)

Ducatelle, R., Eeckhaut, V., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., 2015, A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: present status and future perspectives. Animal 9, 43-48.

Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K., 1999, Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. Antonie Van Leeuwenhoek 76, 279-292.

## BIBLIOGRAFIA

Edwards, C.G., Haag, K.M., Collins, M.D., Hutson, R.A., Huang, Y.C., 1998, *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associated with grape juice fermentations. *Journal of applied microbiology* 84, 698-702.

Endo, A., Futagawa-Endo, Y., Dicks, L.M., 2009, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* diversity in horse feces, revealed by PCR-DGGE. *Current Microbiology* 59, 651-657.

Endo, H., Tamura, K., Fukasawa, T., Kanegae, M., Koga, J., 2012, Comparison of fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus* and *Bacteroides* species. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 76, 176-179.

Engel, P., Moran, N.A., 2013, Functional and evolutionary insights into the simple yet specific gut microbiota of the honey bee from metagenomic analysis. *Gut Microbes* 4, 60-67.

Ernst, O., Mazzilli, S., Kemanian, A., 2013. Zonas agrícolas en expansión: desarrollo de herramientas para un manejo sustentable de los sistemas de producción. INIA Serie de difusión N°50

Errea, E., Licandro, H., 2009, Apicultura: situación y perspectivas. *Anuario OPYPA*, 113-118.

Evans, J.D., 2004, Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 85, 105-111.

Evans, J.D., 2006, Beepath: an ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Journal of Invertebrate Pathology* 93, 135-139.

Evans, J.D., Armstrong, T.N., 2006, Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecology* 6, 4.

Evans, J.D., Aronstein, K., Chen, Y.P., Hetru, C., Imler, J.L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G.J., Zou, Z., Hultmark, D., 2006, Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* 15, 645-657.

## BIBLIOGRAFIA

Evans, J.D., Lopez, D.L., 2004, Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 97, 752-757.

Evans, J.D., Schwarz, R.S., 2011, Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiology* 19, 614-620.

Evans, J.D., Spivak, M., 2010, Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 103 Suppl 1, 62-72.

Feldhaar, H., Gross, R., 2009, Insects as hosts for mutualistic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology* 299, 1-8.

Forsgren, E., Olofsson, T.C., Vásquez, A., Fries, I., 2010, Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie* 41, 99-108.

Fries I. 1997. Protozoa. En: Morse R. A. & Flottum K. (Eds.). *Honey Bee Pests Predators and Diseases*. Medina, Ohio, USA. A.I. Root Company. 59–76.

Fries I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*. 103, S73–S79.

Fries, I., Chauzat, M.P., Chen, Y., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D.P., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., 2013, Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research* 52, 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, 356-367.

Fujisawa, T., Mitsuoka, T., 1996, Homofermentative *Lactobacillus* species predominantly isolated from canine feces. *Journal of Veterinary Medical Science* 58, 591-593.

## BIBLIOGRAFIA

Gallai, N., Salles, J.-M., Settele, J., Vaissière, B.E., 2009, Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics* 68, 810-821.

Genersch, E., Aubert, M., 2010, Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary Research* 41, 54.

Genersch, E., Forsgren, E., Pentikainen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., Fries, I., 2006, Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 501-511.

Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R., 1994, *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Gibson, C.M., Hunter, M.S., 2010, Extraordinarily widespread and fantastically complex: comparative biology of endosymbiotic bacterial and fungal mutualists of insects. *Ecology Letters* 13 223–234.

Gill, S.R., Pop, M., DeBoy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P.J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C.M., Nelson, K.E., 2006, Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science* 312, 1355-1359.

Gillespie, J.P., Jeremy, P., Kanost, M.R., Trenczek, T., 1997, Biological mediators of insect immunity. *Annual review of entomology* 42, 611-643.

Gilliam, M., 1971, Microbial sterility of the intestinal content of the immature honey bee, *Apis mellifera*. *Annals of the Entomological Society of America* 64, 315-317.

Gilliam, M., 1997, Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters* 155, 1-10.

## BIBLIOGRAFIA

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, 50-54.

Gilliam, M., Prest, D.B., 1987, Microbiology of feces of the larval honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 49, 70-77.

Gilliam, M., Taber, S., 3rd, Lorenz, B.J., Prest, D.B., 1988, Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascosphaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 52, 314-327.

Gisder, S., Möckel, N., Linde, A., Genersch, E., 2011, A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. *Environmental Microbiology* 13, 404-413.

Glinski, Z., Jarosz, J., 2001, Infection and immunity in the honey bee *Apis mellifera*. *Apiacta* 36, 12–24.

Goodwin, R.M., Perry, J.H., Ten Houten, A., 1994, The effect of drifting honey bees on the spread of American foulbrood infections. *Journal of Apicultural Research* 33, 209-212.

Haag, K.L., Traunecker, E., Ebert, D., 2013, Single-nucleotide polymorphisms of two closely related microsporidian parasites suggest a clonal population expansion after the last glaciation. *Molecular ecology* 22, 314-327.

Hamdi, C., Balloi, A., Essanaa, J., Crotti, E., Gonella, E., Raddadi, N., Ricci, I., Boudabous, A., Borin, S., Manino, A., Bandi, C., Alma, A., Daffonchio, D., Cherif, A., 2011, Gut microbiome dysbiosis and honeybee health. *Journal of Applied Entomology* 135, 524-533.

Hansen, H., Brodsgaard, C.J., 1999, American foulbrood: A review of its biology, diagnosis and control. *Bee World* 80, 5-23.

## BIBLIOGRAFIA

Havukainen, H., Halskau, Ø., Amdam, G.V., 2011, Social pleiotropy and the molecular evolution of honey bee vitellogenin. *Molecular ecology* 20, 5111-5113.

Higes, M., Martín, R., Meana, A., 2006, *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe *Journal of Invertebrate Pathology* 92, 93–95.

Higes M., Martín-Hernández R. & Meana A. 2010. *Nosema ceranae* in Europe: An emergent type C nosemosis. *Apidologie*. 41, 375–392.

Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., Martín-Hernández, R., 2013, *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental microbiology reports* 5, 17-29.

Hoffmann, J.A., 2003, The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33-38.

Hornitzky, M.A.Z., Karlovskis, S., 1989, A culture technique for the detection of *Bacillus larvae* in honey bees. *Journal of Apicultural Research* 28, 118-120.

Hornitzky, M.A.Z., Nicholls, P.J., 1993, J medium is superior to Sheep Blood Agar and Brain Heart Infusion for the isolation of *Bacillus larvae* from honey samples. *Journal of Apicultural Research* 32, 51-52.

Hornitzky, M.A.Z., 1998, The pathogenicity of *Paenibacillus larvae* subsp. larvae spores and vegetative cells to honey bee (*Apis mellifera*) colonies and their susceptibility to royal jelly. *Journal of Apicultural Research* 37, 267-271.

Huang, Y.-C., Edwards, C.G., Peterson, J.C., Haag, K.M., 1996, Relationship between sluggish fermentations and the antagonism of yeast by lactic acid bacteria. *American Journal of Enology and Viticulture* 47, 1-10.

Human, H., Brodschneider, R., Diemann, V., Dively, G., Ellis, J.D., Forsgren, E., Fries, I., Hatjina, F., Hu, F., Jaffé, R., 2013, Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research & Bee World* 52.

## BIBLIOGRAFIA

Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I.H., Harriet, J., Ramallo, G., Campa, J., Katz, H., Gardiol, G., Mendoza, Y., 2009, Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology* 101, 150-153.

Invernizzi, C., Antúnez, K., Campa, J., Harriet, J., Mendoza, Y., Santos, E., Zunino, P., 2011, Situación sanitaria de las abejas melíferas en Uruguay. *Veterinaria* 181, 15-28.

Jacobsen, C., Rosenfeldt, N., Hayford, A., Moller, P., Michaelsen, K., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M., Jakobsen, M., 1999, Screening of probiotics activities of forty seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4949-4957.

Jean-Prost, P., 2007, *Apicultura: conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena.* Mundi-Prensa Libros.

Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R.E., 2006, Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 19, 491-511.

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, 96-103.

Kailasapathy, K., Chin, J., 2000, Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology* 78, 80-88.

Keeling, P., Fast, N., 2002, Microsporidia: Biology and Evolution of Highly Reduced Intracellular Parasites. *Annual Review of Microbiology* 56, 93-116.

Keller, I., Fluri, P., Imdorf, A., 2005, Pollen nutrition and colony development in honey bees: part I. *Bee World* 86, 3-10.

Klaenhammer, T.R., Kullen, M.J., 1999, Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 50, 45-57.

## BIBLIOGRAFIA

Klein, A.M., Vaissiere, 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, 303-313.

Lane, D.J., 1991, 16S/23S rRNA sequencing In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. E. Stackebrandt & M. Goodfellow, New York: Wiley, 115-177.

Langstroth, L.L., 1857, *A Practical Treatise on the Hive and Honey-bee*. CM Saxton & Company.

Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002, Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect biochemistry and molecular biology* 32, 1295-1309.

Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007, The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* 25, 697-743.

Li, Z., Zhang, S., Zhang, J., Liu, M., Liu, Z., 2009, Vitellogenin is a cidal factor capable of killing bacteria via interaction with lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Molecular immunology* 46, 3232-3239.

Lindström, A., Korpela, S., Fries, I., 2008, Horizontal transmission of *Paenibacillus larvae* spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing. *Apidologie* 39, 515-522.

Ljungh, Å., Wadström, T., 2009, *Lactobacillus* molecular biology: from genomics to probiotics. Horizon Scientific Press.

López, A., Sotomayor, C., 1992, La polinización de frutales en Chile: Una actividad clave que debe ser profesionalizada. *Chile Agrícola* 17 270 - 272.

Lovallo, N., Cox-Foster, D.L., 1999, Alteration in FAD-glucose dehydrogenase activity and hemocyte behavior contribute to initial disruption of *Manduca sexta* immune response to *Cotesia congregata* parasitoids. *Journal of Insect Physiology* 45, 1037-1048.

Máchova, M., Rada, V., Huk, J., 1997, Development of probiotics for bees. *Apiacta* 4, 99-111.

## BIBLIOGRAFIA

Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker Jr, C.T., Saxman, P.R., Farris, R.J., Garrity, G.M., Olsen, G.J., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M., 2001, The RDP-II (ribosomal database project). *Nucleic Acids Research* 29, 173-174.

Martinson, V.G., Danforth, B.N., Minckley, R.L., Rueppell, O., Tingek, S., Moran, N.A., 2011, A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology* 20, 619-628.

McFrederick, Q.S., Wcislo, W.T., Taylor, D.R., Ishak, H.D., Dowd, S.E., Mueller, U.G., 2012, Environment or kin: whence do bees obtain acidophilic bacteria? *Molecular ecology* 21, 1754-1768.

Mendoza, Y., 2012. Resistencia de las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) frente al microsporidio *Nosema ceranae* en forestaciones de *Eucalyptus grandis*. Tesis de maestría en ciencias agrarias. PEDECIBA, Uruguay.

Mendoza, Y., Harriet, J., Campa, J., Katz, H., Ramallo, G., Díaz-Cetti, S., Invernizzi, C., 2013, Control de *Nosema ceranae* en colonias de abejas (*Apis mellifera*) en forestaciones de *Eucalyptus grandis*. *Agrociencia Uruguay* 17, 108-113.

Mendoza, Y., Ramallo, G., Díaz-Cetti, S., Ojeda, M.P., Carrasco-Letelier, L. 2008. Factores predisponentes, pautas sanitarias y medidas de control que se deben integrar para manejar el control de la varroasis. Serie de Actividades de Difusión (INIA la estanzuela), p. 4.

Mendoza, Y., Santos, E., Rodríguez, V., 2010, ¿Es factible realizar apicultura en cultivos de soja? Congreso Nacional de Apicultura. Sarandí Grande, Uruguay.

MGAP, 2010.

<http://www.mgap.gub.uy/dgsg/PNRB/Marco%20Legal/Decreto%20Oxitetraciclina%202014.06.10.pdf>

Michener, C.D., 1974, The social behavior of the bees: a comparative study, Vol 73. Harvard University Press.

## BIBLIOGRAFIA

Mitsuoka, T., 1992, The human intestinal tract. In: The Lactic Acid Bacteria: Volume I, The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease Essex, England.

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, 258-272.

Moran, N.A., Hansen, A.K., Powell, J.E., Sabree, Z.L., 2012, Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS One* 7, e36393.

Moran, N.A., Telang, A., 1998, Bacteriocyte-associated symbionts of insects: a variety of insect groups harbor ancient prokaryotic endosymbionts. *Bioscience* 48, 295-304.

Morse, R.A., Calderone, N.W., 2000, The value of honey bee pollination the United States. *Bee Culture* 128.

Mrazek, J., Strosova, L., Fliegerova, K., Kott, T., Kopecny, J., 2008, Diversity of insect intestinal microflora. *Folia Microbiologica* 53, 229-233.

Muyzer G, de Wall EC, Uitterlinden QG. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695–700.

Naug, D., 2009, Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation* 142, 2369–2372.

Nelson, C.M., Ihle, K.E., Fondrk, M.K., Page, R.E., Amdam, G.V., 2007, The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biology* 5, e62.

O'Sullivan, G.C., Kelly, P., O'Halloran, S., Collins, C., Collins, J.K., Dunne, C., Shanahan, F., 2005, Probiotics: an emerging therapy. *Current Pharmaceutical Design* 11, 3-10.

## BIBLIOGRAFIA

OIE, 2004a, Varroosis. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A\\_00124.htm](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00124.htm).

OIE, 2004b, Nosemosis of bees. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A\\_00123.htm](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00123.htm).

Olofsson, T.C., Vasquez, A., 2008, Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current Microbiology* 57, 356-363.

Osta, M.A., Christophides, G.K., Vlachou, D., Kafatos, F.C., 2004, Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *Journal of experimental biology* 207, 2551-2563.

Parrott, T.D., Rehberger, T.G., Owens, F.N., 1997. Selection of *Propionibacterium* strains capable of utilizing lactic acid from in vitro models. Oklahoma State University,

Pascual Anderson, M.d.R., Calderón y Pascual, V., 2000, *Microbiología alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas*, 2ª Edition. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.

Pfaffl, M.W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29, e45-e47.

Piard, J.C., Desmazeaud, M., 1991, Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Le lait* 71, 525-541.

Piard, J.C., Desmazeaud, M., 1992, Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Le lait* 72, 113-142.

Piccini, C., Zunino, P., 2001, American foulbrood in Uruguay: isolation of *Paenibacillus larvae* larvae from larvae with clinical symptoms and adult honeybees and susceptibility to oxytetracycline. *Journal of Invertebrate Pathology* 78, 176-177.

## BIBLIOGRAFIA

Porrini, M.P., Audisio, M.C., Sabaté, D.C., Ibarguren, C., Medici, S.K., Sarlo, E.G., Garrido, P.M., Eguaras, M.J., 2010, Effect of bacterial metabolites on microsporidian *Nosema ceranae* and on its host *Apis mellifera*. *Parasitology Research* 107, 381-388.

Qu, N., Jiang, J., Sun, L., Lai, C., Wu, X., 2008, Proteomic characterization of royal jelly proteins in Chinese (*Apis cerana cerana*) and European (*Apis mellifera*) honeybees. *Biochemistry (Mosc)* 73, 676-680.

Rangberg, A., Diep, D.B., Rudi, K., Amdam, G.V., 2012, Paratransgenesis: an approach to improve colony health and molecular insight in honey bees (*Apis mellifera*). *Integrative and comparative biology* 52, 89-99.

Rangberg, A., Mathiesen, G., Amdam, G.V., Diep, D.B., 2015, The paratransgenic potential of *Lactobacillus kunkeei* in the honey bee *Apis mellifera*. *Beneficial Microbes*, 1-11.

Reid, G., 1999, The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environmental Microbiology* 65, 3763-3767.

Rhee, S.J., Lee, J., Lee, C., 2011, Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *Microbial Cell Factories* 10, S7.

Rinderer, T.E., 1976, Honey bees: individual feeding of large numbers of adult workers. *Journal of economic entomology* 69, 489-491.

Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010, Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103 Suppl 1, S96-119.

Sabate, D.C., Carrillo, L., Audisio, M.C., 2009, Inhibition of *Paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples. *Research in Microbiology* 160, 193-199.

Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Mattila-Sandholm, T., 1998, Demonstration of safety of probiotics -- a review. *International Journal of Food Microbiology* 44, 93-107.

## BIBLIOGRAFIA

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, NY.

Santos, E., Mendoza, Y., Díaz, R., Harriet, J., Campá, J., 2009, Valor económico de la polinización realizada por las abejas *Apis mellífera* en Uruguay, una aproximación. Serie de Actividades de Difusión, INIA 568, 25-28.

Sartor, R.B., 2004, Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 126, 1620-1633.

Sartor, R.B., 2008, Therapeutic correction of bacterial dysbiosis discovered by molecular techniques. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 16413-16414.

Schmid-Hempel, P., 1998, Parasites in social insects. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

Schmid, A., Collomb, M., Bee, G., Butikofer, U., Wechsler, D., Eberhard, P., Sieber, R., 2008, Effect of dietary alpine butter rich in conjugated linoleic acid on milk fat composition of lactating sows. *British Journal of Nutrition* 100, 54-60.

Schrezenmeir, J., de Vrese, M., 2001, Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American journal of clinical nutrition* 73, 361s-364s.

Seehuus, S.C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., Amdam, G.V., 2006, Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 103, 962-967.

Simó, E., 2002, Las abejas de miel y la polinización. *Método*, 33.

Snowdon, J.A., Cliver, D.O., 1996, Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology* 31, 1-27.

Starks, P.T., Blackie, C.A., Thomas D Seeley, P.T., 2000, Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften* 87, 229-231.

## BIBLIOGRAFIA

Suzuki, C., Kimoto-Nira, H., Kobayashi, M., Nomura, M., Sasaki, K., Mizumachi, K., 2008, Immunomodulatory and cytotoxic effects of various *Lactococcus* strains on the murine macrophage cell line J774. 1. *International Journal of Food Microbiology* 123, 159-167.

Tajabadi, N., Mardan, M., Manap, M.Y.A., Mustafa, S., 2013, Molecular identification of *Lactobacillus* spp. isolated from the honey comb of the honey bee (*Apis dorsata*) by 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Apicultural Research* 52, 235-241.

Tajabadi, N., Mardan, M., Manap, M.Y.A., Shuhaimi, M., Meimandipour, A., Nateghi, L., 2011, Detection and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee *Apis dorsata*. *Apidologie* 42, 642-649.

Tannock, G.W., 2004, A special fondness for lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3189-3194.

Theopold, U., Dushay, M.S., 2007, Mechanisms of *Drosophila* immunity – an innate immune system at work. *Current Immunology Reviews* 3, 276–288.

Uruguay-XXI, 2014, Sector Apícola.

<http://www.uruguayxxi.gub.uy/exportaciones/wp-content/uploads/sites/2/2014/09/Sector-apicola-Mayo-2014-Uruguay-XXI.pdf>

vanEngelsdorp, D., Meixner, M.D., 2010, A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology* 103 Suppl 1, S80-97.

Vasquez, A., Olofsson, T.C., 2009, The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research* 48, 189-197.

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J., Lupski, J.R., 1994, Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology* 5, 25-40.

## BIBLIOGRAFIA

Wedenig, M., Riessberger-Galle, U., Crailsheim, K., 2003, A substance in honey bee larvae inhibits the growth of *Paenibacillus larvae larvae*. *Apidologie* 34, 43-51.

Wilson-Rich, N., Dres, S.T., Starks, P.T., 2008, The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 54, 1392-1399.

Woodrow, A.W., 1942, Susceptibility of honeybee larvae to individual inoculations with spores of *Bacillus larvae*. *Journal of Economic Entomology* 35.

Woodrow, A.W., Holst, E.C., 1942, The mechanism of colony resistance to American foulbrood. *Journal of Economic Entomology* 35, 327-330.

Yang, X., Cox-Foster, D., 2007, Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology* 134, 405-412.

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 U S A* 102, 7470-7477.

Yasui, H., Shida, K., Matsuzaki, T., Yokokura, T., 1999, Immunomodulatory function of lactic acid bacteria, In: *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Springer, 383-389.

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, 91-97.

Yoshiyama, M., Wu, M., Sugimura, Y., Takaya, N., Kimoto-Nira, H., Suzuki, C., 2013, Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. *Journal of Invertebrate Pathology* 112, 62-67.

## BIBLIOGRAFIA

Yue, D., Nordhoff, M., Wieler, L.H., Genersch, E., 2008, Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology* 10, 1612-1620.

Zacharof, M.P., Lovitt, R.W., Ratanapongleka, K., 2010. The importance of Lactobacilli in contemporary food and pharmaceutical industry: A review article. *Proceedings of 2010 international conference on chemical engineering and applications (CCEA 2010)*, 13-18.

## 15.- Anexo I

Aisl.	Número de abeja	Morfología	Gram	Catalasa	Oxidasa	Filiación Asignada	Porcentaje de identidad	Inhibición de <i>P. larvae</i> (cm)	Tiempo de generación (min)	Resistencia Osmótica al Jarabe (porcentaje de supervivencia)				Tolerancia a distintas condiciones de acidez					
										1:1		2:1		Porcentaje de supervivencia			Diferencia de absorbancia		
										28°C	4°C	28°C	4°C	pH 3	pH 5	pH 7	pH 3	pH 5	pH 7
1	2	Bacilos	+	-	-	<i>Lactobacillus helsingborgensis</i>	98%	2,3 ± 0,42	185,3	15	21	14	48	6	100	100	0,05	0,18	0,19
21	3	Bacilos	-	+	-	<i>Acetobacteraceae bacterium</i>	99%	0,2 ± 0,35	288,9										
22	3	Bacilos	-	+	+	<i>A. bacterium</i>	99%	2,1 ± 1,94	245,8	0	2	0	1	52	100	100	0,04	0,07	0,54
29	7	Bacilos	+	-	-	<i>Lactobacillus kunkeei</i>	99%	0,8 ± 1,06	247,0	16	4	32	7	2	100	100	0,00	0,04	0,05
32	7	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	1,1 ± 0,07	194,1	0	0	0	0	7	100	100	0,00	0,05	0,08
33	7	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	1,0 ± 0	101,7	0	86	0	137	100	100	100	0,01	0,07	0,21
34	7	Bacilos	+	-	+	<i>L. kunkeei</i>	99%	1,3 ± 0,21	137,1	4	11	12	8	0	100	100	0,00	0,04	0,07
35	7	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	2,0 ± 0,75	81,6	75	76	35	32	100	100	100	0,00	0,03	0,05
36	7	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	1,0 ± 0,14	113,7	8	37	62	64	100	100	100	0,00	0,04	0,16
37	7	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	1,2 ± 0,72	108,3	20	19	3	23	54	100	100	0,00	0,04	0,04
38	7	Bacilos	+	-	-	ND		1,1 ± 0,42	116,3	8	65	49	79	100	100	100	0,00	0,04	0,19
39	7	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	98%	1,2 ± 0,07	131,7	0	82	32	58	100	100	100	0,12	0,56	0,54
46	7	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	98%	0,9 ± 0,28	137,9	0	43	0	95	100	100	100	0,18	0,42	0,46
51	7	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	98%	0,8 ± 0,07	150,9	43	45	38	75	23	100	100	0,09	0,13	0,27
53	7	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	1,3 ± 0,36	129,4	1	41	0	157	64	100	100	0,00	0,06	0,16
67	8	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	0,6 ± 0	117,5	85	65	67	64	100	100	100	0,09	0,22	0,02
72	8	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	1,1 ± 0,14	87,8	0	0	0	0	96	100	100	0,00	0,07	0,08
75	8	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	1,2 ± 0,35	93,3	0	0	0	0	0	100	100	0	0,13	0,29
76	8	Bacilos	+	-	-	ND		1,4 ± 0,63	76,5	0	0	10	12	33	100	100	0,00	0,04	0,18
77	8	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	1,7 ± 0,71	140,3					0	99	100	0,00	0,06	0,08
78	8	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	0,9 ± 0,28	101,8	30	0	0	2	100	100	69	0,03	0,17	0,02
81	8	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	98%	1,2 ± 0,35	91,8	0	0	0	3	0	100	100	0,00	0,44	0,51
83	8	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	1,6 ± 0,35	173,8	0	59	2	75	62	100	100	0,01	0,40	0,25
84	8	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	1,1 ± 0,14	141,1	0	10	0	4	15	100	100	0,00	0,04	0,14

## ANEXO I

88	8	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	98%	0											
90	8	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	1,8 ±0,28	131,3	0	13	0	27	70	100	100	0,00	0,16	0,04
93	8	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	1,7 ±0,42	120,9	4	5	1	98	10	100	100	0	0,31	0,29
97	8	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	0											
98	8	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	1,4 ±0,49	157,4	13	0	3	9	26	100	100	0,00	0,15	0,38
100	20	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	0											
101	20	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	97%	0											
102	20	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	0,7 ±0,14	100,1	2	23	0	219	31	100	100	0,00	0,15	0,38
103	20	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	0											
104	20	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	0											
105	21	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	1,2 ±0,32	100,9	0	64	0	68	37	5	2	0,01	0,18	0,23
106	21	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	86%	0											
107	28	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	0,7 ±0	62,6	1	49	0	57	0	100	100	0,01	0,31	0,23
108	28	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	1,2 ±0,21	91,4	2	87	0	43	0	100	100	0,00	0,21	0,24
109	29	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	0,9 ±0,71	83,4	0	31	0	114	0	76	100	0,00	0,22	0,19
110	22	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	1,2 ±0,45	89,7	38	34	0	38	100	100	71	0,00	0,22	0,22
111	22	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	97%	0											
112	23	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	1,1 ±0,36	101,7	10	70	1	206	0	100	97	0,00	0,39	0,27
113	23	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	0,7 ±0,61	85,4	0	28	0	91	0	100	100	0,00	0,42	0,38
114	23	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	1,0 ±0,56	121,4	0	43	0	116	0	53	100	0,01	0,45	0,32
115	23	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	1,5 ±0,78	91,8	2	82	0	96	0	51	83	0,01	0,33	0,24
116	23	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	0,7 ±0,61	100,0	0	40	0	40	1	100	100	0,02	0,26	0,22
117	23	Bacilos	+	-	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	97%	0,8 ±0,75	58,7	51	97	5	116	100	100	100	0,00	0,15	0,16
118	24	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	2,0 ±0,90	92,2	0	46	0	124	0	100	100	0,05	0,33	0,22
119	25	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	0,3 ±0,52						0	100	100	0,00	0,16	0,26
120	26	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	2,5 ±0,42	109,3	6	15	6	0	0	100	100	0,00	0,17	0,17
121	26	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	0,6 ±0,28	95,7	0	36	0	99	0	100	100	0,02	0,22	0,14
122	26	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	1,2 ±0,45	160,4	94	23	0	220	0	100	100	0,03	0,17	0,11
123	26	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	100%	1,7 ±0,38	138,5	1	92	0	0	0	100	100	0,07	0,13	0,18
124	26	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	1,3 ±0,62	99,3	0	47	0	39	0	1	1	0,04	0,27	0,27
125	26	Bacilos	+	-	-	<i>L. kunkeei</i>	99%	1,6 ±0,60	122,2	0	4	0	9	100	100	28	0,00	0,44	0,22

