

EVALUACIÓN DE CEPAS LÁCTICAS AISLADAS DEL POLEN CONSERVADO FRENTE A *Varroa destructor* Y *Nosema* spp. EN COLONIAS DE *Apis mellifera* L.

EVALUATION OF LACTIC STRAINS ISOLATED FROM PRESERVED POLLEN AGAINST *Varroa destructor* AND *Nosema* spp. IN COLONIES OF *Apis mellifera* L.

María José Cabana^{1*}, Jean Guy LeBlanc² y Marcelo Rafael Benítez Ahrendts^{1,3}

¹ Universidad Nacional de Jujuy- Facultad de Ciencias Agrarias, Alberdi 47, CP 4600 San Salvador de Jujuy, Provincia de Jujuy, Argentina

<https://orcid.org/0000-0002-4649-2384>

² CERELA-CONICET-FML-FECIC, Chacabuco 145, CP 4000, San Miguel de Tucumán, Provincia de Tucumán, Argentina

<https://orcid.org/0000-0002-4634-8630>

³ Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA-CONICET), CP 4600, Provincia de Jujuy, Argentina

<https://orcid.org/0000-0001-8479-8985>

* Autor para correspondencia: mariajosecabana@fca.unju.edu.ar

RESUMEN

Las abejas (*Apis mellifera* L.) son afectadas por *Nosema* spp. y *Varroa destructor*. Una alternativa para controlar estos patógenos es el uso de bacterias lácticas. En la presente investigación se aisló del polen conservado, tres cepas lácticas identificadas como *Apilactobacillus kunkeei* (LSAJ), *Lactobacillus helsingborgensis* (LSAI) y *Lactobacillus melliventris* (LSAM), de manera que el objetivo fue evaluar la influencia de estas cepas sobre la incidencia de *V. destructor* y de *N. spp.* en *A. mellifera*. Se emplearon 12 colmenas en total, tres se asignaron para cada tratamiento con lactobacilos, mientras que las restantes se destinaron al grupo control de cada tratamiento. Los ensayos se efectuaron en un apiario de la Finca de la Facultad de Ciencias Agrarias (Jujuy, Argentina). Durante 11 meses, se suministró a cada colmena una suspensión bacteriana de 1×10^8 UFC mL⁻¹ en jarabe de sacarosa que contenía 1 L de agua con 125 g de sacarosa, aplicada en alimentadores doolittle, para que las abejas lo consumieran, mientras que el control recibió el mismo jarabe, con la misma concentración, pero sin la bacteria. Las cepas *A. kunkeei* y *L. helsingborgensis* redujeron *V. destructor* un 100% y *L. melliventris* un 90%. En cuanto a *N. spp.*, el análisis estadístico registró diferencias significativas entre las cepas $p < 0,0001$ con disminución de *N. spp.* en 97% para *A. kunkeei*, *L. helsingborgensis* en 75% y *L. melliventris* en 45%. *A. kunkeei* demostró un efecto biocontrolador para *V. destructor* y *N. spp.* en colmenas de *A. mellifera*.

Palabras clave: *Nosema* spp., probióticos, *Varroa destructor*.

ABSTRACT

Bees (*Apis mellifera* L.) are affected by *Nosema* spp. and *Varroa destructor*. One alternative for controlling these pathogens is the use of lactic acid bacteria. Three lactic acid bacteria strains were isolated from preserved pollen, identified as *Apilactobacillus kunkeei* (LSAJ), *Lactobacillus*

helsingborgensis (LSAI), and *Lactobacillus melliventris* (LSAM). The objective of this study was to evaluate the influence of these strains on the incidence of *V. destructor* and *N. spp.* in *A. mellifera*. A total of 12 hives were used; three were assigned to each *Lactobacillus* treatment, while the remaining hives served as the control group for each treatment. The trials were conducted at an apiary on the Faculty of Agricultural Sciences farm (Jujuy, Argentina). Over an 11-month period, each hive was supplied with a bacterial suspension of 1×10^8 CFU mL⁻¹ in sucrose syrup containing 1 L of water with 125 g of sucrose, administered via Doolittle feeders for the bees to consume, while the control received the same syrup at the same concentration but without the bacteria. The strains *A. kunkeei* and *L. helsingborgensis* reduced *V. destructor* by 100% and *L. melliventris* by 90%. Regarding *N. spp.*, statistical analysis revealed significant differences among the strains ($p < 0.0001$). *N. spp.* abundance was reduced by 97% by *A. kunkeei*, 75% by *L. helsingborgensis*, and 45% by *L. melliventris*. *A. kunkeei* demonstrated a biocontrol effect against *V. destructor* and *N. spp.* in *A. mellifera* hives.

Keywords: *Nosema spp.*, probiotics, *Varroa destructor*.

INTRODUCCIÓN

Mantener una microbiota intestinal sana y equilibrada es fundamental, ya que la disbiosis intestinal genera que las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) sean susceptible a infecciones generadas por patógenos (Moharrami et al., 2022). La presencia de ectoparásitos como *Varroa destructor* y de parásitos como *Nosema spp.* causan enfermedades en abejas melíferas dañando su microbiota intestinal y alterando su sistema inmune entre otros efectos (Antúnez et al., 2009).

En cuanto al ectoparásito *V. destructor*, este se alimenta de sus tejidos, provocando pérdida de peso y malformaciones en patas, alas, y abdomen, además, transporta e introduce diferentes tipos de virus, como el virus de las alas deformadas (DWW) (Ramsey et al., 2019).

Asimismo, las colonias de abejas se ven afectadas por los microsporidios *N. spp.* (*N. apis* y *N. ceranae*) (Tauber et al., 2019). Estos microsporidios se transmiten por esporas en vía feco-oral, entre abejas en actividades de limpieza, provocando el incremento de las bacterias intestinales *Gilliamella apicola* y *Snodgrassella alvi*, y disminución de *Alfaproteobacterias*, *Bifidobacterium spp.*, y *Lactobacillus spp.*, lo que provoca alteraciones de las funciones digestivas de las abejas, disminuyendo su esperanza de vida (Rouze et al., 2019).

En investigaciones realizadas por Tejerina et al. (2022) se ha reportado que en la provincia de Jujuy (Argentina), los apiarios son afectados por *V. destructor* y *N. spp.*, generando pérdidas del 20% en la producción apícola de un total de 25 colmenas.

Kaskinova et al. (2020), exponen que el uso de acaricidas flumetrina o ácido oxálico para el control de *V. destructor* conduce a la acumulación de este producto en los derivados de origen apícola, y el desarrollo de resistencia por parte del ácaro, ante esta problemática una alternativa

es la selección de abejas que tengan resistencia al ectoparásito.

Cilia et al. (2020), expusieron que la aplicación de fumarilina como tratamiento puede inducir la resistencia en *N. ceranae* y dejar residuos en la miel, además de afectar la fisiología de las abejas y favorecer la proliferación del patógeno, por lo que su empleo no es recomendado en numerosos países.

Sin embargo, en los últimos tiempos una alternativa para controlar este parásito y patógenos es la aplicación de bacterias lácticas (BL), que han demostrado en estudios realizados por Tejerina et al. (2020), reducir la infección generada por estas enfermedades.

Las BL pueden ser consideradas probióticas, siempre que cumplan funciones específicas entre las que se encuentran: llegar viables al intestino, resistir a la acidez y a las sales biliares, no ser patógenos, producir sustancias antimicrobianas entre otras pruebas (Shehata et al., 2016). Estas BL pueden proceder del propio intestino o de productos derivados de la colmena (Iorizzo et al., 2022). En este contexto el polen conservado que es un producto que se encuentra en las celdas de las colmenas, elaborado por las abejas a partir de la mezcla del polen, néctar y enzimas salivales, desencadena un proceso de fermentación, que convierte al polen conservado en un nicho ecológico ideal para el desarrollo de bacterias lácticas (Kieliszek et al., 2018).

En el presente estudio se aisló tres cepas autóctonas a partir de polen conservado (*Apilactibacillus kunkeei* LSJ anteriormente denominada *Lactobacillus kunkeei* LSJ, *Lactobacillus helsingborgensis* LSAI y *Lactobacillus melliventris* LSAM) que demostraron ser potenciales probióticos para *A. mellifera* (Cabana et al., 2021).

El objetivo de esta investigación fue evaluar la influencia de bacterias obtenidas del polen conservado, *A. kunkeei* (LSJ), *L. helsingborgensis*

(LSAI) y *L. melliventris* (LSAM) sobre la incidencia del ectoparásito *V. destructor* y del patógeno *N. spp.* de *A. mellifera* del Valle de Jujuy (Argentina).

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo trabajó con abejas de la especie (*A. mellifera* L.), en colmenas donde se seleccionaron 12 de ellas con sus respectivas reinas. Las colmenas utilizadas pertenecieron al apiario del Laboratorio de Sanidad Apícola y Meliponícola de la Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Jujuy, situado en la Finca Experimental "Dr. Emilio Navea" de dicha facultad, en el departamento El Carmen (24°19'58,60" S, 65°14'2,6" O), provincia de Jujuy, Argentina. Se asignaron tres colmenas para cada tratamiento con bacterias lácticas, con su respectivo grupo control. Las colmenas se instalaron en un terreno plano, procurando que las condiciones del lugar fueran lo más homogéneas posible. Los tratamientos y sus controles se dispusieron en hileras paralelas, separadas entre sí por 1,5 m. Cada colmena estuvo compuesta por 10 cuadros; ninguna de las colmenas, tanto las del tratamiento como las del control, recibió durante los meses de la realización de los ensayos tratamiento químico para disminuir *V. destructor* y *N. spp.*

Cepas de lácticas

Las cepas *A. kunkeei* LSAJ (número de acceso en GenBank MF435935), *L. helsingborgensis* LSAI (número de acceso en GenBank MF435934), y *L. melliventris* LSAM (número de acceso en el GenBank MF435936), se aislaron del polen conservado y se caracterizaron como potenciales probióticos para *A. mellifera*, según lo descrito por Cabana et al. (2021). Estas cepas se conservaron a -20 °C en caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) con un 20% de glicerina y se guardaron en el laboratorio (Laboratorio de Sanidad Apícola y Meliponícola) de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Jujuy (Jujuy, Argentina).

Activación de la cepa y viabilidad

Para la activación de las cepas, el caldo almacenado a -20 °C se dejó a temperatura ambiente durante 1 h. Se sembraron 100 µL de cada bacteria con una concentración de 10¹⁰ UFC mL⁻¹ en 5 mL de caldo MRS, obteniéndose una concentración final de 1 × 10⁸ UFC mL⁻¹ tras la incubación a 37 °C durante 24 h, en condiciones de microaerofilia.

Para evaluar la viabilidad y concentración de las bacterias, se inocularon 100 µL de 1 × 10⁸ UFC mL⁻¹ de una suspensión de cada cepa procedentes de los cultivos previamente activos en medio agar MRS, y se incubaron en condiciones de

microaerofilia durante 24 h. Transcurridas 24 h, se contabilizó el número de colonias, para comprobar la concentración y la viabilidad de las bacterias, este procedimiento se repitió una vez para confirmar los resultados.

Administración de las cepas bacterianas en las colmenas de ensayo

Se prepararon jarabes de sacarosa disolviendo 125 g de azúcar en 1 L de agua, en los cuales se suspendió cada bacteria láctica con una concentración de 1 × 10⁸ UFC mL⁻¹. El jarabe conjuntamente con la bacteria fue colocado en alimentadores tipo Doolittle, para que las abejas lo consumieran (Audisio y Benítez, 2011).

Se seleccionaron tres colmenas para cada tratamiento con *A. kunkeei*, *L. helsingborgensis* y *L. melliventris*. Posteriormente se eligieron tres colmenas como grupo control para cada tratamiento, las cuales recibieron únicamente jarabe de sacarosa sin la bacteria. La administración de bacterias se realizó una vez al mes, durante un período de 11 meses (febrero-diciembre), durante 2023.

Incidencia de *Varroa destructor* en colmenas de ensayo

La incidencia de *V. destructor* se determinó un mes antes de la aplicación de las bacterias y durante la administración mensual de las mismas. Se empleó el método de muestreo en frasco (De Jong, 1982), que consistió en recolectar aproximadamente 300 abejas nodrizas de cuadros con cría de las colmenas, depositándolas en un recipiente con 200 mL de agua y 100 mL de alcohol.

Las muestras que aproximadamente eran 300 abejas se llevaron al laboratorio para cuantificar el número de abejas y determinar el porcentaje de infestación de las colmenas.

Se aplicó la fórmula [ácaros / abejas] × 100 = porcentaje de parasitismo. Los porcentajes superiores al 1% se consideraron niveles elevados de parasitismo.

Incidencia de *Nosema spp.* en colmenas de ensayo

La incidencia de *N. spp.* se registró un mes antes de la aplicación de las bacterias y después de su administración mensual, utilizando las abejas recogidas en el apartado anterior, recolectadas en recipientes con 200 mL de agua y 100 mL de alcohol. El número de esporas/abejas se determinó según la técnica de Cantwell (1970), utilizando la cámara de Neubauer para contar el número de esporas. Dicha técnica consistió en separar 60 abdómenes de abejas y macerarlos con 60 mL de agua, posteriormente se agitó la muestra y se

colocó una alícuota en la cámara de Neubauer, para contabilizar las esporas en el microscopio.

Para definir el nivel de infestación se utilizó la clasificación propuesta por Jaycox (1990) (Molina et al., 1990): valores comprendidos entre 10^4 y 10^6 (esporas/abejas) se asociaron a un índice de infección muy leve, entre 10^6 y 5×10^6 (esporas/abejas) a un índice leve, entre 5×10^6 y 10^7 (esporas/abejas) a un índice moderado, entre 10^7 y 2×10^7 (esporas/abejas) a un índice semifuerte, y superiores a 2×10^7 (esporas/abejas) a un índice fuerte. Se evaluó el efecto total y mensual de las bacterias sobre *N. spp.*

Análisis estadístico

Para analizar los datos de *V. destructor* y *N. spp.* se utilizó el programa estadístico INFOSTAT (2023), y los datos se presentan como media \pm desviación estándar. Se aplicó ANOVA con un diseño de bloques completamente aleatorizados (DBA). Para una mejor comprensión de los datos, se utilizó la prueba de Tukey (Di Rienzo et al., 2008).

RESULTADOS

Incidencia de *Varroa destructor* en colmenas de ensayo

En lo que respecta a este ensayo con la aplicación de las tres bacterias durante 11

meses, se registraron los porcentajes totales de infestación de *V. destructor* en colmenas testigos y colmenas que recibieron los tratamientos (Tabla 1).

Con relación al análisis estadístico del efecto de las bacterias lácticas en los 11 meses de aplicación, registraron diferencia significativa entre los tratamientos con respecto a los grupos controles con ($p < 0,0001$), reduciendo los índices de infestación del ácaro a un 100%. (Tabla 2).

Mientras que el test de Tukey no señaló diferencia significativa entre los tres tratamientos con las bacterias (Fig. 1).

Sin embargo, al efectuarse el análisis de la interacción de las bacterias por cada mes de aplicación, se reportó diferencia significativa entre las bacterias con un $p < 0,0001$ (Tabla 3). Mientras que el análisis de las medias indicó diferencia entre *L. melliventris* con *A. kunkeei* y *L. helsingborgensis*, respecto al Control (Tabla 4).

L. melliventris logró reducir un 100% la infestación de *V. destructor* al tercer mes de aplicación, mientras que *A. kunkeei* y *L. helsingborgensis* controlaron al ectoparásito en el primer mes de administración (Fig. 2).

Las cepas *A. kunkeei* y *L. helsingborgensis* mostraron el mejor efecto de rendimiento, disminuyendo el porcentaje la infestación en un 100% en su primera aplicación, mientras que *L. melliventris* lo hizo en un 90%.

Tabla 1. Porcentaje de infestación de *V. destructor* antes y después de la aplicación de las bacterias lácticas en las colmenas, en un período de 11 meses.

Table 1. Percentage of *V. destructor* infestation before and after the application of lactic acid bacteria in the experimental hives over an 11-month period.

Colmenas	Porcentaje (%) de <i>V. destructor</i> antes de la aplicación de los lactobacilos	Porcentaje (%) de <i>V. destructor</i> después de la aplicación de los lactobacilos	Niveles de parasitismos (%)
Testigo	8,6 \pm 0,4	8,3 \pm 0,6	> 1% (elevado)
<i>A. kunkeei</i>	8,2 \pm 0,5	0	Nulo
<i>L. helsingborgensis</i>	8,4 \pm 0,2	0	Nulo
<i>L. melliventris</i>	8,3 \pm 0,3	0,8 \pm 0,2	< 1 % (bajo)

Tabla 2. Resultados del ANOVA para el efecto de bacterias lácticas sobre *V. destructor* durante un período de 11 meses.

Table 2. ANOVA results for the effect of lactic acid bacteria on *V. destructor* over an 11-month period.

F.V.	SC	gl	CM	F	P-valor
Modelo	1542,10	12	128,76	1521,23	< 0,0001
Tratamiento	1542,32	3	514,11	6073,97	< 0,0001
Mes	2,79	9	0,31	3,66	0,0005
Error	9,06	107	0,08		
Total	1554,16	119			

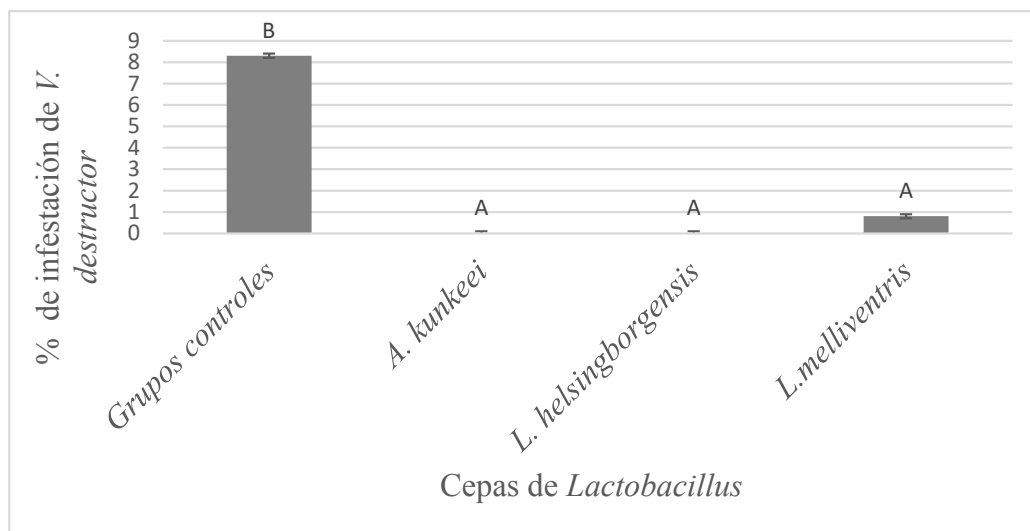


Fig. 1. Tratamientos con bacterias lácticas y su influencia en la infestación con *V. destructor*. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Fig. 1. Treatments with lactic bacteria and their influence on *V. destructor* infestation. Means followed by the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Tabla 3. Resultados del ANOVA para el efecto de las bacterias lácticas sobre *V. destructor* por cada mes de aplicación.

Table 3. ANOVA results for the effect of lactic acid bacteria on *V. destructor* for each month of application.

F.V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1553,64	39	39,84	6186,67	< 0,0001
Tratamiento	1542,32	3	514,11	79840,36	< 0,0001
Mes	2,79	9	0,31	48,07	< 0,0001
Tratam. *mes	8,54	27	0,32	49,13	< 0,0001
Error	0,52	80	0,01		
Total	1554,16	119			

Tabla 4. Resultados del test de Tukey entre los diferentes tratamientos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Table 4. Results of the Tukey test comparing the different treatments. Means followed by the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Tratamientos	medias	n	E.E	
<i>L. kunkeei</i>	0,00	30	0,01	A
<i>L. helsingborgensis</i>	0,00	30	0,01	A
<i>L. melliventris</i>	0,08	30	0,01	B
Control	8,31	30	0,01	C

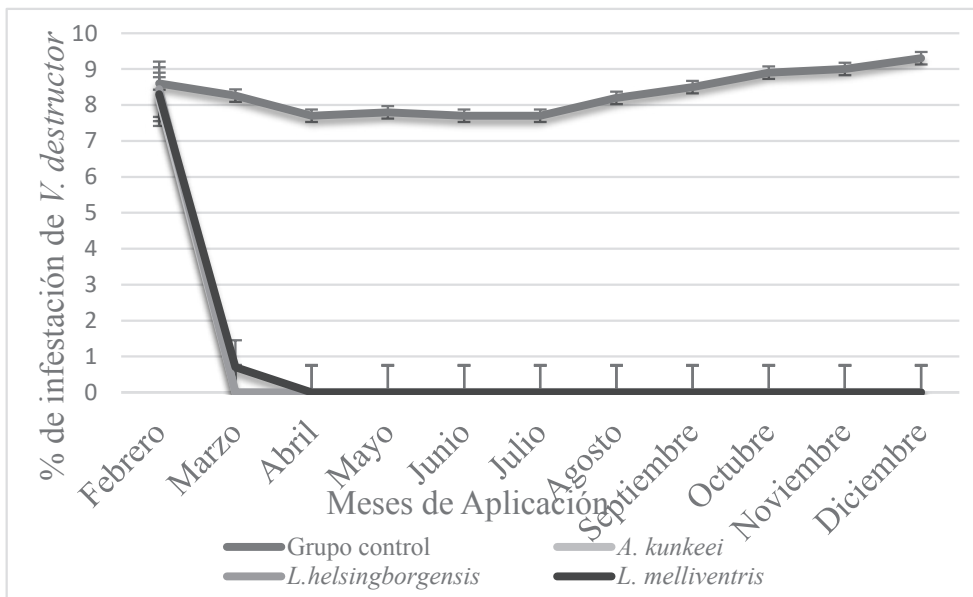


Fig. 2. Porcentaje de infestación de *V. destructor* por cada mes de aplicación de las bacterias lácticas.
Fig. 2. Percentage of *V. destructor* infestation for each month of application of lactic acid bacteria.

Incidencia de *Nosema* spp. en colmenas de ensayo

Con respecto a *N. spp.*, se registraron los valores promedios con su desviación estándar antes y después de la aplicación de las cepas lácticas, comparando los valores obtenidos según la tabla de Jaycox (1990) (Tabla 5).

El análisis estadístico del efecto de las cepas lácticas sobre la incidencia de *N. spp.* en relación a los controles señalaron diferencia significativa con un $p < 0,0001$ (Tabla 6).

El análisis de las medias indicó diferencia significativa entre los ensayos realizados con *A. kunkeei*, *L. helsingborgensis* y *L. melliventris*, disminuyendo los índices de *N. spp.*, presentando mejor efecto *A. kunkeei*, seguido por *L. helsingborgensis* y *L. melliventris* (Fig. 3).

Con relación a la aplicación de las bacterias lácticas en cada mes, se manifestaron diferencias significativas entre las aplicaciones mensuales de cada bacteria con un p valor 0,0005 (Tabla 6).

Mientras que el análisis de las medias indicó que el mejor efecto sobre *N. spp.* lo presentó *A. kunkeei*, seguido por *L. helsingborgensis* y *L. melliventris* (Tabla 7).

En el primer mes de aplicación la colmena control de *A. kunkeei* registraron un promedio de 1.430.000 (esporas/abejas), mientras que las colmenas tratamiento un promedio de 17.600 (esporas/abejas), reduciendo más del 90% la infección. En lo que respecta a *L. melliventris* el

control obtuvo un promedio de 1.650.000 (esporas/abejas) y las colmenas tratamiento 1.410.000 (esporas/abejas), disminuyendo la enfermedad en un 14%. Mientras que *L. helsingborgensis* reportó un promedio de colmenas control de 1.760.000 (esporas/abejas) y el tratamiento 1.270.000 (esporas/abejas), reduciendo un 28% el microsporidio. La administración en los meses siguientes a partir del tercer mes para *L. helsingborgensis* demostró una disminución del 50%, mientras que *L. melliventris* un 26% y *A. kunkeei* un 94% de (esporas/abejas). En el transcurso de los meses siguientes de suministro de las bacterias la infección fue reduciendo de forma progresiva, manteniendo posteriormente valores constantes para las tres cepas lácticas (Fig. 4).

El efecto en todos los meses de tratamiento indicó que *A. kunkeei* redujo un 97% las esporas de *Nosema*, mientras que *L. helsingborgensis* un 75% y *L. melliventris* un 45%.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de la aplicación *in vivo* en colmenas con bacterias del pan de polen potencialmente probióticas (*L. helsingborgensis*, *L. melliventris*, *A. kunkeei*), demostraron una reducción significativa de *V. destructor* y *N. spp.* El análisis de la incidencia sobre el ectoparásito a partir de la aplicación de los lactobacilos evidenció

Tabla 5. Niveles de infección de *N. spp.* antes de la administración y después de la aplicación de los lactobacilos con relación a la tabla de Jaycox (1990), en un periodo de 11 meses.

Table 5. Infection levels of *N. spp.* before and after administration of lactobacilli in relation to the table of Jaycox (1990) over an 11-month period.

Colmenas	Infección de <i>N. spp.</i> antes de la aplicación de las bacterias lácticas (esporas/abejas)	Infección de <i>N. spp.</i> después de la aplicación de las bacterias lácticas (esporas/abejas)	Índice de infección de Jaycox
Testigo	1.600.000 ± 8.660	1.748.600 ± 78.570	Leve
<i>A. kunkeei</i>	1.430.000 ± 323.573	51.266 ± 68.723	Muy leve
<i>L.helsingborgensis</i>	1.633.333 ± 152.752	413.225 ± 397.877	Muy leve
<i>L. melliventris</i>	1.760.000 ± 52.915	888.965 ± 324.344	Muy leve

Tabla 6. Resultados del ANOVA para el efecto de bacterias lácticas sobre *N. spp.* durante un periodo de 11 meses.

Table 6. ANOVA results for the effect of lactic acid bacteria on *N. spp.* over an 11-month period.

F. V	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	55338834640625,00	13	4256833433894,23	41,93	< 0,0001
Tratamiento	41988332220170,40	3	13996110740056,80	137,87	< 0,0001
Mes	13350502420454,50	10	133505242945,45	13,15	< 0,0001
Error	16445136232964,60	162	101513186623,18		
Total	71783970873579,60	175			

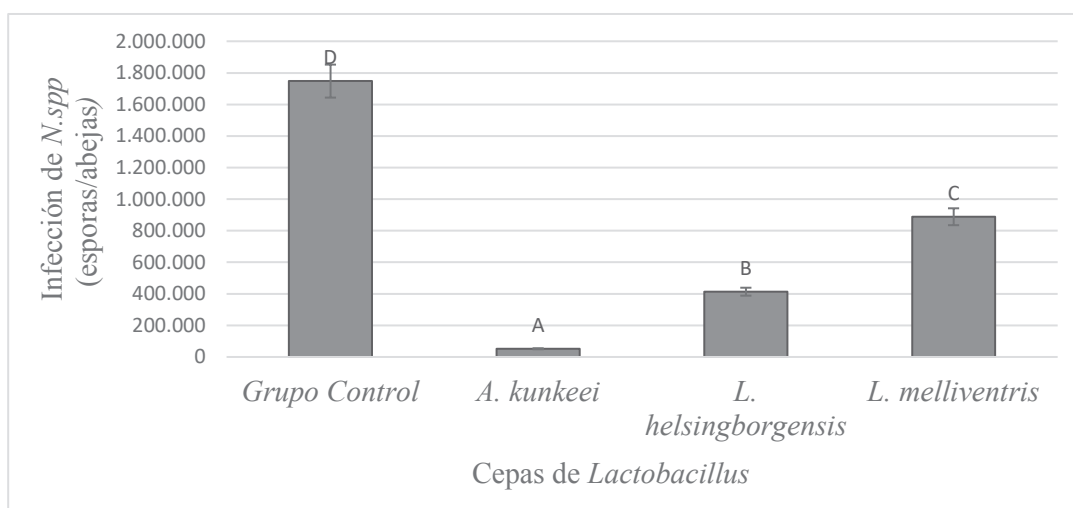


Fig. 3. Efecto de *A. kunkeei*, *L. helsingborgensis*, *L. melliventris* sobre *N. spp.* Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Fig. 3. Effect of *A. kunkeei*, *L. helsingborgensis*, *L. melliventris* on *N. spp.* Means followed by the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

la eficacia de las tres bacterias, en términos de disminución de la viabilidad del ácaro.

Sander (2016), señala que, aunque aún no es claro el mecanismo de acción de las bacterias lácticas sobre el parásito, su efecto

está relacionado a la producción de metabolitos secundarios que evitan el desarrollo de los patógenos, la competitividad por los nutrientes o la estimulación del sistema inmunológico. Los resultados de la presente investigación sugieren

Tabla 6. Resultados del ANOVA para el efecto de las bacterias lácticas sobre *N. spp* por cada mes.
Table 6. ANOVA results for the effect of lactic acid bacteria on *N. spp* for each month.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	61054310311079,50	43	1419867681653,01	17,47	< 0,0001
Tratamiento	41988332220170,40	3	13996110740056,80	172,19	< 0,0001
Mes	13350502420454,50	10	1335050242045,45	16,42	< 0,0001
Tratam* mes	5715475670454,54	30	190515855681,82	2,34	0,0005
Error	10729660562500,10	132	81285307291,67		
Total	71783970873579,60	175			

Tabla 7. Resultados del test de Tukey entre los diferentes tratamientos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).
Table 7. Results of the Tukey test comparing the different treatments. Means followed by the same letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Tratamiento	Media	n	E.E	
<i>L. kunkeei</i>	182545,45	44	42981,31	A
<i>L. helsingborgensis</i>	632045,45	44	42981,31	B
<i>L. melliventris</i>	982727,27	44	42981,31	C
Control	1517443,18	44	42981,31	D

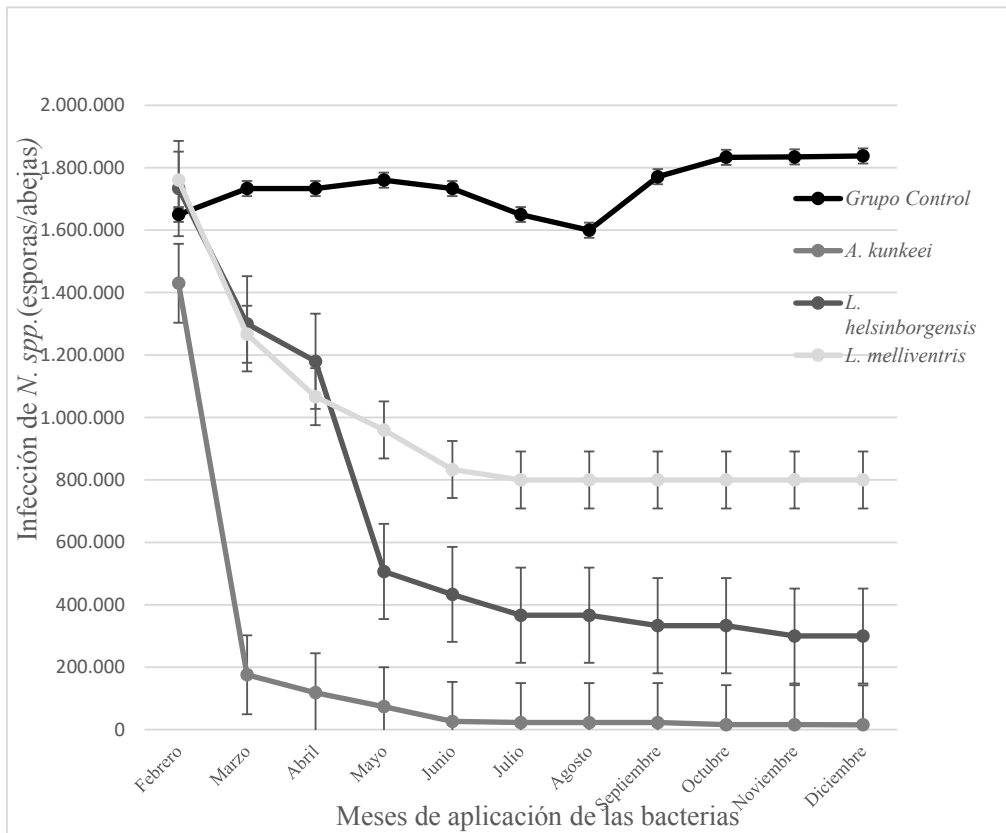


Fig 4. Efecto de la aplicación mensual de las bacterias lácticas sobre *N. spp*.
Fig 4. Effect of the monthly application of lactic acid bacteria on *N. spp*.

que estas bacterias mejorarían la modulación de la microbiota intestinal de las melíferas y contribuirían a mantener una microbiota sana y resistente frente a los efectos que produce este parásito. Esto concuerda con lo expuesto por Marche et al. (2019), quienes afirmaron que *V. destructor* afecta la microbiota intestinal de las abejas obreras, a partir de la disminución de *Lactobacillus* spp, produciendo disbiosis intestinal, lo cual genera que las abejas encuentren vulnerabilidad frente a cualquier patógeno.

En cuanto a los efectos de la aplicación mensual de *L. helsingborgensis* y *A. kunkeei*, reportaron una disminución inmediata de *V. destructor*, mientras que *L. melliventris* disminuyó el ácaro progresivamente. Estos efectos sobre la viabilidad del parásito por parte de los lactobacilos están probablemente relacionados a que la actividad de las bacterias depende de la cantidad o del tipo de metabolitos secundarios que cada una de ellas produce. Esto se vincula con lo expresado por García Vicente et al. (2024), quienes en sus ensayos realizados con postbióticos, expresaron que los diferentes accionar de las bacterias lácticas sobre *V. destructor* dependen del tiempo de exposición o de la cantidad de dosis aplicada.

Ramsey et al. (2019), mencionan que el ciclo de *V. destructor* se relaciona con el desarrollo de las abejas, cuya fase de reproducción del ácaro se efectúa en las celdas de las crías de las abejas melíferas; por lo que en primavera y fundamentalmente en otoño se reporta una elevada densidad del ectoparásito, mientras que en invierno se reduce el número de crías de abejas y por lo tanto también el del ácaro. Con relación a los períodos de mayor producción del parásito, los presentes ensayos, registraron que durante los meses de administración de los lactobacilos la población de *V. destructor* se mantuvo ausente, lo que indicaría que estas cepas bacterianas tuvieron un efecto protector sobre las abejas en todos los períodos de aplicación.

En lo que respecta al accionar sobre *N. spp.*, las tres cepas lácticas redujeron la infección del microsporidio a un nivel bajo, por lo que los lactobacilos empleados en este ensayo producirían compuestos bioactivos que inhibirían el desarrollo del patógeno o generarían un efecto de biofilm en la microbiota intestinal, evitando la colonización del mismo. Estos resultados se relacionan a lo enunciado por El Khoury et al. (2018), quienes señalaron que las bacterias lácticas controlan *N. spp.*, debido a que producen moléculas antimicrobianas, como por ejemplo bacteriocinas, antibióticos, peróxido de hidrógeno.

En cuanto a la aplicación en forma mensual se registró que *L. melliventris* y *L. helsingborgensis* disminuyeron *N. spp.* de manera gradual,

alcanzando su máxima eficacia en el tercer mes de la administración, mientras que *A. kunkeei* en su primera aplicación provocó un rápido descenso de la infección. Según la investigación efectuada por Huang y Evans (2020) *N. spp.* altera la microbiota intestinal, perturbando así la digestión de los alimentos y la absorción de nutrientes, por lo que el efecto tardío de las bacterias puede deberse al proceso de ajuste en el intestino.

Además, Ye et al. (2021) afirman que las abejas que presentan mayor cantidad de *Lactobacillus* en su microbiota intestinal son capaces de evitar la prevalencia de enfermedades como *Ascospheara apis*, y de reducir *Nosema*. Por lo que, en este ensayo, el accionar rápida o gradual observado entre las bacterias sobre el patógeno podría relacionarse a que *L. melliventris* y *L. helsingborgensis* tienen un proceso de adaptación tardío en la microbiota intestinal, o bien, la concentración bacteriana aplicada en los ensayos *in vivo* sería insuficiente para inhibir rápidamente a los patógenos.

En los últimos reportes relacionados a la provincia de Jujuy, se aplicaron *L. salivarius* A3iob en colmenas jujeñas durante cinco meses, cuyos resultados redujeron los niveles de *N. spp* y de *V. destructor* en un 50 -80% (Tejerina et al., 2020). Por otra parte, el estudio preliminar de *A. kunkeei* y *L. helsingborgensis* realizado por Jose et al. (2024), en tres meses, indicaron la disminución *Varroa* en un 100%, y de un 70 y 50% *N. spp.* para las respectivas bacterias.

Al observar los datos obtenidos en este ensayo, *A. kunkeei*, *L. helsingborgensis* y *L. melliventris*, disminuyeron en su totalidad al ácaro, mientras que para *N. spp.* *A. kunkeei* logró reducir más de un 90%, seguido por *L. helsingborgensis* con 70%, y en menor efecto *L. melliventris*, por lo que estos resultados indicarían que la administración prolongada de las bacterias incrementaría su efecto sobre el patógeno.

Los lactobacilos empleados en esta investigación, cepas autóctonas, aplicadas en colmenas de la misma provincia, ejercieron un efecto biocontrolador y protector contra *V. destructor* y *N. spp.*, confirmando lo enunciado de Hernández Figueroa et al. (2024) quienes exponen que es importante que un agente biocontrolador pertenezca a la región en que se pretende aplicar.

En estos estudios, *A. kunkeei* en comparación con *L. helsingborgensis* y *L. melliventris* fue la que generó un efecto significativo e inmediato sobre la reducción de la viabilidad *V. destructor* y *N. spp.*, por lo que esta cepa podría considerarse como una alternativa prometedora para prevenir y biocontrolar las enfermedades que afectan a las abejas, modulando la microbiota intestinal y mejorando la salud de las mismas.

Esta investigación aporta nuevos conocimientos sobre los efectos que generaron tres cepas autóctonas, en enfermedades que se encuentran presente en la provincia de Jujuy. En la que *A. kunkeei* demostró ser una cepa con beneficios para la salud de las abejas.

Sin embargo, se debe destacar el efecto de *L. helsingborgensis* y *L. melliventris* sobre *V. destructor* y *N. spp.*, las cuales podrían ser consideradas para evaluar su impacto en otro sector apícola como por ejemplo aumento de producción de miel, control de otros patógenos, etc., buscando fortalecer el sistema inmunológico, mejorar su digestión y protegerlas contra enfermedades y parásito.

CONCLUSIÓN

Las cepas *A. kunkeei*, *L. helsingborgensis* y *L. melliventris*, aisladas del pan de polen, mostraron efectos prometedoros en la reducción de *V. destructor* y *N. spp.* en colmenas de *A. mellifera*. Entre ellas, *A. kunkeei* demostró mayor eficacia para el control de estas enfermedades.

LITERATURA CITADA

- Antúñez, K., R. Martín-Hernández, L. Prieto, A. Meana, P. Zunino, and M. Higes. 2009. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (*Microsporidia*). *Environmental Microbiology* 11:2284-2290. [https://doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01953.x)
- Audisio, M, and M. Benitez-Ahrendts. 2011. *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. *Beneficial Microbes* 2 (1):29–34. [https://doi:10.3920/BM2010.0024](https://doi.org/10.3920/BM2010.0024)
- Cabana, M., M. Tejerina, J. Jose, R. Castro, y M. Benitez-Ahrendts. 2021. Potencial probiótico de bacterias aisladas de pan de polen para mejorar la producción y sanidad de *Apis mellifera*. *Idesia (Arica)* 39(1) 45-51. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292021000100045>
- Cantwell, G. 1970. Standard methods for counting nosema spores. *Am. Bee J.* 110:222–223. [https://doi:10.3896/IBRA.1.52.1.14](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14)
- Cilia, G., C. Garrido, M. Bonetto, D. Tesoriero, and A. Nanetti. 2020. Effect of Api-Bioxal and ApiHerb Treatments against *Nosema ceranae* Infection in *Apis mellifera* investigated by two qPCR Methods. *Vet. Sci.* 7 (3):125. [https://doi:10.3390/vetsci7030125](https://doi.org/10.3390/vetsci7030125)
- De Jong, D., D. De Andrea Roma, and L. Goncalves. 1982. A comparative analysis of shaking solutions for the detection of *Varroa jacobsoni* on adult honeybees. *Apidologie* 13 (3):297–306. <https://doi.org/10.1051/apido:19820308>
- Di Rienzo, J., F. Casanoves, M. Balzanini, and L. González. 2008. Grupo Infostat, versión 2008, FCA, Univ. Nacional de Córdoba, Argentina. Primera edición. Editorial Brujas Argentina. https://www.researchgate.net/publication/283491340_Infostat_manual_del_usuario
- El-Khoury, S., A. Rousseau, A. Lecoœur, B. Cheaib, S. Bouslama, P. Mercier, V. Demey, M. Castex, P. Giovenazzo, and N. Derome. 2018. Deleterious interaction between honeybees (*Apis mellifera*) and its microsporidian intracellular parasite *Nosema ceranae* was mitigated by administering either endogenous or allochthonous gut microbiota strains. *Front. Ecol. Evol.* 6:58. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00058>
- García-Vicente, E., M. B. Murcia, M. Martín, I. Rey-Casero, A. Pérez, M. González, J. Alonso, and D. Risco. 2024. Evaluation of the potential effect of postbiotics obtained from honey bees against *Varroa destructor* and their combination with other organic products. *Insects* 15 (1):67. <https://doi.org/10.3390/insects15010067>
- Hernández-Figueroa, R., J. Morales Camacho, E. Mani-López, and A. López-Malo. 2024. Assessment of antifungal activity of aqueous extracts and protein fractions from sourdough fermented by *Lactiplantibacillus plantarum*. *Future Foods* 9:100314. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100314>
- Huang, Q., and J. Evans. 2020. Targeting the honey bee gut parasite *Nosema ceranae* with siRNA positively affects gut bacteria. *BMC Microbiol.* 20 (1):258. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01939-9>
- Iorizzo, M., S. Ganassi, G. Albanese, F. Letizia, B. Testa, C. Tedino, S. Petrarca, F. Mutinelli, A. Mazzeo, and A. De Cristofaro. 2022. Antimicrobial activity from putative probiotic lactic acid bacteria for the biological control of American and European Foulbrood Diseases. *Vet. Sci.* 9: 236. <https://doi.org/10.3390/vetsci9050236>
- Jose, J., M. Cabana, y M. Benitez-Ahrendts. 2024. Estudio preliminar *in vivo* del efecto de *Apilactobacillus kunkeei* (LSAJ) y *Lactobacillus helsingborgensis* (LSAI) sobre patógenos y parásitos de *Apis mellifera*. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNju* 17 (2):7-15. ISSN 2362-4035

- Kaskinova, M., Gaifullina, L., Saltykova, E., A. Poskryakov, and A. Nikolenko. 2020. Genetic markers for the resistance of honey bee to *Varroa destructor*. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektzii*. Dec. 24 (8):853-860. [https://doi: 10.18699/VJ20.683](https://doi.org/10.18699/VJ20.683)
- Kieliszek, M., K. Piwowarek, A. Kot, S. Błażejak, and I. Chlebowska-Śmigiel. 2018. Pollen and bee bread as new health- oriented products: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 71:170–180. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.021>
- Marche, M., A. Satta, I. Floris, M. Pusceddu, F. Buffa, and L. Ruiu. 2019. Quantitative Variation in the Core Bacterial Community Associated with Honey Bees from *Varroa*-Infested Colonies. *J. Apic. Res.* 58:444–454. <https://doi:10.1080/00218839.2019.1589669>
- Moharrami, M., N. Mojgani, M. Bagheri, and S. Toutiaee. 2022. Role of honey bee gut microbiota in the control of American Foulbrood and European Foulbrood Diseases. *Archives of Razi Institute* 77(4):1331. <https://doi: 10.22092/ARI.2022.358073.2146>
- Molina, A., E. Guzmán-Nova, D. Message, D. De Jong, D. Pesante, C. Mantilla-Cortés, A. Zozaya-Rubio, E. Jaycox, F. Alvarado-Viquez, S. Handal-Canahuati, and L. Meneses. 1990. Enfermedades y plagas de la abeja melífera occidental. Publicado por el organismo internacional regional de sanidad agropecuaria. OIRSA-BID. El Salvador.
- Ramsey, D., R. Ochoa, G. Bauchan, J. Gulbranson, A. Mowery, D. Cohen, D. Lim, J. Joklik, J. Cicero, J. Ellis, D. Hawthorne, and D. vanEngelsdorp. 2019. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *PNAS* January 116 (5):1792–1801. <https://doi: 10.1073/pnas.1818371116>
- Rouzé, R., A. Moné, and F. Delbac. 2019. The honeybee gut microbiota is altered after chronic exposure to different families of insecticides and infection by *Nosema ceranae*. *Microbes Environ.* 34:226–233. <https://doi:10.1264/jsme2.ME18169>
- Sanders, M. 2016. Probiotics and Microbiota Composition. *BMC Med*, 14: 82. <https://doi: 10.1186/s12916-016-0629-z>.
- Shehata, M., S. El-Sohaimy, M. El-Sahn, and M. Youssef. 2016. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences* 61(1):65-75. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2016.03.001>
- Tauber, J., V. Nguyen, D. Lopez, and J. Evans. 2019. Effects of a resident yeast from the honeybee gut on immunity, microbiota, and nosema disease. *Insects* 10 (9): 296. <https://doi.org/10.3390/insects10090296>
- Tejerina, M., M. Benítez-Ahrendts, and M. Audisio. 2020. *Lactobacillus salivarius* A3iob reduces the incidence of *Varroa destructor* and *Nosema* spp. in commercial apiaries located in the northwest of Argentina. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 12:1360-1369. <https://doi: 10.1007/s12602-020-09638-7>
- Tejerina, M., M. Cabana y M. Benítez-Ahrendts. 2022. Incidencia de factores ambientales sobre la prevalencia de *Varroa* spp. y *Nosema* spp. en zonas fitogeográficas de la provincia de Jujuy, Argentina. *Idesia Arica* 40(2):103-112. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292022000200103>
- Ye, M., S. Fan, X. Li, I. Tarequl, C. Yan, W. Wei, S. Yang, and B. Zhou. 2021. Microbiota dysbiosis in honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae infected with brood diseases and foraging bees exposed to agrochemicals. *R. Soc. Open Sci.* 8:201805. <https://doi: 10.1098/rsos.201805>.

