

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



CONSORCIOS BACTERIANOS PROVENIENTES DE ABEJAS MELÍFERAS
PARA EL CONTROL DE DWV Y *Nosema ceranae*

POR

KARLA ANDREA CUEVAS GARRIDO

MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.

CHILLÁN – CHILE
2025

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**CONSORCIOS BACTERIANOS PROVENIENTES DE ABEJAS MELÍFERAS
PARA EL CONTROL DE DWV Y *Nosema ceranae***

POR

KARLA ANDREA CUEVAS GARRIDO

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE
2025**

Aprobada por:

Profesor Asistente, Marisol Vargas C.
Ing. Agrónoma, Dr.

Guía

Profesor Asociado, Macarena Gerding G.
Ing. Agrónomo, Ph. D.

Asesor

Asesor externo, Nolberto Arismendi S.
Ing. Agrónomo, Mg. Cs., Dr.
Universidad Santo Tomás

Asesor

Profesor Asociado Guillermo Wells M.
Ing. Agrónomo, Mg. Cs.

Decano

RECONOCIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto FIA, PYT 2017 - 0241, de nombre: “Desarrollo de un bioestimulante probiótico para potenciar el mecanismo de defensa de *Apis mellifera* frente a los patógenos DWV y *Nosema ceranae* y su adaptación al cambio climático”.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen	1
Summary	1
Introducción	2
Materiales y Métodos	5
Resultados y Discusión	9
Conclusiones	24
Referencias	24

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		Página
Figura 1	Sobrevivencia de abejas tratadas con Consorcio 3 y co-infectadas con <i>Nosema ceranae</i> y DWV en ensayos biológicos en condiciones controladas.....	11
Figura 2	Sobrevivencia de abejas tratadas con Consorcio 6 y co-infectadas con <i>Nosema ceranae</i> y DWV en ensayos biológicos en condiciones controladas.....	12
Figura 3	Sobrevivencia de abejas tratadas con Consorcio 11 y co-infectadas con <i>Nosema ceranae</i> y DWV en ensayos biológicos en condiciones controladas.....	13
Figura 4	Carga relativa de <i>Nosema ceranae</i> del período total de evaluación de los ensayos en abejas tratadas con un consorcio de lactobacterias y co-infectadas con el virus de las alas deformadas (DWV).....	14
Figura 5	Carga relativa de <i>Nosema ceranae</i> en abejas tratadas con consorcio 6 de lactobacterias y co-infectadas con DWV evaluados a los 5, 10 y 15 días post-infección en condiciones controladas.....	15
Figura 6	Carga relativa del virus de las alas deformadas (DWV) del período total de evaluación de los ensayos en abejas tratadas con consorcio 6 de lactobacterias y co-infectadas con <i>Nosema ceranae</i>	17
Figura 7	Carga relativa del virus de las alas deformadas (DWV) en abejas tratadas con consorcio 6 de lactobacterias y co-infectadas con DWV y <i>Nosema ceranae</i> , evaluados a los 5, 10 y 15 días post-infección en condiciones controladas.....	18
Figura 8	Expresión relativa de abaecina a los 5, 10 y 15 días post-infección en abejas tratadas con consorcio 6 e infectadas con <i>Nosema ceranae</i> , DWV y co-infectadas con ambos patógenos.....	19
Figura 9	Expresión relativa de defensina a los 5, 10 y 15 días post-infección en abejas tratadas con Consorcio 6 e infectadas	20

	con <i>Nosema ceranae</i> , DWV y co-infectadas con ambos patógenos.....	
Tabla 1	Cepas de lactobacterias en cada consorcio	6

CONSORCIOS BACTERIANOS PROVENIENTES DE ABEJAS MELÍFERAS PARA EL CONTROL DE DWV Y *Nosema ceranae*

BACTERIAL CONSORTIA FROM HONEY BEES FOR THE CONTROL OF DWV
AND *Nosema ceranae*

Palabras índice adicionales: *Apis mellifera*, bacterias lácticas, *Lactobacillus kunkeei*, *Bifidobacterium asteroides*, *Weissella bombi*.

RESUMEN

El virus de las alas deformadas (DWV) y *Nosema ceranae* son patógenos predominantes en *Apis mellifera*. Estos, debilitan su sistema inmune y alteran la producción de péptidos antimicrobianos. La flora intestinal de la abeja representa un nicho de lactobacterias, las que favorecen al agente hospedante. Dado esto, el objetivo de la presente investigación fue estudiar el uso de consorcios bacterianos provenientes de abejas melíferas para el control de DWV y *Nosema ceranae*. Para esto, tres consorcios conformados por lactobacterias (N°3, 6 y 11), aisladas desde el intestino de *Apis mellifera*, provenientes de las localidades de Los Lagos, Los Ríos – Los Lagos, y Bíobío, respectivamente, fueron suministrados mediante ingesta a las abejas. Se evaluó la supervivencia, carga parasitaria y expresión de péptidos antimicrobianos (AMPs, abaecina y defensina) en abejas infectadas con *N. ceranae*, inoculadas con DWV, co-infectadas con ambos patógenos y en abejas sanas (control). Los resultados muestran que la sobrevivencia de las abejas es dependiente del consorcio y el estado sanitario. El consorcio 6 redujo significativamente la carga de *Nosema ceranae* y DWV, incluso en co-infecciones y aumentó la expresión del péptido defensina en abejas infectadas con *N. ceranae*.

SUMMARY

Deformed wing virus and *Nosema ceranae* are two predominant pathogens in *Apis mellifera* that weaken the bees immune system and hinder the production of antimicrobial peptides. The Honey bee's gut flora constitutes a niche for

lactobacteria, and these microbial populations often benefit the host organism. In this study, three bacterial consortia (N°3, 6 and 11), isolated from *Apis mellifera* specimens collected in Los Lagos, Los Rios – Los Lagos, and Biobío, respectively, were evaluated. Variables such as survival, parasite load, and expression of antimicrobial peptides (AMPs, Abaecin and Defensin) were analyzed in bees infected with *Nosema ceranae*, inoculated with DWV, co-infected with both pathogens, and in healthy (control) bees. The results show that inoculation with bacterial consortia can positively or negatively affect the survival of *Apis mellifera*, depending on the strains used and the bees health status. Consortium 6 significantly reduced the load of *Nosema ceranae* and DWV, even in co-infected bees. No effect was observed on the expression of the abaecin gene, but defensin expression increased in bees infected with *N. ceranae*.

INTRODUCCIÓN

La abeja melífera (*Apis mellifera* L.) es un himenóptero reconocido por la producción de miel, polen, jalea real, propóleo y cera, además de su rol en la polinización (Iwasa *et al.*, 2004). La polinización entomófila es esencial para la diversidad genética vegetal y la agricultura, beneficiando a cerca de 87 de 115 especies cultivadas más relevantes (Klein *et al.*, 2007), cuya demanda sigue en aumento a nivel global (Venturini *et al.*, 2017).

La apicultura se practica mundialmente tanto para la obtención de miel como por su función polinizadora. En 2023, las exportaciones apícolas chilenas alcanzaron USD 17,27 millones FOB, correspondiendo un 97,5 % a mieles naturales y orgánicas (Iturra, 2023). En Chile, la actividad está presente en todas las regiones, destacando Maule, O'Higgins y Metropolitana como las de mayor concentración de colmenas (Boletín apícola, 2024). Según el mismo boletín, existen 11.583 apicultores y 1.533.405 colmenas; en 2023 la miel representó un 98 % de la producción total, seguida por la polinización con un 25,2 %.

Diversos estudios advierten una disminución global de las abejas, atribuida a la intensificación agrícola y la simplificación del paisaje (Kremen y M'Gonigle,

2015; Potts *et al.*, 2010). A ello se suma el Síndrome del Colapso de las Colmenas (CCD, *Colony Collapse Disorder*), descrito en 2007, caracterizado por el despoblamiento masivo de abejas adultas (Cox-Foster *et al.*, 2007). Aunque sus causas no se comprenden completamente, se asocia a varios patógenos, entre ellos *Varroa destructor*, *Nosema ceranae* (Evans y Schwarz, 2011; Genersch, 2010) y el Virus de las Alas Deformadas (DWV) (Reybroeck *et al.*, 2012), este último estrechamente vinculado a *V. destructor* (Martin *et al.*, 2012).

La nosemosis, una de las enfermedades más difundidas a nivel mundial, es causada por los microsporidios intracelulares *Nosema apis* y *Nosema ceranae* (Klee *et al.*, 2007; Sinpoo *et al.*, 2018). Inicialmente, *N. apis* era la única especie que parasitaba a *A. mellifera*, mientras que *N. ceranae* afectaba a *A. cerana*. Sin embargo, Huang *et al.* (2007) detectaron *N. ceranae* en colonias de *A. mellifera* en Taiwán, volviéndose más frecuente que *N. apis* (Klee *et al.*, 2007).

La transmisión ocurre principalmente por vía oral-fecal, cuando abejas sanas ingieren esporas al consumir alimentos contaminados o limpiar material fecal infectado. Estas esporas invaden las células epiteliales del intestino medio mediante un filamento polar que introduce el material infeccioso, generando nuevas esporas (Chen *et al.*, 2008; Reybroeck *et al.*, 2012). Entre los efectos de la infección se encuentran la reducción de la longevidad (Aufauvre *et al.*, 2014), mayor susceptibilidad a otros patógenos e inmunodepresión (Antúnez *et al.*, 2009), daño intestinal y estrés energético (Li *et al.*, 2018), provocando despoblación y colapso de la colonia (Higes *et al.*, 2009). En Chile, *N. ceranae* fue detectada por primera vez en 2009, tras la denuncia de mortalidad de colmenas en Hualqui, Región del Biobío (Fuentealba y Linero, 2010)

Otros patógenos asociados a la disminución de abejas son los virus (Teixeira *et al.*, 2008). El DWV (*Deformed Wing Virus*), de la familia *Iflaviridae*, es uno de los virus más prevalentes en *A. mellifera* y se asocia frecuentemente a colmenas infestadas con *V. destructor*, que actúa como su vector (Carreck *et al.*, 2010). Este virus se ha transformado en el patógeno viral más extendido y peligroso para las colmenas a nivel mundial (Martin y Brettell, 2019). Infecta

larvas, pupas y abejas adultas (Chen *et al.*, 2004), desarrollándose lentamente hasta la etapa adulta (Bailey y Ball, 1991). Puede transmitirse verticalmente (madre a crías) u horizontalmente mediante alimentos contaminados o vectores (Chen *et al.*, 2006). Las abejas enfermas presentan alas deformadas, abdomen corto, coloración alterada, menor capacidad de vuelo y muerte prematura (Yue y Genersch, 2005).

En Chile, Rodríguez *et al.* (2012) reportaron por primera vez la presencia de DWV en apiarios de Curepto (Región del Maule). Posteriormente, Barriga *et al.* (2012) lo detectaron en Valparaíso y Metropolitana, y Vargas *et al.* (2017) confirmaron su presencia entre la Región Metropolitana y La Araucanía.

El tracto gastrointestinal (*GIT, Gastrointestinal Tract*) de las abejas adultas se compone de cuatro compartimentos: buche, intestino medio, íleon y recto (Rangberg *et al.*, 2015). Cada sección posee condiciones particulares que favorecen distintos microorganismos, lo que genera una distribución desigual del microbiota (Martinson *et al.*, 2012).

La microbiota normal de *A. mellifera* incluye bacterias gram positivas, negativas (Moran, 2015), variables (Erlor *et al.*, 2018) y levaduras (Ptaszyńska *et al.*, 2016). Estas participan en la descomposición del polen, degradación de compuestos tóxicos (Engel *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015), síntesis de vitaminas y estimulación del sistema inmune, impidiendo la colonización de patógenos (Dillon y Dillon, 2004).

Entre esta microbiota destacan las bacterias ácido lácticas (LAB, *Lactic Acid Bacteria*), principalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Olofsson y Vásquez, 2008; Moran, 2015), consideradas benéficas por su acción antimicrobiana —asociada a la producción de ácido láctico y bacteriocinas (Vieco-Saiz *et al.*, 2019)—, su capacidad inmunoestimulante mediante la expresión de genes de péptidos antimicrobianos (Evans y López, 2004) y su papel en el metabolismo de carbohidratos y fitoquímicos (Ricigliano *et al.*, 2017). Algunas especies de estos géneros, utilizadas como probióticos, han demostrado reducir la carga de patógenos, aumentar la supervivencia y fortalecer la inmunidad de las abejas (Daisley *et al.*, 2020).

El uso de antibióticos en apicultura altera significativamente la microbiota intestinal, disminuyendo la supervivencia y aumentando la vulnerabilidad a infecciones oportunistas (Raymann *et al.*, 2017). Por esta razón, mercados como la Unión Europea aplican políticas de cero tolerancias al uso de antibióticos, impulsando la búsqueda de alternativas basadas en microorganismos benéficos como las bacterias lácticas.

Dado lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la ingesta de consorcios de bacterias lácticas aisladas desde *Apis mellifera* sobre su sobrevivencia, sistema inmune y respuesta frente a la infección del Virus de las Alas Deformadas (DWV) y *Nosema ceranae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se desarrolló en los laboratorios de Virología y de Sanidad Apícola de la Universidad de Concepción, campus Chillán, ubicado en la Región del Ñuble, Chile.

Conorcios de lactobacterias

Los consorcios fueron conformados por bacterias lácticas (Tabla 1), aisladas desde los intestinos de abejas melíferas, que se colectaron en apiarios ubicados en la Región de Valparaíso/Coquimbo, Región del Biobío y Región de Los Lagos, en el marco del proyecto FIA PYT 2017 - 0241, de nombre: “Desarrollo de un bioestimulante probiótico para potenciar el mecanismo de defensa de *Apis mellifera* frente a los patógenos DWV y *Nosema ceranae* y su adaptación al cambio climático”.

Patógeno DWV y preparación de inóculo

Para la inoculación con DWV se utilizó un aislado obtenido desde abejas infectadas con el virus. Se eligieron 10 abejas al azar, se trituraron y homogeneizaron en una bolsa Stomacher® con 10 mL de solución salina PBS (1x) durante 90 s a alta velocidad en un homogeneizador (Stomacher® 80 Lab Blender, Seward, Reino Unido). Las muestras se centrifugaron dos veces a 1500 g durante 10 minutos a 4 °C, seguido de 10.000 g durante 10 minutos a 4 °C. Se tomaron 200 µL del sobrenadante para cuantificar el título viral y el resto

se congeló hasta su posterior utilización. Para la cuantificación se extrajo el ARN de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por E.Z.N.A.® Total RNA Kit (Omega Bio-Tek, EE. UU.). A partir del ARN se sintetizó cDNA de primera cadena por medio de la enzima transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se conservó a -20 °C hasta su análisis por PCR en tiempo real para la detección y cuantificación del virus.

Tabla 1. Cepas de lactobacterias en cada consorcio.

Región	Consortio	Especie	Cepa
Los Ríos	3	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	LR3.5
		<i>Weisella bombi</i>	LR13.5
		<i>Lactobacillus kunkeei</i>	LR10.4; LR10.5; LR10.12; LR3.4
Los Lagos	6	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	LL6.1; LL7.1
		<i>Lactobacillus kunkeei</i>	LL13.9
Los Ríos		<i>Lactobacillus kunkeei</i>	LR17.12; LR13.34; LR20.4
BioBío	11	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	BB18a; BB21b
		<i>Lactobacillus kunkeei</i>	BB1a; BB18.2; BB17a; BB17e

Patógeno *Nosema ceranae* y preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo de *Nosema ceranae* se colectaron abejas obreras adultas desde colonias infectadas (50 abejas por colmena, 5 colmenas). Las abejas infectadas, que contenían las esporas, se transportaron al laboratorio y se mantuvieron confinadas vivas bajo condiciones controladas

(30 °C ± 1,0; 60 % ± 3,0 RH) hasta su procesamiento. La purificación de las esporas y la extracción de ADN de *N. ceranae* se realizó a partir de la metodología descrita por Fries *et al.* (1996). La identificación se realizó mediante duplex-PCR con partidores específicos dirigidos al gen RPB1, según Gisder y Genersh (2013) y los resultados se confirmaron mediante secuenciación (Macrogen Inc., Seoul, Korea).

Carga relativa de *Nosema ceranae*

Se seleccionó el Consorcio 6 para estudiar su efecto sobre la carga relativa de *N. ceranae* en *A. mellifera* mediante 4 tratamientos que fueron analizados en el período total de evaluación, como también, a los 5, 10 y 15 días post- infección (dpi). Se estudió la carga relativa del microsporidio en grupos de abejas inoculadas con consorcio e infectadas con *N. ceranae* (Con 6 + Nc); en abejas inoculadas con consorcio, infectadas con *N. ceranae* y DWV (Con 6+ Nc + DWV); en abejas co-infectadas con *N. ceranae* y DWV (Nc + DWV) y, por último, en abejas sólo infectadas con *N. ceranae* como tratamiento control infectado (Nc).

Expresión de genes involucrados en la respuesta inmune

Se evaluó, a los 5, 10 y 15 días post-infección, los niveles de expresión de genes involucrados en la respuesta inmune de *A. mellifera*: abaecina y defensina, como respuesta a la ingesta del consorcio 6 de bacterias lácticas. Los 8 tratamientos evaluados consistieron en: grupos de abejas sanas inoculadas con un consorcio de bacterias lácticas (Con 6); abejas inoculadas con consorcio e infectadas con *N. ceranae* (Con 6 + Nc); abejas inoculadas con consorcio e infectadas con DWV (Con 6 + DWV); abejas inoculadas con consorcio, y co-infectadas con *N. ceranae* y DWV (Con + Nc + DWV); abejas co-infectadas con *N. ceranae* y DWV (Nc + DWV); abejas infectadas solo con *N. ceranae* (Nc); abejas infectadas solo con DWV (DWV) y, por último, abejas sanas sin ningún tratamiento (Control).

Ensayos biológicos en abejas melíferas

Inoculación de *Apis mellifera* con *N. ceranae*. Para evaluar el efecto de la ingesta de bacterias lácticas sobre la sobrevivencia, carga de patógenos y expresión de genes relacionados con el sistema inmune en abejas infectadas, se colectaron abejas recién emergidas (2 días de edad) y se mantuvieron en

jaulas plásticas sin alimentar durante 3 horas. Cada abeja fue inoculada individualmente con *N. ceranae*, en una mezcla de 5 μ L que contenía 6×10^4 esporas del patógeno en jarabe de sacarosa (60 %), de acuerdo con Porrini *et al.* (2013). Las abejas que no consumieron la totalidad de la solución suministrada se descartaron del ensayo. Por último, se dispusieron 50 abejas inoculadas en jaulas plásticas (base: 8 cm de diámetro; boca: 10 cm de diámetro; altura: 15 cm; con perforaciones para facilitar la entrada de oxígeno), para ser evaluadas.

Inoculación de *Apis mellifera* con DWV. Para evaluar la influencia de la ingesta de bacterias lácticas en la sobrevivencia, carga de patógenos y expresión de genes relacionados con el sistema inmune en abejas infectadas con DWV, se colectaron 50 abejas jóvenes de no más de 2 días de edad y se mantuvieron en jaulas plásticas hasta su inoculación. Para infectar cada abeja, se inocularon individualmente con una suspensión del virus (1×10^9 copias genoma del virus) que se dispuso en jarabe de sacarosa (50 %). Aquellas abejas que no consumieron la totalidad de la solución suministrada se descartaron del ensayo. Finalmente, se tomaron 50 abejas inoculadas y se dispusieron en jaulas plásticas para ser evaluadas.

Cada jaula plástica con 50 abejas corresponde a una unidad experimental, en la cual se dispusieron 3 gramos de torta proteica.

Se realizaron tres bioensayos independientes, cada uno utilizando un consorcio bacteriano diferente (ver Tabla 1). En todos los bioensayos se aplicaron los mismos cuatro tratamientos. La diferencia entre ellos fue el consorcio utilizado. En cada bioensayo, los tratamientos fueron: T1: Control, sin consorcio ni patógeno, T2: Aplicación del consorcio, T3: Aplicación del consorcio más inoculación con los patógenos *Nosema ceranae* y DWV, T4: Solo inoculación con *Nosema ceranae* y DWV (sin consorcio).

Las abejas muertas se contaron a diario y se extrajeron 5 individuos de las jaulas los días 5, 10, 15 después de la inoculación viral. La extracción total de ADN y ARN de las muestras de estas abejas, específicamente del abdomen, se realizó de acuerdo a Vargas *et al.* (2017). Se cuantificó la expresión de los

genes Apidaecina, Himenoptaecina, Defensina, Vago y Relish, todos ellos relacionados con el sistema inmune de *Apis mellifera*, a través de qPCR (basado en la química SYRB Green), de acuerdo al protocolo descrito por Evans (2006). Estos genes se usaron como bioindicadores de la salud de las abejas.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones y los tratamientos a evaluar correspondieron a 4 distintas combinaciones de consorcios bacterianos y patógenos. La unidad experimental correspondió a un grupo de 50 abejas melíferas confinadas en una jaula plástica. Las variables respuesta estudiadas fueron sobrevivencia, carga relativa de patógenos y expresión de genes relacionados con el sistema inmune de abejas melíferas.

La diferencia en la sobrevivencia de las abejas en el tiempo bajo tratamiento fue analizada mediante una ANOVA de medidas repetidas en el tiempo y la separación de medias a posteriori en cada punto de medición, fueron analizadas mediante el test de Tukey HSD ($p < 0,05$). En forma similar, la carga relativa de patógenos, como la expresión relativa de genes asociados al sistema inmune de las abejas, fueron analizadas mediante ANOVA, seguido de una comparación de medias de las abejas tratadas e infectadas con respecto al control infectado (*N. ceranae* o DWV) de acuerdo al test de Dunnett ($p < 0,05$). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa Statistica 7.0 (Statsoft)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sobrevivencia

Los datos experimentales obtenidos que denotan el efecto de los consorcios 3, 6 y 11 sobre la sobrevivencia de abejas melíferas se detallan a continuación:

Consortio 3. Según los resultados en la Figura 1, entre los días 0 y 20 post-infección se mantuvo la sobrevivencia mayor al 50 % en todos los tratamientos. No obstante, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en función al tiempo de medición de la sobrevivencia (Tratamiento*Tiempo $F = 8,63$; $GL = 27, 108$; $p < 0,001$). Las abejas tratadas con el consorcio y no inoculadas con los patógenos (*N. ceranae* + DWV), presentan una mayor sobrevivencia que el resto de

tratamiento, incluso que el Control Sano (abejas no inoculadas con patógenos y no tratadas con consorcio), a partir del día 10 del ensayo. En cambio, las abejas inoculadas con *N. ceranae* y DWV (Nc + DWV) y tratadas con el Consorcio 3 presentaron una mayor sobrevivencia que el tratamiento que incluía el bioestimulante (Consortio + Nc + DWV) en casi todos los días evaluados. De esta manera, el Consorcio 3 no mejoró la sobrevivencia de las abejas inoculadas con los patógenos.; los tratamientos Consortio + Nc + DWV y Nc + DWV, a los 20 dpi, mostraron una sobrevivencia de 55 % y 58 %, respectivamente.

Por otra parte, el control con bioestimulante (Consortio) mostró una mayor sobrevivencia (86 %), seguido del control sin inoculación de patógenos ni consorcio (Control), que presentó una sobrevivencia de un 72%.

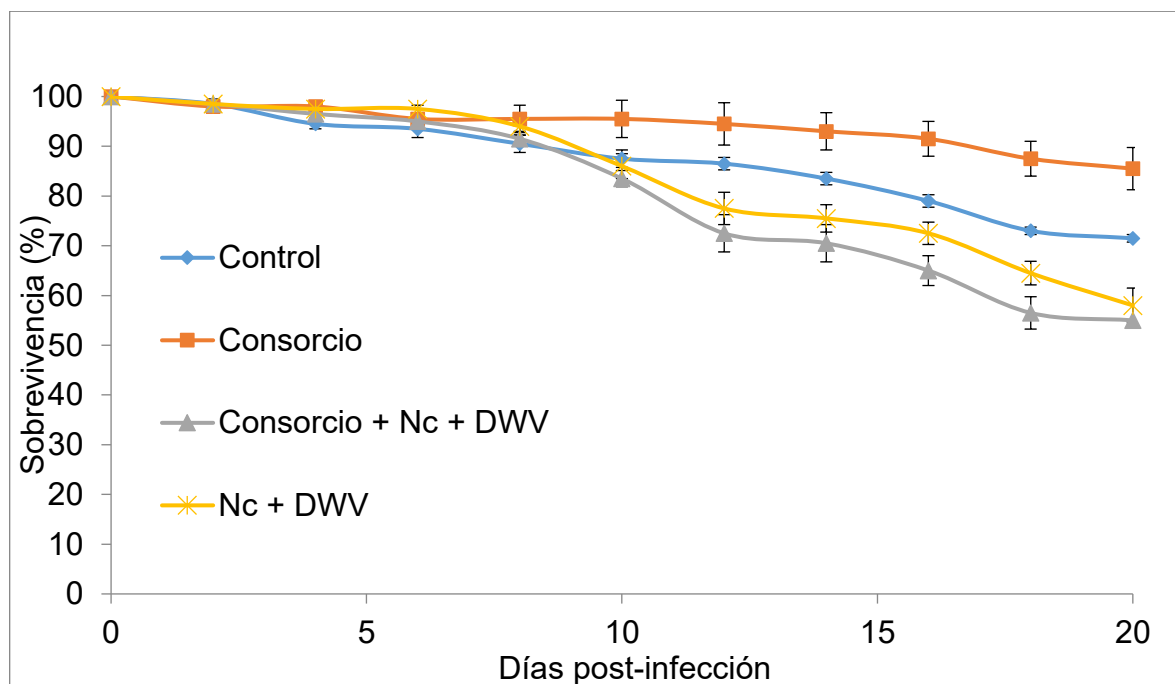
Consortio 6. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en función al tiempo de medición de la sobrevivencia para el Consortio 6 (Tratamiento* Tiempo $F = 3,65$; $GL = 27, 108$; $p < 0,001$). Los resultados en la Figura 2 muestran que entre los días 0 y 18 post-infección se mantuvo una sobrevivencia mayor al 50% en todos los tratamientos. Respecto a los tratamientos Nc + DWV y Consortio + Nc + DWV, no se observó una predominancia sostenida de un tratamiento sobre otro durante todo el ensayo, tal como muestra la Figura 2. Así, en 8 de los 20 días (40 % del período total), el tratamiento Consortio + Nc + DWV mostró una mayor sobrevivencia que Nc + DWV, mientras que en 12 de los 20 días (60 % del período total), este último sobrepasó los resultados de Consortio + Nc + DWV. Al final del período de evaluación, las abejas inoculadas con el bioestimulante alcanzaron una sobrevivencia de 54 %, mientras que el tratamiento Nc + DWV obtuvo un 46 %.

Por otro lado, durante todos los días evaluados el tratamiento Control (sin inoculación de consorcio ni co-infección con *Nosema* y DWV) presentó una mayor sobrevivencia que Consortio (con inoculación de bioestimulante), presentando al final del período un 73 % y 61 % de sobrevivencia, respectivamente.

Consortio 11. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en función al tiempo de medición de la sobrevivencia para el Consortio 11 (Tratamiento*Tiempo $F = 6,25$; $GL = 27, 108$; $p < 0,001$). Como se puede observar en la Figura 3, entre los días 0 y 14 post-infección se mantuvo una sobrevivencia

mayor al 50% en todos los tratamientos.

Figura 1. Sobrevivencia de abejas tratadas con Consorcio 3 y co-infectadas con *Nosema ceranae* y DWV en ensayos biológicos en condiciones controladas.

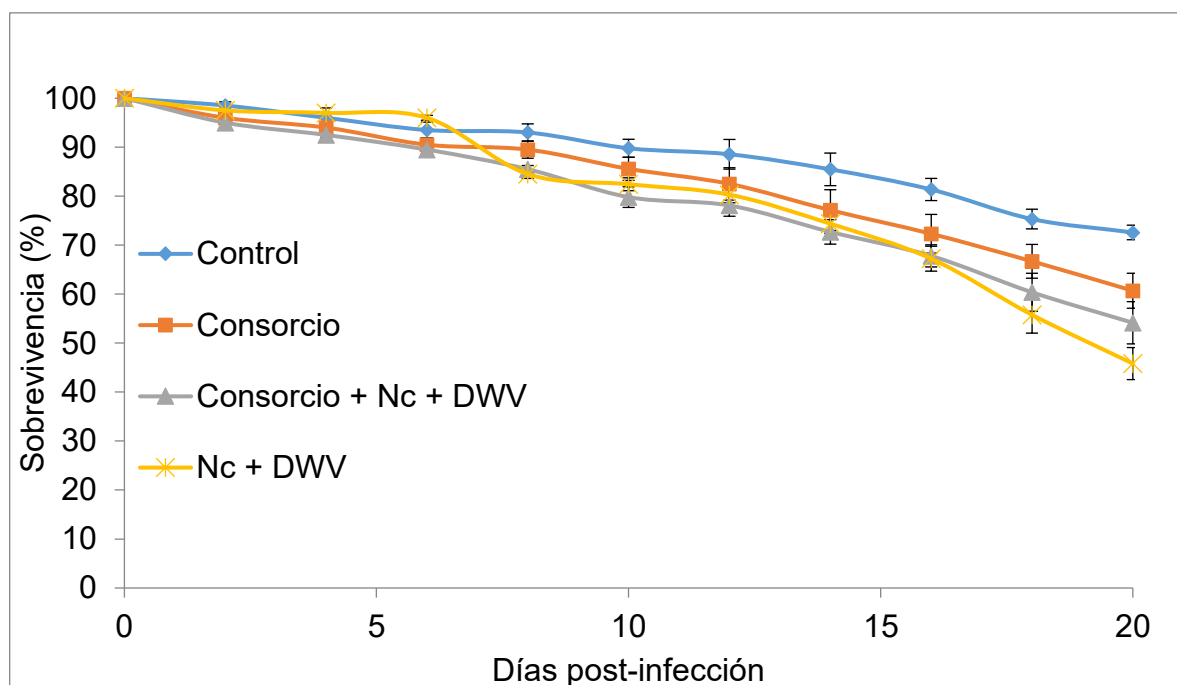


Control: Abejas sin tratamiento (control sano). Consorcio: Abejas tratadas con un consorcio, pero no infectadas con algún patógeno. Consorcio + Nc + DWV: Abejas tratadas con un consorcio y co-infectadas con *Nosema ceranae* y virus de las alas deformadas. Nc + DWV: Abejas co-infectadas con *N. ceranae* y DWV, pero que no fueron tratadas con algún consorcio. Barra sobre cada línea de tendencia indica error estándar. El no cruce de las barras de error entre tratamiento y en cada punto de medición en el tiempo, indica diferencias estadísticas significativas entre tratamiento basado en el test de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Por otro lado, durante todos los días evaluados el tratamiento Control (sin inoculación de consorcio ni co-infección con *Nosema* y DWV) presentó una mayor sobrevivencia que Consorcio (con inoculación de bioestimulante), presentando al final del período un 73 % y 61 % de sobrevivencia, respectivamente.

Consorcio 11. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en función al tiempo de medición de la sobrevivencia para el Consorcio 11 (Tratamiento*Tiempo $F = 6,25$; $GL = 27, 108$; $p < 0,001$). Como se puede observar en la Figura 3, entre los días 0 y 14 post-infección se mantuvo una sobrevivencia mayor al 50% en todos los tratamientos.

Figura 2. Supervivencia en abejas tratadas con el Consorcio 6 y co-infectadas con *Nosema ceranae* y DWV en ensayos biológicos en condiciones controladas.



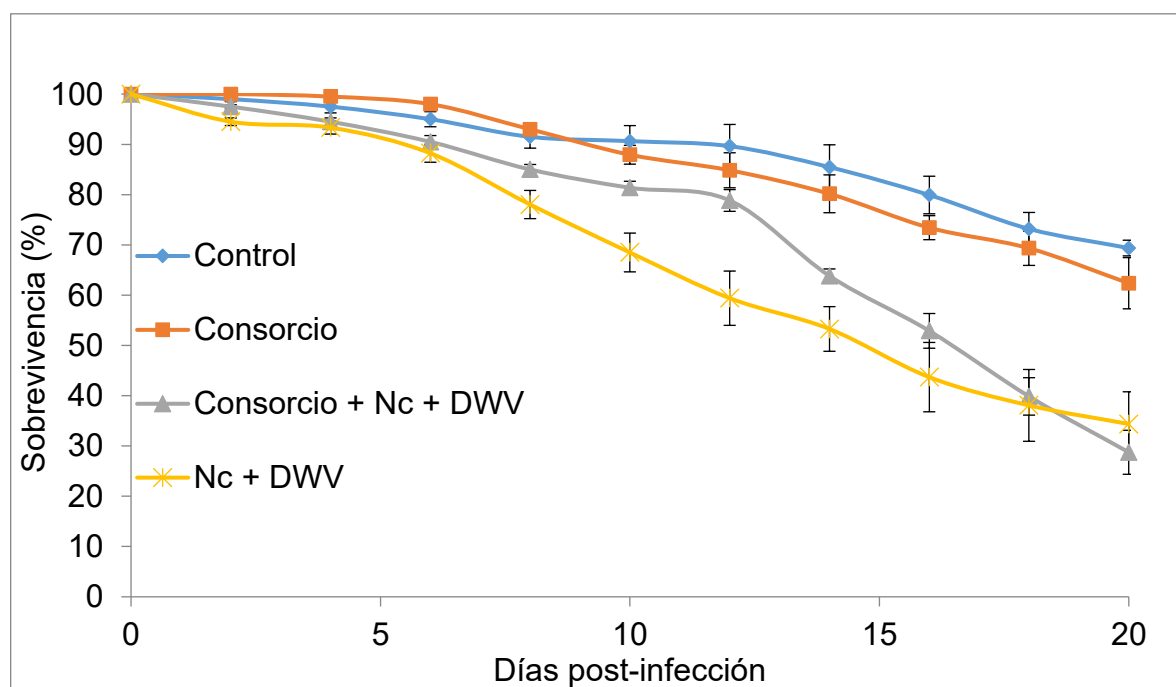
Control: Abejas sin tratamiento (control sano). Consorcio: Abejas tratadas con un consorcio, pero no infectadas con algún patógeno. Consorcio + Nc + DWV: Abejas tratadas con un consorcio y co-infectadas con *Nosema ceranae* y virus de las alas deformadas. Nc + DWV: Abejas co-infectadas con *N. ceranae* y DWV, pero que no fueron tratadas con algún consorcio (control co-infectado). Barra sobre cada línea de tendencia indica error estándar. El no cruce de las barras de error entre tratamiento y en cada punto de medición en el tiempo indica diferencias estadísticas significativas entre tratamiento basado en el test de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Durante los primeros 18 días de evaluación, el tratamiento Consorcio + Nc + DWV presentó una mayor supervivencia en comparación con las abejas co-infectadas con Nc + DWV, observándose el día 12 la mayor diferencia entre ambos tratamientos (20 %). El efecto de la co-infección con Nc + DWV sobre las abejas mostró un descenso relativamente constante de la supervivencia durante el ensayo, mientras que en Consorcio + Nc + DWV se registró, a partir del día 12, un decrecimiento más acelerado que el de Nc + DWV, alcanzando una cifra final de 29 % y 34 %, respectivamente. Estos resultados muestran un efecto positivo sobre la supervivencia de las abejas que fueron inoculadas con el consorcio bacteriano y que, previamente, habían sido co-infectadas con *Nosema* y DWV.

Durante todo el período de evaluación se registró una mayor supervivencia en

los tratamientos Consorcio y Control respecto al resto de los tratamientos. En el período que comprende desde el día 2 hasta el día 8 post-infección, Consorcio mostró una sobrevivencia más alta que la del tratamiento Control (diferencias menores a un 3 %), sin embargo, desde el día 10 hasta el final del ensayo el tratamiento Control mostró la mayor sobrevivencia (diferencias menores a un 7 %). De esta manera, al final del período los tratamientos de inoculación con bioestimulante y Control llegaron a un 62 % y 69 % de sobrevivencia, respectivamente.

Figura 3. Sobrevivencia en abejas tratadas con el Consorcio 11 y co-infectadas con *Nosema ceranae* y DWV en ensayos biológicos en condiciones controladas.

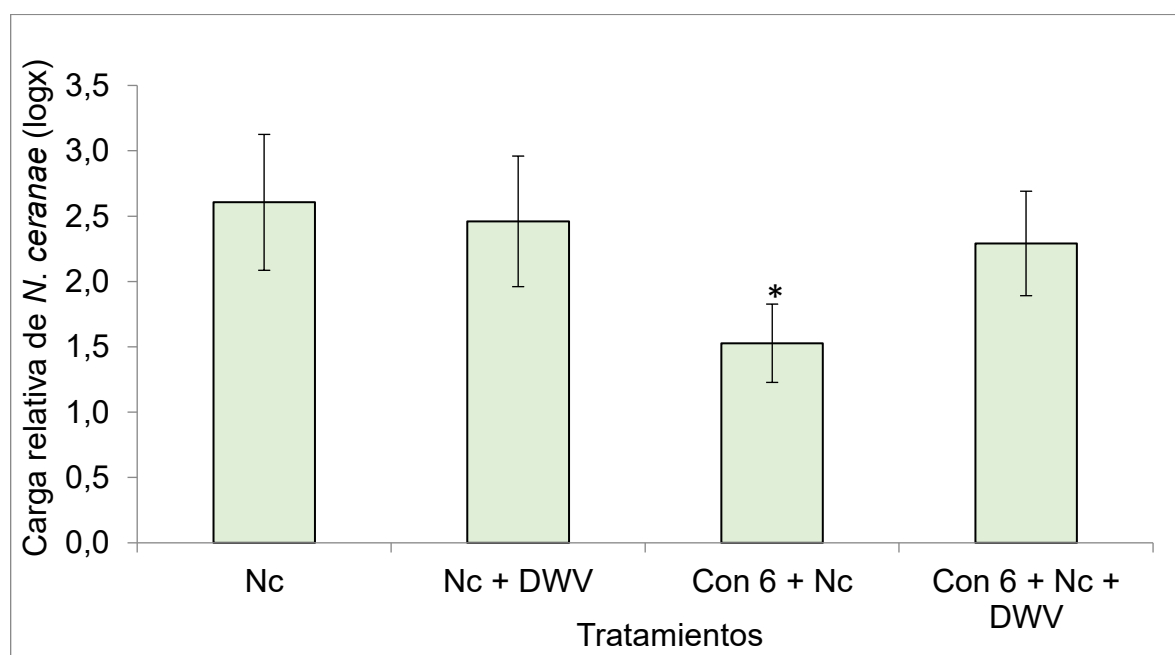


Control: Abejas sin tratamiento (control sano). Consorcio: Abejas tratadas con un consorcio, pero no infectadas con algún patógeno. Consorcio + Nc + DWV: Abejas tratadas con un consorcio y co-infectadas con *Nosema ceranae* y virus de las alas deformadas. Nc + DWV: Abejas co-infectadas con *N. ceranae* y DWV, pero que no fueron tratadas con algún consorcio (control co-infectado). Barra sobre cada línea de tendencia indica error estándar. El no cruce de las barras de error entre tratamiento y en cada punto de medición en el tiempo indica diferencias estadísticas significativas entre tratamiento basado en el test de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Carga relativa de *N. ceranae* en el período total de evaluación. La carga relativa de *N. ceranae* fue estandarizada con un gen endógeno (β -actina) y comparada entre

los tratamientos. Según el análisis estadístico (ANOVA), se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($F = 5.14$; $gl = 3, 12$; $p = 0.016$). Se puede observar en la Figura 4 que, el tratamiento control infectado (Nc) y las abejas co-infectadas con *N. ceranae* y DWV (Nc + DWV) presentaron mayores cargas relativas del microsporidio (2.6 y 2.5, respectivamente), respecto a los tratamientos que incluyeron inoculación con Consorcio 6, coincidiendo con los resultados esperados. El tratamiento que incluyó Consorcio 6 (Con 6 + Nc) arrojó una carga relativa de 1.5, presentando diferencias estadísticas significativas respecto a Nc. Mientras que la carga del tratamiento con inoculación de Consorcio 6 y co-infectadas con DWV (Con 6 + Nc + DWV) fue de 2.3, sin exponer diferencias significativas con Nc.

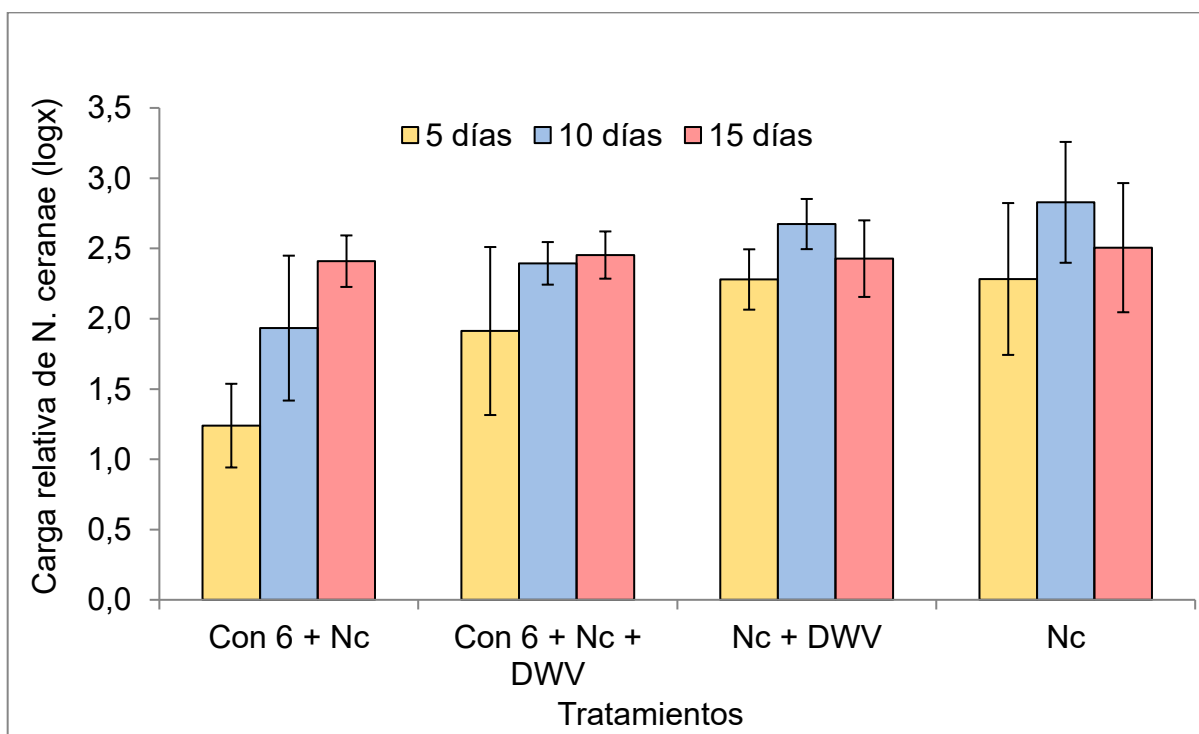
Figura 4. Carga relativa de *Nosema ceranae* del período total de evaluación de los ensayos en abejas tratadas con un consorcio de lactobacterias y co-infectadas con el virus de las alas deformadas (DWV).



Nc: Abejas sólo infectadas con *N. ceranae* (control infectado), Nc + DWV: Abejas co-infectadas con *N. ceranae* y virus de las alas deformadas (DWV), Con 6 + Nc: Abejas inoculadas con Consorcio 6 e infectadas con *N. ceranae*, Con 6 + Nc + DWV: Abejas inoculadas con Consorcio 6 y co-infectadas con *N. ceranae* y virus de las alas deformadas (DWV). Asteriscos en las barras indican diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento control infectado (Nc) y basado en el test de Dunnett ($p < 0.05$). Barra sobre cada gráfico indica error estándar.

Carga relativa de *Nosema ceranae* a los 5, 10 y 15 días post-infección. Los datos analizados y graficados en la Figura 5 revelan que no existen diferencias significativas en la carga relativa de *N. ceranae* entre tratamientos a los 5, 10 y 15 dpi ($F = 1.69$; $gl = 6, 24$; $p = 0.160$), sin embargo, se observó una tendencia a una menor carga relativa del patógeno en los tratamientos que incluyeron inoculación con Consorcio 6, en comparación con sus homólogos sin la aplicación del bioestimulante. En particular, el tratamiento Consorcio 6 + Nc mostro valores de carga relativa más bajos en los tres tiempos evaluados, aunque estos no difirieron estadísticamente de los demás tratamientos, y presentaron un aumento relativamente constante a lo largo del periodo de evaluación, mientras que, las cargas relativas de *N. ceranae* más altas se observaron en el tratamiento control infectado (Nc).

Figura 5. Carga relativa de *Nosema ceranae* en abejas tratadas con un consorcio de lactobacterias y co-infectadas con DWV evaluados a los 5, 10 y 15 días post-infección en condiciones controladas.



Con 6 + Nc: Abejas inoculadas con Consorcio 6 e infectadas con *N. ceranae*, Con 6 + Nc + DWV: Abejas inoculadas con Consorcio 6 y co-infectadas con *N. ceranae* y virus de las alas deformadas (DWV), Nc + DWV: Abejas co-infectadas con *N. ceranae* y virus de las alas deformadas (DWV), Nc: Abejas sólo infectadas con *N. ceranae* (control infectado). Barra sobre cada gráfico indica error estándar.

Carga relativa de DWV. Se seleccionó el Consorcio 6 para estudiar su efecto sobre la carga relativa de DWV en *A. mellifera* mediante 4 tratamientos que fueron analizados en el período total de evaluación, y de igual forma, a los 5, 10 y 15 días post- infección. Se estudió la carga relativa del virus en grupos de abejas inoculadas con: Consorcio de lactobacterias 6 + DWV (Con 6 + DWV), abejas tratadas con Consorcio 6 y co- infectadas con *N. ceranae* y DWV (Con 6 + DWV + Nc), abejas co-infectadas con *N. ceranae* y virus de las alas deformadas (DWV + Nc) y abejas sólo infectadas con DWV (control infectado).

Carga relativa de DWV del período total de evaluación. La carga relativa de DWV fue estandarizada con β -actina (gen endógeno) y comparada entre los tratamientos evaluados. Según el análisis estadístico (ANOVA), se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($F = 8.61$; $gl = 3, 12$; $p = 0.003$). Los resultados (Figura 6) evidencian que la adición de Consorcio 6 en abejas infectadas con DWV y en abejas coinfectadas con DWV + Nc produjo las menores cargas relativas del virus (3.1 y 2.8, respectivamente), ambos exponiendo diferencias significativas con el tratamiento control infectado (DWV) (3.8). Por otra parte, DWV (3.8) junto con DWV + Nc (3.6) presentaron las cargas relativas más altas, las cuales resultaron similares entre sí.

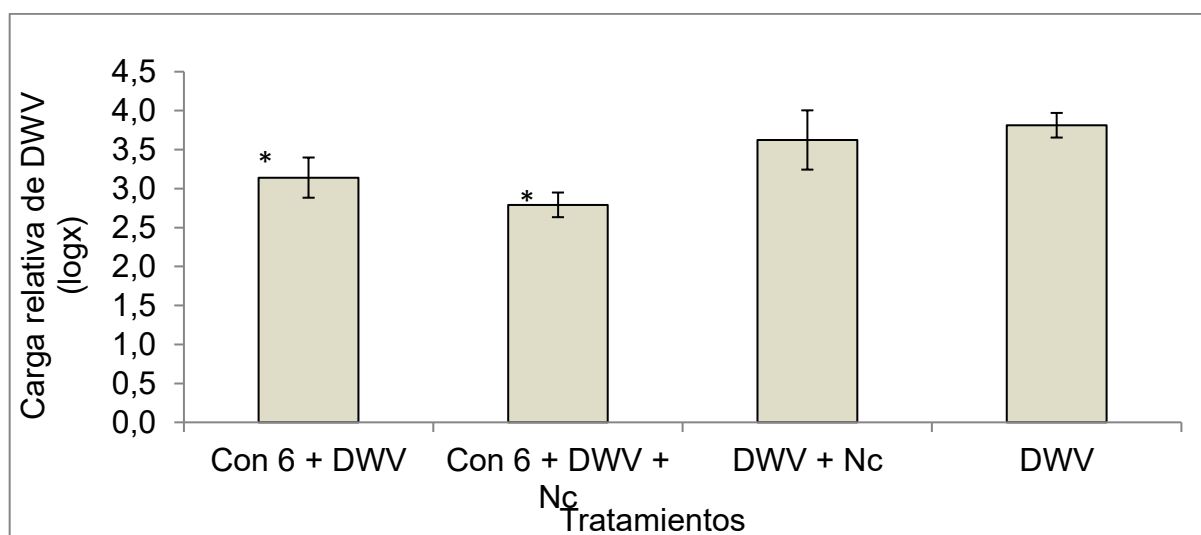
Carga relativa de DWV a los 5, 10 y 15 días post-infección. Se detectaron diferencias en la carga relativa de DWV entre tratamientos cuando se consideró el tiempo como un factor (ANOVA tratamiento x tiempo $F = 2.70$; $gl = 6, 24$; $p = 0.038$) medido a los 5, 10 y 15 dpi. Según se observa en la Figura 7, el Consorcio 6 disminuyó la carga relativa de DWV en el día 10 en los tratamientos Con 6 + DWV y Con 6 + DWV + Nc, los cuales mostraron diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento control infectado (DWV), así como también con el tratamiento co-inoculado con ambos patógenos (Nc + DWV).

Carga relativa de DWV a los 5, 10 y 15 días post-infección. Se detectaron diferencias en la carga relativa de DWV entre tratamientos cuando se consideró el tiempo como un factor (ANOVA tratamiento x tiempo $F = 2.70$; $gl = 6, 24$; $p = 0.038$) medido a los 5, 10 y 15 dpi.

Según se observa en la Figura 7, el Consorcio 6 disminuyó la carga relativa de DWV

en el día 10 en los tratamientos Con 6 + DWV y Con 6 + DWV + Nc, los cuales mostraron diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento control infectado (DWV), así como también con el tratamiento co-inoculado con ambos patógenos (Nc + DWV).

Figura 6. Carga relativa del virus de las alas deformadas (DWV) del período total de evaluación de los ensayos en abejas tratadas con un consorcio 6 de lactobacterias y co-infectadas con *Nosema ceranae*.



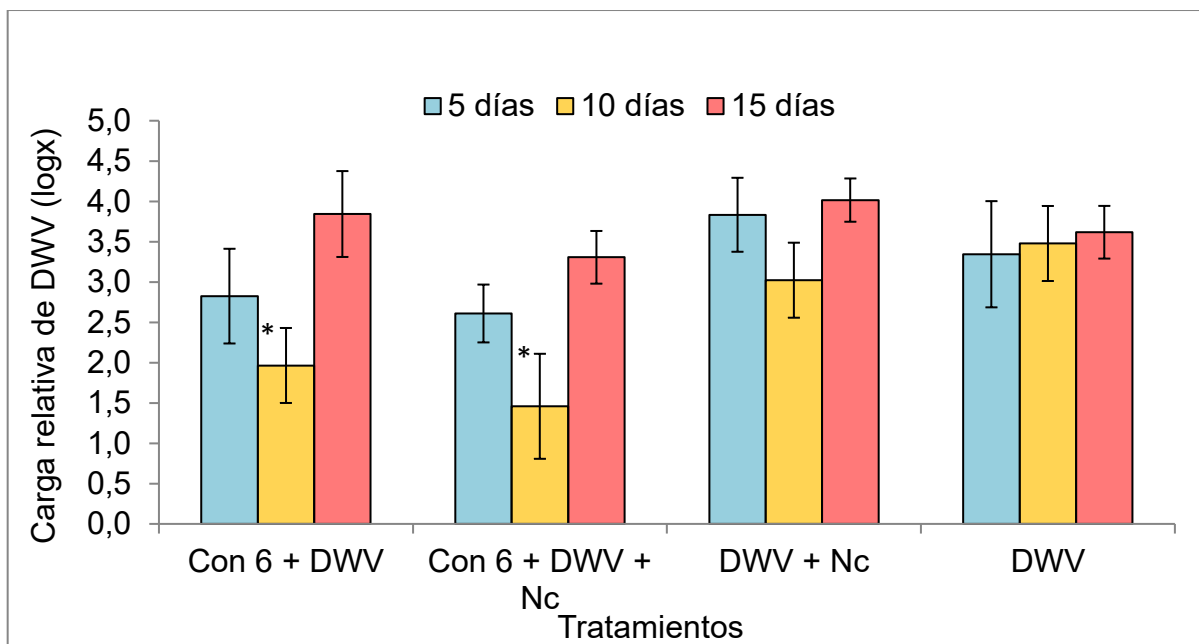
Con 6 + DWV: Abejas inoculadas con Consorcio 6 e infectadas con DWV, Con 6 + DWV + Nc: Abejas inoculadas con Consorcio 6 y co-infectadas con virus de las alas deformadas (DWV) y *N. ceranae*, DWV + Nc: Abejas co-infectadas con virus de las alas deformadas (DWV) y *N. ceranae*, DWV: Abejas sólo infectadas con virus de las alas deformadas (control infectado). Asteriscos en las barras indican diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento control infectado (DWV) y basado en el test de Dunnett ($p < 0.05$). Barra sobre cada gráfico indica error estándar.

La Figura 7 muestra que el tratamiento que presentó la mayor variación de carga relativa entre cada día evaluado fue Con 6 + DWV + Nc, seguido de Con 6 + DWV, DWV + Nc y, por último, DWV. Las medias de las cargas relativas de DWV estudiadas en el día 5 estuvieron en un rango entre 2.6 y 3.8, en el día 10 entre 1.5 y 3.5, y en el día 15 entre 3.3 y 4.0.

En base a este resultado y de acuerdo a la metodología utilizada en este estudio, no se evidenció un efecto sinérgico ni antagónico entre ambos patógenos, a pesar de que existen estudios que sugieren que DWV y *N. ceranae* sí pueden actuar sinérgicamente en colonias infectadas, pero que ese efecto sinérgico

depende de la dosis y la nutrición (Zheng *et al.*, 2015).

Figura 7. Carga relativa del virus de las alas deformadas (DWV) en abejas tratadas con el consorcio 6 de lactobacterias y co-infectadas con DWV y *Nosema ceranae*, evaluados a los 5, 10 y 15 días post-infección en condiciones controladas.



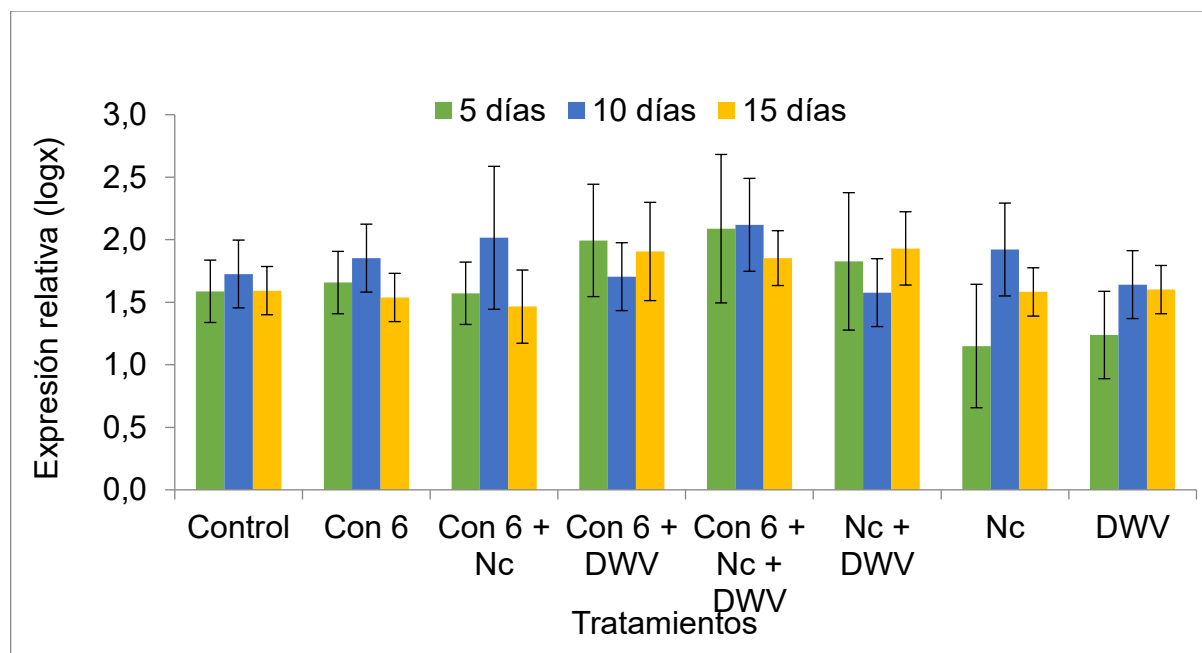
Con 6 + DWV: Abejas inoculadas con Consorcio 6 e infectadas con DWV, Con 6 + DWV + Nc: Abejas inoculadas con Consorcio 6 y co-infectadas con virus de las alas deformadas (DWV) y *N. ceranae*, DWV + Nc: Abejas co-infectadas con virus de las alas deformadas (DWV) y *N. ceranae*, DWV: Abejas sólo infectadas con virus de las alas deformadas (control infectado). Asteriscos en las barras indican diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento control infectado (no tratado) dentro de cada período de medición en función del test de Dunnett ($p < 0.05$). Barra sobre cada gráfico indica error estándar.

Expresión relativa del gen abaecina. En la Figura 8 se aprecia la expresión relativa (estandarizada) del péptido antimicrobiano abaecina en abejas melíferas infectadas y tratadas con Consorcio 6. El análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas entre tratamientos cuando se consideró el tiempo como un factor (ANOVA tratamiento x tiempo $F = 0.97$; $gl = 14, 48$; $p = 0.493$) medido a los 5, 10 y 15 días post-infección.

No obstante, se observó una tendencia a niveles de expresión más elevados en el gen abaecina en abejas inoculadas con Consorcio 6 y co-infectadas con *N. ceranae* y DWV (Con 6 + Nc + DWV), en comparación con otros tratamientos. De forma paralela, se apreció una tendencia a niveles más bajos de expresión en

abejas infectadas únicamente con *N. ceranae* o únicamente con DWV. En general, los datos sugieren una tendencia al incremento en la expresión de abaecina hacia el día 10 por infección, seguida de una disminución a los 15 dpi.

Figura 8. Expresión relativa de abaecina a los 5, 10 y 15 días post-infección en abejas tratadas con consorcio 6 e infectadas con *Nosema ceranae*, DWV y co-infectadas con ambos patógenos.



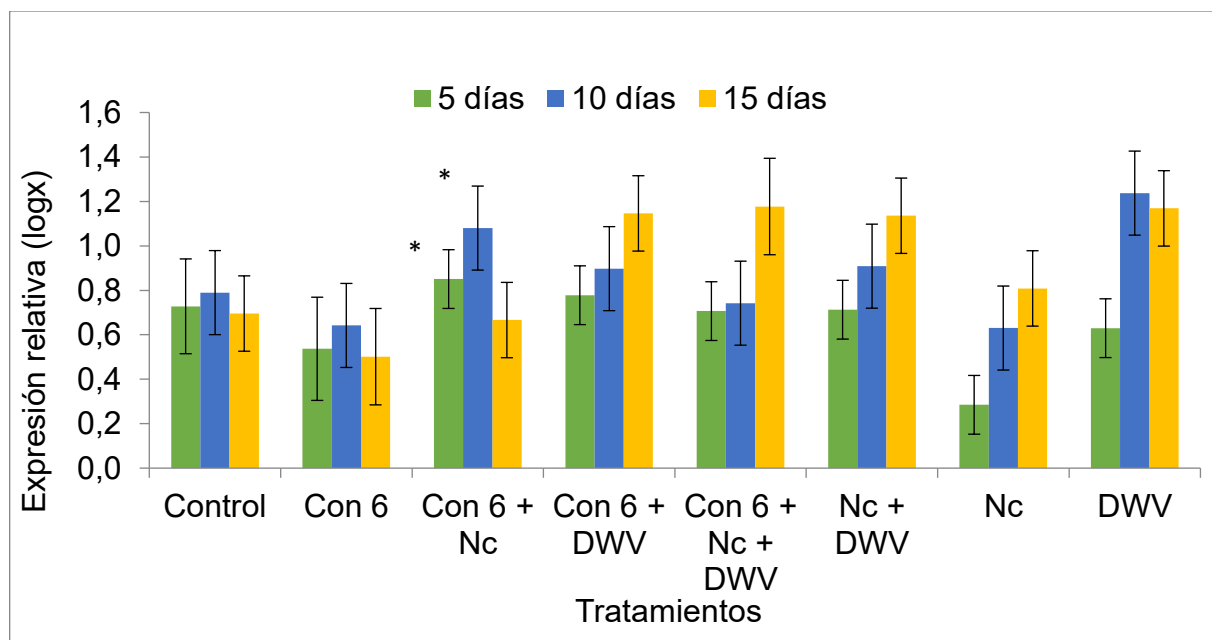
Control: Abejas no tratadas, Con 6: Abejas sanas tratadas con un consorcio de lactobacterias, Con 6 + Nc: Consorcio de lactobacterias e infección con *Nosema ceranae*, Con 6 + DWV: Consorcio e infección con virus de las alas deformadas (DWV), Con 6 + Nc + DWV: Consorcio y co-infección con *N. ceranae* y DWV, Nc + DWV: Co-infección con *N. ceranae* y DWV, Nc: Infección con *N. ceranae*, DWV: infección con DWV. Barra sobre cada gráfico indica error estándar.

Expresión relativa del gen defensina. La Figura 9 muestra la expresión relativa del péptido antimicrobiano defensina en *A. mellifera* infectadas y tratadas con Consorcio 6. El análisis estadístico evidenció diferencias significativas entre tratamientos ($F = 3.55$; $gl = 7, 24$; $p = 0.009$), pero no en función del tiempo (ANOVA tratamiento x tiempo $F = 1.12$; $gl = 14, 48$; $p = 0.367$) medido a los 5, 10 y 15 días post-infección.

Se detectaron diferencias estadísticas significativas entre Con 6 + Nc, los días 5 y 10 post-infección, con respecto al tratamiento control infectado (Nc), no obstante, no se detectaron estas diferencias entre Con 6 + DWV y Con 6 + Nc + DWV, en comparación con sus homólogos no inoculados con el consorcio bacteriano.

Los niveles de expresión más altos para el gen defensina se encontraron, mayormente, en aquellas abejas que fueron infectadas con DWV, mientras que los niveles más bajos se detectaron en aquellas que fueron inoculadas con el consorcio (Con 6) y en aquellas no tratadas, como también en aquellas que fueron infectadas con *Nosema*. Se puede observar una tendencia al aumento de la expresión relativa de defensina en el día 10 post- infección en cada tratamiento, seguida de una tendencia a un nuevo incremento a los 15 dpi en 5 de los 8 tratamientos evaluados

Figura 9. Expresión relativa de defensina a los 5, 10 y 15 días post-infección en abejas tratadas con Consorcio 6 e infectadas con *Nosema ceranae*, DWV y co-infectadas con ambos patógenos.



Control: Abejas no tratadas, Con 6: Abejas sanas tratadas con un consorcio de lactobacterias, Con 6 + Nc: Consorcio de lactobacterias e infección con *Nosema ceranae*, Con 6 + DWV: Consorcio e infección con virus de las alas deformadas (DWV), Con 6 + Nc + DWV: Consorcio y co-infección con *N. ceranae* y DWV, Nc + DWV: Co-infección con *N. ceranae* y DWV, Nc: Infección con *N. ceranae*, DWV: infección con DWV. Asteriscos en las barras indican diferencias estadísticas significativas con respecto al tratamiento control infectado (no tratado) dentro de cada período de medición en función del test de Dunnett ($p < 0.05$). Barra sobre cada gráfico indica error estándar.

Los datos obtenidos sobre el efecto de un consorcio bacteriano en la sobrevivencia, carga relativa de patógenos, y expresión de genes relacionados con el sistema inmune en abejas melíferas, se utilizaron para estudios posteriores del proyecto en curso (Proyecto FIA, PYT 2017 - 0241, de nombre: “Desarrollo de un bioestimulante

probiótico para potenciar el mecanismo de defensa de *A. mellifera* frente a los patógenos DWV y *Nosema ceranae* y su adaptación al cambio climático”).

Los resultados observados podrían atribuirse a efectos directos del consorcio sobre los patógenos mediante la producción de compuestos (ácido fórmico, láctico y acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, benzoato, bacteriocinas), así como a la modulación del sistema inmunitario, la prevención de la adhesión de patógenos, la competencia por nutrientes o la reducción de toxinas en abejas sanas (Vieco-Saiz *et al.*, 2019).

Las propiedades antimicrobianas de *L. kunkeei* y *B. asteroides*, empleadas en los consorcios, han sido ampliamente descritas. *L. kunkeei*, aislada de intestinos de abejas, miel, polen, jalea real, pan de abeja, flores, vino y jugo de uva parcialmente fermentado, en general de fuentes ricas en fructosa (Čeksterytė *et al.*, 2020), indicando que no es exclusiva de *A. mellifera*. Disminuye la mortalidad larval frente a *Paenibacillus larvae* en mezclas de cepas (Arredondo *et al.*, 2018) y muestra actividad inhibitoria in vitro contra este patógeno (Forsgren *et al.*, 2010) y *Melissococcus plutonius*, atribuida a péptidos antibacterianos (Endo y Salminen, 2013). Además, posee actividad antifúngica y capacidad de adhesión a células epiteliales intestinales, vinculada a hidrofobicidad y autoagregación (Iorizzo *et al.*, 2020). *Bifidobacterium asteroides*, aislada de intestinos de abejas, miel y pan de abeja, aunque no pertenece al grupo de bacterias lácticas, comparte hábitat con ellas y posee un metabolismo que produce ácido láctico como principal producto de fermentación. Algunas cepas codifican enzimas detoxificadoras de compuestos generados por la respiración aeróbica (Bottacini *et al.*, 2012). Además, estudios indican que *B. asteroides* mejora la inmunidad de abejas infectadas con *P. larvae* cuando se administra en mezclas de bacterias lácticas específicas de abejas, incluyendo géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Lamei *et al.*, 2019; Forsgren *et al.*, 2010).

Weissella bombi es una bacteria descrita recientemente y ha sido aislada, únicamente, desde el intestino de *Bombus terrestris* (Praet *et al.*, 2015). No se conoce sobre los efectos benéficos de *W. bombi* sobre *A. mellifera*, sin embargo, Yoshiyama *et al.* (2013) afirman que algunas cepas del género *Weissella* producen

bacteriocinas. No se han detectado genes para la producción de metabolitos secundarios con potencial actividad antimicrobiana en el genoma de *W. bombi*, no obstante, sí muestra un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Crithidia bombi* (tripanosomatido específico de *Bombus*) (Praet *et al.*, 2018).

Hasta ahora no se habían evaluado los posibles efectos de una mezcla de bacterias lácticas sobre la salud de las abejas, ante una infección simultánea de DWV y *N. ceranae*.

Sobrevivencia. En este sentido, los reportes indican que la suplementación de la dieta de abejas melíferas sanas con *L. kunkeei* y otras bacterias lácticas fructofílicas, naturalmente presentes en el intestino de las abejas, promueven la sobrevivencia de las abejas melíferas y disminuye significativamente la mortalidad de las abejas en comparación las abejas control alimentadas con jarabe de azúcar sin bacterias lácticas (Pachla *et al.*, 2021). Por otro lado, Arredondo *et al.* (2018) afirman que una mezcla de varias cepas de *L. kunkeei* puede reducir la mortalidad de abejas infectadas con *N. ceranae*, aunque este efecto no es estadísticamente significativo. Dosch *et al.* (2021) indican que tras la exposición oral a DWV, la supervivencia de las abejas melíferas aumenta significativamente en aquellas con una microbiota intestinal normal (establecida experimentalmente) en comparación con las abejas de control con una microbiota intestinal alterada (disbiótica).

Carga relativa del patógeno. Baffoni *et al.* (2016) detectaron un nivel significativamente más bajo en la carga de esporas de *N. ceranae* tanto en el grupo infectado y tratado con probiótico, como en el grupo tratado solo con la mezcla de *L. kunkeei* y *B. asteroides*. Asimismo, la administración de *L. kunkeei* redujo la carga de esporas de *N. ceranae* comparado con las abejas no tratadas del grupo control (Arredondo *et al.*, 2018). Los ensayos de Li *et al.* (2019) revelaron que la alteración de las bacterias intestinales a causa de los antibióticos da como resultado un cambio de una infección latente de DWV, a una de replicación activa, lo que sugiere que las bacterias intestinales juegan un papel extremadamente importante en la prevención de la replicación de DWV en las abejas melíferas.

Expresión de genes de inmunidad. Doublet *et al.* (2017) identificaron un conjunto común de genes que responden infecciones por diversos patógenos (*V. destructor*,

N. apis, *N. ceranae* y virus RNA), lo que sugiere una respuesta inmunitaria común. Entre ellos se encuentran himenoptaecina, defensina, abaecina y lisozima, entre otros.

Las bacterias probióticas pueden estimular el sistema inmune, aunque esta función depende de la especie y cepa (Yoshiyama *et al.*, 2013). *Bifidobacterium asteroides* regula la expresión de apidaecina. En otro estudio, 9 cepas diferentes de LAB (*Enterococcus* sp., *Weissella* sp., *Lactobacillus* sp.) incrementó significativamente la expresión de abaecina, himenoptaecina y defensina (Janashia y Alaux., 2016). En contraste, la alimentación con jarabe suplementado con *L. kunkeei* no produjo cambios significativos en la expresión de péptidos antibacterianos, enzimas relacionadas con la inmunidad o vitelogenina (abaecina, himenoptaecina, defensina, vitelogenina, glucosa deshidrogenasa y lisozima) en comparación con las abejas de control (Arredondo *et al.*, 2018). Anderson *et al.* (2021) expone que la defensina-1 se correlacionó negativamente con la abundancia de *L. kunkeei* en la boca y en el intestino medio.

Respecto a la co-infección DWV-*N. ceranae*

Las comunidades microbianas de las abejas melíferas incluyen virus, hongos, microsporidios y bacterias, generando interacciones simbióticas, sinérgicas o antagónicas que afectan la distribución y virulencia de los patógenos. Se ha detectado una asociación negativa entre *Nosema ceranae* y el Virus de las Alas Deformadas (DWV) en el intestino medio, aunque no a nivel de abeja completa o colonia (Retschnig *et al.*, 2014). Doublet *et al.* (2015) señalaron que la infección previa por *N. ceranae* inhibe DWV, evidenciando una competencia asimétrica, mientras que Costa *et al.* (2011) también reportaron correlaciones negativas sin efectos sinérgicos. Sin embargo, Zheng *et al.* (2015) sugieren posibles interacciones sinérgicas dependientes de la dosis y la nutrición, lo que podría explicar cargas similares de ambos patógenos en infecciones individuales o conjuntas sin considerar el tiempo como factor.

Respecto a la heterogeneidad de los resultados entre consorcios compuestos por mezclas de iguales especies

Las diferencias observadas en el efecto de los consorcios 6 y 11, ambos

compuestos por *L. kunkeei* y *B. asteroides*, sobre la sobrevivencia de abejas se deben, en parte, a que las características antimicrobianas y bioestimulantes varían entre las cepas en función de sus capacidades metabólicas, pudiendo generar efectos aditivos o complementarios en mezcla. En algunos casos, las cepas probióticas pueden incluso favorecer al patógeno, como ocurre con *Lactobacillus rhamnosus*, que moduló negativamente genes inmunes y favoreció el desarrollo de *N. ceranae*. Asimismo, una sobrerregulación de la respuesta inmune, principalmente de proteínas antimicrobianas, podría alterar la composición microbiana y favorecer a comensales patógenos, como se ha observado en *Drosophila melanogaster* (Arredondo *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

1. En abejas melíferas la ingesta de consorcios en base a lactobacterias tiene un efecto diferencial en la sobrevivencia en *Apis mellifera*, dependiendo de las cepas que componen el consorcio y del estado sanitario de estas.
2. El consorcio 6 redujo significativamente la carga relativa de *Nosema ceranae* en abejas infectadas con este patógeno en el período total de evaluación y disminuyó significativamente la carga relativa de DWV en abejas infectadas con dicho patógeno y en abejas co-infectadas con DWV y *N. ceranae*.
3. El consorcio 6 no tuvo un efecto significativo en los niveles de expresión relativa del gen abaecina en ninguno de los tratamientos, pero sí incrementó la expresión del gen defensina en abejas infectadas con *Nosema ceranae*.

REFERENCIAS

1. Anderson, K.E. and P. Maes. 2021. Gut and colony microbiota of honey bees *Apis mellifera*: social immunity, opportunistic disease and survival overwinter. Res. Sq. doi: 10.21203/rs.3.rs-757584/v1 [en línea].
2. Antúnez, 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*). Environ. Microbiol. 11(9): 2284-2290.
3. Arredondo D., L. Castelli, M.P. Porrini, P.M. Garrido, M.J. Eguaras, P. Zunino and K. Antúnez. 2018. *Lactobacillus kunkeei* strains decreased the infection by

- honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Nosema ceranae*. *Benefic. Microbes* 9: 279-290.
4. Aufauvre, J., B. Misme-Aucouturier, B. Viguès, C. Texier, F. Delbac and N. Blot. 2014. Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS One* 9(3) doi: 10.1371/journal.pone.0091686 [en línea].
 5. Baffoni, L., Gaggia, F., Alberoni, D., Cabbri, R., Nanetti, A., Biavati, B. and Di Gioia, D., 2016. Effect of dietary supplementation of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains in *Apis mellifera* L. against *Nosema ceranae*. *Benef. Microbes* 7: 45-51.
 6. Bailey, L and B.V. Ball. 1991. Honey bee pathology. (2a. ed.). Academic Press. London, United Kingdom.
 7. Barriga, G.P., N. Cifuentes-Muñoz, P.A. Rivera, M. Gutierrez, A. Shmaryahu, P.D.T. Valenzuela and E.A. Engel. 2012. First detection and complete genome sequence of deformed wing virus in Chilean honeybees. *Virus genes* 45(3): 606-609.
 8. Boletín apícola. 2024. Boletín Apícola N°9. Servicio Agrícola y Ganadero. División de Protección Pecuaria. Santiago, Chile.
 9. Bottacini, F., Milani, C., Turrone, F., Sánchez, B., Foroni, E. and Duranti, S. 2012. *Bifidobacterium asteroides* PRL2011 Genome analysis reveals clues for colonization of the insect gut. *PLoS ONE* 7(9): e44229-
 10. Carreck, N.L., B.V. Ball and S.J. Martin. 2010. Honey bee colony collapse and changes in viral prevalence associated with *Varroa destructor*. *J. Apic. Res.* 49(1): 93-94.
 11. Čeksterytė, V., B. Kurtinaitienė, K. Jaškūnė and J. Kretavičius. 2020. The influence of storage conditions on invertase, glucose oxidase activity and free acidity of bee bread and bee-collected pollen mixed with honey and vegetable oils. *J. Apic. Res.* 59(5): 862-875.
 12. Chen, Y., J. Evans and M. Feldlaufer. 2006. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 92(3): 152-159.
 13. Chen, Y., J.D. Evans, I.B. Smith and J.S. Pettis. 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 97(2): 186-188.
 14. Chen, Y., Y. Zhao, J. Hammond, H. Hsu, J. Evans and M. Feldlaufer. 2004. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 87(2 y 3): 84-93.

15. Cornman, R.S., D.R. Tarpy, Y. Chen, L. Jeffreys, D. Lopez, J.S. Pettis, D. vanEngelsdorp and J.D. Evans. 2012. Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS One* 7(8) doi: 10.1371/journal.pone.0043562 [en línea].
16. Costa, C., G. Tanner, M. Lodesani, L. Maistrello and P. Neumann. 2011. Negative correlation between *Nosema ceranae* spore loads and deformed wing virus infection levels in adult honey bee workers. *Journal of Invertebrate Pathology* 108(3): 224-225.
17. Cox-Foster, D.L., S. Conlan, E.C. Holmes, G. Palacios, J.D. Evans, N.A. Moran, P. Quan, T. Briese, M. Hornig, D.M. Geiser, V. Martinson, D. vanEngelsdorp, A.L. Kalkstein, A. Drysdale, J. Hui, J. Zhai, L. Cui, S.K. Hutchison, J.F. Simons, M. Egholm, J.S. Pettis and W.I. Lipkin. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318(5848): 283-287.
18. Daisley, B.A., A.P. Pitek, J.A. Chmiel, K.F. Al, A.M. Chernyshova, K.M. Faragalla, J.P. Burton, G.J. Thompson and G. Reid. 2020. Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. *ISME J.* 14(2): 476-491.
19. Dillon, R.J. and V.M. Dillon. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 71-92.
20. Dosch, C., A. Manigk, T. Streicher, A. Tehel, R.J. Paxton and S. Tragust. 2021. The gut microbiota can provide viral tolerance in the honey bee. *Microorganisms* 9(4) doi: 10.3390/microorganisms9040871 [en línea].
21. Doublet, V., M.E. Natsopoulou, L. Zschiesche and R.J. Paxton. 2015. Within-host competition among the honey bees pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus is asymmetric and to the disadvantage of the virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 124: 31-34.
22. Doublet, V., Poeschl, Y., Gogol-Döring, A. 2017. Unity in defence: honeybee workers exhibit conserved molecular responses to diverse pathogens. *BMC Genomics* 18, 207
23. Endo, A. and S. Salminen. 2013. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 36(6): 444-448.
24. Engel, P., V.G. Martinson and N.A. Moran. 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109(27): 11002-11007.
25. Eler, S., O. Lewkowski, A. Poehlein and E. Forsgren. 2018. The curious case of *Achromobacter eurydice*, a gram-variable pleomorphic bacterium associated with European foulbrood disease in honeybees. *Microb. Ecol.* 75(1): 1-6.

26. Evans, J. D. 2006. Beepath: An ordered quantitative-PCR array for exploring honey bee immunity and disease. *Journal of Invertebrate Pathology* 93(2): 135-139
27. Evans, J.D. and D.L. Lopez. 2004. Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 97(3): 752-756.
28. Evans, J.D. and R.S. Schwarz. 2011. Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends Microbiol.* 19(12): 614-620.
29. Forsgren, E., T.C. Olofsson, A. Vásquez and I. Fries. 2010. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie* 41(1): 99-108.
30. Fries, I., F. Feng, A. da Silva, S.B. Slemenda, N.J. Pieniazek. 1996. *Nosema ceranae* n.sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). *Eur. J. Protistol.* 32(3): 356-365.
31. Fuentealba, J. y P. Linero. 2010. Informe de caso de *Nosema ceranae* en la Región del Bío Bío, Octubre de 2009 [en línea]. Servicio Agrícola y Ganadero, Chile.
<http://www.sag.cl/sites/default/files/informe_caso_nosema_ceranae_biobio_2009.pdf>. [Consulta: DIA MES AÑO].
32. Genersch, E. 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87(1): 87-97.
33. Gisder, S. and E. Genersch. 2013. Molecular differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* based on species-specific sequence differences in a protein coding gene. *J. Invertebr. Pathol.* 113(1): 1-6.
34. Higes, M., R. Martín-Hernández, E. Garrido-Bailón, A.V. González-Porto, P. García-Palencia, A. Meana, M.J. del Nozal, R. Mayo and J.L. Bernal. 2009. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environ. Microbiol. Rep.* 1(2): 110-113.
35. Huang, WF., Jiang, JH., Chen, YW. And CH. Wang. 2007. A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38(1): 30-37.
36. Iturra, C. 2023. Temporada apícola 2022-23. ODEPA. Santiago, Chile
37. Iorizzo, M., S.J. Lombardi, S. Ganassi, B. Testa, M. Ianiro, F. Letizia, M. Succi, P. Tremonte, F. Vergalito, A. Cozzolino, E. Sorrentino, R. Coppola, S. Petrarca, M. Mancini and A. De Cristofaro. 2020. Antagonistic activity against *Ascosphaera apis* and functional properties of *Lactobacillus kunkeei* strains. *Antibiotics* 9(5) doi: 10.3390/antibiotics9050262 [en línea].

38. Iwasa, T., N. Motoyama, J.T. Ambrose and R.M. Roe. 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *J. Crop Prot.* 23(5): 371-378.
39. Janashia, I. and C. Alaux. 2016. Specific immune stimulation by endogenous bacteria in honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 109(3): 1474-1477.
40. Klee, J., A.M. Besana, E. Genersch, S. Gisder, A. Nanetti, D.Q. Tam, T.X. Chinh, F. Puerta, J.M. Ruz, P. Kryger, D. Message, F. Hatjina, S. Korpela, I. Fries and R.J. Paxton. 2007. Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* 96(1): 1-10.
41. Klein, A., B.E. 7, J.H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S.A. Cunningham, C. Kremen and T. Tscharntke. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. Royal Soc.* 274(1608): 303-313.
42. Kremen, C. and L.K. M'Gonigle. 2015. Small-scale restoration in the intensive agricultural landscapes supports more specialized and less mobile pollinator species. *J. Appl. Ecol.* 52(3): 602-610.
43. Lamei, S., Stephan, J.G., Riesbeck, K., Vasquez, A., Olofsson, T., Nilson, B., Forsgren, E. 2019. The secretome of Honey bee-specific lactic acid bacteria inhibits *Paenibacillus larvae* growth. *Journal of Apicultural Research.* 58(3): 405-412
44. Lee, F.J., D.B. Rusch, F.J. Stewart, H.R. Mattila and I.L.G. Newton. 2015. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environ. Microbiol.* 17(3): 796-815.
45. Li, W., Y. Chen and S.C. Cook. 2018. Chronic *Nosema ceranae* infection inflicts comprehensive and persistent immunosuppression and accelerated lipid loss in host *Apis mellifera* honey bees. *Int. J. Parasitol.* 48(6): 433-444.
46. Li, J., M.C. Heerman, J.D. Evans, R. Rose, W. Li, C. Rodríguez-García, G. DeGrandi-Hoffman, Y. Zhao, S. Huang, Z. Li, M. Hamilton and Y. Chen. 2019. Pollen reverses decreased lifespan, altered nutritional metabolism, and suppressed immunity in honey bees (*Apis mellifera*) treated with antibiotics. *J. Exp. Biol.* doi: 10.1242/jeb.202077 [en línea].
47. Martin, S. J., & Brettell, L. E. 2019. Deformed wing virus in honeybees and other insects. *Annual Review of Virology*, 6, 49–69.
48. Martin, S. J., Highfield, A. C., Brettell, L., Villalobos, E. M., Budge, G. E., Powell, M., Nikaido, S. & D. Schroeder. 2012. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science*, 336(6086), 1304-1306.

49. Martinson, V.G., J. Moy and N.A. Moran. 2012. Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(8): 2830-2840.
50. Moran, N.A. 2015. Genomics of the honey bee microbiome. *Curr. Opin. Insect Sci.* 10: 22-28.
51. Olofsson, T.C. and A. Vasquez. 2008. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr. Microbiol.* 57(4): 356-363.
52. Pachla, A., A.A. Ptasińska, M. Wicha, M. Kunat, J. Wydrych, E. Oleńska and W. Małek. 2021. Insight into probiotic properties of lactic acid bacterial endosymbionts of *Apis mellifera* L. derived from the Polish apiary. *Saudi J. Biol. Sci.* 28(3): 1890-1899.
53. Porrini, M.P., P.M. Garrido and M.J. Eguaras. 2013. Individual feeding of honey bees: modification of the Rinderer technique. *J. Apic. Res.* 52(5): 194-195.
54. Potts, S.G., J.C. Biesmeijer, C. Kremen, P. Neumann, O. Schweiger and W.E. Kunin. 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25(6): 345-353.
55. Praet, J., I. Meeus, M. Cnockaert, K. Houf, G. Smagghe and P. Vandamme. 2015. Novel lactic acid bacteria isolated from the bumble bee gut: *Convivina intestini* gen. nov., sp. nov., *Lactobacillus bombicola* sp. nov., and *Weissella bombi* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 107: 1337-1349.
56. Praet, J., A. Parmentier, R. Schmid-Hempel, I. Meeus, G. Smagghe and P. Vandamme. 2018. Large-scale cultivation of the bumblebee gut microbiota reveals an underestimated bacterial species diversity capable of pathogen inhibition. *Environ. Microbiol.* 20(1): 214-227.
57. Ptasińska, A.A., J. Paleolog and G. Borsuk. 2016. *Nosema ceranae* infection promotes proliferation of yeasts in honey bee intestines. *PloS One* 11(10) doi: 10.1371/journal.pone.0164477 [en línea].
58. Rangberg, A., G. Mathiesen, G.V. Amdam and D.B. Diep. 2015. The paratransgenic potential of *Lactobacillus kunkeei* in the honey bee *Apis mellifera*. *Benef. Microbes* 6(4): 513-523.
59. Raymann, K., Z. Shaffer and N.A. Moran. 2017. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biol.* 15(3) doi: 10.1371/journal.pbio.2001861 [en línea].
60. Retschnig, G., G.R. Williams, M.M. Mehmman, O. Yañez, J.R. de Miranda and P. Neumann. 2014. Sex-specific differences in pathogen susceptibility in honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS One* 9(1) doi: 10.1371/journal.pone.0085261 [en línea].

61. Reybroeck, W., E. Daeseleire, H.F. De Brabander and L. Herman. 2012. Antimicrobials in beekeeping. *Vet. Microbiol.* 158(1 y 2): 1-11.
62. Ricigliano, V.A., W. Fitz, D.C. Copeland, B.M. Mott, P. Maes, A.S. Floyd, A. Dockstader and K.E. Anderson. 2017. The impact of pollen consumption on honey bee (*Apis mellifera*) digestive physiology and carbohydrate metabolism. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 96(2) doi: 10.1002/arch.21406 [en línea].
63. Rodríguez, M., M. Vargas, M. Gerding, H. Navarro and K. Antúnez. 2012. Viral infection and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Chile. *J. Apic. Res.* 51(3): 285-287.
64. Sinpoo, C., R.J. Paxton, T. Disayathanoowat, S. Krongdang, P. Chantawannakul. 2018. Impact of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* of individual worker bees of the two host species (*Apis cerana* and *Apis mellifera*) and regulation of host immune response. *J. Insect Physiol.* 105: 1-8.
65. Teixeira, E.W., Y. Chen, D. Message, J. Pettis and J.D. Evans. 2008. Virus infections in Brazilian honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 99(1): 117-119.
66. Vargas, M., N. Arismendi, G. Riveros, N. Zapata, A. Bruna, M. Vidal, M. Rodríguez and M. Gerding. 2017. Viral and intestinal diseases detected in *Apis mellifera* in Central and Southern Chile. *Chil. J. Agric. Res.* 77(3): 243-249.
67. Venturini, E. M., Drummond, F. A., Hoshide, A. K., Dibble, A. C., and Stack, L.B. 2017. Pollination reservoirs for wild bee hábitat enhancement in cropping systems: a review. *Agroecol. Sustain. Food Syst.* 41:2101-42.
68. Vieco-Saiz, N., Y. Belguesmia, R. Raspoet, E. Auclair, F. Gancel, I. Kempf and D. Drider. 2019. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. *Front. Microbiol.* 10(57) doi: 10.3389/fmicb.2019.00057 [en línea].
69. Yoshiyama, M., M. Wu, Y. Sugimura, N. Takaya, H. Kimoto-Nira and C. Suzuki. 2013. Inhibition of *Paenibacillus larvae* by lactic acid bacteria isolated from fermented materials. *J. Invertebr. Pathol.* 112(1): 62-67.
70. Yue, C. and E. Genersch. 2005. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *J. Gen. Virol.* 86(12): 3419-3424.
71. Zheng, H.-Q., Gong, H.-R., Huang, S.-K., Sohr, A., Hu, F.-L., Chen, Y.P. 2015. Evidence of the synergistic effect of honey bee pathogens *Nosema ceranae* and deformed wing virus. *Vet. Microbiol.* doi: 10.1016/j.vetmic.2015.02.003 [en línea].