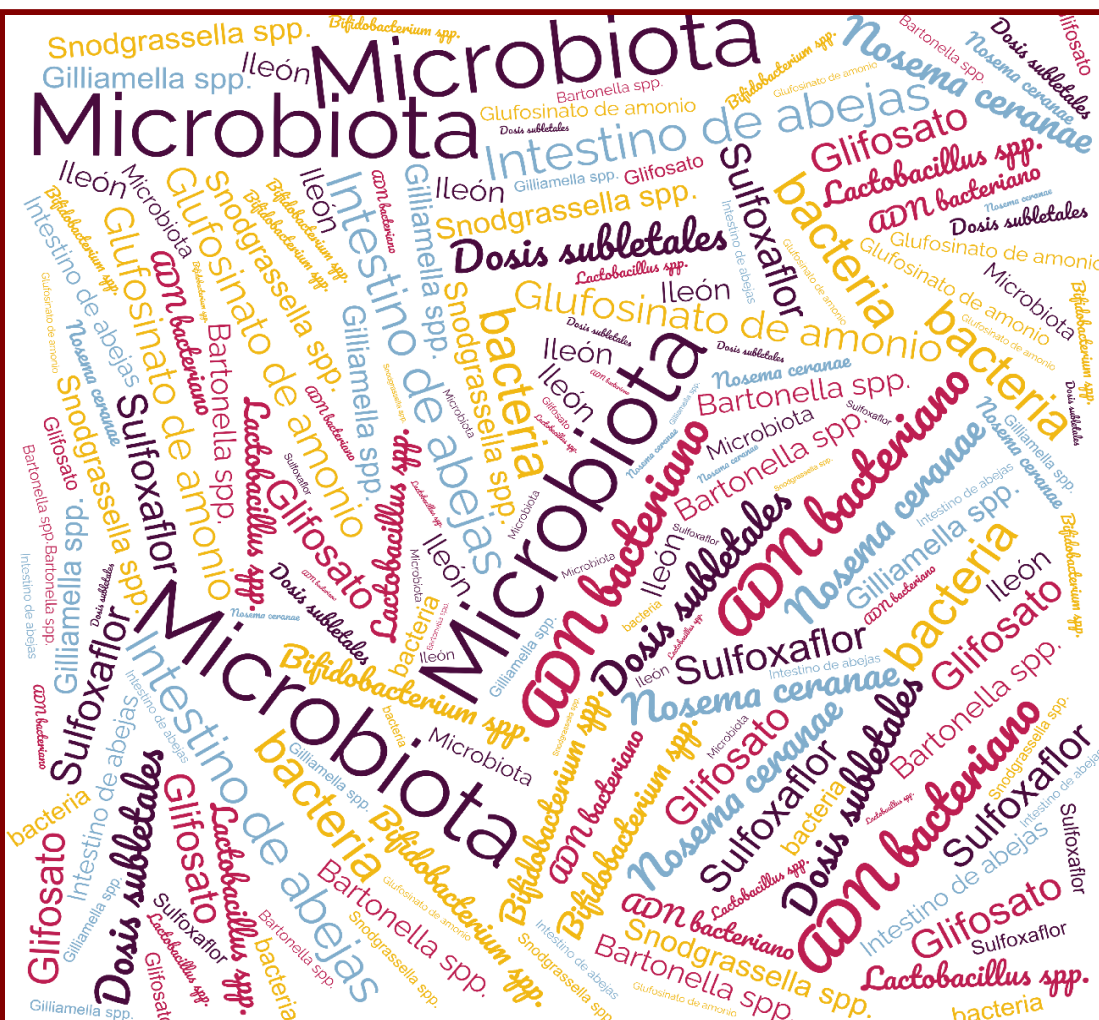


# Efecto de dosis subletales de pesticidas en la salud de las abejas melíferas



Mag. Loreley Castelli

Tesis de Doctorado, PEDECIBA

Montevideo, Uruguay

2022



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



AGENCIA NACIONAL  
DE INVESTIGACIÓN  
E INNOVACIÓN



**iibce**  
INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES  
BIOLÓGICAS  
CLEMENTE  
ESTABLE

# Efecto de dosis subletales de pesticidas en la salud de las abejas melíferas

Mag. Loreley Castelli

Laboratorio de Microbiología y Salud de las Abejas, Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Directora: Dra. Karina Antúnez Claustre

Montevideo, Uruguay.

(2022)

## Agradecimientos

---

Este trabajo fue posible gracias al apoyo de muchas personas, a las cuales les quiero expresar mi agradecimiento.

A mi tutora, Karina Antúnez quien, desde el primer día, me acompañó y me enseñó durante todo este camino e impulso mi crecimiento tanto a nivel científico como personal. Gracias por contagiarme con tu energía y espíritu científico.

A Pablo Zunino por aceptar mi ingreso al Departamento de Microbiología y por el compromiso durante toda mi formación.

A Ciro Invernizzi por contagiarme su pasión por las abejas, por la Ciencia y por confiar en mí.

A la Colonia por su ayuda en las tareas del laboratorio, por las horas de charlas de mesada y seminarios, sobre todo a Belén.

A Sebastián Díaz, Carlos Silva y Gustavo Ramallo por el soporte en la colección de muestras a campo y la ayuda en la cría de abejas en el laboratorio.

A la ANII por otorgarme una beca de investigación la cual fue imprescindible para seguir con mi formación.

A PEDEBICA por formar parte del programa de posgrado en el cual me formé.

Y por último quiero resaltar que este trabajo fue posible gracias al enorme apoyo de mi familia y amigos. En especial quiero agradecer a mi familia, pilares importantes en mi vida: Yenis y Roque, a mis hermanas Dahiana y Alexandra, y a Gonzalo, por apoyarme en todas mis decisiones, por su amor y por siempre estar presentes. Quiero dedicar este trabajo especialmente a mi abuela Olga, quien siempre estuvo para cuidarme, consentirme, apoyarme, quien siempre confió en mí desde mi primer examen y sé que estaría muy orgullosa.

A todos, ¡muchas gracias!

## RESUMEN

Las abejas desempeñan un rol esencial en el mantenimiento de los ecosistemas naturales y en la producción agrícola, a través de la polinización. Por este motivo, las pérdidas masivas de colonias de abejas alrededor del mundo generan gran preocupación. Entre las principales causas de estas pérdidas se encuentran la presencia de múltiples plagas y patógenos y la intensificación en el uso de la tierra, que ha traído aparejado el aumento en la superficie destinada a monocultivos y el aumento en el uso de pesticidas potencialmente tóxicos. El objetivo general de esta tesis fue evaluar el impacto del insecticida sulfoxaflor y los herbicidas glufosinato de amonio y glifosato en la salud de las abejas melíferas. Utilizando un modelo de cría e intoxicación de abejas en laboratorio, se evaluó el efecto de la intoxicación oral aguda y crónica con dosis subletales de estos pesticidas en su microbiota intestinal, en la expresión de genes vinculados a la fisiología y respuesta inmune, en la infección por *Nosema ceranae* y el Virus de las alas deformes (DWV) y finalmente en la supervivencia de las abejas. En el caso del glifosato, además se evaluó su efecto en conjunto con la infección por *N. ceranae*. La intoxicación con dosis subletales de sulfoxaflor, glufosinato de amonio y glifosato alteraron la microbiota intestinal y la respuesta inmune de las abejas. En particular, el glufosinato de amonio disminuyó significativamente el número de bacterias en el intestino, así como la expresión de glucosa oxidasa, un marcador de inmunidad social. Por otro lado, el sulfoxaflor aumentó significativamente el número de bacterias en el intestino, disminuyó la expresión de lisozima y aumentó la expresión de himenoptecina. Con respecto al glifosato, disminuyó la abundancia de *Snodgrassella alvi*, bacteria perteneciente al *core*, implicada en la defensa frente a patógenos. Este pesticida en conjunto con *N. ceranae* alteró significativamente la estructura y composición de la microbiota intestinal, aumentó la expresión de genes vinculados a la inmunidad (lisozima y glucosa oxidasa), y aumentó el nivel de infección del virus DWV. En todos los casos, la intoxicación con estos pesticidas disminuyó significativamente la supervivencia de las abejas. Estos resultados evidencian el impacto negativo de los pesticidas en la salud de las abejas y demuestra la importancia de evaluar cuidadosamente los efectos de la exposición a corto y largo plazo en organismos no blanco. El conocimiento generado podrá ser de utilidad para el diseño de políticas agrícolas de uso y manejo de pesticidas que permita la conservación de estos insectos.

# Índice

---

1. INTRODUCCIÓN .....	1
<b>1.1 Importancia de las comunidades microbianas</b> .....	1
<b>1.2 Importancia de las abejas melíferas y su uso como modelo para el estudio de comunidades microbianas</b> .....	3
<b>1.3 La microbiota intestinal de las abejas melíferas</b> .....	5
<b>1.4 Funciones de la microbiota intestinal de las abejas melíferas</b> .....	7
<b>1.5 Respuesta inmune de las abejas melíferas</b> .....	10
<b>1.6 Factores de estrés que afectan a las abejas melíferas</b> .....	14
<b>1.6.1 Nosema ceranae</b> .....	155
<b>1.6.2 Virus ARN</b> .....	16
<b>1.6.3 Pesticidas</b> .....	16
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	211
<b>2.1 Hipótesis general</b> .....	211
<b>2.2 Objetivo general</b> .....	211
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
<b>3.1 Determinación de la Dosis Letal 50</b> .....	23
3.1.1 Dosis a evaluar .....	23
3.1.2 Diseño experimental .....	24
3.1.3 Análisis estadísticos .....	25
<b>3.2 Análisis de la intoxicación oral aguda y crónica de pesticidas en la salud de las abejas melíferas</b> .....	25
3.2.1 Diseño experimental .....	25
3.2.2 Análisis de estructura y composición de la microbiota intestinal .....	27
3.2.3 Análisis de la expresión de diferentes genes mediante PCR cuantitativa .....	28
3.2.4 Análisis estadísticos .....	29
4. CAPÍTULO I. “Efecto del insecticida sulfoxaflor en la salud de las abejas” .....	32
<b>4.1- Introducción</b> .....	32
<b>4.2 Materiales y métodos</b> .....	35
4.2.1 Determinación de DL <sub>50</sub> del sulfoxaflor en abejas melíferas de Uruguay .....	35
4.2.2 Evaluación del impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con sulfoxaflor en abejas melíferas .....	35
<b>4.3- Resultados</b> .....	37

4.3.1 Dosis letal 50 de sulfoxaflor en abejas melíferas de Uruguay.....	37
4.3.2 Impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con sulfoxaflor en las microbiota intestinal de las abejas .....	40
4.3.3 Impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con sulfoxaflor en la expresión de genes y en la dinámica de patógenos como el virus de las alas deformadas .....	46
4.3.4 Impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con sulfoxaflor en el consumo y la supervivencia de las abejas.....	47
<b>4.4 Discusión.....</b>	<b>49</b>
5. CAPÍTULO 2. “Efecto del herbicida glufosinato de amonio en la salud de las abejas” .....	54
<b>5.1 Introducción .....</b>	<b>54</b>
<b>5.2 Materiales y métodos.....</b>	<b>56</b>
5.2.1 Evaluación del impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con glufosinato de amonio en abejas melíferas .....	56
<b>5.3 Resultados .....</b>	<b>58</b>
5.3.1 Impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con glufosinato de amonio en la microbiota intestinal de las abejas .....	58
5.3.2 Impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con glufosinato de amonio en la expresión de genes y en la dinámica de patógenos como el virus de las alas deformadas.....	63
5.3.3 Impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con glufosinato de amonio en el consumo y supervivencia de las abejas .....	65
<b>5.4 Discusión.....</b>	<b>68</b>
6. CAPÍTULO 3. “Efecto del herbicida glifosato en conjunto con <i>Nosema ceranae</i> en la salud de las abejas” .....	70
<b>6.1 Introducción .....</b>	<b>70</b>
<b>6.2 Materiales y métodos.....</b>	<b>74</b>
6.2.1 Determinación de la DL <sub>50</sub> del glifosato en las abejas melíferas de Uruguay.....	74
6.2.2 Evaluación del impacto de la intoxicación oral crónica con glifosato en la salud de las abejas y su susceptibilidad a patógenos .....	74
<b>6.3 Resultados .....</b>	<b>77</b>
6.3.1 Dosis letal 50 de glifosato en abejas melíferas de Uruguay.....	77
6.3.2 Impacto de la intoxicación oral crónica con glifosato en la microbiota intestinal de las abejas ...	78
6.3.3 Impacto de la intoxicación oral crónica con glifosato en la expresión de genes y en la dinámica de patógenos como el virus de las alas deformadas y <i>N. ceranae</i> .....	85
6.3.4 Impacto de la intoxicación oral crónica con glifosato en la supervivencia de las abejas .....	90
<b>6.4 Discusión.....</b>	<b>92</b>
7. Consideraciones finales.....	97
8. Perspectivas .....	100

Índice

9. Referencias .....	101
10. Anexo I.....	129

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## *1.1 Importancia de las comunidades microbianas*

La diversidad de las comunidades microbianas en ambientes naturales es clave para el funcionamiento de los ecosistemas. Estas comunidades regulan los ciclos biogeoquímicos de los principales elementos, participan en los procesos de descomposición de la materia orgánica, favorecen el ciclo de nutrientes y degradan compuestos contaminantes (Hunter-Cevera, 1998).

Los microorganismos han evolucionado para adaptarse a distintos microambientes. A la vez, las condiciones particulares de cada ambiente condicionan y determinan la diversidad de las comunidades, seleccionando poblaciones de microorganismos con actividades metabólicas específicas. Esto influye en la distribución espacial de estas poblaciones y su interacción (Konopka, 2006; Prosser et al., 2007; Young et al., 2008).

Gran parte de los microorganismos se encuentran asociados a diferentes especies de plantas y animales, estableciendo diversos tipos de interacciones con el hospedero, ya sea como simbioses o como patógenos (Frago et al., 2012; McFall-Ngai et al., 2013). El descubrimiento de la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN), y posteriormente el desarrollo de herramientas de biología molecular y tecnologías de secuenciación masiva, han impulsado el avance en el entendimiento de la diversidad microbiana, la diversidad de funciones y sus complejas interacciones con otros organismos. Debido a esa diversidad y a su gran capacidad metabólica, las comunidades microbianas (o microbiotas), se consideran un órgano separado dentro del hospedador, un ejemplo de esto son las microbiotas que habitan en el intestino animal (Cani & Delzenne, 2007; Possemiers et al., 2011). Así como los



órganos están constituidos por células organizadas en una estructura específica (tejido) que cumplen una función común, los microorganismos que habitan el intestino existen principalmente en asociaciones complejas adheridas a la mucosa intestinal (Macfarlane & Dillon, 2007). Estas estructuras, definidas como *biofilms* mucosos, suelen ser consorcios de multiespecies, en los que las bacterias se comunican entre sí, coordinan sus actividades y cooperan para llevar adelante diversas funciones (Dickschat, 2010).

Existen diferentes factores que regulan la composición y diversidad de la comunidad microbiana de un microambiente determinado, algunos de estos factores son las características del ambiente como la temperatura, pH, salinidad, nutrientes, disponibilidad de oxígeno y materia orgánica, entre otros, además de la competencia entre organismos, depredación y sinergismo (Engel & Moran, 2013a; Pickard et al., 2017).

La microbiota intestinal constituye una comunidad de microorganismos que habitan en un entorno definido a lo largo del tracto gastrointestinal e incluye bacterias, hongos, protozoos, arqueas y levaduras. Como más del 98 % de las secuencias genéticas obtenidas del intestino provienen de bacterias, el término y el enfoque de la mayoría de las investigaciones en esta área se refieren a las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal (Jandhyala et al., 2015; Laukens et al., 2016).

La microbiota intestinal cumple importantes funciones, por ejemplo, en los seres humanos juega un papel predominante en el metabolismo, permitiendo una absorción eficiente de nutrientes (Krajmalnik-Brown et al., 2012) y proporciona vitaminas como las del grupo B (folatos, riboflavina o vitamina B12) que no podemos sintetizar y son cruciales para un correcto desarrollo del sistema inmune (Ximenez & Torres, 2017). Un claro indicador de la importancia de dicha microbiota en nuestra salud es la conexión entre una microbiota intestinal en disbiosis (alterada) y el desarrollo de enfermedades mentales como el Alzheimer (Kowalski & Mulak,

2019), la esquizofrenia (Lv et al., 2017) o la depresión (Winter et al., 2018). Sin embargo, el estudio funcional de dichas comunidades presenta grandes dificultades debido a su complejidad y variabilidad, además, muchos de esos microorganismos no se conocen. Teniendo esto en cuenta, para estudiar las funciones de las comunidades microbianas se necesitan emplear modelos más simples en composición y particularmente sistemas de fácil uso y manejo.

### ***1.2 Importancia de las abejas melíferas y su uso como modelo para el estudio de comunidades microbianas***

Las abejas, y en particular las abejas melíferas (*Apis mellifera*) constituyen un grupo de insectos clave para el mantenimiento de ecosistemas naturales y para la producción agrícola. Al recolectar polen y néctar de las flores como recursos nutricionales (Charles D. Michener, 1974), llevan adelante la polinización, el traslado de polen entre flores. Esto es esencial para la reproducción de las plantas con flores, la producción de semillas y frutos (Council, 2006). Una adecuada polinización es necesaria para una mayor producción, mejor tamaño, forma y maduración temprana de los frutos (Klein et al., 2006). Se estima que el 75% de los cultivos a nivel mundial dependen de forma directa de la polinización por abejas (Klein et al., 2006).

En Uruguay, la polinización por abejas melíferas favorece la formación de frutos en los cultivos de manzanos, zapallitos de tronco y melones, así como también en cultivos industriales como Trébol blanco, Trébol rojo, Lotus, entre otros (Santos et al., 2009). En particular, en el caso de los manzanos, el 90% de la producción se asocia a las abejas. A partir de estos datos se logró estimar el valor económico de la acción polinizadora de la abeja melífera en nuestro territorio, el cual superó los 1.600.000.000 pesos uruguayos en 2008 (Santos et al., 2009).

Además de su rol clave para el mantenimiento de la biodiversidad y brindar seguridad alimentaria, las abejas melíferas elaboran una gran diversidad de productos como miel, polen, jalea real y propóleos, que han sido de gran utilidad para la humanidad no solo como alimentos sino también para su uso en la medicina (Aizen et al., 2009; Natalia Prytulska, 2021). En Uruguay existen cerca de 2600 productores que poseen 500.000 colmenas, el 90-95% de la miel producida es exportada. En 2020, las exportaciones de miel alcanzaron las 15.500 toneladas, generando divisas al país de 30.5 millones de dólares (MGAP, 2020).

Los insectos sociales, particularmente las abejas melíferas, son también un excelente modelo para estudiar la microbiota intestinal, para comprender las interacciones hospedero-microbiota y sus funciones (Zheng et al., 2018; Romero et al., 2019). Son múltiples los motivos por los cuales se considera esta microbiota una fuente de información ecológica novedosa. En primer lugar, dada su condición de insectos eusociales, su principal vía de transmisión es el contacto. Las abejas recién emergidas carecen de una microbiota intestinal establecida, estos microorganismos se adquieren vía oral a través de interacciones sociales con otras abejas durante los días posteriores a la emergencia (Martinson et al., 2012). Al cuarto día post-emergencia, el número de bacterias en el intestino aumenta logarítmicamente hasta que la comunidad se establece en  $10^8$ - $10^9$  bacterias por individuo (Powell et al., 2014). Por otro lado, la microbiota intestinal exhibe una gran capacidad de resiliencia, a pesar de las variaciones ambientales, se mantiene un grupo distintivo de microorganismos (Moran et al., 2012). Estos microorganismos son mayormente especies que se encuentran sólo en las abejas sociales, lo que sugiere una relación de co-evolución entre los microorganismos y las abejas (Martinson et al., 2012). Esta restricción de nicho probablemente se deba a la incapacidad de estas bacterias para replicarse en concentraciones atmosféricas de oxígeno (Kwong & Moran, 2016).

Finalmente, todos los grupos taxonómicos presentes en el intestino de las abejas son cultivables en condiciones de laboratorio, lo que permite la caracterización genómica y la manipulación experimental (Zheng et al., 2018).

Otra de las ventajas clave de las abejas melíferas como modelo para el estudio de la microbiota, es su fácil manejo y la posibilidad de criarlas en laboratorio. Es posible obtener abejas carentes de microbiota intestinal (abejas gnotobióticas), e inocularlas con cepas bacterianas específicas, lo que permite conocer cómo estos microorganismos influyen en el fenotipo del hospedador y estudiar su papel en la salud (Zheng et al., 2018).

Este modelo se puede utilizar para estudiar la resistencia de la microbiota intestinal de las abejas a la perturbación o para comprender el impacto de los xenobióticos, sobre la microbiota y como esto afecta el comportamiento y la salud de las abejas.

### **1.3 La microbiota intestinal de las abejas melíferas**

La microbiota intestinal de las abejas está compuesta en su mayoría por bacterias microaerófilas o anaeróbicas (Kwong & Moran, 2016; Moran, 2015). Poseen un núcleo, o *core*, formado por cinco grupos de especies: *Lactobacillus* spp. denominadas colectivamente Firm-5, *Bombilactobacillus* spp. (antes denominado *Lactobacillus* spp. Firm-4) (Zheng et al., 2020), *Bifidobacterium* spp., *Snodgrassella alvi* y *Gilliamella* spp. los cuales están siempre presentes en las abejas (Kwong & Moran, 2013). Este núcleo, junto con otras especies no tan abundantes como *Frischella perrara*, *Bartonella apis* y *Parasaccharibacter apium* (reclasificado recientemente como *Bombella apis*) (Yun et al., 2017) forman el grupo dominante de la microbiota, y representan el 95-99 % del total de la comunidad intestinal (Martinson et al., 2012; Zheng et al., 2020). El predominio de estos taxones principales es consistente entre abejas de

diferentes colmenas o de diferentes áreas geográficas, razón por la cual se considera que dicha comunidad intestinal es conservada (Ahn et al., 2012; Disayathanoowat et al., 2012; Moran et al., 2012; Jeyaprakash et al., 2003; Kwong & Moran, 2016). Además, también se pueden encontrar bacterias ambientales presentes en la colmena o en las flores, pero sus abundancias son bajas con respecto a las abundancias de las bacterias del núcleo (Corby-Harris et al., 2014).

A pesar de que esta microbiota es conservada, estudios empleando metagenómica demuestran que existen variaciones a nivel de cepas dentro de las diferentes poblaciones, lo que aumenta la diversidad metabólica en el intestino de estos insectos (Engel et al., 2012; Kwong & Moran, 2016a; Zheng et al., 2018).

Las abejas emergen desde la etapa de pupa con un bajo número de microorganismos y se colonizan por completo dentro de los 4-5 días posteriores a la emergencia (Martinson et al., 2012; Kwong & Moran, 2016). Durante la etapa de pupa, el desprendimiento del tegumento y de algunas capas del intestino impide el transporte de microorganismos intestinales desde la etapa larval hasta la etapa adulta (Winston, 1987; Kaltenpoth et al., 2010; Martinson et al., 2012). Las abejas obreras recién emergidas son alimentadas a través de trofalaxis (transferencia de alimentos como néctar y miel y otras sustancias entre los integrantes de la colonia) por otras abejas nodrizas; consumen pan de polen así como también, polen fermentado almacenado dentro de las colmenas. Esto, y el contacto con materiales de la colmena, favorecen el establecimiento de la microbiota característica (Powell et al., 2014).

Una vez establecida la microbiota intestinal en las abejas adultas, la composición varía poco, a pesar de cambios estacionales, cambios en la dieta, o incluso cambio en la fisiología y en el comportamiento al transicionar de abejas nodrizas a pecoreadora (Martinson et al., 2012; Corby-Harris et al., 2014).

## **1.4 Funciones de la microbiota intestinal de las abejas melíferas**

Los microorganismos que forman parte de la microbiota intestinal de las abejas melíferas desempeñan funciones esenciales para la vida de estos insectos:

1) Pueden producir compuestos químicos con múltiples efectos en la fisiología. Por ejemplo, bacterias simbióticas como *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola*, y *Lactobacillus* spp., pueden producir ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés) (Zheng et al., 2018), estimular la inmunidad, especialmente durante una infección (Jay D Evans & Lopez, 2004; Kwong et al., 2017; Li et al., 2017) y degradar polisacáridos de plantas (Zheng et al., 2019). Los ácidos grasos de cadena corta como: el acetato, el propionato y el butirato, son producidos por la microbiota intestinal como principales productos de fermentación de la fibra dietética. Estos se acumulan en el colon en el caso de los seres humanos, al igual que en el intestino de las abejas, y sirven como una de las principales fuentes de energía para las células epiteliales intestinales (Donohoe et al., 2011) o como principal sustrato respiratorio del hospedador (Odelson & Breznak, 1983). Como compuestos neuroactivos, los SCFA producidos por la microbiota intestinal pueden afectar las vías neurales e inmunitarias del hospedador y, por lo tanto, influir en la función y el comportamiento del cerebro (Kwong & Moran, 2013).

Los metabolitos microbianos también pueden tener un importante efecto en la fisiología intestinal; por ejemplo, sobre la concentración de oxígeno, el pH y el potencial redox que pueden ser esenciales para la salud del hospedador (Zeitouni et al., 2016).

Algunas bacterias que forman parte de la microbiota intestinal de las abejas presentan en sus genomas una gran cantidad de genes involucrados en el metabolismo de los carbohidratos y en el transporte de azúcares (Engel & Moran,

2013b; Lee et al., 2015), lo que sugiere que estas bacterias intestinales tienen un papel fundamental en la digestión y en la disponibilidad de nutrientes, compensando aquellos procesos que el hospedador por sí mismo no puede realizar. Como ejemplo, se ha visto que *G. apicola* participan en la degradación de pectinas; así como especies de *Bifidobacterias*, *Lactobacillus melliventris* y *Bombilactobacillus* spp. que participan en la digestión de los componentes de la pared y el revestimiento externo del polen, y utilizan los productos de su degradación (Daisley et al., 2020; Kešnerová et al., 2017).

2) La microbiota intestinal puede colonizar nichos en los hospedadores impidiendo el establecimiento de patógenos. En el intestino de las abejas, cada especie tiene una distribución característica. Pocas bacterias colonizan el intestino medio; el intestino posterior (íleon y recto) contienen la mayor abundancia. El íleon, un tubo angosto con seis pliegues longitudinales, está dominado por dos especies de bacterias Gram-negativas: *S. alvi* (Martinson et al., 2012), bacteria fermentadora que forma directamente una capa sobre la pared intestinal, junto con *G. apicola*, un fermentador de azúcar que coloniza más hacia el centro del lumen (Kwong & Moran, 2013). El recto está dominado por el grupo de bacterias Gram-positiva *Lactobacillus* spp. (Martinson et al., 2012). Estos integrantes de la microbiota intestinal pueden excluir competitivamente el establecimiento de microorganismos patógenos y evitar el desarrollo de la infección. Como ejemplo, se ha descrito que diversas bacterias del ácido láctico (*Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* principalmente) pertenecientes a esta microbiota presentan efectos inhibitorios sobre *Paenibacillus larvae* (Forsgren et al., 2010; Olofsson & Vásquez, 2008; Yoshiyama & Kimura, 2009).

3) Los integrantes de la microbiota intestinal, también, pueden interactuar con el sistema inmune y potenciar la respuesta frente a patógenos o parásitos (Kaltenpoth & Engl, 2014).

A continuación, se detallan algunas funciones de los principales miembros de la microbiota intestinal de abejas:

*S. alvi* forma una capa de *biofilms* (Martinson et al., 2012) que ayuda a otras bacterias intestinales, como *Gilliamella* spp., a establecerse en esa región y funciona como una barrera mecánica contra colonización e invasión por patógenos. Además, *S. alvi* estimula el sistema inmune de las abejas, aumenta la secreción de péptidos antimicrobianos, como la apidaecina, por parte de las células intestinales, inhibiendo el crecimiento de ciertas bacterias (Kwong et al., 2017). Algunas cepas de *S. alvi* codifican sistemas de secreción de tipo VI, que contribuye a la resistencia en la colonización por patógenos oportunistas (Steele et al., 2017).

*Gilliamella* spp. poseen capacidades metabólicas adaptada a la dieta de las abejas, presentando un gran repertorio de genes para la digestión de componentes presentes en la pared celular del polen, como la pectina, que no se procesan y/o absorben por las células de las abejas y, por lo tanto, se acumula en el intestino posterior (Engel et al., 2012; Zheng et al., 2017). Algunas cepas de *Gilliamella* también codifican genes para el metabolismo de azúcares tóxicos que las abejas pueden encontrar en el néctar, evitando la intoxicación por los mismos (Zheng et al., 2016).

Diferentes estudios demuestran que *S. alvi* y cepas de *Gilliamella* presentan vías metabólicas complementarias, principalmente aquellas vías implicadas en el metabolismo de los azúcares, en donde el producto generado por *Gilliamella* spp. es empleado por *S. alvi* (Kwong et al., 2014; Kwong & Moran, 2016; Kešnerová et al., 2017).

Por otro lado, el recto de la abeja está colonizado principalmente por bacterias Gram-positivas como las *Bifidobacterium*, *Bombilactobacillus* Firm-4 y *Lactobacillus* Firm-5. El grupo de cepas de *Lactobacillus* Firm-5 es el filotipo más abundante, seguido de *Bombilactobacillus* Firm-4 y *Bifidobacterium* spp. *Lactobacillus* Firm-5 son los principales fermentadores y utilizadores de flavonoides (componentes de la pared celular del polen) en el intestino de las abejas (Kešnerová et al., 2017). Estas bacterias controlan la proliferación de algunos patógenos oportunistas, mediante la



acidificación del ambiente intestinal, disminuyendo el pH y el potencial redox (Zheng et al., 2016; Palmer-Young et al., 2019). Las *Bifidobacterium* incrementan la producción de hormonas y moléculas de señalización (Kešnerová et al., 2017).

Teniendo en cuenta las múltiples funciones que tienen las bacterias pertenecientes a la microbiota intestinal, es esperable que alteraciones en estas comunidades (disbiosis intestinal) pueda comprometer la salud de la abeja. Por ejemplo, el tratamiento con antibióticos actúa como un factor de estrés ambiental al provocar una disminución en la abundancia de bacterias en el intestino de las abejas adultas, como *S. alvi*, *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., lo que hace que se vuelvan más susceptibles a la infección bacteriana (Raymann et al., 2017). Estudios en los abejorros han demostrado que el microbioma en su conjunto también lo protege contra el parásito intestinal *Crithidia bombi* (Koch & Schmid-Hempel, 2011). El entendimiento de las funciones de la microbiota intestinal en la abeja y cómo la microbiota se ve afectada por los estresores ambientales, puede ayudar no solo a comprender mejor las funciones de las bacterias simbióticas del intestino de estos insectos, sino también su importancia para la salud de las abejas.

### ***1.5 Respuesta inmune de las abejas melíferas***

Un individuo que vive en grupos posee muchos beneficios en comparación con un estilo de vida solitario. En las abejas, la cooperación favorece la eficiencia del cuidado de las crías, la búsqueda de alimento y/o las defensas contra los depredadores. Es por esto que los insectos sociales son especies dominantes en muchos hábitats (Klein et al., 2006). Sin embargo, vivir en grupos también acarrea inconvenientes: las enfermedades infecciosas pueden potencialmente propagarse más fácilmente entre los miembros del grupo, en comparación con los individuos que viven solos (Godfrey et al., 2006; Shykoff et al., 1991). Esto puede deberse a que es más probable que ocurra la transmisión cuando los individuos viven en altas

densidades y tienen contactos sociales frecuentes y, en segundo lugar, el hecho de que los miembros del grupo son a menudo parientes cercanos y, por lo tanto, son susceptibles a las mismas infecciones (Nunn & Altizer, 2006; Shykoff et al., 1991).

Durante su evolución, las abejas han desarrollado mecanismos de defensas colectivos denominados “inmunidad social”, que constituyen la primera barrera de defensa frente a patógenos (Cremer et al., 2007; Jay D Evans & Spivak, 2009). Como ejemplo, se encuentra el comportamiento higiénico (las abejas obreras remueven abejas adultas que mueren en la colonia o a las crías que están infectadas o parasitadas), la fiebre social (agrupaciones de abejas que alcanzan temperaturas inhóspitas para el desarrollo de parásitos) (Simone-Finstrom et al., 2014), la construcción de colmenas con materiales que poseen propiedades antimicrobianas como el propóleos (J. D. Evans et al., 2006), entre otros.

Como la mayoría de los eucariotas, las abejas también poseen mecanismos de defensa individuales que incluyen defensas mecánicas, fisiológicas e inmunes (J. D. Evans et al., 2006; Schmid et al., 2008; Wilson-Rich et al., 2008). Estos mecanismos de defensa están presentes en todos los individuos de la colmena. Las defensas mecánicas incluyen la presencia de la cutícula del insecto y del tejido epitelial, los cuales previenen la adhesión o el ingreso de los microorganismos; mientras que las defensas fisiológicas se vinculan a cambios en el pH y otras condiciones químicas del intestino del insecto (Crailsheim & Riessberger-Gallé, 2001). Una vez que los patógenos logran evadir estas barreras se activan la respuesta inmune innata celular y humoral (Larsen et al., 2019).

La respuesta inmune en las abejas melíferas implica una secuencia de eventos que se pueden agrupar en tres etapas: 1) reconocimiento, 2) activación de vías de señalización y 3) mecanismos efectores celulares y humorales destinados a eliminar patógenos (Guzman-Novoa, 2011).

La respuesta inmunitaria se desencadena por el proceso de reconocimiento en el que los PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos) son identificados por los PRR (receptores que reconocen patrones) en las células del sistema inmunitario. Los PAMP son estructuras conservadas y vitales presentes en grupos de microorganismos específicos; por ejemplo lipoparasacáridos (LPS), ácido lipoteicoico, zymosan, glicolípidos, glicoproteínas o ARN de doble cadena (Murphy y Weaver, 2016). El sistema inmune también reconoce patrones moleculares asociados a daños (DAMP), que son moléculas expresadas en células que han sufrido daños infecciosos o no infecciosos, como la proteína de choque térmico.

El reconocimiento de estas estructuras microbianas desencadena la activación de las vías de señalización intracelular, que traducen señales o estímulos externos en acciones dentro de las células, induciendo una respuesta inmune humoral y celular.

La inmunidad de insectos muestra muchos paralelismos con la respuesta inmune innata de los seres humanos y otros vertebrados, que implican un conjunto diverso de acciones como la secreción de péptidos antimicrobianos, fagocitosis, melanización y la degradación enzimática de patógenos (Hoffmann, 2003; Hultmark, 2003). Los insectos carecen de respuesta inmune adaptativa. La respuesta humoral consiste en secreciones de diferentes péptidos antimicrobianos hacia la hemolinfa (Hoffmann, 2003). Estos péptidos están altamente conservados, generalmente poseen entre 12 y 50 aminoácidos, los cuales se producen y liberan en la hemolinfa del insecto (Lemaitre & Hoffmann, 2007).

Se han detectado cuatro péptidos antimicrobianos en las abejas: defensinas (Casteels-Josson et al., 1994), (Peter Casteels et al., 1990), abaecinas, himenoptecinas (P. Casteels et al., 1993) y apidaecinas (P. Casteels et al., 1989). Estos AMPs son un componente clave en la inmunidad innata de los insectos para la defensa contra patógenos invasores, se liberan durante una infección bacteriana, fúngica o protozoaria, y dañan las células microbianas perforando las membranas e inhibiendo

el plegamiento de proteínas (Daníhlík et al., 2015). Las abejas también producen lisozima, un factor no específico del sistema inmune sintetizado por las glándulas salivares de las abejas nodrizas (Bogdanov, 1997), que es activo frente a bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. La lisozima puede promover la expresión de otros péptidos antimicrobianos (Imler & Bulet, 2005).

Por otro lado, la respuesta inmune celular está formada por células inmunes como los hemocitos, granulocitos y plasmocitos encargados de realizar las tareas de fagocitosis, encapsulación, nodulación y melanización de microorganismos y cuerpos extraños (Christophides et al., 2002; Wilson-Rich et al., 2008). Los mecanismos celulares contribuyen a la eliminación de agentes extraños; ante una partícula infecciosa o externa, los hemocitos pueden responder fagocitándola o lisándola, o engulléndola para neutralizarla. Los hemocitos pueden fagocitar pequeños agentes extraños para eliminarlos. Para que los hemocitos cumplan con sus funciones fagocíticas y reparadoras, tienen algún tipo de moléculas de adhesión que les permite unirse a diferentes superficies, a otras células o entre sí, que es lo que sucede en la nodulación o encapsulación (Marringa et al., 2014; Negri et al., 2017). La melanización es una combinación de procesos humorales y celulares que se produce durante la encapsulación o la nodulación y la cicatrización, y tiene como objetivo tratar las lesiones, ya sean mediadas por patógenos o no. Esta reacción celular en el sistema de defensa de los insectos elimina gran cantidad de células bacterianas, parásitos y xenobióticos (Eleftherianos et al., 2009). Su función principal es limitar la propagación del agente y retenerlo para su eliminación (Strand, 2008).

Finalmente, una proteína importante vinculada a la organización social de los insectos con efectos pleiotrópicos sobre la división del trabajo y especialización de forrajeo, pero que también está vinculada a la defensa frente a patógenos, es la vitelogenina (Amdam & Omholt, 2003; Nelson et al., 2007). La expresión de esta

proteína se ha asociado con una mayor resistencia al estrés oxidativo ocasionado por el microsporidio *Nosema ceranae* (Corona et al., 2007; Nelson et al., 2007).

La respuesta inmune está vinculada a la microbiota intestinal de las abejas. Kwong y colaboradores, demostraron que la microbiota puede influir en la abundancia de apidaecina en la hemolinfa, ejerciendo un efecto inmunológico sistémico en lugar de estar solo localizado en el intestino. Además, encontraron que la apidaecina se produce en la luz intestinal, lo que abre la posibilidad de que el sistema inmune del hospedero participe en la estructuración de la comunidad microbiana intestinal (Kwong et al., 2017).

Estos diversos mecanismos de defensa actúan de forma sinérgica, constituyendo poderosas herramientas para neutralizar parásitos y patógenos (Larsen et al., 2019).

### ***1.6 Factores de estrés que afectan a las abejas melíferas***

En los últimos años se han reportado pérdidas masivas de colmenas alrededor del mundo (Gray et al., 2022; Steinhauer et al., 2018). En Uruguay, estas pérdidas ascienden al 25-30% de las colmenas al año, porcentajes similares a Estados Unidos y superiores a los reportados en Europa (Gray et al., 2022; Requier et al., 2018; Steinhauer et al., 2018). Entre las principales causas se encuentran la intoxicación con pesticidas (herbicidas, insecticidas, fungicidas) y problemas nutricionales, ambos asociadas a la intensificación en el uso de la tierra. A esto se suma la infección por múltiples plagas y patógenos, tales como el ácaro *Varroa destructor*, el microsporidio *Nosema ceranae* y diferentes virus de ARN (Dave Goulson et al., 2015; Steinhauer et al., 2018).

### 1.6.1 *Nosema ceranae*

*Nosema ceranae* (*N. ceranae*) es un hongo causante de una enfermedad llamada Nosemosis. Las abejas melíferas adultas se infectan al ingerir esporas con la miel, con el polen almacenado o con la ingesta de agua, y las transmiten dentro de la colmena mediante trofalaxis con otras abejas (Higes et al., 2010; Higes et al., 2008b) y durante la limpieza de la colonia (Graystock et al., 2015). Después de su ingestión, las esporas llegan a la luz del intestino medio donde germinan e inyectan el esporoplasma (parásito infectivo) en células epiteliales a través del tubo polar (Higes et al., 2008b). Allí se multiplicará y se producirá un alto número de esporas que se liberarán a través de las heces generando nuevas fuentes de infección para la colonia (Chen et al., 2008). Una abeja puede albergar millones de esporas nuevas en su intestino en unas pocas semanas después de la infección inicial (Bailey & Ball, 1991). Las heces de los individuos enfermos poseen grandes números de esporas, y constituyen las principales fuentes de infección.

A nivel individual *N. ceranae* genera desórdenes intestinales y envejecimiento precoz, disminuyendo la vida media de la abeja (Alaux et al., 2011; Dussaubat et al., 2010). Además deprime la respuesta inmune de la abeja, lo que podría aumentar la susceptibilidad a otros patógenos (Antúnez et al., 2009). A nivel colonial, las abejas infectadas pueden no mostrar síntomas visibles, pero cuando las condiciones ambientales son favorables para el parásito, las colonias pueden colapsar rápidamente (Higes et al., 2008b; Higes et al., 2009; Genersch et al., 2010; Bourgeois et al., 2010). Esto convierte a la Nosemosis en una enfermedad difícil de diagnosticar y por consiguiente de controlar.

*N. ceranae* presenta una distribución mundial (Higes et al., 2013). En Uruguay, los primeros reportes datan de 1990 (Invernizzi et al., 2009), y actualmente se encuentra ampliamente distribuido en el país (Anido et al., 2015).

En un trabajo previo realizado en condiciones de laboratorio por nuestro grupo, se encontró que la infección por *N. ceranae* altera la microbiota intestinal de las abejas melíferas (Castelli et al., 2020). En particular, la infección favoreció la abundancia de *Bartonella* sp. y *Enterobacteriaceae* y disminuyó la abundancia de *Lactobacillus* spp (Castelli et al., 2020). Dado que el microsporidio infecta las células epiteliales del intestino y altera drásticamente la anatomía y fisiología del intestino (Higes et al., 2013) es esperable que genere una modificación importante de la microbiota intestinal.

### **1.6.2 Virus ARN**

Dentro de los patógenos que afectan a las abejas melíferas se encuentran también los virus de ARN. Actualmente se han descrito más de 80 virus que infectan a las abejas, la mayoría son virus de ARN monocatenario (ssRNA) de sentido positivo (+), siendo los principales el Virus de la Parálisis Aguda (ABPV), el Virus de la Celda Reina Negra (BQCV), el Virus de la Parálisis Crónica de las abejas (CBPV), el Virus de las Alas Deformadas (DWV), Virus de la Parálisis Aguda Israelí (IAPV) y el Virus de la Cría Ensacada (SBV) (Beaurepaire et al., 2020). En particular, el DWV es el virus con mayor relevancia ya que genera el nacimiento de abejas sin alas o con alas deformes, y junto al ácaro *V. destructor* (Rosenkranz et al., 2009), se los asocia al colapso de las colmenas (Highfield et al., 2009).

### **1.6.3 Pesticidas**

Otro de los factores que afectan a las abejas es el uso de pesticidas, sustancias químicas diseñadas para controlar un grupo blanco de organismos al interferir con rutas metabólicas. Existen diferentes tipos de pesticidas según su organismo blanco, insecticidas, herbicidas y funguicidas, entre otros (Botías & Sánchez-Bayo, 2018). Los insecticidas matan insectos al interrumpir su actividad neuronal, su proceso de muda u otro metabolismo específico. Los herbicidas afectan a plantas al interrumpir sus capacidades fotosintéticas o la síntesis de compuestos orgánicos esenciales. Los

fungicidas matan hongos al inhibir la formación de sus membranas celulares u otro metabolismo específico de estos organismos (Sanchez-Bayo et al., 2016).

La toxicidad de cada tipo de pesticida, sin embargo, no es exclusiva para su grupo blanco, ya que también se ven afectadas otras especies que comparten un metabolismo similar aunque normalmente en menor grado. La potencia de un pesticida se define por la dosis de producto químico letal para el 50% de los individuos de una población ( $DL_{50}$ ), y dicha dosis varía de una especie a otra (Botías & Sánchez-Bayo, 2018). Las dosis por debajo de la  $DL_{50}$  se consideran “subletales”, y si bien pueden no causar la muerte directa de un organismo, pueden afectar su funcionamiento normal y por ende su salud (Desneux et al., 2006).

Si bien el uso de los pesticidas permite el control de las poblaciones de plagas y mejora el rendimiento de los cultivos, los residuos tienden a dispersarse y permanecer en el medio ambiente durante períodos de tiempo inciertos, lo que aumenta las posibilidades de efectos secundarios en organismos no blancos (Sanchez-Bayo et al., 2016).

El uso de pesticidas alrededor del mundo ha aumentado durante las últimas décadas a causa del incremento en el uso del suelo con fines agrícolas (Zhang et al., 2011; Johnson & Pettis, 2014). En Uruguay en la última década el proceso de expansión agrícola elevó el área utilizada de 300.000 a más de un millón de hectáreas, basándose en una estrategia de siembra directa dominada por rotaciones de cultivo con soja transgénica (Diea & Mgap, 2014). Esto ha determinado que aumente sensiblemente el uso de ciertos pesticidas como el glifosato y ciertos neonicotinoides, y el registro y uso de nuevos productos como es el caso del sulfoxaflor y/o el glufosinato de amonio.

En los ambientes agrícolas las abejas están continuamente expuestas a estos pesticidas por diversas rutas (Botías & Sánchez-Bayo, 2018). Se pueden exponer a



ellos durante su aplicación sobre el cultivo. La mayoría de los insecticidas se aplican como aerosoles, mientras que los herbicidas y fungicidas generalmente se aplican directamente sobre el suelo antes de plantar los cultivos. En todos estos casos, las gotas y el polvo de las aplicaciones pueden caer directamente sobre las abejas que vuelan a través de los campos tratados (Craig et al., 1998). Una sola gota de insecticida puede ser suficiente para matar a una abeja ya que las soluciones de rociado contienen dosis concentradas de estos químicos; siendo esta una causa común de intoxicación de abejas (Greig-Smith et al., 1994; Magrini et al., 2004).

Los insecticidas sistémicos generalmente se aplican como recubrimientos de semillas. Las semillas tratadas se introducen en el suelo mediante sembradoras especializadas, y el roce de las semillas en la maquinaria produce partículas de polvo muy cargadas con los insecticidas. Estas partículas también pueden causar una gran mortalidad de las abejas (Georgiadis et al., 2010). Además, los insecticidas sistémicos aplicados de esta manera son absorbidos por las plantas de cultivo a medida que crecen, y sus residuos se distribuyen en todas las partes de la planta tratada incluidas las flores, el polen y el néctar (Bonmatin et al., 2015). De esta forma, no solo las plantas del cultivo tratado se ven afectadas, sino también las hierbas y arbustos que crecen cercanos al cultivo, a través del polvo/deriva del rociado o al absorber pequeñas cantidades de residuos que se esparcen por el suelo a través del flujo de agua (Botías et al., 2015; Krupke et al., 2012). Además, algunas plantas pueden producir gotas en las primeras horas de la mañana (por ejemplo, el maíz), y los insecticidas sistémicos que aparecen en dichas gotas en concentraciones elevadas son capaces de matar a las abejas (Tapparo et al., 2011).

Por otro lado, la exposición de las abejas a los pesticidas también puede darse a través de la ingestión de residuos que se encuentran en el polen y el néctar de las plantas contaminadas, ya sea de las plantas de cultivo o de las malezas de los alrededores (Botías & Sánchez-Bayo, 2018; Sanchez-Bayo & Goka, 2014). Los

residuos de pesticidas en el polen y el néctar son llevados por las abejas recolectoras a sus colonias y permanecen en el pan de abeja y en la miel durante mucho tiempo (Kubik et al., 1999; Orantes-Bermejo et al., 2010). Con estos residuos luego se alimentan a las larvas y a la reina, que se ven afectadas de manera similar a las abejas recolectoras. En este sentido, los diferentes productos de la colmena como cera y miel son considerados reservorios de información valiosa sobre la calidad del ambiente en el que se encuentra la colmena. De hecho las abejas melíferas y la colmena son considerados bioindicadores de calidad ambiental, que pueden ser herramientas poderosas para monitorear los residuos de pesticidas en diferentes agroecosistemas (Niell et al., 2015; Balayiannis & Balayiannis, 2008; Celli & Maccagnani, 2003; Kwong & Moran, 2013; Porrini et al., 2002).

Finalmente, otra forma de intoxicación es a través del agua contaminada que las abejas beben para mantener constante su temperatura corporal (Schmaranzer, 2000). En ocasiones, los residuos del suelo pueden pasar al agua y aparecer en los arroyos, riachuelos y estanques de las áreas agrícolas y más allá, generando una mezcla de pesticidas (Belden et al., 2007). Parte de la contaminación del agua también se puede deber a la deriva de las aplicaciones de rociado, particularmente de los insecticidas (Siebers et al., 2003; Woods et al., 2001).

La exposición a pesticidas puede tener efectos negativos en las abejas. Un ejemplo es el imidacloprid, un insecticida neonicotinoide comúnmente utilizado para el control del daño causado por insectos en cultivos, el cual en dosis subletales potencia los efectos negativos de los patógenos bacterianos en las abejas. Además, afecta el sistema nervioso de los insectos, alterando los procesos de aprendizaje y memoria (Elbert et al., 2008; Williamson et al., 2013). Los pesticidas también pueden tener efectos dañinos en el medio ambiente donde viven las abejas y otros polinizadores. Se ha demostrado que la biodiversidad vegetal y sus comunidades de

## Introducción

insectos asociadas han disminuido en áreas que se han tratado con pesticidas durante muchos años (Schmitz et al., 2014; Wardle et al., 1999).

# 1. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

## *2.1 Hipótesis general*

La hipótesis general de esta tesis es que la exposición a dosis subletales de diferentes pesticidas impacta negativamente en la microbiota intestinal de las abejas, así como en su fisiología e inmunidad. Al alterarse estos mecanismos de defensa, la abeja se vuelve más susceptible a la infección por patógenos, terminando con su muerte.

## *2.2 Objetivo general*

Evaluar el impacto de diferentes pesticidas en la salud de las abejas melíferas. En particular se escogieron tres productos empleados en Uruguay, el herbicida glifosato, por ser el producto que más se importa y aplica en nuestro país; el herbicida glufosinato de amonio y el insecticida sulfoxaflor, por estar recientemente aprobados por el MGAP y existe escasa información acerca de sus efectos en las abejas.

Para alcanzar este objetivo esta tesis se llevó adelante en tres etapas, que se presentan como tres capítulos:

### **Capítulo I: “Efecto del insecticida sulfoxaflor en la salud de las abejas”.**

En primer lugar se evaluó la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del sulfoxaflor en abejas melíferas, paso necesario para determinar las dosis subletales de trabajo. Luego se analizó el impacto de la intoxicación oral aguda y crónica de dosis subletales de este pesticida sobre la microbiota intestinal de las abejas, en la expresión de genes

## Hipótesis y objetivos

asociados a la respuesta inmune; sobre el nivel de infección por DWV, y finalmente sobre la supervivencia de las abejas.

### **Capítulo II: “Efecto del herbicida glufosinato de amonio en la salud de las abejas”.**

Se analizó el impacto de la intoxicación oral aguda y crónica de dosis subletales de glufosinato de amonio sobre la microbiota intestinal, en la expresión de genes asociados a la respuesta inmune; sobre el nivel de infección por DWV, y finalmente sobre la supervivencia de las abejas.

### **Capítulo III: “Efecto del herbicida glifosato en conjunto con *Nosema ceranae* en la salud de las abejas”.**

Se evaluó la DL<sub>50</sub> del glifosato en abejas melíferas, lo que permitió determinar las dosis subletales de trabajo. Luego se analizó el impacto de la intoxicación oral crónica de dosis subletales de glifosato solo o en combinación con la infección con *N. ceranae*, en la microbiota intestinal, en la expresión de genes asociados a la respuesta inmune, sobre el nivel de infección por DWV y finalmente en la supervivencia de las abejas.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### *3.1 Determinación de la Dosis Letal 50*

#### *3.1.1 Dosis a evaluar*

Para determinar la DL<sub>50</sub> en las abejas melíferas uruguayas se empleó un ensayo de cría de abejas en laboratorio siguiendo las indicaciones descritas por OECD, 2017 y US EPA. Estos experimentos se realizaron en la primavera del 2020 (noviembre y diciembre).

Las dosis a evaluar se seleccionaron en base a la DL<sub>50</sub> del sulfoxaflor y glifosato para intoxicación oral en abejas europeas (PPDB: Pesticide Properties DataBase) (DL<sub>50</sub> sulfoxaflor: 0,146 µg/abeja; DL<sub>50</sub> glifosato = 104 µg/abeja) (Lewis et al., 2016) (Tabla 1). Se preparó una solución concentrada de sulfoxaflor y glifosato (ingrediente activo, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) homogeneizando 0,3 mg de sulfoxaflor en 5 mL de agua destilada estéril + 2,5 gramos de azúcar (sacarosa); mientras que para preparar la solución concentrada de glifosato se pesaron 50 mg de glifosato en 5 mL de agua destilada estéril + 2,5 gramos de azúcar (sacarosa). Posteriormente a partir de estas soluciones se realizaron las diluciones correspondientes empleando jarabe de sacarosa 1:2 (1 kg de azúcar (sacarosa) en 2 litros de agua).

Como control negativo se administró jarabe de sacarosa 1:2, y como control positivo se emplearon dos dosis diferentes del insecticida dimetoato, insecticida estándar de preferencia en los bioensayos (dosis: 0,10 µg y 0,35 µg por abeja).

**Tabla 1.-** Dosis de sulfoxaflor y de glifosato empleadas en el ensayo de determinación de la DL<sub>50</sub> de abejas melíferas

Dosis de sulfoxaflor evaluadas en abejas criollas (µg/abeja)	Dosis de glifosato evaluadas en abejas criollas (µg/abeja)
0,6	100
0,15	50
0,0375	25
0,01875	
0,009375	
0,002343	
0,0005859	

### 3.1.2 Diseño experimental

Se colectaron cuadros de cría operculada de *A. mellifera* criollas a punto de emerger (híbridos locales entre *Apis mellifera scutellata*, *Apis mellifera ligustica* y *Apis mellifera mellifera*), de diferentes colonias de un apiario experimental localizado en Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay. Dichas las colonias no se trataron con ningún químico al menos 6 meses antes del ensayo. Los cuadros se incubaron en condiciones de temperatura y humedad similares a las naturales (Temperatura: 34°C y Humedad: 60%), para estimular la emergencia de las abejas.

Las abejas recién emergidas se mantuvieron en esas condiciones y en contacto con el panal para que se inoculen con la microbiota intestinal normal. A las 24 horas, las abejas emergidas de panales de diferentes colonias se mezclaron, se colocaron en jaulas cuyas dimensiones son 3x14x4,75 cm junto con una jeringa de 5 mL (Figura 1), y se incubaron en la oscuridad a 25 ± 2°C y 60% de humedad relativa. Solo se

## Materiales y métodos

emplearon las abejas que emergieron dentro de esas primeras 24 horas para estandarizar la edad. Se alimentaron con jarabe de sacarosa 1:2. Transcurridas 24 horas de su emergencia, se retiró el alimento por un período de 2 horas, se formaron los grupos (cada uno conformado por 3 jaulas con 20 abejas=triplicados), y cada grupo recibió un tratamiento diferente: jarabe de sacarosa contaminado con diferentes dosis de pesticida; jarabe de sacarosa contaminado con diferentes dosis de dimetoato como control positivo, o jarabe de sacarosa sin contaminar como control negativo. Una vez consumida la dosis adecuada, se retiró el jarabe de sacarosa contaminado y se les administró jarabe de sacarosa fresco y sin contaminar *ad libitum*. A las 48 horas de la intoxicación, se registraron y se retiraron las abejas muertas por tratamiento. El ensayo se consideró válido siempre y cuando los controles negativos presentaran una tasa de mortalidad inferior al 10%. Las abejas melíferas se consideraron muertas cuando permanecieron totalmente inmóviles durante un período de observación de 10 segundos durante su observación diaria (OECD, 2017).



**Figura 1.** Jaulas empleadas para los diferentes diseños experimentales de esta tesis.



### 3.1.3 Análisis estadísticos

La DL<sub>50</sub> se determinó utilizando un modelo lineal generalizado (GLM) con distribución *quasibinomial* y un modelo *logit* o *probit* (Crawley, 2016), con niveles residuales inferiores a los grados de libertad. Las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el software *RStudio* versión 4.0.2 (RStudio, 2020).

## 3.2 Análisis de la intoxicación oral aguda y crónica de pesticidas en la salud de las abejas melíferas

### 3.2.1 Diseño experimental

Para los diferentes ensayos de cría de abejas en laboratorio se colectaron cuadros de cría operculada de *A. mellifera* criollas a punto de emerger (híbridos locales entre *Apis mellifera scutellata*, *Apis mellifera ligustica* y *Apis mellifera mellifera*), de diferentes colonias de un apiario experimental. En los experimentos del capítulo I y II se emplearon colonias del apiario experimental de INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay, y en los experimentos del capítulo III se emplearon colonias de Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay. En ambos casos las colonias no se trataron con ningún químico al menos 6 meses antes del ensayo. Los cuadros se incubaron en condiciones de temperatura y humedad similares a las naturales (Temperatura: 34°C y Humedad: 60%), para estimular la emergencia de las abejas.

Las abejas recién emergidas se mantuvieron en esas condiciones y en contacto con el panal para que se inoculen con la microbiota intestinal normal. A las 24 horas, las abejas emergidas de panales de diferentes colonias se mezclaron, se colocaron en jaulas y se incubaron en la oscuridad a  $30 \pm 1$  °C y 60% de humedad relativa. Solo se emplearon las abejas que emergieron dentro de esas primeras 24 horas para estandarizar la edad.

Con el fin de evaluar el efecto de los diferentes tratamientos (pesticidas/patógenos) en las abejas, se realizaron dos ensayos de intoxicación. En primer lugar se intoxicó a las abejas con el pesticida de interés durante 48 horas, a esto se le denominó ensayo de intoxicación aguda. Por otro lado, se intoxicó a las abejas con el pesticida durante toda su vida, a lo que se denominó intoxicación crónica. En todos los casos la administración fue por vía oral en masa, y se incluyeron grupos controles, abejas alimentadas únicamente con jarabe de sacarosa 1:1. Todos los días se cuantificó el número de abejas muertas (las cuales se removieron) y se estimó el consumo de jarabe de sacarosa, determinado por el cambio de volumen en las jeringas graduadas. Cada 48 horas, se reemplazó el alimento por alimento fresco, con la concentración de pesticida adecuada según corresponda. A diferentes tiempos post-intoxicación, se colectaron abejas para el análisis de su microbiota intestinal, para el análisis de la expresión de genes vinculados a la respuesta inmune, y el nivel de infección por DWV. Estas últimas se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para evitar la degradación del ARN mensajero y viral.

### *3.2.2 Análisis de estructura y composición de la microbiota intestinal*

- Extracción de ADN: Las abejas se lavaron externamente usando una solución de hipoclorito al 1% (Engel et al., 2013). Se extrajeron los intestinos de forma individual y se homogeneizaron usando perlas de cerámica en tubos de plástico empleando un equipo FastPrep-24™ durante 40 segundos a 6,0 m/s. Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 1 minuto a 5000 xg. La extracción de ADN se realizó utilizando el método de SDS-CTAB (Zhou et al., 1996). El ADN obtenido se cuantificó y se normalizó a 10 ng/ $\mu\text{L}$ .

- PCR cuantitativa: la abundancia de bacterias por abeja se estimó mediante la proporción de copias del gen de ARNr 16S (Kešnerová et al., 2017) y un gen de

expresión constitutiva de la abeja (gen RPS5) (Jay D. Evans, 2006). En ambos casos, las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en un volumen final de 20  $\mu$ L, compuesto por 1 $\times$  SYBR (*Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix, Applied Biosystems*), 0,3  $\mu$ M de cada cebador, 40 ng de ADN y agua libre de ARNasa. Todas las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado en un equipo (*Applied Biosystem*) BIO-RAD CFX96<sup>™</sup> Real-Time, y se incluyeron dos controles negativos en cada corrida. La proporción relativa de bacterias/ADN de abeja se calculó mediante la fórmula = (log [eficacia del gen de la abeja] $\times$ CT del gen de la abeja) – (log [eficacia del gen 16S de las bacterias] $\times$ CT del gen 16S de las bacterias) (Ludvigsen et al., 2015).

- Secuenciación masiva: El ADN obtenido se analizó mediante secuenciación masiva. En el caso del capítulo I y II, se secuenció la región V3-V4 del gen de ARNr 16S empleando los cebadores V3F\_Nextera (5-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGAGGCAGCAG-3) y Meta\_V4\_806R (GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3). La secuenciación se llevó a cabo usando la plataforma *Illumina MiSeq* 2x300bp en los servicios del Centro de Genómica de la Universidad de Minnesota (UMGC - USA).

En el capítulo III, se secuenció la región V4 del gen de ARNr 16S, empleando la plataforma *MiSeq Illumina (2x300 PE)* en Macrogen (Korea), de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante ([https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf), accessed on 31 July 2020). En este caso, la librería de secuenciación se construyó empleando los *primers* Bakt\_341F (5-CCTACGGGNGGCWGCAG-3) y Bakt\_805R (5-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3).

### 3.2.3 *Análisis de la expresión de diferentes genes mediante PCR cuantitativa*

- Extracción de ARN y retrotranscripción: Las abejas se homogeneizaron de forma individual en buffer de lisis (Invitrogen) y se realizó la extracción de ARN usando el *Mini Kit PureLink RNA* (Invitrogen), de acuerdo con las condiciones del fabricante. El ARN total se trató con DNAsa y se utilizó para generar ADNc empleando el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Applied Biosystem*), de acuerdo con lo recomendado por el fabricante.

- PCR cuantitativa: Se evaluó la expresión de diferentes genes vinculados con la inmunidad (lisozima, glucosa oxidasa, himenoptecina, vitelogenina) y el nivel de infección por DWV, empleando cebadores previamente reportados (Tabla 2) (Jay D. Evans, 2006; Kukielka et al., 2008; Yang & Cox-Foster, 2005). Se preparó la mezcla de reacción con 10  $\mu$ L de *MasterMix PCR QuantiTect SYBR Green 1 X*, 0,3  $\mu$ M de cada cebador, agua libre de RNAsa y 2  $\mu$ L de ADNc diluido 1:10, en un volumen final de 20  $\mu$ L. Las reacciones de PCR se realizaron en un Sistema de *BIO-RAD CFX96TM Real-Time* y el programa del ciclado consistió en una etapa inicial de 95°C por 15 min, y 40 ciclos 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos. La fluorescencia se midió en la etapa de elongación. En todas las corridas se emplearon controles negativos (sin ADN).

**Tabla 2.-** Secuencias de los cebadores empleados en esta tesis.

Secuencias blanco	Secuencia (5' a 3')	Referencias
Proteína Ribosomal S5 F	5'-AATTATTTGGTCGCTGGAATTG-3'	Evans, 2006
Proteína Ribosomal S5 R	5'-TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA-3'	
Himenoptecina F	5'-CTCTTCTGTGCCGTTGCATA-3'	Evans, 2006
Himenoptecina R	5'-GCGTCTCCTGTTCATCCATT-3'	
Vitelogenina F	5'-AGTTCCGACCGACGACGA-3'	Corona <i>et al.</i> , 2007
Vitelogenina R	5'-TTCCTCCACGGAGTCC-3'	
Lisozima F	5'-ACACGGTTGGTCACTGGTCC-3'	Yang and Cox-Foster, 2005
Lisozima R	5'-GTCCACGCTTTGAATCCCT-3'	
Glucosa oxidasa F	5'-GAGCGAGGTTTCGAATTGGA-3'	Yang and Cox-Foster, 2005
Glucosa oxidasa R	5'-GTCGTTCCCCGAGATTCTT-3'	
Bacteria universal (16S rRNA) F	5'-AGGATTAGATACCCTGGTAGTCC-3'	Kesnerova <i>et al.</i> , 2017
Bacteria universal (16S rRNA) R	5'-YCGTACTCCCCAGGCGG-3'	
DWV2 F	5'-GAGATTGAAGCGCATGAACA-3'	Kukielka <i>et al.</i> , 2008
DWV2 R	5'-TGAATTCAGTGTCGCCATA-3'	

### 3.2.4 Análisis estadísticos

- Análisis bioinformático: Los *reads* (lecturas) *paired-end* obtenidas, se procesaron empleando el software *RStudio* versión 4.0.2 (*RStudio*, 2020) y el paquete *Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2* (DADA2) (versión 1.12.1, (Callahan *et al.*, 2016)). Los *reads* crudos de baja calidad se descartaron y las secuencias de los cebadores se eliminaron con *cutadapt* (Martin, 2011). Luego, se fusionaron los *reads* pareados. Posteriormente se obtuvieron las secuencias representativas de cada ASV (por las siglas en inglés de "*Amplicon Variant Sequence*") y se eliminaron las quimeras. La asignación taxonómica de las ASVs representativas se realizó empleando la base de datos *BEEexact* (Daisley & Reid, 2021) para las secuencias obtenidas en el capítulo I y II) y *SILVA\_132* para las secuencias del capítulo III, con una identidad de secuencias del 99%, empleando el paquete *assignTaxonomy*. Los *reads* pertenecientes a mitocondrias, cloroplastos y eucariotas se excluyeron empleando el paquete "phyloseq" package versión 1.28.0 (McMurdie and Holmes, 2013), "subset\_taxa" function. Con el fin de facilitar la visualización de los diferentes gráficos de

abundancia “barplot” (representando la abundancia relativa de las ASVs), sólo se retuvieron aquellas secuencias que estaban presente al menos en una abundancia del 1% en un mínimo de 2 muestras (“genefilter” paquete versión 1.66.0 (Gentleman et al., 2022), “filterfun\_sample” función). A partir de la tabla de ASVs se analizó la diversidad alfa y beta empleando el paquete “Vegan” (Oksanen et al., 2015). La diversidad alfa se analizó mediante el índice de ASVs observadas y el índice de Shannon (Anderson, 2006a); mientras que la diversidad beta se analizó empleando los índices de Bray–Curtis, UniFrac weighted, y UniFrac unweighted (función “vegdist”) (Anderson, 2006a). Con el fin de evaluar el efecto de los diferentes tratamientos en la estructura de la microbiota intestinal, se emplearon análisis de varianza multivariados permutacionales (ADONIS, “adonis” función) sobre los índices de beta diversidad. Se empleó también la función “betadisper” para evaluar homogeneidad de varianza (Anderson, 2006a; 2006b) comparando las distancias de las muestras individuales a los centroides de grupo en el espacio multidimensional utilizando “permutest”. Se empleó la función “metaMDS” para realizar diferentes gráficos. Las diferencias entre las abundancias relativas de las diferentes ASV se examinaron utilizando el software *DESeq2* (Love et al., 2014), como lo describen Jones *et al.*, 2018 (Jones et al., 2018).

- Análisis de la expresión de genes: Los valores de Cq (*threshold cycle number*) del gen de referencia RPS5 se utilizaron para normalizar los resultados entre muestras, y se calculó el radio de expresión de acuerdo con lo descrito por Pfaffl (Pfaffl, 2001). Los resultados para cada gen se analizaron para determinar si se ajustaban a una distribución normal (mediante el test de Kolmogorov-Smirnov) y si presentaban homogeneidad de varianza (mediante el test de Levene). En aquellas variables en las cuales los datos cumplían los requisitos para el uso de estadística paramétrica, la diferencia entre los diferentes grupos se evaluó mediante el test de ANOVA. Cuando los datos no se ajustaban a datos paramétricos se empleó el test de Kruskal-Wallis y posteriormente Mann-Whitney.

## Materiales y métodos

- Supervivencia: Se construyó una curva de supervivencia para las abejas sometidas a los diferentes tratamientos, y se analizó mediante el método de Kaplan-Meier. Se evaluó la presencia de diferencias estadísticas entre los grupos empleando el test Log-Rank (Bland & Altman, 2004).

- Consumo de alimento: Se estimó el consumo diario de alimento por abeja en las 3 jaulas de cada tratamiento, durante los primeros 15 días de ensayo. Se utilizaron modelos mixtos lineales generalizados (GLMM) para evaluar el efecto de los tratamientos (como variable independiente) sobre el consumo de alimento considerando el tiempo como efecto aleatorio.

En todos los casos, los valores de  $p$  menores o iguales a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los análisis estadísticos fueron realizados en el software *RStudio* versión 4.0.2 (RStudio, 2020).

## 4. CAPÍTULO I. “Efecto del insecticida sulfoxaflor en la salud de las abejas”

---

### *4.1- Introducción*

En los últimos años se han reportado grandes pérdidas de colonias de abejas melíferas alrededor del mundo (D. Goulson et al., 2007; Requier et al., 2018; Steinhauer et al., 2018). Las causas de estas pérdidas son diversas, pero se ha demostrado que la intensificación agrícola es una de las principales amenazas (D. Goulson et al., 2007). Esto no solo reduce la disponibilidad, diversidad y calidad de los recursos florales para las abejas, sino que también aumenta la exposición a diferentes pesticidas (Smith et al., 2014). Entre ellos, los insecticidas neonicotinoides han sido los más estudiados debido al fuerte impacto que provocan en su salud (Henry et al., 2012; Tsvetkov et al., 2017; Woodcock et al., 2016).

Las abejas están expuestas a múltiples insecticidas neonicotinoides alrededor del mundo. En 2017, Mitchell y colaboradores (2017) (Mitchell et al., 2017) analizaron 198 muestras de miel de diferentes países, encontrando al menos un neonicotinoide en el 75 % de las muestras, dos o más en el 45% y cuatro o cinco en el 10%. La coexistencia de estos insecticidas neonicotinoides, o incluso con otros pesticidas puede aumentar el daño a los polinizadores. En consecuencia, la pertinencia del uso de estos pesticidas está siendo cuestionada actualmente en muchos países (Van Der Sluijs et al., 2014), estando prohibido su uso en países de Europa y América del Norte (Brown et al., 2016). Sin embargo, su prohibición ha impulsado la introducción y uso de nuevas moléculas. Un ejemplo de esto es el insecticida sulfoxaflor, el primer insecticida a base de sulfoxamina comercializado. Fue registrado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos en 2013, y se utiliza para proteger cultivos (entre ellos el maíz, sorgo, cacao, y cítricos) contra múltiples plagas (Bacci et



al., 2018), incluyendo insectos que se alimentan de savia (pulgones) y que son resistentes a otras clases de insecticidas (Sparks et al., 2013).

El blanco de acción de los insecticidas neonicotinoides son los receptores de acetilcolina (nAChR) de las neuronas post-sinápticas del sistema nervioso central en insectos, interfiriendo con la transmisión de impulsos en el sistema nervioso central (Simon-Delso et al., 2015). Aunque muchos autores proponen que el sulfoxaflor debería clasificarse como neonicotinoide por estar direccionado al mismo blanco de acción, este se une a sitios diferentes dentro de esos receptores (Babcock et al., 2011; Cutler et al., 2013; Watson et al., 2011; Zhu et al., 2011).

Los insecticidas en base a sulfoxaminas son altamente tóxicos para algunos organismos acuáticos (Morrissey et al., 2015), y para insectos como los abejorros (Siviter et al., 2018). Un estudio reciente, demuestra que una de las formulaciones comerciales del sulfoxaflor (*Transform*®) aumenta el estrés oxidativo y el inicio de la apoptosis en las abejas melíferas expuestas a concentraciones de dicho producto encontradas en el campo. Por otro lado, actualmente el uso del sulfoxaflor se encuentra prohibido en Francia (Chakrabarti et al., 2020; EPA, 2014).

Gracias a su alta potencia y baja resistencia cruzada con otros insecticidas, el sulfoxaflor se considera una adecuada alternativa con respecto al uso de los neonicotinoides (Babcock et al., 2011). Sin embargo, poco se conoce acerca de su efecto sobre la salud de las abejas melíferas.

En los últimos años se han publicado varios trabajos científicos que demuestran el impacto negativo de los pesticidas en la microbiota intestinal, y como esto repercute en la salud de las abejas (Giambò et al., 2021). Liu *et al.* (2020) demostraron que la exposición continua durante 7 días a concentraciones altas del insecticida neonicotinoide tiacloprid (0,6 y 2,0 mg/L) causa una alta mortalidad y genera disbiosis en su microbioma intestinal. La supervivencia de las abejas no se vio

afectada cuando se intoxicaron con concentración baja de tiacloprid (0,2 mg/L) (Liu et al., 2020). Zhu et al (2020) demostraron que la intoxicación crónica con el neonicotinoide nitenpiram causa disbiosis en la microbiota intestinal, alterando también la homeostasis metabólica, la respuesta inmune de las abejas, el consumo de alimento y disminuyendo la supervivencia de las abejas (Zhu et al., 2020). En el mismo sentido, Aufauvre et al. (2014) demostraron que la exposición crónica a otros dos insecticidas neonicotinoides, fipronil e imidacloprid, puede reprimir la expresión de genes relacionados con la inmunidad (Aufauvre et al., 2014).

Por lo antes descrito, se plantea como hipótesis de este capítulo que la intoxicación con dosis subletales de sulfoxaflor altera la microbiota intestinal y la respuesta inmune de las abejas melíferas, lo que aumenta su susceptibilidad a la infección por patógenos y, reduce la supervivencia de estos insectos.

El objetivo de este capítulo es evaluar el impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con dosis subletales de sulfoxaflor en la microbiota intestinal de las abejas, la respuesta inmune, los niveles virales de DWV y la supervivencia de las abejas.

Para esto, se plantean como objetivos específicos:

- Determinar  $DL_{50}$  del sulfoxaflor en las abejas melíferas criollas en Uruguay.
- Dilucidar el impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con dosis subletales de sulfoxaflor en la microbiota intestinal de las abejas.
- Dilucidar su impacto sobre el sistema inmune y sobre los niveles del virus DWV en las abejas.
- Dilucidar su impacto en la supervivencia de estos insectos.

## *4.2 Materiales y métodos*

### *4.2.1 Determinación de DL<sub>50</sub> del sulfoxaflor en abejas melíferas de Uruguay*

El ensayo se realizó de acuerdo con lo descrito en la sección 3.1 de Materiales y Métodos. Los cuadros de cría operculada se colectaron de colonias de un apiario experimental ubicado en Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

En este caso se generaron 10 grupos de abejas, siete recibieron jarabe de sacarosa (1 kilogramos azúcar (sacarosa): 2 litros de agua) contaminado con diferentes dosis de sulfoxaflor (0,6; 0,15; 0,0375; 0,01875; 0,009375; 0,002343 y 0,0005859 µg/abeja), dos grupos recibieron dimetoato (0,10 y 0,35 µg/abeja) y un grupo solo recibió jarabe de sacarosa 1:2 como control negativo. Una vez consumidos 200 µl del tratamiento (aprox. 10 µl por abeja) se retiró el jarabe de sacarosa contaminado y se colocó jarabe de sacarosa fresco. La dosis estimada consumida por abeja se presenta en la Tabla 1.

### *4.2.2 Evaluación del impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con sulfoxaflor en abejas melíferas*

#### *4.2.2.1. Selección y obtención de las dosis del sulfoxaflor a analizar*

Con el fin de determinar las dosis subletales de sulfoxaflor a evaluar se tomaron como referencias la DL<sub>50</sub> calculada en esta tesis, la reportada en PPDB (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>) (Lewis et al., 2016) (0,026 µg/abeja y 0,146 µg/abeja respectivamente) y concentraciones detectadas a nivel de campo. Estudios sobre residuos de este pesticida en cultivos de algodón y trigo mostraron que los

niveles encontrados oscilaron entre 0,05 y 1 ppm (0,05 a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el néctar recolectado por las abejas durante el período de floración (EPA, 2014).

Teniendo estos datos en cuenta se seleccionaron como soluciones de trabajo 1 y 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de sulfoxaflor en jarabe de sacarosa 1:1 para el ensayo de intoxicación aguda, y 1; 0,5; 0,25 y 0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de sulfoxaflor en jarabe de sacarosa 1:1 para el ensayo de intoxicación crónica.

Para obtener las dosis de trabajo se disolvió el principio activo en agua destilada con el fin de obtener una solución de stock de 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . A partir de dicha solución stock, se prepararon diluciones en jarabe de sacarosa 1:1.

#### *4.2.2.2 Diseño experimental*

El ensayo de cría e intoxicación de abejas melíferas se desarrolló de acuerdo con lo descrito en la sección 3.2 de Materiales y Métodos. En este ensayo se emplearon cuadros de cría operculada de colonias de un apiario experimental ubicado en INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

**Ensayo 1.- Intoxicación oral aguda.** Se generaron tres grupos, cada uno compuesto por tres cajas con 40 abejas cada uno. Los primeros dos grupos se alimentaron con 1000  $\mu\text{L}$  de jarabe de sacarosa 1:1 contaminado con el insecticida (concentración final 1 y 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), una única vez durante las primeras 48 horas de experimento; mientras que las abejas del tercer grupo recibieron jarabe de sacarosa 1:1 constituyendo el grupo control. Asumiendo que todas las abejas ingieren la misma cantidad de jarabe de sacarosa 1:1 (25  $\mu\text{l}$  en 48hs), se estima que el consumo fue 0,0125 o 0,006  $\mu\text{g}$  de sulfoxaflor/abeja/día durante dos días.

**Ensayo 2.- Intoxicación oral crónica.** Se formaron cinco grupos, cada uno formado por tres cajas de 80 abejas y recibieron diferentes tratamientos: los primeros cuatro grupos se alimentaron con jarabe de sacarosa 1:1 contaminado con las

diferentes dosis de sulfoxaflor *ad libitum* durante toda la vida de la abeja (1; 0,5; 0,25 y 0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente). Asumiendo que el consumo de jarabe de sacarosa diario promedio es de 15  $\mu\text{L}$  (Balbuena et al., 2022), las abejas consumieron aproximadamente 0,015; 0,0075; 0,00375; o 0,0019  $\mu\text{g}/\text{abeja}/\text{día}$ . El quinto grupo de abejas se alimentó solo con jarabe de sacarosa 1:1 constituyendo el grupo control.

Todos los días se cuantificó el número de abejas muertas, se estimó el consumo de jarabe de sacarosa y cada 48 horas se reemplazó el alimento por alimento fresco con la concentración de sulfoxaflor adecuada según corresponda.

A los 4 y 7 días post-intoxicación se colectaron 10 abejas por tratamiento (4, 3 y 3 abejas por jaula) para el análisis de su microbiota intestinal. La extracción de ADN, PCR cuantitativa para estimar la abundancia de bacterias intestinales por abeja y la secuenciación masiva de la región V3-V4 del ARNr16S y análisis de datos se realizó de acuerdo con lo descrito en la sección 3.2.2 de Materiales y Métodos.

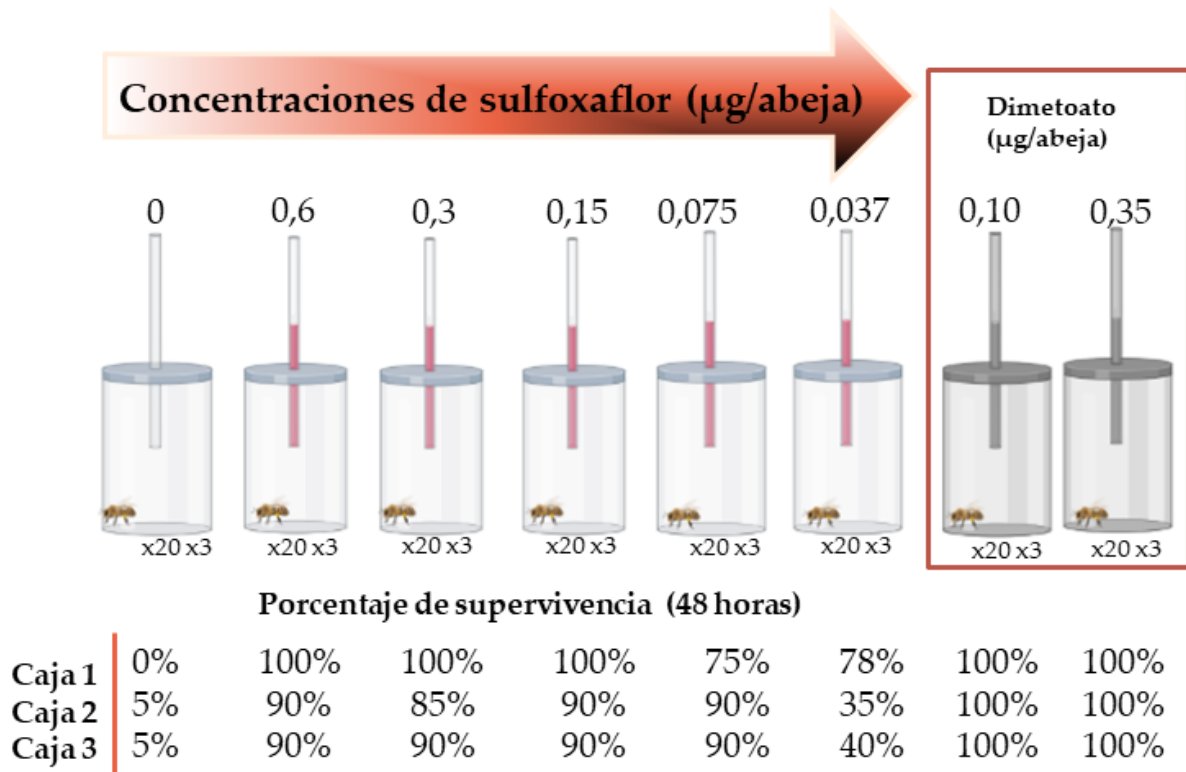
También se colectaron 12 abejas por tratamiento (4 por jaula) para el análisis de la expresión de genes vinculados a la respuesta inmune y nivel de infección por DWV. La extracción de ARN, RT, qPCR y análisis de datos se realizaron según lo descrito en la sección 3.2.3 de Materiales y Métodos.

## ***4.3- Resultados***

### ***4.3.1 Dosis letal 50 de sulfoxaflor en abejas melíferas de Uruguay***

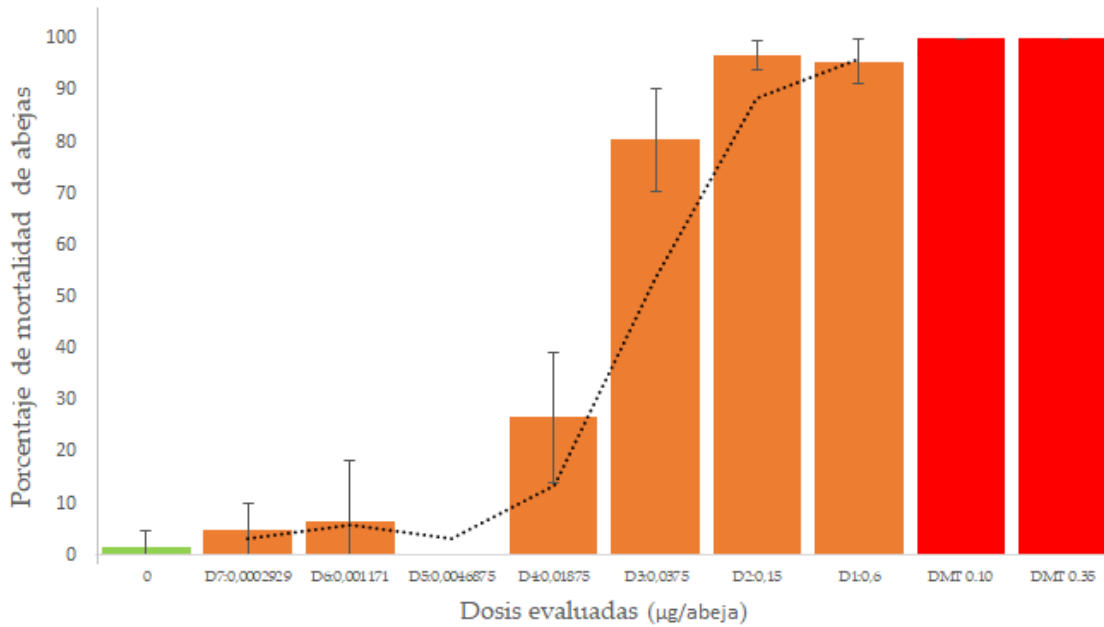
En el primer ensayo de esta tesis se evaluó la toxicidad aguda de diferentes dosis de sulfoxaflor sobre abejas melíferas. En los grupos controles (sin intoxicación) se obtuvieron porcentajes de mortalidad menores e iguales al 5%, mientras que en los grupos de abejas tratadas con dimetoato (control positivo) se observó un porcentaje de mortalidad del 100% antes de las 48 horas post-intoxicación (Figura 2).

De acuerdo con los requisitos y criterios establecidos por EPPO (1992), esto valida los resultados de los bioensayos.



**Figura 2.-** Esquema representativo del ensayo de determinación de la  $DL_{50}$  realizado para el S, y los resultados obtenidos.

En cuanto a la mortalidad ocasionada por el sulfoxaflor, los datos presentaron una distribución sigmoide, de acuerdo con lo esperado (Figura 3). La  $DL_{50}$  determinada estuvo en el rango 0,023 - 0,031  $\mu\text{g}$  por abeja, siendo el valor promedio de 0,026  $\mu\text{g}/\text{abeja}$  y una desviación estándar de 0,005  $\mu\text{g}/\text{abeja}$  (Tabla 3).



**Figura 3.-** Determinación de la DL<sub>50</sub> del sulfoxaflor en abejas melíferas. Porcentaje de mortalidad de abejas intoxicadas con diferentes dosis de este pesticida (0 a 0,6 µg/abeja) a las 48 horas post-intoxicación. Las ultimas dos barras rojas corresponden a las dosis empleadas del insecticida dimetoato (0,10 y 0,35 µg/abeja).

**Tabla 3.-** Dosis letales medias (DL<sub>50</sub>) del sulfoxaflor (ingrediente activo) en abejas melíferas, expresadas como µg por abeja, con el desvío estándar correspondientes entre paréntesis; y el promedio final de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) del insecticida para las abejas.

Sulfoxaflor	DL <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µg/abeja)	Pendiente ± E.E <sup>b</sup>
Réplica 1	0,031 [0,027-0,036]	15,65 ± 5,61
Réplica 2	0,023 [0,016-0,034]	26,10 ± 4,97
Réplica 3	0,023 [0,020-0,027]	37,38 ± 7,68
<b>DL<sub>50</sub></b>	<b>0,026 ± 0,005</b>	

<sup>a</sup> La dosis letal que causa la mortalidad del 50% de los individuos en 48 horas con un 95% de confianza.

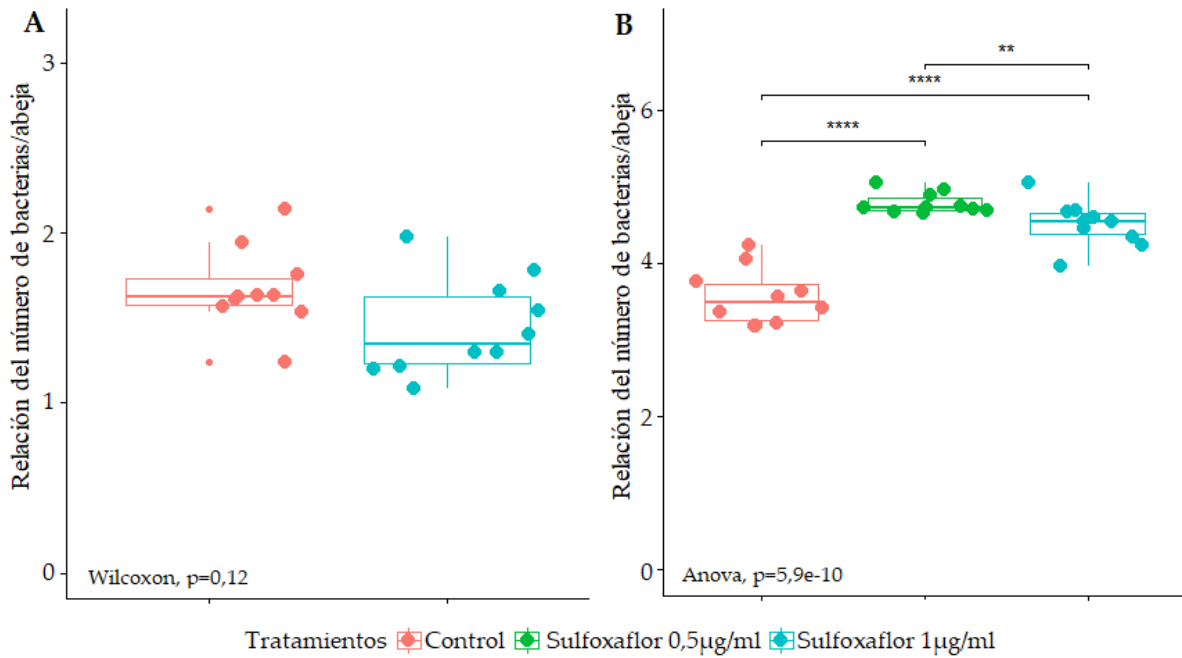
<sup>b</sup> Pendiente ± error estándar de la regresión lineal entre la mortalidad y las dosis.

### *4.3.2 Impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con sulfoxaflor en las microbiota intestinal de las abejas*

Una vez establecida la  $DL_{50}$  del sulfoxaflor en abejas ( $0,026 \mu\text{g}/\text{abeja}$ ) y teniendo también en cuenta la dosis publicada ( $0,146 \mu\text{g}/\text{abeja}$ ), se escogieron dosis subletales y se evaluó el impacto de la intoxicación oral aguda y crónica en las abejas. En el ensayo de intoxicación aguda, las abejas consumieron  $12,5 \mu\text{L}$  de la solución  $1$  o  $0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  por día durante  $2$  días, ingiriendo alrededor de  $0,0125$  o  $0,0062 \mu\text{g}/\text{abeja}/\text{día}$ . En el ensayo de intoxicación crónico, asumiendo que el consumo diario de jarabe de sacarosa de las abejas es de  $15 \mu\text{L}$ , consumieron aproximadamente  $0,015$ ,  $0,0075$ ,  $0,00375$  o  $0,0019 \mu\text{g}/\text{abeja}/\text{día}$ .

En primer lugar se evaluó su impacto en la microbiota intestinal, mediante la secuenciación de un amplicón del gen que codifica para el ARN ribosomal  $16\text{S}$ . En los ensayos de intoxicación aguda con  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  de sulfoxaflor no se evidenciaron cambios significativos en el número de bacterias totales en el intestino de las abejas con respecto al grupo control (Wilcoxon test  $p=0,12$ , Figura 4A). Mientras que la intoxicación crónica generó un incremento significativo en el número de bacterias totales de la microbiota intestinal (Anova  $p<0,05$ , Figura 4B).



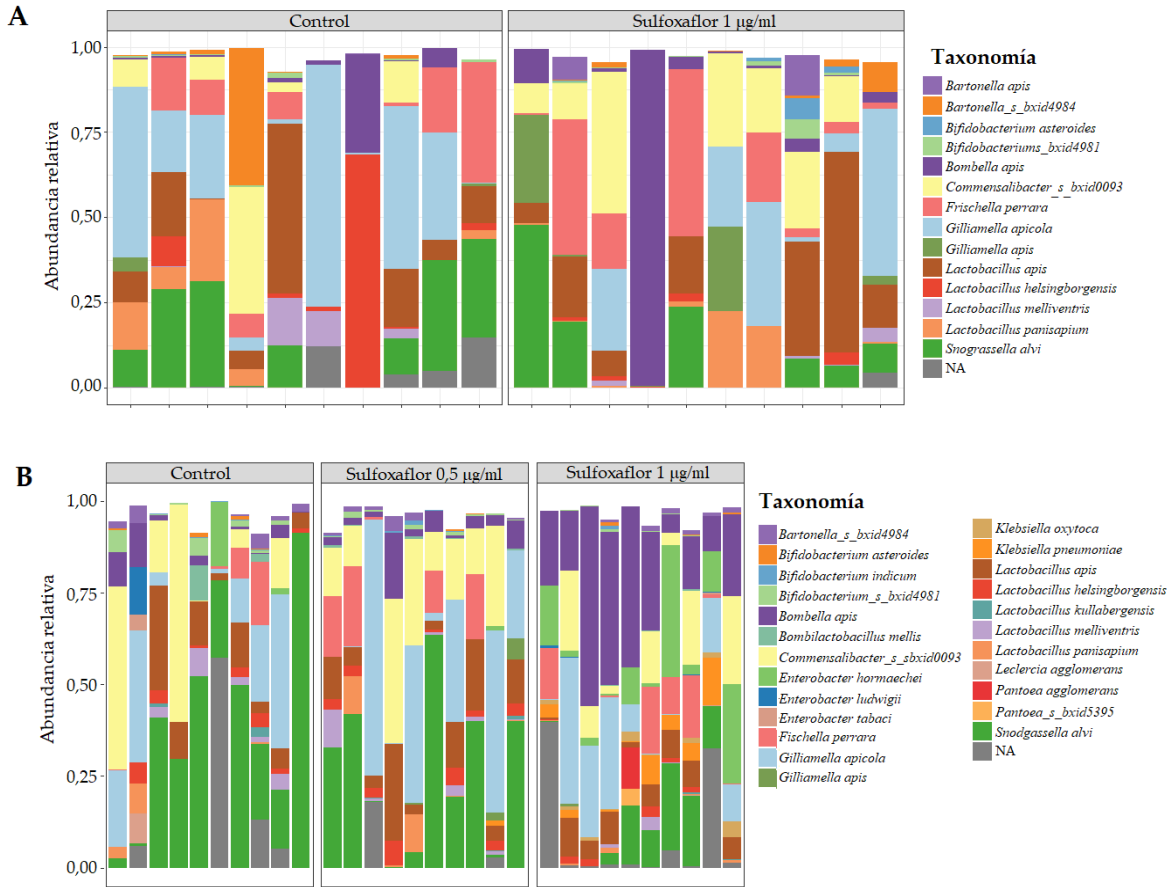


**Figura 4.-** Impacto de la intoxicación aguda (A) o crónica (B) con sulfoxaflor en el número de bacterias totales en el intestino de las abejas melíferas. Se presenta la estimación del número de bacterias mediante la relación número de copias del gen de ARNr 16S sobre el número de copias del gen RPS5 de la abeja.

Posteriormente se estudió la estructura y diversidad de la microbiota intestinal mediante secuenciación de la región V3-V4 del gen de ARNr 16S. Se obtuvieron, en el ensayo de intoxicación aguda, 574.036 secuencias pertenecientes a 342 ASVs en un total de 20 muestras, con un promedio de 28.702 secuencias por muestra. En el ensayo de intoxicación crónica se obtuvieron 973.511 secuencias pertenecientes a 415 ASVs en las 30 muestras analizadas, con un promedio de 30.000 reads por muestra.

En ambos ensayos la microbiota intestinal de las abejas estuvo formada por los géneros bacterianos descritos en estos insectos incluyendo *Bombilactobacillus* Firm-4, *Lactobacillus* spp. Firm-5, *Bifidobacterium* sp., *Snodgrassella* spp. y *Gilliamella* spp., que constituyen el núcleo, así como también otras especies como:

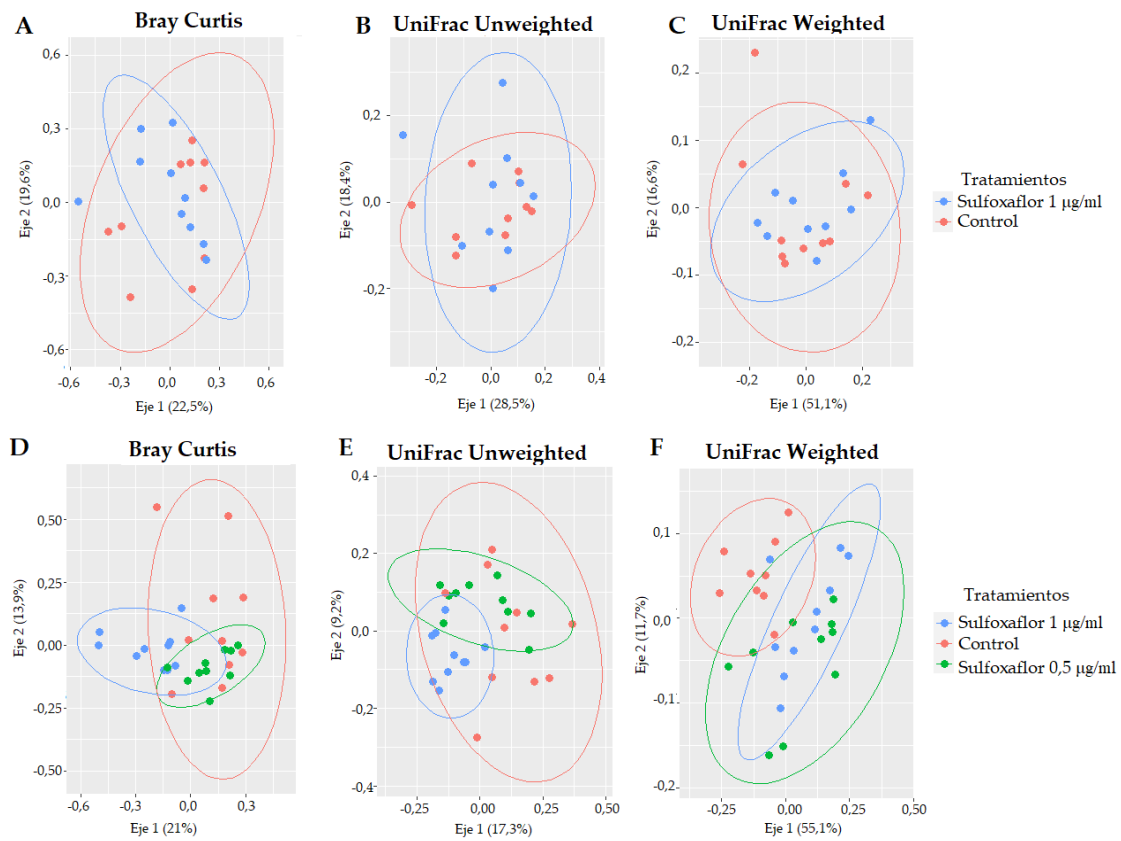
*Comensalibacter* spp., *Bartonella* sp., *Bombella* spp., *Apibacter* spp., y *Frischella perrara* (Figura 5A-B).



**Figura 5.-** Impacto del sulfoxaflor en la microbiota intestinal de las abejas. A.- Abundancias relativas de especies bacterianas en abejas sometidas a la intoxicación aguda con 1 µg/mL. B.- Abundancias relativas de especies bacterianas en abejas sometidas a intoxicación crónica con 0,5 y 1 µg/mL.

La intoxicación aguda así como la crónica con sulfoxaflor no provocaron cambios significativos en la diversidad alfa, de acuerdo con el índice de ASVs observadas y al índice de Shannon. La intoxicación aguda tampoco generó cambios en la diversidad beta según los índices de Bray-curtis, UniFrac unweighted y/o UniFrac weighted (Tabla 4). Sin embargo, la intoxicación crónica (1 µg/mL) si afectó la diversidad beta, según el índice de UniFrac weighted (permanova  $p < 0,05$ ) (Figura

6F). Este índice toma como base las diferencias en la abundancia de los microorganismos observados. La dispersión entre los individuos fue similar en los diferentes grupos (Betadisper: UniFrac weighted  $p=0,34$ ), validando la comparación. Por otro lado esto no se cumplió para los índices de Bray-Curtis y UniFrac unweighted (Betadisper: Bray-curtis dissimilarities  $p=0,005$ ; UniFrac unweighted  $p=0,005$ ), por lo que esos resultados no se consideraron (Figura 6).



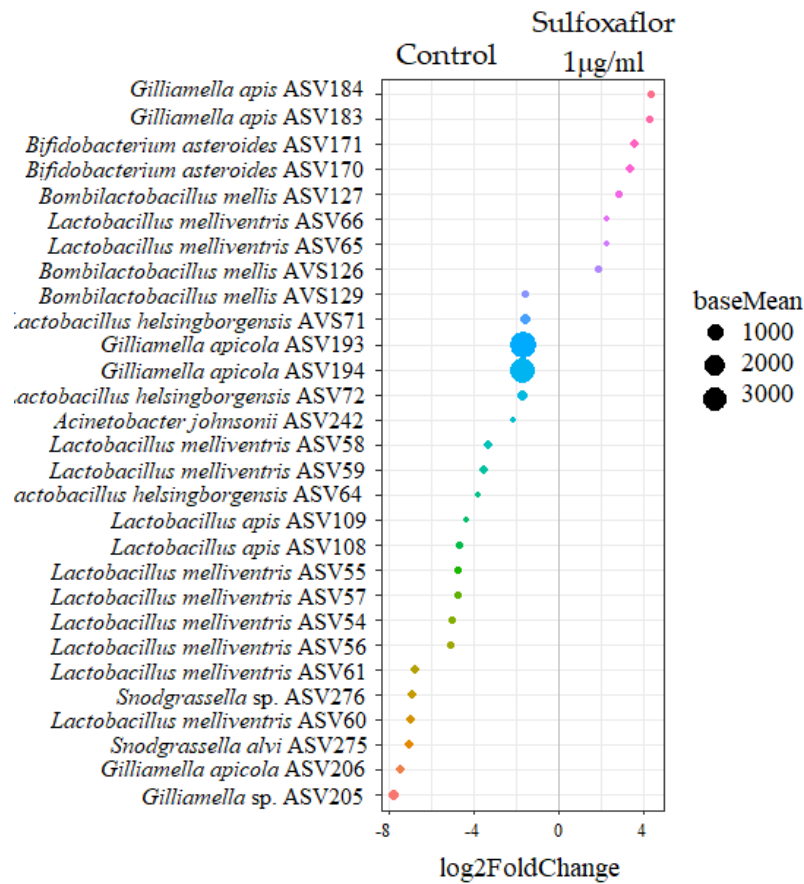
**Figura 6.-** Índice de diversidad beta (A-D Bray Curtis, B-E UniFrac UnWeighted – C-F Weighted) de las comunidades bacterianas intestinales de los diferentes tratamientos de abejas intoxicadas aguda con las dosis de sulfoxaflor (ABC) y de forma crónica (DEF).

**Tabla 4.-** Efecto de la exposición oral aguda y crónica de sulfoxaflor en la microbiota intestinal de las abejas melíferas, evaluado por PERMANOVA. Se consideraron estadísticamente significativos valores de p iguales y menores de 0,05 (en negrita).

<b>BETADISPER</b>	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>	<i>Grupo 3</i>	<b>Pseudo F</b>	<b>Valor p</b>
<i>Exposición oral aguda</i>					
<b>Bray Curtis</b>				0,0263	0,879
<b>UniFrac Weighted</b>	Control jarabe		Sulfoxaflor 1 µg/ml	0,0035	0,966
<b>UniFrac Unweighted</b>				25,759	0,123
<i>Exposición oral crónica</i>					
<b>Bray Curtis</b>				7,20	<b>0,005</b>
<b>UniFrac Weighted</b>	Control jarabe	Sulfoxaflor 0,5 µg/ml	Sulfoxaflor 1 µg/ml	0,34	1,093
<b>UniFrac Unweighted</b>				5,54	0,008
<b>PERMANOVA</b>	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>	<i>Grupo 3</i>	<b>Pseudo F</b>	<b>Valor p</b>
<i>Exposición oral aguda</i>					
<b>Bray Curtis</b>				1,270	0,27
<b>UniFrac Weighted</b>	Control jarabe		Sulfoxaflor 1 µg/ml	-0,040	0,71
<b>UniFrac Unweighted</b>				-0,008	0,52
<i>Exposición oral crónica</i>					
<b>Bray Curtis</b>				3,080	<b>0,001</b>
<b>UniFrac Weighted</b>	Control jarabe	Sulfoxaflor 0,5 µg/ml	Sulfoxaflor 1 µg/ml	0,279	<b>0,001</b>
<b>UniFrac Unweighted</b>				0,134	<b>0,001</b>

Para identificar las especies bacterianas más afectadas por la intoxicación con sulfoxaflor se empleó el análisis de DESeq2, realizando comparaciones pareadas entre los tratamientos. Este análisis solo se realizó en abejas melíferas expuestas de forma aguda al sulfoxaflor (1 µg/mL) vs el grupo control, ya que, en el ensayo de intoxicación crónica, el pesticida alteró significativamente el número de bacterias totales y la comparación no sería adecuada.

La intoxicación aguda con sulfoxaflor disminuyó significativamente la abundancia de ASV identificados como *S. alvi*, *G. apicola*, *Lactobacillus* y aumentó la abundancia de dos ASVs pertenecientes a *Bifidobacterium*, en comparación con el grupo de control (Figura 7).



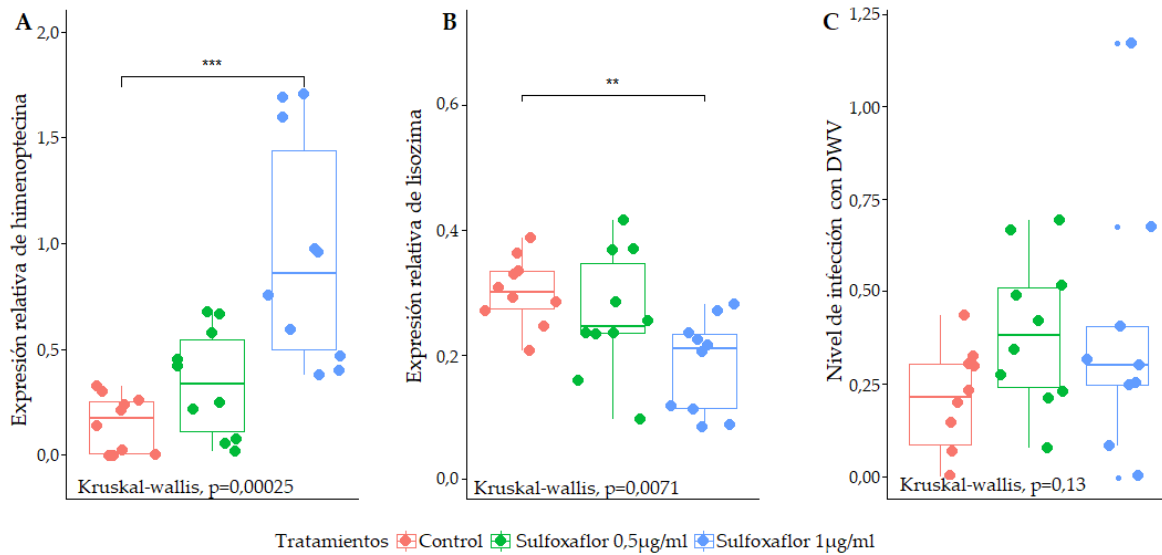
**Figura 7.-** Comparación de las abundancias de diferentes ASVs entre las comunidades bacterianas de las abejas intoxicadas de forma aguda con 1 µg/mL de sulfoxaflor con respecto al grupo control, obtenida de los análisis de DESeq2. Valores de *fold change* >0 indican que las abundancias fueron mayores para el grupo correspondiente.

### *4.3.3 Impacto de la intoxicación oral aguda y crónica del sulfoxaflor en la expresión de genes y el nivel de infección por patógenos como el virus de las alas deformadas*

La intoxicación oral aguda con sulfoxaflor (1 µg/mL) no generó una alteración en la expresión de los diferentes genes estudiados (glucosa oxidasa, lisozima, himenoptecina, vitelogenina).

Por otro lado, la intoxicación crónica afectó la expresión de los genes de himenoptecina y lisozima (Figura 8), pero no afectó la expresión de la glucosa oxidasa ni la expresión de la vitelogenina. En particular, la intoxicación con sulfoxaflor (1 µg/mL) aumentó la expresión del gen que codifica para la himenoptecina con respecto al grupo control (KW, H=13.24, p=0,0025 – M-W p=0,0007) (Figura 8A). A la vez, disminuyó la expresión del gen que codifica para la lisozima con respecto al grupo control (KW, H=9,88, p=0,0071 – M-W p=0,002 (Figura 8B). La intoxicación con la dosis más baja de sulfoxaflor (0,5 µg/mL) no generó alteraciones en la expresión de los genes estudiados.

Respecto a la infección por DWV, si bien el nivel de infección por este virus fue mayor en aquellas abejas intoxicadas con las dos dosis de sulfoxaflor de forma crónica respecto al grupo control, esto no fue significativo (KW p=0,13) (Figura 8C).



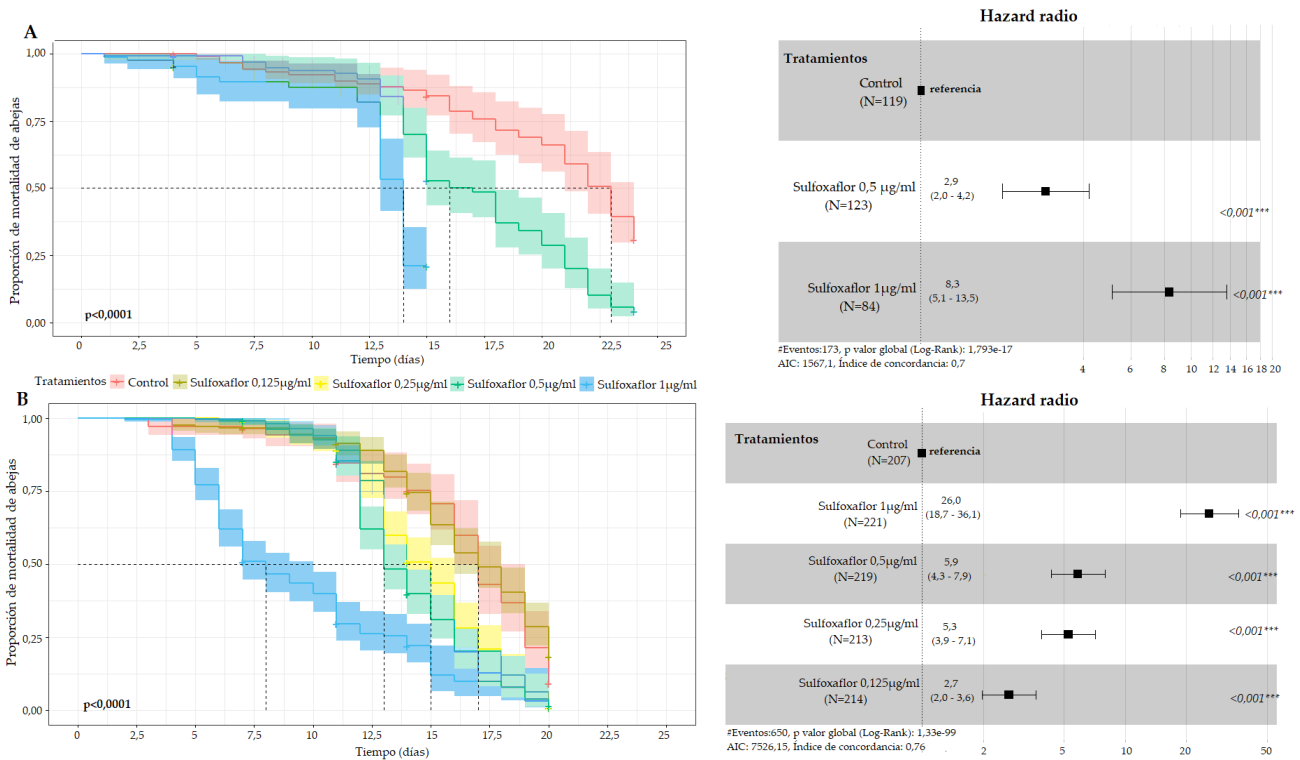
**Figura 8.-** Impacto de dosis de sulfoxaflor en la inmunidad de las abejas. Expresión relativa de himenoptecina, lisozima y niveles de infección del virus de las alas deformes, en abejas sometidas a los diferentes tratamientos. Los asteriscos indican las diferencias significativas (valores p por debajo de 0,05).

#### *4.3.4 Impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con sulfoxaflor en el consumo y la supervivencia de las abejas*

La administración oral aguda de sulfoxaflor (0,5 y 1 µg/mL) disminuyó significativamente la supervivencia de las abejas con respecto al grupo control (Test de Log-Rank, Estadístico=13,3;  $p < 0,001$ ) (Figura 9A). De acuerdo con el análisis de las curvas de supervivencia, el tiempo letal medio se estimó en 17 y 15 días, respectivamente, aumentando en 2,9 y 8,3 veces el riesgo de muerte de las abejas.

La intoxicación oral crónica con las diferentes dosis de sulfoxaflor evaluadas también disminuyó significativamente la supervivencia de las abejas con respecto al grupo control (Test de Log-Rank, Estadístico=516,7;  $p < 0,001$ ). De acuerdo con el análisis de las curvas de supervivencia se estimó el tiempo letal medio de 17 días para las abejas intoxicadas con la solución de 0,125 µg/mL, 14 días para las abejas intoxicadas con 0,25 µg/mL, 13 días para las abejas intoxicadas con 0,5 µg/mL y 7

días para las abejas intoxicadas con 1 µg/mL del insecticida (Figura 9B). La intoxicación con este insecticida (0,125; 0,25; 0,5 y 1 µg/mL) incrementó 2,3; 5,3; 5 y 27,3 veces el riesgo de muerte en las abejas, respectivamente (Figura 9B).



**Figura 9.-** Curvas de mortalidad y riesgo de muerte de las abejas intoxicadas de forma aguda (A) y crónica (B) con dosis subletales de sulfoxaflor, con el correspondiente valor de significancia del test Log-rank.

Por último, durante los primeros 15 días de vida las abejas que fueron intoxicadas de forma aguda con la dosis de sulfoxaflor, mostraron un consumo de jarabe de sacarosa similar a las abejas del grupo control. Por otro lado, aquellas abejas intoxicadas de forma crónica consumieron significativamente menos jarabe de sacarosa comparadas al grupo control (Tabla 5).



**Tabla 5.-** Efecto del sulfoxaflor en el consumo de jarabe de sacarosa, evaluado por modelos lineales mixtos generalizados. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de p inferiores a 0,05 y se muestran en negrita.

Variable dependiente	Variable independiente	Valor del coeficiente	Valor del intercepto	Valor p
Consumo de jarabe	Intoxicación aguda con sulfoxaflor 1 µg/ml	-0,06	3,12	0,5
	Intoxicación aguda con sulfoxaflor 0,5 µg/ml	-0,04		0,4
	Intoxicación crónica con sulfoxaflor 1 µg/ml	-0,27	3,05	<b>0,05</b>
	Intoxicación crónica con sulfoxaflor 0,5 µg/ml	-0,04		0,2
	Intoxicación crónica con sulfoxaflor 0,25 µg/ml	-0,06		0,08
	Intoxicación crónica con sulfoxaflor 0,125 µg/ml	-0,07		<b>0,03</b>

## 4.4 Discusión

Durante los últimos años ha habido una creciente preocupación por el impacto de los insecticidas en los organismos no blancos, como las abejas melíferas. Esto se ve reflejado en el aumento de las publicaciones que evidencian sus efectos negativos, especialmente en el caso de los neonicotinoides (Botías & Sánchez-Bayo, 2018; Serrão et al., 2022). Como consecuencia, se ha estimulado el desarrollo y uso de nuevos insecticidas como es el caso del sulfoxaflor, derivado de las sulfoxamidas. Sin embargo, es escaso el conocimiento existente sobre su impacto en la salud de las abejas melíferas.

En este trabajo en primer lugar se determinó la  $DL_{50}$  del sulfoxaflor (ingrediente activo) en abejas melíferas. Basados en la clasificación toxicológica de Johansen y Mayer (1990), los pesticidas cuya  $DL_{50}$  sean menores de 2 µg/abeja son altamente tóxicos para *A. mellifera*. El valor de dosis letal 50 del sulfoxaflor obtenido en este trabajo en abejas melíferas criollas fue casi 10 veces menor que la dosis letal 50 reportada para dicho insecticida en Europa, lo que sugeriría que nuestras abejas son más sensibles a estas intoxicaciones que las abejas de origen europeo. Este resultado es de suma importancia a la hora considerar las condiciones de aplicación de este producto en los cultivos en nuestro país, resaltando la relevancia de buscar

métodos de manejo que reduzcan la exposición de los polinizadores a estos pesticidas.

La intoxicación con dosis subletales de sulfoxaflor generó alteraciones importantes en la microbiota intestinal de las abejas. La intoxicación durante un corto período de tiempo, denominada en esta tesis como intoxicación aguda, redujo la abundancia de los principales grupos bacterianos como *G. apicola*, *S. alvi* y varias especies de *Lactobacillus* spp. incluyendo *Lactobacillus melliventris*, *Lactobacillus apis* y *Lactobacillus helsingborgensis*. Estas especies de *Lactobacillus* spp. pertenecen al grupo de bacterias ácido láctico, las cuales se caracterizan por producir ácidos orgánicos como resultado de la fermentación del metabolismo de los carbohidratos (Quinto et al., 2014). Pueden producir compuestos bioactivos como el ácido láctico, ácido acético y ácido fórmico, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), etanol, enzimas, benzoato, ácidos grasos libres y compuestos volátiles que actúan como antimicrobianos de amplio espectro frente a varios patógenos (Niode et al., 2020), por lo que se consideran bacterias benéficas y son potenciales candidatos para el desarrollo de probióticos. La reducción en su abundancia podría implicar una desventaja frente a la infección por patógenos.

La intoxicación crónica con sulfoxaflor generó alteraciones aún mayores en la microbiota intestinal, aumentando de forma significativa el número de bacterias totales. En este caso se observa un notorio aumento en la abundancia de *Bombella apis*. Esta bacteria tiene grandes capacidades metabólicas, lo que le permite ocupar diferentes nichos en la colmena (Smith y Newton, 2020).

En estudios previos, Rouzé y colaboradores (2019) encontraron que la exposición crónica a cuatro insecticidas neurotóxicos (cumafós, fipronil, tiametoxam e imidacloprid) disminuye la abundancia de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en la microbiota intestinal de las abejas melíferas (Rouzé et al., 2019). En el mismo sentido, Alberoni y colaboradores, (2021) encontraron que la intoxicación a largo plazo con

dos neonicotinoides (imidacloprid y tiacloprid) afectó la abundancia de varias especies microbianas como *Frischella* sp., *Lactobacillus* (Firm-4 y Firm-5) y *Bifidobacterium* sp. Esto generó también un aumento en la susceptibilidad a la infección por patógenos oportunistas (Alberoni et al., 2021).

Estos estudios confirman el impacto negativo de los insecticidas en la microbiota intestinal de las abejas. Sin embargo, los efectos dependen del pesticida analizado y del grado de exposición, ya que Raymann & Moran (2018) y Balbuena y colaboradores (2022) no encontraron impacto negativo del imidacloprid en la microbiota luego de la exposición durante períodos cortos.

Los insecticidas ingeridos se absorben en el intestino y se diseminan por todo el cuerpo, lo que podría explicar el efecto observado en la microbiota. Pero además de este potencial efecto directo, pueden generar efectos indirectos a través de la alteración de la morfología intestinal (Rouzé et al., 2019). En este sentido, Catae y colaboradores (2018) demostraron que abejas expuestas durante 4 días a concentraciones subletales del insecticida imidacloprid presentaron núcleos celulares con cromatina condensada y una evidente desorganización de la envoltura nuclear. La condensación de la cromatina es una característica típica de la apoptosis y está relacionada con la disminución de la actividad de las células, con lo que ellos concluyen que el imidacloprid resulta citotóxico para las células digestivas de las abejas. Estos cambios en la morfología probablemente generen alteraciones en la microbiota intestinal.

La exposición a pesticidas también afecta la función del sistema inmune de los insectos (James & Xu, 2012), incluidas las abejas (Alaux et al., 2009; Aufauvre et al., 2014; Brandt et al., 2016; Di Prisco et al., 2013; Underwood et al., 2012). Estas alteraciones pueden afectar la regulación de la microbiota intestinal que realiza el hospedero, alterando la estructura o composición de la comunidad (Engel & Moran, 2013b; Hooper et al., 2012; Nyholm & Graf, 2012).

En este trabajo demostramos que la intoxicación de las abejas con dosis subletales de sulfoxaflor provocó una disminución en la expresión del gen que codifica para la lisozima, un factor de inmunidad no específico que hidroliza los enlaces glucosídicos (1, 4) en la capa de peptidoglucano de la membrana celular bacteriana. La lisozima también promueve la expresión de péptidos antimicrobianos, optimizando la respuesta inmune (Imler & Bulet, 2005; Schneider, 1985). La disminución en la expresión de dicha enzima en abejas melíferas puede estar asociada con una capacidad defensiva disminuida contra patógenos. A su vez, la intoxicación crónica por sulfoxaflor en las abejas produjo un incremento en la expresión del gen que codifica para la himenoptecina (un péptido antimicrobiano) (P. Casteels et al., 1993). James & Xu, (2012) proponen que la himenoptecina podría ser un factor importante para restringir o eliminar diferentes patógenos en el sistema inmunitario innato de la abeja. Dado que la intoxicación crónica con sulfoxaflor generó un incremento en el número de bacterias totales intestinales, el aumento de este péptido antimicrobiano podría constituir una respuesta para evitar posibles infecciones.

Los resultados aquí presentados evidencian que la intoxicación de las abejas melíferas con sulfoxaflor genera alteraciones (disbiosis) en la microbiota intestinal y en la respuesta inmune, culminando con una disminución significativa de su supervivencia y un aumento del riesgo de muerte. Aunque las abejas intoxicadas de forma crónica con sulfoxaflor consumieron menos jarabe de sacarosa, el consumo de sacarosa debería ser suficiente para sobrevivir, ya que las abejas necesitan 4 mg de azúcar utilizable por día para sobrevivir (alrededor de 8  $\mu$ L de solución de sacarosa al 50% por abeja por día (Barker & Lehner, 1974). Esto sugiere que la muerte de las abejas no estuvo asociada con el hambre en la mayoría de los casos.

Esos resultados revelan la importancia de monitorear el impacto de los pesticidas por períodos más largos que lo estipulado en las normas actuales (durante

10 días, OECD, 2017) para desenmascarar los posibles efectos negativos que no se pueden observar durante los estudios a corto plazo.

## 5. CAPÍTULO 2. “Efecto del herbicida glufosinato de amonio en la salud de las abejas”

---

### 5.1 Introducción

El glifosato es el herbicida más utilizado alrededor del mundo (Benbrook, 2016). Sin embargo, la aparición de cultivos resistentes a este herbicida ha impulsado su sustitución por el glufosinato de amonio, un herbicida no selectivo de amplio espectro (Takano & Dayan, 2020). El glufosinato fue descubierto durante el estudio de actinomicetes, uno de los grupos de microorganismos más importantes del suelo. *Streptomyces hygroscopicus* y *S. viridochromogenes* son capaces de producir un herbicida tripéptido (L-alanina-L-alanina-L- fosfinotricina) llamado bialafos, el cual dentro de las plantas es metabolizado dando lugar a L-fosfinotricina (PT) (glufosinato) (Takano & Dayan, 2020). Este pesticida inhibe la enzima glutamina sintetasa de plantas susceptibles, la segunda proteína más abundante, esencial para el metabolismo del nitrógeno (Takano & Dayan, 2020). Así, se acumulan niveles letales de amoníaco, alterando las membranas celulares (Berlicki, 2008; Lea & Mifflin, 2010). El glufosinato de amonio se usa ampliamente en los EE. UU. y América del Sur, principalmente en soja y algodón resistentes (Takano & Dayan, 2020). Sin embargo, ha sido prohibido recientemente en Europa debido a preocupaciones toxicológicas (Regulación (EC) No. 1107/2009 del Parlamento Europeo).

Diferentes estudios han demostrado que el glufosinato de amonio altera significativamente la comunidad bacteriana del suelo (Ahmad & Malloch, 1995; Pampulha et al., 2007). El modo de acción del glufosinato de amonio podría deberse a la inhibición de la enzima glutamato sintetasa, tal como ocurre en las plantas, ya que esta enzima está presente en los microorganismos como bacterias y hongos (Kortekamp & Kortekamp, 2011).

## CAPÍTULO 2. “Efecto del herbicida glufosinato de amonio en la salud de las abejas”

Por lo antes expuesto, se plantea como hipótesis de este trabajo que el glufosinato de amonio altera la microbiota intestinal de las abejas, probablemente a través de la inhibición de la enzima glutamato sintetasa en estos microorganismos. Esto afecta también la respuesta inmune de las abejas y disminuye su supervivencia.

El objetivo de este capítulo es evaluar el efecto de la intoxicación con dosis subletales de glufosinato de amonio en la estructura y composición de la microbiota intestinal de las abejas, en la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune, sobre los niveles de infección de DWV y finalmente en la supervivencia de las abejas.

Para llevar a cabo dicho objetivo, se plantean como objetivos específicos:

- Dilucidar el impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con dosis subletales de glufosinato de amonio en la microbiota intestinal de las abejas.
- Dilucidar su impacto sobre el sistema inmune y sobre los niveles del virus DWV en las abejas.
- Dilucidar su impacto en la supervivencia de estos insectos.

## *5.2 Materiales y métodos*

### *5.2.1 Evaluación del impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con glufosinato de amonio en abejas melíferas*

#### 5.2.2.1. Selección y obtención de las dosis de glufosinato a analizar

Con el fin de determinar las dosis subletales de trabajo de glufosinato de amonio (ingrediente activo, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) se tomó como referencia su  $DL_{50}$  reportada en *PPDB* (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>)(Lewis et al., 2016), 600  $\mu\text{g}/\text{abeja}$ . En base a este dato se seleccionaron las siguientes soluciones de trabajo: D1: 500 y D2: 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Para obtener las dosis de trabajo, el principio activo se disolvió en agua destilada obteniendo una la solución de stock (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A partir de dicha solución de stock se obtuvieron las dosis de trabajo mediante diluciones en jarabe de sacarosa 1:1.

#### 5.2.2.2 Diseño experimental

El ensayo de cría e intoxicación de abejas melíferas se llevó adelante de acuerdo con lo descrito en la sección 3.2 de Materiales y Métodos. Las colonias empleadas pertenecieron a un apiario experimental ubicado en INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

Se realizaron dos ensayos (i) intoxicación oral aguda; (ii) intoxicación oral crónica (durante toda la vida de la abeja).

**Ensayo 1.- Intoxicación oral aguda.** Seis cajas de abejas (con 40 abejas por caja) se dividieron en dos grupos (tres jaulas por grupo) y se les administraron diferentes tratamientos. Las abejas del grupo 1 se alimentaron con 1000  $\mu\text{L}$  de jarabe de



sacarosa contaminado con glufosinato de amonio (500 µg/mL), una única vez durante las primeras 48 horas de experimento. Asumiendo que todas las abejas consumen la misma cantidad de jarabe de sacarosa (25 µL en 48 horas), se estima que cada abeja consumió 6,25 µg de glufosinato/día, durante dos días. Las abejas del grupo 2 recibieron jarabe de sacarosa 1:1 constituyendo el grupo control.

**Ensayo 2.- Intoxicación oral crónica.** Se formaron tres grupos, cada uno con tres cajas con 80 abejas. Cada grupo recibió un tratamiento diferente: las abejas del grupo 1 y 2 se intoxicaron con jarabe de sacarosa 1:1 contaminado con glufosinato de amonio *ad libitum* durante toda la vida de la abeja (500 µg/mL y 50 µg/mL, respectivamente), mientras que el tercer grupo de abejas se alimentó con jarabe de sacarosa 1:1 constituyendo el grupo control. Asumiendo que las abejas melíferas consumen 15 µL de jarabe/día (Balbuena et al., 2022), estarían consumiendo 7,5 y 0,75 µg de glufosinato/abeja/día, para las soluciones de 500 y 50 µg/mL, respectivamente.

Todos los días se cuantificó el número de abejas muertas y se estimó el consumo de jarabe de sacarosa. Cada 48 horas, se reemplazó el alimento por alimento fresco, con la concentración de glufosinato de amonio adecuada según corresponda.

A los 4 o 7 días post-intoxicación (ensayo de intoxicación oral aguda o crónica, respectivamente), se colectaron 10 abejas por tratamiento (4, 3 y 3 abejas por jaula) para el análisis de su microbiota intestinal. La extracción de ADN, PCR cuantitativa para estimar la abundancia de bacterias por abeja, la secuenciación masiva de la región V3-V4 del ARNr16S y análisis de datos se realizaron de acuerdo con lo descrito en la sección 3.2.2 de Materiales y Métodos. También se colectaron 12 abejas por tratamiento (4 por jaula), para el análisis de la expresión de genes vinculados a la respuesta inmune, y nivel de infección por DWV. La extracción de ARN, RT, qPCR,

y análisis de datos se realizaron según lo descrito en la sección 3.2.3 de Materiales y Métodos.

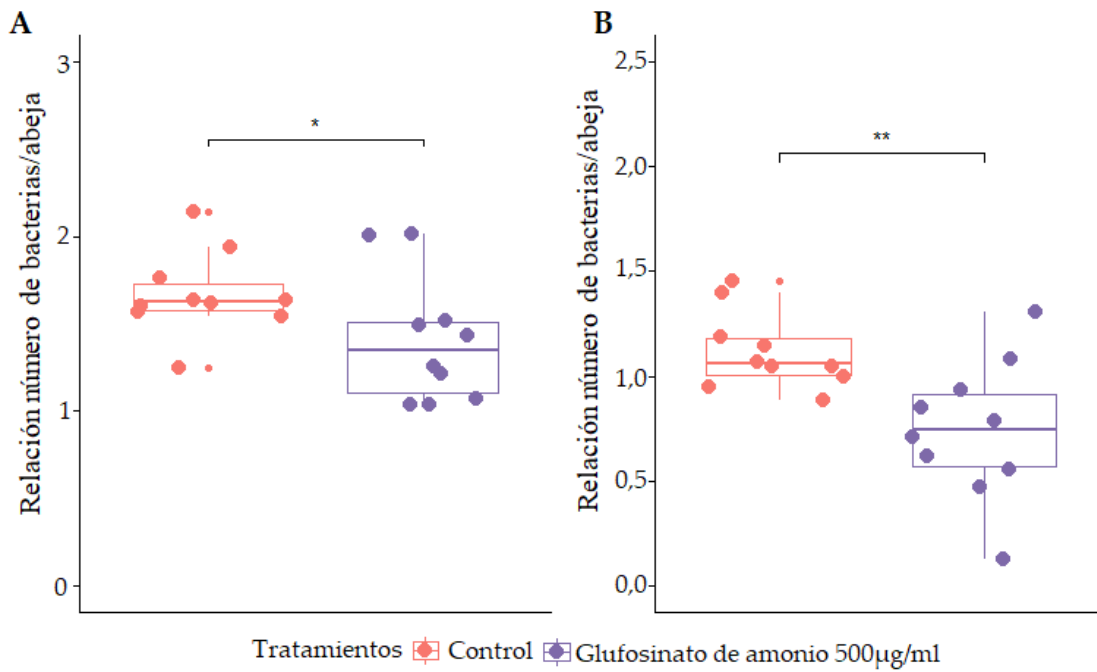
## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con glufosinato de amonio en la microbiota intestinal de las abejas

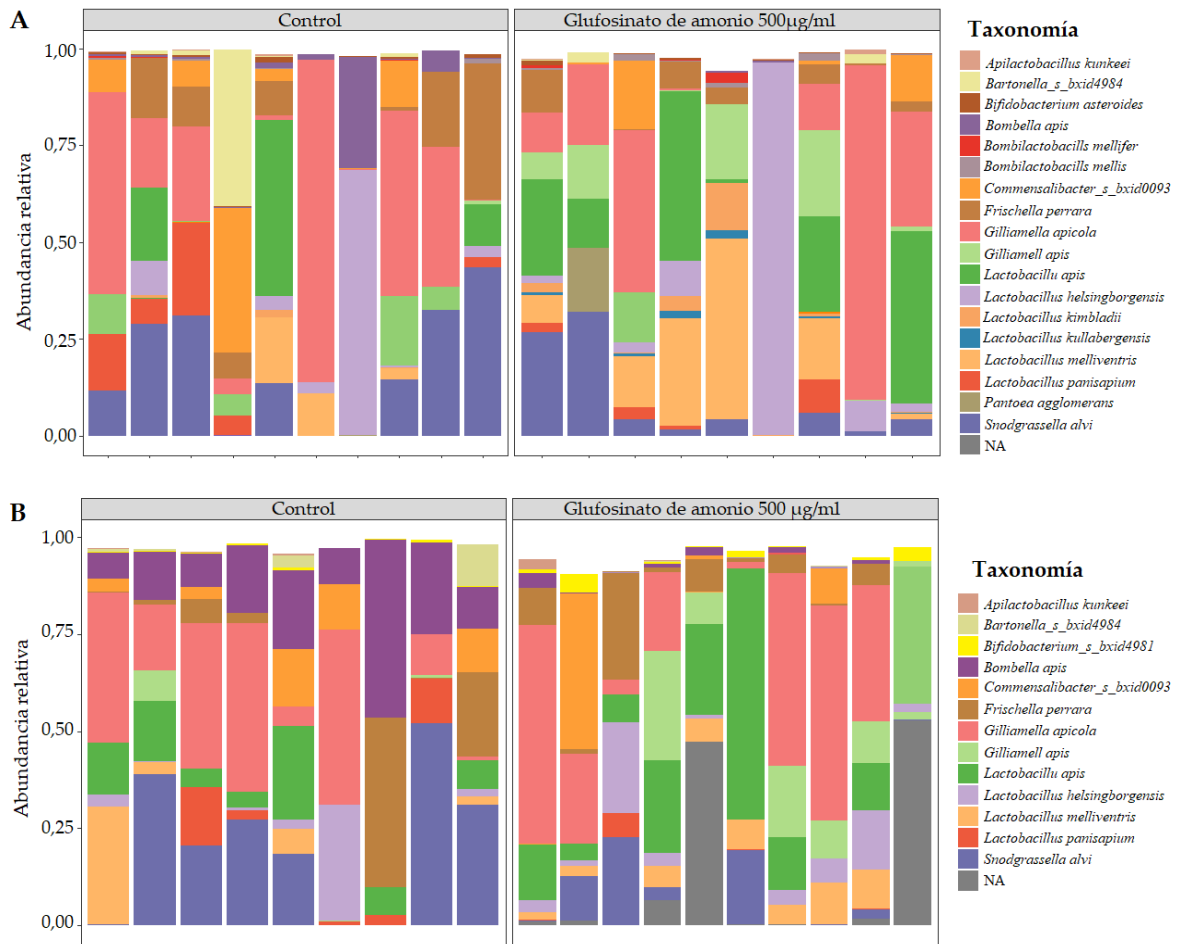
La intoxicación oral aguda y crónica con glufosinato (500 µg/mL) generó una disminución significativa en la cantidad de bacterias totales en el intestino de las abejas con respecto al grupo control (Wilcoxon test  $p=0,0035$  y  $p=0,0068$  respectivamente) (Figura 10A-B).

La secuenciación masiva de esta microbiota generó, en el ensayo de intoxicación oral aguda, 552.894 *reads*, representando a 345 ASVs en 19 muestras con un promedio de 29.100 *reads* por muestra (10 muestras del grupo control y 9 muestras intoxicadas con glufosinato). Por otro lado, se obtuvieron 573.631 *reads*, pertenecientes a 328 ASVs en 19 muestras (con un promedio de 30.191 *reads* por muestra) en el ensayo de intoxicación oral crónica (9 muestras del grupo control y 10 muestras expuestas a glufosinato). En ambos ensayos, la comunidad microbiana intestinal de las abejas estuvo constituida por *Lactobacillus* spp. Firm-5, *Bombilactobacillus* spp. Firm-4, *Bifidobacterium* sp., *Snodgrassella* spp. and *Gilliamella* spp., entre otras especies (Figura 11A-B).

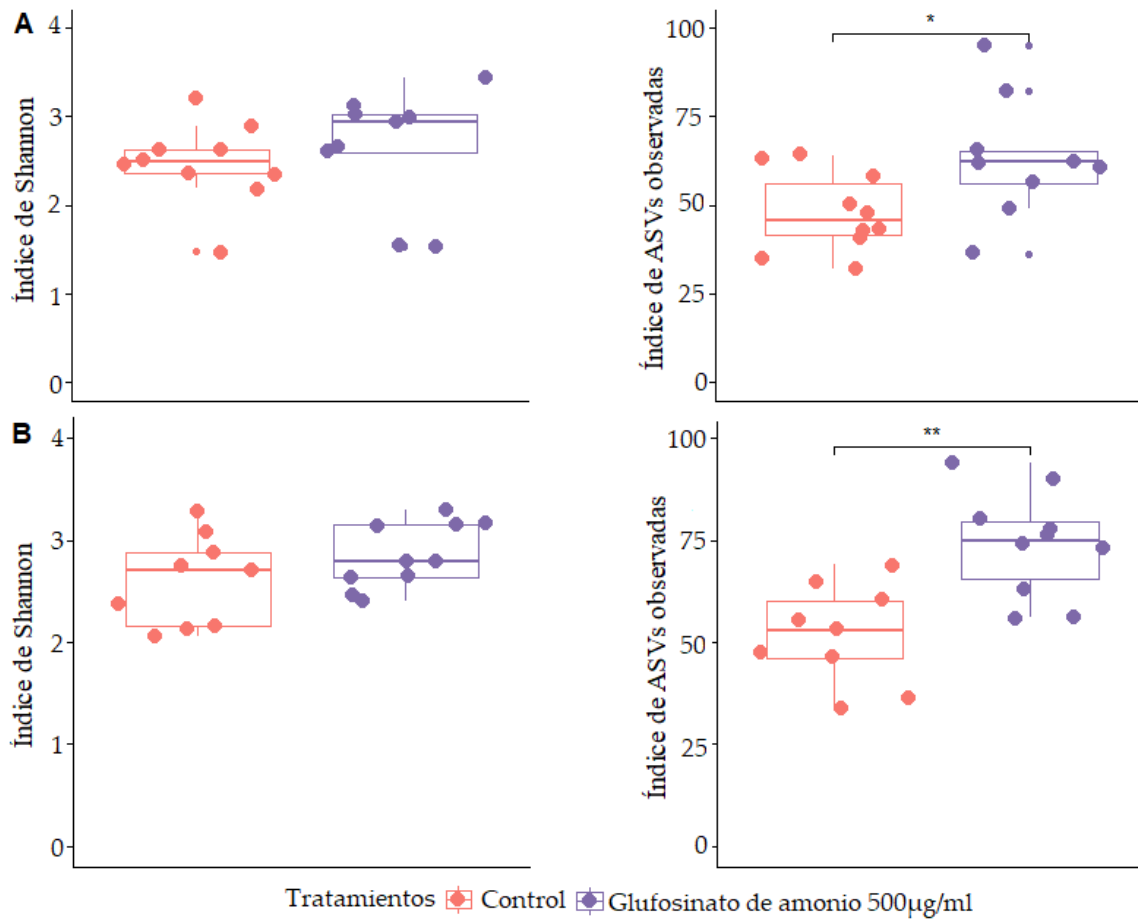
Tanto en la intoxicación aguda como crónica, el glufosinato incrementó la diversidad alfa de la microbiota, como se muestra según el índice de ASVs observadas (Figura 12A-B). Sin embargo, el índice de Shannon fue similar entre grupos (Figura 12A-B).



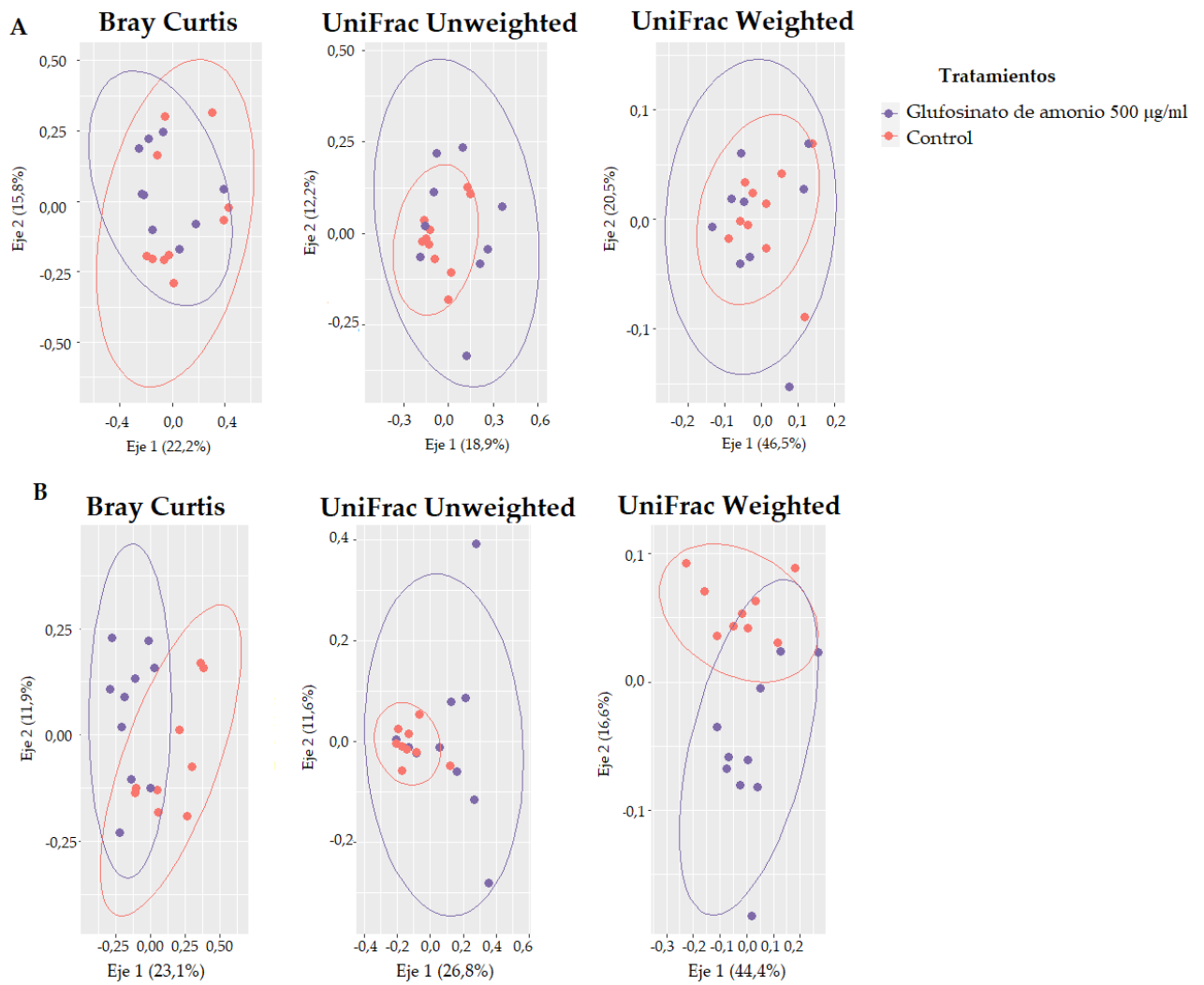
**Figura 10.-** Relación del número total de bacterias para las abejas intoxicadas con glufosinato de amonio y para las abejas que constituyeron el grupo control de forma aguda (A) y crónica (B).



**Figura 11.-** Impacto del glufosinato de amonio en la microbiota intestinal de las abejas. A.- Abundancias relativas de especies bacterianas en abejas sometidas a los diferentes tratamientos durante la intoxicación aguda con el herbicida. B.- Abundancias relativas de especies bacterianas en abejas sometidas a los diferentes tratamientos durante la intoxicación crónica con el herbicida.



**Figura 12.-** Índice de diversidad alfa (número efectivo de especies) de las comunidades bacterianas intestinales de los diferentes tratamientos de abejas intoxicadas aguda con glufosinato de amonio (A) y de forma crónica (B).



**Figura 13.-** Índice de diversidad beta (Bray Curtis, UniFrac UnWeighted - Weighted) de las comunidades bacterianas intestinales de los diferentes tratamientos de abejas intoxicadas de forma aguda con glufosinato de amonio (A) y de forma crónica (B).

En ambos experimentos, la diversidad beta no se vio afectada significativamente por la intoxicación con las dosis del glufosinato de amonio. No hubo diferencias significativas en los índices de Bray-curtis, UniFrac weighted and unweighted (PERMANOVA  $p > 0.01$ ) (Tabla 6) entre los tratamientos. La dispersión entre individuos fue similar en los diferentes grupos, con la excepción del índice de UniFrac unweighted (Bray-curtis dissimilarities  $p = 0,964$ ; UniFrac unweighted  $p = 0,038$ ; UniFrac weighted  $p = 0,661$  para la intoxicación oral aguda / Betadisper: Bray-

curtis dissimilarities  $p=0,286$ ; UniFrac unweighted  $p=0,929$ ; UniFrac weighted  $p=0,591$  para la intoxicación oral crónica) (Figura 13).

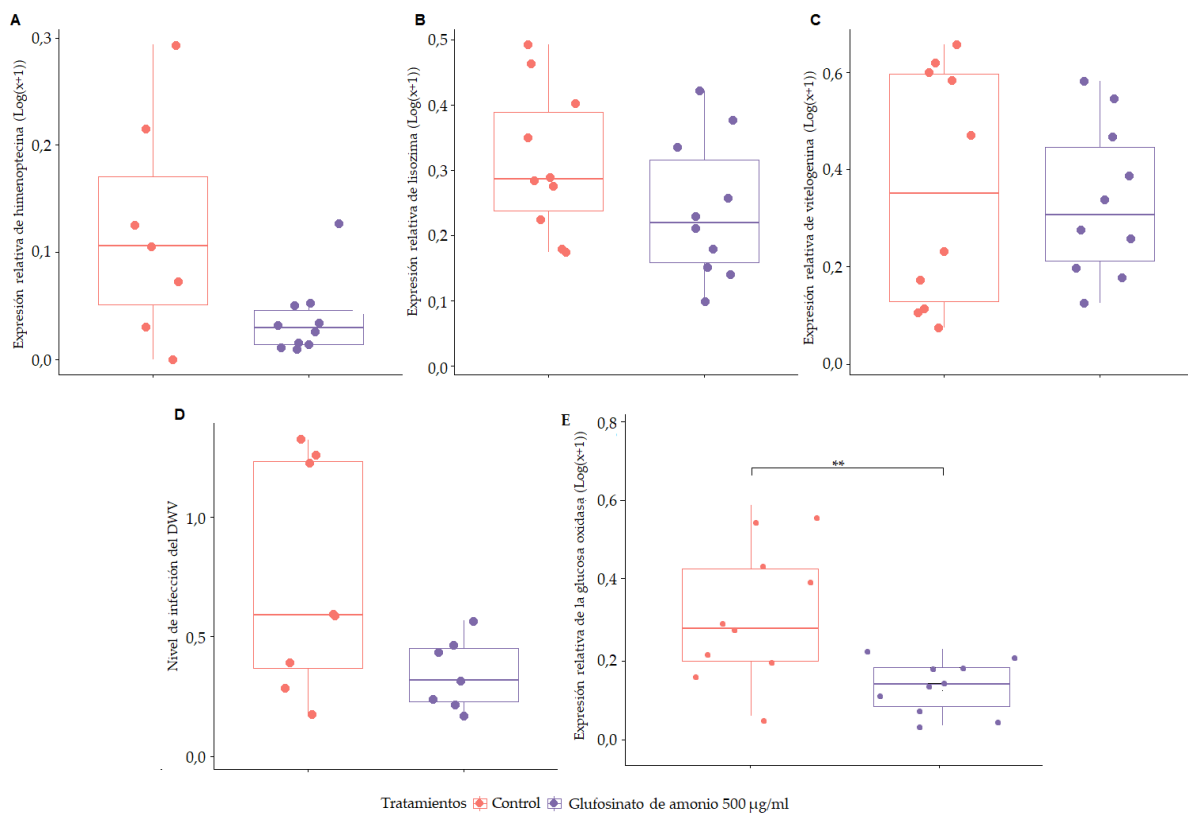
**Tabla 6.-** Efecto de la intoxicación aguda y crónica con glufosinato de amonio en la microbiota intestinal de las abejas melíferas, evaluado por PERMANOVA. Se consideraron estadísticamente significativos valores de  $p$  iguales y menores de 0,05.

<b>BETADISPER</b>	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>	<b>Pseudo F</b>	<b>Valor p</b>
<i>Exposición oral aguda</i>				
<b>Bray Curtis</b>			0,003	0,964
<b>UniFrac Weighted</b>	Control jarabe	Glufosinato de amonio 500 $\mu\text{g/ml}$	0,196	0,661
<b>UniFrac Unweighted</b>			5,433	0,038
<i>Exposición oral crónica</i>				
<b>Bray Curtis</b>			1,181	0,286
<b>UniFrac Weighted</b>	Control jarabe	Glufosinato de amonio 500 $\mu\text{g/ml}$	0,285	0,591
<b>UniFrac Unweighted</b>			0,007	0,929
<b>PERMANOVA</b>	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>	<b>Pseudo F</b>	<b>Valor p</b>
<i>Exposición oral aguda</i>				
<b>Bray Curtis</b>			1,413	0,136
<b>UniFrac Weighted</b>	Control jarabe	Glufosinato de amonio 500 $\mu\text{g/ml}$	0,275	0,020
<b>UniFrac Unweighted</b>			0,107	0,051
<i>Exposición oral crónica</i>				
<b>Bray Curtis</b>			1,456	0,106
<b>UniFrac Weighted</b>	Control jarabe	Glufosinato de amonio 500 $\mu\text{g/ml}$	-0,014	0,489
<b>UniFrac Unweighted</b>			-0,009	0,555

### 5.3.2 Impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con glufosinato de amonio en la expresión de genes y en el nivel de infección por patógenos como el virus de las alas deformadas

La intoxicación aguda con la dosis subletales de glufosinato de amonio no afectó la expresión de ninguno de los genes analizados con respecto al grupo control (glucosa oxidasa, lisozima, himenoptecina, vitelogenina ni el nivel de infección por

DWV). Sin embargo, las abejas intoxicadas de forma crónica con el glufosinato de amonio mostraron niveles menores en la expresión del gen que codifica para la glucosa oxidasa con respecto al grupo control (Figura 14E) (Mann-Whitney test,  $U=15$   $p=0,009$ ). La expresión de los genes que codifican para la lisozima, himenoptecina, vitelogenina y el nivel de infección por el virus DWV no se vieron afectados.



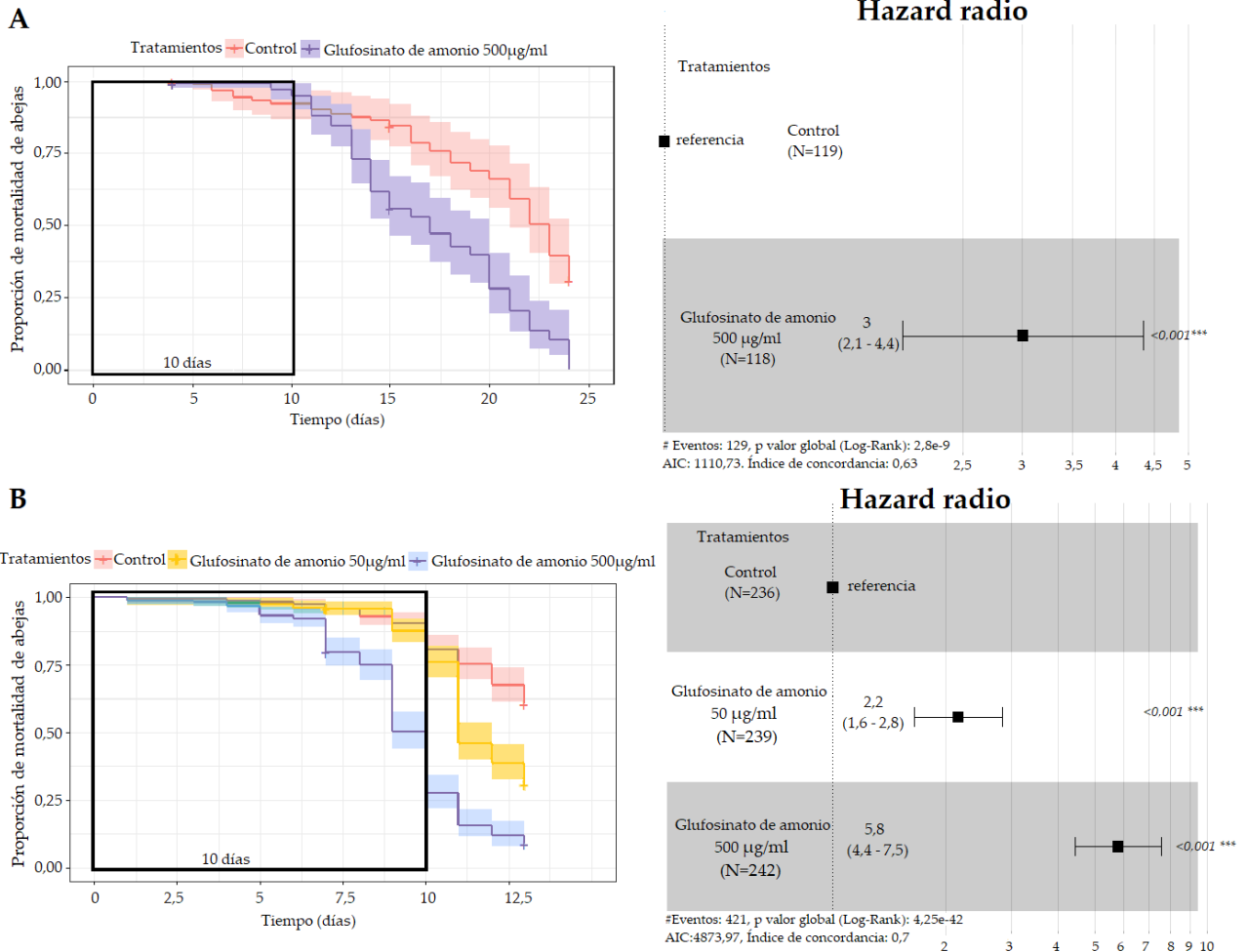
**Figura 14.-** Impacto de la intoxicación crónica con glufosinato de amonio en la inmunidad de las abejas sometidas a diferentes tratamientos. Los asteriscos indican las diferencias significativas (valores p por debajo de 0,05).



### *5.3.3 Impacto de la intoxicación oral aguda y crónica con glufosinato de amonio en el consumo y supervivencia de las abejas*

La intoxicación oral aguda con la dosis de glufosinato de amonio disminuyó significativamente la supervivencia (Log Rank test, estadístico=34,374  $p<0,001$ , Figura 15B). En este experimento, el tiempo letal medio para las abejas intoxicadas con el herbicida fue estimado en 17 días, mientras que para las abejas que constituyeron el grupo control fue de 23 días. Paralelamente, se puede observar que la dosis de glufosinato de amonio de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  incrementó 3 veces el riesgo de muerte con respecto a las abejas alimentadas con jarabe de sacarosa (Figura 15A).

La exposición crónica a glufosinato de amonio (50 y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) afectó la supervivencia de las abejas durante los primeros 13 días (duración del experimento) (Figure 15B) y 10 días (LogRank test, estadístico= 206,272  $p<0,001$ ; estadístico= 180,696  $p<0,001$ , respectivamente). Teniendo estos datos en cuenta, se estimó el tiempo letal medio para las abejas intoxicadas con el herbicida de 10 días. Las dosis de glufosinato de amonio de 50 y 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  incrementaron en 2,2 y 5,8 veces el riesgo de muerte de abejas frente a esos pesticidas (Figura 15B).

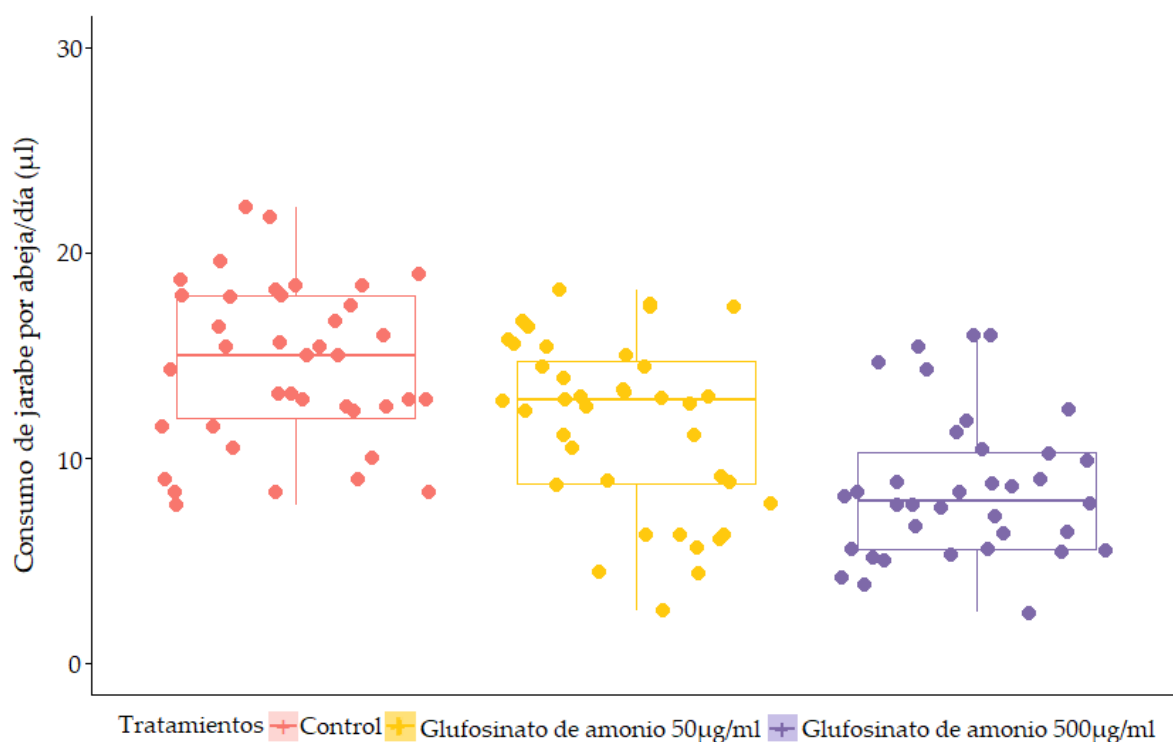


**Figura 15.-** A- Impacto de la intoxicación aguda (A) y crónica (B) al glufosinato de amonio en la supervivencia de las abejas y su riesgo de muerte. El recuadro en negro marca los primeros 10 días de tratamiento.

Finalmente, considerando los primeros 13 días de vida, la intoxicación aguda no generó cambios significativos en el consumo de jarabe de sacarosa con respecto al grupo control (MW U=1344 p=0,305, datos no mostrados). Por otro lado, las abejas melíferas intoxicadas de forma crónica con glufosinato de amonio (500 o 50 µg/mL) consumieron menos jarabe de sacarosa que las abejas control (Tabla 7). En promedio, las abejas consumieron 11,7±4,2; 8,5±3,5 y 14,6±3,9 para las abejas intoxicadas con 50 µg/mL, 500 µg/mL y para el grupo control respectivamente (Figura 16).

**Tabla 7.-** Efecto del glufosinato de amonio en el consumo de jarabe de sacarosa, evaluado por modelos lineales mixtos generalizados. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de p inferiores a 0,05 y se muestran en **negrita**.

Variable dependiente	Variable independiente	Valor del coeficiente	Valor del intercepto	Valor p
	Intoxicación aguda con Glufosinato de amonio 500 µg/ml	-0,18	3,12	0,1
Consumo de jarabe	Intoxicación crónica con Glufosinato de amonio 500 µg/ml	-0,36		<b>≤0,0001</b>
	Intoxicación crónica con Glufosinato de amonio 50 µg/ml	-0,15	2,91	<b>0,01</b>



**Figura 16.-** Consumo de jarabe de sacarosa en µL por abeja por días durante 13 días de las abejas intoxicadas crónicamente con glufosinato de amonio.

## 5.4 *Discusión*

El glufosinato de amonio es un herbicida que se está utilizando cada vez más en todo el mundo debido al incremento de las malezas resistentes al glifosato (Maillet et al., 2016). Como consecuencia, restos de este herbicida se han detectado en matrices ambientales como lagos y suelos (Berg et al., 2018). Esto evidencia el riesgo de exposición de las abejas durante la recolección de alimentos y agua (Berg et al., 2018).

En esta tesis, reportamos por primera vez que la intoxicación de abejas con dosis subletales de glufosinato de amonio disminuye significativamente el número de bacterias en el intestino. Estudios previos han demostrado una reducción en la abundancia de bacterias y hongos en suelos tratados con este pesticida (Ahmad & Malloch, 1995). Como el glufosinato de amonio inhibe la enzima glutamina sintetasa, proteína esencial para el metabolismo de nitrógeno y para la desintoxicación de amoníaco en plantas y microorganismos (Eisenberg et al., 2000; Pline et al., 2001; Mohr y Tebbe, 2007; Kortekamp, 2011), la reducción observada en la abundancia bacteriana puede deberse a la inhibición de esta enzima. En este sentido, de acuerdo a la información disponible en la base de datos del Genbank, los miembros de la microbiota intestinal de las abeja melíferas tendrían el gen que codifica para dicha enzima (*Bombella apis* GenBank: OOL17863.1; *Frischella perrara* GenBank: AJA46077.1, *Snodgrassella alvi* GenBank: PXY97432.1, *Bartonella apis* GenBank: OLY48946.1). Futuros estudios deberían realizarse para confirmar esta hipótesis.

Por otro lado, la intoxicación crónica con glufosinato de amonio también generó alteraciones en la respuesta inmune de las abejas, en particular en la expresión de glucosa oxidasa. Esta enzima es producida en las glándulas hipofaríngeas de las abejas y secretada a la jalea real y la miel, alimento de la cría. Allí, en contacto con glucosa se forma peróxido de hidrógeno que elimina a los

microorganismos (Bucekova et al., 2014). Esto podría brindar protección a nivel de la colonia previniendo algunas enfermedades larvales (Yang & Cox-Foster, 2005). Por este motivo la generación de glucosa oxidasa se utiliza como biomarcador de inmunidad social (Alaux et al., 2010; Klaudiny et al., 2012; Yang & Cox-Foster, 2005). Bucekova y colaboradores (2014) postulan que el nivel de glucosa oxidasa en miel podría prevenir infecciones bacterianas y fúngicas en las colonias, y actuar como marcador en la selección de mieles con alta actividad antibacteriana. La reducción en la expresión de dicha enzima por la intoxicación con glufosinato de amonio podría incrementar la susceptibilidad de la cría a estas infecciones.

Teniendo en cuenta el vínculo existente entre la microbiota intestinal de las abejas y el sistema inmune, es probable que la disminución en la abundancia bacteriana en las abejas intoxicadas con glufosinato de amonio pueda estar vinculada a la alteración en la respuesta inmune. En esta línea, Anderson & Maes, (2022) reportaron que la glucosa oxidasa está fuerte y positivamente asociada con la abundancia de los miembros principales de la microbiota intestinal de las abejas, especialmente con *Gilliamella apicola*.

Aunque observamos que las abejas melíferas intoxicadas con glufosinato de amonio consumían menos jarabe de sacarosa, el consumo de sacarosa debería ser suficiente para sobrevivir, ya que las abejas necesitan 4 mg de azúcar utilizable por día para sobrevivir (alrededor de 8  $\mu$ L de solución de sacarosa al 50% por abeja por día) (Barker & Lehner, 1974). Esto sugiere que la muerte de las abejas no estaría asociada con el hambre en la mayoría de los casos.

Finalmente, la intoxicación con dicho herbicida acortó la supervivencia de las abejas melíferas y aumentó el riesgo de muerte. Esos resultados evidencian el impacto negativo del glufosinato de amonio en las abejas melíferas, incluso con una sola exposición, y brindan información útil para comprender la disminución de los polinizadores.

## 6. CAPÍTULO 3. “Efecto del herbicida glifosato en conjunto con *Nosema ceranae* en la salud de las abejas”

---

### 6.1 Introducción

El glifosato, un herbicida de amplio espectro, es el pesticida más empleado alrededor del mundo (Benbrook, 2016). Entre 1974 y 2014 se aplicaron más de 8.6 billones de kilogramos del ingrediente activo. Su aplicación a nivel mundial ha aumentado más de 15 veces desde 1996, debido al uso del producto *Roundup Ready*<sup>TM</sup> (Monsanto) en cultivos genéticamente modificados. El 72% de ese volumen se usó en el último período estudiado (2004-2014) (Benbrook, 2016). Uruguay sigue la misma tendencia mundial, importándose anualmente entre 7 y 8 millones de kilos del producto activo (MGAP (Ministerio de ganadería, agricultura y pesca), 2020). Debido al uso generalizado de este herbicida, puede ser detectado básicamente en todas partes, incluyendo el agua, el suelo, el follaje, los alimentos humanos y animales, e incluso en las colmenas de abejas melíferas, lo que implica que muchos organismos están continuamente expuestos (Berg et al., 2018; Rubio et al., 2014).

El mecanismo de acción del glifosato involucra la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), enzima de la vía del shiquimato que participa en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y otros metabolitos secundarios en plantas (Shilo et al., 2016). La inhibición de EPSPS por el glifosato detiene la vía del shiquimato, reduciendo la producción de todos los metabolitos aromáticos. Un déficit de aminoácidos aromáticos conduce, por ejemplo, a un déficit en la síntesis de proteínas y, en última instancia, a la muerte del organismo (Motta et al., 2018).

Diversos estudios han reportado el efecto negativo del glifosato en las abejas, incluyendo efectos detrimentales en el comportamiento, habilidades cognitivas, sensoriales y en el desarrollo (Farina et al., 2019).

Las enzimas EPSPS se clasifican en dos clases según sus distinciones bioquímicas y filogenéticas (Funke et al., 2009). Las enzimas de clase I son inhibidas a dosis muy bajas de glifosato y ocurren naturalmente en todas las plantas y algunos procariotas, como *Escherichia coli* (Cao et al., 2012), mientras que las enzimas de clase II no son inhibidas a dosis altas de glifosato y ocurren exclusivamente en ciertas especies bacterianas, como *Staphylococcus aureus* (Cao et al., 2012; Pollegioni et al., 2011; Priestman et al., 2005).

El glifosato es el principal ingrediente activo de formulaciones comerciales como el ya nombrado *Roundup*®, dicha formulación contiene otros ingredientes (surfactantes) los cuales potencian la eficiencia del herbicida (Mesnage et al., 2019).

Dado que los animales carecen de la vía del shikimato, es considerado el pesticida menos tóxico utilizado en la agricultura (Duke & Powles, 2008). Sin embargo, se ha observado que la enzima EPSPS también está presente en organismos no blancos como los microorganismos, por lo que el glifosato también podría tener un efecto antimicrobiano sobre ellos (Shilo et al., 2016). Comparando la concentración inhibitoria mínima del glifosato en diversas bacterias, van Bruggen et al. (2021) encontraron que las bacterias benéficas tienden a ser más susceptibles que aquellas bacterias asociadas con enfermedades (van Bruggen et al., 2021). Como ejemplo, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* son más susceptibles a formulaciones de glifosato *in vitro* que bacterias patogénicas como *Clostridium* y *Salmonella* (Shehata et al., 2012).

El efecto de los pesticidas en la salud de las abejas podría ser potenciado por la interacción con plagas y patógenos (Dave Goulson et al., 2015; Steinhauer et al.,

2018). Entre ellos, tiene especial relevancia el microsporidio *Nosema ceranae*, causante de Nosemosis (Higes et al., 2013). Este microsporidio está ampliamente distribuido en nuestro país (Anido et al., 2015; Antúnez et al., 2015; Branchiccela et al., 2017; Invernizzi et al., 2009). *Nosema ceranae* infecta la abeja al ingerir alimentos contaminados con esporas (Higes et al., 2013), generando desórdenes intestinales y envejecimiento precoz, disminuyendo la vida media de la abeja (Alaux et al., 2011; Dussaubat et al., 2010; Mayack & Naug, 2010). A nivel colonial, reduce la población de la colonia generando su muerte (Higes et al., 2009; Higes et al., 2008a). *N. ceranae* es capaz de deprimir la respuesta inmune de la abeja, pudiendo aumentar su susceptibilidad a patógenos (Antúnez et al., 2009; Chaimanee et al., 2012). Además de este microsporidio, las abejas son blancos de más de 80 virus de ARN (Beaurepaire et al., 2020). Uno de los virus más estudiados es el Virus de las alas deformes (DWV). Este virus genera el nacimiento de abejas sin alas o con alas deformes, y junto al ácaro *Varroa destructor* (Rosenkranz et al., 2009), se los asocia con la pérdida de colmenas (Highfield et al., 2009).

Como se ha presentado previamente, para prevenir la infección por patógenos, las abejas presentan diferentes estrategias que van desde la inmunidad social, comportamientos de cooperación entre individuos, tales como el *grooming* o comportamiento higiénico, hasta mecanismos de defensa individual (defensas mecánicas, fisiológicas e inmunológicas (Simone-Finstrom et al., 2014). Doublet y colaboradores (2015), identificaron un conjunto de genes que responden de forma unificada a la infección por diferentes patógenos (*V. destructor*, *Nosema apis*, *N. ceranae* y virus de ARN), incluyendo la himenoptecina, defensina, abaecina y lisozima, entre otros (Doublet et al., 2015).

En los últimos años se ha reconocido el rol que tiene la microbiota intestinal de las abejas en la inmunidad y defensa frente a patógenos, así como en el metabolismo, crecimiento y desarrollo de las abejas (Raymann & Moran, 2018). Las



alteraciones de esta microbiota (disbiosis), pueden tener consecuencias en la salud, por lo que la estructura y composición de esta microbiota es un indicador del estado de salud de la colmena (Hamdi et al., 2011; Zheng et al., 2018).

Teniendo en cuenta el volumen de glifosato empleado alrededor del mundo y los posibles efectos en el medio ambiente, es necesario profundizar en su estudio y generar más información a nivel local y regional, para que sea tomada en cuenta en el diseño de políticas agrícolas. Además, el hecho de que no todas las abejas responden de la misma forma frente a la exposición a los pesticidas, realza la importancia de la generación de información local (Suchail et al., 2000).

La hipótesis de este trabajo es que el glifosato altera la microbiota intestinal de las abejas, probablemente a través de la inhibición de la enzima EPSPS en estos microorganismos. Esto afecta también la respuesta inmune de las abejas y favorece la infección por patógenos, disminuyendo la supervivencia. Estas consecuencias son aún más evidentes en abejas infectadas con *N. ceranae*. Para testear esta hipótesis, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) del glifosato en las abejas melíferas criollas en Uruguay.
- Evaluar el efecto de la intoxicación oral crónica con dosis subletales de glifosato en la estructura y composición de la microbiota intestinal de las abejas.
- Evaluar su impacto en la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune, en la infección por *N. ceranae* y en los niveles de infección por DWV.
- Evaluar su impacto en la supervivencia de las abejas.

## *6.2 Materiales y métodos*

### *6.2.1 Determinación de la DL<sub>50</sub> del glifosato en las abejas melíferas de Uruguay*

El ensayo se realizó de acuerdo con lo descrito en la sección 3.1 de Materiales y Métodos. Los cuadros con cría operculada se colectaron de colonias pertenecientes a un apiario experimental ubicado en la Facultad de Veterinaria, UdelaR, Montevideo, Uruguay. En este caso se generaron 6 grupos de abejas, 3 recibieron jarabe de sacarosa 1:2 contaminado con diferentes dosis de glifosato (100, 50 y 25 µg/abeja), dos grupos recibieron dimetoato y un grupo solo recibió jarabe de sacarosa 1:2 como control negativo. Una vez consumidos 200 µL del jarabe (aprox. 10 µL por abeja) se retiró el jarabe contaminado y se colocó jarabe de sacarosa fresco. La dosis estimada consumida por abeja se presenta en la Tabla 1.

### *6.2.2 Evaluación del impacto de la intoxicación oral crónica con glifosato en la salud de las abejas y su susceptibilidad a patógenos*

#### *6.2.2.1 Selección y obtención de las dosis de glifosato analizar*

En base a la DL<sub>50</sub> reportada para el glifosato (104 µg/abeja (Lewis et al., 2016)) y a las dosis realistas encontradas en el campo (Van Bruggen et al., 2018), se escogieron como dosis subletal de trabajo las concentraciones de 5 y 10 mg/L. El glifosato se administró en jarabe de sacarosa 1:1. Asumiendo que las abejas melíferas consumen 15 µL de jarabe/día (Balbuena et al., 2022), estarían consumiendo 0,000075 y 0,00015 mg (0,075 y 0,15 µg respectivamente) de glifosato/abeja/día, para las soluciones de 5 y 10 mg/L, respectivamente.

Se preparó una solución stock concentrada de 20 mg/L, disolviendo el principio activo en agua destilada estéril. Esta solución se disolvió a una concentración final de 5 y 10 mg/L en jarabe de sacarosa 1:1 y se empleó para alimentar a las abejas.

#### 6.2.2.2 Preparación de la suspensión de esporas de *N. ceranae*

Se preparó una suspensión de esporas de *N. ceranae* a partir de abejas naturalmente infectadas, de acuerdo con lo recomendado en el *Beebook* (Human et al., 2013). La purificación de esporas de *N. ceranae* se realizó por filtración (Rodríguez-García et al., 2018).

Brevemente, se colectaron abejas pecoreadoras de una colonia naturalmente infectada con alta carga de esporas. Se extrajo el tubo digestivo de 200 abejas y el intestino medio se utilizó para la purificación de esporas. Dichos intestinos se homogeneizaron en agua destilada estéril (100  $\mu$ L por cada intestino medio), se filtraron con filtro con poros de 65  $\mu$ m y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, el *pellet* obtenido se resuspendió en la misma cantidad de agua y se centrifugó a 3.200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Este último paso de lavados se repitió dos veces consecutivas. El *pellet* obtenido se resuspendió en agua destilada estéril (50  $\mu$ L de agua por cada intestino medio).

Las esporas se cuantificaron por medio de cámara de *Neubauer* (hemocitómetro) y visualización en microscopio óptico a 400X. La determinación de la especie de *Nosema* se determinó mediante multiplex PCR, de acuerdo con lo descrito por Martín-Hernández y col., 2007 (Martín-Hernández et al., 2007).

### 6.2.2.3. Diseño experimental

Se empleó el modelo de cría de abejas descrito previamente (sección 3.2 de Materiales y Métodos), empleando en este caso abejas de un apiario experimental ubicado en Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Las abejas se repartieron en 6 grupos (3 jaulas con 70 abejas por grupo) y cada grupo recibió un tratamiento diferente: alimentación con jarabe de sacarosa 1:1 contaminado con glifosato D1 (5 mg/L, GD1), alimentación con jarabe de sacarosa 1:1 contaminado con glifosato D2 (10 mg/L, GD2); alimentación con jarabe de sacarosa 1:1 contaminado con glifosato (5 mg/L) e infección con esporas de *N. ceranae* (GND1); alimentación con jarabe contaminado con glifosato (10 mg/L) e infección con esporas de *N. ceranae* (GND2); alimentación solo con jarabe de sacarosa 1:1 como control (J); y por último infección con *N. ceranae* (N, Figura 18).

En primer lugar, las abejas de los grupos GND1, GND2 y N se alimentaron en masa con jarabe de sacarosa 1:1 contaminado con esporas de *N. ceranae* (dosis estimada 100.000 esporas por abeja), de acuerdo con lo recomendado (Blot et al., 2019). Los grupos de abejas intoxicadas con glifosato y las alimentadas con jarabe de sacarosa recibieron el mismo tratamiento, pero empleando sólo jarabe de sacarosa 1:1. Una vez consumido el jarabe con esporas/jarabe solo, las abejas recibieron jarabe de sacarosa fresco o jarabe de sacarosa contaminado con glifosato, de acuerdo con el grupo al que pertenecían, y se permitió el consumo *ad libitum*. Diariamente las abejas se monitorearon, se registraron y se removieron las abejas muertas, se estimó el consumo de alimento y se reemplazó por alimento fresco.

A tiempos 7 y 14 días post-infección, se colectaron 12 abejas por tratamiento (4 abejas por jaula) para el análisis de su microbiota intestinal. La extracción de ADN, la secuenciación masiva de la región V4 del ARNr16S y el análisis de datos se realizó de acuerdo con lo descrito en la sección 3.2.2 de Materiales y Métodos.

A la vez, a tiempo 0, 7 y 14 días, se colectaron 12 abejas por tratamiento (4 por jaula) para el análisis de la expresión de genes vinculados a la respuesta inmune, así como para el nivel de infección por DWV. La extracción de ARN, RT, qPCR, y análisis de datos se realizaron según lo descrito en la sección 3.2.3 de Materiales y Métodos. También se colectaron 15 abejas por tratamiento (5 por jaula) para determinar la presencia y número de esporas de *N. ceranae*.

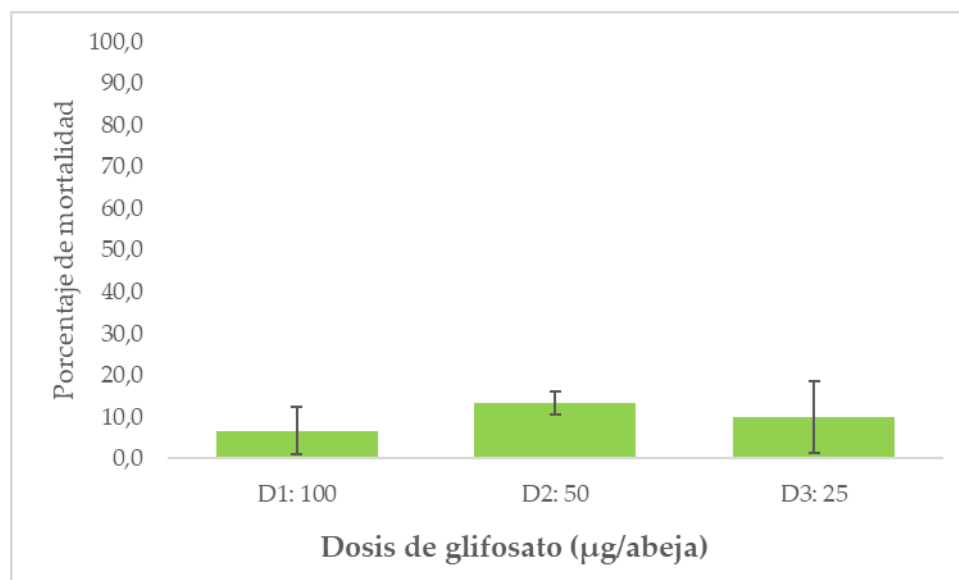
#### 6.2.2.4 Cuantificación de esporas de *N. ceranae*

Se removió el intestino de cada abeja y se cuantificó el número de esporas por abeja (intensidad de la infección del parásito) mediante hemocitómetro bajo microscopio óptico (Cantwell, 1970).

## 6.3 Resultados

### 6.3.1 Dosis letal 50 de glifosato en abejas melíferas de Uruguay

En primer lugar, se evaluó la  $DL_{50}$  del glifosato de las abejas melíferas criollas. La tasa de mortalidad de los controles negativos correspondió a un  $3,3 \pm 2,9$  %, y los controles positivos, abejas expuestas a dimetoato, tuvieron una mortalidad del 100% a las 24 horas de intoxicación (Figura 17) validando el ensayo. La  $DL_{50}$  del glifosato resultó mayor a 100  $\mu\text{g}/\text{abeja}$ , ya que las dosis evaluadas no resultaron tóxicas. Esto coincide con lo reportado en la bibliografía (<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/373.htm>).



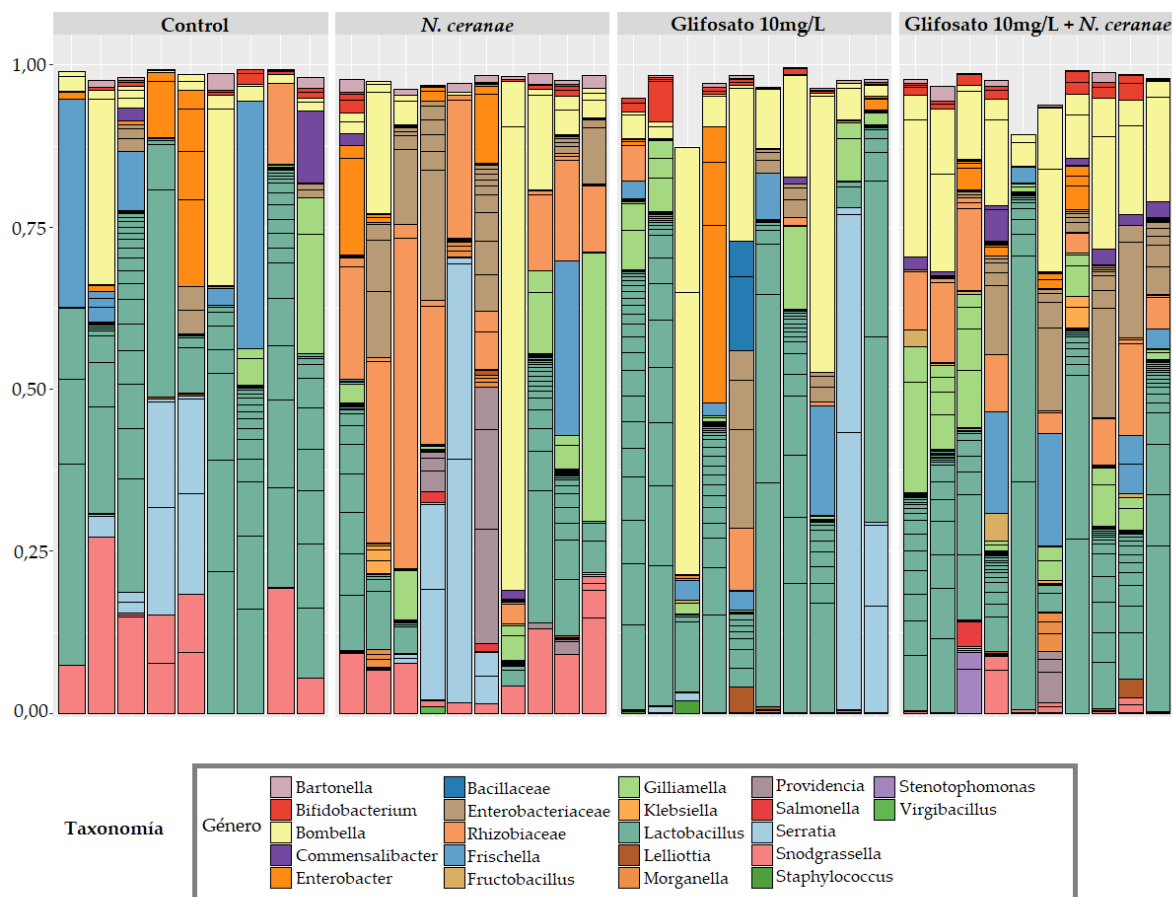
**Figura 17.-** Porcentaje de mortalidad de abejas intoxicadas con diferentes dosis de glifosato a las 48 horas post-intoxicación.

### 6.3.2 Impacto de la intoxicación oral crónica con glifosato en la microbiota intestinal de las abejas

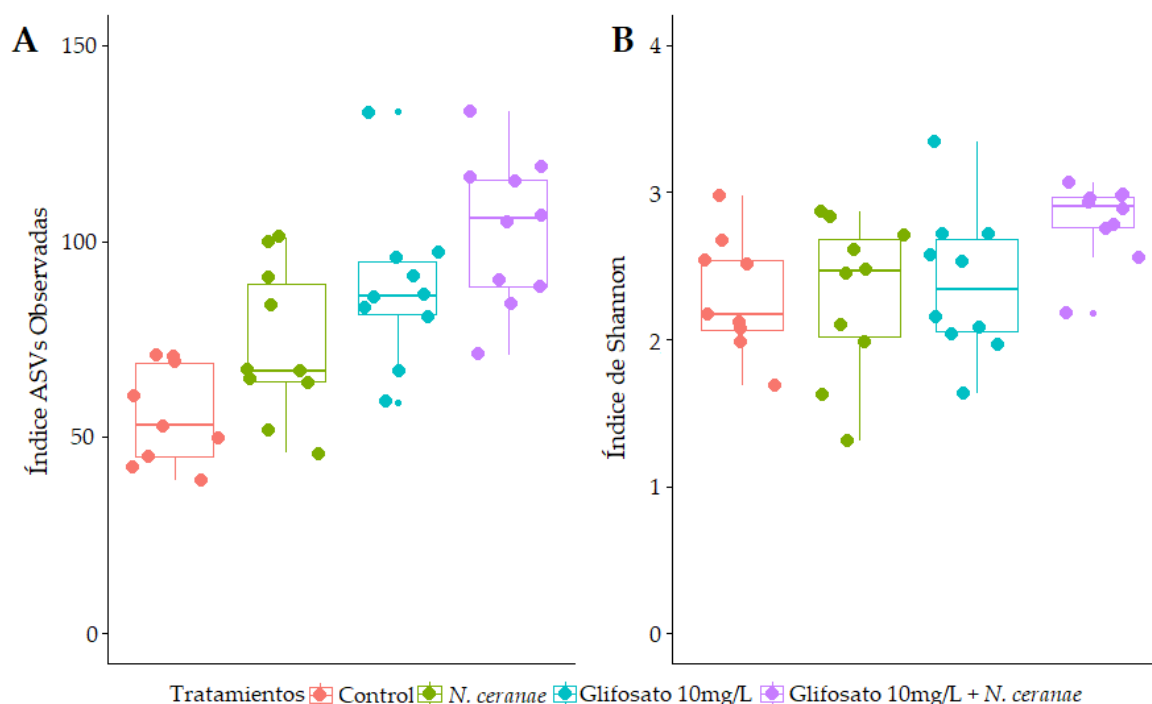
Dado que la dosis más baja de glifosato empleada en este trabajo (5mg/L) presentó un efecto similar al control de jarabe de sacarosa 1:1, se seleccionó la dosis de 10mg/L para los diferentes análisis (Figura 25A).

En primer lugar se evaluó el efecto del glifosato (10mg/L), solo o en combinación con *N. ceranae* sobre la estructura y composición de la microbiota intestinal de las abejas. Mediante secuenciación masiva se obtuvieron 3.574.953 secuencias de la región V4 del gen de ARNr 16S, las cuales pertenecieron a 59 ASVs en 39 muestras analizadas, con un promedio de 50.000 *reads* por muestra. En todas las abejas se identificaron los mismos grupos bacterianos, incluyendo *Bifidobacterium*, *Bombilactobacillus* Firm-4, *Lactobacillus* Firm-5, *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella* spp., *Bartonellaceae*, *Frischella perrara* y *Acetobacteraceae* (Figura 18).

La intoxicación crónica con glifosato o la infección por *N. ceranae*, no afectaron la diversidad alfa de esta comunidad, de acuerdo con el índice del número de especies efectivas; aunque la interacción entre ambos factores, si generó un aumento en este parámetro (Figura 19, KW test, estadístico= 10,65; p= 0,014).



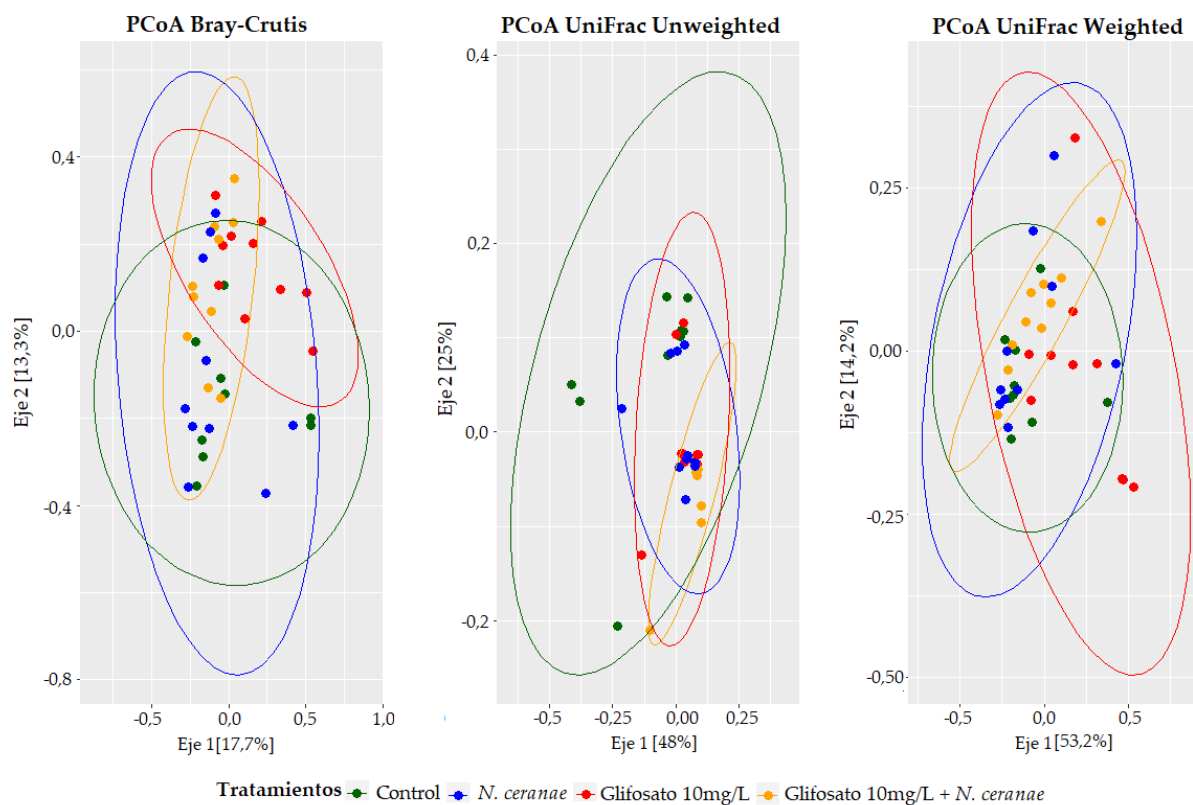
**Figura 18.-** Abundancia relativa de las diferentes bacterias de la comunidad bacteriana intestinal en base al gen ARN ribosomal 16S durante 7 días post-intoxicación crónica con glifosato (10 mg/L), infección con *N. ceranae* (100.000 esporas por abeja a tiempo 0 días) y abejas sujetas a la combinación de ambos estresores. Se analizaron individualmente 10 abejas por tratamiento (tres/cuatro abejas por caja de tres jaulas independiente). Dentro de cada género bacteriano se grafican con rayas horizontales la cantidad de ASVs identificadas.



**Figura 19.-** Impacto del glifosato y *N. ceranae* en la microbiota intestinal de las abejas. A- Índice de diversidad alfa (número efectivo de especies) e B- índice de Shannon de dichas comunidades.

La diversidad beta se vio afectada por los diferentes tratamientos, de acuerdo con las matrices empleadas: Bray-Curtis, UniFrac weighted y UniFrac unweighted (Figura 20, PERMANOVA  $p=0,001$  en todos tres casos). Los análisis de betadisper indicaron que la dispersión de la microbiota entre individuos no varió entre los diferentes grupos, reforzando los resultados del PERMANOVA ( $p=0,224$  y  $p=0,194$ , para los índices de UniFrac weighted y unweigthed respectivamente), excepto para el índice de Bray-Curtis ( $p=0,036$ ).

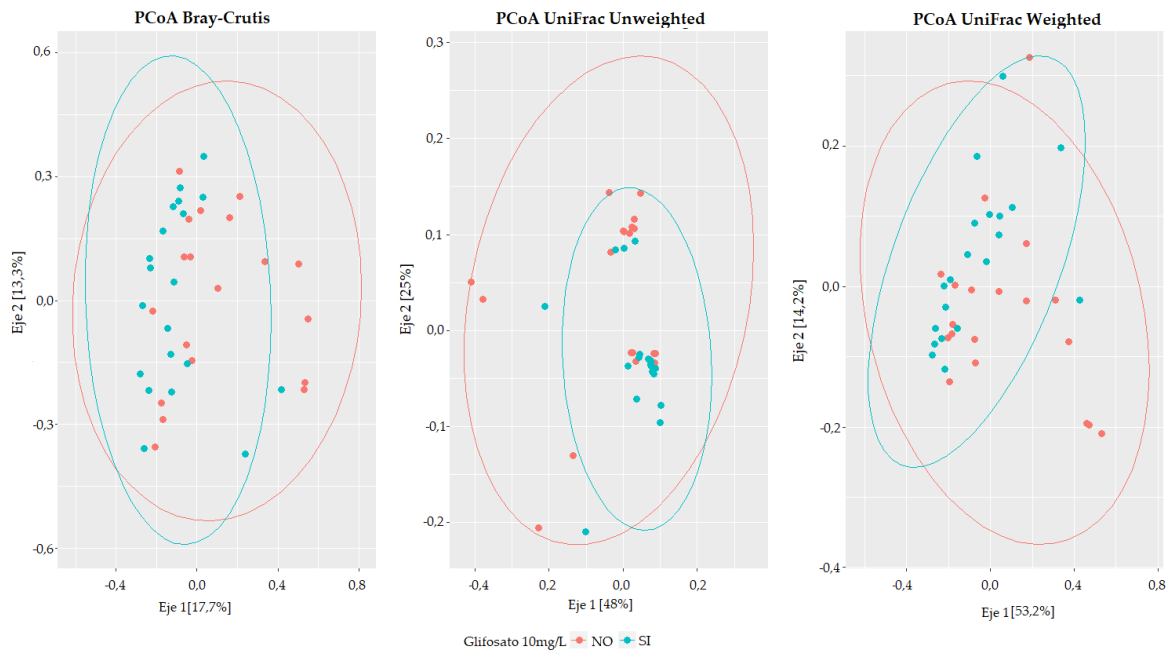




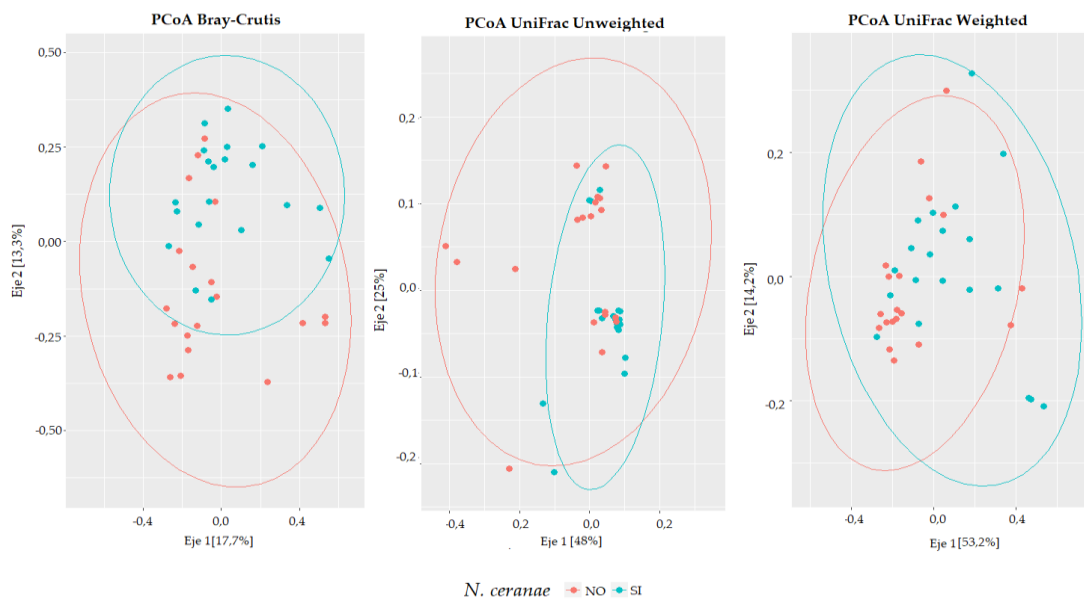
**Figura 20.-** Impacto de la intoxicación crónica del glifosato 10mg/L. El análisis de diversidad beta muestra que los tratamientos alteraron la estructura de la microbiota según los índices Bray-Curtis, UniFrac unweighted y weighted (A-C) (0,001 en todos los casos). Ambos estresores afectaron significativamente la diversidad en la microbiota intestinal de las abejas (0,005 en todos los casos).

Para identificar los tratamientos que generaron diferencias en la microbiota intestinal, se realizaron PERMANOVAs pareados entre los grupos. Se encontró que el glifosato alteró la microbiota intestinal comparado con el control (UniFrac Unweighted, pseudo  $F= 4,5$   $p=0,001$ ) y con *N. ceranae* (UniFrac Unweighted, pseudo  $F= 4,80$   $p=0,001$ ; UniFrac weighted, pseudo  $F= 8,25$   $p=0,002$ ) (Figura 19-20). A la vez, el glifosato junto con *N. ceranae* alteraron la microbiota comparado con el control (UniFrac Unweighted, pseudo  $F= 4,29$   $p=0,002$ ) y con *N. ceranae* (UniFrac Unweighted, pseudo  $F= 3,87$   $p=0,001$ ; UniFrac weighted, pseudo  $F= 5,99$   $p=0,004$ ).

Finalmente, *N. ceranae* también alteró la microbiota respecto al control (Unifrac weighted, pseudo F= 10,23 p=0,001) (Figura 22).



**Figura 21.-** Impacto de la intoxicación crónica del glifosato 10mg/L. Las muestras fueron divididas en dos grupos (intoxicadas o no intoxicadas con glifosato).



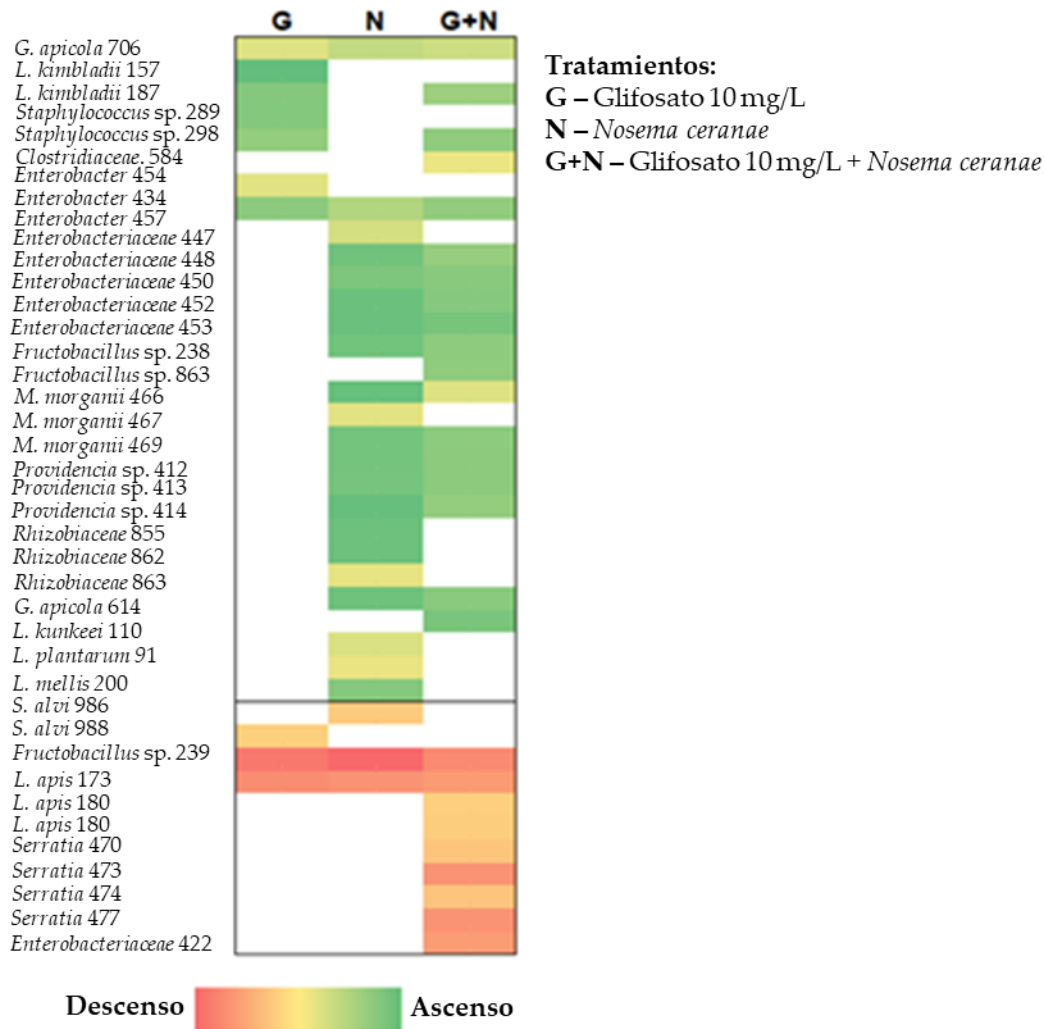
**Figura 22.-** Impacto de la intoxicación crónica del glifosato 10mg/L. Las muestras fueron divididas en dos grupos (infectadas o no infectadas con esporas de *N. ceranae*).

Posteriormente para identificar los grupos bacterianos más afectados se empleó el análisis de DESeq2, realizando también comparaciones pareadas entre tratamientos (Figura 23). El glifosato generó una disminución significativa en la abundancia de *Snodgrassella alvi*, y un aumento en la abundancia de *Staphylococcus* sp. respecto al grupo control.

Por otro lado, *N. ceranae* generó un aumento en la abundancia de *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Rhizobiaceae*, *Bartonella* sp., *Acetobacteriaceae* y *Fructobacillus* sp., y una disminución en una ASV identificada como *Lactobacillus* y otra ASV identificada como *Frischella* sp., respecto al grupo control. La interacción entre glifosato y *N. ceranae* generó un aumento en la abundancia de *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* sp. y *Fructobacillus* sp., *Staphylococcus* sp. y una disminución en la abundancia de *Lactobacillus* sp., *Frischella* sp. y *Snodgrassella alvi*, en comparación con el grupo control (Figura 23).

**Tabla 8.-** Efecto del glifosato, *N. ceranae* y ambos factores de estrés en la microbiota intestinal, la inmunidad y el nivel de infección por DWV de las abejas melíferas y consumo de jarabe de sacarosa, evaluado por modelos lineales mixtos generalizados. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de p inferiores a 0,05 y se muestran en negrita. \* indica interacción entre factores.

Variable dependiente	Variable independiente	Valor de coeficiente	Valor del intercepto	Valor p
ASV Observadas	<i>N. ceranae</i>	0,2		<b>0,004</b>
	Glifosato	0,46	4,01	<b>≤ 0,001</b>
	<i>N. ceranae</i> + Glifosato	0,62		<b>≤ 0,001</b>
Índice de Shannon	<i>N. ceranae</i>	-0,005		0,95
	Glifosato	0,01	0,83	0,86
	<i>N. ceranae</i> + Glifosato	0,19		0,03
Lisozima	<i>N. ceranae</i>	1,38		<b>≤ 0,001</b>
	Glifosato	0,69	-1,29	<b>≤ 0,001</b>
	<i>N. ceranae</i> + Glifosato	0,67		<b>≤ 0,001</b>
	Tiempo	-		ns
Glucosa oxidasa	<i>N. ceranae</i>	0,07		0,16
	Glifosato	0,32	-0,24	<b>≤ 0,001</b>
	<i>N. ceranae</i> + Glifosato	0,25		<b>≤ 0,001</b>
	Tiempo	-		ns
Fenol oxidasa	<i>N. ceranae</i>	0,04		0,24
	Glifosato	-0,007	-0,37	0,83
	<i>N. ceranae</i> + Glifosato	0,04		0,17
	Tiempo	0,15		<b>≤ 0,001</b>
Himenoptecina	<i>N. ceranae</i>	0,77		0,05
	Glifosato	0,24	0,99	0,57
	<i>N. ceranae</i> + Glifosato	0,33		0,43
	Tiempo	1,67		<b>≤ 0,001</b>
Vitелогенина	<i>N. ceranae</i>	-0,16		<b>≤ 0,001</b>
	Glifosato	-0,14		<b>≤ 0,001</b>
	<i>N. ceranae</i> + Glifosato	-0,12		<b>≤ 0,001</b>
	Tiempo	-0,08	-0,16	<b>≤ 0,001</b>
	<i>N. ceranae</i> * Tiempo	0,09		<b>≤ 0,001</b>
	Glifosato * Tiempo	0,08		<b>≤ 0,001</b>
	<i>N. ceranae</i> + Glifosato * Tiempo	0,07		<b>≤ 0,001</b>
Virus de las alas deformadas	<i>N. ceranae</i>	0,44		0,07
	Glifosato	-0,11	-0,24	<b>0,01</b>
	<i>N. ceranae</i> + Glifosato	0,03		<b>≤ 0,001</b>
	Tiempo	-		ns
Consumo de jarabe	<i>N. ceranae</i>	-0,02		0,73
	Glifosato	-0,07	2,65	0,28
	<i>N. ceranae</i> + Glifosato	0,08		0,16



**Figura 23.-** Heatmap en donde se representan los resultados obtenidos de las comparaciones pareadas entre los grupos de los distintos tratamientos versus el grupo control (DESeq). Se grafican las ASV determinada versus los diferentes tratamientos. En color representa el aumento o descenso de cada ASVs.

### 6.3.3 Impacto de la intoxicación oral crónica con glifosato en la expresión de genes y en el nivel de infección por patógenos como el virus de las alas deformadas y *N. ceranae*

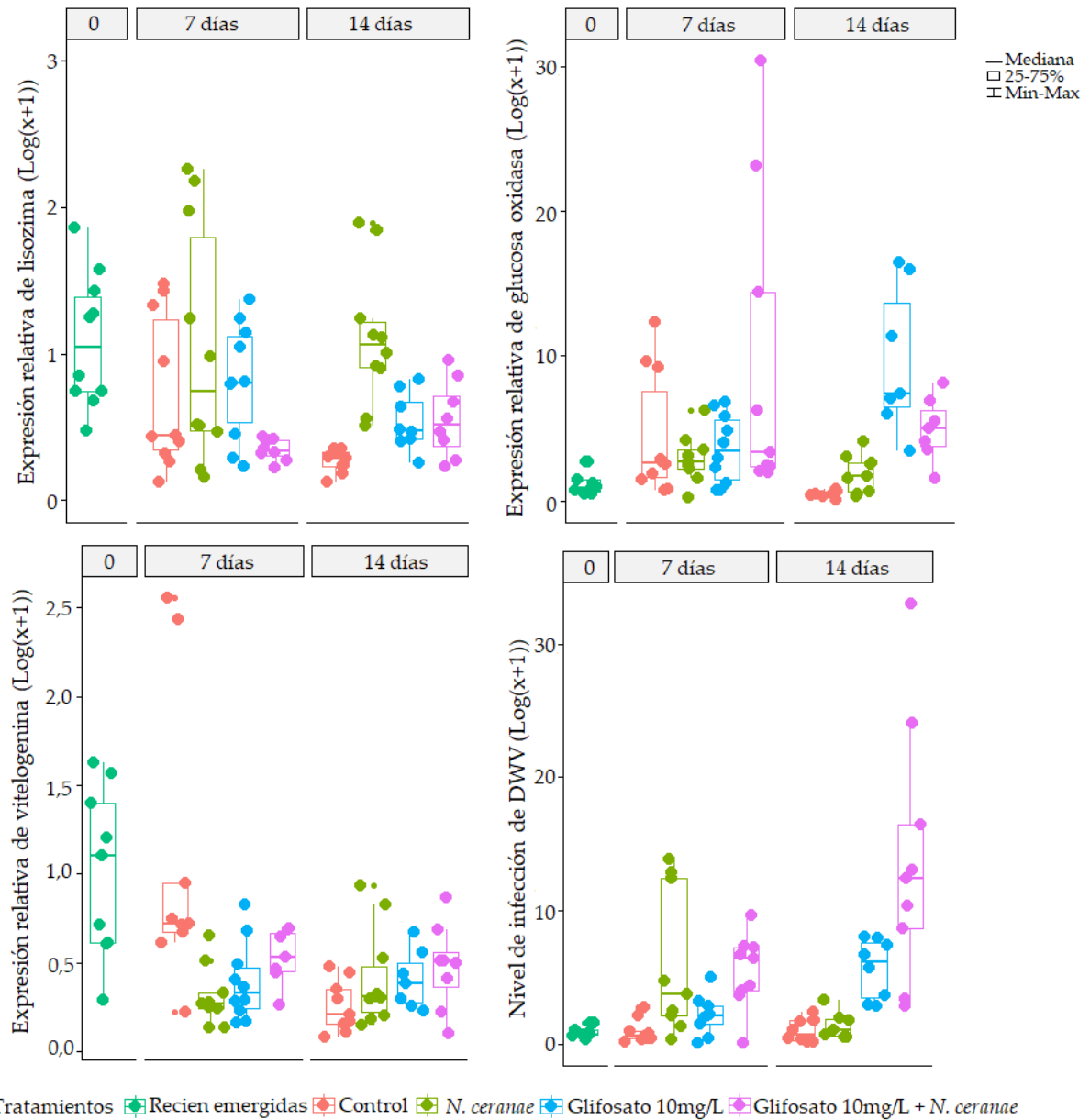
Posteriormente se evaluó el efecto del glifosato, solo o en combinación con *N. ceranae* en la inmunocompetencia de las abejas, mediante el análisis de la expresión de genes que participan en la respuesta inmune.

Uno de los genes más afectados fue la lisozima. Tanto el glifosato como *N. ceranae* generaron un aumento en la expresión de este gen en comparación con el grupo control (t 14 días, KW test GD2 vs J,  $p=0,003$ , N vs J,  $p=0,01$ ), siendo mayor el aumento observado con *N. ceranae* (KW test GD2 vs N, MW,  $p=0,002$ ) (Figura 24). La interacción entre ambos factores tendió a atenuar este aumento, tanto a los 7 días (KW test GND2 vs N,  $p=0,03$ , GND2 vs GD2,  $p=0,01$ ), como a los 14 (KW test GND2 vs N,  $p=0,006$ ) (Tabla 8).

En cuanto a la glucosa oxidasa, ambos factores, así como la interacción entre ellos, aumentaron la expresión de este gen a los 14 días post-infección (KW test J vs N  $p=0,03$ , J vs GD2  $p=0,001$ , J vs GND2  $p=0,001$ ) (Figura 24) (Tabla 8).

Por otro lado, la expresión de profenoloxidasa e himenoptaecina no se vieron afectada por los diferentes tratamientos en ninguno de los momentos de estudio (7 y 14 días post infección, KW test  $p=0,62$ ;  $p=0,67$ , respectivamente) (Tabla 8).





**Figura 24.-** Impacto de la intoxicación crónica de glifosato (10 mg/L), *N. ceranae* (100.000 esporas/abeja en el día 0), y ambos factores de estrés combinados en la inmunidad de las abejas melíferas (lisozima, glucosa oxidasa), vitelogenina y nivel de infección por DWV empleando PCR cuantitativa. Doce abejas por tratamiento (cuatro abejas por jaula, de tres jaulas independientes) fueron individualmente muestreados y analizados a los 0, 7 y 14 días de intoxicación. La cuantificación relativa se realizó utilizando el RPS5 de abeja melífera como gen de referencia. Los resultados se muestran como diagramas de caja, incluida la mediana y los cuartiles de 25 y 75 %.

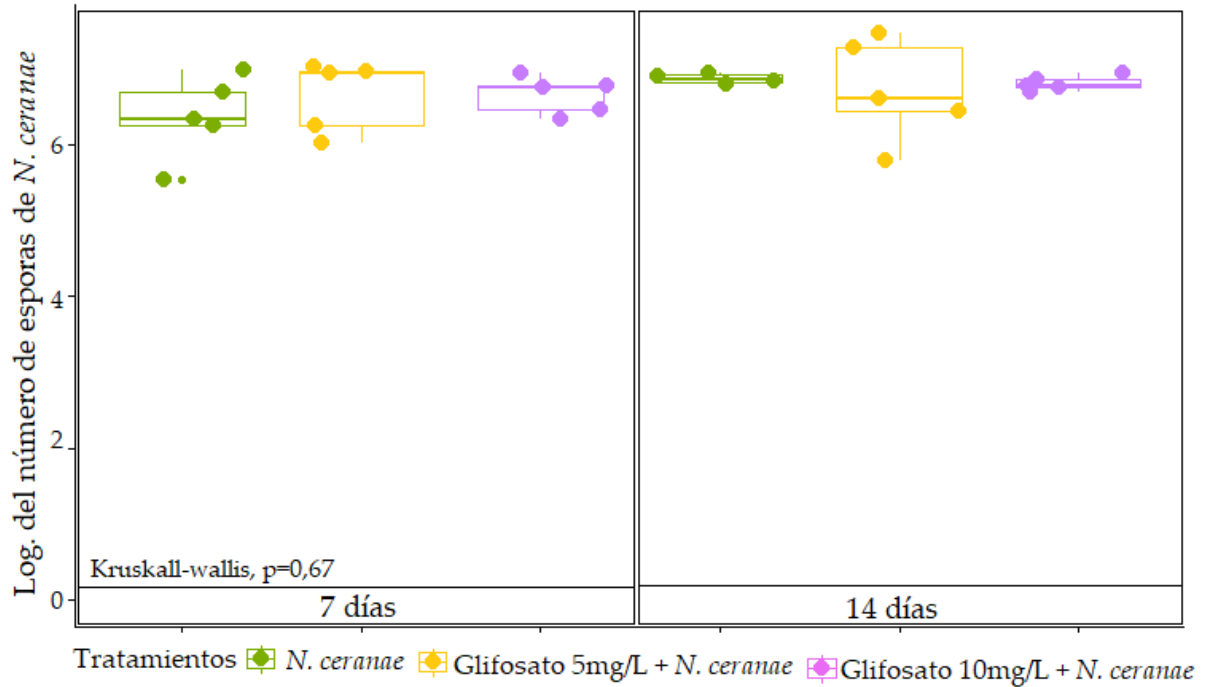


Para evaluar el impacto de dosis subletales de glifosato en el desarrollo de patógenos, las abejas expuestas se infectaron con esporas de *N. ceranae* y se realizaron recuentos de esporas al inicio del ensayo, y a los 7 y 14 días post-infección.

Al inicio del ensayo no se detectaron esporas en ninguno de los grupos, indicando que las abejas recién emergidas estaban libres de este microsporidio. Las abejas del grupo control, que solo recibieron jarabe de sacarosa, y aquellas que recibieron glifosato, tampoco presentaron esporas a los 7 y 14 días, confirmando ese resultado.

Las abejas de los grupos infectados con *N. ceranae* si desarrollaron infección por el microsporidio, y el nivel de infección fue similar en los dos grupos, a 7 y 14 días post-infección (KW test, estadístico=4,48; p=0,21). El número de esporas llegó a  $3,7 \times 10^6 \pm 3,6 \times 10^6$  esporas/abeja y  $5,1 \times 10^6 \pm 2,7 \times 10^6$  esporas/abejas en el grupo infectado con *N. ceranae* y en el grupo infectado y expuesto a glifosato, respectivamente. A los 14 días estos números alcanzaron  $7,4 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$  esporas/abeja y  $6,5 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^6$  esporas/abeja, respectivamente (Figura 24).

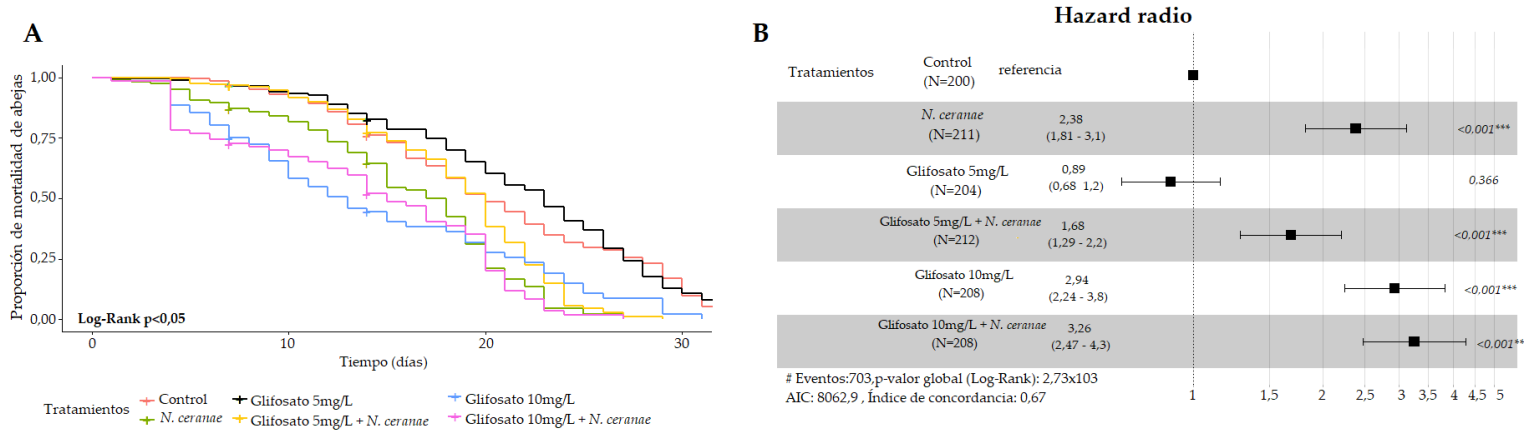
En el caso del DWV, tanto las abejas recién emergidas como las abejas del grupo control a los 7 días presentaron un bajo nivel de infección por este virus, indicando que las abejas estaban naturalmente infectadas (Figura 24). En ese tiempo, las abejas infectadas con *N. ceranae* rápidamente aumentaron el nivel de infección por DWV (KW test N vs C, p=0,02, GND2 vs C, p=0,005, G vs GND2, p=0,02). A los 14 días, el glifosato solo o en interacción con *N. ceranae* estimularon la multiplicación del virus, aumentando significativamente la carga viral (KW test GD2 vs C, p=0,0002, GND2 vs C, p=0,0002, GND2 vs N, p=0,01) (Figura 24).



**Figura 24.** Número de esporas de *N. ceranae* por abeja infectada artificialmente con 100.000 esporas, y en abejas infectadas e intoxicadas con glifosato (5 y 10mg/L) a los 7 y 14 días post infección. No se encontraron diferencias significativas entre esos grupos. Por otro lado, no se detectaron esporas de *N. ceranae* en las abejas recién emergidas o en las abejas melíferas pertenecientes a los grupos de control (y glifosato).

#### 6.3.4 Impacto de la intoxicación oral crónica con glifosato en la supervivencia de las abejas

Por último, el glifosato, *N. ceranae*, así como ambos factores juntos afectaron significativamente la supervivencia de las abejas. Mientras que las abejas del grupo control lograron sobrevivir 30 días en las condiciones empleadas en este ensayo, la infección por *N. ceranae* y el consumo crónico de glifosato con la dosis subletal de 10mg/L, disminuyeron significativamente la vida de las abejas (Log Rank test, estadístico=65,6  $p < 0,001$ ) (Figura 25). La vida media (es decir, el tiempo en el que el 50% de la población de abejas muere) se estimó en 20 días para las abejas del grupo control, 18 días para las abejas infectadas con *N. ceranae*, 23 días para las abejas intoxicadas con glifosato D1, 20 días para las abejas intoxicadas D1 e infectadas con *N. ceranae*, 13 días para las abejas intoxicadas con glifosato D2, 15 días para las abejas intoxicadas D2 e infectadas con *N. ceranae*. Estos factores aumentaron significativamente el riesgo de muerte de las abejas en 2,38; 0,89; 1,68; 2,94 y 3,26 veces respectivamente, en comparación con el grupo control. El consumo de jarabe de sacarosa por día por abeja fue similar en todos los grupos con respecto al grupo control (KW  $p > 0,05$  en todos los casos).



**Figura 25.** A. Curva de supervivencia de abejas melíferas sometidas a exposición crónica de glifosato (5 y 10 mg/L), *N. ceranae* (100.000 esporas/abeja en el día 0) y ambos factores combinados. En total se utilizaron doscientos diez abejas por tratamiento (setenta abejas por jaula, tres jaulas independientes por tratamiento). (B) Relación de riesgo de las abejas melíferas sujetas a diferentes factores estresantes en comparación con el grupo de control de jarabe de sacarosa.

## 6.4 Discusión

El glifosato es el herbicida más utilizado alrededor del mundo (Benbrook, 2016), y su uso continúa en aumento (Battaglin et al., 2014; Rubio et al., 2014). Esto ha generado la contaminación de los cursos de agua, lluvia y aire, especialmente en áreas agrícolas. Las abejas melíferas se exponen a este herbicida a través de la recolección de polen, néctar o agua contaminada, y lo pueden transportar a la colonia contaminando a otras abejas, así como también al alimento (Johnson & Pettis, 2014; Mukherjee, 2009; Balbuena et al., 2015).

Estudios recientes han mostrado que la exposición a dosis subletales de glifosato genera una alteración de la composición de la microbiota intestinal de las abejas (Blot et al., 2019; Motta et al., 2018, 2020a, 2020b; Motta & Moran, 2020). Esta tesis confirma estos resultados. En 2018, investigadores europeos informaron que la administración con glifosato en las abejas (5 y 10 mg/L) en condiciones de laboratorio durante 5 días alteró la microbiota intestinal, siendo *S. alvi* la especie más afectada (Motta et al., 2018). En un trabajo posterior, estos mismos autores reafirmaron que la administración crónica con este herbicida (~1.7 mg/L a 170 mg/L) en abejas de 24 horas en condiciones de laboratorio, afectó la microbiota intestinal, siendo nuevamente *S. alvi* la especie más afectada (Motta et al., 2020a). Del mismo modo, en 2020 dichos autores evaluaron los efectos vía oral y tópico de varias concentraciones de glifosato solo o como una formulación comercial (*Round-up*) en condiciones de laboratorio y de campo, confirmando los resultados obtenidos previamente en condiciones de laboratorio (Motta et al., 2020b). Nuestros resultados coinciden con estos estudios previos, y subrayan a *S. alvi* como la especie más afectada.

El mecanismo de acción del glifosato podría ser la inhibición de la enzima EPSPS, presente en plantas, que también se encuentra presente en los genomas secuenciados de bacterias pertenecientes a la microbiota intestinal de las abejas (Motta et al., 2018). La susceptibilidad de los microorganismos al glifosato depende del tipo de enzima que poseen, clase I o II. Las enzimas de clase I son sensibles al glifosato mientras que las enzimas de clase II son tolerantes al herbicida. *Snodgrassella alvi* posee la clase I de EPSPS, lo que la hace sensible al herbicida (Motta et al., 2018). Esta bacteria coloniza el íleon formando un denso *biofilm* que podría bloquear el acceso de patógenos a las células epiteliales del hospedador (Powell et al., 2016). Además, *S. alvi* puede modular el sistema inmunitario de abejas melíferas (Kwong et al., 2017). La disminución en la abundancia de esta especie asociada con el glifosato (Blot et al., 2019; Motta et al., 2018; Motta & Moran, 2020), demostrado también en este estudio, podría alterar la homeostasis de las abejas adultas, teniendo importantes consecuencias en la salud de las abejas melíferas.

Por otro lado, el glifosato aumentó la abundancia de ASVs identificadas como *Staphylococcus* sp., *Enterobacteraceae* y los miembros claves como *G. apicola* y *L. kimbladii* (Firm-5). *Staphylococcus* spp. son microorganismos oportunistas que generalmente no se encuentran en la microbiota intestinal de las abejas melíferas (Engel et al., 2016; Raymann & Moran, 2018). Sin embargo, han sido aislados ocasionalmente del intestino de la abeja melífera, lo que sugiere que podrían ser parte de la microbiota intestinal de estos insectos, pero en una abundancia relativamente menor (Anjum et al., 2018; Blot et al., 2019). Algunas especies del género *Staphylococcus* tienen EPSPS clase II, la cual no es sensible al glifosato (Priestman et al., 2005), por lo que estas condiciones favorecerían la multiplicación de este microorganismo generando un aumento de su abundancia relativa en la microbiota intestinal de las abejas. De hecho, Blot y col., 2019 (Blot et al., 2019) encontraron que una cepa de *Staphylococcus* aislada del intestino de la abeja melífera es resistente al herbicida.

En cuanto a *G. apicola*, Blot y colaboradores (2019) proponen que la especie podría tener distintas cepas con diferente susceptibilidad al glifosato, que puede estar relacionada con diferentes mecanismos de resistencia, incluyendo el eflujo y la degradación enzimática del herbicida, como se ha descrito para otros microorganismos (Blot et al., 2019; Hove-Jensen et al., 2014; Van Bruggen et al., 2018). En nuestro trabajo se observó un aumento en la abundancia de esta bacteria, mientras que en estudios previos encontraron una reducción (Blot et al., 2019; Motta et al., 2020; Motta & Moran, 2020).

En cuanto a *Lactobacillus* Firm-5, nuestros resultados son consistentes con trabajos previos (Blot et al., 2019). Estos autores propusieron una hipótesis ecológica para explicar esto, la reducción de algunas especies bacterianas podría liberar nichos ecológicos que serían ocupados por otros microorganismos. En este caso la reducción de *S. alvi* podría favorecer el aumento de *L. kumbaldi*,

Aunque los estudios publicados anteriormente proporcionan una fuerte evidencia sobre el impacto de glifosato solo o en formulaciones comerciales en la microbiota intestinal de las abejas melíferas bajo condiciones de laboratorio y de campo, la novedad de nuestro estudio es la evaluación simultánea del impacto del glifosato junto con *N. ceranae*, un microsporidio que afecta a las abejas salud y se encuentra comúnmente en las colonias de abejas (Higes et al., 2013). *N. ceranae* generó cambios en la microbiota intestinal de las abejas melíferas, favoreciendo un aumento en la abundancia de bacterias en la familia *Enterobacteriaceae*, entre otras alteraciones.

Dado que estos microsporidios infectan las células epiteliales del intestino y alteran drásticamente su anatomía y fisiología (Higes et al., 2013) no es sorprendente que generen cambios importantes en la microbiota intestinal residente. El glifosato y *N. ceranae* juntos aumentaron la diversidad de la comunidad intestinal. Aunque, por lo general, una comunidad bacteriana saludable se asocia con microbiotas que

poseen alta diversidad de bacteria, esto no parece ser el caso en nuestro estudio, ya que estos factores estresantes favorecieron la colonización por oportunistas, y microorganismos potencialmente patógenos. Además de eso, ambos factores juntos disminuyen la abundancia relativa de un miembro central importante, *L. apis* (Firm-4).

Además del efecto del glifosato y *N. ceranae* sobre la microbiota, también se investigó su impacto en la inmunocompetencia y en el nivel de infección por

patógenos, así como la supervivencia de las abejas melíferas. El glifosato y *N. ceranae* aumentaron la expresión de lisozima, una enzima responsable de hidrolizar las paredes celulares bacterianas en animales, y promover la síntesis de péptidos antimicrobianos (Schneider, 1985). El glifosato también aumentó la expresión de glucosa oxidasa, una enzima responsable de producir uno de los principales componentes antibacterianos, peróxido de hidrógeno, al oxidar -d-glucosa a ácido glucónico en abejas (Bucekova et al., 2014), siendo un marcador de inmunidad social (Alaux et al., 2010). Esos resultados demostraron que el glifosato es capaz de modificar la expresión de genes asociados a la inmunidad, posiblemente representando una respuesta fisiológica para mitigar los efectos negativos del envenenamiento (Zhao et al., 2020). Por otro lado, puede ser un efecto indirecto de la alteración de la microbiota intestinal. De todos modos, la activación del sistema inmune es energéticamente costosa (Zhao et al., 2020) y según nuestros resultados, esto no sería suficiente para superar la infección por DWV. De hecho, en este estudio encontramos que el glifosato favorecía la infección por DWV, lo que representa la primera evidencia de una interacción entre este herbicida y el virus ARN en la abeja melífera. El glifosato, *N. ceranae* y DWV redujeron severamente el nivel de expresión de vitelogenina, una enzima importante involucrada en la división del trabajo, la especialización en alimentación, la longevidad de la reina y la resistencia al estrés oxidativo (Amdam & Omholt, 2003; Nelson et al., 2007). Una disminución en el nivel



de vitelogenina se asocia con un forrajeo precoz y una vida más corta (Amdam & Omholt, 2003; Nelson et al., 2007). Por lo tanto, esta disminución en la expresión de la vitelogenina puede estar asociada con la reducción significativa en la supervivencia de las abejas.

En conclusión, nuestros resultados confirman que la intoxicación crónica con dosis subletales de glifosato alteró la microbiota intestinal de las abejas melíferas y disminuyó la abundancia de miembros centrales como *S. alvi*. Cuando *N. ceranae* estuvo presente, el efecto fue más evidente, ya que la diversidad intestinal aumentó significativamente y la abundancia de otras bacterias centrales, *L. apis*, disminuyó. Aunque las abejas melíferas expuestas al glifosato desarrollaron una respuesta inmune, esas estrategias parecieron no tener éxito, ya que los niveles de infección por DWV aumentaron y la vida útil de las abejas melíferas se acortó significativamente.

Además de afectar a la microbiota, también se demostró que las abejas tratadas con glifosato 10 mg/L desde los primeros días de su emergencia presentaron un ciclo de vida más corto con respecto a las abejas de control. Diferentes trabajos respaldan que el glifosato compromete directamente el *fitness* de la abeja en diferentes etapas de desarrollo (Herbert et al., 2014; Balbuena et al., 2015).

Estos hallazgos contribuyen a dilucidar los mecanismos involucrados en el efecto nocivo del uso generalizado de glifosato en la salud de las abejas melíferas.

## 7. Consideraciones finales

---

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo nos permiten confirmar nuestras hipótesis de trabajo:

La intoxicación crónica con dosis subletales de sulfoxaflor generó alteraciones en la estructura y composición de la microbiota intestinal de las abejas melíferas, incrementando el número de bacterias totales en el intestino. La intoxicación aguda si bien no generó cambios en el número de bacterias totales del intestino disminuyó la abundancia de *Snodgrassella alvi* y *Lactobacillus* spp., componentes principales de la microbiota. Además, la intoxicación con sulfoxaflor generó cambios en la expresión de péptidos antimicrobianos como la himenoptecina y la expresión de la enzima lisozima. Estas alteraciones terminaron afectando la supervivencia de las abejas.

La intoxicación aguda y crónica con dosis de glufosinato de amonio en las abejas generó una disminución significativa en el número de bacterias totales en el intestino, afectando también la diversidad alfa y beta de la microbiota. La intoxicación crónica con el glufosinato de amonio redujo significativamente la expresión de la glucosa oxidasa. Estas alteraciones afectaron de forma significativa la supervivencia de las abejas, así como el consumo de jarabe de sacarosa de las mismas.

Por último, tanto la intoxicación crónica con glifosato como la infección con esporas de *N. ceranae* alteraron la microbiota intestinal de las abejas. En particular, el glifosato disminuyó la abundancia de *Snodgrassella alvi*, bacteria implicada en la defensa frente a patógenos. Ambos factores generaron un aumento en la expresión de genes vinculados a la inmunidad (lisozima y glucosa oxidasa), probablemente como intento para sobreponerse a los efectos negativos de los tratamientos. El glifosato no tuvo efecto en el nivel de infección por *N. ceranae*, pero sí incrementó el nivel de infección del virus de las alas deformes. Como consecuencia, el glifosato por

sí solo, así como en conjunto con *N. ceranae* disminuyeron significativamente la supervivencia de las abejas.

Si bien los tres pesticidas evaluados tienen diferentes mecanismos de acción, la intoxicación con cualquiera de los tres terminó afectando la capacidad de las abejas de adaptarse a los diferentes ambientes, viéndose reflejada en una reducción de la supervivencia de las abejas melíferas.

Teniendo en cuenta que las abejas son consideradas un excelente indicador de calidad ambiental, el impacto observado aún con dosis subletales de pesticidas en esta tesis nos hace reflexionar sobre el daño causado por estos productos en el ecosistema. Es necesario tomar medidas para reemplazar el uso del sulfoxaflor, glufosinato de amonio así como también del glifosato, por productos alternativos que sean menos dañinos y tóxicos para el ambiente, o implementar nuevas alternativas de cultivos para los polinizadores a fin de evitar pérdidas de abejas melíferas y preservar los polinizadores nativos que son esenciales para el mantenimiento de los ecosistemas.

Como estrategias alternativas, se podría plantear:

1. Empleo de biocontroles o controles biológicos de plagas en cultivos.
2. Siembra de policultivos (es decir siembra de múltiples tipos de cultivos) que se complementen entre sí, como una forma de mantener el cultivo de interés.
3. Uso de barreras naturales, es decir, utilizar y plantar otros cultivos diferentes y cercanos al cultivo de interés para atraer y alojar sus depredadores. Un ejemplo de esto es la siembra de rosadales en cultivos de uvas, las cuales funcionan como alarmas biológicas ya que alojarían las plagas del cultivo de interés con el fin de proteger los mismos (Hossain et al., 2017; Jackson, 2002).

## Consideraciones finales

La adopción de estrategias para reducir el uso de estos pesticidas en los cultivos puede contribuir a la conservación de los polinizadores y reducir la contaminación ambiental provocada por el uso de pesticidas.

## 8. Perspectivas

---

Los resultados obtenidos en esta tesis nos han permitido comprender el efecto de la intoxicación con dosis subletales de diferentes pesticidas en la microbiota intestinal, en la respuesta inmune de las abejas melíferas así como en la susceptibilidad a *Nosema ceranae* y el Virus de las alas deformes.

Considerando estos efectos, y dado que existe un eje microbiota-intestino-cerebro, los cambios de la microbiota podrían afectar el sistema nervioso de estos insectos. Sería interesante estudiar cómo estos cambios afectan los mecanismos vinculados a las características sociales de la abeja como el aprendizaje y la orientación.

Otra perspectiva interesante sería estudiar el efecto de estos pesticidas en los mismos parámetros pero en condiciones de campo, en colmenas expuestas a estos productos químicos.

Por último, estos resultados sientan las bases para el desarrollo de nuevos proyectos en los que sería interesante evaluar cómo afectan otros pesticidas como por ejemplo funguicidas o acaricidas, así como también la combinación de más de un pesticida y/o sus formulaciones comerciales en la salud de las abejas melíferas.

## 9. Referencias

---

- Ahn, K., Xie, X., Riddle, J., Pettis, J., & Huang, Z. Y. (2012). Effects of long distance transportation on honey bee physiology. *Psyche* (London). <https://doi.org/10.1155/2012/193029>
- Ahmad, I., & Malloch, D. (1995). Interaction of soil microflora with the bioherbicide phosphinothricin. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 54(3), 165–174. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(95\)00603-P](https://doi.org/10.1016/0167-8809(95)00603-P)
- Aizen, M. A., Garibaldi, L. A., Cunningham, S. A., & Klein, A. M. (2009). How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Annals of Botany*, 103(9), 1579. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCP076>
- Alaux, C., Brunet, J.-L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L. P., & Le Conte, Y. (2009). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*)e mi\_2123 774..782. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x>
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., & Le Conte, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6(4), 562–565. <https://doi.org/10.1098/RSBL.2009.0986>
- Alaux, C., Folschweiller, M., McDonnell, C., Beslay, D., Cousin, M., Dussaubat, C., Brunet, J. L., & Conte, Y. Le. (2011). Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 106(3), 380–385. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2010.12.005>
- Alberoni, D., Favaro, R., Baffoni, L., Angeli, S., & Di Gioia, D. (2021). Neonicotinoids in the agroecosystem: In-field long-term assessment on honeybee colony strength and microbiome. *Science of The Total Environment*, 762, 144116. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.144116>
- Amdam, G. V., & Omholt, S. W. (2003). The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*, 223(4), 451–464. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(03\)00121-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(03)00121-8)
- Anido, M., Branchiccela, B., Castelli, L., Harriet, J., Campá, J., Zunino, P., & Antúnez, K. (2015). Prevalencia y distribución de los principales patógenos apícolas en Uruguay. *Journal of Apicultural Research*, 54(5), 532–540. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1175731>
- Anderson, M. J. (2006a). Distance-based tests for homogeneity of multivariate

## Referencias

- dispersions. *Biometrics*. 62, 245–253. <https://doi.org/10.1111/j.1541-0420.2005.00440.x>.
- Anderson, M.J, (2006b). Ellingsen K.E.; McArdle B.H. Multivariate dispersion as a measure of beta diversity. *Ecol. Let.* 9, 683–693. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00926.x>.
- Anderson, K. E., Maes, P, (2022). Social microbiota and social gland gene expression of worker honey bees by age and climate. *Sci Rep* 12, 10690. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14442-0>.
- Anjum, S. I., Shah, A. H., Aurongzeb, M., Kori, J., Azim, M. K., Ansari, M. J., & Bin, L. (2018). Characterization of gut bacterial flora of *Apis mellifera* from north-west Pakistan. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 388–392. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2017.05.008>
- Antúnez, K., Martín-Hernández, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., & Higes, M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, 11(9). <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x>
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campa, J., Invernizzi, C., Santos, E., Higes, M., Martín-Hernández, R., & Zunino, P. (2015). Seasonal Variation of Honeybee Pathogens and its Association with Pollen Diversity in Uruguay. *Microbial Ecology*, 70(2), 522–533. <https://doi.org/10.1007/S00248-015-0594-7/FIGURES/7>
- Aufauvre, J., Misme-Aucouturier, B., Viguès, B., Texier, C., Delbac, F., & Blot, N. (2014). Transcriptome Analyses of the Honeybee Response to *Nosema ceranae* and Insecticides. *PLOS ONE*, 9(3), e91686. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0091686>
- Babcock, J. M., Gerwick, C. B., Huang, J. X., Loso, M. R., Nakamura, G., Nolting, S. P., Rogers, R. B., Sparks, T. C., Thomas, J., Watson, G. B., & Zhu, Y. (2011). Biological characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide. *Pest Management Science*, 67(3), 328–334. <https://doi.org/10.1002/PS.2069>
- Bacci, L., Convertini, S., & Rossaro, B. (2018). A review of sulfoxaflor, a derivative of biological acting substances as a class of insecticides with a broad range of action against many insect pests. *Journal of Entomological and Acarological Research*, 50(3). <https://doi.org/10.4081/jear.2018.7836>
- Bailey, L., & Ball, B. V. (1991). Chapter 3 Viruses - XI Cultivation and Purification of Bee Viruses. *Honey Bee Pathology*, 31–34.

## Referencias

- Balayiannis, G., & Balayiannis, P. (2008). Bee honey as an environmental bioindicator of pesticides' occurrence in six agricultural areas of Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55(3), 462–470. <https://doi.org/10.1007/S00244-007-9126-X>
- Balbuena, S., Castelli, L., Zunino, P., Antúnez, K. (2022). Effect of Chronic Exposure to Sublethal Doses of Imidacloprid and *Nosema ceranae* on Immunity, Gut Microbiota, and Survival of Africanized Honey Bees. *Microb Ecol.* doi: <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02014-8>.
- Balbuena, M. S., Tison, L., Hahn, M. L., Greggers, U., Menzel, R., & Farina, W. M. (2015). Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *Journal of Experimental Biology*, 218(17), 2799–2805. <https://doi.org/10.1242/JEB.117291>
- Barker, R. J., & Lehner, Y. (1974). Influence of diet on sugars found by thin-layer chromatography in thoraces of honey bees, *Apis mellifera* L. *Journal of Experimental Zoology*, 188(2), 157–164. <https://doi.org/10.1002/JEZ.1401880204>
- Battaglin, W. A., Meyer, M. T., Kuivila, K. M., & Dietze, J. E. (2014). Glyphosate and Its Degradation Product AMPA Occur Frequently and Widely in U.S. Soils, Surface Water, Groundwater, and Precipitation. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 50(2), 275–290. <https://doi.org/10.1111/JAWR.12159>
- Beaurepaire, A., Piot, N., Doublet, V., Antunez, K., Campbell, E., Chantawannakul, P., Chejanovsky, N., Gajda, A., Heerman, M., Panziera, D., Smagghe, G., Yañez, O., De Miranda, J. R., & Dalmon, A. (2020). Diversity and global distribution of viruses of the western honey bee, *apis mellifera*. *Insects*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/insects11040239>
- Belden, J. B., Gilliom, R. J., Martin, J. D., & Lydy, M. J. (2007). Relative toxicity and occurrence patterns of pesticide mixtures in streams draining agricultural watersheds dominated by corn and soybean production. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3(1), 90–100. <https://doi.org/10.1002/IEAM.5630030108>
- Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S12302-016-0070-0>
- Berg, C. J., Peter King, H., Delenstarr, G., Kumar, R., Rubio, F., & Glaze, T. (2018). Glyphosate residue concentrations in honey attributed through geospatial analysis to proximity of large-scale agriculture and transfer off-site by bees. *PLOS ONE*, 13(7), e0198876. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0198876>



## Referencias

- Berlicki, L. (2008). Inhibitors of Glutamine Synthetase and their Potential Application in Medicine. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(9), 869–878. <https://doi.org/10.2174/138955708785132800>
- Bland, J. M., & Altman, D. G. (2004). Statistics Notes: The logrank test. *BMJ : British Medical Journal*, 328(7447), 1073. <https://doi.org/10.1136/BMJ.328.7447.1073>
- Blot, N., Veillat, L., Rouzé, R., & Delatte, H. (2019). Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. *PLOS ONE*, 14(4), e0215466. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0215466>
- Bogdanov, S. (1997). Nature and Origin of the Antibacterial Substances in Honey. *Undefined*, 30(7), 748–753. <https://doi.org/10.1006/FSTL.1997.0259>
- Bonmatin, J. M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E. A. D., Noome, D. A., Simon-Delso, N. & Tapparo, A. (2015). Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. *Environmental science and pollution research*, 22(1), 35-67.
- Bourgeois, A. L., Rinderer, T. E., Beaman, L. D., & Danka, R. G. (2010). Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(1), 53–58. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2009.10.009>
- Botías, C., & Sánchez-Bayo, F. (2018). Papel de los plaguicidas en la pérdida de polinizadores. *Ecosistemas*, 27(2), 34–41. <https://doi.org/10.7818/ECOS.1314>
- Botías, C., David, A., Horwood, J., Abdul-Sada, A., Nicholls, E., Hill, E., & Goulson, D. (2015). Neonicotinoid Residues in Wildflowers, a Potential Route of Chronic Exposure for Bees. *Environmental Science and Technology*, 49(21), 12731–12740. [https://doi.org/10.1021/ACS.EST.5B03459/SUPPL\\_FILE/ES5B03459\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/ACS.EST.5B03459/SUPPL_FILE/ES5B03459_SI_001.PDF)
- Branchiccela, B., Arredondo, D., Higes, M., Invernizzi, C., Martín-Hernández, R., Tomasco, I., Zunino, P., & Antúnez, K. (2017). Characterization of *Nosema ceranae* Genetic Variants from Different Geographic Origins. *Microbial Ecology*, 73(4). <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0880-z>
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., & Büchler, R. (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 86, 40–47. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2016.01.001>
- Brown, M. J. F., Dicks, L. V., Paxton, R. J., Baldock, K. C. R., Barron, A. B., Chauzat, M. P., Freitas, B. M., Goulson, D., Jepsen, S., Kremen, C., Li, J., Neumann, P.,

## Referencias

- Pattemore, D. E., Potts, S. G., Schweiger, O., Seymour, C. L., & Stout, J. C. (2016). A horizon scan of future threats and opportunities for pollinators and pollination. *PeerJ*, 2016(9), e2249. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.2249/SUPP-1>
- Bucekova, M., Valachova, I., Kohutova, L., Prochazka, E., Kloudiny, J., & Majtan, J. (2014). Honeybee glucose oxidase—its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated antibacterial activity in natural honeys. *Naturwissenschaften* 2014 101:8, 101(8), 661–670. <https://doi.org/10.1007/S00114-014-1205-Z>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581. <https://doi.org/10.1038/NMETH.3869>
- Catae, A. F., Roat, T. C., Pratavieira, M., Silva Menegasso, A. R. D., Palma, M. S., & Malaspina, O. (2018). Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Ecotoxicology*, 27(2), 109-121.
- Cani, P. D., & Delzenne, N. M. (2007). Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 10(6), 729–734. <https://doi.org/10.1097/MCO.0B013E3282EFDEBB>
- Cantwell, G.E. (1970) Standard Methods for Counting Nosema Spores. *American Bee Journal*, 110, 222-223.
- Cao, G., Liu, Y., Zhang, S., Yang, X., Chen, R., Zhang, Y., Lu, W., Liu, Y., Wang, J., Lin, M., & Wang, G. (2012). A Novel 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase Shows High Glyphosate Tolerance in *Escherichia coli* and Tobacco Plants. *PLOS ONE*, 7(6), e38718. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0038718>
- Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P., & Tempst, P. (1994). Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 28569–28575. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)61943-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)61943-5)
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., & Tempst, P. (1993). Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7044–7054. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53143-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53143-4)
- Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Van Damme, J., Elicone, C., Fleming, M., ... &

- Tempst, P. (1990). Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European journal of biochemistry*, 187(2), 381-386. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1990.TB15315.X>
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., & Tempst, P. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal*, 8(8), 2387–2391. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1989.TB08368.X>
- Castelli, L., Branchiccela, B., Garrido, M., Invernizzi, C., Porrini, M., Romero, H., Santos, E., Zunino, P., & Antúnez, K. (2020). Impact of Nutritional Stress on Honeybee Gut Microbiota, Immunity, and *Nosema ceranae* Infection. *Microbial Ecology*, 80(4), 908–919. <https://doi.org/10.1007/S00248-020-01538-1>
- Castelli, L., Balbuena, S., Branchiccela, B., Zunino, P., Liberti, J., Engel, P., & Antúnez, K. (2021). Impact of chronic exposure to sublethal doses of glyphosate on honey bee immunity, gut microbiota and infection by pathogens. *Microorganisms*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9040845>
- Catae, A.F., Roat, T.C., Pratavieira, M., Silva Menegasso, A.R.D., Palma, M.S., Malaspina, O. (2018). Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). *Ecotoxicology*.27(2):109-121. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1874-4>.
- Celli, G., & Maccagnani, B. (2003). Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology*, 56(1), 137–139.
- Chaimanee, V., Chantawannakul, P., Chen, Y., Evans, J. D., & Pettis, J. S. (2012). Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology*, 58(8), 1090–1095. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2012.04.016>
- Chakrabarti, P., Carlson, E. A., Lucas, H. M., Melathopoulos, A. P., & Sagili, R. R. (2020). Field rates of Sivanto™(flupyradifurone) and Transform®(sulfoxaflor) increase oxidative stress and induce apoptosis in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Plos one*, 15(5), e0233033.
- Charles D. Michener. (1974). *The Social Behavior of the Bees*. 418.
- Chen, Y., Evans, J. D., Smith, I. B., & Pettis, J. S. (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(2), 186–188. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2007.07.010>
- Christophides, G. K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P. T., Collins, F. H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N. T.,

## Referencias

- Hoffmann, J. A., Kanzok, S. M., Letunic, I., Levashina, E. A., Loukeris, T. G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L. F., Müller, H-M., Osta, M. A., Paskewitz, S. M., Reichhart, J-M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K. D., Vlachou, D., Volz, J., von Mering, C., Xu, C., Zheng, L., Bork, P., Kafatos, F. C. (2002). Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*, 298(5591), 159–165. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1077136/SUPPL\\_FILE/CHRISTOPHIDES1077136.SUP.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1077136/SUPPL_FILE/CHRISTOPHIDES1077136.SUP.PDF)
- Council, N. R. (2006). Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. *Nutrient Requirements of Small Ruminants*. <https://doi.org/10.17226/11654>
- Craig, I., Woods, N., & Dorr, G. (1998). A simple guide to predicting aircraft spray drift. *Crop Protection*, 17(6), 475–482. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(98\)00006-4](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(98)00006-4)
- Crailsheim, K., & Riessberger-Gallé, U. (2001). Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie*, 32(1), 91–103. <https://doi.org/10.1051/APIDO:2001114>
- Crawley, M.J. (2016) *The R Book*. 2nd Edition. John Wiley & Sons Ltd., New Delhi.
- Cremer, S., Armitage, S. A. O., & Schmid-Hempel, P. (2007). Social Immunity. *Current Biology*, 17(16). <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2007.06.008>
- Cutler, P., Slater, R., Edmunds, A. J. F., Maienfisch, P., Hall, R. G., Earley, F. G. P., Pitterna, T., Pal, S., Paul, V. L., Goodchild, J., Blacker, M., Hagmann, L., & Crossthwaite, A. J. (2013). Investigating the mode of action of sulfoxaflor: a fourth-generation neonicotinoid. *Pest Management Science*, 69(5), 607–619. <https://doi.org/10.1002/PS.3413>
- Corby-Harris, V., Maes, P., & Anderson, K. E. (2014). The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0095056>
- 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 of the United States of America*, 104(17), 7128–7133. [https://doi.org/10.1073/PNAS.0701909104/SUPPL\\_FILE/01909FIG12.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.0701909104/SUPPL_FILE/01909FIG12.PDF)
- Daisley, B. A., Chmiel, J. A., Pitek, A. P., Thompson, G. J., & Reid, G. (2020). Missing Microbes in Bees: How Systematic Depletion of Key Symbionts Erodes

## Referencias

- Immunity. *Trends in Microbiology*, 28(12), 1010–1021. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2020.06.006>
- Daisley, B. A., & Reid, G. (2021). BEEexact: a Metataxonomic Database Tool for High-Resolution Inference of Bee-Associated Microbial Communities. *MSystems*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00082-21>
- Danihlík, J., Aronstein, K., & Petřivalský, M. (2015). Antimicrobial peptides: A key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*, 54(2), 123–136. <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919>
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual review of entomology*, 52(1), 81–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- Diea, & Mgap, (2014). Anuario Estadístico Agropecuario 2014. [www.mgap.gub.uy/diea](http://www.mgap.gub.uy/diea).
- Disayathanoowat, T., Young, J. P. W., Helgason, T., & Chantawannakul, P. (2012). T-RFLP analysis of bacterial communities in the midguts of *Apis mellifera* and *Apis cerana* honey bees in Thailand. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(2), 273–281. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6941.2011.01216.X>
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., Gargiulo, G., & Pennacchio, F. (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(46), 18466–18471. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1314923110/SUPPL\\_FILE/FRANCESCO PENNACCHIOPODCAST.MP3](https://doi.org/10.1073/PNAS.1314923110/SUPPL_FILE/FRANCESCO PENNACCHIOPODCAST.MP3)
- Diaz, T., del-Val, E., Ayala, R., & Larsen, J. (2019). Alterations in honey bee gut microorganisms caused by *Nosema* spp. and pest control methods. *Pest Management Science*, 75(3), 835–843. <https://doi.org/10.1002/PS.5188>
- Dickschat, J. S. (2010). Quorum sensing and bacterial biofilms. *Natural Product Reports*, 27(3), 343–369. <https://doi.org/10.1039/B804469B>
- Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O'Connell, T. M., Bunger, M. K., & Bultman, S. J. (2011). The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metabolism*, 13(5), 517. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2011.02.018>
- Doublet, V., Labarussias, M., de Miranda, J. R., Moritz, R. F. A., & Paxton, R. J. (2015). Bees under stress: Sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and

## Referencias

- pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental Microbiology*, 17(4), 969–983. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12426>
- Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4), 319–325. <https://doi.org/10.1002/PS.1518>
- Dussaubat, C., Maisonnasse, A., Alaux, C., Tchamitchan, S., Brunet, J. L., Plettner, E., Belzunces, L. P., & Le Conte, Y. (2010). *Nosema* spp. Infection Alters Pheromone Production in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology* 2010 36:5, 36(5), 522–525. <https://doi.org/10.1007/S10886-010-9786-2>
- US EPA. (2014). Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for Foliar, Soil Drench, and Seed Treatment Uses Of The New Insecticide Flupyradifurone (BYI 02960).
- Eisenberg, D., Gill, H. S., Pfluegl, G. M. U., Rotstein, S. H. (2000). Structure–function relationships of glutamine synthetases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1477, 122-145. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00270-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00270-8).
- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., & Nauen, R. (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science*, 64(11), 1099–1105. <https://doi.org/10.1002/PS.1616>
- Eleftherianos, I., Felföldi, G., Ffrench-Constant, R. H., & Reynolds, S. E. (2009). Induced nitric oxide synthesis in the gut of *Manduca sexta* protects against oral infection by the bacterial pathogen *Photobacterium luminescens*. *Insect Molecular Biology*, 18(4), 507–516. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.2009.00899.X>
- Engel, P., James, R. R., Koga, R., Kwong, W. K., McFrederick, Q. S., & Moran, N. A. (2013). Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1–24. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.07>
- Engel, P., Kwong, W. K., McFrederick, Q. et al., (2016). The Bee Microbiome: Impact on Bee Health and Model for Evolution and Ecology of Host-Microbe Interactions. *MBio*, 7(2), e02164-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.02164-15>
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013a). Functional and evolutionary insights into the simple yet specific gut microbiota of the honey bee from metagenomic analysis. *Gut Microbes*, 4(1). <https://doi.org/10.4161/GMIC.22517>
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013b). The gut microbiota of insects-diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 699-735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>

- Engel, P., Martinson, V. G., & Moran, N. A. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(27), 11002–11007. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1202970109>
- EPPO (1992). Guideline on test methods for evaluating the side-effects of plant protection products on honeybees. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 22, 203-16.
- 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(5), 645–656. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.2006.00682.X>
- Evans, Jay D. (2006). Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(2), 135–139. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2006.04.004>
- Evans, Jay D, & Lopez, D. L. (2004). Bacterial Probiotics Induce an Immune Response in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *APICULTURE AND SOCIAL INSECTS J. Econ. Entomol*, 97(3), 752–756. <https://academic.oup.com/jee/article/97/3/752/2218008>
- Evans, Jay D, & Spivak, M. (2009). Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S62-S72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.019>
- Farina, W. M., Balbuena, M. S., Herbert, L. T., Mengoni Goñalons, C., & Vázquez, D. E. (2019). Effects of the herbicide glyphosate on honey bee sensory and cognitive abilities: Individual impairments with implications for the hive. *Insects*, 10(10), 354. <https://doi.org/10.3390/INSECTS10100354>
- Forsgren, E., Olofsson, T. C., Vásquez, A., & Fries, I. (2010). Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus* larvae in honey bee larvae. *Apidologie* 2010 41:1, 41(1), 99–108. <https://doi.org/10.1051/APIDO/2009065>
- Frago, E., Dicke, M., & Godfray, H. C. J. (2012). Insect symbionts as hidden players in insect–plant interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(12), 705–711. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2012.08.013>
- Funke, T., Yang, Y., Han, H., Healy-Fried, M., Olesen, S., Becker, A., & Schönbrunn, E. (2009). Structural Basis of Glyphosate Resistance Resulting from the Double Mutation Thr97 → Ile and Pro101 → Ser in 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(15), 9854. <https://doi.org/10.1074/JBC.M809771200>

- Georgiadis, P. T., Pistorius, J., & Heimbach, U. (2010). Gone with the wind-drift of abrasive dust from seed treatments-a risk for honey bees (*Apis mellifera* L.)?. *Julius-Kühn-Archiv*, (424).
- Genersch, E., Von Der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G., & Rosenkranz, P. (2010). The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41(3), 332–352. <https://doi.org/10.1051/APIDO/2010014>
- Gentleman, R., Carey, V. J., Huber, W., Hahne, F., Bioconductor, M., & Maintainer, P. (2022). Package “genefilter” Title genefilter: methods for filtering genes from high-throughput experiments Version 1.81.0 Description Some basic functions for filtering genes. <https://git.bioconductor.org/packages/genefilter>
- Giambò, F., Teodoro, M., Costa, C., Fenga, C., & Gregory Robson, M. (2021). Toxicology and Microbiota: How Do Pesticides Influence Gut Microbiota? A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 18, 5510. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115510>
- Godfrey, S. S., Bull, C. M., Murray, K., & Gardner, M. G. (2006). Transmission mode and distribution of parasites among groups of the social lizard *Egernia stokesii*. *Parasitology Research*, 99(3), 223–230. <https://doi.org/10.1007/S00436-005-0120-9>
- Goulson, D., Lye, G. C., & Darvill, B. (2007). Decline and Conservation of Bumble Bees. *Annual review of entomology*, 53, 191–208. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Ento.53.103106.093454>, 53, 191–208.
- Goulson, Dave, Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229). [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1255957/ASSET/25ACDDB7-03E0-4D87-BEC1-0935B850C29F/ASSETS/GRAPHIC/347\\_1255957\\_FA.JPEG](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1255957/ASSET/25ACDDB7-03E0-4D87-BEC1-0935B850C29F/ASSETS/GRAPHIC/347_1255957_FA.JPEG)
- Gray, A., Adjlane, N., Arab, A., Ballis, A., Brusbardis, V., Douglas, A. B., Cadahía, L., Charrière, J.-D., Chlebo, R., Coffey, M. F., Cornelissen, B., Costa, C. A. da, Danneels, E., Danihlík, J., Dobrescu, C., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., Gregorc, A., et al., (2022). Honey bee colony loss rates in 37 countries using the COLOSS survey for winter 2019–2020: the combined effects of operation size, migration and queen replacement. *Journal of Apicultural Research*, 1–7. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2113329>, 1–7.
- Graystock, P., Goulson, D., & Hughes, W. O. H. (2015). Parasites in bloom: flowers aid dispersal and transmission of pollinator parasites within and between bee species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1813).



<https://doi.org/10.1098/RSPB.2015.1371>

Greig-Smith, P. W., Thompson, H. M., Hardy, A. R., Bew, M. H., Findlay, E., & Stevenson, J. H. (1994). Incidents of poisoning of honeybees (*Apis mellifera*) by agricultural pesticides in Great Britain 1981-1991. *Crop Protection* (United Kingdom). <https://doi.org/10.3/JQUERY-UIJS>

Guzman-Novoa, E. (2011). Genetic Basis of Disease Resistance in the Honey Bee (*Apis mellifera* L.). *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition, 4, 763–767. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00327-5>

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(7), 524–533. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0418.2010.01609.X>

Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J. F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., & Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079), 348–350. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1215039/SUPPL\\_FILE/HENRY.SOM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1215039/SUPPL_FILE/HENRY.SOM.PDF)

Herbert, L. T., Vázquez, D. E., Arenas, A., & Farina, W. M. (2014). Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *Journal of Experimental Biology*, 217(19), 3457–3464. <https://doi.org/10.1242/JEB.109520/257937/AM/EFFECTS-OF-FIELD-REALISTIC-DOSES-OF-GLYPHOSATE-ON>

Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E. G., González-Porto, A. V., Barrios, L., Del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Jiménez, J. J., Palencia, P. G., & Meana, A. (2008a). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2659–2669. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2008.01687.X>

Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., Botías, C., García-Palencia, P., & Meana, A. (2008b). Regurgitated pellets of *Merops apiaster* as fomites of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores. *Environmental Microbiology*, 10(5), 1374–1379. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2007.01548.X>

Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A. V., García-Palencia, P., Meana, A., del Nozal, M. J., Mayo, R., & Bernal, J. L. (2009). Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports*, 1(2), 110–113. <https://doi.org/10.1111/J.1758-2229.2009.00014.X>

## Referencias

- Higes, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., & Higes, M. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie*, 3, 375–392. <https://doi.org/10.1051/apido/2010019>
- 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(1), 17–29. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12024>
- Highfield, A. C., El Nagar, A., Mackinder, L. C. M., Noël, L. M. L. J., Hall, M. J., Martin, S. J., & Schroeder, D. C. (2009). Deformed wing virus implicated in overwintering honeybee colony losses. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7212–7220. <https://doi.org/10.1128/AEM.02227-09>
- Hoffmann, J. A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature* 2003 426:6962, 426(6962), 33–38. <https://doi.org/10.1038/nature02021>
- Hooper, L. V., Littman, D. R., & Macpherson, A. J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6086), 1268. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1223490>
- Hossain, L., Rahman, R., & Khan, M. S. (2017). Alternatives of pesticides. In *Pesticide residue in foods*. Springer, Cham. 147–165. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-52683-6\\_9/COVER](https://doi.org/10.1007/978-3-319-52683-6_9/COVER)
- Hove-Jensen, B., Zechel, D. L., & Jochimsen, B. (2014). Utilization of Glyphosate as Phosphate Source: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-13>
- Hultmark, D. (2003). *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Current Opinion in Immunology*, 15(1), 12–19. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(02\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(02)00005-5)
- Human, H., Brodschneider, R., Dietemann, V., Dively, G., Ellis, J. D., Forsgren, E., Fries, I., Hatjina, F., Hu, F.-L., Jaffé, R., Jensen, A. B., Köhler, A., Magyar, J. P., Özkýrým, A., Pirk, C. W. W., Rose, R., Strauss, U., Tanner, G., Tarpy, D. R., ... Zheng, H.-Q. (2013). Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1–53. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.10>
- Hunter-Cevera, J. C. (1998). The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*, 1(3), 278-285. <http://biomednet.com/elecref/13695274001002?8>
- Imler, J. L., & Bulet, P. (2005). Antimicrobial Peptides in *Drosophila*: Structures, Activities and Gene Regulation. *Chemical Immunology and Allergy*, 86, 1–21. <https://doi.org/10.1159/000086648>

## Referencias

- Invernizzi, C., Abud, C., Tomasco, I. H., Harriet, J., Ramallo, G., Campá, J., Katz, H., Gardiol, G., & Mendoza, Y. (2009). Presence of *Nosema ceranae* in honeybees (*Apis mellifera*) in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(2), 150–153. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2009.03.006>
- Jackson, W. (2002). Natural Systems Agriculture: A radical alternative. *Ecosystems and Environment*, 88, 111–117.
- James, R. R., & Xu, J. (2012). Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(2), 175–182. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2011.12.005>
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 21(29), 8787. <https://doi.org/10.3748/WJG.V21.I29.8787>
- Jeyaprakash, A., Hoy, M. A., & Allsopp, M. H. (2003). Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84(2), 96–103. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2003.08.007>
- Johansen, C. A., & Mayer, D. F. (1990). Pollinator protection: a bee & pesticide handbook. Wicwas Press.
- Johnson, J. D., & Pettis, J. S. (2014). A Survey of Imidacloprid Levels in Water Sources Potentially Frequented by Honeybees (*Apis mellifera*) in the Eastern USA. *Water, Air, and Soil Pollution*, 225(11). <https://doi.org/10.1007/S11270-014-2127-2>
- Jones, J. C., Fruciano, C., Hildebrand, F., Al Toufalilia, H., Balfour, N. J., Bork, P., Engel, P., Ratnieks, F. L. W., & Hughes, W. O. H. (2018). Gut microbiota composition is associated with environmental landscape in honey bees. *Ecology and Evolution*, 8(1), 441–451. <https://doi.org/10.1002/ECE3.3597>
- Kaltenpoth, M., & Engl, T. (2014). Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. *Functional Ecology*, 28(2), 315–327. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12089>
- Kaltenpoth, M., Goettler, W., Koehler, S., & Strohm, E. (2010). Life cycle and population dynamics of a protective insect symbiont reveal severe bottlenecks during vertical transmission. *Evolutionary Ecology*, 24(2), 463–477. <https://doi.org/10.1007/S10682-009-9319-Z>
- Kešnerová, L., Mars, R. A. T., Ellegaard, K. M., Troilo, M., Sauer, U., & Engel, P. (2017). Disentangling metabolic functions of bacteria in the honey bee gut. *PLOS Biology*, 15(12), e2003467. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.2003467>

## Referencias

- Klaudiny, J., Bachanová, K., Kohútová, L., Džúrová, M., Kopernický, J., & Majtán, J. (2012). Expression of larval jelly antimicrobial peptide defensin1 in *Apis mellifera* colonies. *Biologia*, 67(1), 200–211. <https://doi.org/10.2478/S11756-011-0153-8>
- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2006). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303–313. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2006.3721>
- Koch, H., & Schmid-Hempel, P. (2011). Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(48), 19288–19292. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1110474108/SUPPL\\_FILE/PNAS.201110474SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1110474108/SUPPL_FILE/PNAS.201110474SI.PDF)
- Konopka, A. (2006). *Microbial Ecology: Searching for Principles*. Undefined, 1(4), 175–179. <https://doi.org/10.1128/MICROBE.1.175.1>
- Kortekamp, A. (2011). Unexpected Side Effects of Herbicides: Modulation of Plant-Pathogen Interactions. *Herbicides and Environment*. <https://doi.org/10.5772/13217>
- Kowalski, K., & Mulak, A. (2019). Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 25(1), 48. <https://doi.org/10.5056/JNM18087>
- Krajmalnik-Brown, R., Ilhan, Z. E., Kang, D. W., & DiBaise, J. K. (2012). Effects of Gut Microbes on Nutrient Absorption and Energy Regulation. *Nutrition in Clinical Practice : Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 27(2), 201. <https://doi.org/10.1177/0884533611436116>
- Krupke, C. H., Hunt, G. J., Eitzer, B. D., Andino, G., & Given, K. (2012). Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. *PLOS ONE*, 7(1), e29268. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0029268>
- Kubik, M., Nowacki, J., Pidek, A., Warakomska, Z., Michalczyk, L., & Goszczyński, W. (1999). Pesticide residues in bee products collected from cherry trees protected during blooming period with contact and systemic fungicides. *Apidologie*, 30(6), 521–532. <https://doi.org/10.1051/APIDO:19990607>
- Kukielka, D., Esperón, F., Higes, M., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2008). A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detection of deformed wing virus and black queen cell virus in honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Virological Methods*, 147(2), 275–281. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2007.09.008>
- Kwong, W. K., Mancenido, A. L., & Moran, N. A. (2017). Immune system stimulation

## Referencias

- by the native gut microbiota of honey bees. *Royal Society Open Science*, 4(2).  
<https://doi.org/10.1098/RSOS.170003>
- Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14(6), 374–384.  
<https://doi.org/10.1038/NRMICRO.2016.43>
- Kwong, W. K., Engel, P., Koch, H., & Moran, N. A. (2014). Genomics and host specialization of honey bee and bumble bee gut symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(31), 11509–11514.  
[https://doi.org/10.1073/PNAS.1405838111/SUPPL\\_FILE/PNAS.201405838SI.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1405838111/SUPPL_FILE/PNAS.201405838SI.PDF)
- Kwong, W. K., & Moran, N. A. (2013). Cultivation and characterization of the gut symbionts of honey bees and bumble bees: Description of *Snodgrassella alvi* gen. nov., sp. nov., a member of the family Neisseriaceae of the betaproteobacteria, and *Gilliamella apicola* gen. nov., sp. nov., a member of Orbaceae fam. nov., Orbales ord. nov., a sister taxon to the order “Enterobacteriales” of the Gammaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART6), 2008–2018.  
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.044875-0>
- Larsen, A., Reynaldi, F. J., & Guzmán-Novoa, E. (2019). Fundamentals of the honey bee (*Apis mellifera*) immune system. Review. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 10(3), 705-728.
- Laukens, D., Brinkman, B. M., Raes, J., De Vos, M., & Vandenabeele, P. (2016). Heterogeneity of the gut microbiome in mice: guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), 117–132.  
<https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUV036>
- Lea, P. J., & Miflin, B. J. (2010). Nitrogen Assimilation and its Relevance to Crop Improvement. *Nitrogen Metabolism in Plants in the Post-Genomic Era*, 42, 1–40.  
<https://doi.org/10.1002/9781444328608.CH1>
- Lee, F. J., Rusch, D. B., Stewart, F. J., Mattila, H. R., & Newton, I. L. G. (2015). Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environmental Microbiology*, 17(3), 796–815. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12526>
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of immunology*, 25(ARTICLE), 697-743.  
<https://doi.org/10.1146/Annurev.Immunol.25.022106.141615>
- Lewis, K. A., Tzivilakis, J., Warner, D. J., & Green, A. (2016). An international

- database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment*, 22(4), 1050–1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
- Li, W., Evans, J. D., Li, J., Su, S., Hamilton, M., & Chen, Y. (2017). Spore load and immune response of honey bees naturally infected by *Nosema ceranae*. *Parasitology Research*, 116(12), 3265–3274. <https://doi.org/10.1007/S00436-017-5630-8>
- Liu, Y. J., Qiao, N. H., Diao, Q. Y., Jing, Z., Vukanti, R., Dai, P. L., & Ge, Y. (2020). Thiadoclopid exposure perturbs the gut microbiota and reduces the survival status in honeybees. *Journal of Hazardous Materials*, 389, 121-818. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2019.121818>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8/FIGURES/9>
- Ludvigsen, J., Rangberg, A., Avershina, E., Sekelja, M., Kreibich, C., Amdam, G., & Rudi, K. (2015). Shifts in the midgut/pyloric microbiota composition within a honey bee apiary throughout a season. *Microbes and Environments*, 30(3), 235–244. <https://doi.org/10.1264/JSME2.ME15019>
- Lv, F., Chen, S., Wang, L., Jiang, R., Tian, H., Li, J., Yao, Y., & Zhuo, C. (2017). The role of microbiota in the pathogenesis of schizophrenia and major depressive disorder and the possibility of targeting microbiota as a treatment option. *Oncotarget*, 8(59), 100899. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.21284>
- Macfarlane, S., & Dillon, J. F. (2007). Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), 1187–1196. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2007.03287.X>
- Magrini, P., Abbazzi, P., Magnano, L., & Baviera, C. (2004). Biomonitoring by bees. Tests in Latium region. *Redia*, 87, 207–210. <https://eurekamag.com/research/004/402/004402771.php>
- Maillet, I., Perche, O., Pâris, A., Richard, O., Gombault, A., Herzine, A., Pichon, J., Huaux, F., Mortaud, S., Ryffel, B., Quesniaux, V. F. J., & Montécot-Dubourg, C. (2016). Glufosinate aerogenic exposure induces glutamate and IL-1 receptor dependent lung inflammation. *Clinical Science*, 130(21), 1939–1954. <https://doi.org/10.1042/CS20160530>
- Marringa, W. J., Krueger, M. J., Burritt, N. L., & Burritt, J. B. (2014). Honey Bee Hemocyte Profiling by Flow Cytometry. *PLOS ONE*, 9(10), e108486. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0108486>

## Referencias

- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailón, E., & Higes, M. (2007). Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 73(20), 6331–6338. <https://doi.org/10.1128/AEM.00270-07>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10. <https://doi.org/10.14806/EJ.17.1.200>
- Martinson, V. G., Moy, J., & Moran, N. A. (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and environmental microbiology*, 78(8), 2830-2840.
- Mayack, C., & Naug, D. (2010). Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *Journal of Insect Physiology*, 56(11), 1572–1575. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2010.05.016>
- McMurdie, P.J., Holmes, S, 2013. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLOS ONE*.8:e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.
- McFall-Ngai, M., Hadfield, M. G., Bosch, T. C. G., Carey, H. V., Domazet-Lošo, T., Douglas, A. E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S. F., Hentschel, U., King, N., Kjelleberg, S., Knoll, A. H., Kremer, N., Mazmanian, S. K., Metcalf, J. L., Neelson, K., Pierce, N. E., et al., (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9), 3229–3236. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1218525110/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201218525SI.PDF>
- Mesnage, R., Benbrook, C., & Antoniou, M. N. (2019). Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. *Food and Chemical Toxicology*, 128, 137–145. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.03.053>
- Ministerio de Agricultura y Pesca (MGAP), 2020. Anuario Estadístico Agropecuario 2020. [www.mgap.gub.uy](http://www.mgap.gub.uy).
- Mitchell, E. A. D., Mulhauser, B., Mulo, M., Mutabazi, A., Glauser, G., & Aebi, A. (2017). A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science*, 358(6359), 109–111. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN3684/SUPPL\\_FILE/TABLES\\_NEONICS\\_HONEY\\_FINAL.XLSX](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN3684/SUPPL_FILE/TABLES_NEONICS_HONEY_FINAL.XLSX)
- Mohr, K. I., Tebbe, C.C. (2007). Field study results on the probability and risk of a horizontal gene transfer from transgenic herbicide-resistant oilseed rape pollen to gut bacteria of bees, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 573-582.

## Referencias

- <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0846-7>.
- Moran, N. A. (2015). Genomics of the honey bee microbiome. *Undefined*, 10, 22–28. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2015.04.003>
- 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(4), e36393. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0036393>
- Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., & Liber, K. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. *Environment International*, 74, 291–303. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2014.10.024>
- Motta, E. V. S., & Moran, N. A. (2020a). Impact of Glyphosate on the Honey Bee Gut Microbiota: Effects of Intensity, Duration, and Timing of Exposure. *MSystems*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00268-20>
- Motta, E. V. S., Mak, M., De Jong, T. K., Powell, J. E., O'Donnell, A., Suhr, K. J., Riddington, I. M., & Moran, N. A. (2020b). Oral or topical exposure to glyphosate in herbicide formulation impacts the gut microbiota and survival rates of honey bees. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(18). <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-20>
- Motta, E. V. S., Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(41), 10305–10310. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1803880115>
- Mukherjee, I. (2009). Determination of Pesticide Residues in Honey Samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 2009 83:6, 83(6), 818–821. <https://doi.org/10.1007/S00128-009-9772-Y>
- Murphy, K., & Weaver, C. (2016). *Janeway's immunobiology*. Garland science.
- Negri, P., Maggi, M., Correa-Aragunde, N., Brasesco, C., Eguaras, M., & Lamattina, L. (2017). Nitric oxide participates at the first steps of *Apis mellifera* cellular immune activation in response to non-self recognition. *Apidologie*, 44(5), 575–585. <https://doi.org/10.1007/S13592-013-0207-8>
- 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 Biol*, 5(3), 62. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050062>



## Referencias

- Niell, S., Jesús, F., Pérez, C., Mendoza, Y., Díaz, R., Franco, J., Cesio, V., & Heinzen, H. (2015). QuEChERS adaptability for the analysis of pesticide residues in beehive products seeking the development of an agroecosystem sustainability monitor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(18), 4484–4492. [https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.5B00795/SUPPL\\_FILE/JF5B00795\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.5B00795/SUPPL_FILE/JF5B00795_SI_001.PDF)
- Niide, N. J., Salaki, C. L., Rumokoy, L. J. M., & Tallei, T. E. (2020). Lactic Acid Bacteria from Honey Bees Digestive Tract and Their Potential as Probiotics. 236–241. <https://doi.org/10.2991/ABSR.K.200513.041>
- Nunn, C., & Altizer, S. (2006). Infectious Diseases in Primates: Behavior, Ecology and Evolution. *Infectious Diseases in Primates: Behavior, Ecology and Evolution*, 1–400. <https://doi.org/10.1093/ACPROF:OSO/9780198565857.001.0001>
- Nyholm, S. V., & Graf, J. (2012). Knowing your friends: invertebrate innate immunity fosters beneficial bacterial symbioses. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(12), 815–827. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2894>
- OECD/OCDE. (2017). OECD Guideline 245 for the Testing of Chemicals. Honey bee (*Apis mellifera* L.), Chronic Oral Toxicity Test (10-Day Feeding). OECD/OCDE. <https://doi.org/10.1787/9789264284081-en>
- Odelson, D. A., & Breznak, J. A. (1983). Volatile Fatty Acid production by the hindgut microbiota of xylophagous termites. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(5), 1602–1613. <https://doi.org/10.1128/AEM.45.5.1602-1613.1983>
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R.L.P., Minchin, P., O'Hara, R.B., Simpson, G., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H. (2015). Vegan: community ecology package. R package vegan. vers. 2.2-1. <http://CRAN.Rproject.org/package=vegan>.
- Olofsson, T. C., & Vásquez, A. (2008). Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current Microbiology*, 57(4), 356–363. <https://doi.org/10.1007/S00284-008-9202-0>
- Orantes-Bermejo, F. J., Pajuelo, A. G., Megías, M. M., & Fernández-Piñar, C. T. (2010). Pesticide residues in beeswax and beebread samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in Spain. Possible implications for bee losses. *Journal of Apicultural Research*, 49(3), 243–250. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.3.03>
- Palmer-Young, E. C., Raffel, T. R., & McFrederick, Q. S. (2019). PH-mediated inhibition of a bumble bee parasite by an intestinal symbiont. *Parasitology*, 146(3), 380–388. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001555>

## Referencias

- Pampulha, M. E., Ferreira, M. A. S. S., & Oliveira, A. (2007). Effects of a phosphinothricin based herbicide on selected groups of soil microorganisms. *Journal of Basic Microbiology*, 47(4), 325–331. <https://doi.org/10.1002/JOBM.200610274>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/NAR/29.9.E45>
- Pickard, J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R., & Núñez, G. (2017). Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunological Reviews*, 279(1), 70–89. <https://doi.org/10.1111/IMR.12567>
- Pline, W. A., Lacy, G. H., Stromberg, V., & Hatzios, K. K. (2001). Antibacterial activity of the herbicide glufosinate on *Pseudomonas syringae* pathovar *glycinea*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 71(1), 48–55.
- Pollegioni, L., Schonbrunn, E., & Siehl, D. (2011). Molecular basis of glyphosate resistance - Different approaches through protein engineering. *FEBS Journal*, 278(16), 2753–2766. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2011.08214.X>
- Porrini, C., Ghini, S., & Girotti, S. (2002). Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy. In *Honey Bees* (pp. 200–261). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203218655-14>
- Possemiers, S., Bolca, S., Verstraete, W., & Heyerick, A. (2011). The intestinal microbiome: A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. *Fitoterapia*, 82(1), 53–66. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2010.07.012>
- Powell, J. E., Leonard, S. P., Kwong, W. K., Engel, P., & Moran, N. A. (2016). Genome-wide screen identifies host colonization determinants in a bacterial gut symbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(48), 13887–13892. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1610856113/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Powell, J. E., Martinson, V. G., Urban-Mead, K., & Moran, N. A. (2014). Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(23), 7378–7387. [https://doi.org/10.1128/AEM.01861-14/SUPPL\\_FILE/ZAM999105827SO1.PDF](https://doi.org/10.1128/AEM.01861-14/SUPPL_FILE/ZAM999105827SO1.PDF)
- Priestman, M. A., Funke, T., Singh, I. M., Crupper, S. S., & Schönbrunn, E. (2005). 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. *FEBS Letters*, 579(3), 728–732. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2004.12.057>

## Referencias

- Prosser, J. I., Bohannan, B. J. M., Curtis, T. P., Ellis, R. J., Firestone, M. K., Freckleton, R. P., Green, J. L., Green, L. E., Killham, K., Lennon, J. J., Osborn, A. M., Solan, M., van der Gast, C. J., & Young, J. P. W. (2007). The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology* 2007 5:5, 5(5), 384–392. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1643>
- Prytulska, N., Karpenko, P., Antiushko, D., Bozhko, T., & Shapovalova, N. (2021). Prospects for the use of apiproducs in human healthy nutrition. *EUREKA: Life Sciences*, (5), 54-60.
- Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., & Girbés, T. (2014). Probiotic lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 5(18), 1765–1775. <https://doi.org/10.4236/FNS.2014.518190>
- Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 97. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2018.02.012>
- Raymann, K., Shaffer, Z., & Moran, N. A. (2017). Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001861>
- Requier, F., Antúnez, K., Morales, C. L., Aldea Sánchez, P., Castilhos, D., Garrido, P. M., Giacobino, A., Reynaldi, F. J., Manuel Rosso Londoño, J., Santos, E., & Garibaldi, L. A. (2018). Trends in beekeeping and honey bee colony losses in Latin America. *Taylor & Francis*, 57(5), 657–662. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1494919>
- Rodríguez-García, C., Evans, J. D., Li, W., Branchiccela, B., Li, J. H., Heerman, M. C., Banmeke, O., Zhao, Y., Hamilton, M., Higes, M., Martín-Hernández, R., & Chen, Y. P. (2018). Nosemosis control in European honey bees, *Apis mellifera*, by silencing the gene encoding *Nosema ceranae* polar tube protein 3. *Journal of Experimental Biology*, 221(19). <https://doi.org/10.1242/JEB.184606/259465/AM/NOSEMOSIS-CONTROL-IN-EUROPEAN-HONEY-BEES-APIS>
- Romero, S., Nastasa, A., Chapman, A., Kwong, W. K., & Foster, L. J. (2019). The honey bee gut microbiota: strategies for study and characterization. *Insect Molecular Biology*, 28(4), 455–472. <https://doi.org/10.1111/IMB.12567>
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S96-S119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>
- Rouzé, R., Moné, A., Delbac, F., Belzunces, L., & Blot, N. (2019). The Honeybee Gut

## Referencias

- Microbiota Is Altered after Chronic Exposure to Different Families of Insecticides and Infection by *Nosema ceranae*. *Microbes and Environments*, 34(3), 226. <https://doi.org/10.1264/JSME2.ME18169>
- RStudio Team, 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Rubio, F., Guo, E., & Kamp, L. (2014). Survey of Glyphosate Residues in Honey, Corn and Soy Products. *J Environ Anal Toxicol*, 5(1), 249. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.1000249>
- Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2014). Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. *PLOS ONE*, 9(4), e94482. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0094482>
- Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2016). Impacts of pesticides on honey bees. *Beekeeping and bee conservation-advances in research*, 4, 97.. <https://doi.org/10.5772/62487>
- Santos, E., Mendoza, Y., Díaz, R., Harriet, J., Campá, J. (2009). Valor económico de la polinización realizada por abejas *Apis mellifera* en Uruguay, una aproximación. *Serie de difusión INIA*, 568, 25–28.
- Schmaranzer, S. (2000). Thermoregulation of water collecting honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 46(8), 1187–1194. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00039-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00039-1)
- Schmid, M. R., Brockmann, A., Pirk, C. W. W., Stanley, D. W., & Tautz, J. (2008). Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology*, 54(2), 439–444. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2007.11.002>
- Schmitz, J., Hahn, M., & Brühl, C. A. (2014). Agrochemicals in field margins - An experimental field study to assess the impacts of pesticides and fertilizers on a natural plant community. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 193, 60–69. <https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2014.04.025>
- Schneider, P. M. (1985). Purification and properties of three lysozymes from hemolymph of the cricket, *Gryllus bimaculatus* (De Geer). *Insect Biochemistry*, 15(4), 463–470. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(85\)90058-7](https://doi.org/10.1016/0020-1790(85)90058-7)
- Serrão, J. E., Plata-Rueda, A., Martínez, L. C., & Zanuncio, J. C. (2022). Side-effects of pesticides on non-target insects in agriculture: a mini-review. *The Science of Nature* 2022 109:2, 109(2), 1–11. <https://doi.org/10.1007/S00114-022-01788-8>

## Referencias

- Shehata, A. A., Schrödl, W., Aldin, A. A., Hafez, H. M., & Krüger, M. (2012). The Effect of Glyphosate on Potential Pathogens and Beneficial Members of Poultry Microbiota In Vitro. *Current Microbiology* 66(4), 350–358. <https://doi.org/10.1007/S00284-012-0277-2>
- Shilo, T., Zygier, L., Rubin, B., Wolf, S., & Eizenberg, H. (2016). Mechanism of glyphosate control of *Phelipanche aegyptiaca*. *Planta* 244(5), 1095–1107. <https://doi.org/10.1007/S00425-016-2565-8>
- Shykoff, J. A., Schmid-Hempel, P., Shykoff, J. A., & Schmid-Hempel, P. (1991). Parasites and the Advantage of Genetic Variability within Social Insect Colonies. *RSPSB*, 243(1306), 55–58. <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/1991RSPSB.243...55S/abstract>
- Siebers, J., Binner, R., & Wittich, K. P. (2003). Investigation on downwind short-range transport of pesticides after application in agricultural crops. *Chemosphere*, 51(5), 397–407. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00820-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00820-2)
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D. W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C. H., Liess, M., Long, E., Mcfield, M., Mineau, P., Mitchell, E. A., Morrissey, C. A., et al. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(1), 5. <https://doi.org/10.1007/S11356-014-3470-Y>
- Simone-Finstrom, M., Foo, B., Tarpy, D. R., & Starks, P. T. (2014). Impact of Food Availability, Pathogen Exposure, and Genetic Diversity on Thermoregulation in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Behavior*, 27(4), 527–539. <https://doi.org/10.1007/S10905-014-9447-3>
- Siviter, H., Brown, M. J. F., & Leadbeater, E. (2018). Sulfoxaflor exposure reduces bumblebee reproductive success. *Nature*, 561(7721), 109–112. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0430-6>
- Smith, K. M., Loh, E. H., Rostal, M. K., Zambrana-Torrel, C. M., Mendiola, L., & Daszak, P. (2014). Pathogens, Pests, and Economics: Drivers of Honey Bee Colony Declines and Losses. *EcoHealth* 2014 10(4), 434–445. <https://doi.org/10.1007/S10393-013-0870-2>
- Smith, E. A., Newton, I. L.G. (2020). Genomic Signatures of Honey Bee Association in an Acetic Acid Symbiont. *Genome Biology and Evolution*. 12: 1882–1894, <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa183>
- Sparks, T. C., Watson, G. B., Loso, M. R., Geng, C., Babcock, J. M., & Thomas, J. D.

## Referencias

- (2013). Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: Chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.PESTBP.2013.05.014>
- Steele, M. I., Kwong, W. K., Whiteley, M., & Moranb, N. A. (2017). Diversification of Type VI Secretion System Toxins Reveals Ancient Antagonism among Bee Gut Microbes. *MBio*, 8(6). <https://doi.org/10.1128/MBIO.01630-17>
- Steinhauer, N., Kulhanek, K., Antúnez, K., Human, H., Chantawannakul, P., Chauzat, M. P., & vanEngelsdorp, D. (2018). Drivers of colony losses. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 142–148. <https://doi.org/10.1016/J.COIS.2018.02.004>
- Strand, M. R. (2008). The insect cellular immune response. *Insect science*, 15(1), 1-14.
- Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L. P. (2000). Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(7), 1901–1905. <https://doi.org/10.1002/ETC.5620190726>
- Takano, H. K., & Dayan, F. E. (2020). Glufosinate-ammonium: a review of the current state of knowledge. *Pest Management Science*, 76(12), 3911–3925. <https://doi.org/10.1002/PS.5965>
- Tapparo, A., Giorio, C., Marzaro, M., Marton, D., Soldà, L., & Girolami, V. (2011). Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated seeds. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(6), 1564–1568. <https://doi.org/10.1039/C1EM10085H>
- Tsvetkov, N., Samson-Robert, O., Sood, K., Patel, H. S., Malena, D. A., Gajiwala, P. H., Maciukiewicz, P., Fournier, V., & Zayed, A. (2017). Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. *Science*, 356(6345), 1395–1397. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAM7470/SUPPL\\_FILE/AAM7470\\_TABLES5.XLSX](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAM7470/SUPPL_FILE/AAM7470_TABLES5.XLSX)
- van Bruggen, A. H. C., Finckh, M. R., He, M., Ritsema, C. J., Harkes, P., Knuth, D., & Geissen, V. (2021). Indirect Effects of the Herbicide Glyphosate on Plant, Animal and Human Health Through its Effects on Microbial Communities. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 464. <https://doi.org/10.3389/FENVS.2021.763917/BIBTEX>
- van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of The Total Environment*, 616, 255–268. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.10.309>

- Van Der Sluijs, J. P., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bijleveld Van Lexmond, M. F., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C. A., Furlan, L., Gibbons, D. W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreuzweiser, D. P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Mcfield, M., Mineau, P., Mitchell, E. A. et al., (2014). Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. *Environmental Science and Pollution Research* 22(1), 148–154. <https://doi.org/10.1007/S11356-014-3229-5>
- Wardle, D. A., Nicholson, K. S., Bonner, K. I., & Yeates, G. W. (1999). Effects of agricultural intensification on soil-associated arthropod population dynamics, community structure, diversity and temporal variability over a seven-year period. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(12), 1691–1706. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00089-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00089-9)
- Watson, G. B., Loso, M. R., Babcock, J. M., Hasler, J. M., Letherer, T. J., Young, C. D., Zhu, Y., Casida, J. E., & Sparks, T. C. (2011). Novel nicotinic action of the sulfoximine insecticide sulfoxaflor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7), 432–439. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2011.01.009>
- Williamson, S. M., Baker, D. D., & Wright, G. A. (2013). Acute exposure to a sublethal dose of imidacloprid and coumaphos enhances olfactory learning and memory in the honeybee *Apis mellifera*. *Invertebrate Neuroscience*, 13(1), 63. <https://doi.org/10.1007/S10158-012-0144-7>
- 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(10–11), 1392–1399. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2008.07.016>
- Winter, G., Hart, R. A., Charlesworth, R. P. G., & Sharpley, C. F. (2018). Gut microbiome and depression: what we know and what we need to know. *Reviews in the Neurosciences*, 29(6), 629–643. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO-2017-0072>
- Winston, M. L. (1987). *The biology of the honey bee*. harvard university press.
- Woodcock, B. A., Isaac, N. J. B., Bullock, J. M., Roy, D. B., Garthwaite, D. G., Crowe, A., & Pywell, R. F. (2016). Impacts of neonicotinoid use on long-term population changes in wild bees in England. *Nature Communications* 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms12459>
- Woods, N., Craig, I. P., Dorr, G., & Young, B. (2001). Spray Drift of Pesticides Arising from Aerial Application in Cotton. *Journal of Environmental Quality*, 30(3), 697–701. <https://doi.org/10.2134/JEQ2001.303697X>

- Ximenez, C., & Torres, J. (2017). Development of Microbiota in Infants and its Role in Maturation of Gut Mucosa and Immune System. *Archives of Medical Research*, 48(8), 666–680. <https://doi.org/10.1016/J.ARCMED.2017.11.007>
- Yang, X., & Cox-Foster, D. L. (2005). Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(21), 7470–7475.
- Yoshiyama, M., & Kimura, K. (2009). Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, and their antagonistic effect against *Paenibacillus* larvae, the causal agent of American foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*, 102(2), 91–96. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2009.07.005>
- Young, I. M., Crawford, J. W., Nunan, N., Otten, W., & Spiers, A. (2008). Chapter 4 Microbial Distribution in Soils: Physics and Scaling. *Advances in Agronomy*, 100(C), 81–121. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)00604-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)00604-4)
- Yun, J. H., Lee, J. Y., Hyun, D. W., Jung, M. J., & Bae, J. W. (2017). *Bombella apis* sp. nov., an acetic acid bacterium isolated from the midgut of a honey bee. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(7), 2184–2188. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.001921>
- Zhang, W., Jiang, F., & Ou, J. (2011). Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 1(2), 125–144. [www.iaees.org/Article](http://www.iaees.org/Article)
- Zeitouni, N. E., Chotikatum, S., Köckritz-Blickwede, M. von, & Naim, H. Y. (2016). The impact of hypoxia on intestinal epithelial cell functions: consequences for invasion by bacterial pathogens. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/S40348-016-0041-Y>
- Zhao, H., Li, G., Guo, D., Wang, Y., Liu, Q., Gao, Z., Wang, H., Liu, Z., Guo, X., & Xu, B. (2020). Transcriptomic and metabolomic landscape of the molecular effects of glyphosate commercial formulation on *Apis mellifera ligustica* and *Apis cerana cerana*. *Science of The Total Environment*, 744, 140819. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.140819>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., O’Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782–2858.



## Referencias

- Zheng, H., Steele, M. I., Leonard, S. P., Motta, E. V. S., & Moran, N. A. (2018). Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Animal*, 47(11), 317–325. <https://doi.org/10.1038/S41684-018-0173-X>
- Zheng, H., Nishida, A., Kwong, W. K., Koch, H., Engel, P., Steele, M. I., & Moran, N. A. (2016). Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola*. *MBio*, 7(6). <https://doi.org/10.1128/MBIO.01326-16>
- Zhou, J., Bruns, M. A., & Tiedje, J. M. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 316. <https://doi.org/10.1128/AEM.62.2.316-322.1996>
- Zhu, C. Z., Chin, C. L., Rustay, N. R., Zhong, C., Mikusa, J., Chandran, P., Salyers, A., Gomez, E., Simler, G., Lewis, L. G., Gauvin, D., Baker, S., Pai, M., Tovcimak, A., Brown, J., Komater, V., Fox, G. B., Decker, M. W., Jacobson, P. B., et al., (2011). Potentiation of analgesic efficacy but not side effects: Co-administration of an  $\alpha 4\beta 2$  neuronal nicotinic acetylcholine receptor agonist and its positive allosteric modulator in experimental models of pain in rats. *Biochemical Pharmacology*, 82(8), 967–976. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2011.05.007>
- Zhu, L., Qi, S., Xue, X., Niu, X., & Wu, L. (2020). Nitenpyram disturbs gut microbiota and influences metabolic homeostasis and immunity in honey bee (*Apis mellifera* L.). *Environmental Pollution*, 258, 113671. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113671>.

## 10. ANEXO I

---