



INSTITUTO
NACIONAL DE
INVESTIGACIÓN
AGROPECUARIA

URUGUAY



**DESARROLLO DE UNA
ESTRATEGIA NATURAL
PARA EL CONTROL DE
VARROA DESTRUCTOR,
INTEGRANDO EL USO DE
PROBIÓTICOS Y PRODUCTOS
ORGÁNICOS**

MARZO 2019

SERIE
FPTA-INIA

75

DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA NATURAL PARA EL CONTROL DE *VARROA DESTRUCTOR*, INTEGRANDO EL USO DE PROBIÓTICOS Y PRODUCTOS ORGÁNICOS

FPTA - 329

Responsable del proyecto:

Dra. Karina Antúnez

Equipo de trabajo:

Daniela Arredondo¹, Loreley Castelli¹, Florencia Silva¹, Guillermo Añon¹, Jorge Harriet², Juan Campá², Ciro Invernizzi³, Pablo Zunino¹, Karina Antúnez¹

¹ Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. kantunez03@gmail.com.

² Apicultura, DILAVE, MGAP.

³ Sección Etología, Facultad de Ciencias.

Título: Desarrollo de una estrategia natural para el control de *Varroa destructor*, integrando el uso de probióticos y productos orgánicos

Responsable técnico del proyecto: Dra. Karina Antúnez

Equipo técnico de trabajo:

Daniela Arredondo,
Loreley Castelli,
Florencia Silva,
Guillermo Añon,
Jorge Harriet,
Juan Campá,
Ciro Invernizzi,
Pablo Zunino,
Karina Antúnez

Serie: FPTA N° 75

ISBN: 978-9974-38-415-6

© 2019, INIA

Editado por la Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología de INIA
Andes 1365, Piso 12. Montevideo, Uruguay
<http://www.inia.uy>

Quedan reservados todos los derechos de la presente edición. Este libro no se podrá reproducir total o parcialmente sin expreso consentimiento del INIA.

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

D.M.T.V., Ph.D. José Luis Repetto - Presidente

Ing. Agr., Mag. Mariana Hill - Vicepresidenta



Ing. Agr. Jaime Gomes de Freitas

Ing. Agr. Jorge Peñagaricano



Ing. Agr. Alberto Bozzo

Ing. Agr. Alejandro Henry



FONDO DE PROMOCIÓN DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA) fue instituido por el artículo 18° de la ley 16.065 (ley de creación del INIA), con el destino de financiar proyectos especiales de investigación tecnológica relativos al sector agropecuario del Uruguay, no previstos en los planes del Instituto.

El FPTA se integra con la afectación preceptiva del 10% de los recursos del INIA provenientes del financiamiento básico (adicional del 4o/oo del Impuesto a la Enajenación de Bienes Agropecuarios y contrapartida del Estado), con aportes voluntarios que efectúen los productores u otras instituciones, y con los fondos provenientes de financiamiento externo con tal fin.

EL FPTA es un instrumento para financiar la ejecución de proyectos de investigación en forma conjunta entre INIA y otras organizaciones nacionales o internacionales, y una herramienta para coordinar las políticas tecnológicas nacionales para el agro.

Los proyectos a ser financiados por el FPTA pueden surgir de propuestas presentadas por:

- a) los productores agropecuarios, beneficiarios finales de la investigación, o por sus instituciones.
- b) por instituciones nacionales o internacionales ejecutoras de la investigación, de acuerdo a temas definidos por sí o en acuerdo con INIA.
- c) por consultoras privadas, organizaciones no gubernamentales o cualquier otro organismo con capacidad para ejecutar la investigación propuesta.

En todos los casos, la Junta Directiva del INIA decide la aplicación de recursos del FPTA para financiar proyectos, de acuerdo a su potencial contribución al desarrollo del sector agropecuario nacional y del acervo científico y tecnológico relativo a la investigación agropecuaria.

El INIA a través de su Junta Directiva y de sus técnicos especializados en las diferentes áreas de investigación, asesora y facilita la presentación de proyectos a los potenciales interesados. Las políticas y procedimientos para la presentación de proyectos son fijados periódicamente y hechos públicos a través de una amplia gama de medios de comunicación.

El FPTA es un instrumento para profundizar las vinculaciones tecnológicas con instituciones públicas y privadas, a los efectos de llevar a cabo proyectos conjuntos.

De esta manera, se busca potenciar el uso de capacidades técnicas y de infraestructura instalada, lo que resulta en un mejor aprovechamiento de los recursos nacionales para resolver problemas tecnológicos del sector agropecuario.

El Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria contribuye de esta manera a la consolidación de un sistema integrado de investigación agropecuaria para el Uruguay.

A través del Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA), INIA ha financiado numerosos proyectos de investigación agropecuaria a distintas instituciones nacionales e internacionales. Muchos de estos proyectos han producido resultados que se integran a las recomendaciones tecnológicas que realiza la institución por sus medios habituales.

En esta serie de publicaciones, se han seleccionado los proyectos cuyos resultados se considera contribuyen al desarrollo del sector agropecuario nacional. Su relevancia, el potencial impacto de sus conclusiones y recomendaciones, y su aporte al conocimiento científico y tecnológico nacional e internacional, hacen necesaria la amplia difusión de estos resultados, objetivo al cual se pretende contribuir con esta publicación.

Índice general

INTRODUCCIÓN	9
Pérdidas de colmenas.....	9
Apicultura en Uruguay	9
<i>Varroa destructor</i>	10
Virus ARN	10
<i>Nosema ceranae</i>	10
Probióticos y su uso en abejas melíferas	11
Hipótesis.....	11
Objetivo	11
COMPONENTES	11
ESTRATEGIA Y METODOLOGÍA.....	12
1. Generación de una colección de aislamientos potencialmente probióticos a partir de abejas de colmenas sanas.....	12
2. Evaluación del potencial probiótico de los aislamientos obtenidos mediante ensayos <i>in vitro</i>	12
3. Identificación de los aislamientos obtenidos.....	14
4. Preparación de una mezcla de probióticos.....	14
5. Caracterización del potencial probiótico de la mezcla de microorganismos.....	14
6. Evaluación del efecto de la mezcla de microorganismos probióticos sobre el desarrollo de patógenos (<i>V. destructor</i> , <i>N. ceranae</i> , virus ARN) así como sobre la fortaleza de la colmena, en condiciones de campo.....	15
RESULTADOS.....	18
1. Generación de una colección de aislamientos potencialmente probióticos.....	18
2. Evaluación del potencial probiótico de los aislamientos obtenidos, mediante ensayos <i>in vitro</i>	18
3. Identificación de los aislamientos obtenidos.	22
4. Preparación de una mezcla de probióticos.....	22
5. Caracterización del potencial probiótico de la mezcla de microorganismos.....	22
6. Evaluación del efecto de la mezcla de microorganismos probióticos sobre el desarrollo de patógenos (<i>V. destructor</i> , <i>N. ceranae</i> , virus ARN) así como sobre la fortaleza de la colmena, en condiciones de campo.....	25
CONCLUSIONES	27
REFERENCIAS	28

Responsable técnico del proyecto:

Dra. Karina Antúnez

Equipo técnico de trabajo:

Daniela Arredondo,

Loreley Castelli,

Florencia Silva,

Guillermo Añon,

Jorge Harriet,

Juan Campá,

Ciro Invernizzi,

Pablo Zunino,

Karina Antúnez

DESARROLLO DE UNA ESTRATEGIA NATURAL PARA EL CONTROL DE *VARROA DESTRUCTOR*, INTEGRANDO EL USO DE PROBIÓTICOS Y PRODUCTOS ORGÁNICOS

FPTA 329

Período de ejecución:

Febrero 2014 – Junio 2017

INTRODUCCIÓN

Pérdidas de colmenas

Durante los últimos años se han observado pérdidas de colmenas de abejas melíferas alrededor del mundo, lo que ha ocasionado importantes consecuencias no sólo en la producción apícola sino en todas las actividades agrícolas dependientes de la polinización (Stokstad, 2007; Ellis *et al.*, 2010; Neumann y Carreck, 2010; Potts *et al.*, 2010). La polinización favorece la fecundación y fructificación de diferentes especies vegetales, por lo que contribuye en gran medida a la producción agrícola (Morse y Calderone, 2000). La mayoría de los cultivos necesarios para la alimentación mundial son estrictamente dependientes de la polinización, o favorecidos por la misma en términos de tamaño del fruto, cantidad y calidad (Klein *et al.*, 2007). El valor de la polinización por insectos ha sido estimado en 153 billones de Euros por año alrededor del mundo (casi el 10 % del valor total de la producción agrícola) (Gallai *et al.*, 2009) y aunque la abeja melífera no es el único insecto polinizador, es el más importante (vanEngelsdorp y Meixner, 2010). Además del inmenso valor económico, la contribución de la polinización en cuanto al mantenimiento de la biodiversidad es inestimable.

Una de las principales causas de pérdidas de colmenas alrededor del mundo es la presencia

de diferentes parásitos y patógenos, como el ácaro *Varroa destructor*, el microsporidio *Nosema ceranae* y diferentes virus ARN (Neumann y Carreck, 2010; Evans y Schwarz, 2011).

Apicultura en Uruguay

La actividad apícola adquirió relevancia dentro del sector agro-exportador de Uruguay en las últimas décadas, con un crecimiento que se refleja tanto en el volumen de producción así como en el ingreso de divisas fundamentalmente relacionadas con la exportación de miel (MGAP/DIGEGRA, 2011).

Actualmente contamos con alrededor de 3.200 apicultores registrados que poseen 580.000 colmenas (MGAP/DIGEGRA, 2016). La mayor parte de la producción de miel se exporta, especialmente a Estados Unidos y Europa. Sin embargo, el volumen de miel producida en el país ha mermado progresivamente durante los últimos años. Esta merma, está asociada a una disminución en la productividad por colmena. Entre las posibles causas se encuentra la presencia de diferentes parásitos y patógenos. Los principales patógenos que afectan a las abejas alrededor del mundo se encuentran presentes y ampliamente distribuidos en nuestro país, entre ellos *Varroa destructor*, *Nosema ceranae* y diferentes virus ARN (Antunez *et al.*, 2005; Antúnez *et al.*, 2006; Invernizzi *et al.*, 2011; Antúnez *et al.*, 2012; Anido *et al.*, 2016).

Varroa destructor

V. destructor es un ácaro parásito que causa daños en la abeja, debilitándola, deprimiendo su sistema inmune y favoreciendo la infección por otros patógenos. Es letal si no es tratado adecuadamente (OIE, 2008). Este ácaro es el causante de la mayor cantidad de pérdidas de colmenas alrededor del mundo, siendo responsable de la pérdida de entre el 20 al 60% de las colmenas en diferentes países de Europa (Neumann y Carreck, 2010). En Uruguay, este ácaro también es responsable de gran parte de las pérdidas (Mendoza *et al.*, 2008; Invernizzi *et al.*, 2011).

De acuerdo a un estudio epidemiológico realizado durante el año 2011 en nuestro instituto, *V. destructor* está presente en la mayor parte de las colmenas de Uruguay (Anido *et al.*, 2016), lo que lleva a la necesidad de la aplicación sistemática de productos acaricidas para evitar la pérdida de colmenas.

Los tratamientos disponibles para el control del ácaro se basan principalmente en el uso de acaricidas sintéticos (Campá *et al.*, 2007 a y b; Mendoza *et al.*, 2008; Rosenkranz *et al.*, 2010). Los principios activos registrados en el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca y habilitados para su uso en Uruguay, son el organofosforado cumafós, los piretroides fluvalinato y flumetrina, y la formamida amitraz. De acuerdo a un relevamiento realizado en el año 2010, la mayor parte de las colmenas de nuestro país recibieron algún tipo de tratamiento con acaricidas (82,5%), siendo la mayor parte acaricidas sintéticos (72,5% del total de colmenas). Estos tratamientos presentan muchos inconvenientes, como su permanencia en la cera luego de repetidos reciclajes de la misma, generando la exposición de la abeja de forma simultánea a múltiples compuestos dañinos. Además, los residuos pueden permanecer en la miel y en otros productos apícolas, pudiendo resultar tóxico para el consumo humano. Por último, pueden estimular la generación de ácaros resistentes, y afectar la fisiología y la inmunidad de las abejas (Rosenkranz *et al.*, 2010; Boncristiani *et al.*, 2012; Garrido *et al.*, 2013). Ya se ha evidenciado en el país la aparición de resistencia a flumetrina y cumafós (Maggi *et al.*, 2011; Mitton *et al.*, 2016) y en Argentina, a cumafós y amitraz (Maggi *et al.*, 2008; Maggi *et al.*, 2010).

Una alternativa de tratamiento que está siendo cada vez más utilizada son los acaricidas orgánicos

y los aceites esenciales (Ruffinengo y Maggi 2007; Rosenkranz *et al.*, 2009). Los más utilizados son el ácido fórmico, ácido oxálico, ácido láctico y timol (Rosenkranz *et al.*, 2009). Las principales ventajas de estos productos son la baja acumulación de estas sustancias en los productos de la colmena, por lo que no se pone en riesgo la calidad de la miel, así como la baja probabilidad de la generación de resistencia (Ronsekranz *et al.*, 2010). Sin embargo también poseen inconvenientes, generalmente es necesario aplicarlos en ausencia de cría para aumentar su efectividad y las condiciones de aplicación deben ser analizadas en profundidad para obtener un efecto óptimo. Por último, pueden tener efectos patológicos en las abejas, así como afectar su metabolismo y el sistema inmune (Martin-Hernández *et al.*, 2006; Boncristiani *et al.*, 2012).

El ácido oxálico es la primera opción de los apicultores uruguayos por su fácil de aplicación y por su alta eficacia cuando se lo aplica sin cría (Rosenkranz *et al.*, 2010). Sin embargo, puede tener efectos patológicos y generar reducción de la fortaleza de la colmena (Martin-Hernández *et al.*, 2006; Rademacher y Harz, 2006).

Virus ARN

La presencia de *V. destructor* en las colmenas no sólo es un problema en sí mismo, sino que su virulencia aumenta por la asociación con diferentes virus ARN. Se han detectado más de 18 virus en abejas melíferas, 7 de ellos revisten mayor importancia por su patogenicidad (Chen y Siede, 2007; Genersch y Aubert, 2010). De estos virus, 5 están presentes y ampliamente distribuidos en nuestro país: el Virus de la parálisis aguda, Virus de la parálisis crónica, Virus de la celda real negra, Virus de la cría ensacada y Virus de las alas deformadas (Antúnez *et al.*, 2005; 2006; Anido *et al.*, 2016). Hasta el momento no existen opciones que permitan su control.

Nosema ceranae

N. ceranae es un microsporidio parásito que ha sido vinculado a la despoblación masiva de colmenas en España (Higes *et al.*, 2008). Este microsporidio es un problema en Uruguay, especialmente en las plantaciones de *Eucaliptus grandis*. Los apicultores trasladan sus colmenas a estas plantaciones con el fin de aprovechar las floraciones otoñales y extender así la temporada productiva (Invernizzi

et al., 2012). Sin embargo, todas las colmenas trasladadas se infectan con esporas y se debilitan. El único tratamiento disponible para su control es la fumagilina, pero su uso se encuentra restringido a los criaderos de reinas (MGAP, 2010).

Dada la relevancia de las Varroosis, Virosis y Nosemosis, y los inconvenientes de los tratamientos disponibles en el país, el desarrollo de una estrategia integrada de control de patógenos, saludable y natural, es un punto clave para el desarrollo de la apicultura.

Probióticos y su uso en abejas melíferas

Se denomina probiótico a un cultivo de microorganismos cuya administración ejerce algún efecto beneficioso sobre animales o humanos al ser consumido (Klaenhammer y Kullen, 1999). El uso de probióticos es una práctica ampliamente utilizada y en los últimos años se han realizado un gran número de estudios sobre los efectos de la administración de cepas seleccionadas en humanos y animales (Reid, 1999; Cross, 2002). Miembros de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* entre otros, han sido utilizados como probióticos en diferentes especies.

Para que una cepa bacteriana se considere con el potencial de ser utilizada como probiótico se busca que cumpla con determinadas características (por ejemplo que inhiba el crecimiento de bacterias patógenas). En el caso de las abejas melíferas, se ha visto que microorganismos obtenidos de la colmena son capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de patógenos como *Paenibacillus larvae*, agente causal de la Loque Americana.

Las bacterias probióticas podrían modular la homeostasis del intestino de las larvas, para protegerlas frente a patógenos. El mecanismo de acción podría ser por una actividad antagonista directa mediante la producción de compuestos antimicrobianos, bacteriocinas, surfactinas o ác. láctico (Audisio *et al.*, 2010; Sabate *et al.*, 2009). Este último podría ser interesante para combatir a *V. destructor*, ya que el ácido láctico es uno de los tratamientos recomendados (OIE, 2004).

Por otro lado, las bacterias probióticas podrían actuar de forma indirecta mediante la estimulación

de la respuesta inmune innata (Evans y Lopez, 2004). Esto también es importante para el control de *V. destructor*, ya que este patógeno, junto con *N. ceranae*, son capaces de deprimir la respuesta inmune de la abeja, y causar un mayor daño (Yang y Cox-Foster, 2005; Antunez *et al.*, 2009).

Por lo expuesto anteriormente, creemos que el desarrollo de estrategias de prevención y tratamiento de enfermedades de las abejas basadas en el uso de microorganismos probióticos es una alternativa prometedor.

Hipótesis

La hipótesis de este trabajo plantea que el uso de probióticos como estrategia natural de control, suplementando el uso de ácido oxálico (acaricida orgánico), contribuirá a disminuir los niveles de infestación de *V. destructor* y proporcionará mejores condiciones de desarrollo y de inmunidad para la abeja. Planteamos además, que esta mejora en la fortaleza de la colmena la ayudará a controlar otros patógenos, como *N. ceranae* y virus ARN.

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue desarrollar una mezcla de microorganismos probióticos nativos capaces de mejorar la salud de las abejas melíferas.

COMPONENTES:

1. Generación de una colección de aislamientos potencialmente probióticos a partir de abejas de colmenas sanas
2. Evaluación del potencial probiótico de los aislamientos obtenidos mediante ensayos *in vitro*.
3. Identificación de los aislamientos obtenidos.
4. Preparación de una mezcla de probióticos.
5. Caracterización del potencial probiótico de la mezcla de microorganismos
6. Evaluación del efecto de la mezcla de microorganismos probióticos sobre el desarrollo de patógenos (*V. destructor*, *N. ceranae*, virus ARN) así como sobre la fortaleza de la colmena, en condiciones de campo.

ESTRATEGIA Y METODOLOGÍA

1. Generación de una colección de aislamientos potencialmente probióticos a partir de abejas de colmenas sanas

Un requisito importante para que los microorganismos puedan ser considerados probióticos es que su administración sea segura, es decir que el o los microorganismos no deben ser potencialmente patógenos. Por este motivo lo ideal es que sean nativos y que formen parte del nicho ecológico en el cuál serán probados y utilizados (Reid, 1999; Salminen *et al.*, 1998). Por estas razones, se colectaron abejas nodrizas vivas de colmenas históricamente sanas pertenecientes a dos apiarios experimentales de INIA (La Estanzuela; Colonia y Treinta y Tres) y de la sección de Apicultura de la Facultad de Veterinaria (Montevideo, Uruguay). Las abejas se procesaron, se extrajo el intestino de forma aséptica, se homogeneizaron en 1 ml de PBS y se cultivaron en MRS y Rogosa agar (Merck, Alemania) a 37°C durante 48 h en condiciones de microaerofilia. Dado que uno de los grupos de mayor importancia de la comunidad microbiana de las abejas adultas es el de las bacterias del ácido láctico, se emplearon medios de cultivo que permitan su crecimiento (Gilliam, 1997; Mohr y Tebbe, 2006; Mrazek *et al.*, 2008; Olofsson y Vasquez, 2008). Se seleccionaron aleatoriamente de tres a cinco colonias bacterianas por placa y se obtuvieron cultivos puros. Los aislamientos se mantuvieron en caldo MRS suplementado con 15% de glicerol como cultivos madre a -80°C o como cultivos de trabajo a -20°C. La identificación se realizó inicialmente en base a la morfología de la colonia, examen microscópico, tinción de Gram, reacciones de catalasa y oxidasa (Gerhardt *et al.*, 1994).

2. Evaluación del potencial probiótico de los aislamientos obtenidos mediante ensayos *in vitro*.

Para la selección de los microorganismos a emplear se evaluó una serie de características vinculadas a su potencial como probióticos, así como características que los hagan adecuados desde un punto de vista tecnológico:

- **Inhibición de crecimiento de *Paenibacillus larvae in vitro*:** Se analizó la capacidad de los aislamientos de inhibir el desarrollo de la bacteria patógena *P. larvae*, agente causal de la Loque

Americana, en base a la técnica de inhibición de crecimiento en placa (Pascual Anderson y Calderón y Pascual, 2000). A partir de un cultivo fresco de *P. larvae* (44) en agar J (Hornitzky y Nicholls, 1993) se preparó una suspensión celular en PBS equivalente a 0,5 McFarland y se sembró en una placa de agar J. Luego, los aislamientos se inocularon mediante punción en la misma placa. Después de la incubación a 37°C durante 48 h en condiciones microaerofílicas, las placas se examinaron para detectar zonas de inhibición y se midieron los diámetros. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

- **Tasa de crecimiento:** Para que un microorganismo pueda ser producido rápidamente a gran escala debe tener una alta tasa de crecimiento. Por este motivo se realizaron curvas de crecimiento de los diferentes aislamientos mediante el método de turbidimetría (Gerhardt *et al.*, 1994). Se inocularon 180 μ l de caldo MRS con 20 μ l de una suspensión bacteriana equivalente a la escala de 0,5 McFarland. Se incubó a 37°C y se midió la absorbancia (DO600) cada dos horas. Posteriormente se calculó el tiempo de duplicación y la tasa de crecimiento (Gerhardt *et al.*, 1994). El ensayo se realizó por triplicado.

- **Tolerancia osmótica al jarabe de azúcar:** El néctar y el polen que consumen las abejas contienen altas concentraciones de azúcares. Por otro lado, la forma de administración más práctica de los productos sanitarios apícolas es por medio del jarabe. Por estos motivos se evaluó la capacidad de los aislamientos de sobrevivir en estas condiciones durante 72 hs, a 4°C (heladera) y 28°C (temperatura ambiente). Se preparó una suspensión bacteriana en PBS equivalente a la escala 4 McFarland, se diluyó en jarabe (1:1 o 2:1) a una concentración final de 1×10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) / ml y se incubó a 4 o 28°C durante 72 hs. El número de células bacterianas viables por tratamiento se determinó mediante recuento en placa en agar MRS a 0 y 72 hs. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 hs bajo condiciones de microaerofilia.

- **Tolerancia a diferentes condiciones de acidez:** Dado que la vía de administración a las abejas es oral, es necesario que los microorganismos logren sobrevivir durante su paso por el tracto gastrointestinal, soportando condiciones de acidez (Reid, 1999). Por esto se evaluó la

tolerancia de cada aislamiento a distintas condiciones de acidez (pH 3 a 7) mediante el método descrito por Jacobsen *et al.*, (1999). Se inocularon 180 µl de caldo MRS a pH 3, 5 o 7, con 20 µl de una suspensión bacteriana equivalente a 0,5 McFarland. Se midió la densidad óptica a 600 nm (DO600) a tiempo cero, y 1, 2, 3, 4 y 24 hs de incubación a 37°C. El número de células bacterianas viables por tratamiento se determinó mediante el conteo de placas en agar MRS a las 0 y 4 h. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h bajo condiciones microaerófilas. El ensayo se realizó por triplicado.

- **Preselección de aislamientos:** Los diez aislamientos bacterianos que mostraron las mejores características biológicas y biotecnológicas (inhibición de *P. larvae*, tolerancia osmótica al jarabe de azúcar y tolerancia a condiciones ácidas) se seleccionaron y se profundizó en su caracterización.

- **Evaluación de la producción de ácidos:** Se evaluó la producción de ácido cítrico, Pirúvico, Succínico, Láctico, Acético, Propiónico, isobutírico, Butírico y Valérico mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) en la plataforma de Servicios Analíticos del IIBCE.

- **Evaluación de la patogenicidad en larvas, y efecto antibacteriano frente a *P. larvae*:** Se evaluó la patogenicidad de los 10 aislamientos preseleccionados así como su capacidad de disminuir la mortalidad por *P. larvae* en larvas, empleando un modelo de cría en laboratorio.

Se utilizaron larvas de abejas obreras de la progenie de una sola reina (híbrido entre *Apis mellifera mellifera* y *Apis mellifera scutellata*). Se colectaron larvas menores a 24 hs, se colocaron en pocillos de placas de microtitulación rellenas con dieta artificial y se mantuvieron de acuerdo a lo descrito por Evans (2004).

Diez grupos de 12 larvas se alimentaron *ad libitum* con dieta artificial suplementada con un aislamiento (concentración final de 1x10⁷ bacterias/ml, aislamientos 1, 22, 35, 37, 51, 67, 78, 110, 117, 122); otros diez grupos se alimentaron con dieta artificial suplementada con uno de los aislamientos y contaminada simultáneamente con *P. larvae* (1000 esporas / µl, grupos 1P, 22P, 35P, 37P, 51P, 67P, 78P, 110P, 117P, 122P); un grupo de control de larvas

se alimentó solo con la dieta artificial (L) y otro grupo control se alimentó con la dieta artificial contaminada con *P. larvae* (1000 esporas / µl) (LP).

Las larvas recibieron este tratamiento durante las primeras 48 hs, luego se empleó dieta larval normal en todos los casos. Las placas se incubaron a 34,5°C con alta humedad durante 6 días. Las larvas se examinaron todos los días, y se clasificaron como muertas cuando perdieron su elasticidad corporal o mostraron un cambio de color a marrón. Se registró el número de larvas muertas y las larvas supervivientes se transfirieron a nuevos pocillos con alimento fresco.

- **Evaluación de la patogenicidad en abejas adultas:** Se evaluó la patogenicidad de los 10 aislamientos así como su capacidad de disminuir la infección por *N. ceranae* en abejas, empleando un modelo de cría en laboratorio.

Se obtuvieron cuadros con abejas a punto de nacer de una colonia sana de *A. mellifera* del colmenar experimental J. J. Nagera (Centro de Investigación de Abejas Sociales, Mar del Plata, Argentina). Al nacer, las abejas se confinaron en jaulas especiales y se mantuvieron en incubadora a 35°C, con alimentación *ad libitum* de jarabe (sacarosa al 50%). A los dos días, las abejas se dividieron en once grupos de 15 abejas cada una, y se alimentaron de forma individual con 20 µl de jarabe suplementado con uno de los aislamientos (grupos 1, 22, 35, 37, 51, 67, 78, 110, 117, 122) o jarabe (control grupo, C). Después de ingerir todo el inóculo, las abejas fueron devueltas a sus jaulas y alimentadas con jarabe *ad libitum*. El ensayo se realizó por triplicado. Las jaulas se examinaron diariamente durante 7 días para registrar la mortalidad.

- **Ensayos de inhibición entre aislamientos:** Se evaluó la capacidad de los aislamientos de inhibir el desarrollo de los otros aislamientos, con el fin de evaluar la posible coexistencia.

Se preparó una suspensión bacteriana en PBS equivalente a 0,5 McFarland de cada aislamiento, y se inoculó mediante hisopado en agar MRS. Los restantes 9 aislamientos bacterianos se inocularon en la misma placa por punción. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 hs bajo condiciones microaerófilas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

3. Identificación de los aislamientos obtenidos.

Se realizó la extracción de ADN genómico de cada aislamiento empleando el kit comercial (Gen Elute Bacterial Genomic, Sigma, St. Louis, MO). El ADN se empleó como molde para amplificar el gen que codifica para el ARNr16S, empleando cebadores bacterianos universales 27F y 1492R (Lane, 1991). Los productos obtenidos se secuenciaron en Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se analizaron mediante comparación con bases de datos (RDP, Wang *et al.*, 2007; NCBI, Altschul *et al.*, 1997).

4. Preparación de una mezcla de probióticos.

Dado que los diferentes aislamientos pueden mostrar diferentes características o efectos complementarios en el hospedero (Forsgren *et al.*, 2010), se decidió generar una mezcla de microorganismos probióticos. Los aislamientos que no mostraron inhibición de crecimiento entre ellos, no resultaron tóxicos para las larvas y las abejas adultas y disminuyeron la mortalidad de larvas ocasionada por *P. larvae*, fueron seleccionados, y se generó una mezcla con cantidades iguales de cada microorganismo.

5. Caracterización del potencial probiótico de la mezcla de microorganismos

- **Evaluación de la patogenicidad de la mezcla bacteriana en larvas, y efecto antibacteriano frente a *P. larvae*:** Una vez obtenida la mezcla, se evaluó su patogenicidad y el efecto antibacteriano frente a *P. larvae* empleando el modelo larval descrito anteriormente. En este caso, un grupo larval se alimentó *ad libitum* con dieta artificial suplementada con la mezcla bacteriana (1×10^4 células / μl , LBM); otro grupo fue alimentado con la dieta mencionada anteriormente suplementada con la mezcla bacteriana y contaminada con *P. larvae* (1000 esporas / μl , LBMP); un grupo control de larvas se alimentó solo con la dieta artificial (L) y otro grupo control se alimentó con la dieta artificial contaminada con *P. larvae* (1000 esporas / μl , LP). Se emplearon grupos de 12 larvas en cada caso y el ensayo se realizó por triplicado.

- **Evaluación de la patogenicidad de la mezcla bacteriana en abejas adultas:** Se evaluó el efecto de la mezcla bacteriana en la supervivencia de la abeja empleando el modelo de cría de abejas descrito anteriormente. Se prepararon dos grupos de 25 abejas, un grupo se alimentó individualmente con 20 μl de jarabe suplementado con la mezcla bacteriana (2×10^4 CFU / μl , BM) y el otro sólo recibió jarabe (C). El ensayo se llevó a cabo por triplicado. Las jaulas se examinaron diariamente durante 10 días para registrar la mortalidad.

- **Efecto de la mezcla bacteriana frente a *N. ceranae*:** Se evaluó la actividad antiparasitaria de la mezcla bacteriana frente a *N. ceranae* empleando el modelo de cría de abejas descrito anteriormente. En este caso, se prepararon tres grupos de 50 abejas. Las abejas de un grupo se alimentaron individualmente con 20 μl de jarabe suplementado con la mezcla bacteriana (2×10^4 CFU / μl , NBM) y las abejas de los otros dos grupos se alimentaron individualmente con 20 μl de jarabe (N y C). Luego las abejas retornaron a sus jaulas y se alimentaron con jarabe *ad libitum*. Un día después las abejas de los grupos NBM y N se alimentaron *ad libitum* con 4 ml de jarabe inoculado con 5×10^5 esporas de *N. ceranae* (extraídas de abejas naturalmente infectadas; Fries *et al.*, 2013). El alimento inoculado se colocó durante 24 hs, y después de ese período se colocó alimento fresco. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

Las abejas se examinaron diariamente, registrando la mortalidad. Para evaluar la multiplicación de *N. ceranae*, las abejas se sacrificaron 7 días después de la infección (10 días post-emergencia), se extrajo el intestino de 30 abejas por grupo y se homogeneizaron individualmente en 1 ml de agua destilada estéril. Luego se realizó la cuantificación de las esporas en la cámara de Neubauer empleando un microscopio óptico a 400X (Cantwell, 1970).

- **Efecto de la mezcla bacteriana en genes relacionados con el sistema inmune:** Se evaluó la capacidad de los microorganismos de activar la expresión de diferentes genes vinculados a la inmunidad empleando el modelo de cría de abejas descrito previamente.

Se colectaron cuadros con abejas a punto de nacer de una colonia sana localizada en INIA La Estanzuela (Colonia, Uruguay). Se prepararon dos

grupos de 15 abejas, un grupo (BM) se alimentó con 20 µl de jarabe suplementado con la mezcla bacteriana (2×10^4 CFU / µl) y el otro grupo, control (C), se alimentó solo con jarabe. El ensayo se realizó por triplicado. Las jaulas se examinaron diariamente para registrar la mortalidad. Dos días después de la aplicación de los tratamientos, se tomaron diez abejas de cada tratamiento, se procesaron y se realizó la extracción de ARN utilizando el Mini Kit RNeasyPlus (Qiagen). El ARN se usó inmediatamente para generar ADNc empleando el kit de transcripción inversa Quantitect (Qiagen). Para comparar la respuesta inmune de las abejas sometidas a diferentes tratamientos, se evaluó el nivel de expresión de genes vinculados a la inmunidad: abaecina, himenoptecina, defensina, glucosa deshidrogenasa, lisozima y vitelogenina, empleando cebadores previamente descritos (Corona *et al.*, 2007; Evans, 2006; Johnson *et al.*, 2009; Yang y Cox-Foster, 2005). Los niveles de transcripción de la proteína ribosómica RPS5 y β -actina se utilizaron como genes de referencia para normalizar las variaciones en los niveles de ADNc (Evans, 2006; Yang y Cox-Foster, 2005). Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos utilizando el Kit QuantiTect SYBR PCR (Qiagen) y el termociclador BIO-Rad CFX96 (Bio-Rad Laboratories, EE. UU.).

Se realizó una curva de melting para confirmar la amplificación específica de estos genes. Los resultados de amplificación se expresaron como el número de ciclo umbral (Ct), que representa el número de ciclos necesarios para generar una señal fluorescente mayor que un umbral predefinido. El nivel de expresión de RPS5 y β -actina se empleó como referencia, calculando la media geométrica Ct entre ambos. Se calculó

el radio de expresión de acuerdo a lo descrito por Pfaffl (2001).

6. Evaluación del efecto de la mezcla de microorganismos probióticos sobre el desarrollo de patógenos (*V. destructor*, *N. ceranae*, virus ARN) así como sobre la fortaleza de la colmena, en condiciones de campo.

Se realizaron ensayos de campo con el fin de evaluar la efectividad de esta mezcla de microorganismos probióticos sobre *V. destructor*, *N. ceranae*, virus ARN así como en la fortaleza de la colmena, en condiciones naturales.

Ensayo de campo 1: Otoño de 2015

Se seleccionó un apiario localizado en Paso Severino (Florida), perteneciente al apicultor Manuel Scarzella (Figura 1). Este apicultor tiene antecedentes avalados de producción y manejo y está inscripto en el Registro Nacional de Colmenas de la Dirección General de la Granja (DIGEGRA).

Antes de iniciar el ensayo (febrero de 2015), se visitó el apiario, se colectaron muestras de abejas nodrizas y se analizó la presencia de *V. destructor*. Teniendo en cuenta este resultado las colmenas se dividieron en cuatro grupos. En marzo se aplicaron los siguientes tratamientos:

Grupo 1- 45 colmenas recibieron acaricida sintético (amivar)

Grupo 2- 15 recibieron ácido oxálico y mezcla de probióticos

Grupo 3- 15 recibieron ácido oxálico

Grupo 4- 15 colmenas se mantuvieron como control, y no recibieron tratamiento



Figura 1.- Instalación del apiario para el ensayo de campo.



Figura 2.- Aplicación de la mezcla de probióticos.

Tanto el acaricida sintético (amivar en tirillas) como el ácido oxálico (por goteo sobre los cabezales) se aplicaron de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes. En cuanto a la mezcla de probióticos, se prepararon cultivos puros de cada microorganismo, se preparó una mezcla de igual concentración de cada cepa y se liofilizó en leche descremada 20%. La mezcla de probióticos liofilizada se resuspendió en jarabe, a una concentración final de 1×10^7 ufc/ml. Se aplicaron 50 ml mediante asperjado por cada cuadro cubierto de abejas (Figura 2). La aplicación se realizó una vez por semana, durante tres semanas consecutivas.

Una vez al mes (marzo, abril, mayo, junio) se visitó el apiario, se abrió cada colmena y se estimaron los siguientes parámetros:

- población de abejas adultas (caras de cuadros cubiertos con abejas)
- cantidad de cría (octavos de cuadros con cría)
- cantidad de reservas (octavos de cuadros con reservas)
- presencia de síntomas

A tiempo cero, uno y tres meses luego de la aplicación de los tratamientos (marzo, abril, junio), se tomaron muestras de abejas de todas las colmenas (Figura 3).

Cada muestra consistió en:

- abejas nodrizas: tomadas de 3 puntos diferentes de la colmena
- abejas pecoreadoras: originalmente se pensó en tomar abejas pecoreadoras, que realizan actividades afuera de la colmena, pero ya que en otoño-invierno es muy difícil obtener este tipo de abejas, se decidió coleccionar abejas de interior pero alejadas del área de cría. Igualmente para distinguirlas de las abejas nodrizas se mantuvo la denominación de abejas pecoreadoras.

Las abejas nodrizas y pecoreadoras se colocaron por separado en recipientes plásticos con alcohol para evitar su descomposición y permitir su almacenamiento hasta el momento del análisis. Una parte de las abejas nodrizas (30 abejas) se colocó en sobres de manila y estas abejas se mantuvieron vivas hasta llegar al laboratorio donde se almacenaron a -80°C , para evitar la degradación del ARN viral.



Figura 3.- Toma de muestras de abejas.

En el laboratorio, se realizaron los siguientes análisis:

- Detección y cuantificación de diferentes virus en abejas nodrizas, mediante la técnica de PCR en tiempo real (Antúnez *et al.* 2015).
- Detección y cuantificación del ácaro *V. destructor* en abejas nodrizas y pecoreadoras, mediante observación macroscópica (Dietemann, *et al.*, 2013)
- Cuantificación de esporas de *Nosema* spp. en abejas nodrizas y pecoreadoras mediante conteo en microscopio (Fries *et al.*, 2013)

Ensayo de campo 2: Primavera de 2015

En este ensayo se emplearon 39 colmenas que en marzo de 2015 recibieron tratamiento con amitraz para el control de *V. destructor*.

Antes de iniciar el ensayo (agosto de 2015), se visitó el apiario, se colectaron muestras de abejas nodrizas y se analizó la presencia de *V. destructor*.

Teniendo en cuenta este resultado las colmenas se dividieron en dos grupos. En setiembre se aplicaron los siguientes tratamientos:

- Grupo 1- 20 colmenas recibieron ácido oxálico y mezcla de probióticos
- Grupo 2- 19 colmenas recibieron ácido oxálico

La mezcla de probióticos se preparó y aplicó de la misma forma que en otoño de 2015.

Una vez al mes (setiembre, octubre, noviembre, diciembre) se visitó el apiario, se abrió cada colmena y se estimaron los siguientes parámetros: población de abejas adultas, cantidad de cría, cantidad de reservas y presencia de síntomas.

A tiempo cero, uno y tres meses luego de la aplicación de los tratamientos (setiembre, octubre, diciembre), se tomaron muestras de abejas nodrizas y pecoreadoras de todas las colmenas, de acuerdo a lo descrito previamente.

En el laboratorio se realizó el análisis de la presencia y cuantificación de virus, *V. destructor* y *Nosema* spp., de acuerdo a lo descrito previamente.

Ensayo de campo 3: Otoño de 2017

Se seleccionó un apiario localizado en Marindia (Canelones), perteneciente al Ing. Agr. y Apicultor Jorge Harriet. Se incorporaron también colmenas pertenecientes a INIA La Estanzuela, que fueron trasladadas a este apiario especialmente para el ensayo. Antes de iniciar el ensayo (febrero de 2017), se visitó el apiario, se colectaron muestras de abejas nodrizas y pecoreadoras y se analizó la presencia de *V. destructor* y *Nosema* spp. Teniendo en cuenta este resultado las colmenas se dividieron en tres grupos. En marzo recibieron los siguientes tratamientos:

Grupo 1- 15 colmenas recibieron acaricida sintético (amivar) y mezcla de probióticos en jarabe por asperjado y en alimentador

Grupo 2- 15 colmenas recibieron acaricida sintético (amivar) y jarabe por asperjado y en alimentador

Grupo 3- 15 colmenas sólo recibieron acaricida sintético (amivar)

El acaricida sintético se aplicó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En cuanto a la mezcla de probióticos, se realizaron modificaciones en cuanto a su preparación, respecto a los ensayos anteriores. Se prepararon cultivos puros de cada microorganismo, se preparó una mezcla de igual concentración de cada cepa, se centrifugó y las células se resuspendieron en jarabe, a una concentración final de 1×10^7 bact/ml. Se aplicaron 50 ml mediante asperjado por cada cuadro cubierto de abejas. A la vez, se colocaron 250 ml en el alimentador. La aplicación se realizó una vez por semana, durante tres semanas consecutivas.

Una vez al mes (marzo, abril, mayo, junio) se visitó el apiario, se abrió cada colmena y se estimaron los siguientes parámetros: población de abejas adultas, cantidad de cría, cantidad de reservas y presencia de síntomas.

A tiempo cero, uno y tres meses luego de la aplicación de los tratamientos (marzo, abril, junio) y se tomaron muestras de abejas nodrizas y pecoreadoras de todas las colmenas.

En el laboratorio se realizó el análisis de la presencia y cuantificación de Virus, *V. destructor* y *Nosema* spp., de acuerdo a lo descrito previamente.

RESULTADOS

1. Generación de una colección de aislamientos potencialmente probióticos

Se obtuvieron 175 aislamientos bacterianos a partir de la comunidad microbiana intestinal de las abejas melíferas. Se seleccionaron al azar 85 aislamientos para continuar su caracterización. La mayoría fueron bacilos Gram-positivos de oxidasa y catalasa-negativos (potencial de *Lactobacillus* spp.).

2. Evaluación del potencial probiótico de los aislamientos obtenidos, mediante ensayos *in vitro*.

Setenta de los 85 aislamientos analizados fueron capaces de inhibir el crecimiento de *P. larvae*,



Figura 4.- Ensayo de inhibición de *P. larvae* *in vitro*. En la fotografía se observa un aislamiento capaz de inhibir el crecimiento de *P. larvae*, y otros 3 aislamientos con resultado negativo

generando zonas de inhibición desde 60 ± 0.4 mm hasta 260 ± 0.6 mm (Figura 4).

El tiempo de generación fue similar en la mayoría de los aislamientos, siendo el promedio fue de 116 ± 48 minutos.

Cuando se analizó la tolerancia osmótica al jarabe de azúcar, los aislamientos mostraron una mayor resistencia a 4°C en ambas concentraciones de azúcar (1: 1 y 2: 1) que a 28°C (Figura

5, prueba de Mann-Whitney $p < 0.01$ en ambos casos). No se observaron diferencias significativas en la viabilidad bacteriana a diferentes concentraciones de azúcar, ya sea a 4 o 28°C (prueba de Mann-Whitney $p > 0.05$ en ambos casos).

En cuanto a la resistencia a condiciones de acidez, todos los aislamientos mostraron la capacidad de resistir a pH 5 y pH 7, pero solo 27 pudieron resistir a pH 3 (Figura 6).

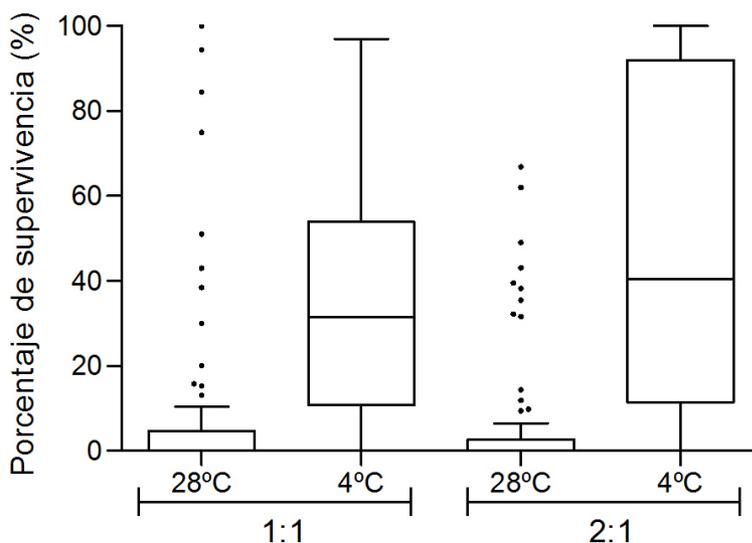


Figura 5- Supervivencia de los aislamientos a diferentes concentraciones de azúcar (jarabe 1:1 o 2:1) y temperatura (4 y 28°C). El porcentaje de supervivencia de cada aislamiento se calculó como: $((\text{ufc/ml})_{t72h} * 100) / (\text{ufc/ml})_{t0h}$.

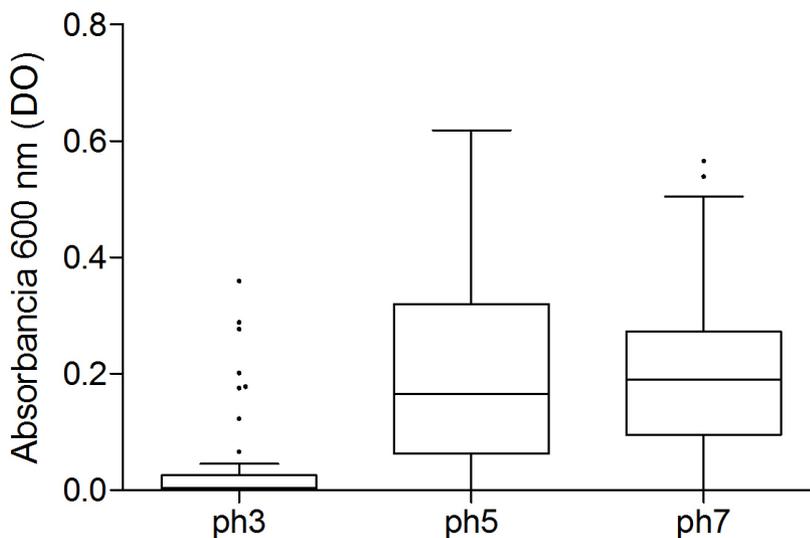


Figura 6- Supervivencia de los aislamientos sometidos a diferentes condiciones de acidez (pH 3, 5 y 7). Los datos que se representan corresponden al Δ Absorbancia $600\text{nm} = \text{Absorbancia } 600\text{nm}_{t0h} - \text{Absorbancia } 600\text{nm}_{t4h}$.

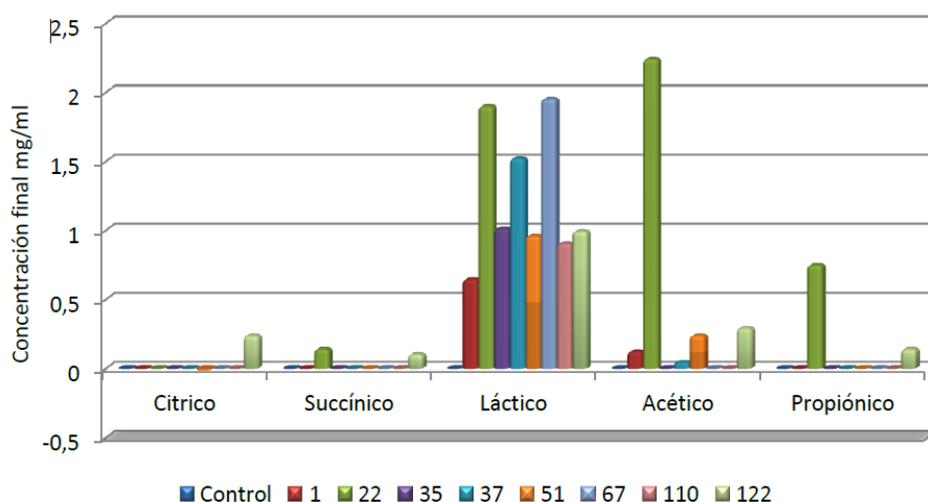


Figura 7- Niveles de producción de los distintos ácidos grasos volátiles (Cítrico, Succínico, Láctico, Acético y Propiónico).

En base a los resultados obtenidos se realizó la elección de aquellos aislamientos capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de *P. larvae*, de sobrevivir en altas concentraciones de azúcar y capaces de sobrevivir a distintas condiciones de acidez. Los aislamientos escogidos resultaron: 1, 22, 35, 37, 51, 67, 78, 110, 117, 122 (tabla 1). Estos diez aislamientos produjeron ácido láctico. Además algunos aislamientos produjeron ácido acético,

propiónico, succínico y cítrico (Figura 7).

La administración de estos aislamientos a larvas no generó efectos deletéreos. Las larvas que recibieron los aislamientos bacterianos mostraron una curva de supervivencia similar a los individuos control (L o C) (Figura 8 y 9, Gehan-Breslow, $p > 0.05$ en todos los casos, excepto para el aislamiento 78, $p = 0.03$).

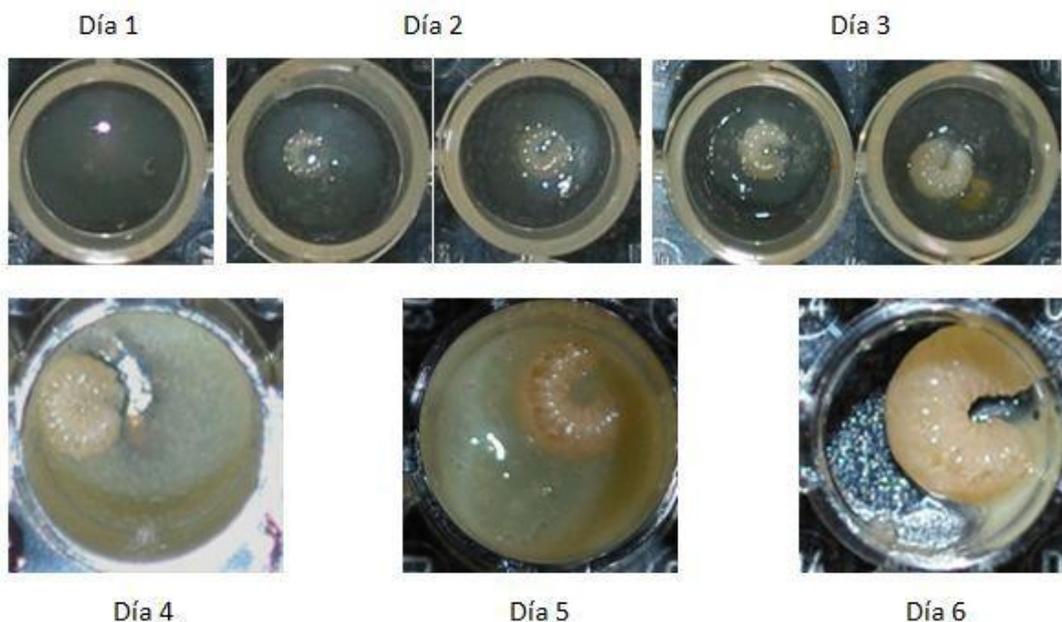


Figura 8- Desarrollo larval de *A. mellifera* en condiciones controladas de laboratorio.

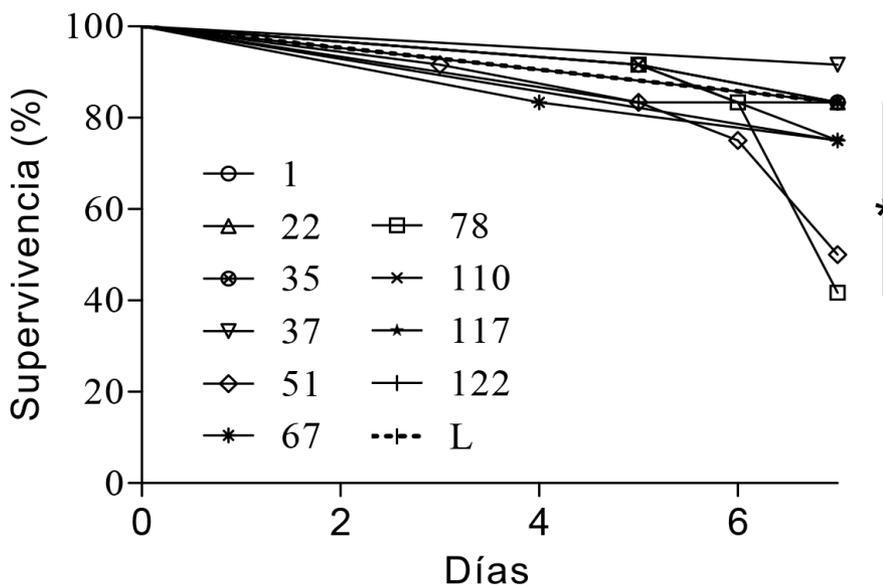


Figura 9.- Curvas de supervivencia de las larvas alimentadas *ad libitum* con dieta artificial suplementada con los distintos aislamientos (1, 22, 35, 37, 51, 67, 78, 110, 117, 122), o solo alimento larval (L).

La infección con *P. larvae* generó una mortalidad del 80% de las larvas. La administración de las cepas 35, 37, 51, 67, 78, 110, 117, 122 generaron

una disminución significativa en la mortalidad ocasionada por este patógeno (Figura 10, Gehan-Breslow, $p < 0.05$ en estos casos).

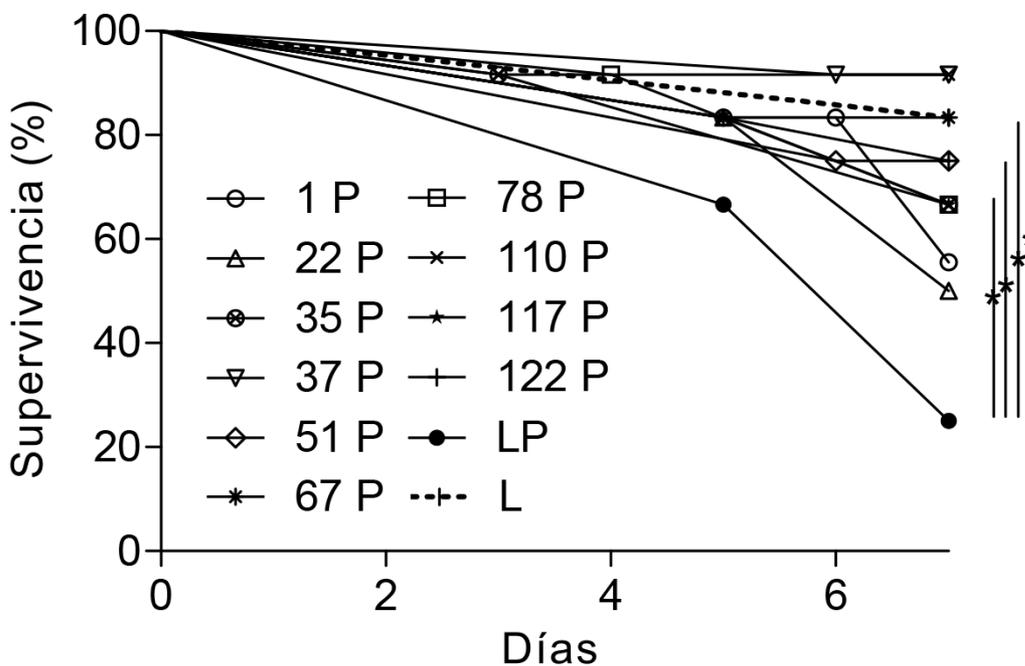


Figura 10.- Curvas de supervivencia de las larvas alimentadas *ad libitum* con dieta artificial suplementada con los distintos aislamientos e inoculada con esporas de *P. larvae* (1P, 22P, 35P, 37P, 51P, 67P, 78P, 110P, 117P, 122P), alimento larval (L) o alimento larval y esporas (LP). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

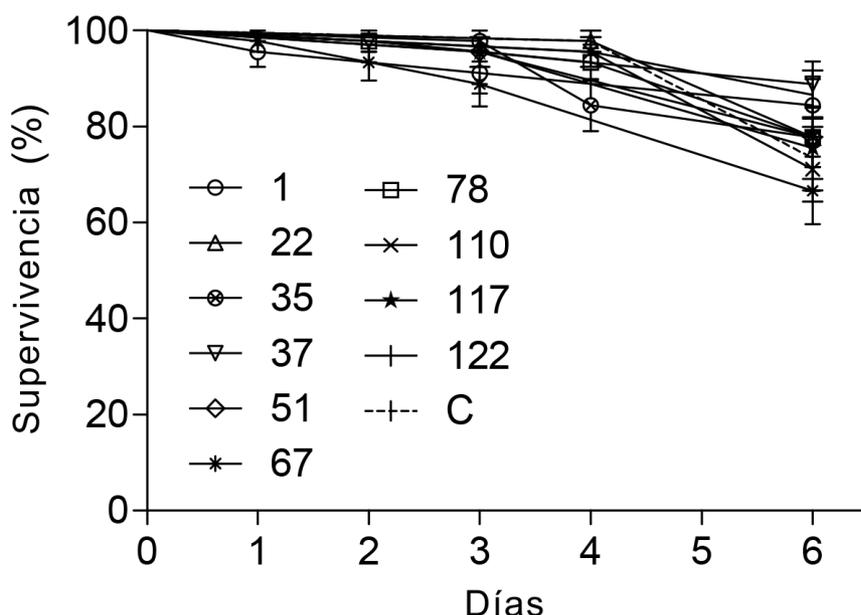


Figura 11.- Curvas de supervivencia de abejas adultas alimentadas ad libitum con dieta artificial suplementada con los distintos aislamientos (1, 22, 35, 37, 51, 67, 78, 110, 117, 122), o solo alimento (C).

En el caso de las abejas adultas, la administración de estos aislamientos tampoco generó un efecto perjudicial (Figura 11, Gehan-Breslow, $p > 0.05$ en todos los casos).

La mortalidad de las abejas que recibieron bacterias fue similar a las control (Gehan - Breslow; $p > 0.05$ en todos los casos), mostrando que la administración de estos microorganismos es segura.

3. Identificación de los aislamientos obtenidos.

Los 10 aislamientos que exhibieron las características más prometedoras asociadas con su uso como microorganismos probióticos se identificaron mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. La mayoría de ellos fueron identificados como *Lactobacillus kunkeei* (Tabla 1).

4. Preparación de una mezcla de probióticos.

Se evaluó la actividad inhibitoria entre los aislados preseleccionados y 6 de los 10 aislamientos inhibieron el crecimiento de otros (1, 22, 51, 78, 11 y 122) mientras que 4 de ellos no mostraron ninguna influencia inhibitoria sobre los otros aislados (35, 37, 67 y 110). Para obtener

una mezcla bacteriana que podría presentar diferentes propiedades beneficiosas y coexistir, se eligieron estos últimos 4 aislamientos (Tabla 1 complementaria). Aunque todos ellos fueron identificados como *L. kunkeei*, mostraron variaciones fenotípicas entre ellos, lo que sugiere que son cepas diferentes.

Se generó una mezcla de microorganismos probióticos conteniendo cantidades similares de los 4 microorganismos seleccionados.

5. Caracterización del potencial probiótico de la mezcla de microorganismos

Una vez preparada la mezcla de microorganismos, se evaluó el efecto de la mezcla bacteriana sobre la supervivencia de larvas y abejas. No se observaron efectos tóxicos de la mezcla bacteriana, obteniendo curvas de supervivencia similares a los grupos control (prueba de Gehan-Breslow $p > 0.05$ en todos los casos, Figura 12 y 13A). Aún más, la administración de las bacterias aumentó la viabilidad de las larvas (LBMP vs L, prueba de Gehan-Breslow $p = 0.03$).

El comportamiento de las larvas y abejas tratadas fue normal, siendo activo durante las inspecciones a lo largo de los experimentos.

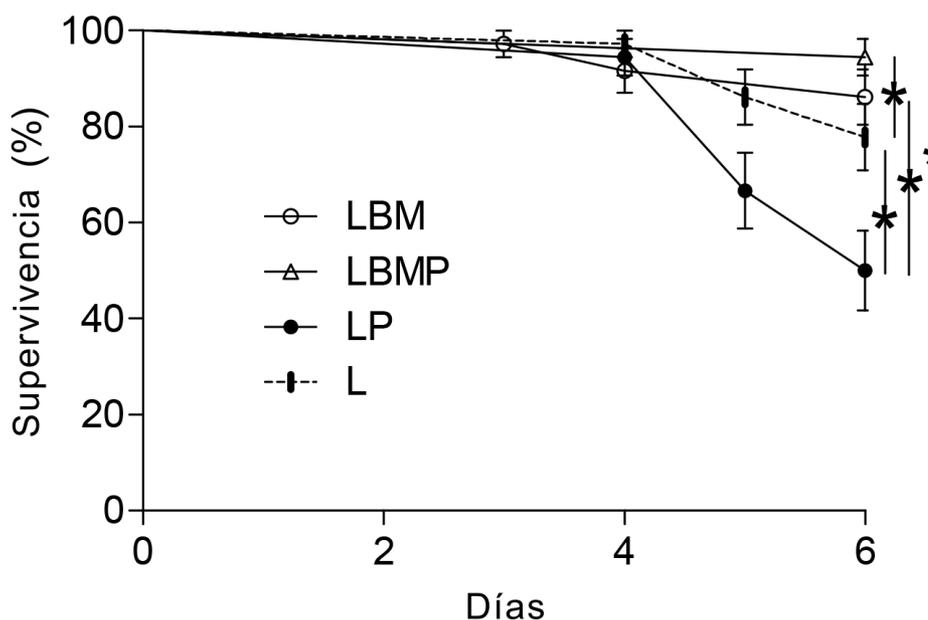


Figura 12.- Curvas de supervivencia de las larvas alimentadas ad libitum con dieta artificial suplementada con la mezcla de microorganismos (LBM); alimentada con esa mezcla e infectada con esporas de *P. larvae* (LBMP); alimentada solo con dieta artificial (L) y alimentada con dieta artificial y *P. larvae* (LP). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Por otro lado, la mezcla bacteriana redujo la mortalidad de larvas infectadas por *P. larvae* in vivo. En particular, las larvas que recibieron la mezcla bacteriana y se infectaron con esporas de *P. larvae* tuvieron una mortalidad menor que las larvas infectadas que no recibieron bacterias (Figura 12, LBMP frente a LP, prueba de Gehan-Breslow $p < 0,01$).

En cuanto al efecto antiparasitario sobre *N. ceranae*, las abejas infectadas alimentadas con la mezcla bacteriana tenían significativamente menos esporas que las abejas infectadas con *N. ceranae* que no recibieron bacterias (NBM frente

a N, prueba de Mann-Whitney $p < 0,01$, Figura 14). Ninguna de las abejas pertenecientes al grupo control (C) mostró esporas.

La supervivencia de las abejas a lo largo de siete días después de la infección fue similar entre los grupos infectados con *N. ceranae* y control tratados con la mezcla bacteriana (C frente a NBM, prueba de Gehan-Breslow $p > 0,05$, Figura 13B). La supervivencia de las abejas infectadas con *N. ceranae* fue significativamente menor que la supervivencia de las abejas del grupo de control (C frente a N, prueba de Gehan-Breslow $p < 0.01$, Figura 13B).

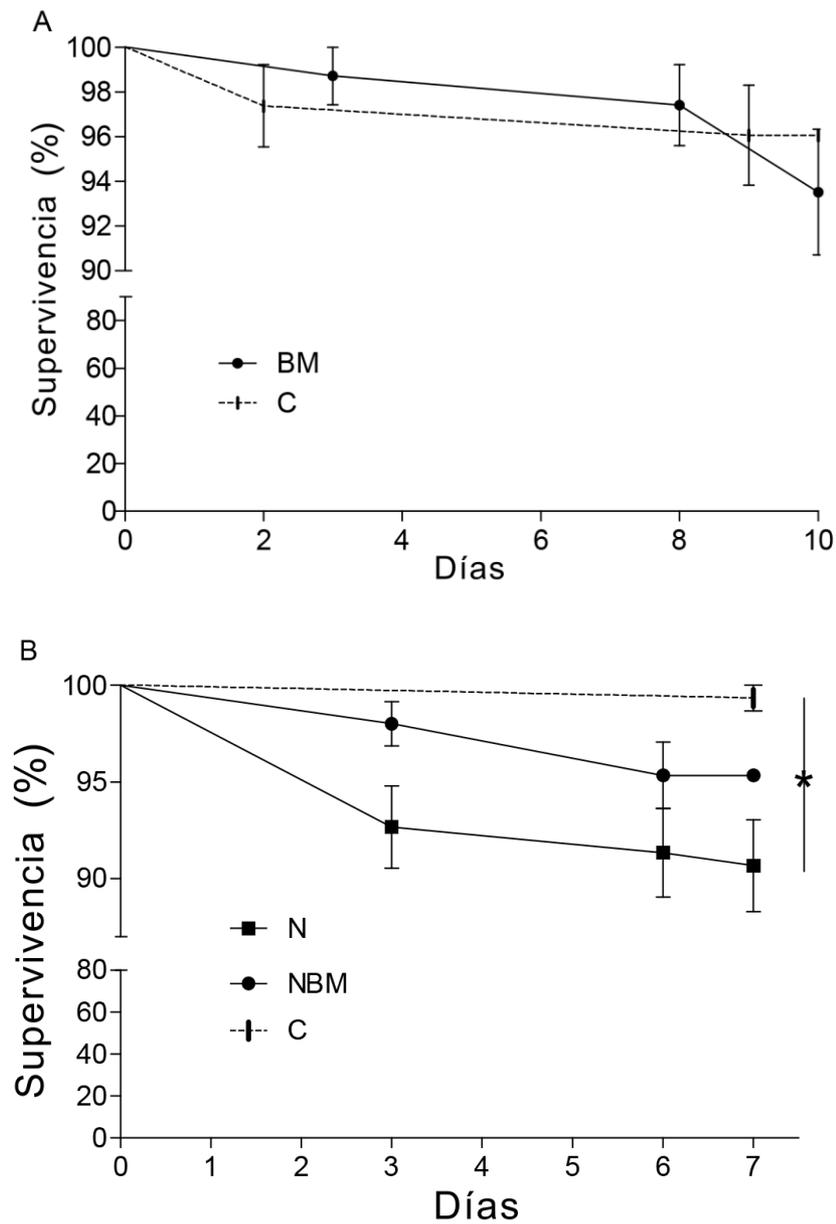


Figura 13.- Curvas de supervivencia de las abejas adultas alimentadas *ad libitum* con: A.-dieta artificial suplementada con la mezcla de microorganismos (BM) y control (C); B.- dieta artificial suplementada con la mezcla de microorganismos e infectada con *N. ceranae* (NBM); control (C) e infectada con *N. ceranae* (LP). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

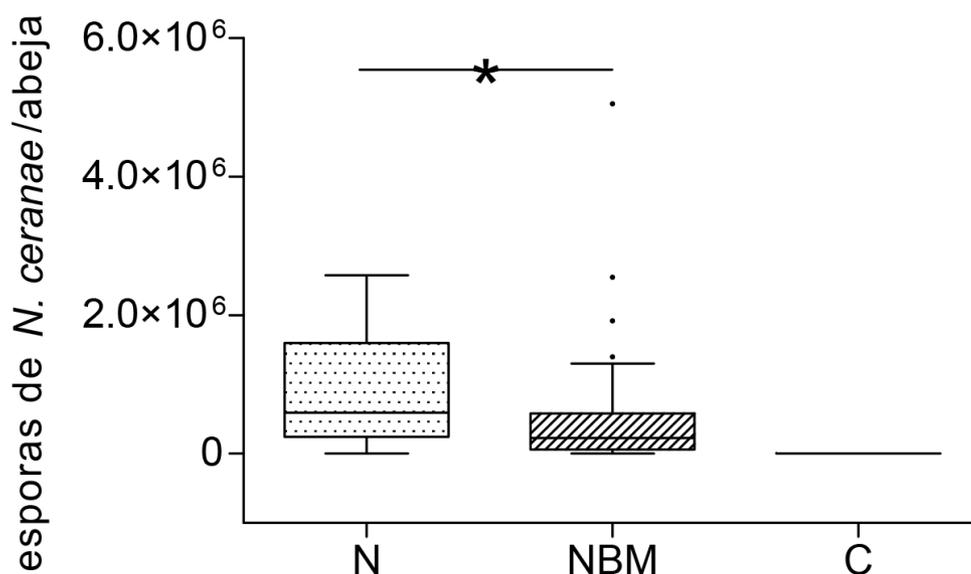


Figura 14. Nivel de infección por *N. ceranae* de abejas infectadas artificialmente (N), abejas alimentadas con la mezcla e infectadas con *N. ceranae* (NBM) y abejas control (C). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

La alimentación de abejas melíferas con jarabe suplementado con la mezcla bacteriana no produjo cambios significativos en la expresión de péptidos antibacterianos, enzimas relacionadas con la inmunidad o vitelogenina en comparación con las abejas control (BM frente a C, prueba de Mann-Whitney $p > 0.05$ en todos los casos).

6. Evaluación del efecto de la mezcla de microorganismos probióticos sobre el desarrollo de patógenos (*V. destructor*, *N. ceranae*, virus ARN) así como sobre la fortaleza de la colmena, en condiciones de campo.

Ensayo de campo 1: Otoño de 2015

Al inicio del ensayo, los cuatro grupos de colmenas (tratados con acaricida sintético, ácido oxálico, ácido oxálico y probióticos, y grupo control) presentaron características similares, con similar población de abejas, cría y miel y similar nivel de infestación/ infección por los patógenos *V. destructor*, *N. ceranae*, ABPV, BQCV, DWV y SBV.

Un mes después de la primera aplicación de los tratamientos, el acaricida sintético, el ácido oxálico,

y el ácido oxálico suplementado con probióticos, lograron disminuir significativamente el porcentaje de infestación por varroa comparado con el grupo control (que no recibió tratamiento).

Sin embargo, tres meses después de la primera aplicación, sólo el acaricida sintético fue capaz de mantener bajo los niveles de varroa. En los grupos tratados con ácido oxálico, ác. oxálico suplementado con probióticos y el grupo control se observó un aumento en el nivel de infestación con varroa, que en muchos casos terminó con la muerte de la colmena.

La aplicación de los tratamientos no generó cambios en el nivel de infección por *N. ceranae* y los virus ABPV, BQCV, DWV y SBV.

Estos resultados indican que esta forma de aplicación del ácido oxálico (por goteo sobre los cabezales) no resultó efectiva para el control de varroa. Tampoco se encontró un efecto de la administración de probióticos.

Ensayo de campo 2: Primavera de 2015

En este ensayo se emplearon las colmenas que sobrevivieron del ensayo anterior, realizado en otoño de 2015, que fueron tratadas con amivar para el control de varroa.

Al inicio del ensayo, los dos grupos de colmenas (tratados con ácido oxálico y ácido oxálico con probióticos) presentaron características similares, con similar población de abejas, cría y miel, y similares niveles de infestación/infección por los patógenos *V. destructor*, *N. ceranae*, ABPV, BQCV, DWV y SBV.

La administración del probiótico no generó cambios en la fortaleza de la colmena (población de abejas, cría y miel) ni en el nivel de infestación/infección por los distintos patógenos, a lo largo del ensayo.

Ensayo de campo 3: Otoño de 2017

Al inicio del ensayo, los tres grupos de colmenas (tratados con probióticos, jarabe y control) presentaron características similares, con similar población de abejas, cría y miel y similar nivel de infestación/ infección por los patógenos *V. destructor*, *N. ceranae*, ABPV, BQCV, DWV y SBV. Es importante recordar que en este caso todas las colmenas recibieron tratamiento con acaricida sintético antes de iniciar el ensayo, para bajar y estandarizar el nivel de infestación por varroa.

Con el transcurso de los días el nivel de infestación aumentó, evidenciando su multiplicación.

Uno y tres meses luego de la aplicación de los tratamientos, los tres grupos mostraron niveles similares de población de abejas, cría y miel, indicando que la administración de probióticos no afecta la fortaleza de la colmena. Sin embargo, si se encontró un efecto sobre el nivel de infestación de varroa y *Nosema* spp.

Tres meses después de la primera aplicación, el grupo tratado con probióticos presentó significativamente menor nivel de infestación por varroa que las colmenas de los grupos controles. Esto sugiere que el probiótico es capaz de reforzar el efecto acaricida del Amivar, afectando el desarrollo de varroa (Figura 15).

Por otro lado, también se encontró que el número de esporas de *N. ceranae* por abeja tiende a bajar en el tiempo, entre marzo y julio, probablemente asociado al ciclo biológico del patógeno. Sin embargo, se observa que esta disminución se da más rápidamente en el grupo de colmenas tratado con probióticos que en el grupo vehículo o control (Figura 16).

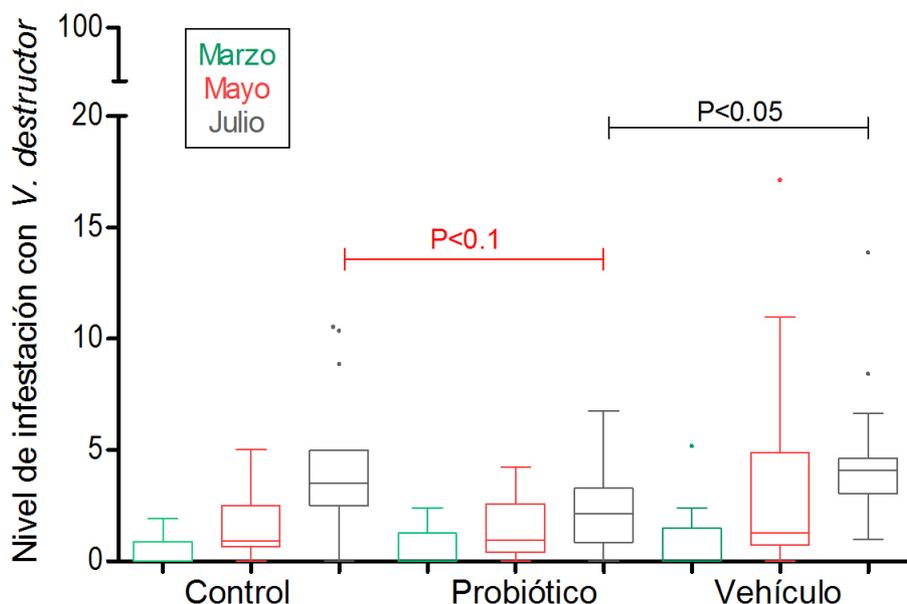


Figura 15.- Porcentaje de infestación con *V. destructor* en el ensayo de campo 3. Se indica los valores obtenidos en marzo, mayo y julio. En rojo y negro se indican las diferencias significativas (P<0,1 y P<0,05 respectivamente)

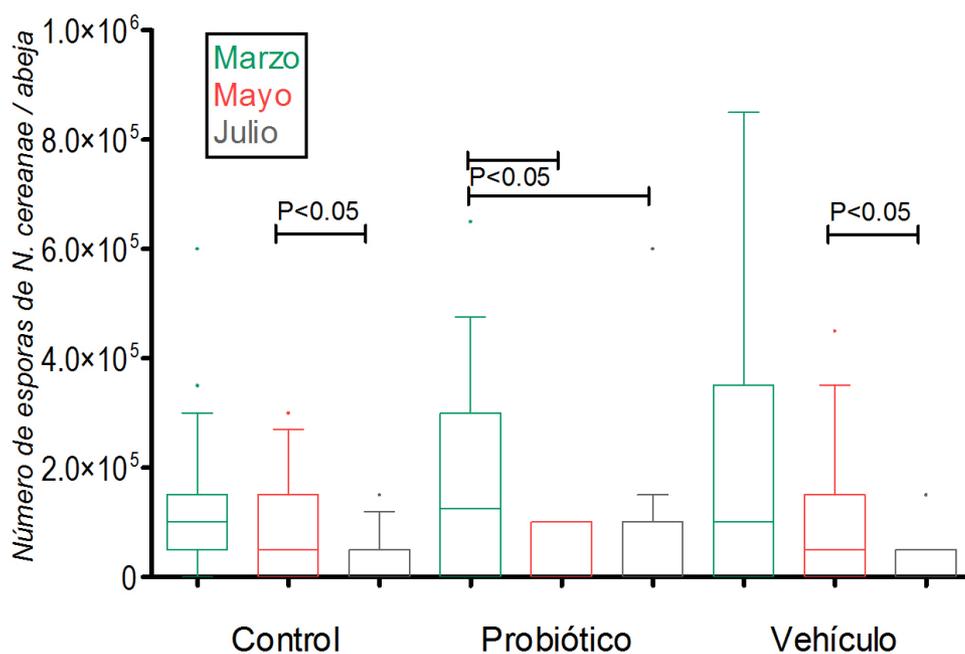


Figura 16.- Número de esporas de *N. ceranae* en las colmenas analizadas en el ensayo de campo 3. Se indica los valores obtenidos en marzo, mayo y julio. En negro se indican las diferencias significativas ($P < 0.05$)

Finalmente, la administración de probióticos no tuvo efecto sobre el nivel de infección de los diferentes virus ARN estudiados (ABPV, BQCV, DWV y SBV).

CONCLUSIONES

Se obtuvo una colección de aislamientos a partir de abejas de colmenas históricamente sanas, los que en su mayoría fueron identificados como *Lactobacillus kunkeei*. A pesar de pertenecer a la misma especie estos aislamientos presentaron diferencias fenotípicas y genotípicas.

Se obtuvo una mezcla de 4 cepas de *L. kunkeei*. Su administración fue segura para larvas y abejas adultas en condiciones de laboratorio, disminuyó la mortalidad causada por la bacteria *P. larvae* en larvas y disminuyó el número de esporas de *N. ceranae* en abejas adultas.

La administración de esta mezcla en ensayos de campo logró disminuir la infestación por *V. destructor*, potenciando el efecto del acaricida sintético, y a la vez, disminuir la infección por *N. ceranae*. Si bien estos resultados son auspiciosos, es necesario realizar más ensayos para confirmar su efecto en condiciones de campo.

REFERENCIAS

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST y PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25:3389-3402.
- Anido, M., Branchiccela, B., Castelli, L., Harriet, J., Campá, J., Zunino, P. Antúnez, K., 2016. Prevalence and distribution of honeybee pest y pathogens in Uruguay. *Journal of Apicultural Research*, 54(5):532-40.
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campá, J., Zunino, P., 2012. American Foulbrood in Uruguay: twelve years from its first report. *Journal of invertebrate pathology*, 110(1), 129-131.
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Zunino, P., 2005, Detection of chronic bee paralysis virus y acute bee paralysis virus in Uruguayan honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90:69-72.
- Antúnez, K., D'Alessandro, B., Corbella, E., Ramallo, G., Zunino, P., 2006, Honeybee viruses in Uruguay. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93:67-70.
- Antúnez, K., Martin-Hernandez, R., Prieto, L., Meana, A., Zunino, P., Higes, M., 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology*, 11: 2284-2290.
- Audisio, C.M., Torres, M.J., Sabate, D.C., Iburguren, C. y Apella, M.C., 2011. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiological Research*, 166:1-13.
- Boncrisiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J.D., Pettis, J. y vanEngelsdorp, D., 2012. Direct effect of acaricides on pathogen loads y gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* 58:613-620.
- Campá, J., Harriet, J., Coll, F., Roth, R., Bonunous, C., Roth, F., 2007b, Control de varroa. Evaluación de productos orgánicos y de síntesis. *Jornada de Manejo Sanitario en Apicultura* 500:13-20.
- Campá, J., Harriet, J., Mendoza, Y., 2007a. Pautas sanitarias para manejar correctamente la Varroasis.
- Chen, Y. P., Siede R., 2007. "Honey bee viruses." *Advances in Virus Research* 70: 33-80.
- Corona, M., Velarde, R.A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K.A., Robinson, G.E., 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, y queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:7128-7133.
- Cross, M.L., 2002. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli y their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 34(4):245-253.
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S.J., Anderson, D., Locke, B., Delaplane, K.S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P., Ellis, J.D., 2013. Standard methods for varroa research. *Journal of Apicultural Research* 52:1-54.
- Ellis, J.J., Evans, J. D. Pettis, J. 2010. Colony losses, managed colony population decline, y Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*. 49(1):134-136.
- Evans, J.D., 2004. Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 85:105-111.
- Evans, J.D., 2006. Beepath: an ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity y disease. *Journal of Invertebrate Pathology* 93:135-139.
- Evans, J.D., Lopez, D.L., 2004. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 97: 752-757.
- Evans, J.D. Schwarz, R.S., 2011, Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiology*. 19:614-620.
- Forsgren, E., Olofsson, T.C., Vásquez, A., Fries, I., 2010. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie* 41:99-108.

- Fries, I., Chauzat, M.P., Chen, Y., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D.P., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., 2013. Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research* 52: 1-28.
- Gallai, N., Salles, J.-M., Settele, J., Vaissière, B.E., 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*. 68:810-821.
- Garrido, P.M., Antunez, K., Martin, M., Porrini, M.P., Zunino, P. y Eguaras, M.J., 2013. Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. *Journal of Insect Physiology* 59:113-119.
- Genersch E., Aubert M., 2010. Emerging y re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Veterinary Research*, 41:54.
- Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R., 1994. *Methods for General y Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Gilliam, M., 1997. Identification y roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters* 155:1-10.
- 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., 2008. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental microbiology*, 10(10):2659-69.
- Hornitzky, M.A.Z., Nicholls, P.J., 1993. J medium is superior to Sheep Blood Agar y Brain Heart Infusion for the isolation of *Bacillus larvae* from honey samples. *Journal of Apicultural Research* 32:51-52.
- Invernizzi, C., Antúnez, K., Campa, J., Harriet, J., Mendoza, Y., Santos, E., Zunino, P., 2011. Situación sanitaria de las abejas melíferas en Uruguay. *Veterinaria*. 181:15-28.
- Invernizzi C., 2012. Physiological susceptibility y hygienic behavior affect chalkbrood disease incidence in worker y drone larvae in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research* 51:91 -99.
- Jacobsen, C., Rosenfeldt, N., Hayford, A., Moller, P., Michaelsen, K., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M., Jakobsen, M., 1999. Screening of probiotics activities of forty seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques y evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology* 65:4949-4957.
- Johnson, R.M., Evans, J.D., Robinson, G.E., Berenbaum, M.R., 2009. Changes in transcript abundance relating to colony collapse disorder in honey bees (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(35):14790-14795.
- Klaenhammer, T.R., Kullen, M.J., 1999. Selection y design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 50:45-57.
- Klein, A.M., Vaissiere, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274:303-313.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. E. Stackebrandt & M. Goodfellow, New York: Wiley, 115-177.
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Gende, L.B., Eguaras, M.J. y Sardella, N.H., 2008. LC50 baseline levels of amitraz, coumaphos, fluvalinate y flumethrin in populations of *Varroa destructor* from Buenos Aires Province, Argentina. *Journal of Apicultural Research*, 47(4):292-295.
- Maggi, M.D., Ruffinengo, S.R., Negri, P. y Eguaras, M.J., 2010. Resistance phenomena to amitraz from populations of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* of Argentina. *Parasitology Research*, 107(5): 1189-1192.
- Maggi M.D., Ruffinengo, S.R., Mendoza, Y., Ojeda, P., Ramallo, G., Floris, I., Eguaras, M.J. 2011. Susceptibility of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) to synthetic acaricides in Uruguay: *Varroa* mites' potential to develop acaricide resistance. *Parasitology Research*. 108(4):815-21.

- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Garrido-Bailón, E. y Higes, M., 2007. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20): 6331-6338.
- Mendoza, Y., Ramallo, G., Díaz-Cetti, S., Ojeda, M.P., Carrasco-Letelier, L. 2008. Factores predisponentes, pautas sanitarias y medidas de control que se deben integrar para manejar el control de la varroasis. *Serie de Actividades de Difusión (INIA la estanzuela)*, p. 4.
- Mitton, G.A., Quintana, S., Giménez, P., Mendoza, Y., Ramallo, G., Brasesco, C., Villalba, A., Eguaras, M.J., Maggi, M., Ruffinengo, S. 2016. First record of resistance to flumethrin in a varroa population from Uruguay. *Journal of Apicultural Research* 55: 422-427.
- MGAP, 2010. Decreto N° 188/2010 de 14 junio de 2010 <http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/decretooxitetetraciclina14.06.10.pdf>
- MGAP/DIGEGRA, 2016 . Registro nacional de propietarios de colmenas (RNPC) 2016. www.mgap.gub.uy
- Morse, R. A. Calderone, N. W., 2000. The value of honey bee pollination the United States. *Bee Culture* 128:1-15.
- Mohr, K.I., Tebbe, C.C., 2006. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology* 8:258-272.
- Mrazek, J., Strosova, L., Fliegerova, K., Kott, T., Kopečný, J., 2008. Diversity of insect intestinal microflora. *Folia Microbiologica* 53:229-233.
- Neumann, P. Carreck, N.L., 2010. Honeybee colony losses. *Journal of Apicultural Research*. 49(1):1-6.
- OIE, 2004. Varroosis. *Manual of Diagnostic Tests y Vaccines for Terrestrial Animals*, www.oie.int/esp/normes/mmanual/A_00124.htm.
- OIE, 2008. Varroosis of honey bees. www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.02.07_VARROOSIS.pdf
- Olofsson, T.C., Vasquez, A., 2008. Detection y identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Current Microbiology* 57:356-363.
- Pascual Anderson, M.d.R., Calderón; Pascual, V., 2000. *Microbiología alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas*, 2ª Edición. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29:e45-e47.
- Potts *et al.*, 2010. Declines of managed honeybees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*. 49(1):15-22.
- Rademacher, E. y Harz, M., 2006. Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies—a review. *Apidologie*, 37(1):98-120.
- Reid, G., 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied Environmental Microbiology* 65:3763-3767.
- Rosenkranz, P., Aumeier P., Ziegelmann, B., 2010. Biology y control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology* 103(1): S96-119.
- Ruffinengo, S., Matias, M., Faverin, C., García de la Rosa, S.B., Bailac, P., Principal, J. y Eguaras, M., 2007. Essential oils toxicity related to *Varroa destructor* and *Apis mellifera* under laboratory conditions. *Zootecnia Tropical*, 25(1):63-69.
- Sabate, D. C., Carrillo L., Audisio, M. C., 2009. Inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples. *Research in Microbiology* 160(3): 193-199.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fonden, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Mattila-Sandholm, T., 1998. Demonstration of safety of probiotics -- a review. *International Journal of Food Microbiology* 44: 93-107.
- Stokstad, E., 2007. The case of the empty hives. *Science*, 316:970-972.

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

Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. y Cole, J.R., 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73:5261-5267.

Yang, X., Cox-Foster, D.L., 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 102:7470-7477.

Marzo de 2019
PRONTOGRAFICA S.A.
Cerro Largo 850 - Tel.: 2902 3172
E-mail: pgrafica@adinet.com.uy

INIA Dirección Nacional
Andes 1365 P. 12
Montevideo
Tel.: ++598 2902 0550
Fax: ++598 2902 3633
iniadn@inia.org.uy

INIA La Estanzuela
Ruta 50 Km. 11
Colonia
Tel.: ++598 4574 8000
Fax: ++598 4574 8012
iniale@le.inia.org.uy

INIA Las Brujas
Ruta 48 Km. 10
Canelones
Tel.: ++598 2367 7641
Fax: ++598 2367 7609
inia_lb@lb.inia.org.uy

INIA Salto Grande
Camino al Terrible
Salto
Tel.: ++598 4733 5156
Fax: ++598 4732 9624
inia_sg@sg.inia.org.uy

INIA Tacuarembó
Ruta 5 Km. 386
Tacuarembó
Tel.: ++598 4632 2407
Fax: ++598 4632 3969
iniatbo@tb.inia.org.uy

INIA Treinta y Tres
Ruta 8 Km. 281
Treinta y Tres
Tel.: ++598 4452 2023
Fax: ++598 4452 5701
iniatt@tyt.inia.org.uy