

# Tesis de Doctorado en Agronomía

Desarrollo de un nuevo producto nutricional  
para abejas (*Apis mellifera* L.)

María Agustina Rodríguez



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
 Consejo Superior Universitario  
 BAHIA BLANCA - REPUBLICA ARGENTINA

“2024 - 30° Aniversario de la  
 Consagración Constitucional de la  
 Autonomía Universitaria”

## PREFACIO

*Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía durante el período comprendido entre el 27 de agosto de 2019 y el 19 de diciembre de 2024, bajo la dirección del Dr. Francisco J. Reynaldi, Universidad Nacional de La Plata y la co-dirección de la Dra. Leticia A. Fernández.*

*Lic. en Cs. Biológicas María Agustina Rodríguez*



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
 Subsecretaría de Posgrado

La presente tesis ha sido aprobada el ..... 13/06/2025 .....  
 mereciendo la calificación de ..... 10 (SOBRESALIENTE) .....

La presentación de la versión final de la tesis deberá estar acompañada por una licencia de depósito en el Repositorio Institucional Digital y un documento en soporte digital, según las normas que establezca la Subsecretaría de Posgrado, que contenga las siguientes declaraciones:

*La versión final digital de tesis presentada se entrega como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía durante el período comprendido entre el 27 de agosto de 2019 y el 19 de diciembre de 2024, bajo la dirección del Dr. Francisco J. Reynaldi, Universidad Nacional de La Plata y la co-dirección de la Dra. Leticia A. Fernández.*



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
*Consejo Superior Universitario*  
BAHIA BLANCA - REPUBLICA ARGENTINA

“2024 - 30° Aniversario de la  
Consagración Constitucional de la  
Autonomía Universitaria”

*[Firma y aclaración de la/del tesista]*

*Certifico/amos que en la versión final digital de tesis presentada fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.*

*[Firma y aclaración de las/os directoras/es]*

Para la suscripción de este documento, en caso de que la/el tesista y/o las/os directoras/es no cuenten con firma digital, será de aplicación el procedimiento establecido en la resolución CSU- 666/22.

***Dedicada a mis padres, Mónica y Roberto,  
mi gran ejemplo a seguir.  
Quienes me educaron en los valores  
del estudio y la dedicación,  
desde el cariño y el amor***

## AGRADECIMIENTOS

- A mis directores de tesis, Dra. Leticia Fernández y Dr. Francisco Reynaldi. Por acompañarme y enseñarme tanto durante estos años de doctorado, siempre dispuestos a ayudarme y guiarme con cariño.
- Nuevamente, a Leti. Por su calidez, su generosidad, su oído atento y sus consejos, no sólo en lo académico sino en lo personal. Gracias por recibirme siempre con una sonrisa y estar para lo que necesite, incondicional.
- A los integrantes del Laboratorio de Estudios Apícolas, Liliana, Cecilia, Soledad, Gisela, Pili, Luciano, Victoria y Matías. Gracias por hacer del LabEA un lugar de trabajo cálido y ayudarme siempre que los necesité.
- A Matías, mi compañero de “colmena”, por su buena onda de todos los días y su gran ayuda en los ensayos a campo.
- A Elian Tourn, de la Cooperativa Apícola Pampero, por su colaboración en este trabajo.
- A Juan Echazarreta y Mauricio Schwert, por ayudarme en el trabajo a campo en las colmenas, siempre con muy buena predisposición. A Louis por colaborar durante su estadía en Argentina con los ensayos a campo y enseñarme un poco de alemán.
- A mis compañeros de docencia de la Cátedra de Microbiología Agrícola de la UNS, por apoyar mi formación doctoral.
- A Nicolás Tamburi, por asesorarme en los análisis estadísticos, siempre con muy buena predisposición.
- A Marina Díaz, por ayudarme con los ensayos de Biología Molecular tan amablemente y a Cristian Gallo, por la ayuda en la interpretación de datos de Bioinformática.
- A Mónica Pérez, del Departamento de Química de la UNS, por su ayuda en la realización de los análisis químicos de este trabajo.
- A Claudio Ferrarelo y Miryam Crespo, integrantes del LANAQUI; Cecilia Costantino y Juan Carlos Gasparoni, por su ayuda en la realización de los análisis químicos de este trabajo.
- A Maximiliano Garay, Pablo Zalba, Luciano Rodríguez y Martín Sarti, por ayudarme a utilizar equipos e insumos para distintos ensayos.
- A Carmen Salerno, por estar dispuesta a ayudarme y recibirme siempre tan cariñosamente.

- A Thomas Ibáñez, mi primer becario, por su gran ayuda y sus ganas de aprender y colaborar.
- A los integrantes del CEMIBA, Mumi, Marcos, Maricel, Ma. Laura, por hacerme sentir muy cómoda cuando fui a trabajar a La Plata y hacer que siempre quiera volver.
- A María de la Paz Moliné, Liesel Gende y María Emilia del CIAS, Universidad Nacional de Mar del Plata, por recibirme con los brazos abiertos y enseñarme muchísimo sobre patógenos de abejas.
- A Miguel Corona y Jay Evans, del Bee Research Laboratory, United States Department of Agriculture, por su colaboración para realizar el análisis de secuenciación masiva del kéfir.
- Al Dr. Graham J. Thompson, del Department of Biology de Western University (London, Ontario, Canadá), por recibirme tan bien en su país y permitirme trabajar y realizar una estadía en su laboratorio. A Brendan Daisley, por ser mi primer contacto en Canadá y ayudarme con mis ensayos. A Sophie Killam, una gran amiga y compañera de laboratorio. A Gurpreet Dhami, por su ayuda en la realización de ensayos de Biología Molecular. A Mitchell Zimmer, por tomar excelentes fotografías de mis ensayos. A Ana, Julia y Shenella, Anica Bjelica, Robert Cumming y Brendan Charles, del departamento de Biología, por ayudarme para poder realizar distintos ensayos.
- A los jurados de esta tesis, por la corrección del manuscrito.
- Al Departamento de Agronomía de la UNS, donde llevé a cabo mi trabajo y me sentí muy bien recibida en todo momento.
- A la Universidad Nacional del Sur, por ser mi lugar de estudio y formación, una excelente casa de altos estudios de la que estoy orgullosa de ser parte.
- A la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por su apoyo financiero para poder realizar y finalizar mi tesis doctoral.
- Especialmente, a mi familia. A mis padres, Mónica y Roberto, por su apoyo, su amor y cariño incondicional. A mis hermanas, Lucía y Julieta, por acompañarme siempre, creciendo juntas. Gracias porque sé que puedo encontrar en cada uno de ustedes la calidez del hogar.

## RESUMEN

En los últimos años, la población mundial de las abejas melíferas ha experimentado una gran mortalidad. Es necesario recurrir a alternativas naturales para controlar enfermedades y mejorar el bienestar general de las colmenas. Entre ellas, los probióticos constituyen una propuesta natural, fácil de aplicar y que no deja residuos contaminantes en la colmena. El objetivo de esta tesis fue desarrollar un suplemento nutricional con potencial probiótico para alimentación de abejas (*Apis mellifera* L.) constituido por microorganismos aislados de kéfir de agua para contribuir a mitigar los actuales problemas nutricionales de la colmena.

En la etapa inicial, se caracterizó química y microbiológicamente un kéfir de agua elaborado en el laboratorio. Se encontró una compleja comunidad microbiana, constituida principalmente por bacterias del ácido láctico y levaduras, las cuales fueron aisladas y caracterizadas fenotípicamente. Luego, se probaron *in vitro* las propiedades antimicrobianas de los sobrenadantes microbianos frente a dos patógenos de interés apícola, *Paenibacillus larvae* y *Ascosphaera apis*. A continuación, se evaluó la toxicidad de los sobrenadantes de las bacterias y levaduras que presentaron una fuerte actividad inhibitoria *in vitro*. Los sobrenadantes no resultaron tóxicos para las larvas, y, por lo tanto, se evaluó su capacidad probiótica mediante pruebas de tolerancia *in vitro*: capacidad de crecimiento a diferentes pHs y temperaturas y distintas concentraciones de NaCl y de jarabe. Las bacterias y levaduras con mayor supervivencia se seleccionaron como potenciales probióticos y fueron identificadas genotípicamente.

En una última etapa, se desarrolló en el laboratorio el nuevo suplemento nutricional para abejas, incorporando la cepa de la bacteria y la levadura probióticas, por separado. Posteriormente, se realizaron ensayos a campo para evaluar la efectividad del suplemento, la preferencia por el mismo y determinar la condición nutricional de las abejas que lo consumieron. Las dos cepas microbianas presentaron la misma supervivencia en las condiciones de campo. Los suplementos probióticos fueron aceptados y consumidos por las abejas. Más aún, la incorporación de los microorganismos al suplemento mantuvo el estado nutricional de las abejas adultas y las pupas.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en esta tesis, se aceptan las hipótesis propuestas: los microorganismos aislados a partir de kéfir de agua tienen el potencial para actuar como probiótico y, el suplemento nutricional con potencial probiótico constituye una alternativa eficaz para enfrentar los problemas nutricionales

que se evidencian actualmente a nivel de colonia.

El trabajo realizado en esta tesis permitió obtener información de utilidad en la investigación apícola para mejorar la nutrición y bienestar de las abejas. Además, reporta por primera vez la actividad antimicrobiana de especies de levaduras del kéfir frente a dos patógenos apícolas de interés global. Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que los probióticos son una alternativa con gran potencial para la apicultura. El uso de probióticos es una temática muy reciente y novedosa y, por lo tanto, es importante continuar con las investigaciones en esta área para lograr el manejo sustentable de las abejas, el cual se ha convertido en un gran desafío.

**Palabras claves:** *Apis mellifera*, probióticos, kéfir de agua, suplemento nutricional, microbiota.

## ABSTRACT

In recent years, the global population of honey bees has been facing high mortality rates. Natural alternatives that could control diseases and also improve bee health are needed. Among them, probiotics represent a potential adjunct or alternative that can easily be applied to bee colonies without contamination of their products. In this context, the main goal of this thesis was to develop a nutritional supplement with potential probiotic microorganisms isolated from water kefir to feed honey bees (*Apis mellifera* L.), as a therapy against nutritional issues that affect bee hives.

In the initial stage, a water kefir produced at the laboratory was chemically and microbiologically characterized. A complex microbial community was found, consisting mainly of lactic acid bacteria and yeasts, which were isolated and phenotypically characterized. Then, the antimicrobial properties of the microbial supernatants were tested *in vitro* against two pathogens affecting honey bees on a global scale, *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. Following, the toxicity of the supernatants of bacteria and yeasts that presented a strong inhibitory activity *in vitro* was evaluated. The supernatants were not toxic to bee larvae and, consequently, their metabolic properties were analyzed through several *in vitro* tests. The bacteria and yeasts that best survived against the stress tests were selected as potential probiotics and were genotypically identified.

In the final stage, a novel nutritional supplement to feed bees was developed at the lab, containing the selected probiotic bacteria and yeast, separately. Next, a series of field trials was performed to assess the efficacy of the nutritional supplement and the impact on bee's nutrition. Both microbial strains showed the same survival in the supplement in the field conditions. The probiotic supplements were well accepted and consumed by honey bees. Moreover, the incorporation of the microorganisms to the supplement maintained the nutritional status of the bees and pupae.

Based on the results obtained in the present thesis, both hypotheses are accepted: the microorganisms isolated from water kefir have the potential to be used as probiotics, and, the nutritional supplement with probiotic potential constitutes an effective alternative for colony feeding.

This work provides valuable information that can be helpful and useful in the apicultural research to improve bees' nutrition and health. Moreover, it proves the antimicrobial activity of yeast species from kefir against two bee pathogens of global importance, which has not been reported before. The results show that probiotics are an

alternative with great potential for apiculture worldwide. The use of probiotics is a recent and novel thematic, and, therefore, it is important to continue research in this area to manage honey bees in a sustainable way, which has become increasingly difficult.

**Key words:** *Apis mellifera*, probiotics, water kefir, nutritional supplement, microbiota.

## ÍNDICE

<b>SIGLAS Y ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>Capítulo 1: Introducción general</b> .....	3
<b>1.1. La Apicultura en Argentina</b> .....	3
<b>1.2. Definición del problema: Las abejas y el medio ambiente</b> .....	3
<b>1.3. Nutrición y su relación con la microbiota de las abejas</b> .....	5
<b>1.4. Probióticos</b> .....	7
<b>1.5. Probióticos para abejas</b> .....	9
<b>1.6. Suplementos nutricionales para abejas</b> .....	10
<b>1.7. Kéfir de agua: fuente de potenciales probióticos</b> .....	11
<b>1.8. Hipótesis y objetivos</b> .....	12
<b>1.9. Esquema de trabajo</b> .....	13
<b>Capítulo 2: Caracterización microbiológica y química del kéfir de agua</b> .....	15
<b>2.1. Introducción</b> .....	15
<b>2.2. Materiales y Métodos</b> .....	19
<b>2.2.1. Preparación de kéfir de agua en el laboratorio</b> .....	19
<b>2.2.2. Análisis químico del kéfir</b> .....	19
<b>2.2.3. Recuento de microorganismos viables presentes en el kéfir</b> .....	20
<b>2.2.4. Evaluación de la composición microbiana del kéfir en el tiempo</b> .....	20
<b>2.2.5. Secuenciación masiva del kéfir de agua</b> .....	21
<b>2.2.5.1. Purificación del ADN bacteriano</b> .....	21
<b>2.2.5.2. Amplificación por PCR y secuenciación de ADN</b> .....	21
<b>2.2.5.3. Taxonomía y abundancia relativa</b> .....	22
<b>2.2.6. Análisis estadístico</b> .....	22
<b>2.3. Resultados</b> .....	23
<b>2.3.1. Análisis químico del kéfir de agua</b> .....	23
<b>2.3.2. Enumeración de microorganismos del kéfir</b> .....	23
<b>2.3.3. Comparación del recuento de microorganismos entre el sobrenadante y los gránulos de kéfir</b> .....	24
<b>2.3.4. Evaluación de la composición microbiana del kéfir en el tiempo</b> .....	24
<b>2.3.5. Secuenciación masiva del kéfir de agua</b> .....	27
<b>2.3.5.1. Cobertura de secuenciación</b> .....	27
<b>2.3.5.2. Diversidad de las comunidades bacterianas</b> .....	27
<b>2.3.5.3. Análisis taxonómico y abundancia relativa de las comunidades bacterianas en cada muestra</b> .....	28

2.4. Discusión.....	28
<b>Capítulo 3: Estudios <i>in vitro</i> de la actividad antimicrobiana de microorganismos aislados del kéfir de agua frente a patógenos de interés apícola.....</b>	<b>33</b>
3.1. Introducción.....	33
3.2. Materiales y métodos .....	38
3.2.1. Aislamiento y caracterización fenotípica de microorganismos del kéfir de agua .....	38
3.2.1.1. Preparación de sobrenadantes de los cultivos microbianos .....	38
3.2.2. Cepas patógenas de larvas de abejas .....	39
3.2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	39
3.2.3.1. Ensayo frente a <i>Paenibacillus larvae</i> .....	40
3.2.3.2. Ensayo frente a <i>Ascosphaera apis</i> .....	40
3.2.4. Determinación de la CIM de los sobrenadantes de bacterias y levaduras.....	41
3.2.5. Ensayos <i>in vitro</i> en larvas de abejas .....	42
3.2.5.1. Preparación del alimento para larvas .....	42
3.2.5.2. Traslarve .....	42
3.2.6. Ensayos preliminares <i>in vitro</i> sobre el efecto del kéfir de agua en la alimentación de larvas.....	44
3.2.7. Ensayos de toxicidad .....	44
3.2.8. Ensayos de estrés en cría de abejas <i>in vitro</i> por infección con patógenos larvales.....	44
3.2.8.1. <i>Paenibacillus larvae</i> : capacidad antibacteriana del aislamiento de la bacteria S6.....	45
3.2.8.2. <i>Ascosphaera apis</i> : capacidad antifúngica del aislamiento de la levadura LK3.....	45
3.2.9. Análisis estadístico.....	46
3.3. Resultados .....	46
3.3.1. Aislamiento y caracterización fenotípica de los microorganismos seleccionados a partir del kéfir de agua .....	46
3.3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	47
3.3.2.1. Ensayo frente a <i>Paenibacillus larvae</i> .....	47
3.3.2.2. Ensayo frente <i>Ascosphaera apis</i> .....	49
3.3.3. Evaluación del efecto de los sobrenadantes de bacterias y levaduras sobre <i>P. larvae</i> por el método de dilución en caldo.....	50
3.3.4. Ensayos <i>in vitro</i> en larvas de abejas .....	50

3.3.4.1.	Ensayos preliminares sobre el efecto del kéfir de agua en la alimentación de larvas.....	50
3.3.4.2.	Ensayos de toxicidad.....	51
3.3.5.	Ensayos de estrés por infección con patógenos de la cría de abejas.....	52
3.3.5.1.	Efecto de los sobrenadantes sobre la supervivencia larval: Ensayo con <i>P. larvae</i> .....	52
3.3.5.2.	Efecto de los sobrenadantes sobre la supervivencia larval: Ensayo con <i>A. apis</i> .....	53
3.4.	Discusión.....	54
<b>Capítulo 4: Identificación y evaluación de las propiedades probióticas de bacterias con actividad antimicrobiana.....</b>		<b>59</b>
4.1.	Introducción.....	59
4.2.	Materiales y métodos.....	64
4.2.1.	Identificación genotípica de las bacterias seleccionadas.....	64
4.2.1.1.	Extracción de ADN de bacterias.....	64
4.2.1.2.	Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	64
4.2.2.	Evaluación de la capacidad probiótica.....	65
4.2.2.1.	Caracterización fisiológica de las bacterias seleccionadas.....	65
4.2.2.2.	Ensayo de tolerancia osmótica.....	65
4.2.2.3.	Cinética de crecimiento.....	65
4.2.2.4.	Evaluación de la supervivencia a la liofilización.....	66
4.2.3.	Estudio del perfil de fermentación de carbohidratos.....	66
4.2.4.	Caracterización de los metabolitos presentes en los sobrenadantes microbianos por Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.....	67
4.2.5.	Análisis estadístico.....	67
4.3.	Resultados.....	68
4.3.1.	Identificación genotípica de las bacterias seleccionadas.....	68
4.3.2.	Evaluación de la capacidad probiótica.....	70
4.3.2.1.	Tolerancia a pH ácido.....	70
4.3.2.2.	Resistencia a altas concentraciones de NaCl.....	71
4.3.2.3.	Crecimiento a diferentes temperaturas.....	73
4.3.2.4.	Tolerancia osmótica.....	74
4.3.2.5.	Cinética de crecimiento.....	76

4.3.2.6.	Supervivencia posterior a la liofilización.....	77
4.3.3.	Estudio del perfil de utilización de carbohidratos.....	78
4.3.4.	Caracterización de los metabolitos presentes en los sobrenadantes microbianos por Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear .....	81
4.4.	Discusión.....	84
<b>Capítulo 5: Identificación y evaluación de las propiedades probióticas de levaduras con actividad antimicrobiana.....</b>		
5.1.	Introducción.....	91
5.2.	Materiales y Métodos .....	95
5.2.1.	Identificación genotípica de las levaduras seleccionadas.....	95
5.2.1.1.	Extracción de ADN de levaduras .....	95
5.2.1.2.	Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	95
5.2.2.	Evaluación de la capacidad probiótica.....	96
5.2.2.1.	Caracterización fisiológica de las levaduras seleccionadas.....	96
5.2.2.2.	Ensayo de tolerancia osmótica .....	96
5.2.2.3.	Cinética de crecimiento .....	97
5.2.2.4.	Evaluación de la supervivencia posterior a la liofilización .....	97
5.2.3.	Caracterización de los metabolitos presentes en los sobrenadantes microbianos por Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear .....	97
5.2.4.	Análisis estadístico.....	98
5.3.	Resultados .....	98
5.3.1.	Identificación genotípica de las levaduras seleccionadas.....	98
5.3.2.	Evaluación de la capacidad probiótica.....	100
5.3.2.1.	Tolerancia a pH ácido.....	100
5.3.2.2.	Resistencia a altas concentraciones de NaCl .....	101
5.3.2.3.	Crecimiento a diferentes temperaturas .....	103
5.3.2.4.	Tolerancia osmótica .....	104
5.3.2.5.	Cinética de crecimiento .....	106
5.3.2.6.	Supervivencia posterior a la liofilización.....	107
5.3.3.	Caracterización de los metabolitos presentes en los sobrenadantes microbianos por Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear .....	108
5.4.	Discusión.....	110
<b>Capítulo 6: Evaluación a campo de un producto nutricional elaborado con microorganismos probióticos aislados de kéfir de agua.....</b>		
6.1.	Introducción.....	116

<b>6.2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>119</b>
<b>6.2.1. Descripción de los microorganismos probióticos seleccionados.....</b>	<b>119</b>
<b>6.2.2. Preparación del suplemento con un probiótico en el laboratorio.....</b>	<b>120</b>
<b>6.2.3. Ensayos de preferencia a campo en las colmenas.....</b>	<b>121</b>
<b>6.2.4. Evaluación de la condición nutricional de abejas adultas y pupas.....</b>	<b>123</b>
<b>6.2.4.1. Abejas adultas.....</b>	<b>123</b>
<b>6.2.4.2. Pupas de abejas.....</b>	<b>123</b>
<b>6.2.5. Supervivencia del microorganismo probiótico en el suplemento nutricional desarrollado .....</b>	<b>124</b>
<b>6.2.6. Análisis estadístico.....</b>	<b>124</b>
<b>6.3. Resultados .....</b>	<b>125</b>
<b>6.3.1. Evaluación de la preferencia de las abejas por los tratamientos</b>	<b>125</b>
<b>6.3.1.1. Ensayo con la bacteria probiótica .....</b>	<b>125</b>
<b>6.3.1.2. Ensayo con la levadura probiótica .....</b>	<b>125</b>
<b>6.3.2. Evaluación de la condición nutricional de abejas y de pupas .....</b>	<b>125</b>
<b>6.3.2.1. Abejas adultas.....</b>	<b>125</b>
<b>6.3.2.2. Pupas de abejas.....</b>	<b>127</b>
<b>6.3.3. Supervivencia del microorganismo probiótico en el suplemento nutricional desarrollado .....</b>	<b>128</b>
<b>6.3.3.1. Comparación de la supervivencia de los microorganismos probióticos .....</b>	<b>129</b>
<b>6.4. Discusión.....</b>	<b>129</b>
<b>Capítulo 7: Consideraciones finales y perspectivas .....</b>	<b>133</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>138</b>
<b>ANEXO - Publicaciones científicas y presentaciones a Congresos.....</b>	<b>164</b>

## SIGLAS Y ABREVIATURAS

<sup>1</sup>H-RMN: Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H

Abs: Absorbancia

ADE: Agua destilada estéril

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

BAL: Bacterias del ácido láctico

CC: Control de crecimiento

CE: Control de esterilidad

CIM: Concentración inhibitoria mínima

CP: Componentes principales

dNTPs: Desoxirribonucleótido trifosfato

D.O: Densidad óptica

DMS: Prueba de Diferencia Mínima Significativa

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

GRAS: Generally Recognized as Safe

HyL: Hongos y levaduras

ISAPP: Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics)

ITS: Espacios (regiones) de intergenes ribosomales transcritos (Internal Transcribed Spacer)

LSD: Diferencia mínima significativa (Least Significant Difference)

MRS: Man Rogosa Sharpe

MYPGP: Mueller-Hinton, extracto de levadura, fosfato potásico, glucosa y piruvato de sodio

OMS: Organización Mundial de la Salud

OTU: Unidad taxonómica operativa (Operational Taxonomic Unit)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PBS: Tampón fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline)

rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Laurilsulfato sódico

SLC: Sobrenadante libre de células

Tris: Trisaminometano

UFC: Unidades formadoras de colonias

UV: Ultravioleta

YGPSA: extracto de levadura, glucosa,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , almidón soluble y agar

## **Capítulo 1: Introducción general**

### **1.1. La Apicultura en Argentina**

La apicultura en Argentina es sinónimo de arraigo, desarrollo territorial, fuente de divisas y empleo, además de ser una actividad complementaria y sinérgica en la producción de alimentos (Barreto, 2018). En el hemisferio sur, Argentina es el país con mayor cantidad de colmenas y es reconocido por la calidad de la miel que produce en gran parte de su territorio. Posee una cantidad aproximada de 28.600 apicultores que explotan alrededor de 2,5 millones de colmenas en todo el país (Subsecretaría de Programación Microeconómica, Ministerio de Hacienda, 2018). Esta condición se basa en las grandes extensiones de pastizales naturales, la abundante flora autóctona y las enormes superficies implantadas con diversos cultivos agroindustriales que se encuentran a disposición de la producción apícola. El complejo productivo apícola constituye un ejemplo de cadena agroalimentaria consolidada. Esta situación no solo posiciona al país dentro de los líderes en producción y exportación de miel, sino que es considerado como referente internacional en el desarrollo de tecnologías de producción gracias a la institucionalidad vinculada al sector productivo (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2022). La actividad apícola en la provincia de Buenos Aires es sinónimo de territorialidad y diversificación productiva. En cada uno de los 135 municipios hay productores, con diferentes escalas de producción, que realizan esta labor, que adicionalmente aporta una gran variedad de servicios ecosistémicos. La apicultura es una de las pocas actividades que es anexa a otras producciones agropecuarias, favoreciendo la polinización de cultivos forrajeros, hortícolas y frutícolas, generando valor agregado en los productos de la apicultura, mejorando los cultivos y cuidando el ambiente. Para el sector, Buenos Aires es la provincia más importante a nivel nacional. Cuenta con 1.5 millones de colmenas digitalizadas, representadas por 6.000 productores apícolas, de las que se extrae y procesa miel en 950 establecimientos apícolas. Esto genera un procesado anual de 38 millones de kilos de miel (Guardia López, 2024).

### **1.2. Definición del problema: Las abejas y el medio ambiente**

Las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) cumplen un rol fundamental en la sustentabilidad de los ecosistemas a través del impacto que generan en la población y reproducción de las especies de plantas en áreas naturales (Biesmeijer *et al.*, 2006; Potts *et al.*, 2016). Son, posiblemente, los insectos polinizadores más importantes a nivel

global debido a su influencia a gran escala en el suministro internacional de alimentos y en las economías agrícolas. Datos provenientes de más de 200 países demuestran que el 75,7 % (87/115) de los principales cultivos alimenticios del mundo dependen en cierta medida de la polinización llevada a cabo por los animales, generalmente, insectos. Se estima que, de todos los cultivos que requieren de la polinización, el 59,8 % (52/87) dependen específicamente de las abejas melíferas (Klein *et al.*, 2007).

En las últimas décadas, a pesar de su rol esencial en el servicio de polinización de cultivos y especies naturales, la población global de las abejas está sufriendo una elevada mortalidad. Entre los principales factores de esta merma poblacional se pueden mencionar las deficiencias nutricionales asociadas a la pérdida de hábitats, la exposición a pesticidas y antibióticos y la presencia de patógenos y parásitos (Goulson *et al.*, 2015).

Las prácticas intensivas de la agricultura moderna, caracterizadas por el monocultivo, así como la fragmentación del hábitat y la pérdida de zonas silvestres, provocan que las fuentes de recursos para las abejas sean escasas, impidiéndoles una óptima alimentación (Foley *et al.*, 2012). En los últimos años, en numerosas regiones de nuestro país, el significativo avance de la frontera agrícola generó una reducción cuantitativa y temporal de fuentes alimenticias. Así, quedó reducida la superficie de la flora natural, lo que repercutió negativamente en la actividad apícola (Marini, 2008; Haedo *et al.*, 2017). Existen datos que documentan que la mencionada modificación del agroecosistema que experimentan muchas regiones ha reducido las fuentes de polen y néctar provocando estrés nutricional en las colmenas, problemas sanitarios y bajos rendimientos (Naug, 2009; Dolezal y Toth, 2018).

Este avance de la agricultura también ha ido acompañado por un importante aumento en el uso de agroquímicos que afectan desfavorablemente a las especies polinizadoras, entre ellas la abeja. Más aún, el uso de antibióticos y productos químicos incrementa el riesgo de contaminación de todos los productos de la colmena (García Girou, 2008).

Respecto a los patógenos, entre los principales que afectan a la cría de las abejas melíferas se encuentra *Paenibacillus larvae*. Es una bacteria esporulada causante de la Loque americana, enfermedad bacteriana más severa que afecta a las larvas de abejas. Las células vegetativas de *P. larvae* colonizan el intestino medio de la larva y proliferan allí. Las esporas germinan rápidamente luego de ingresar en el tracto intestinal y se multiplican, invadiendo el hemocele y los tejidos distantes, causando la muerte de la larva (Genersch, 2010). Durante el estadio de infección, *P. larvae* se alimenta de lo que ha ingerido la larva. Las esporas pueden permanecer viables por

largos períodos de tiempo y sobrevivir a condiciones ambientales adversas (Shimanuki, 1990). Los individuos enfermos cambian del color normal blanco nacarado al *beige* y castaño oscuro, casi negro transformándose en una masa viscosa. Con el correr del tiempo, los restos larvales se secan dando lugar a la formación de una escama negra que se adhiere firmemente al piso y fondo de las celdas (Sturtevant, 1932).

En cuanto a las enfermedades causadas por hongos que afectan a la cría de las abejas se puede mencionar a *Ascosphaera apis*, que provoca la enfermedad denominada cría yesificada. Éste pertenece al grupo de los Ascomycetes, dentro de Eurotiomycetes. *A. apis* tiene un estrecho rango de hospedadores, depende solamente de la reproducción sexual y tiene muchas adaptaciones específicas del hospedador (Jensen *et al.*, 2013). El reconocimiento de esta enfermedad en el campo se basa en la detección visual de la cría enferma que presenta el aspecto de “momias”. Puede reducir la productividad de la colonia al disminuir el número de abejas recién emergidas y, en algunos casos, puede llevar a la pérdida de la colonia. Es una enfermedad que se encuentra en la mayoría de las regiones del mundo, incluyendo climas secos y cálidos. Los síntomas de la enfermedad suelen aparecer por un corto período de tiempo, típicamente cuando las condiciones del clima son frías y húmedas (Aronstein y Murray, 2010).

### **1.3. Nutrición y su relación con la microbiota de las abejas**

Al igual que otras ramas de la producción animal, la alimentación constituye uno de los pilares principales de la apicultura (García Girou, 2002). En las abejas melíferas, la nutrición juega un papel fundamental en el desarrollo, mantenimiento y establecimiento de las colonias, particularmente en la determinación de las castas y en la plasticidad del comportamiento social.

La dieta de las abejas deriva exclusivamente del néctar, que constituye la fuente de carbohidratos, y del polen, que provee las proteínas y grasas. El néctar de diferentes plantas difiere en composición y valor nutricional para las abejas. De igual manera, la calidad del polen es variable y, en algunos casos, uno o más aminoácidos esenciales pueden no estar presentes en él (Crane, 1990). Asegurar una zona de alimentación nutritiva es lo más adecuado, sin embargo, cuando no es posible, una práctica común que realizan los apicultores es suplementar las colonias con polen o sustitutos de polen para asegurar una nutrición apropiada. La suplementación con jarabe también es una práctica común para mantener la actividad de las abejas (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2008). La activación del sistema inmune de las abejas es energéticamente costosa y

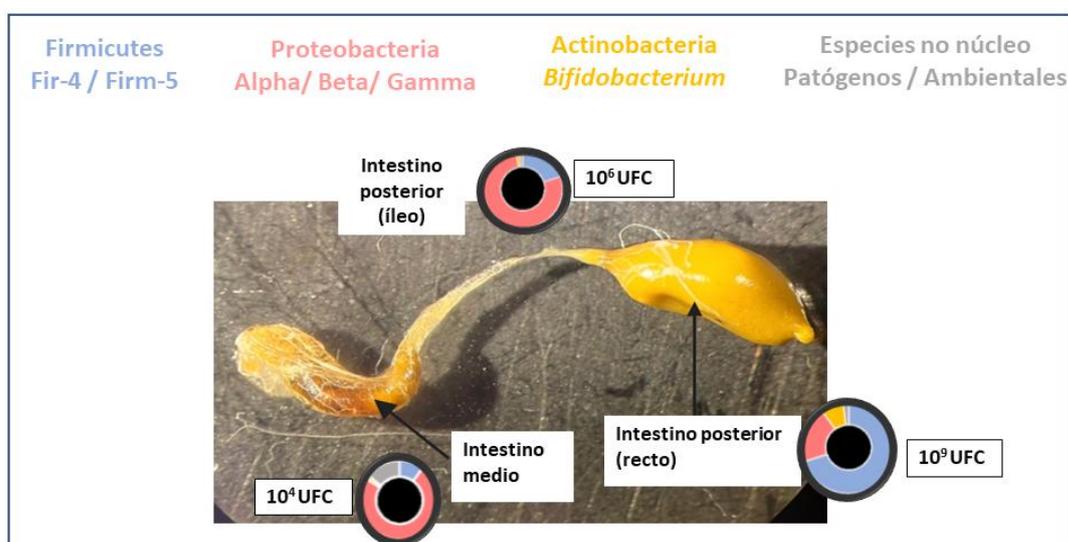
aquellos individuos cuya alimentación ha sido deficiente son más susceptibles a sufrir infecciones parasitarias. Además, los parásitos compiten directamente con el hospedador por sus requerimientos nutricionales y, como consecuencia, los hospedadores tienen menor capacidad de tolerancia al estrés causado por los mismos (Crane, 1990; Brodshneider y Crailsheim, 2010). En este sentido, la salud de la cría es un factor crucial para la supervivencia de la colonia. Durante la fase larval, las condiciones ambientales influyen en el comportamiento y longevidad de las abejas. Uno de los problemas más comunes de encontrar en las colonias de abejas es la presencia de pesticidas en el polen o en el néctar con los que son alimentadas las larvas, lo que puede tener consecuencias perjudiciales para la cría de las abejas (Hendriksma *et al.*, 2011).

El polietismo temporal de las abejas hace que, como primera función dentro de la colmena, las abejas recién emergidas sean las encargadas de la limpieza de la colmena, mientras que las nodrizas cumplen la segunda función dentro de la colonia, y son las encargadas de alimentar a la cría, cumpliendo un papel fundamental en la supervivencia de la colonia. Una nodriza saludable secreta una cantidad abundante de péptidos antimicrobianos a través de sus glándulas hipofaríngeas durante la producción de jalea real para alimentar a las larvas. Una nodriza desnutrida puede no producir una suplementación adecuada para protegerse así misma o para proteger a las larvas de infecciones (Harwood *et al.*, 2019). Otro parámetro que puede afectar a la cría de las abejas es el potencial peligro que representan las abejas nodrizas como vectores de transmisión de enfermedades en la colmena al ser potenciales reservorios de patógenos en la cámara de cría (Erban *et al.*, 2017).

El término microbiota hace referencia específicamente a los microorganismos en sí mismos (bacterias, arqueas, hongos y virus) que se encuentran en un determinado ambiente. La microbiota del intestino ha sido la más ampliamente estudiada, siendo el tubo digestivo el ambiente donde se encuentra la mayor densidad de microorganismos (ISAPP, 2019). En el caso de las abejas, estas poseen una microbiota núcleo o central ("core microbiota") que madura durante el desarrollo temprano y se mantiene relativamente estable a través de la mayor parte de la vida adulta. Esta microbiota núcleo consiste en seis a diez filotipos (Bonilla-Rosso y Engel, 2018), siendo dominante el género *Lactobacillus* spp., cuando la abeja está saludable. La microbiota del tracto gastrointestinal se puede dividir en nichos separados. En un estado saludable, el intestino medio posee aproximadamente  $10^4$  UFC/porción, el íleo  $10^6$  UFC/porción, y el recto  $10^9$  UFC/porción, con distintas proporciones de los grupos Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria y especies no pertenecientes al núcleo, como patógenos

y microbios del ambiente (Figura 1.1) (Daisley, 2021).

Las abejas dependen de una adecuada-microbiota intestinal para las funciones digestivas e inmunomoduladoras (Barribeau *et al.*, 2015). La microbiota puede conferir resistencia a la exposición a pesticidas (Wu *et al.*, 2020), inhibir la invasión por parte de patógenos (Raymann *et al.*, 2017), ejercer resistencia a la colonización de parásitos (Schwarz *et al.*, 2019) y mejorar la asimilación de nutrientes provenientes de la dieta (Bonilla-Rosso y Engel, 2018). Esta homeostasis con sus microorganismos ha sido alterada por las actividades antropogénicas propias del sistema agroindustrial presente principalmente en los países agroexportadores. Es por ello que hay un interés a nivel mundial en desarrollar nuevas herramientas que puedan llevar a mejores prácticas en la apicultura. El uso de microorganismos beneficiosos como los probióticos es una opción para mejorar la microbiota de las abejas y su estado nutricional, así como combatir enfermedades y mantener el bienestar de las colonias de manera sostenible. En ese contexto, la incorporación de probióticos en la dieta de las abejas constituye una alternativa natural, amigable con el medio ambiente, fácil de aplicar y que no deja residuos contaminantes en la colmena y, principalmente, en la miel (Endo y Salminen, 2013).



**Figura 1.1.** Representación de la microbiota del tracto gastrointestinal de una abeja melífera en estado saludable, expresado como UFC/porción intestino.

#### 1.4. Probióticos

Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador” (Hill *et al.*, 2014). En el año 2018, la Asociación Científica Internacional de

Probióticos y Prebióticos (ISAPP) propuso una lista de los criterios mínimos que debe cumplir un alimento o suplemento para ser considerado probiótico. Estos incluyen: 1. Caracterización adecuada que permita identificar al microorganismo hasta el nivel de cepa; 2. Nombre del probiótico de acuerdo a la nomenclatura científica; 3. Seguridad; 4. Inclusión en una colección de cultivo internacional; 5. Ejercer un beneficio para la salud, el cual debe ser demostrado en al menos un estudio en humanos; 6. El producto que utiliza el probiótico debe proporcionar hasta el final de su vida útil un nivel suficiente de microbios vivos para ofrecer un beneficio para la salud (ISAPP, 2018).

El requisito de seguridad hace referencia a que el microorganismo sea reconocido como GRAS (Generally Recognized As Safe); para garantizarlo debe ser sometido a una serie de pruebas de seguridad, como la ausencia de genes de resistencia y factores de virulencia, entre otras. Además, debe ser capaz de tolerar las condiciones del tracto gastrointestinal, incluyendo el pH gástrico, las enzimas digestivas y la acción de las sales biliares para poder llegar viables y en gran cantidad al intestino. Una vez allí, debe colonizarlo y adherirse a la mucosa intestinal para que tenga lugar la modulación de la respuesta inmune, así como la exclusión de microorganismos patógenos (Bolla, 2011).

El criterio propuesto por ISAPP para caracterizar adecuadamente un probiótico hasta el nivel de cepa es importante debido a que algunas propiedades son cepa-específicas (Binda *et al.*, 2020; McFarland y Evans, 2018; van den Akker *et al.*, 2018). El nombre de la cepa debe ser provisto de acuerdo a la nomenclatura actual de bacterias, basado en el Código Internacional de Nomenclatura (Parker *et al.*, 2019). Existe una lista de los nombres de procariotas disponible en <http://www.bacterio.net/> (Parte, 2018). Una vez que la cepa ha sido identificada correctamente, debe ser depositada en una colección de cultivos reconocida internacionalmente. Actualmente, existen 792 colecciones de 78 países y regiones registrados (Forssten *et al.*, 2020).

La definición de probióticos afirma que éstos deben ser administrados en cantidades suficientes para conferir un beneficio para la salud del hospedador. Es por ello que la capacidad de multiplicarse y la cinética de crecimiento del microorganismo deben ser evaluadas para seleccionar las cepas más adecuadas. Una vez determinada cuál es la dosis eficaz, se debe estudiar su viabilidad y garantizar que se mantiene hasta el final de la vida útil del producto en el cual han sido incorporadas (Binda *et al.*, 2020).

Entre los efectos de los probióticos se destacan el fortalecimiento de las defensas del intestino, la mejora en la digestión y la modulación del sistema inmune (Li *et al.*, 2016; Sanders *et al.*, 2019). Además, ciertas cepas probióticas pueden evitar el

uso de antibióticos, minimizando la posibilidad de infecciones oportunistas causadas por patógenos resistentes a los antimicrobianos (Reid *et al.*, 2001). Los probióticos pueden intervenir en la función metabólica y fisiológica del intestino a través de diferentes mecanismos de acción, tales como la prevención de la colonización de patógenos, el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, la modificación de la histomorfología del epitelio intestinal, la digestión y biodisponibilidad de nutrientes, el balance de la comunidad microbiana y el mejoramiento de la función del sistema inmune (Londero, 2012).

### 1.5. Probióticos para abejas

Los probióticos son utilizados en los animales con dos principales fines, mejorar el sistema inmune y promover la presencia de microorganismos beneficiosos en el tracto gastrointestinal, lo cual puede ayudar a la digestión y proteger contra enfermedades (Tanner *et al.*, 2018). En el caso de las abejas, los probióticos pueden ser utilizados como reemplazo de los antibióticos y como suplemento para las colonias. Los estudios llevados a cabo con probióticos han demostrado el efecto de la suplementación oral, especialmente de bacterias lácticas, y se han focalizado en enfermedades en las que el tracto intestinal es el sitio de ingreso de los patógenos al hemocele de las abejas, tales como la loque americana y cría yesificada.

Con respecto a la actividad inhibitoria de ciertas bacterias sobre el crecimiento de *P. larvae*, causante de loque americana, existen numerosos estudios que demuestran su efectividad (Arredondo *et al.*, 2018; Bartel *et al.*, 2019). Por ejemplo, Iorizzo *et al.* (2020) evaluó 61 cepas de *Lactiplantibacillus plantarum* (anteriormente *Lactobacillus plantarum*) aisladas de pan de polen y del intestino de abejas. Las cepas presentaron un gran antagonismo frente al patógeno y mostraron propiedades fisiológicas y bioquímicas adecuadas para su uso como probióticos en la dieta de las abejas. Resultados similares fueron encontrados por Arredondo *et al.* (2018) quien estudió cepas de *Apilactobacillus kunkeei* aisladas del intestino de las abejas. En este caso, los ensayos se realizaron alimentando larvas de abejas en el laboratorio con las mencionadas cepas, las cuales disminuyeron la mortalidad de las larvas asociada a la infección con *P. larvae*.

Por último, para la enfermedad cría yesificada, el estudio de bacterias con capacidad de inhibir el crecimiento de *A. apis* se ha focalizado en las bacterias lácticas. Entre ellas, se ha reportado el efecto beneficioso de *Lactobacillus johnsonii*, una bacteria asociada a la microbiota de las abejas (Audisio, 2016). En otro estudio, Iorizzo *et al.*

(2021) analizaron la capacidad antagonica de 22 cepas de *L. plantarum* frente al hongo patógeno. Evaluaron distintas matrices, incluyendo lisado celular, cultivo celular y sobrenadante libre de células. Los autores encontraron que todas las cepas presentaron actividad antifúngica, en distintas intensidades. Esto fue atribuido a la producción de sustancias biológicamente activas contra el hongo. Sus resultados confirman el rol antagonico de las bacterias frente a patógenos que utilizan el tracto digestivo de las abejas como sitio de infección, como *A. apis*.

## 1.6. Suplementos nutricionales para abejas

El acceso a fuentes diversas y naturales de polen y néctar es esencial para una completa y adecuada alimentación de las abejas. Sin embargo, como se mencionó previamente, la falta de diversidad de nutrientes debido a los monocultivos y pérdida de hábitats ha llevado a que los apicultores suplementen las colonias con sustitutos proteicos o jarabes de sacarosa para prevenir deficiencias nutricionales. Los suplementos proteicos son estrategias indispensables en la apicultura en la mayoría de los países. Está demostrado que mejoran la resistencia a enfermedades causadas por virus y hongos (Dolezal y Toth, 2018), y se ha reportado que la suplementación proteica puede aumentar la expresión a nivel de genes y proteínas del péptido antimicrobiano apidaecina (Daníhlík *et al.*, 2018).

Una práctica novedosa que ofrece una oportunidad para los apicultores es la incorporación de microorganismos beneficiosos a los suplementos alimenticios destinados a las abejas, con el fin de combatir enfermedades infecciosas. Debido a que el estado nutricional de la abeja es influenciado por su microbiota, la cual tiene un rol fundamental en la biosíntesis de vitaminas (Zheng *et al.*, 2017), en la descomposición de los componentes recalcitrantes del polen (Bonilla-Rosso y Engel, 2018) y en el metabolismo de azúcares tóxicos (Zheng *et al.*, 2016), es interesante utilizar microorganismos para mitigar estreses que afectan a las abejas.

El método por el cual el probiótico es provisto como alimento a las abejas es un punto importante que puede influir en su eficacia ya que, por ejemplo, el agregado del microorganismo al jarabe de sacarosa podría tener un rendimiento inferior debido al estrés osmótico que puede causar en las células bacterianas (Ptaszyńska *et al.*, 2016). La suplementación de las colonias con cepas seleccionadas de lactobacilos se ha llevado a cabo a través de su incorporación a un suplemento proteico. Su utilización redujo los niveles de *P. larvae* en las colmenas y mejoró la supervivencia de las abejas en ensayos *in vitro* (Daisley *et al.*, 2020a, b).

## 1.7. Kéfir de agua: fuente de potenciales probióticos

La mayoría de las cepas microbianas utilizadas como probióticos se han aislado del intestino de las abejas, siendo seleccionados en base a su antagonismo *in vitro* frente a determinados patógenos. Sin embargo, también se han aislado especies microbianas del ambiente o de formulaciones para consumo animal y humano (Alberoni, 2018). Actualmente, los probióticos se pueden obtener de distintos productos (Panghal *et al.*, 2018). Entre ellos, el kéfir representa una fuente natural y novedosa de potenciales probióticos (Nejati *et al.*, 2020) con beneficios para la salud y actividad antimicrobiana (Sindi *et al.*, 2020).

El kéfir es una bebida fermentada originaria de la región del Cáucaso a la cual se le acreditan varias propiedades beneficiosas para la salud. Esta bebida fermentada con los gránulos de kéfir es consumida por el hombre desde hace miles de años sin registrarse efectos adversos (Liu *et al.*, 2002, 2006). Se obtiene a partir de la actividad metabólica de los gránulos de kéfir, una masa gelatinosa e irregular de consistencia elástica (Figura 1.2). Los gránulos están constituidos por una matriz de polisacáridos y proteínas en la que convive un ecosistema de microorganismos en simbiosis, capaces de fermentar distintos compuestos azucarados (Garrote *et al.*, 2001). Normalmente, el kéfir contiene 85–90 % de humedad, 0,2 % de lípidos, 3 % de proteínas, 6% de azúcares, 0,7% de cenizas y 1 % de ácido láctico y alcohol (expresado como % p/v). La microbiota del kéfir consiste en levaduras fermentadoras o no fermentadoras de lactosa, bacterias lácticas homofermentativas y heterofermentativas y bacterias ácido-acéticas. Las especies microbianas presentes dependen del origen de los gránulos, las condiciones de cultivo, de almacenamiento y elaboración del kéfir (Liu y Lin, 2000).

La comunidad microbiana presente en los gránulos del kéfir incluye especies de bacterias lácticas, bacterias del ácido acético y levaduras (Fiorda *et al.*, 2017). Entre las bacterias se han reportado las especies *Lactobacillus casei* (*Lb. paracasei*, *Lb. kefir*, *Lb. parakefir*, *Lb. hilgardii*, *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* (Koroleva, 1988; Garrote *et al.*, 2001; Otogalli *et al.*, 1973; Simova *et al.*, 2002; Witthuhn *et al.*, 2004). Las levaduras presentes en el kéfir incluyen a *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kefir*, *Candida kefir*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulopsis delbrueckii*, *Torulopsis holmii* (Rosi, 1978; Koroleva, 1988; Iwasawa *et al.*, 1992; Angullo *et al.*, 1993; Simova *et al.*, 2002;), entre otras.

El descubrimiento de que un componente importante de la microbiota del intestino de las abejas está representado por lactobacilos y bifidobacterias ha llevado a los científicos a investigar la similitud y analogía con las bacterias probióticas más

ampliamente estudiadas en animales y humanos. En particular, el kéfir posee una gran diversidad de bacterias lácticas que podrían inhibir a patógenos a través de distintos mecanismos y ayudar a prevenir enfermedades. De manera similar a la dieta de las abejas, el kéfir de agua contiene azúcares de las frutas ricas en fructosa, convirtiéndolo así en un ambiente adecuado para la obtención de microorganismos como las bacterias lácticas y las levaduras, que podrían ser incorporadas en los suplementos alimenticios para mejorar la salud y bienestar de las abejas (Rodríguez *et al.*, 2023).



**Figura 1.2.** Kéfir de agua, una bebida fermentada obtenida a partir de la fermentación de los gránulos de kéfir en una solución azucarada.

### **1.8. Hipótesis y objetivos**

Desde el año 2015, en el Laboratorio de Estudios Apícolas (LabEA) del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, que pertenece a la red de centros de I+D de la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (CIC), se está trabajando para contribuir a mitigar los actuales problemas nutricionales que afectan al bienestar general de la colonia de abejas. En base a las investigaciones y estudios realizados se generaron publicaciones y trabajos que, junto con el estado actual del conocimiento, llevaron a plantear las hipótesis y los objetivos de esta tesis.

## Hipótesis

1. Los microorganismos obtenidos a partir de kéfir de agua tienen el potencial para actuar como probiótico, mejorando el estado de salud y bienestar de abejas y larvas.
2. El suplemento nutricional con potencial probiótico constituye una alternativa eficaz para mitigar los problemas nutricionales que se evidencian actualmente a nivel de la colonia.

## Objetivo general

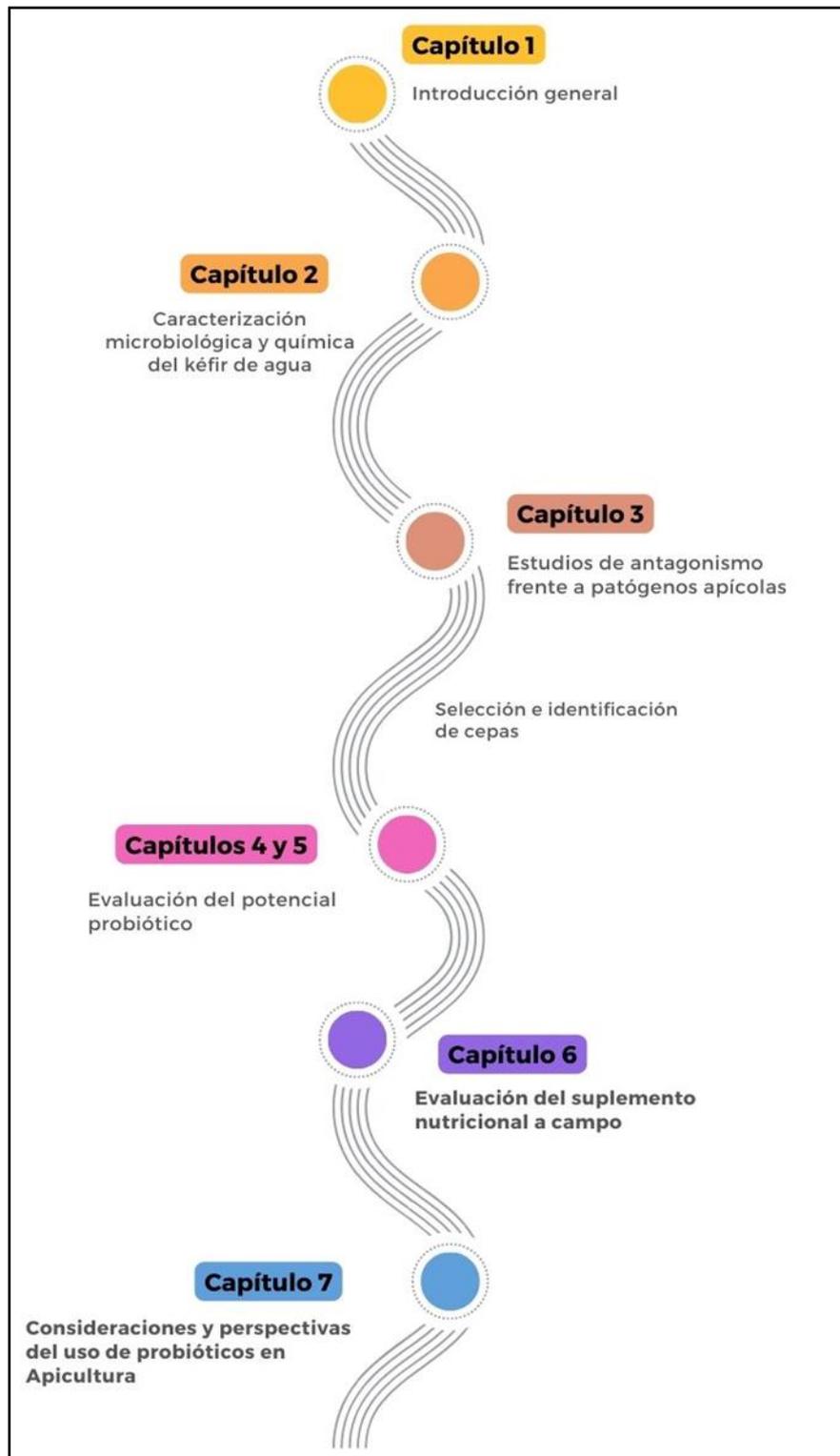
Desarrollar un suplemento nutricional con potencial probiótico para alimentación de abejas (*Apis mellifera* L.) constituido por microorganismos aislados de kéfir de agua para contribuir a mitigar los actuales problemas nutricionales de la colonia.

## Objetivos específicos

1. Caracterizar y analizar el kéfir de agua como fuente de potenciales probióticos para abejas.
2. Estudiar *in vitro* las propiedades antimicrobianas de microorganismos aislados de kéfir de agua frente a dos patógenos de abejas: *Paenibacillus larvae* y *Ascophaera apis*.
3. Caracterizar y estudiar *in vitro* las propiedades probióticas de los microorganismos con actividad antimicrobiana frente a los mencionados patógenos de abejas.
4. Evaluar en colmenas a campo la efectividad del suplemento nutricional mejorado por la incorporación del probiótico.

## 1.9. Esquema de trabajo

Esta tesis está estructurada en siete capítulos que corresponden a las etapas que se siguieron para el desarrollo de la investigación (Figura 1.3).



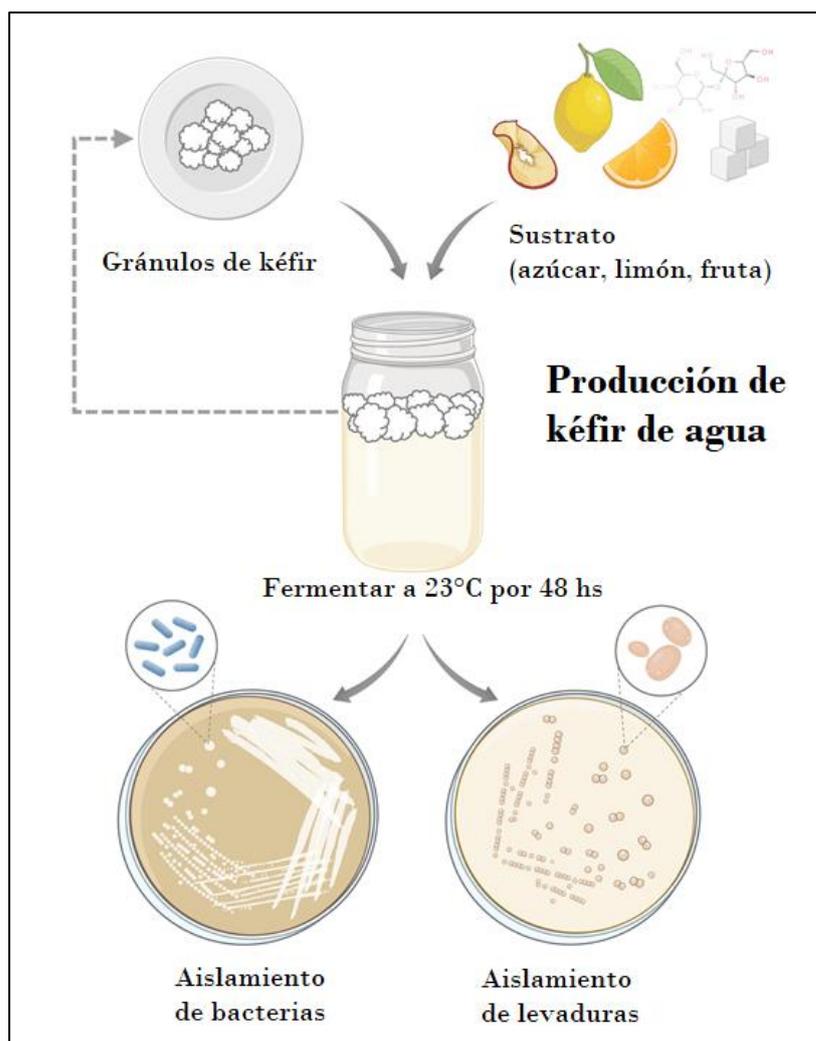
**Figura 1.3.** Esquema de trabajo de esta tesis doctoral.

## **Capítulo 2: Caracterización microbiológica y química del kéfir de agua**

### **2.1. Introducción**

El kéfir es una bebida fermentada, ligeramente ácida y carbonatada a la cual se le atribuyen beneficios para la salud humana (Liu *et al.*, 2002, 2006). Se obtiene a partir de la fermentación llevada a cabo por una comunidad simbiótica de bacterias ácido lácticas, bacterias del ácido acético y levaduras, las cuales coexisten en una matriz de polisacárido llamada kefirán, y, en conjunto, constituyen los gránulos del kéfir (Fiorda *et al.*, 2016). Al igual que otros productos fermentados estos microorganismos le otorgan su sabor, aroma, color y textura característicos (Bolla, 2011). El kéfir generalmente se produce al fermentar leche con los gránulos, sin embargo, pueden utilizarse distintos sustratos para su preparación (Syrokou *et al.*, 2019). En el caso del kéfir de agua, éste se obtiene agregando los gránulos a una solución de agua, azúcar, frutas desecadas y una rodaja de limón (Gulitz *et al.*, 2012). Luego de 24 o 48 horas de fermentación a temperatura ambiente, los gránulos son removidos por filtración y la bebida resultante está lista para ser consumida (Figura 2.1). Una gran variedad de productos de fermentación está presente en esta bebida, incluyendo ácido láctico, acetaldehído, etanol y dióxido de carbono, entre otros (Çevik *et al.*, 2019).

La diversidad y abundancia de especies microbianas del kéfir es muy variable ya que depende del origen de los gránulos, así como del sustrato utilizado y las condiciones de su preparación y almacenamiento (Witthuhn *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2017). Según las condiciones de incubación, la concentración de los microorganismos puede experimentar fluctuaciones. Además, las levaduras se mantienen metabólicamente activas durante la refrigeración, lo que conlleva a cambios del producto durante la conservación y reduce su vida útil. Esta variabilidad en su composición química y microbiológica hace que sea difícil obtener una calidad constante en el producto, dificultando su industrialización y comercialización (Bolla, 2011).



**Figura 2.1.** Proceso de elaboración artesanal de kéfir de agua en el laboratorio: se agregaron los gránulos a una solución de agua, azúcar, frutas desecadas y una rodaja de limón y se dejó fermentar por 48 h a temperatura ambiente.

La comunidad microbiana presente en los gránulos del kéfir incluye especies de bacterias lácticas ( $10^8 - 10^9$  UFC/g), bacterias del ácido acético ( $10^5 - 10^6$  UFC/g) y levaduras ( $10^7 - 10^8$  UFC/g) (Fiorda *et al.*, 2017). Entre las bacterias, el género *Liquorilactobacillus* ha sido reportado como el grupo dominante en el kéfir de agua (Gamba *et al.*, 2021), acompañado por *Lactobacillus paracasei*, *L. kefir*, *L. parabuchneri* y *Acetobacter lovaniensis* (Gulitz *et al.*, 2011). También, miembros de la familia Bifidobacteriaceae, tales como *Bifidobacter bifidum*, *B. longum* y *B. brevi* han sido aislados de los gránulos del kéfir (Çevik *et al.*, 2019). Asimismo, se ha reportado la dominancia de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygorulasporea florentina* y *Kluyveromyces lactis* (Fiorda *et al.*, 2017).

La composición microbiana de los gránulos y del sobrenadante del kéfir ha sido,

como se describió previamente, muy bien documentada. El análisis de la comunidad de microorganismos se ha llevado a cabo, hasta hace unas décadas, exclusivamente por técnicas de cultivo de microorganismos, seguidas de su identificación por análisis del gen ARNr 16S. Si bien estos estudios han proporcionado información sustancial muy relevante, los métodos pueden estar limitados por la baja cobertura de secuencia en los datos (Gamba *et al.*, 2021). Además, sólo una mínima proporción de microorganismos pueden ser aislados y cultivados en el laboratorio. Partiendo de este supuesto, fue necesario avanzar en el estudio del ADN microbiano para ser utilizado en la búsqueda de información sobre la fisiología y genética de organismos no cultivables (Handelsman, 2004).

En las últimas décadas, las tecnologías de secuenciación masiva del ADN, junto con el enfoque de las ómicas y las técnicas computacionales, han permitido un significativo avance en el estudio de las comunidades microbianas. En la actualidad, la metagenómica es la técnica más ampliamente utilizada para analizar las bacterias y levaduras presentes en una matriz (Kazou *et al.*, 2021). Los dos componentes principales de la investigación en metagenómica son el análisis de la diversidad microbiana de la fracción de organismos no cultivables y el análisis funcional de genes de organismos presentes en un ambiente de interés, independientemente del cultivo de los mismos (Caldas de Pinho Pessoa Filho, 2011). Los diferentes enfoques que componen lo que se conoce como metagenómica incluyen la caracterización de las comunidades microbianas o de sus miembros por métodos que no dependen del cultivo, aplicando técnicas de análisis a gran escala, tales como la genómica, proteómica y transcriptómica. Lo que diferencia la metagenómica de la genómica es que es independiente del aislamiento de un organismo en particular para luego analizar su genoma individual. Además, se enfoca en la comprensión de la biología a nivel de comunidades, más allá del organismo individual, centrándose en la función que cumple en el ambiente (Research Council US, 2007).

La secuenciación metagenómica proporciona una alta resolución taxonómica y funcional, pero es muy costosa para estudios a gran escala. Es por ello que la alternativa que prevalece es la secuenciación del gen ARNr 16S, a pesar de que no permite identificar más allá del nivel de género y especie, y ofrece sólo predicciones moderadamente precisas del perfil funcional de los microorganismos (Hillmann *et al.*, 2018).

La secuenciación masiva es un método por el cual se ha logrado un gran avance en la investigación de los ecosistemas microbianos, tales como los de los alimentos fermentados. En efecto, esta técnica ha sido utilizada para estudiar las poblaciones

microbianas presentes en el kéfir. Por ejemplo, Marsh *et al.* (2013) analizaron mediante secuenciación masiva las poblaciones microbianas de muestras de kéfir de distinto origen. La comunidad bacteriana consistió principalmente en bacterias del ácido láctico, *Zymomonas* y bacterias del ácido acético. Y las levaduras incluyeron especies de los géneros *Dekkera*, *Zygosaccharomyces* y *Meyerozyma*, además de *Saccharomyces*. Por su parte, Walsh *et al.* (2016) estudiaron los cambios producidos en la comunidad microbiana del kéfir durante el proceso de fermentación. El análisis de secuenciación masiva reveló que *Lactobacillus kefiranofaciens* fue la especie bacteriana predominante en el kéfir en las etapas iniciales de la fermentación, mientras que *Leuconostoc mesenteroides* predominó en las etapas finales.

El kéfir de agua ha sido estudiado por los beneficios que podría aportar a la salud humana. Se ha demostrado que el kéfir y sus constituyentes pueden tener propiedades antimicrobianas, antivirales y antimutagénicas, en cultivos *in vitro* (Garrote *et al.*, 2000; Farnworth, 2005). También, se ha descrito la capacidad del kéfir de estimular el sistema inmune en el ser humano (Thoreux Schmucker, 2001, Vinderola *et al.*, 2005). Estos efectos podrían atribuirse a la actividad de los propios microorganismos o a los productos de la fermentación (Cross, 2002). Numerosas bacterias y levaduras aisladas de kéfir presentan propiedades probióticas como resistencia a sales biliares, a bajo pH y adhesión a células Caco-2 (Golowczyc *et al.*, 2007, 2008). Muchos microorganismos beneficiosos, principalmente bacterias lácticas, se han aislado del kéfir (Tang *et al.*, 2018). Algunas cepas de *Lentilactobacillus kefir* han sido propuestas como excelentes candidatas para ser aplicadas en el desarrollo de suplementos alimenticios y alimentos fermentados con propiedades promotoras de la salud (Carasi *et al.*, 2022). De la misma manera, se han obtenido levaduras con propiedades beneficiosas del kéfir (Romero-Luna *et al.*, 2018; Tamang y Lama, 2022). Éstas han sido identificadas principalmente como especies de los géneros *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (Goktas *et al.*, 2021).

Estos microorganismos beneficiosos pueden ser utilizados en animales para mejorar el sistema inmune y promover la microbiota del tracto gastrointestinal, lo cual puede ayudar a la digestión y proteger contra enfermedades (Tanner *et al.*, 2018). Es por ello que, en los últimos años, se han llevado a cabo estudios sobre el uso de microorganismos en alimentación animal, incluyendo la industria porcina (Etleva *et al.*, 2010), avícola (Mantilla y Portacio, 2012) y apícola (Audisio, 2016). En el caso de las abejas melíferas, el principal propósito es la prevención y el biocontrol de patógenos (Chmiel *et al.*, 2021; Iorizzo *et al.*, 2020).

## **Objetivos específicos**

1. Caracterizar químicamente el kéfir de agua producido en el LabEA.
2. Comparar la composición microbiana de los gránulos con respecto al sobrenadante de kéfir.
3. Evaluar la composición microbiana de los gránulos y del sobrenadante del kéfir de agua durante un año de incubación, con el fin de determinar si el número y el tipo de microorganismos se mantienen estables o no en el tiempo.
4. Analizar y comparar la diversidad bacteriana presente en los gránulos y en el sobrenadante del kéfir a través de una técnica de secuenciación masiva de alto rendimiento.

## **2.2. Materiales y Métodos**

### **2.2.1. Preparación de kéfir de agua en el laboratorio**

El kéfir de agua se preparó en una solución de sacarosa (100 g/l) en un litro de agua hervida. A esta solución se le incorporaron pasas de uva y una rodaja de limón sin cáscara. Se colocó en un frasco de vidrio con tapa sin cerrar herméticamente. La fermentación se realizó a temperatura ambiente ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) por 48 h. El sobrenadante se descartó y los gránulos de kéfir fueron filtrados y lavados con agua para una nueva fermentación (Stadie *et al.*, 2013).

### **2.2.2. Análisis químico del kéfir**

Los parámetros de acidez, pH, etanol (% ABV), contenido de minerales (sodio, potasio y magnesio), sólidos solubles totales (°Brix), carbohidratos, proteínas y contenido de materia seca fueron determinados en el sobrenadante de kéfir. Por su parte, el contenido de cenizas y de materia seca se midieron en los gránulos de kéfir (Magalhaes *et al.*, 2010; Laureys y De Vuyst, 2014). Todos los análisis químicos se realizaron por triplicado y luego del proceso de fermentación.

La acidez y la materia seca se analizaron siguiendo la metodología de la Association of Analytical Communities (AOAC, 1995). El pH se midió utilizando un pHmetro digital (Hanna Instruments HI98103). El porcentaje de etanol (% ABV) se estimó determinando la densidad del sobrenadante antes y después del proceso de fermentación utilizando un densitómetro (Macotest, Argentina). Los sólidos solubles totales (°Brix) se midieron usando un refractómetro de mano de laboratorio (Atago N1

(Brix 0-32 %, Japan). La presencia de minerales fue evaluada por espectroscopia de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Las soluciones standard certificadas por Chem-Lab, Zedelgem B-8210 Belgium, fueron estabilizadas con ácido nítrico previamente purificado por destilación (Berghof distillacid BSB-939-IR, GmbH, Germany). Para los análisis se utilizó agua ultrapura (Water Purification Systems Millipore - Milli Q, modelo Elix Technology Inside 10 (Merck, France)). El contenido de carbohidratos totales fue estimado por el método de Antrona (Londero, 2012), mientras que el de nitrógeno fue evaluado utilizando el método Kjeldahl. Para el cálculo de proteínas, se multiplicó el nitrógeno total por el factor 6,38 (Matissek *et al.*, 1998). Finalmente, el porcentaje de cenizas se determinó gravimétricamente luego de la incineración de los gránulos de kéfir a 500-550 °C hasta lograr un peso constante.

### **2.2.3. Recuento de microorganismos viables presentes en el kéfir**

Se pesaron 10 gramos de gránulos de kéfir y/o 10 ml de sobrenadante y se diluyeron en 90 ml de citrato de sodio al 2 % p/v (primera dilución). A continuación, se prepararon diluciones decimales y se sembraron en los medios de cultivo correspondientes. Para las bacterias se utilizó Man Rogosa Sharpe (MRS, Bioclar) (Roy, 2001), mientras que para levaduras fue Hongos y Levaduras (HyL, Britania). Para ambos grupos de microorganismos la siembra se realizó por diseminación en superficie, inoculando 0,1 ml de las diluciones correspondientes. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante cinco a siete días en atmósfera microaerobia y anaerobia para las bacterias. En el caso de las levaduras, las placas fueron incubadas a 25 °C por tres a cinco días en aerobiosis. Luego de la incubación, se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). El número se expresó como UFC por g de gránulo de kéfir o por ml de sobrenadante de kéfir, en función de la dilución.

### **2.2.4. Evaluación de la composición microbiana del kéfir en el tiempo**

Con el objetivo de determinar si el número y el tipo de microorganismos se mantuvieron estables o no en el tiempo, se evaluó, durante un año, la composición microbiana de los gránulos y del sobrenadante del kéfir. Para ello, tres réplicas de kéfir de agua se prepararon para el ensayo y se incubaron en el laboratorio a  $23 \pm 2$  °C. Se realizaron recuentos como se describió previamente en muestras de gránulos y sobrenadante en ocho tiempos, cada un mes y medio, durante un año (2019 – 2020).

### **2.2.5. Secuenciación masiva del kéfir de agua**

La diversidad bacteriana del kéfir de agua se determinó por un análisis de secuenciación masiva en el Bee Research Laboratory (United States Department of Agriculture). La región hipervariable V1-V2 del gen bacteriano ARNr 16S fue secuenciada a partir de seis muestras, tres correspondientes a los gránulos y tres a las muestras de sobrenadante.

#### **2.2.5.1. Purificación del ADN bacteriano**

Para recuperar el ADN bacteriano de los gránulos, tres gramos de gránulos se resuspendieron en 40 ml de agua (de grado molecular) usando tubos plásticos de 50 ml como contenedores. Para obtener el ADN de las muestras de sobrenadante, 14 ml de agua se añadieron a los tubos con 15 ml de las muestras. Los tubos se calentaron por 45 min a 65 °C y con un vórtex se homogeneizaron cada 15 min durante una hora. Las extracciones de ADN se llevaron a cabo utilizando el kit Powerlyzer Microbial Kit (Qiagen 12255), con las siguientes modificaciones: para cada muestra, dos ml de las soluciones resuspendidas se colocaron en tubos de dos ml y se centrifugaron a 10.000 rpm por dos min. El sobrenadante se descartó y los *pellets* se resuspendieron en 350 µl de solución PowerBead y se transfirieron a un tubo Powerlyzer Microbial 0,1 mm. Cincuenta µl de solución SL se añadieron a cada tubo y las muestras se homogeneizaron usando un homogeneizador FastPrep®-24 5G (MP Biomedicals) a seis m/s por dos min, tres veces (total seis minutos). Las muestras se recuperaron en 50 µl de buffer de elución y se conservaron a -20 °C.

#### **2.2.5.2. Amplificación por PCR y secuenciación de ADN**

Una región conservada de la región V1-V2 del gen del ARN ribosomal bacteriano 16S fue amplificado utilizando los *primers* universales y el protocolo descrito por Floyd *et al.* (2020). La amplificación por PCR se llevó a cabo usando los reactivos de la máster mix Bio-Rad (166509EDU) y un termociclador Bio-Rad CFX96 Real-Time System C1000 Touch Thermal Cycler. Luego de la confirmación mediante electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de 359 pares de bases esperados, las muestras fueron purificadas utilizando filtros Ultracel 100K 0.5 ml (Amicon). Los productos de PCR purificados se usaron para preparar 6 librerías de ADN para ILLUMINA MiSeq, siguiendo el protocolo de la librería de ADN TruSeq DNA. Entre 1.4 M y 2.4 M pares de bases fueron secuenciadas para la librería (University of Maryland Institute for Genome Sciences sequencing facility, Baltimore, MD).

### 2.2.5.3. Taxonomía y abundancia relativa

La calidad de las lecturas fue evaluada con el software FASTQC (Andrews *et al.*, 2010). A continuación, fueron recortadas usando el software Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) para remover los cebadores. Las lecturas resultantes fueron procesadas usando el software MOTHUR v1.48 (Schloss *et al.*, 2009). Los pares de lecturas finales fueron combinadas utilizando el *make.contigs command* y el resultado fue filtrado usando el *screen.seqs command*. Para remover las secuencias duplicadas, el *unique.seqs command* fue utilizado. Luego, fueron alineadas a la base de datos de referencia SILVA v. 138.1 con el *align.seqs command*. Las secuencias quiméricas se eliminaron con el *chimera.vsearch command*. Las secuencias resultantes se clasificaron con el *classify.seqs command*, y aquellas secuencias que no pertenecieron a Bacteria se removieron con el *remove.lineage command*. Finalmente, las secuencias fueron agrupadas en unidades taxonómicas operativas (OTU) usando el *cluster.split command* con un *taxlevel=4* y *cutoff=0.03*, y los OTUs resultantes se clasificaron por medias con el *classify.otu command*. Los OTUs con menos de 10 lecturas en todas las muestras fueron removidos. La abundancia relativa de cada OTU fue calculada como la proporción de la suma de secuencias para cada muestra basada en la anotación. La estructura de la comunidad microbiana fue estimada con el índice de Diversidad de Shannon y de Simpson, y fueron utilizados para calcular la diversidad  $\alpha$  usando el software NAMCO <https://exbio.wzw.tum.de/namco/>. Las muestras fueron normalizadas por rarefacción.

### 2.2.6. Análisis estadístico

La variable número de UFC fue transformada con logaritmo en base 10. Las diferencias en el número de microorganismos en gránulos y sobrenadante de kéfir en el tiempo se evaluaron mediante análisis de la variancia (ANOVA de un factor). Las medias fueron analizadas mediante el test de Fisher LSD (*Least Significant Difference*) ( $p < 0,05$ ). El test de t-Student se llevó a cabo para comparar las medias (log UFC) de las bacterias y levaduras entre sobrenadante y gránulos de kéfir, así como para evaluar las diferencias en el número de microorganismos al inicio y al final del ensayo luego de un año. Un p-valor  $< 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron con los softwares Epidat e InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2008).

## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Análisis químico del kéfir de agua

Las muestras de kéfir de agua se examinaron en el tiempo 0 (después de la inoculación con los gránulos de kéfir) y luego de las 72 h de fermentación a través de distintos parámetros químicos. En la Tabla 2.1 se presentan los resultados de la caracterización de las muestras de gránulos y sobrenadante.

**Tabla 2.1.** Caracterización química de los gránulos y sobrenadante de kéfir de agua luego de 72 h de fermentación.

PARÁMETROS	VALOR*
<b>SOBRENADANTE</b>	
Acidez (g/100 ml)	0,77 ± 0,00
pH	3,44 ± 0,05
Contenido de carbohidratos (mg/ml)	1,80 ± 0,05
Contenido total de proteínas (%)	0,02 ± 0,00
Materia seca (% p/v)	0,51 ± 0,04
Etanol (% ABV)	1,19 ± 0,37
Sólidos solubles totales (°Brix)	1,73 ± 0,11
Sodio (mg/l)	77,6 ± 0,02
Potasio (mg/l)	165,4 ± 0,03
Magnesio (mg/l)	21,1 ± 0,02
<b>GRÁNULOS</b>	
Peso seco (% p/p)	17,12 ± 1,24
Cenizas (% p/p)	0,69 ± 0,01

\* Cada dato es la media de tres repeticiones ± desvío estándar.

### 2.3.2. Enumeración de microorganismos del kéfir

Se realizó un recuento del número de microorganismos de los gránulos y sobrenadante del kéfir luego de incubar por tres días en el laboratorio un kéfir de agua.

Como resultado se obtuvo que las bacterias ( $6,34 \pm 0,59 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ ), aisladas en atmósfera microaerobia y anaerobia, fueron más abundantes que las levaduras ( $5,48 \pm 0,4 \log \text{ UFC ml}^{-1}$ ) en el sobrenadante ( $p < 0,01$ ), mientras que no se encontraron diferencias estadísticas entre ambos grupos de microorganismos en los gránulos (bacterias:  $7,34 \pm 0,5 \log \text{ UFC g}^{-1}$  y levaduras:  $7,00 \pm 0,32 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ). Los resultados son el promedio de las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  para bacterias y de  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  para levaduras (en el sobrenadante), y de las diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  para bacterias y de  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  para levaduras (en los gránulos).

### 2.3.3. Comparación del recuento de microorganismos entre el sobrenadante y los gránulos de kéfir

El número de bacterias y levaduras de los gránulos del kéfir se comparó con el número obtenido del sobrenadante. El recuento de cada grupo microbiano fue significativamente mayor ( $p < 0,01$ ) en los gránulos comparado con el sobrenadante (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2.** Comparación de la caracterización microbiológica de los gránulos y sobrenadante de kéfir de agua luego de 72 h de fermentación.

MICROORGANISMO	GRÁNULOS (Log UFC g <sup>-1</sup> )*	SOBRENADANTE (Log UFC ml <sup>-1</sup> )
<b>BACTERIAS MICROAERÓFILAS</b>	$7,39 \pm 0,07 \text{ a}^+$	$6,41 \pm 0,08 \text{ b}$
<b>BACTERIAS ANAEROBIAS</b>	$7,28 \pm 0,14 \text{ a}$	$6,27 \pm 0,15 \text{ b}$
<b>LEVADURAS</b>	$7,00 \pm 0,11 \text{ a}$	$5,48 \pm 0,14 \text{ b}$

\* Cada dato es la media de tres repeticiones  $\pm$  desvío estándar.

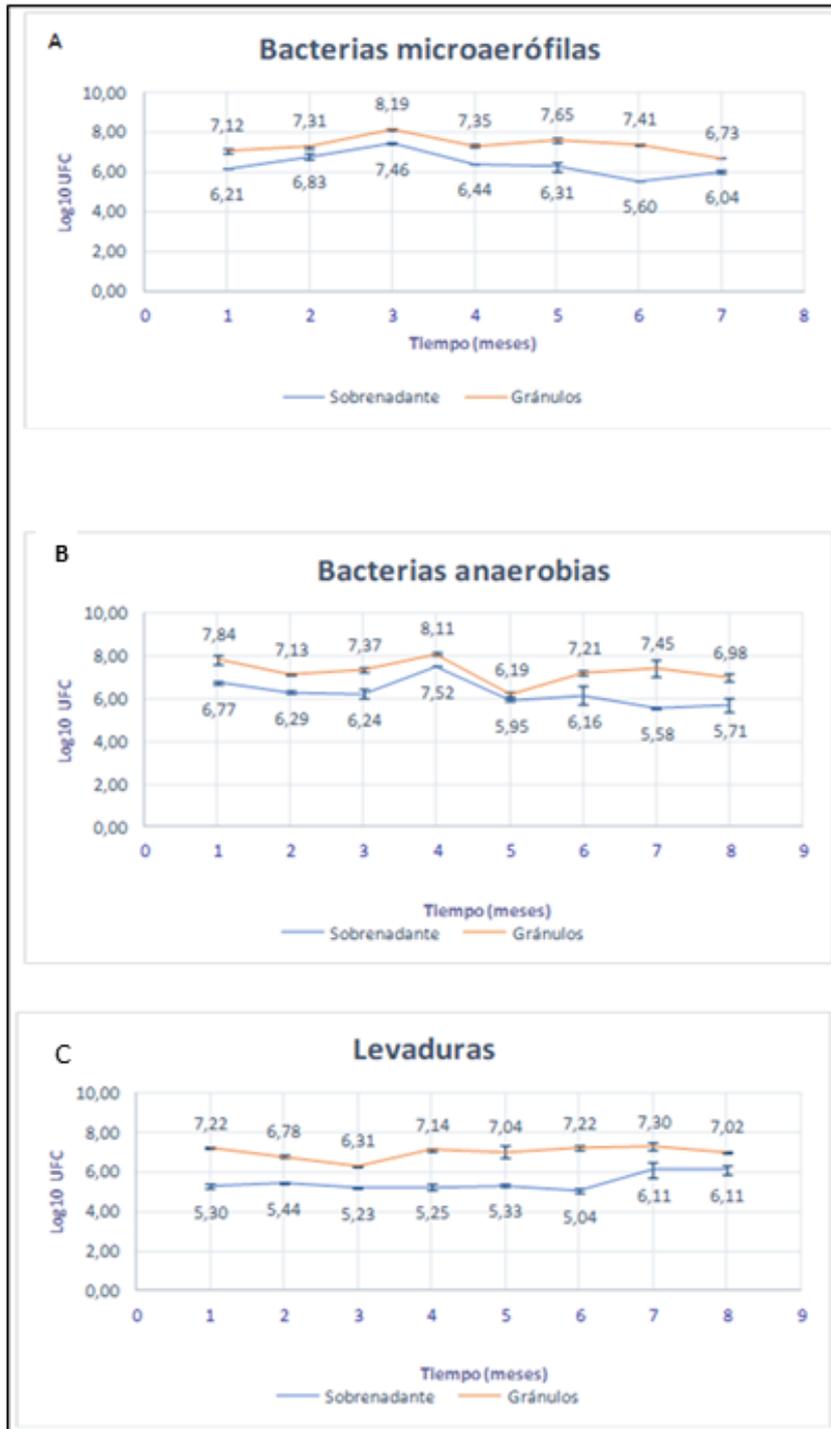
+ Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

### 2.3.4. Evaluación de la composición microbiana del kéfir en el tiempo

Se encontraron marcadas diferencias entre el sobrenadante y los gránulos en las poblaciones de los microorganismos analizados durante el tiempo de almacenamiento (Figura 2.2). El número de bacterias microaerófilas y anaerobias en el sobrenadante alcanzó un máximo luego de cinco meses de almacenamiento, y, a partir

de ese período, se observó una tendencia al descenso en el número. En cambio, el recuento de levaduras se mantuvo constante, hasta que se registró un aumento a los siete meses. Por otro lado, el recuento de bacterias en los gránulos mantuvo una tendencia descendiente durante todo el tiempo de conservación, presentando un significativo descenso luego de los cinco meses. La población de levaduras fue estable durante los primeros cinco meses, con un aumento considerable después de ese tiempo.

El número inicial de microorganismos se comparó con el número final con el objetivo de establecer cómo influyeron las condiciones de almacenamiento luego de un año. En los gránulos de kéfir, el recuento de ambos grupos de bacterias y de levaduras disminuyó significativamente ( $p < 0,01$ ) luego de 12 meses. En el sobrenadante, el número de bacterias no presentó diferencias estadísticas ( $p \geq 0,05$ ) luego de un año, mientras que el recuento de levaduras aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ) después del período de almacenamiento.



**Figura 2.2.** Recuento expresado en log UFC/g o ml de bacterias microaerófilas (A), bacterias anaerobias (B) y levaduras (C) de los gránulos y del sobrenadante del kéfir durante un año de almacenamiento a  $23 \pm 2$  °C.

### 2.3.5. Secuenciación masiva del kéfir de agua

#### 2.3.5.1. Cobertura de secuenciación

En total, 28.721.971 lecturas crudas fueron obtenidas de todas las muestras. Luego de procesar las librerías utilizando el software MOTHUR, 2975 OTUs únicos fueron inferidos con una mínima abundancia de 10 lecturas a través de todas las muestras (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3.** Resultados de la secuenciación masiva del kéfir de agua: estimación de la diversidad bacteriana entre muestras de gránulos (G) y sobrenadante (S) de kéfir.

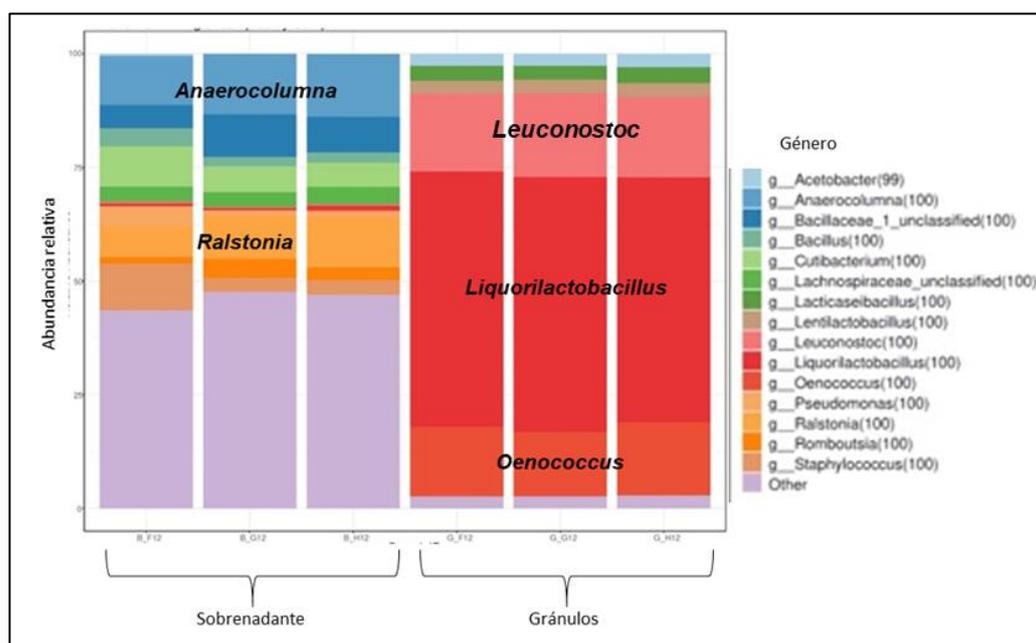
<b>MUESTRA</b>	<b>NÚMERO DE SECUENCIAS (LECTURAS CRUDAS)</b>	<b>OTUS</b>	<b>ÍNDICE SHANNON</b>	<b>ÍNDICE SIMPSON</b>
<b>G-F12</b>	3921280	678	1,59	0,35
<b>G-G12</b>	2969701	666	1,6	0,35
<b>G-H12</b>	2421456	657	1,65	0,33
<b>PROMEDIO</b>	<b>3104145</b>	<b>667</b>	<b>1,61</b>	<b>0,34</b>
<b>S-F12</b>	7887669	1496	4,95	0,02
<b>S-G12</b>	6000839	1242	4,95	0,02
<b>S-H12</b>	5521026	1207	4,95	0,03
<b>PROMEDIO</b>	<b>6469844</b>	<b>1315</b>	<b>4,95</b>	<b>0,02</b>

#### 2.3.5.2. Diversidad de las comunidades bacterianas

La diversidad fue calculada para cada grupo de datos (Tabla 2.3). La estimación de la riqueza de especies fue mayor en las muestras de sobrenadante de kéfir (1315, en promedio para las tres muestras) comparado con los gránulos (667, en promedio para las tres muestras). En las muestras de sobrenadante se observó una mayor diversidad alfa, estimada mediante el índice de Shannon (el cual fue utilizado para estimar la diversidad microbiana en la muestra) y mediante el índice de Simpson (utilizado para estudiar la diversidad microbiana entre muestras) (Tabla 2.3).

### 2.3.5.3. Análisis taxonómico y abundancia relativa de las comunidades bacterianas en cada muestra

Con el objetivo de determinar la abundancia relativa de las bacterias en cada grupo, los OTUs inferidos fueron utilizados para interrogar la base de datos de referencia SILVA. En el sobrenadante, el análisis a nivel de género mostró que los microorganismos pertenecían principalmente a los géneros *Anaerocolumna* y *Ralstonia*. En el caso de los gránulos, el género más representado fue *Liquorilactobacillus*, si bien los géneros *Leuconostoc* y *Oenococcus* también estuvieron bien representados (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Abundancia relativa de los principales 15 géneros de bacterias en muestras de sobrenadante (S) y gránulos (G) de kéfir de agua.

## 2.4. Discusión

Hasta la fecha, se han llevado a cabo estudios sobre la composición química y microbiológica del kéfir de agua comparando bebidas elaboradas con distintos sustratos o de diferentes orígenes. Algunas investigaciones se centran en los cambios químicos o microbiológicos del kéfir. Sin embargo, estos estudios se basan únicamente en el proceso de fermentación (Magalhaes *et al.*, 2010; Laureys y De Vuyst, 2014) o en el almacenamiento del mismo (de Oliveira Leite *et al.*, 2013; Vardjan *et al.*, 2013), pero no en los cambios que pueden ocurrir con el paso del tiempo. En esta tesis se analizó la composición y la estabilidad microbiológica del kéfir de agua durante un año completo, con el objetivo de evaluar la posible alteración que puede ocurrir en la comunidad microbiana del kéfir en el tiempo.

Respecto a los parámetros químicos, los bajos valores de pH del kéfir obtenidos concuerdan con los reportados para muestras de kéfir de agua (Laureys y De Vuyst, 2014; Çevik *et al.*, 2019), y de otras bebidas fermentadas (Nemo y Bacha, 2020). El bajo pH del kéfir es esperable ya que se trata de un producto fermentado, y esta acidez se debe a la presencia de bacterias productoras de ácido láctico que predominan en el kéfir (Magalhaes *et al.*, 2010). El contenido de materia seca en los gránulos fue más alto que en el sobrenadante, lo cual puede ser explicado por la mayor biomasa microbiana presente en los gránulos del kéfir (Garrote *et al.*, 2000). La concentración de etanol aumentó durante el proceso de fermentación de tres días. Esta tendencia también fue observada por otros autores (Magalhaes *et al.*, 2010; Fiorda *et al.*, 2017). El aumento en la concentración de etanol en la bebida obtenida se debe principalmente a la presencia de las levaduras, las cuales son responsables de la fermentación alcohólica y su metabolismo se ve estimulado por el contenido de azúcar del kéfir. Además, la fermentación llevada a cabo por bacterias lácticas heterofermentativas también conlleva a un aumento en la concentración de este alcohol (Moreno y Peinado, 2012). Se han reportado contenidos de etanol entre 0,09 a 4,96 % (Corona *et al.*, 2016; Randazzo *et al.*, 2015). En concordancia con nuestros resultados ( $1,19 \pm 0,37$  %), Situm (2020) reportó valores entre 0,12 y 1,87 %, con una media de 0,60 % de etanol al evaluar 31 muestras de kéfir de agua. Por su parte, en este estudio, los sólidos solubles totales analizados disminuyeron durante el proceso de fermentación, con un mínimo valor luego de 72 h. Esto es esperable ya que los microorganismos consumen el azúcar del kéfir como fuente de energía. Resultados similares fueron reportados por Monar y Dávalos (2013). Destro *et al.* (2019) analizaron el efecto de distintos tipos de azúcar en la fermentación del kéfir y encontraron que los valores de los sólidos solubles totales disminuyeron hasta las 32 h, y luego se mantuvieron estables hasta las 56 h.

Las propiedades químicas del kéfir de agua, al igual que las microbiológicas, dependen de factores tales como el proceso de elaboración, la incubación y las condiciones de almacenamiento (Irigoyen *et al.*, 2004; Farnworth, 2005; Öner *et al.*, 2010). Debido a esto, algunos de los resultados que se obtuvieron difieren de otros estudios. Es el caso de los niveles de proteína, estos fueron más bajos comparados con los presentados por otros autores (Dwiloka *et al.*, 2020). El contenido de carbohidratos y de cenizas también difirieron de valores reportados previamente (Magalhaes *et al.*, 2010; Nemo y Bacha 2020). En este estudio se evaluó la composición de macrominerales (Na, K, Mg) del kéfir. Las muestras presentaron un contenido de 77,6 mg/l de sodio, 165,4 mg/l de potasio y 21,1 mg/l de magnesio. Estos resultados fueron similares a los reportados para otros kéfirs preparados con distintos tipos de azúcar

negra (Destro *et al.*, 2019). Sin embargo, el contenido mineral del kéfir de agua estudiado fue menor con respecto a kéfirs de leche (Turker *et al.*, 2013).

En cuanto a la composición microbiológica de las muestras de kéfir de agua, los principales grupos presentes estudiados fueron bacterias microaerófilas, bacterias anaerobias y levaduras. Muchos autores también han descrito la presencia de estos grupos microbianos en el kéfir (Magalhaes *et al.*, 2010; Syrokou *et al.*, 2019; Çevik *et al.*, 2019). En las muestras de sobrenadante evaluadas, las bacterias fueron más abundantes que las levaduras, al igual que lo reportado por otros autores (Magalhaes *et al.*, 2010; Laureys y De Vuyst, 2014; Prado *et al.*, 2015). Sin embargo, Syrokou *et al.* (2019) encontró que la población de levaduras excedió a la de bacterias por dos unidades logarítmicas en muestras de kéfir de agua. Los autores atribuyeron este resultado al alto contenido de azúcar del kéfir con el que trabajaron. De manera similar a otros estudios (Laureys y De Vuyst, 2014), el número promedio de los tres grupos microbianos evaluados (bacterias microaerófilas, bacterias anaerobias y levaduras), fue mayor en los gránulos que en el sobrenadante.

Durante el almacenamiento del kéfir, las bacterias y las levaduras presentaron un comportamiento diferente. En los gránulos y en el sobrenadante, el número de bacterias tendió a disminuir, mientras que el recuento de levaduras se mantuvo estable, con una tendencia a aumentar con el tiempo. Estos resultados concuerdan con los descritos por Irigoyen *et al.* (2004), quien reportó un significativo descenso de lactobacilos y lactococos, mientras que las levaduras se mantuvieron constantes durante el almacenamiento del kéfir por cuatro semanas. El crecimiento y la supervivencia de los microorganismos en los alimentos depende de los cambios en las condiciones físicas y químicas del ambiente y de la capacidad de los microorganismos de colonizar la matriz alimentaria e interactuar con otras comunidades microbianas presentes en ella (Giraffa, 2004). El crecimiento de las levaduras durante la fermentación puede deberse a la acidificación del ambiente producido por las bacterias, permitiendo a las levaduras convertirse en el grupo predominante al final del período de almacenamiento del kéfir (Magalhaes *et al.*, 2010). Factores tales como la incubación y las condiciones de almacenamiento pueden influir en las características microbiológicas del producto final (Leite *et al.*, 2013). Al comparar los recuentos microbianos entre el inicio y el final del período de conservación, los resultados mostraron que, si bien el número de bacterias y levaduras disminuyó luego de 12 meses, una importante comunidad de microorganismos estuvo presente en el kéfir luego del largo período de almacenamiento.

En esta tesis, se describió la comunidad bacteriana de las muestras de kéfir a

través de la secuenciación masiva. A diferencia de los resultados obtenidos por técnica de recuento de cultivables, con la secuenciación masiva se obtuvieron índices de riqueza y diversidad menores en los gránulos en comparación con los sobrenadantes (Dietrich *et al.*, 2022; Franzetti *et al.*, 1998; Ibacache-Quiroga *et al.*, 2022). Para explicar los menores valores de diversidad observados en los gránulos, se plantean dos hipótesis. La primera hace referencia a que una ineficiente adhesión de los microorganismos a la superficie de los gránulos provocaría una mayor carga bacteriana en el sobrenadante (Dietrich *et al.*, 2022). Otra hipótesis podría ser que la falta de secuenciación del grupo de las levaduras haya llevado a una subestimación de la diversidad real del kéfir (Franzetti *et al.*, 1998; Rosa *et al.*, 2017). Estos resultados demuestran que la técnica de cultivo de microorganismos y otros métodos independientes del cultivo, como la secuenciación masiva, pueden llevar a resultados diferentes. Con lo cual, es muy importante utilizar tanto la técnica tradicional como la moderna de secuenciación para evaluar comunidades microbianas, por ejemplo, en productos como el kéfir.

El análisis metagenómico de la comunidad de bacterias del kéfir reveló tres géneros principales en las muestras de gránulos: *Leuconostoc* (18%) y *Oenococcus* (15%), que pertenecen a la familia Leuconostocaceae, y *Liquorilactobacillus* (55%), miembro de la familia Lactobacillaceae. Este último género ha sido previamente reportado en el kéfir de agua (Badel *et al.*, 2011). *Liquorilactobacillus* es de gran importancia ya que secreta dextrano, un exopolisacárido de particular interés por su potencial como prebiótico (Tan *et al.*, 2022). Por su parte, en las muestras de sobrenadantes, el grupo “otros” fue mayoritario, con un 50 %, reflejando la mayor diversidad observada. Los géneros dentro de este grupo no fueron adecuados candidatos a probióticos debido a que no pertenecían a las bacterias lácticas o porque no eran seguros para su uso como probióticos. De esta manera, a pesar de que la diversidad de bacterias en los gránulos de kéfir fue menor, con sólo tres géneros más representativos, todos ellos incluyen especies que tienen el potencial de ser utilizados como probióticos en alimentación de abejas.

La composición metagenómica del kéfir de agua ha sido estudiada por muchos autores (De Almeida Brasiel *et al.*, 2022; Ibacache-Quiroga *et al.*, 2022; Kalamaki y Angelidis 2019; Liu *et al.*, 2019). Yerlikaya *et al.* (2022) analizó la comunidad microbiana de muestras comerciales de gránulos del kéfir y encontró que, entre las especies bacterianas, eran dominantes *Lactobacillus ruminis* y *Bacillus methanolicus*. Kumar *et al.* (2021) analizó muestras de kéfir de Malasia y, de manera similar a nuestro estudio, describieron a los géneros *Lactobacillus* y *Oenococcus* como los más abundantes. Estos

autores también reportaron al género *Acetobacter* como uno de los más comunes. Muestras de kéfir de agua de Bélgica fueron estudiadas por Verce *et al.* (2019). En su estudio, analizaron las muestras utilizando la secuenciación por metagenómica y encontraron una nueva especie de *Oenococcus* relacionada con *Oenococcus oeni* y *Oenococcus kitaharae*. Es importante destacar que, *Lentilactobacillus kefir*, es una de las principales especies de bacterias lácticas presentes en el kéfir. Carasi *et al.* (2022) discutieron el potencial de *L. kefir* como una especie probiótica y concluyeron que ciertas cepas serían excelentes candidatas para su uso en el desarrollo de suplementos alimenticios.

## Conclusiones

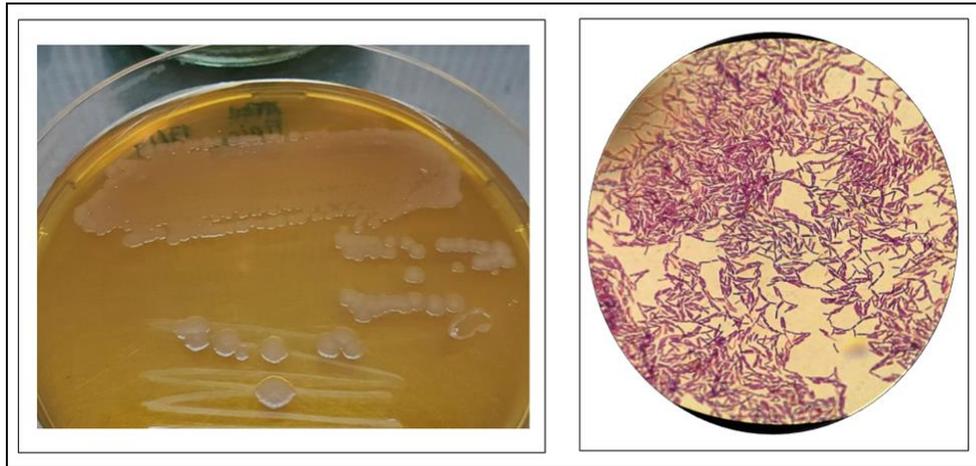
- Desde el punto de vista químico, las muestras de kéfir de agua evaluadas se caracterizaron por ser ácidas, con un bajo contenido de etanol y presentaron macro minerales como Na, K y Mg.
- De acuerdo con los resultados obtenidos por la técnica de recuento de cultivables, en el sobrenadante del kéfir de agua las bacterias fueron más abundantes que las levaduras.
- En los gránulos del kéfir de agua, a través de la técnica de recuento de microorganismos viables, no se encontraron diferencias estadísticas entre bacterias y levaduras.
- Los gránulos del kéfir presentaron un mayor número de microorganismos (bacterias y levaduras), comparado con el sobrenadante.
- Luego de un año de almacenamiento a  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , todos los microorganismos estudiados, bacterias y levaduras, permanecieron viables en el kéfir.
- La diversidad de bacterias, analizada por la técnica de secuenciación masiva, fue menor en los gránulos que en el sobrenadante de kéfir.
- A través de la técnica de secuenciación masiva se observó que los principales géneros de bacterias presentes en los gránulos del kéfir fueron miembros de las familias Leuconostocaceae y Lactobacillaceae, las cuales incluyen especies de microorganismos probióticos.
- Las técnicas de cultivo de microorganismos viables y las de secuenciación son complementarias.
- El kéfir de agua es una fuente de potenciales probióticos que podrían ser utilizados en la alimentación de abejas.

### **Capítulo 3: Estudios *in vitro* de la actividad antimicrobiana de microorganismos aislados del kéfir de agua frente a patógenos de interés apícola**

#### **3.1. Introducción**

En las últimas décadas la población global de las abejas melíferas ha enfrentado una elevada mortalidad, siendo un desafío difícil el manejo sustentable de estos insectos (Maggi *et al.*, 2016). Uno de los principales factores que puede reducir la producción de miel y, en algunos casos, provocar la muerte de la colonia, son los diferentes patógenos y parásitos que afectan a las abejas (Audisio, 2016). Entre ellos se destacan *Paenibacillus larvae* y *Ascosphaera apis*, los cuales representan las enfermedades más importantes de las larvas de abejas a nivel global (Hristov *et al.*, 2020).

*Paenibacillus larvae* (Figura 3.1) es una bacteria Gram positiva con la capacidad de formar esporas que permanecen viables por largos períodos y pueden sobrevivir frente a condiciones adversas (Morse y Nowogrodzki, 1990). Es el agente causal de la “loque americana”, la enfermedad más severa que afecta a la cría de abejas y que está ampliamente difundida en todos los países productores de miel (Matheson, 1996). Las colmenas enfermas se caracterizan por la presencia de cuadros con cría salteada, cuyas celdas presentan opérculos hundidos y oscurecidos, con perforaciones irregulares. Las larvas afectadas adquieren un color *beige* (castaño claro) y marrón oscuro que se transforman en una masa viscosa que, finalmente, se convierte en una escama negra adherida al fondo de las celdas. Cada escama puede contener hasta  $2,5 \times 10^9$  esporas bacterianas, siendo éstas la forma infectiva (Sturtevant, 1932). El ciclo de la enfermedad comienza cuando la larva ingiere las esporas con el alimento contaminado. Las esporas germinan en el intestino de las larvas dando lugar a células vegetativas flageladas que migran al epitelio y lo atraviesan durante la metamorfosis. Desde allí, alcanzan la hemolinfa, se multiplican y vuelven a esporular (Genersch, 2010). A los 11/12 días, la pupa muere por septicemia (Tanada y Kaya, 1993). Cuando las abejas nodrizas remueven las larvas muertas, las esporas se diseminan por toda la colmena, contaminando la miel y otros productos apícolas. También se pueden diseminar entre colmenas por pillaje, enjambres e intercambio de cuadros, principalmente (Matheson y Reid, 1992).



**Figura 3.1.** Micromorfología de *Paenibacillus larvae*. Colonias cultivadas en medio MYPGP a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  (izquierda). Vista bajo microscopio óptico de células de *P. larvae* con tinción de Gram (derecha).

*Ascosphaera apis* (Figura 3.2) es un hongo heterotálico que esporula sólo cuando los micelios del sexo opuesto entran en contacto y, luego de la interacción entre ambos micelios, se forman las esporas dentro de cuerpos fructíferos verde oscuro denominados ascocarpos (Gilliam *et al.*, 1978). *A. apis* causa la enfermedad “cría yesificada” que ataca a las larvas de abejas y se presenta en la mayoría de las regiones del mundo. La enfermedad se produce por la ingestión de las ascosporas por parte de las larvas. Las esporas pueden permanecer latentes y viables por muchos años, y son capaces de germinar en el ambiente microaerófilo del canal alimentario de la larva. Luego, las hifas del micelio penetran en las paredes del intestino, privándola de nutrientes. El crecimiento vegetativo de *A. apis* se extiende por la larva, cubriéndola totalmente de una capa gruesa de micelio. Si los cuerpos de fructificación se han formado, las larvas enfermas se convierten en las llamadas “momias” de color gris o negro (Figura 3.3) (Aronstein y Murray, 2010).



**Figura 3.2.** Micromorfología de *Ascosphaera apis*. Crecimiento en medio YGPSA a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ; vista bajo microscopio óptico.



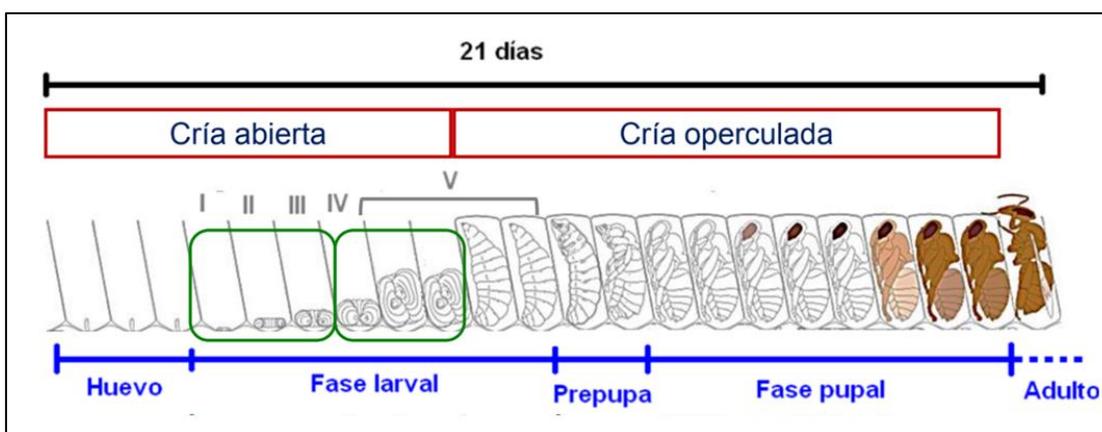
**Figura 3.3.** Momias de larvas de abejas luego de ser atacadas por *A. apis*; vista bajo lupa. Las momias blancas fueron atacadas por un solo micelio (*plus* o *minus*), mientras que las momias negras fueron atacadas por ambos micelios y se generaron frutos, lo que produce el cambio de coloración (de blanco a negro).

En los últimos años, numerosos estudios llevados a cabo en el laboratorio han demostrado el efecto antibacteriano y antifúngico de microorganismos, principalmente bacterias lácticas, frente a distintos patógenos de las abejas (Alquisira-Ramírez *et al.*, 2017; Iorizzo *et al.*, 2020a, b; Iorizzo *et al.*, 2021). Muchos autores han reportado la capacidad de ciertas bacterias para inhibir el crecimiento de *P. larvae* (Daisley *et al.*, 2019; Lamei *et al.*, 2020). La mayoría de las bacterias, entre las que se pueden mencionar *Lactiplantibacillus plantarum* (anteriormente *Lactobacillus plantarum*), *Apilactobacillus kunkeei*, especies de *Bacillus* y *Brevibacillus*, han sido aisladas de pan de polen, del intestino de abejas, de la miel o de larvas de abejas. Estas especies han mostrado antagonismo *in vitro* sobre *P. larvae* o han disminuido la infección y/o mortalidad de las larvas causada por este patógeno (Arredondo *et al.*, 2018; Bartel *et al.*, 2019; Daisley *et al.*, 2020; Iorizzo *et al.*, 2020a). En cuanto al antagonismo de bacterias frente a *A. apis*, hay pocos estudios realizados, siendo las bacterias del ácido láctico las más estudiadas (Bartel *et al.*, 2019; Cabana *et al.*, 2021; Iorizzo *et al.*, 2020b). Ensayos *in vitro* e *in vivo* con especies de *Lactobacillus* han demostrado que esta bacteria tiene un efecto beneficioso en la salud de las colonias, estimulando la puesta de la reina y la producción de miel (Audisio, 2016).

Las investigaciones descritas previamente se basan en la evaluación de la susceptibilidad microbiana a través de la utilización de técnicas conocidas como antibiogramas (Fothergill, 2012). En los antibiogramas se enfrentan microorganismos a sustancias que se aplican al medio de cultivo en determinadas concentraciones (Akualing y Rejeki, 2018). Dentro de las técnicas clásicas se encuentran, por un lado, las pruebas de difusión, que incluyen la difusión por discos, por pozo en agar y la inclusión de la sustancia antimicrobiana a probar en el medio de cultivo. Entre los métodos de dilución se pueden mencionar técnicas en agar, en caldo (Balouri *et al.*, 2016) y el método de microdilución. Éste último implica preparar diluciones seriadas del cultivo a evaluar y permite trabajar con pequeños volúmenes de muestra y medios (EUCAST, 2017).

El ciclo de vida de las abejas se divide en cuatro fases de desarrollo: huevo, larva, pupa e imago (Weaver, 1957). El ciclo de desarrollo comienza con la oviposición de la reina de un huevo en la celda de cría, seguido por la eclosión del huevo y el crecimiento de la larva durante siete días, un período de incubación durante el cual se desarrolla la pupa y, finalmente, la emergencia de la abeja adulta (Winston, 1991) (Figura 3.4). La cría de larvas *in vitro* es una interesante estrategia para estudiar la fisiología de las abejas, la determinación de la casta y para evaluar los efectos de distintas patologías. Los protocolos para criar larvas de abejas *in vitro* se centran en el

período larval de siete días. Con ellos se ha logrado la supervivencia de las larvas y, por lo tanto, pueden ser utilizados para ensayos de cría y de rutina (Aupinel *et al.*, 2005; Crailsheim *et al.*, 2013). Se ha demostrado que alimentar abejas con una dieta suplementada con determinadas bacterias estimula la transcripción de genes implicados en la respuesta inmune (Evans y López, 2004; Antunez *et al.*, 2013). Por lo tanto, el agregado de bacterias beneficiosas al alimento mejoraría la inmunidad de las abejas contra posibles patógenos (Al-Ghamdi *et al.*, 2017).



**Figura 3.4.** Metamorfosis en la casta obrera de *Apis mellifera*. Esquema del desarrollo holometábolo día a día, desde la oviposición hasta que emerge el adulto. Se indica con números romanos los cinco estadios de la fase larval (Tomado de Vázquez y Arredondo, 2024).

Como se describió previamente (Capítulo 1), uno de los requisitos para que un microorganismo sea considerado probiótico es que ejerza un efecto beneficioso en la salud del hospedador. En este contexto, se propuso evaluar el impacto del kéfir de agua y SLC de microorganismos obtenidos del mismo, en la salud de larvas de abejas. A través de su incorporación en la dieta se puede determinar si el compuesto resulta tóxico o ejerce un beneficio en las larvas, tales como aumentar el peso y/o tamaño y disminuir la mortalidad frente a la infección con patógenos.

### Objetivos específicos

1. Aislar bacterias y levaduras que predominen en el kéfir de agua con el fin de obtener una colección de aislamientos como potenciales probióticos.

2. Evaluar *in vitro* las propiedades antimicrobianas de las bacterias y de las levaduras aisladas del kéfir frente a *Paenibacillus larvae* y a *Ascosphaera apis*.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) de los sobrenadantes de los microorganismos seleccionados por su capacidad antimicrobiana a través de la técnica de microdilución en caldo.
4. Estudiar el efecto del kéfir de agua en la mortalidad larval en ensayos de cría de larvas *in vitro*.
5. Evaluar el efecto de los sobrenadantes microbianos sobre larvas criadas *in vitro* y si su incorporación a la dieta induce efecto antimicrobiano en la infección provocada por los patógenos causantes de las enfermedades loque americana y cría yesificada.

### **3.2. Materiales y métodos**

#### **3.2.1. Aislamiento y caracterización fenotípica de microorganismos del kéfir de agua**

A partir del kéfir de agua, en el laboratorio, se prepararon diluciones decimales y se sembraron en placas con medio MRS para aislar bacterias y medio HyL para el aislamiento de levaduras. Luego de la incubación a  $35 \pm 2$  °C (bacterias) y a 25 °C (levaduras), se evaluaron las placas y se eligieron las colonias de bacterias y levaduras que presentaban diferentes morfologías. Cada una de ellas fue repicada mediante estrías a otra placa con el mismo medio de cultivo y se incubaron en las condiciones descritas previamente en el capítulo 2. Este procedimiento se repitió sucesivas veces hasta asegurar la pureza del cultivo.

Los aislamientos puros fueron caracterizados fenotípicamente en base a los criterios reportados por Mantilla y Portacio (2012). En un primer lugar, se realizó el método de tinción de Gram en bacterias (Coico, 2001) y la técnica de disgregado con azul de metileno en levaduras (Smart *et al.*, 1998). Luego, los aislamientos fueron evaluados mediante las pruebas de actividad oxidasa y catalasa, reducción de nitrato, producción de gas a partir de glucosa y fermentación de lactosa (Gerhardt 1981; Audisio *et al.*, 2011; Camarotte 2013).

##### **3.2.1.1. Preparación de sobrenadantes de los cultivos microbianos**

Las bacterias aisladas del kéfir fueron cultivadas en 10 ml de caldo MRS durante

24 h a 37 °C en microaerofilia y en anaerobiosis. Las levaduras se cultivaron en 10 ml de medio HyL durante 24 h a 25 °C en aerobiosis. Los cultivos se hicieron crecer hasta la fase exponencial y su densidad óptica (D.O) se ajustó a 0,1 (600 nm), midiendo en espectrofotómetro (PerkinElmer PDA UV/VIS Lambda 265). Los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación a 15.000 rpm ("DLab" D2012-Plus) durante 10 min. Los mismos se filtraron con filtros de 0,22 µm (Sartorius) y se utilizaron en las pruebas de actividad antimicrobiana.

### **3.2.2. Cepas patógenas de larvas de abejas**

Se utilizaron ocho cepas de *Paenibacillus larvae*. Tres de ellas, CMM15, CMM23 y CMM35, fueron obtenidas por el Dr. Reynaldi y pertenecen al cepario de colección de Micología Médica de La Plata (CEMIBA). Una, MAR1, pertenece a la colección del LabEA. Otras tres, Cobo, Sierra y Estafeta, fueron provistas por el Centro de Investigación de Abejas Sociales (CIAS – Mar del Plata). La cepa BMR43-81 fue provista por el Dr. Thompson del Department of Biology (University of Western Ontario). Las cepas se cultivaron en medio MYPGP con el agregado de antibióticos ácido nalidíxico y ácido pipemídico. Este medio fue desarrollado por Dingman y Stahly (1983) y se compone de caldo Mueller-Hinton, extracto de levadura, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, glucosa, piruvato de sodio y agar. Para la obtención de células vegetativas, las esporas se hicieron germinar mediante la incubación en microaerofilia a 37 °C durante una semana. Las colonias se repicaron en placas con medio MYPGP y se hicieron crecer en aerobiosis a 37 °C por 48 h. A partir de las colonias puras, se inocularon tubos con medio líquido MYPGP y se incubó en aerobiosis a 37 °C durante 24/48 h. La identificación se realizó mediante prueba de la catalasa (catalasa negativa) y tinción con Gram (bacilos Gram positivos).

Se emplearon 15 cepas de *Ascophaera apis* provistas por el Dr. Reynaldi del cepario del CEMIBA. También, se utilizó una cepa de *A. apis* aislada a partir de momias de las colmenas del LabEA. Las cepas se cultivaron en medio YGPSA y se incubó en aerobiosis a 28 °C en oscuridad por siete días para el desarrollo de micelio. El medio YGPSA contiene extracto de levadura, glucosa, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, almidón soluble y agar (Anderson *et al.*, 1997). La identificación se realizó mediante observación microscópica del micelio (Aronstein y Murray, 2010).

### **3.2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana**

La actividad inhibitoria de los aislamientos microbianos sobre el crecimiento de los patógenos *P. larvae* y *A. apis* se evaluó *in vitro* a través de la técnica de difusión por

pozo en agar (Balouiri *et al.*, 2016).

### **3.2.3.1. Ensayo frente a *Paenibacillus larvae***

Se obtuvo un cultivo líquido puro de *P. larvae* en 10 ml de caldo MYPGP luego de la incubación durante 24 h a  $35 \pm 2$  °C. La suspensión bacteriana se ajustó a una D.O de 0,75 a 600 nm. Se colocaron 100 µl del cultivo puro del patógeno sobre la superficie de una placa de Petri con medio MYPGP y se distribuyó homogéneamente con espátula de Drigalsky. Las placas se dejaron secar dentro de la cabina de flujo laminar FLV (Modelo B5 297 Bioamerican Science). A continuación, se realizaron cuatro pozos equidistantes de siete milímetros de diámetro en el medio de cultivo, en los cuales se inocularon 80 µl de cada sobrenadante microbiano a evaluar. Las placas se incubaron a  $35 \pm 2$  °C por 24 y 48 h en aerobiosis. El medio de cultivo (MRS/HyL) sin agregados se utilizó como control negativo. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada cepa de *P. larvae*.

Luego de la incubación, se examinó la presencia de halos de inhibición del crecimiento del patógeno. El tamaño del halo se determinó midiendo desde el borde del pozo hasta el borde de la zona inhibida (halo), y se multiplicó por dos. La sensibilidad fue registrada en una escala de cuatro niveles como: (-) sin inhibición del crecimiento de la cepa indicadora de *P. larvae*; halos entre 0 y 8 mm: moderada inhibición del crecimiento de *P. larvae* (+); entre 8 y 14 mm: buena inhibición (++) y entre 14 y 24 mm: fuerte inhibición del patógeno (+++).

### **3.2.3.2. Ensayo frente a *Ascosphaera apis***

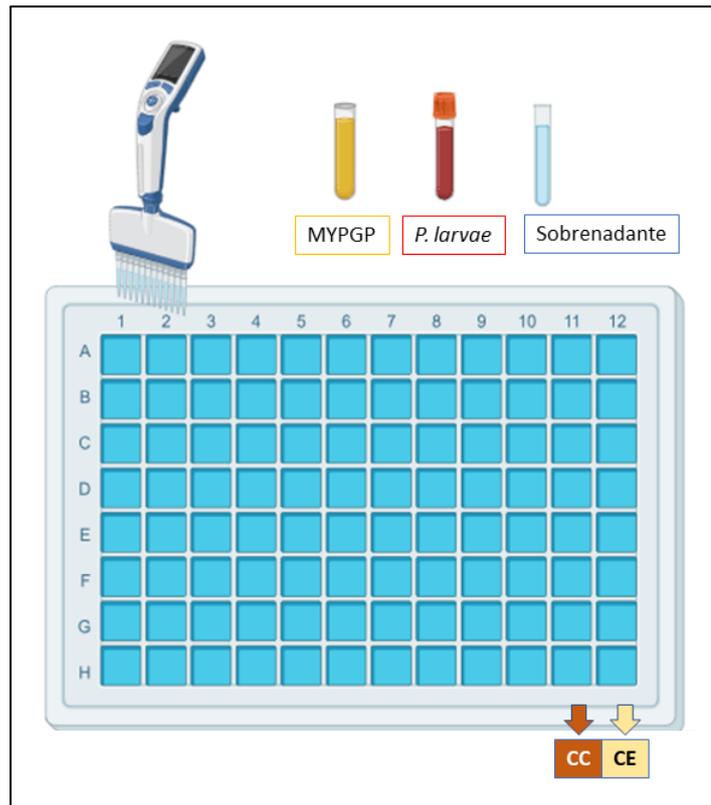
Se cultivó el hongo *A. apis* en medio YGPSA por siete días a 28 °C en oscuridad. Se colocó un disco de micelio del hongo de siete mm de diámetro en el centro de una placa con medio YGPSA. A continuación, en el medio de cultivo se realizaron cuatro pozos de siete mm de diámetro equidistantes al disco central, en los cuales se inocularon 80 µl de cada sobrenadante microbiano a evaluar. Las placas se incubaron a 28 °C por siete días en oscuridad en aerobiosis. Luego de la incubación, se examinó la presencia de inhibición del crecimiento del patógeno. Los resultados se analizaron siguiendo la clasificación cualitativa: sin inhibición (-) o buena inhibición (+). Los ensayos se realizaron por triplicado para cada cepa de *A. apis*.

### 3.2.4. Determinación de la CIM de los sobrenadantes de bacterias y levaduras

Los tres aislamientos de bacterias y tres de levaduras que mayor actividad inhibitoria (+++) presentaron en la prueba de difusión por pozo en agar sobre *P. larvae* fueron seleccionados para determinar la CIM por el método de dilución en caldo (EUCAST, 2017), con modificaciones, utilizando microplacas de 96 pocillos. Cada cepa se evaluó en una microplaca con tres repeticiones.

Se evaluaron los sobrenadantes correspondientes a crecimientos logarítmicos de  $10^8$  UFC de los aislamientos seleccionados. Para ello se prepararon cultivos líquidos de cada microorganismo a evaluar y se ajustó la D.O a la fase de crecimiento exponencial de cada uno de ellos. Los cultivos se centrifugaron a 15.000 rpm por 10 min (Hanil modelo combo 514R) y se filtraron con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  (Sartorius). También, se preparó un cultivo de 24 h de *P. larvae* en medio líquido MYPGP y se ajustó a una D.O de 0,08 – 0,1 (0,5 McFarland).

Se colocaron 100  $\mu\text{l}$  del medio MYPGP sin inocular en cada pocillo de la microplaca (de 1 a 12). A su vez, se inocularon 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de cada cepa en todos los pocillos de la primera columna. A continuación, se transfirieron con micropipeta multicanal 100  $\mu\text{l}$  de la columna 1 a la 2, y así sucesivamente, hasta la columna 10. Finalmente, se inocularon 100  $\mu\text{l}$  del cultivo de *P. larvae* de la columna 1 a 11. Se utilizó la columna 11 como control de crecimiento (CC) con el medio de cultivo y 100  $\mu\text{l}$  de *P. larvae*, y la columna 12 como control de esterilidad (CE) conteniendo sólo el medio de cultivo (Figura 3.4). Las microplacas se incubaron en aerobiosis durante 24 y 48 h a 37 °C. Luego de ese tiempo, se evaluó si hubo crecimiento del patógeno (turbidez) midiendo la D.O en un lector de microplaca (Bio-Tek Synergy™ HT). La menor concentración a la que se produjo una inhibición completa del crecimiento visible fue considerada la concentración inhibitoria mínima (CIM).



**Figura 3.4.** Representación de la carga de la microplaca de 96 pocillos para la determinación de la CIM de los sobrenadantes de bacterias y levaduras. Columnas 1 a 10: MYPGP + *P. larvae* + sobrenadante; columna 11: MYPGP + *P. larvae* (control de crecimiento (CC)); columna 12: MYPGP (control de esterilidad (CE)).

### 3.2.5. Ensayos *in vitro* en larvas de abejas

#### 3.2.5.1. Preparación del alimento para larvas

El alimento se preparó en base a la dieta 7 propuesta por Kaftanoglu *et al.* (2010), con modificaciones. La misma consistió en jalea real (53 % v/v) y una solución azucarada [glucosa (4 % p/v), fructosa (8 % p/v) y extracto de levadura (1 % p/v)]. Inicialmente, se prepararon 10 ml de solución azucarada. Luego, se tomaron 5 ml de la misma y se agregaron 5 ml de agua destilada (control), kéfir de agua (tratamiento 1) o sobrenadante del microorganismo (tratamiento 2), según el ensayo. De estos 10 ml, se tomaron 5 ml y se añadieron 5 ml de jalea real (llegando a un volumen final de 10 ml). El alimento fue conservado en la heladera a 4 °C durante todo el ensayo.

#### 3.2.5.2. Traslarve

Se preparó un protocolo para la cría de larvas de *A. mellifera* en el laboratorio

(Figura 3.5). Se utilizaron larvas de abejas obreras, menores a 72 h de vida procedentes de la progenie de una sola reina. Se colocaron en pocillos de microplacas de 8x12 de base plana las cuales habían sido previamente desinfectadas con alcohol 70 % v/v y luz UV. El traslarve, es decir, el traspaso de larvas desde el cuadro de la colmena a la microplaca, se realizó en ambiente estéril utilizando aguja de traslarve y en el menor tiempo posible. Previo al traslarve, se colocó el alimento en los pocillos de la microplaca utilizando una micropipeta. El alimento fue entibiado a 34 °C antes de la alimentación, variando cada día su cantidad y al séptimo no se alimentó más (Kaftanoglu *et al.*, 2010). Luego del traslarve, las microplacas se incubaron en una cámara de cría (P-Selecta Environment Testing) controlando la humedad relativa entre 80 – 90 % y la temperatura entre 34 – 36 °C durante seis días (período larval). Al séptimo día las larvas comenzaron a empupar, por lo que la humedad se disminuyó al 70 %. En cada ensayo se evaluó el éxito en el traslarve a las 48 h y las variables cuantitativas de peso, tamaño y mortalidad al séptimo día. Las larvas se examinaron diariamente y se clasificaron como muertas cuando perdieron su elasticidad corporal o mostraron un cambio de color a marrón (Aupinel *et al.*, 2005; Antúnez, 2019).



**Figura 3.5.** Cuadro de una colmena para realizar el traslarve (a); Microplaca de 8x12 de base plana con larvas de *Apis mellifera* (b); Larva de 7 días creciendo en un pocillo de una microplaca (c).

### **3.2.6. Ensayos preliminares *in vitro* sobre el efecto del kéfir de agua en la alimentación de larvas**

Los tratamientos consistieron en alimentar larvas con las siguientes dietas basadas en la propuesta por Kaftanoglu *et al.* (2010): una solución azucarada diluida en agua con 50 % de jalea real y una solución azucarada diluida en kéfir (1:1) con 50 % de jalea. Las microplacas fueron incubadas en cámara de cría controlando la temperatura y humedad, como se describió previamente. Además, las placas se dejaron incubando durante 21 días para evaluar el número de larvas que alcanzaron el estado de pupa e imago.

### **3.2.7. Ensayos de toxicidad**

En base a los resultados de actividad inhibitoria *in vitro*, se seleccionó uno de los aislamientos de bacterias con mayor inhibición (+++) frente a *P. larvae* (bacteria S6) y uno de los aislamientos de levaduras con buena inhibición frente a *A. apis* (levadura LK3) y se evaluó si el microorganismo seleccionado pudiera ser tóxico para las larvas de *A. mellifera*.

Se preparó un cultivo puro de la bacteria ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) a evaluar en caldo MRS, incubando a  $35 \pm 2$  °C en anaerobiosis. Por otro lado, se obtuvo un cultivo puro de la levadura ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) en medio HyL líquido y se incubó a 25 °C en aerobiosis. Los tratamientos consistieron en alimentar larvas con las siguientes dietas: una solución azucarada diluida en agua con 50 % de jalea real y una solución azucarada diluida en sobrenadante microbiano (1:1) con 50 % de jalea. Las microplacas fueron incubadas en cámara de cría controlando la temperatura y humedad, como se describió anteriormente.

### **3.2.8. Ensayos de estrés en cría de abejas *in vitro* por infección con patógenos larvales**

Se sometió a las larvas al estrés de las enfermedades loque americana y cría yesificada. Para ello, los tratamientos consistieron en alimentar larvas con las siguientes dietas: una solución azucarada diluida en agua con 50 % de jalea real y una solución azucarada diluida en agua con jalea real y el sobrenadante microbiano. A estas dietas se les añadió esporas del patógeno para infectar las larvas a través de la alimentación, como se detalla a continuación. Se utilizaron como control larvas de abejas alimentadas con dietas sin el agregado de esporas del patógeno.

### **3.2.8.1. *Paenibacillus larvae*: capacidad antibacteriana del aislamiento de la bacteria S6**

Se preparó un cultivo puro de 24 h de *P. larvae*, se sembró en placa con medio MYPGP con antibióticos (ácido nalidíxico y pipemídico) y se incubó en microaerofilia por 15/30 días a  $35 \pm 2$  °C. Luego de ese tiempo, se colectaron las colonias crecidas en placa y se transfirieron a un tubo de ensayo con un ml de solución fisiológica estéril, obteniendo así la suspensión de esporas del patógeno. Luego, se sometió el tubo a tratamiento térmico (15 min a 100 °C), se prepararon diluciones decimales y se sembró en placa. Se incubó en microaerofilia por 72/96 h y posteriormente se realizó el recuento de UFC/ml, con el fin de conocer la concentración de esporas (Moliné *et al.*, 2020). La cepa de *P. larvae* utilizada fue Estafeta ( $DL_{50} = 200$  esporas).

Las larvas fueron sometidas a la inoculación con esporas de *P. larvae* mediante la alimentación. Un grupo control se alimentó con una solución azucarada diluida en agua con 50 % de jalea real; otro grupo fue alimentado con la solución azucarada diluida en agua con jalea real y el sobrenadante de la bacteria S6; un tercer y cuarto grupo fueron alimentadas con cada una de las dietas descritas, a las cuales, el primer día, se les agregó  $1 \times 10^6$  esporas de *P. larvae*. A partir del segundo día, las dietas no llevaban las esporas del patógeno (Al-Ghamdi *et al.*, 2017). Se emplearon grupos de 24 larvas en cada tratamiento y se trabajó con tres microplacas. Las mismas fueron incubadas en la cámara de cría controlando la temperatura y humedad. Se evaluaron las variables de éxito en el traslarve a las 48 h, y mortalidad, medida al séptimo día desde el traslarve (Crailsheim *et al.*, 2013).

Luego de 12 días de haber alimentado a las larvas y con el objetivo de determinar si habían muerto porque se infectaron con esporas de *P. larvae*, se realizó el siguiente protocolo. Se maceraron 10 larvas con varilla estéril y se homogeneizaron en 10 ml de PBS estéril. Se sometieron a tratamiento térmico por 15 min a 100 °C. A continuación, se prepararon diluciones decimales y se sembraron en placa con MYPGP y los antibióticos ácido nalidíxico y ácido pipemídico. Luego de la incubación en microaerofilia por tres días a  $35 \pm 2$  °C, se realizó el recuento de esporas en placa (UFC/ml).

### **3.2.8.2. *Ascosphaera apis*: capacidad antifúngica del aislamiento de la levadura LK3**

Para la obtención de esporas de *A. apis* se siguió el protocolo propuesto por Jensen *et al.* (2013). Se obtuvo micelio del hongo en placas con medio YGPSSA, incubando en oscuridad a 30-34 °C, al menos tres semanas en microaerofilia para

asegurar la producción de esporas. Luego, con un bisturí se recolectaron los esporocistos y se transfirieron a un mortero conteniendo agua destilada estéril (ADE). Se trituró la suspensión por 1 min para liberar las esporas de los esporocistos. Se agregaron 200 µl de ADE al mortero y se transfirieron las esporas con micropipeta a un tubo Eppendorf. Se añadieron 750 µl de agua para tener un medio denso en esporas. Se dejó reposar la suspensión por 30 min y se transfirieron con micropipeta aproximadamente 500 µl a un nuevo tubo, para obtener esporas individuales. A continuación, se prepararon diluciones seriadas de  $10^{-2}$  o  $10^{-3}$  para contar y calcular la concentración de la suspensión.

Las larvas fueron enfrentadas a esporas de *A. apis*. Un grupo control (control -) se alimentó con una solución azucarada diluida en agua con 50 % de jalea real; otro grupo fue alimentado con la solución azucarada diluida en agua con jalea real conteniendo  $1 \times 10^7$  esporas/ml de *A. apis* trituradas (control +) y un tercer grupo fue alimentado con la solución azucarada diluida en el sobrenadante de la levadura LK3 con jalea real conteniendo  $1 \times 10^7$  esporas/ml de *A. apis* trituradas. A partir del segundo día, las dietas no incorporaron las esporas del patógeno (Bamford y Heath, 2015). Las microplacas fueron incubadas en la cámara de cría controlando la temperatura y humedad. Se evaluaron las variables de éxito en el traslarve a las 48 h, y mortalidad, medida al séptimo día (Crailsheim *et al.*, 2013).

### **3.2.9. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2008). Para evaluar la supervivencia y el éxito en el traslarve, así como comparar el peso y longitud de larvas del primer ensayo preliminar del kéfir, se realizó el test Análisis de la Varianza (SC tipo III), seguido del Test LSD Fisher Alfa=0.05 y DMS. Se realizó la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales para evaluar el éxito en el traslarve y la mortalidad de las larvas alimentadas con dieta control negativo (sin esporas del patógeno *P. larvae* o *A. apis*) con respecto a los tratamientos (con esporas y sobrenadante de bacteria/ levadura).

## **3.3. Resultados**

### **3.3.1. Aislamiento y caracterización fenotípica de los microorganismos seleccionados a partir del kéfir de agua**

Se seleccionaron un total de 30 bacterias y 30 levaduras. Los aislamientos de

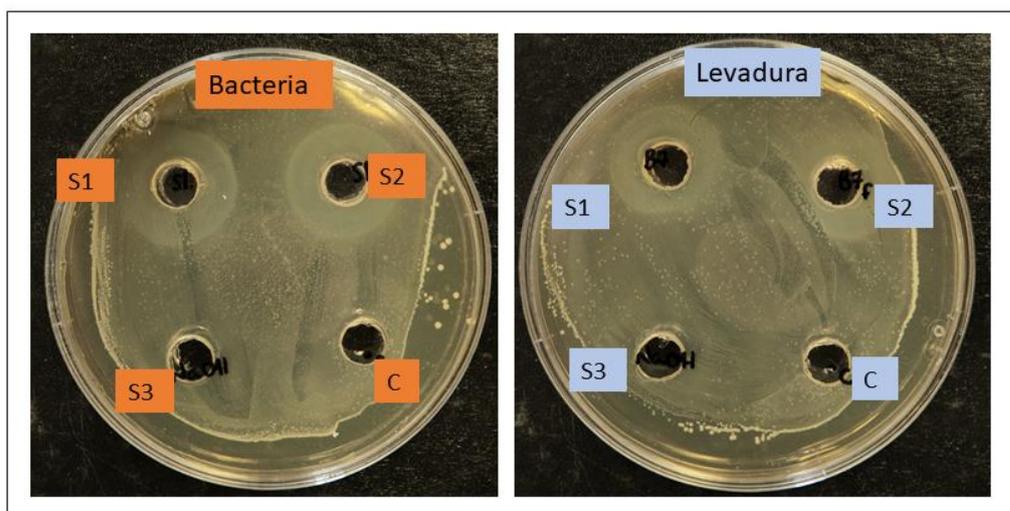
bacterias Gram positivos, catalasa-negativos, oxidasa-negativos, no reductores de nitrato, fermentadores de glucosa con o sin producción de CO<sub>2</sub> y fermentadores de lactosa fueron identificados como posibles bacterias lácticas, en base a la caracterización fenotípica propuesta por Kandler y Weiss (1986). Los aislamientos de levaduras fueron reconocidos como catalasa-positivos, oxidasa-positivos, no reductores de nitrato y no fermentadores de lactosa, en base a lo propuesto por Kreger y Rij (1984).

### **3.3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana**

#### **3.3.2.1. Ensayo frente a *Paenibacillus larvae***

Se evaluó, mediante ensayos de difusión por pozo en agar, el efecto inhibitorio de los sobrenadantes libres de células (SLC) de los 60 aislamientos de bacterias y levaduras del kéfir sobre las ocho cepas de *P. larvae* (Figura 3.6). El diámetro de las zonas de inhibición varió entre  $4 \pm 0,0$  mm y  $24 \pm 0,3$  mm. De los 60 aislamientos, nueve (15 %) no inhibieron a *P. larvae* (-); 10 (16,67 %) produjeron una inhibición moderada (+); 21 (35 %) produjeron buena inhibición (++) y 20 (33,3 %) produjeron fuerte inhibición (+++). En las tablas 3.1 y 3.2 se presentan los resultados del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento del patógeno luego de 24/48 h de incubación producidos por los 20 aislamientos (10 bacterias y 10 levaduras) que presentaron mayor inhibición (+++).

Los 10 aislamientos de bacterias y los 10 de levaduras que presentaron una fuerte actividad inhibitoria frente a *P. larvae* fueron seleccionados para ser evaluados como potenciales probióticos a través de distintas pruebas en el laboratorio (Capítulos 4 y 5).



**Figura 3.6.** Actividad antimicrobiana (técnica de pozo en agar) de sobrenadantes de bacterias (izquierda) y de levaduras (derecha) obtenidos de kéfir de agua sobre *Paenibacillus larvae*. S1, S2, S3: sobrenadantes de bacteria o levadura, C: control negativo (sólo medio de cultivo).

**Tabla 3.1.** Actividad antimicrobiana (técnica de pozo en agar) de 10 aislamientos bacterianos obtenidos de kéfir de agua sobre ocho cepas de *Paenibacillus larvae*.

Aislamiento	Cepas de <i>Paenibacillus larvae</i>							
	CMM15	CMM23	CMM35	MAR1	Estafeta	Sierra	Cobo	BMR43-81
<b>B1</b>	5,3±0,6*	-	-	-	6,0±1,0	4,6±0,6	-	16,0±1,0
<b>B2</b>	-	5,6±1,5	5,0±0,7	4,0±0,0	4,0±0,0	6,0±0,0	4,6±0,7	15,3±0,6
<b>B3</b>	6,0±0,0	-	-	-	-	-	-	14,0±0,0
<b>B5</b>	-	-	-	-	4,0±0,0	-	-	16,0±0,0
<b>B7</b>	9,0±0,7	-	-	-	4,0±0,0	-	-	12,6±0,6
<b>B12</b>	6,0±0,0	-	-	-	4,0±0,0	-	-	16,0±0,0
<b>S1</b>	-	-	-	-	-	-	-	18,0±0,0
<b>S6</b>	-	3,0±0,0	-	8,0±1,0	-	-	6,8±0,7	16,6±0,6
<b>S8</b>	4,6±0,6	-	-	-	6,0±0,0	8,3±0,8	-	14,0±0,0
<b>b3</b>	8,0±0	-	-	-	6,0±0,0	6,0±0,0	-	14,0±0,0

\*Diámetro de halos de inhibición de tres repeticiones en mm  $\pm$  desvío estándar

- Sin inhibición del crecimiento del patógeno

**Tabla 3.2.** Actividad antimicrobiana (técnica de pozo en agar) de 10 aislamientos de levaduras obtenidos de kéfir de agua sobre ocho cepas de *Paenibacillus larvae*.

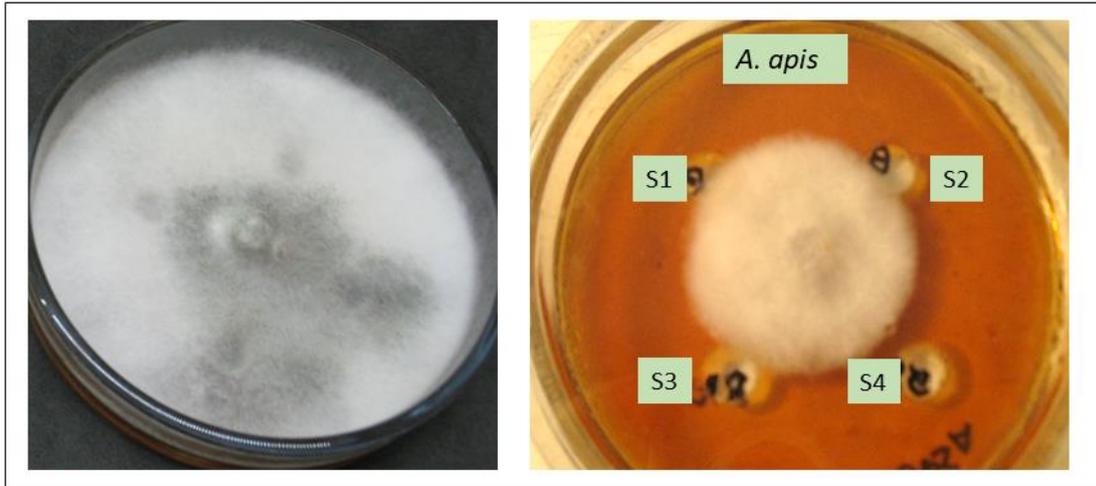
Aislamiento	Cepas de <i>Paenibacillus larvae</i>							
	CMM15	CMM23	CMM35	MAR1	Estafeta	Sierra	Cobo	BMR43-81
<b>LS1</b>	17,0 $\pm$ 0,7*	16,6 $\pm$ 0,6	16,6 $\pm$ 0,6	16,0 $\pm$ 0,0	-	-	-	-
<b>Y1</b>	14,0 $\pm$ 0,0	16,6 $\pm$ 0,6	15,2 $\pm$ 0,5	18,0 $\pm$ 0,0	-	-	-	8,0 $\pm$ 0,0
<b>AS</b>	17,0 $\pm$ 0,7	19,2 $\pm$ 0,6	16,0 $\pm$ 0,0	16,6 $\pm$ 0,6	8,0 $\pm$ 0,0	6,0 $\pm$ 0,0	-	-
<b>BK1</b>	11,5 $\pm$ 0,3	15,0 $\pm$ 0,7	17,5 $\pm$ 0,3	17,0 $\pm$ 0,7	-	8,0 $\pm$ 0,0	-	-
<b>FAS</b>	16,0 $\pm$ 0,0	19,0 $\pm$ 0,7	16,5 $\pm$ 0,3	15,0 $\pm$ 0,7	8,0 $\pm$ 0,7	16,0 $\pm$ 0,0	-	10,0 $\pm$ 1,0
<b>Y4</b>	-	22,0 $\pm$ 0,0	16,0 $\pm$ 0,0	12,5 $\pm$ 0,3	8,0 $\pm$ 0,7	-	-	6,0 $\pm$ 0,0
<b>Y8</b>	12,5 $\pm$ 0,7	18,0 $\pm$ 0,0	16,5 $\pm$ 0,3	11,0 $\pm$ 0,7	8,0 $\pm$ 1,0	16,0 $\pm$ 1,0	-	16,0 $\pm$ 01,0
<b>Y2</b>	-	22,0 $\pm$ 0,0	18,0 $\pm$ 0,0	22,0 $\pm$ 0,0	8,0 $\pm$ 0,0	8,0 $\pm$ 1,0	-	-
<b>LK2</b>	-	24,0 $\pm$ 0,3	17,0 $\pm$ 0,7	21,0 $\pm$ 0,7	-	8,0 $\pm$ 0,0	-	10,0 $\pm$ 0,0
<b>LK3</b>	-	21,0 $\pm$ 1,0	18,0 $\pm$ 0,0	21,0 $\pm$ 0,7	8,0 $\pm$ 1,0	6,0 $\pm$ 0,0	-	10,0 $\pm$ 0,0

\*Diámetro de halos de inhibición de tres repeticiones en mm  $\pm$  desvío estándar

- Sin inhibición del crecimiento del patógeno

### 3.3.2.2. Ensayo frente *Ascosphaera apis*

Se evaluó, mediante ensayos de difusión por pozo en agar, el efecto inhibitorio de los sobrenadantes de los 60 aislamientos frente a las 15 cepas de colección de *A. apis* (CMM1 - CMM15) (Figura 3.7). Un total de cinco bacterias (S6, S8, B8, B3, b3) y 10 levaduras (Y1, Y2, Y4, Y9, K6, LK2, LK3, AS, FAs, LF) lograron una buena inhibición en el crecimiento del patógeno. De estos aislamientos de bacterias y levaduras, aquellos que también presentaron una fuerte actividad inhibitoria frente a *P. larvae*, fueron seleccionados para ser evaluados como potenciales probióticos a través de distintas pruebas en el laboratorio (Capítulos 4 y 5).



**Figura 3.7.** Micelio de *Ascosphaera apis* en una placa con YGPSA (izquierda). Actividad antifúngica (técnica de pozo en agar) de cuatro sobrenadantes microbianos (S1, S2, S3, S4) obtenidos de kéfir de agua sobre el crecimiento del hongo patógeno (derecha).

### 3.3.3. Evaluación del efecto de los sobrenadantes de bacterias y levaduras sobre *P. larvae* por el método de dilución en caldo

Los tres aislamientos de bacterias (B2, S6 y b3) y los tres de levaduras (FAs, Y8 y LK3) que mostraron mejor antagonismo (+++) frente a las cepas de *P. larvae* fueron seleccionados para determinar su CIM. Ninguno de los sobrenadantes de bacterias y levaduras evaluados inhibió el crecimiento de las cepas de *P. larvae*, con lo cual no se pudo determinar una concentración inhibitoria. Sin embargo, se registraron menores valores de absorbancias en los tratamientos (patógeno con sobrenadantes) comparado con las absorbancias en el control de crecimiento (CC) (crecimiento *in vitro* del patógeno solo en el medio de cultivo).

### 3.3.4. Ensayos *in vitro* en larvas de abejas

#### 3.3.4.1. Ensayos preliminares sobre el efecto del kéfir de agua en la alimentación de larvas

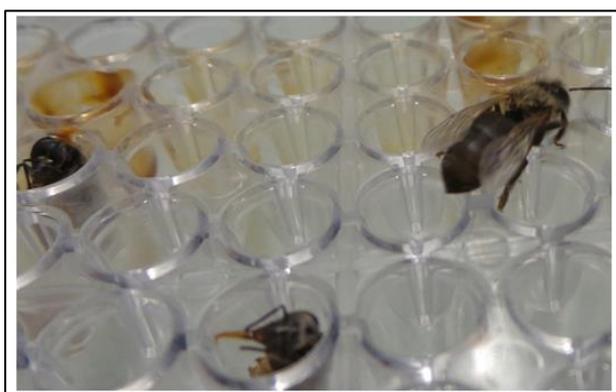
No se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos control y kéfir, en el éxito del traslarve como así tampoco en el porcentaje de mortalidad a los siete días (Tabla 3.3). Se registró un menor peso y tamaño de larvas para el tratamiento kéfir. Sin embargo, cabe destacar, que alcanzaron el estadio de pupa y de imago (Figura 3.8), tanto las larvas alimentadas con solución control (11 pupas y 5 imagos) como con kéfir (5 pupas y 4 imagos).

**Tabla 3.3.** Resultados de las variables medidas en larvas alimentadas con dieta control y kéfir de agua.

Variable	CONTROL	KÉFIR
Éxito en traslarve (%)	62,50	55,50
Mortalidad (%)	54,20	81,10
Peso larva (g)	0,07 ± 0,04 <sup>a *</sup>	0,02 ± 0,03 *
Longitud larva (mm)	9,00 ± 2,50 *	5,40 ± 2,30 *

<sup>a</sup> Los resultados son el promedio de los individuos analizados (n=24) ± el desvío estándar.

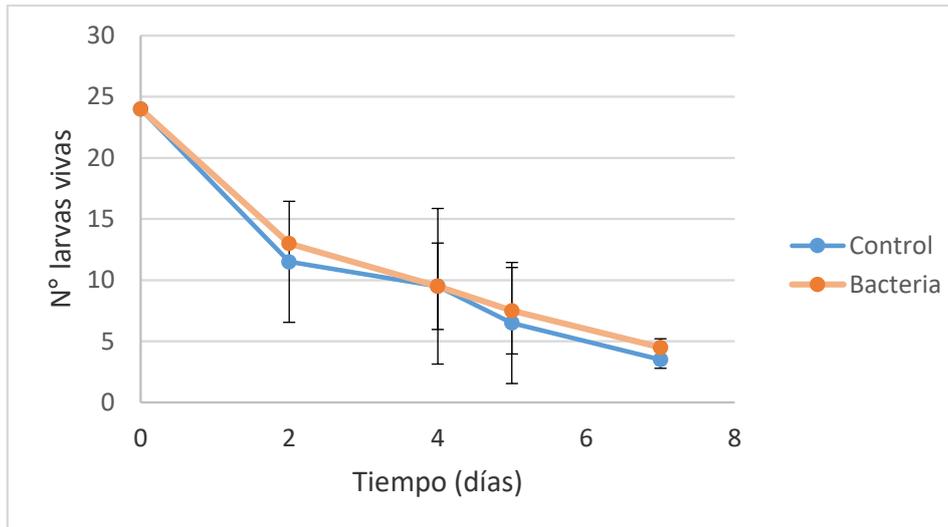
\* Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre tratamientos control y kéfir.



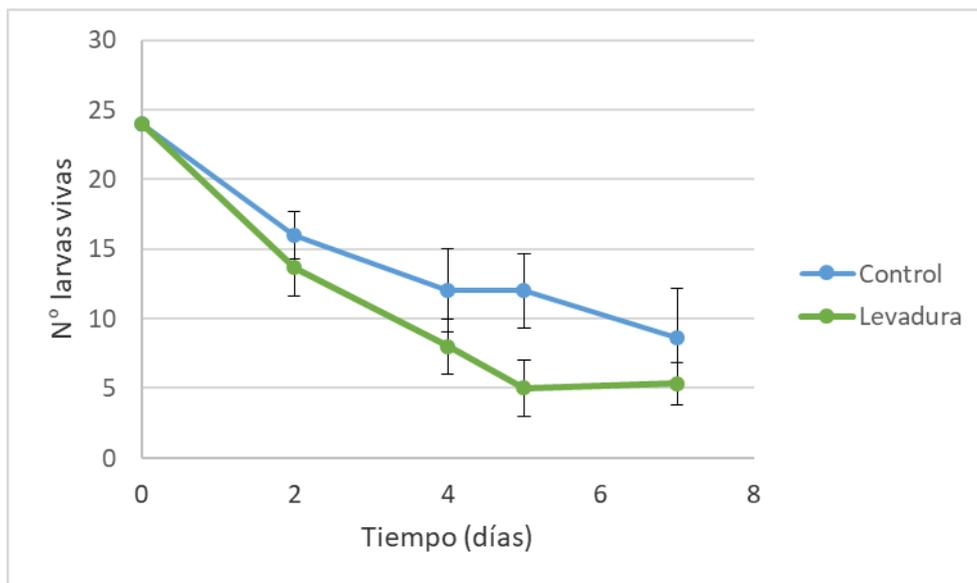
**Figura 3.8.** Estadio de imago de larvas de abejas criadas en microplacas en condiciones de laboratorio.

### 3.3.4.2. Ensayos de toxicidad

No se hallaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos (sobrenadante de bacteria S6/ levadura LK3) en el éxito del traslarve ni tampoco en el porcentaje de mortalidad a los siete días ( $p > 0,1$ ). Es decir, los sobrenadantes libres de células provenientes de cultivos de la bacteria y la levadura evaluadas no tuvieron efecto de toxicidad sobre las larvas (Figura 3.9; Figura 3.10).



**Figura 3.9.** Efecto del sobrenadante de la bacteria S6 sobre la supervivencia de las larvas criadas en el laboratorio durante siete días.



**Figura 3.10.** Efecto del sobrenadante de la levadura LK3 sobre la supervivencia de las larvas criadas en el laboratorio durante siete días.

### 3.3.5. Ensayos de estrés por infección con patógenos de la cría de abejas

#### 3.3.5.1. Efecto de los sobrenadantes sobre la supervivencia larval: Ensayo con *P. larvae*

Al evaluar el éxito en el traslarve a las 48 h, no se hallaron diferencias significativas ( $p > 0,1$ ) entre las larvas alimentadas con dieta sin esporas de *P. larvae* (control negativo), con esporas del patógeno (control positivo) y con el agregado de

sobrenadante de la bacteria más las esporas. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en la mortalidad de las larvas al séptimo día entre los tratamientos comparados (control negativo sin esporas con respecto a los tratamientos control con esporas y sobrenadante bacteriano con esporas). No se hallaron diferencias significativas ( $p > 0,1$ ) entre la supervivencia de las larvas alimentadas con dieta control con esporas (mortalidad al séptimo día=  $90,3\% \pm 0,08$ ) y sobrenadante con esporas (mortalidad al séptimo día=  $91,6\% \pm 0$ ) (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4.** Resultados de las variables medidas en larvas alimentadas con dieta control negativo (sin esporas del patógeno *P. larvae*), control positivo (con esporas) y sobrenadante de bacteria S6 (con esporas).

Tratamiento	Placa	N° Traslarvadas	Éxito traslarve (%)	Mortalidad (%)
CONTROL -	1	24	67	46
	2	24	75	46
	3	24	46	71
<b>Promedio</b>			$63 \pm 0,15$ a*	$54 \pm 0,14$ b
CONTROL +	1	24	67	83
	2	24	79	100
	3	24	67	88
<b>Promedio</b>			$71 \pm 0,07$ a	$90 \pm 0,09$ c
BACTERIA S6	1	24	50	92
	2	24	58	92
	3	24	75	92
<b>Promedio</b>			$61 \pm 0,13$ a	$92 \pm 0,00$ c

\* Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

### 3.3.5.2. Efecto de los sobrenadantes sobre la supervivencia larval: Ensayo con *A. apis*

No se hallaron diferencias significativas ( $p > 0,1$ ) en el éxito en el traslarve a las 48 h entre el control sin esporas (control -), el control con esporas (control +) y el sobrenadante de la levadura LK3 conteniendo esporas de *A. apis*. Respecto al

porcentaje de mortalidad al séptimo día, no hubo diferencias significativas ( $p>0,1$ ) entre los tratamientos (Tabla 3.5).

**Tabla 3.5.** Resultados de las variables medidas en larvas alimentadas con dieta control negativo (sin esporas del patógeno *P. larvae*), control positivo (con esporas) y sobrenadante de levadura LK3 (con esporas).

Tratamiento	Placa	N° Traslarvadas	Éxito traslarve (%)	Mortalidad (%)
CONTROL -	1	24	33	92
	2	24	42	92
	3	24	21	88
<b>Promedio</b>			$32 \pm 0,10^* a$	$90 \pm 0,02 b$
CONTROL +	1	24	38	83
	2	24	25	88
	3	24	13	100
<b>Promedio</b>			$25 \pm 0,13 a$	$90 \pm 0,09 b$
LEVADURA LK3	1	24	33	92
	2	24	58	92
	3	24	29	88
<b>Promedio</b>			$40 \pm 0,16 a$	$90 \pm 0,02 b$

\* Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ( $p>0,05$ )

### 3.4. Discusión

El manejo actual de la enfermedad loque americana en nuestro país se lleva a cabo a través de la quema del material apícola contaminado con esporas (Matheson y Reid, 1992), el empleo de descontaminantes como radiación gamma y esterilización con parafina (Charbonneau *et al.*, 1992) y el mejoramiento genético de las abejas (Rinderer, 1986; Spivak y Reuter, 2001). Todos estos métodos, si bien ayudan a controlar la enfermedad, involucran pérdidas económicas, riesgos y limitaciones (Reynaldi, 2006). En el caso de la cría yesificada, la aplicación de fungicidas sintéticos para su control puede aumentar la mortalidad de las abejas y contaminar la colmena (Mullin *et al.*, 2010). Se han evaluado variados productos quimioterapéuticos sin que ninguno de ellos

sea completamente eficaz (Davis y Ward, 2003). Es por ello que se han estudiado otras alternativas para controlar esta enfermedad. Se ha propuesto el uso de productos naturales para evitar el impacto negativo en el medio ambiente y la contaminación de los productos de la colmena (Albo *et al.*, 2016). Entre los métodos de control naturales se incluye el uso de microorganismos beneficiosos.

Las bacterias obtenidas del kéfir de agua inhibieron con distinta intensidad el crecimiento *in vitro* de *P. larvae* en el ensayo de difusión por pozo en agar. De ellas, se seleccionaron los 10 aislamientos que presentaron una fuerte inhibición para ser evaluadas como posibles probióticos en futuros ensayos. De manera similar, Forsgren *et al.* (2010) estudiaron los efectos de bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* sobre *P. larvae*. En ensayos de inhibición en placas de Petri obtuvieron que distintos grupos taxonómicos de las bacterias presentaron diferencias en el grado de inhibición frente al patógeno. Luego, combinaron los 11 grupos de las bacterias y lograron así una total inhibición del crecimiento del patógeno. Por su parte, Daisley *et al.* (2019) evaluaron las bacterias *Lactobacillus plantarum* Lp39, *L. rhamnosus* GR-1 y *L. kunkeei* BR-1, las cuales presentaron cierto nivel de inhibición *in vitro* frente a *P. larvae*. Al combinar las tres cepas obtuvieron tan buenos resultados como al utilizar el antibiótico oxitetraciclina. Estos estudios demuestran la eficacia de las bacterias para controlar el crecimiento *in vitro* de *P. larvae*. Asimismo, las levaduras aisladas del kéfir presentaron actividad inhibitoria frente a *P. larvae*. Los 10 aislamientos que mostraron mayor inhibición también fueron seleccionados para evaluar su capacidad probiótica. De acuerdo a la bibliografía consultada, no se han reportado estudios en los que especies de levaduras hayan sido utilizadas para controlar el crecimiento de este patógeno. De esta manera, los resultados obtenidos con las levaduras del kéfir son novedosos y de gran interés por su potencial uso para controlar la loque americana.

Los sobrenadantes de determinadas bacterias y levaduras obtenidas del kéfir presentaron buena inhibición frente al crecimiento *in vitro* de *A. apis*. Se ha reportado que especies de *Lactiplantibacillus* presentaron actividad antifúngica de diferente intensidad en ensayos de laboratorio *in vitro* (Iorizzo *et al.*, 2021). Por su parte, Reynaldi *et al.* (2004) estudiaron la potencialidad de 249 cepas de bacterias esporuladas aerobias aisladas de miel como agentes biocontroladores del hongo mediante un ensayo en disco central en condiciones de laboratorio. Seleccionaron como mejores antagonistas 10 cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus* y la especie *Paenibacillus alvei*. Todos estos estudios sugieren que ciertas bacterias tienen el potencial para ser utilizadas en el control de la enfermedad cría yesificada (Bartel *et al.*, 2019), pero ninguno de ellos ha reportado el uso de levaduras. Nuevamente, se pone de manifiesto

la importancia de los resultados obtenidos en esta tesis respecto a las propiedades inhibitorias de las levaduras aisladas del kéfir de agua.

Los tres aislamientos de bacterias y tres de levaduras evaluados mediante el ensayo de microdilución no inhibieron el crecimiento de las cepas de *P. larvae*, por lo tanto, no se pudo determinar una concentración inhibitoria. No obstante, se registró un menor crecimiento de las cepas del patógeno cuando se incubó en presencia de los sobrenadantes microbianos en comparación con el control sin el agregado de los mismos. El grado en que disminuyó el crecimiento fue variable según las cepas de *P. larvae* evaluadas. Esto puede atribuirse a que la patogenicidad y virulencia de las cepas dependen en gran medida de su genotipo y su origen (Genersch, 2006). En esta tesis, dos de las cepas que se utilizaron pertenecen al genotipo ERIC II, mientras que las restantes seis pertenecen al genotipo ERIC I, el cual es considerado como el tipo menos virulento a nivel de larva (Rauch *et al.*, 2009). Además, las cepas tenían un origen diferente, ya que provinieron de distintas regiones de Argentina y una de ellas de Canadá.

El kéfir de agua fue aceptado por las larvas criadas en el laboratorio sin provocar mayor mortalidad que en aquellas alimentadas con una dieta típica. De la misma manera, los sobrenadantes de bacteria y levadura no resultaron tóxicos para las larvas. Esta primera etapa de evaluación de microorganismos es de gran importancia ya que la alimentación de las abejas cumple un rol clave en su salud. Una deficiencia dietética o nutricional es un factor que puede conducir al desarrollo de enfermedades como loque americana (Moliné *et al.*, 2020). Más aún, la pérdida de la microbiota intestinal que puede resultar de la aplicación de antibióticos en las colmenas puede tener consecuencias graves en la función de la inmunidad innata de las abejas y en la susceptibilidad a enfermedades. De esta manera, la alimentación de las abejas se puede mejorar o complementar con microorganismos beneficiosos para lograr mantener una microbiota balanceada (Daisley *et al.*, 2020).

Los sobrenadantes de la bacteria y levadura seleccionadas se incorporaron en la dieta de larvas de abejas que fueron sometidas al estrés de loque americana y cría yesificada. Respecto a la enfermedad loque americana, el agregado de sobrenadante bacteriano a la dieta no tuvo un efecto protector frente a la infección con esporas de *P. larvae*. Otros autores, en cambio, sí lograron disminuir la mortalidad de las larvas asociada a este patógeno (Al-Ghamdi *et al.*, 2017; Arredondo *et al.*, 2018). Por ejemplo, Daisley *et al.* (2019) evaluaron un probiótico constituido por tres especies de *Lactobacillus* que había logrado inhibir *in vitro* a *P. larvae*. En experimentos utilizando larvas criadas en el laboratorio demostraron que este probiótico redujo la carga del

patógeno y mejoró la supervivencia de las larvas. En base a estos resultados, se puede hipotetizar que la combinación de distintos sobrenadantes de bacterias podría ejercer un efecto positivo en la supervivencia de las larvas expuestas a la infección.

Al someter a las larvas a un concentrado de esporas de *A. apis* no se encontró una mayor supervivencia de las larvas cuando se las alimentó con el sobrenadante de la levadura. Existen estudios en los que los autores sí encontraron microorganismos que ejercieron un efecto beneficioso en la salud de las abejas. Por ejemplo, Audisio (2016) estudió la bacteria *Lactobacillus johnsonii* en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Esta especie estimuló la puesta de huevos de la reina y la producción de miel en las colmenas. De manera similar, Cabana *et al.* (2021) aislaron de pan de polen cepas de *Lactobacillus* spp. con potencial probiótico y las evaluaron a través de pruebas *in vitro* de crecimiento a distintas temperaturas, hemólisis, sensibilidad a antibióticos y antagonismo frente a *A. apis*. De las 17 cepas, seis lograron inhibir al hongo y fueron seleccionadas para una futura aplicación en colmenas.

Considerando la distribución a nivel global de las enfermedades loque americana y cría yesificada y, ante la falta de agentes eficaces para contrarrestarlas, resulta necesario desarrollar nuevos métodos de control. El uso de microorganismos beneficiosos como complemento o alternativa natural a los antibióticos, si resultara exitoso, puede ser relevante en términos de prevención para favorecer la salud de las abejas melíferas. El siguiente paso consistirá en evaluar la capacidad probiótica de los microorganismos seleccionados y, finalmente, incorporarlos en la alimentación de las abejas en las colmenas.

## Conclusiones

- En base a la caracterización fenotípica, 30 microorganismos aislados del kéfir de agua fueron identificados como posibles bacterias lácticas y 30 se reconocieron como levaduras.
- De los 60 microorganismos aislados de kéfir de agua, veinte (10 bacterias y 10 levaduras), mostraron una fuerte actividad inhibitoria frente al patógeno *P. larvae* cuando se trabajó con el ensayo de difusión por pozo en agar.
- De los 60 microorganismos estudiados, cinco bacterias y 10 levaduras, presentaron actividad antimicrobiana sobre el patógeno *A. apis* mediante el ensayo de difusión por pozo en agar.

- Los sobrenadantes de las tres bacterias y de las tres levaduras no inhibieron el crecimiento de las cepas de *P. larvae* cuando fueron evaluados mediante el método de dilución en microplaca. Sin embargo, lograron disminuir el crecimiento *in vitro* del patógeno con respecto al control.
- De acuerdo a los ensayos realizados en larvas de abejas criadas en el laboratorio, el kéfir de agua y los sobrenadantes de bacteria y levadura no mostraron efectos de toxicidad sobre las larvas ya que no aumentaron su mortalidad.
- Los sobrenadantes de bacteria y levadura incorporados a la dieta de las larvas criadas *in vitro* e infectadas con esporas de *P. larvae* y *A. apis* no tuvieron actividad antimicrobiana frente a los patógenos.
- Los 10 aislamientos de bacterias y los 10 de levaduras que presentaron una fuerte actividad inhibitoria *in vitro* frente a *P. larvae* y *A. apis* fueron seleccionados para continuar su evaluación como potenciales probióticos.

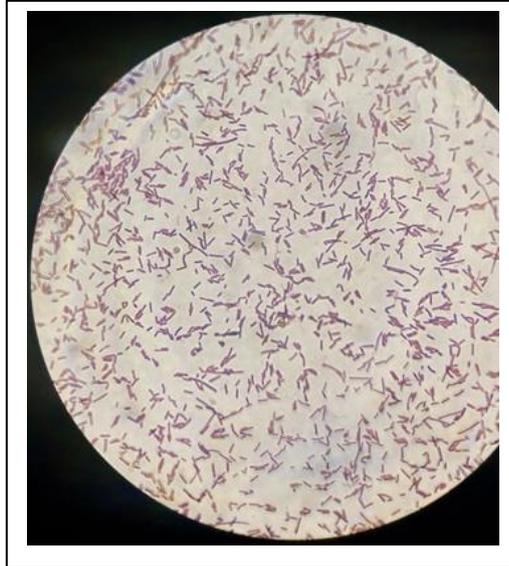
## **Capítulo 4: Identificación y evaluación de las propiedades probióticas de bacterias con actividad antimicrobiana**

### **4.1. Introducción**

La definición de probióticos propuesta en el año 2001 por un comité de expertos con la aprobación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) se puede traducir en cuatro criterios simples y pragmáticos que permiten concluir si una cepa específica de un microorganismo califica como probiótico para su uso en alimentos y suplementos dietéticos. Estos son: (a) está suficientemente caracterizada; (b) es segura; (c) confiere un beneficio para la salud que ha sido evaluado en al menos un ensayo clínico, (d) se encuentra viva en cantidades adecuadas en el producto a una dosis eficaz durante toda su vida útil (Binda *et al.*, 2020).

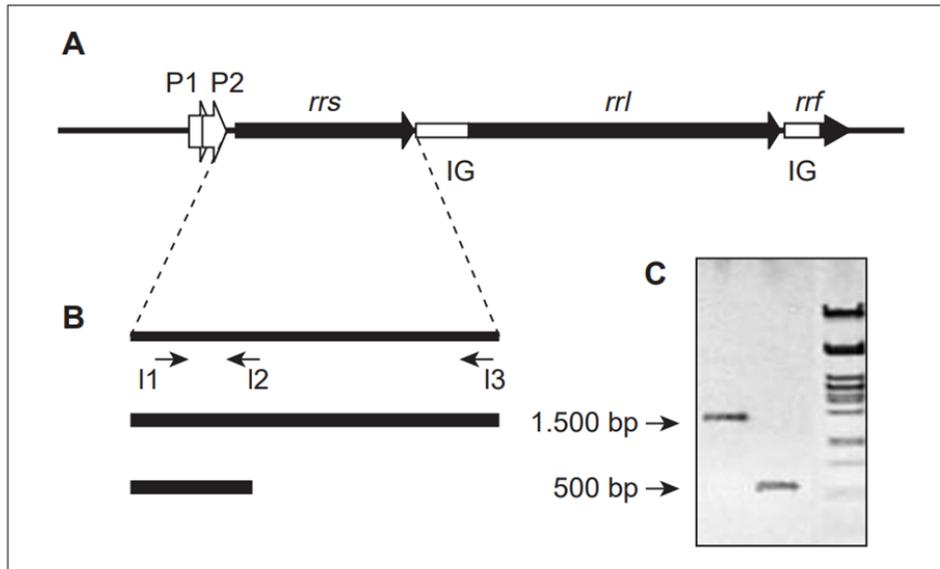
Las bacterias más utilizadas como probióticos son las bacterias del ácido láctico (Figura 4.1) y las bifidobacterias. Las bacterias lácticas (BAL) constituyen un grupo heterogéneo que se caracteriza por la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares. Las BAL comparten similitudes morfológicas y metabólicas, estando muchas de ellas relacionadas filogenéticamente. La principal familia de BAL es *Lactobacillaceae*, la cual ha sido recientemente reclasificada (Zheng *et al.*, 2020) y comprende a todos los géneros previamente incluidos en las familias *Lactobacillaceae* y *Leuconostocaceae*, es decir, *Convivina*, *Fructobacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus* y *Weissella*. Son bacterias Gram-positivas, no formadoras de esporas, anaerobias facultativas o estrictas. Las células son cocos o bacilos, que pueden formar cadenas o estar dispuestas de a pares o tétradas (*Pediococcus*). El principal producto de la fermentación es el ácido láctico. Otros productos incluyen el ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico o ácido succínico. Las BAL tienen requerimientos nutricionales, entre ellos, aminoácidos, péptidos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables. Es por ello que suelen estar asociadas a ambientes ricos en nutrientes como la leche y sus derivados, algunas plantas, material en descomposición y superficies mucosas de los animales como, por ejemplo, el tracto gastrointestinal (Bolla, 2011). *Lactobacillaceae* es la única familia del orden *Lactobacillales* que incluye microorganismos homofermentadores y heterofermentadores (Zheng *et al.*, 2020), pudiendo fermentar hexosas como glucosa o fructosa. La producción de ácidos, principalmente láctico, por parte de las BAL contribuye con las propiedades sensoriales de los alimentos, es decir, la textura, sabor

y desarrollo de aroma. Además, son responsables de inhibir ciertos microorganismos patógenos, permitiendo preservar los alimentos. Por estas razones, son muy utilizadas en la industria alimentaria (Ortiz Balderas, 2006).



**Figura 4.1.** Fotografía en microscopio óptico de células de una bacteria láctica luego de la tinción Gram. Las células son bacilos y se observan de color violeta (Gram +).

La identificación de las bacterias es fundamental y, para hacerlo de manera precisa, se recurre a los métodos moleculares. En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada (Figura 4.2). Al comparar las secuencias de los ARNr 16S se pueden establecer las relaciones filogenéticas entre los organismos procariotas. El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 nucleótidos, codificado por el gen *rrs* o ADN ribosómico ARNr 16S incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (Olmos *et al.*, 2010).



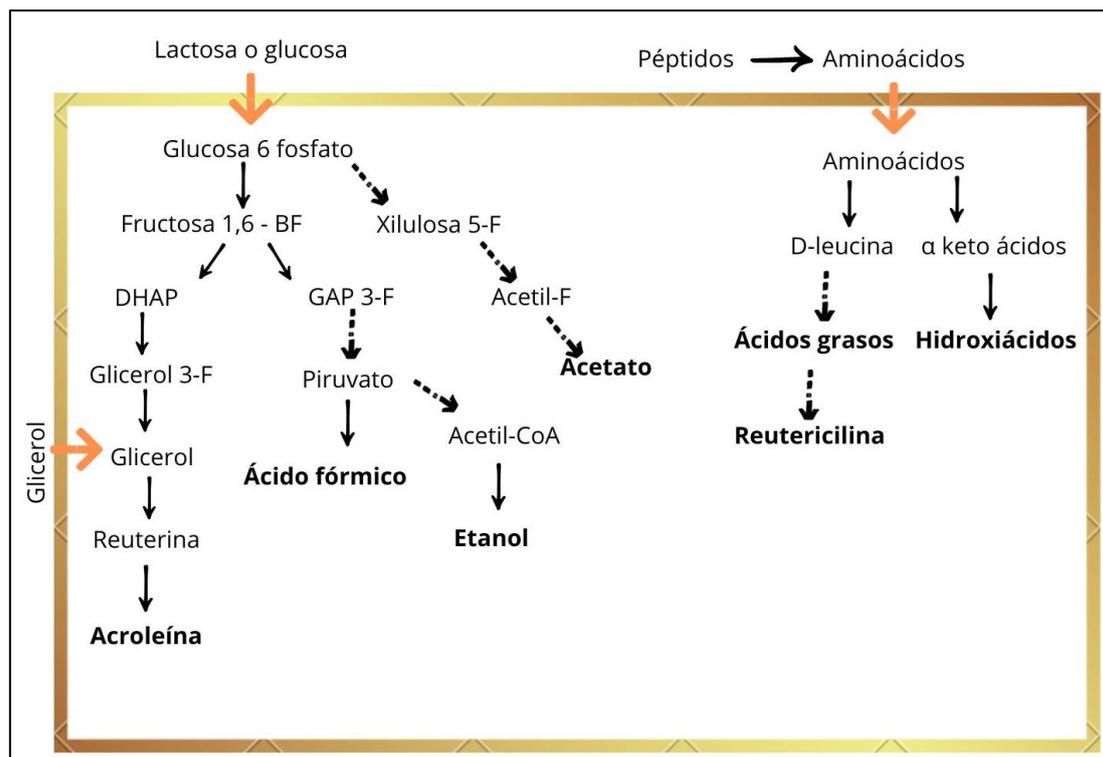
**Figura 4.2. A:** El operón ribosómico con los tres tipos de ARNr (*rrs*, *rrl* y *rrf*), los promotores P1 y P2 y las regiones intergénicas (IG). **B:** Amplificación del gen *rrs* (ARNr 16S). Los iniciadores I1, I2 e I3 se usan para amplificar un fragmento de 1.500 pb (I1-I3) o de 500 pb (I1-I2). **C:** Gel de electroforesis donde se visualizan los dos fragmentos amplificados (Tomado de Rodicio y Mendoza, 2009).

Como se describió previamente, para asegurar que una cepa pueda ser considerada como probiótico es necesario que cumpla con ciertos requisitos. Para ello, cada potencial probiótico es sometido a una serie de pruebas *in vitro*, incluyendo la determinación de resistencia a antibióticos, evaluación de determinadas actividades metabólicas, producción de toxinas, actividad hemolítica, efectos secundarios durante el estudio en humanos, entre otras (WHO/FAO, 2002). En esta tesis, el objetivo es incluir los probióticos en un alimento destinado a las abejas, con lo cual, las pruebas realizadas se seleccionaron de acuerdo al metabolismo de estos insectos y su ambiente. Las mismas incluyen: tolerancia a acidez y altas concentraciones de NaCl, crecimiento a diferentes temperaturas, tolerancia osmótica, cinética de crecimiento, fermentación de carbohidratos y supervivencia posterior a la liofilización. Uno de los requisitos más importantes para el uso de probióticos es que puedan sobrevivir al almacenamiento del alimento, así como al proceso de producción. La liofilización es un método de preservación de microorganismos muy utilizado. Consiste en un proceso de desecación en el que se elimina el agua contenida en la muestra por congelación y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío (Barbour y Priest, 1986). No todos los microorganismos pueden soportar estas condiciones, lo cual es dependiente de cada cepa. Es una técnica de conservación a largo plazo; el período máximo de

almacenamiento oscila entre los seis meses a dos años, aproximadamente (Bolla, 2011).

Las bacterias probióticas producen una gran variedad de sustancias antimicrobianas (Figura 4.3), tales como el ácido láctico y otros ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, péptidos de bajo peso molecular, ácidos grasos, aminoácidos, bacteriocinas, entre otras (Makrasa *et al.*, 2006; Arauz *et al.*, 2009; Razdan *et al.*, 2012). Las bacteriocinas son péptidos o proteínas con actividad inhibitoria frente a bacterias Gram-positivas únicamente (De Vuyst *et al.*, 1994). Por su parte, los compuestos de bajo peso molecular, como el ácido láctico, tienen efectos inhibitorios frente a bacterias Gram-negativas patógenas (Alakomi *et al.*, 2000). En general, las cantidades de cada compuesto producido por las BAL suelen ser insuficientes para ejercer su actividad inhibitoria, por lo que probablemente actúen de manera sinérgica. Es por ello que su identificación se dificulta cuando están presentes en matrices complejas (Siedler *et al.*, 2019). De esta manera, se recurre a distintas metodologías para su estudio.

Una técnica analítica rápida y confiable para detectar y cuantificar metabolitos es la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  ( $^1\text{H}$ -RMN) (Fuochi *et al.*, 2019). Es muy útil en el análisis de diferentes matrices como fluidos biológicos, cultivos celulares y microbianos (Ammons *et al.*, 2014; Parolin *et al.*, 2018). La  $^1\text{H}$ -RMN tiene el potencial para detectar e identificar un amplio rango de compuestos biológicos de bajo peso molecular a bajas concentraciones en sobrenadantes líquidos sin tratar (Abel *et al.*, 1999). Además, es una herramienta que permite obtener información sobre la estructura, dinámica y las interacciones de los metabolitos biológicos producidos por los microorganismos, como las bacterias lácticas (Moradi *et al.*, 2021).



**Figura 4.3.** Descripción general de las vías biosintéticas de algunos compuestos biológicos en bacterias del ácido láctico.

En esta tesis, las bacterias del kéfir de agua seleccionadas por su actividad inhibitoria frente a patógenos de interés apícola (Capítulo 3), fueron caracterizadas y evaluadas a través de distintas pruebas *in vitro* con el fin de determinar su potencial como probiótico para ser incorporadas en el suplemento nutricional destinado a alimentar abejas.

### Objetivos específicos

1. Identificar las bacterias obtenidas del kéfir de agua mediante la caracterización genotípica.
2. Evaluar el potencial probiótico de las bacterias aisladas del kéfir a través de distintas pruebas *in vitro*.
3. Caracterizar e identificar los metabolitos presentes en los sobrenadantes bacterianos por Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ .

## **4.2. Materiales y métodos**

### **4.2.1. Identificación genotípica de las bacterias seleccionadas**

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* de actividad antimicrobiana frente a los patógenos *Paenibacillus larvae* y *Ascosphaera apis* (Capítulo 3), se seleccionaron los 10 aislamientos de bacterias con mayor capacidad inhibitoria, los cuales fueron identificados genotípicamente como se describe a continuación.

#### **4.2.1.1. Extracción de ADN de bacterias**

Para la extracción de ADN bacteriano, se siguió el siguiente protocolo adaptado de Zhou *et al.* (1996) y de Aislabie *et al.* (2008). Inicialmente, se prepararon cultivos líquidos de cada uno de los aislamientos en caldo MRS y se colocó una alícuota en un tubo Eppendorf de 1,5 ml con 500 µl de agua tridestilada estéril. Se centrifugó durante cinco min a 13.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se sometió el precipitado al freezer a -70 °C, durante cinco min y luego se colocó en agua a 100 °C por otros cinco min. Esta operación se repitió tres veces. Luego, se ultracentrifugó el tubo antes de resuspender el precipitado en 567 µl de una solución tamponada de extracción TE (10 mM de Tris HCl con pH 8 y 1 mM de EDTA), con el agregado de 3 µl de proteinasa K (20 mg ml<sup>-1</sup>) y se incubó durante 1 h a 37 °C. A continuación, se incorporaron 30 µl de SDS al 30 % v/v y se sometió a baño termostático a 65 °C durante 2 h. Finalmente, se ultracentrifugó, se recogió el sobrenadante y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

#### **4.2.1.2. Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para analizar el ADN bacteriano se amplificó mediante PCR una región de 1.300 pares de bases del gen del ARNr 16S utilizando los cebadores universales P0 (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y P6 (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA) (Picard *et al.*, 2000) y los cebadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') (Chen *et al.*, 2015). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl conteniendo 1 U ADN Taq polimerasa (PB-L, Argentina), cebadores 1 µM, buffer 1X, ADN Taq polimerasa (PB-L, Argentina), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs y el correspondiente templado de ADN. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador de ADN (Bio-Rad, USA).

La amplificación de ADN se llevó a cabo mediante una desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C seguida de un programa de 30 ciclos que consistió de una desnaturalización a 95 °C por 30 s, hibridación de los cebadores a 55 °C por 30 s y síntesis de ADN a 72 °C por 2 min y un paso de elongación final a 72 °C por 10 min. Los

productos de PCR amplificados fueron secuenciados bidireccionalmente usando el servicio de Macrogen, Korea (<http://macrogen.com/>). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos de nucleótidos del GenBank utilizando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

#### **4.2.2. Evaluación de la capacidad probiótica**

Se evaluó el potencial probiótico de los 10 aislamientos de bacterias seleccionados mediante las pruebas *in vitro* que se describen a continuación.

##### **4.2.2.1. Caracterización fisiológica de las bacterias seleccionadas**

Los 10 aislamientos de bacterias fueron caracterizados fisiológicamente al evaluar su capacidad de crecimiento a diferentes pHs (3, 5 y 6), concentraciones de NaCl (3, 6,5 y 10 %) y temperaturas (10, 25 y 40 °C). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado con cultivos de 24 h de crecimiento (D.O equivalente al estándar de turbidez de McFarland de 0,5). Estos fueron inoculados en 5 ml de caldo MRS e incubados a 37 °C por 24 h para pH y NaCl, y por 48 h para la prueba de temperatura, en condiciones de anaerobiosis. Luego, se realizó el recuento de UFC con la técnica de *drop plate* (Herigstad *et al.*, 2001) y se midió la absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 265 PDA-UV-VIS). Cada aislamiento se cultivó en MRS con pH 7, sin NaCl, y a 35 °C, como control para cada una de las pruebas.

##### **4.2.2.2. Ensayo de tolerancia osmótica**

Se evaluó la capacidad de los microorganismos de sobrevivir en condiciones de alta concentración de azúcares: 30, 50 y 70 % p/v. Se obtuvieron cultivos a una concentración equivalente al tubo 0,5 de la escala Mc Farland y se inocularon por triplicado tubos con 5 ml de caldo MRS enriquecido con las distintas concentraciones de jarabe y en tubos sin jarabe (control). Se incubaron a 37 °C en anaerobiosis por 72 h. Luego, se determinó el número de UFC de cada cultivo con la técnica de *drop plate* y se midió la absorbancia de las muestras a 600 nm.

##### **4.2.2.3. Cinética de crecimiento**

Se determinó por el método de turbidimetría, utilizando un espectrofotómetro

TECAN M1000 (UV/VIS, fluorescencia y luminiscencia) y microplacas de 96 pocillos. Con ese fin, para obtener cultivos puros activos se inocularon 0,5 ml de un cultivo de 24 h en 5 ml de caldo MRS y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se diluyeron (1:20) en agua destilada estéril (275 µL ADE y 15 µL cultivo por pocillo). Se midió la D.O inicial a 600 nm y se ajustó a 0,1. Se realizó la curva de crecimiento de cada aislamiento midiendo a 600 nm cada 15 min durante 24 h. Posteriormente, se calculó el tiempo de duplicación y la tasa de crecimiento de cada microorganismo con las siguientes ecuaciones:

•Medida del número de generaciones que ocurren por unidad de tiempo en un cultivo exponencial ( $h^{-1}$ ):

$$\text{Tasa de crecimiento } (\mu): \mu = (\text{LN}(\text{Abs}_{t1}) - \text{LN}(\text{Abs}_{t0})) / 0,25$$

•Tiempo que tarda una población en duplicar el número de células (h):

$$\text{Tiempo de duplicación } (g): g = \text{LN}(2) / \mu$$

#### 4.2.2.4. Evaluación de la supervivencia a la liofilización

Se realizó un conteo de las células viables previo a la liofilización y luego de 48 h de preservación para determinar la supervivencia tras el proceso. Para ello, se obtuvieron colonias puras en medio MRS y se inocularon en un criovial con 1 ml de solución lioprotectora de leche descremada en polvo al 10 % p/v. Se homogeneizó utilizando vórtex. Luego se llevaron los crioviales al liofilizador (Heto FD1.0). Tras 48 h de realizada la liofilización, se adicionaron 2 ml de leche descremada en polvo al 10 % p/v a cada criovial. Se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente ( $23 \pm 2$  °C) para lograr una correcta hidratación. Se realizaron diluciones decimales y se sembró por *drop plate* en placas con medio de cultivo. Luego de la incubación, se realizó el recuento de UFC (recuento post- liofilización).

#### 4.2.3. Estudio del perfil de fermentación de carbohidratos

Se llevó a cabo utilizando las Galerías API 50 CH y API 50 CHL (BioMerieux, S.A., France). Para ello, se obtuvieron colonias puras de cada bacteria en placas de Petri con medio MRS. Se realizó el ensayo siguiendo la metodología propuesta por Rondón *et al.* (2008). Se preparó una suspensión del microorganismo a evaluar a una concentración equivalente al tubo 0,5 de la escala Mc Farland y se inoculó cada tubo de la tira que contenía un carbohidrato específico. Luego de 24 y 48 h, se leyeron e interpretaron los resultados.

#### **4.2.4. Caracterización de los metabolitos presentes en los sobrenadantes microbianos por Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear**

Para determinar la naturaleza de los compuestos presentes en los SLC, se obtuvieron cultivos líquidos puros de 24 h de cada aislamiento. Se centrifugaron a 15.000 rpm por 10 min a 4 °C y se filtraron utilizando un filtro de 0,22 µm (Sartorius). Los sobrenadantes se transfirieron (540 µl) a un criovial estéril y se diluyeron con una solución estándar de 5 mM DSS-d6 (Chenomx Inc., Edmonton Canada, IS-2 Chenomx Internal Standard—DSS-d6) y azida de sodio (0,1 % p/v) en óxido de deuterio (D2O) (99 % v/v). Las muestras se homogeneizaron y se mantuvieron a -20 °C hasta su posterior análisis (Ganobis *et al.*, 2020).

Las muestras se analizaron por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) durante una pasantía realizada en el año 2023 en el NMR Centre, perteneciente a The Advanced Analysis Centre (AAC) en la Universidad de Guelph, (Ontario, Canadá). Para ello, se transfirieron a tubos RMN de 5 mm (535-PP-7, Wilmad, Wineland, USA) y se escanearon en un espectrofotómetro Bruker Avance 600 MHz NMR (NMR Centre, AAC, University of Guelph, Guelph, ON, Canadá) de acuerdo a Ganobis *et al.* (2020). Brevemente, los espectros se obtuvieron a través del primer incremento de una secuencia de pulso 1D 1H NOESY (tmix = 100 ms, tiempo de adquisición = 4 s, tiempo de relajación = 1 s, ancho del espectro = 12 ppm). El pH de las muestras se estimó usando tiras colorimétricas (GE Whatman, Mississauga, Canadá) después de la exploración de RMN. Se utilizó Chenomx NMR Suite 9.0 (Chenomx Inc., Canadá) para analizar los espectros e identificar los metabolitos de interés. Las correcciones de fase y línea de base se realizaron manualmente, mientras que los demás ajustes de los espectros se realizaron a través de pasos predeterminados de procesamiento automático. Los metabolitos se identificaron por comparación con perfiles espectrales conocidos en la librería Chenomx 600 MHz Reference Library. La cuantificación de los metabolitos se estimó a partir del área de la señal proyectada utilizando una concentración conocida de DSS como patrón interno.

#### **4.2.5. Análisis estadístico**

Se utilizó el software SPSS versión 26. La variable UFC fue transformada con logaritmo. Se analizó la capacidad de crecimiento de las bacterias individualmente para cada una de las condiciones estudiadas. Para ello se comparó cada bacteria con respecto a su control a las 24/72 h, según la prueba. Se controló el supuesto de homocedasticidad mediante el test de varianzas de Brown–Forsythe y el test de Levene

y luego se realizó un ANOVA simple o, de lo contrario, ANOVA de Brown-Forsythe, seguido de pruebas t2 de Tamhane (Tamhane, 1979).

Para la caracterización de metabolitos en los SLC por RMN, se realizó el análisis de componentes principales con el software SPSS.

### **4.3. Resultados**

#### **4.3.1. Identificación genotípica de las bacterias seleccionadas**

En la Tabla 4.1 se presentan los resultados del análisis molecular del gen ARNr 16S para la identificación de las 10 cepas de bacterias aisladas del kéfir de agua que presentaron mayor inhibición frente a los patógenos *P. larvae* y *A. apis*.

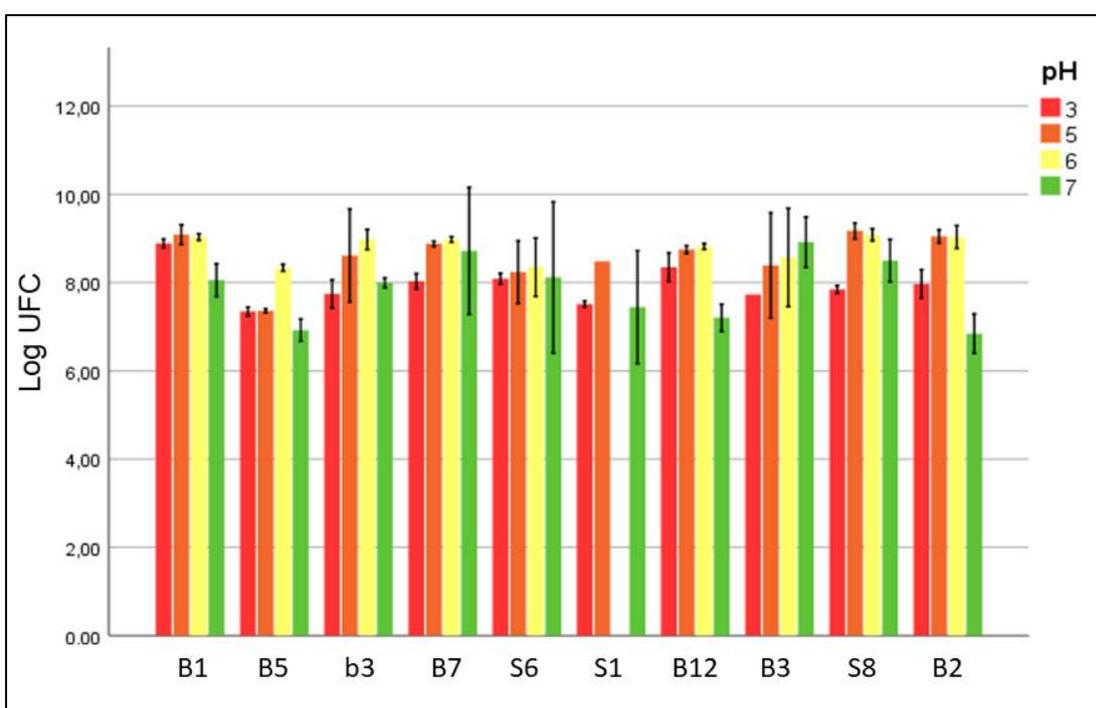
**Tabla 4.1.** Identificación genotípica de las 10 cepas bacterianas aisladas del kéfir de agua y seleccionadas por su actividad antimicrobiana sobre *Paenibacillus larvae* y *Ascosphaera apis*.

<b>CEPA</b>	<b>IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DE MAYOR COINCIDENCIA / NÚMERO DE ACCESO AL GENBANK</b>	<b>SIMILITUD (%)</b>
<b>B1</b>	<i>Lentilactobacillus hilgardii</i> LMG 07934/ CP050262.1	71,50
<b>B2</b>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> HX-3/ MG590101.1	94,16
<b>B3</b>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> HBUAS58133/ ON209926.1	70,56
<b>B5</b>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> 2.90.10/ MK611444.1	92,45
<b>B7</b>	<i>Lacticaseibacillus casei</i> NM30-1/ HM218157.1	89,51
<b>B12</b>	<i>Lentilactobacillus hilgardii</i> NWAUFU1474/ MG551139.1	96,13
<b>b3</b>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> KCKM 1014/ OR435842.1	87,85
<b>S1</b>	<i>Liquorilactobacillus satsumensis</i> SM38/ KU060283.1	86,72
<b>S6</b>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> 2738/ MT611749.1	99,68
<b>S8</b>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> HBUAS66981/ ON795864.1	97,85

## 4.3.2. Evaluación de la capacidad probiótica

### 4.3.2.1. Tolerancia a pH ácido

El crecimiento de cada cepa individual se analizó estadísticamente a cada pH (3, 5, 6, control 7) luego de 24 h (Figura 4.4). Se detectaron diferencias significativas en el número de UFC según el pH del medio (Brown-Forsythe; Tabla 4.2), con excepción de S6. Los pH 5 y 6 favorecieron el crecimiento de las cepas, mientras que las incubaciones de las cepas a pH 3 y 7 disminuyeron el número de UFC luego de 24 h. No se obtuvieron resultados concluyentes para el caso de las cepas S1 y B3 por pérdida de repeticiones y, por lo tanto, no se incluyeron en la Tabla 4.2.



**Figura 4.4.** Tolerancia de las 10 cepas bacterianas a diferentes pH (3, 5, 6). Los resultados están expresados como la media del log de UFC a las 24 h para cada valor de pH (control pH 7).

**Tabla 4.2.** Comparación del efecto del pH sobre las cepas de bacterias estudiadas a las 24 h.

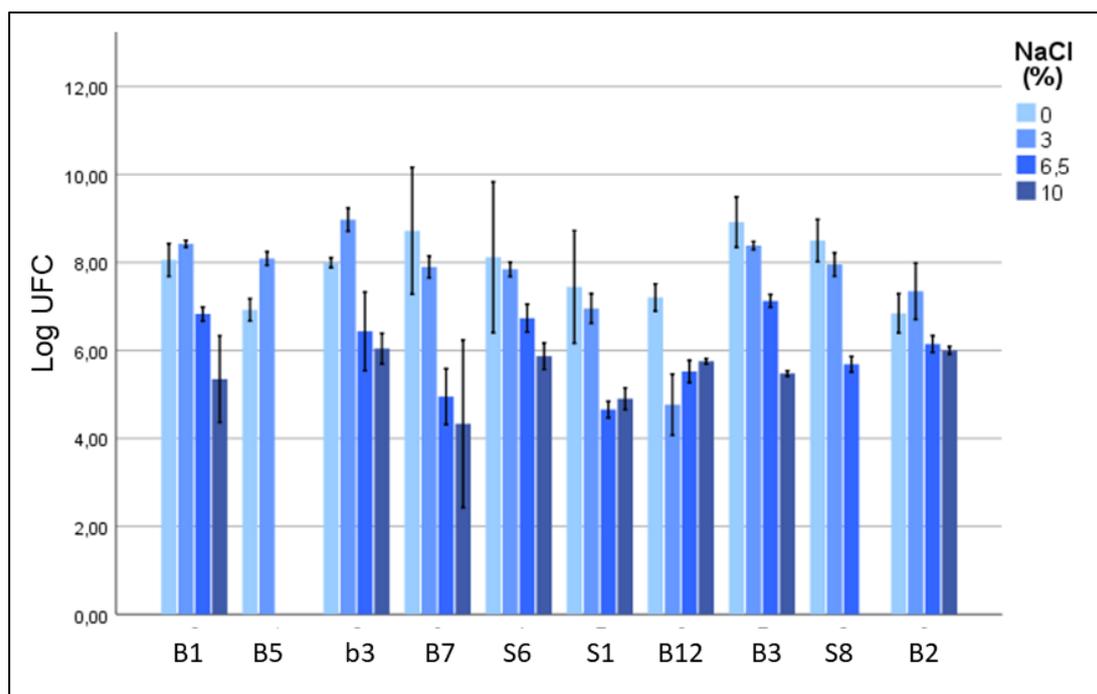
BACTERIA	pH				BROWN-FORSYTHE (SIG)
	3	5	6	7 (Control)	
<b>B1</b>	b*	b	b	a	<0,01
<b>B5</b>	a	a	b	a	<0,01
<b>b3</b>	a	ab	b	a	<0,01
<b>B7</b>	a	b	c	abc	0,02
<b>S6</b>	-	-	-	-	0,85
<b>B12</b>	b	b	b	a	<0,01
<b>S8</b>	a	b	b	ab	<0,01
<b>B2</b>	b	c	c	a	<0,01

\* Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

- ANOVA de Brown-Forsythe no encontró diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.3.2.2. Resistencia a altas concentraciones de NaCl

Se evaluó el comportamiento de las bacterias en cada concentración de NaCl (control 0 %, 3 %, 6,5 %, 10 % p/v) luego de 24 h. En general, se observó una misma tendencia en todas las cepas en estudio (con distinta intensidad): disminuyó su crecimiento a medida que aumentó la salinidad (Figura 4.5). Se encontraron diferencias significativas entre las cepas para todos los tratamientos (ANOVA,  $p < 0,05$ ). B5 no sobrevivió a las concentraciones 6,5 % y 10 % mientras que S8 no toleró un 10 % de NaCl (Tabla 4.3).



**Figura 4.5.** Resistencia de las 10 cepas bacterianas a diferentes concentraciones salinas (3 %, 6,5 %, 10 %). Los resultados están expresados como la media del log de UFC a las 24 h para cada concentración de NaCl (control 0 %).

**Tabla 4.3.** Comparación del efecto de la concentración de NaCl sobre las cepas de bacterias estudiadas a las 24 h.

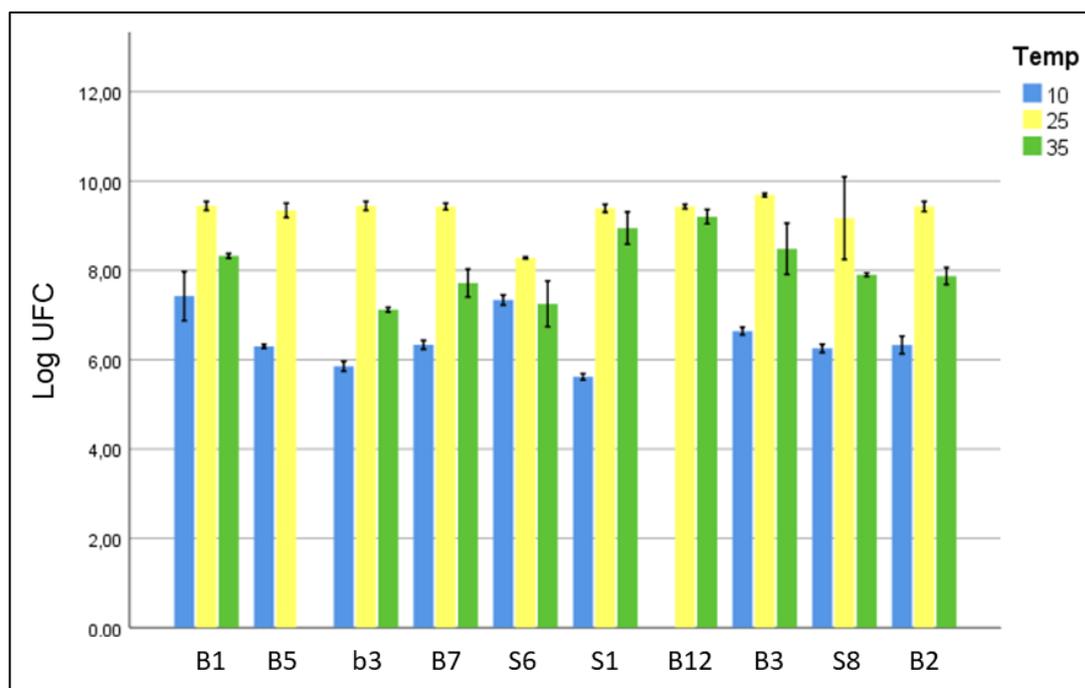
BACTERIA	[NaCl]				BROWN-FORSYTHE (SIG.)
	0%	3%	6,50%	10%	
<b>B1</b>	b*	b	a	a	<0,01
<b>B5</b>	a	b	—	—	<0,01
<b>b3</b>	b	c	ab	a	<0,01
<b>B7</b>	c	bc	a	ab	<0,01
<b>S6</b>	abc	c	b	a	<0,05
<b>S1</b>	ab	b	a	a	<0,01
<b>B12</b>	b	a	a	a	<0,01
<b>B3</b>	c	c	b	a	<0,01
<b>S8</b>	b	b	a	—	<0,01
<b>B2</b>	a	a	a	a	<0,01

\* Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ( $p>0,05$ )

— No sobrevivió

#### 4.3.2.3. Crecimiento a diferentes temperaturas

Se comparó el crecimiento de las bacterias luego de 72 h a las temperaturas 10 °C, 25 °C, 40 °C y control a 35 °C (Figura 4.6). Todas las cepas presentaron un comportamiento general similar respecto a las distintas temperaturas evaluadas: mayor crecimiento a 25 °C respecto de 10 °C. Sin embargo, a 35 °C hubo un descenso en el crecimiento (Tabla 4.4). No se obtuvieron resultados concluyentes para el caso de las cepas B5 y B12 por pérdida de repeticiones. A 40 °C, sólo sobrevivieron tres bacterias, alcanzando un log de UFC/ml de 9,37; 8,96 y 9,41 para S1, B12 y B3, respectivamente.



**Figura 4.6.** Crecimiento de las 10 cepas bacterianas a diferentes temperaturas (10 °C, 25 °C, 40 °C). Los resultados están expresados como la media del log de UFC a las 72 h para cada temperatura (control 35 °C).

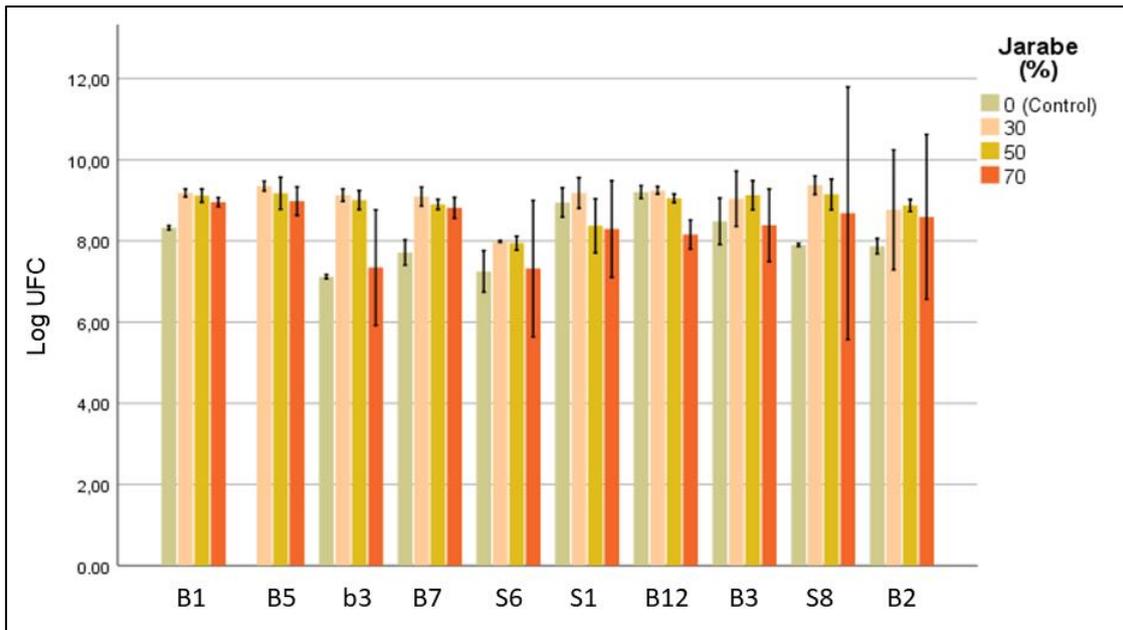
**Tabla 4.4.** Comparación del efecto de la temperatura sobre las cepas de bacterias estudiadas a las 72 h.

BACTERIA	TEMPERATURA			BROWN-FORSYTHE (SIG)
	10°C	25°C	35°C (Control)	
<b>B1</b>	a*	b	a	<0,01
<b>b3</b>	a	c	b	<0,01
<b>B7</b>	a	c	b	<0,01
<b>S6</b>	a	b	a	<0,05
<b>S1</b>	a	b	b	<0,01
<b>B3</b>	a	c	b	<0,01
<b>S8</b>	a	b	b	<0,01
<b>B2</b>	a	c	b	<0,01

\*Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

#### 4.3.2.4. Tolerancia osmótica

Se evaluó el control (0 % p/v) y el efecto de tres concentraciones distintas de jarabe (30 %, 50 %, 70 % p/v) a las 72 h sobre las bacterias. En el caso de S6 ( $p=0,187$ ), S8 ( $p=0,061$ ) y B2 ( $p=0,221$ ) no se observaron diferencias significativas por el agregado de jarabe. En general, se registró un aumento en el crecimiento con concentraciones de 30 %. Este se mantuvo a 50 % y luego disminuyó al aumentar la concentración a 70 % (Figura 4.7). Si bien la prueba de Brown-Forsythe encontró diferencias entre los tratamientos en B5, S1 y B3, la prueba de a pares de Tamhane, por ser más conservadora, no encontró tales diferencias. Por lo tanto, se realizó la prueba DMS, la cual es otra prueba de a pares un poco menos conservadora para rastrear posibles diferencias (Tabla 4.5). No se obtuvieron resultados concluyentes para el caso del control de la cepa B5 por pérdida de repeticiones.



**Figura 4.7.** Tolerancia de las 10 cepas bacterianas a diferentes concentraciones de jarabe (30 %, 50 %, 70 %). Los resultados están expresados como la media del log de UFC a las 72 h para cada concentración (control 0 %).

**Tabla 4.5.** Comparación del efecto de la concentración de jarabe sobre las cepas de bacterias estudiadas a las 72 h.

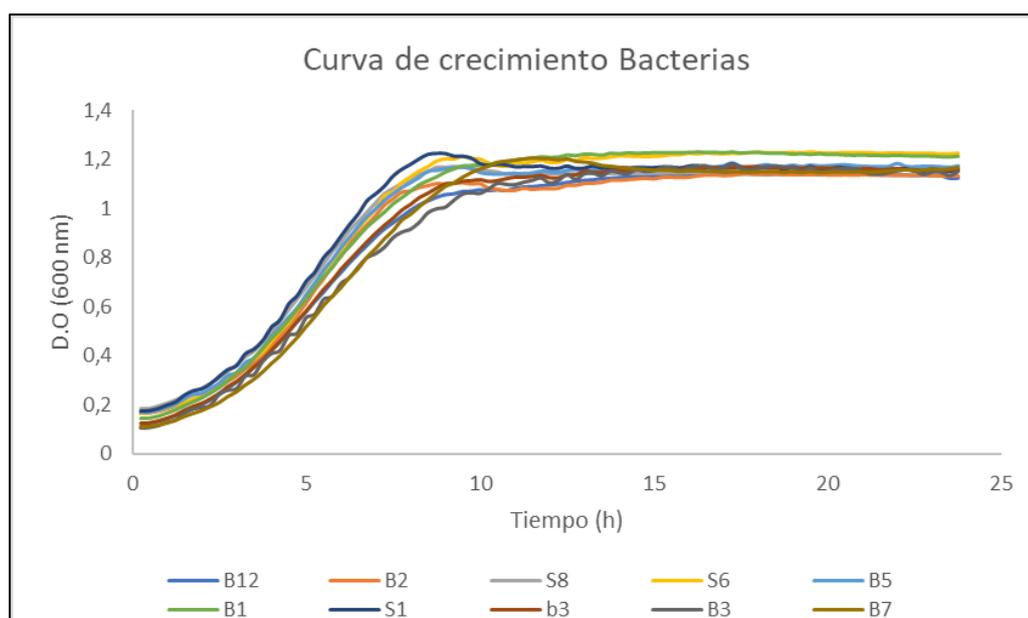
BACTERIA	JARABE (%)			
	0 (Control)	30	50	70
<b>B1</b>	a	c	bc	b
<b>B5</b>		b	ab	a
<b>b3</b>	a	b	b	ab
<b>B7</b>	a	b	b	b
<b>S6</b>	-	-	-	-
<b>S1</b>	b	b	a	a
<b>B12</b>	bc	c	b	a
<b>B3</b>	a	b	b	a
<b>S8</b>	-	-	-	-
<b>B2</b>	-	-	-	-

\* Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

- ANOVA de Brown-Forsythe no encontró diferencias estadísticamente significativas.

#### 4.3.2.5. Cinética de crecimiento

Se evaluó la cinética de crecimiento de las bacterias en condiciones normales (pH 7, temperatura 35 °C, sin agregado de NaCl ni de jarabe) durante 24 h. Todas las cepas presentaron la curva de crecimiento característica de un microorganismo: fase de latencia, fase exponencial, estacionaria y fase de muerte (Figura 4.8). A partir del análisis de la fase exponencial de crecimiento se calculó la tasa de crecimiento y el tiempo de duplicación para cada bacteria. El tiempo de duplicación varió entre un mínimo de 1,86 h a un máximo de 2,56 h y la tasa de crecimiento entre 0,28 h<sup>-1</sup> y 0,37 h<sup>-1</sup> (Tabla 4.6).



**Figura 4.8.** Curva de crecimiento de las 10 cepas de bacterias aisladas de kéfir. Se observa una fase inicial de latencia seguida de una fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

**Tabla 4.6.** Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación de las 10 cepas bacterianas aisladas del kéfir de agua.

	BACTERIA									
	B1	B5	b3	B7	S6	S1	B12	B3	S8	B2
<b>Tasa de crecimiento (h<sup>-1</sup>)</b>	0,33	0,29	0,33	0,35	0,32	0,31	0,37	0,28	0,32	0,32
<b>Tiempo de duplicación (h)</b>	2,10	2,18	2,06	1,95	2,14	2,18	1,87	2,56	2,18	2,10

#### 4.3.2.6. Supervivencia posterior a la liofilización

Luego de la liofilización, si bien hubo una marcada disminución en el crecimiento de las bacterias, todas ellas sobrevivieron al proceso, con una reducción en el logaritmo de UFC que varió ampliamente, desde 0,14 hasta 2,24 (Tabla 4.7). Los recuentos de UFC se realizaron por la técnica de *drop plate*.

**Tabla 4.7.** Supervivencia al proceso de liofilización de las 10 cepas bacterianas aisladas de kéfir de agua.

<b>BACTERIA</b>	<b>Log UFC/ml antes de liofilización</b>	<b>Log UFC/ml después de liofilización</b>	<b>Reducción del Log UFC/ml</b>
<b>B1</b>	7,40 ± 0,05 <sup>+</sup>	6,69 ± 0,06 <sup>*</sup>	0,70
<b>B5</b>	7,83 ± 0,06	7,70 ± 0,13	0,14
<b>b3</b>	8,28 ± 0,04	7,96 ± 0,07	0,32
<b>B7</b>	8,10 ± 0,08	7,78 ± 0,02	0,32
<b>S6</b>	7,66 ± 0,10	7,05 ± 0,12	0,62
<b>S1</b>	6,12 ± 0,09	4,48 ± 0,00	1,65
<b>B12</b>	8,73 ± 0,10	8,45 ± 0,05	0,27
<b>B3</b>	6,32 ± 0,04	4,08 ± 0,04	2,24
<b>S8</b>	7,88 ± 0,10	7,30 ± 0,03	0,58
<b>B2</b>	8,85 ± 0,07	8,29 ± 0,12	0,56

<sup>+</sup> Cada dato es el promedio de tres repeticiones ± desvío estándar.

<sup>\*</sup> Los valores de la columna 'Log UFC/ml después de liofilización' se obtuvieron luego de la rehidratación hasta su volumen original.

#### **4.3.3. Estudio del perfil de utilización de carbohidratos**

Se determinó el perfil bioquímico de las bacterias basado en las pruebas de utilización de carbohidratos (Tabla 4.8). Todas las cepas, excepto S6 (que no pudo utilizar dulcitol), utilizaron ribosa, galactosa, glucosa, fructosa, manosa, sorbosa, dulcitol, manitol, sorbitol, N-acetil-glucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, melecitosa, turanosa, tagatosa y gluconato. Las cepas B1, B3 y B12 no fermentaron L-arabinosa, L-ramnosa, lactosa ni melobiosa. Mientras que B12, S1 y S6 no fermentaron L-sorbosa; B1 y B12 no fermentaron D-manosidasa y B12 y S6 no fermentaron D-turanosa (Figura 4.9).

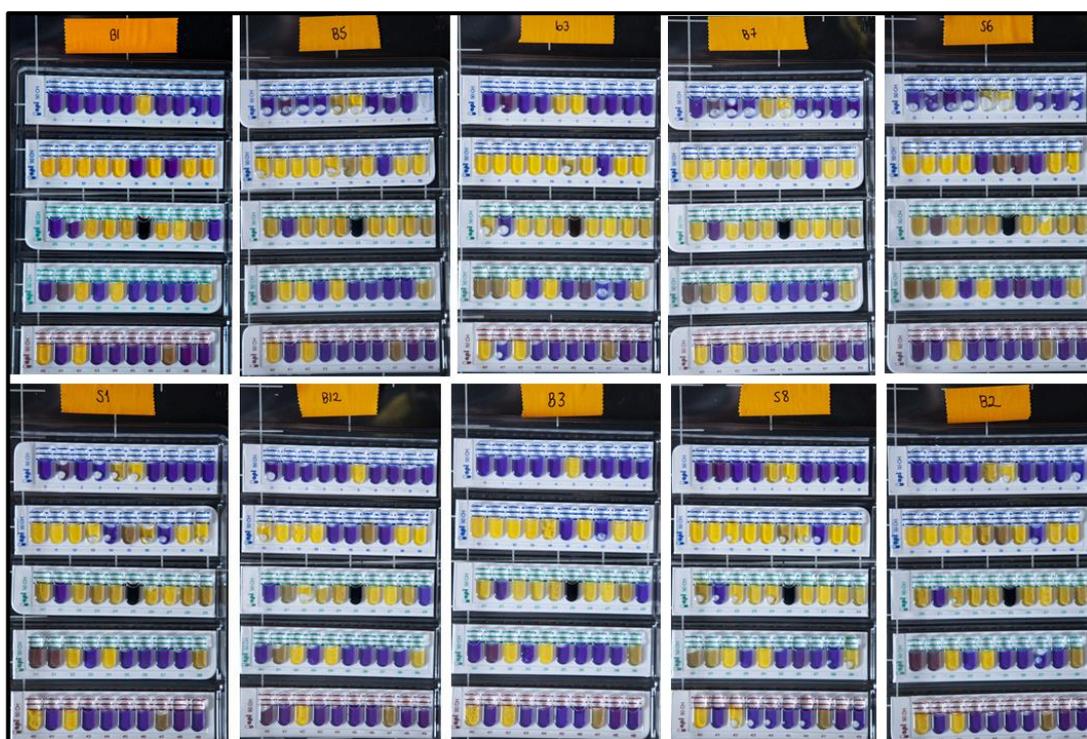
**Tabla 4.8.** Perfiles de fermentación de carbohidratos de las 10 bacterias seleccionadas utilizando las Galerías API 50 CH y API 50 CHL.

Carbohidrato	B1	B2	B3	B5	B7	B12	b3	S1	S6	S8
- CONTROL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 GLICEROL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 ERITROL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 D-ARABINOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4 L-ARABINOSA	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
5 RIBOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6 D-XILOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7 L-XILOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 D-ADONITOL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 METIL BETA-D-XILOPIRANOSIDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 GALACTOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11 GLUCOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12 FRUCTOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13 D-MANNOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14 L-SORBOSA	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
15 L-RAMNOSA	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
16 DULCITOL	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
17 INOSITOL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18 MANITOL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19 SORBITOL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20 METIL ALFA-D-MANOPIRANOSIDA	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+

<b>21 METIL ALFA-D-GLUCOPIRANOSIDA</b>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<b>22 N-ACETILGLUCOSAMINA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>23 AMIGDALINA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>24 ARBUTINA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>25 ESCULINA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>26 SALICINA</b>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>27 CELIBIOSA</b>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<b>28 MALTOSA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>29 LACTOSA</b>	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
<b>30 MELIBIOSA</b>	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
<b>31 SACAROSA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>32 TREALOSA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>33 INULINA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>34 MELECITOSA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>35 RAFINOSA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>36 ALMIDON</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>37 GLICÓGENO</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>38 XILITOL</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>39 GENTIOBIOSA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>40 TURANOSA</b>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
<b>41 LIXOSA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>42 TAGATOSA</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>43 D-FUCOSA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>44 L-FUCOSA</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>45 D-ARABITOL</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>46 L-ARABITOL</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<b>47 GLUCONATO DE POTASIO</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>48 KETOGLUCONATO 2 DE POTASIO</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>49 KETOGLUCONATO 5 DE POTASIO</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Reacción positiva (+); Reacción negativa (-)



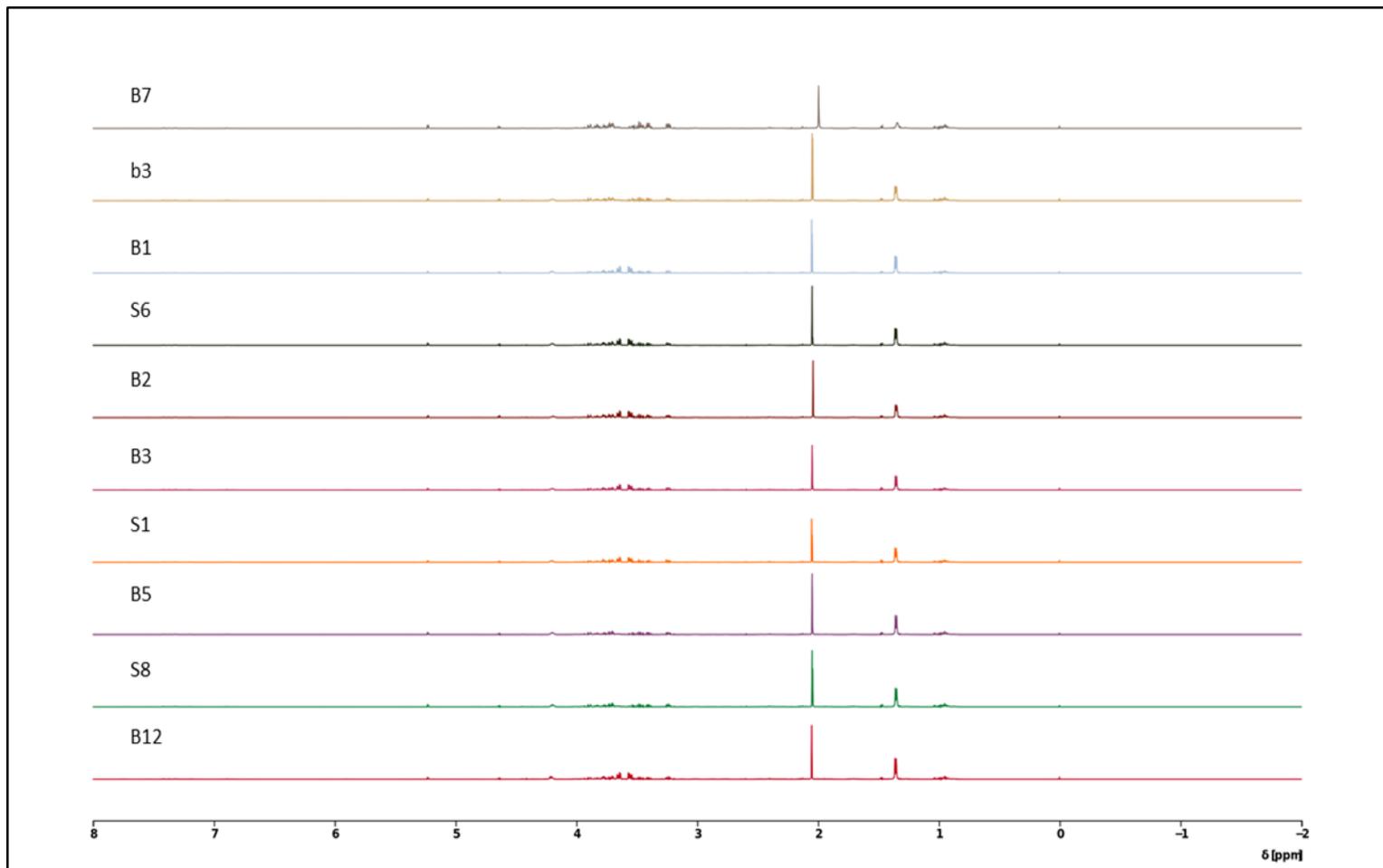
**Figura 4.9.** Estudio del perfil de fermentación de carbohidratos con Galerías API 50 CH y API 50 CHL (BioMerieux, S.A., France) en las 10 cepas bacterianas aisladas de kéfir de agua.

#### 4.3.4. Caracterización de los metabolitos presentes en los sobrenadantes microbianos por Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

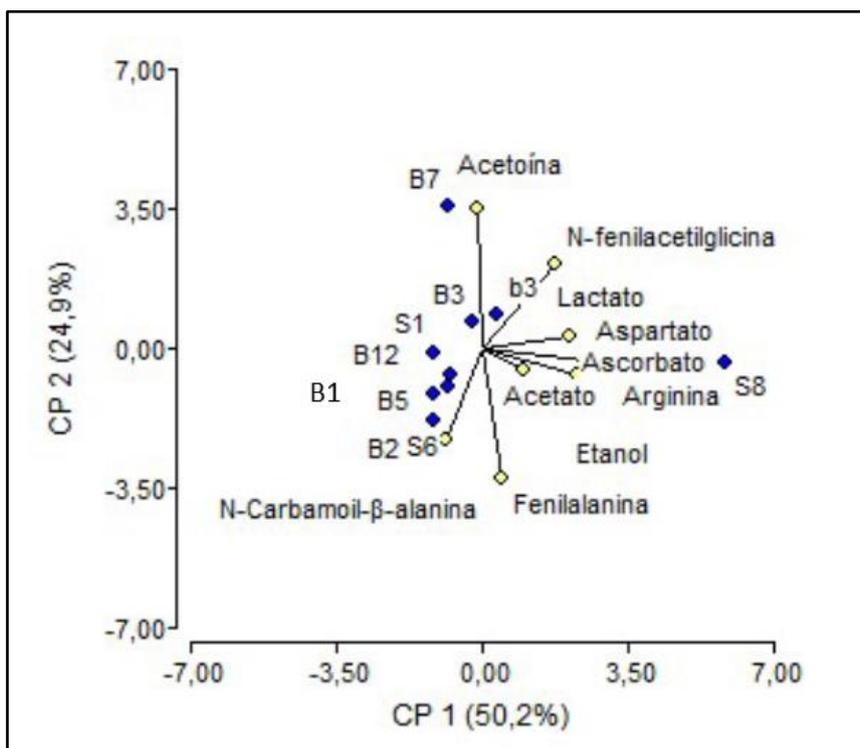
Se llevó a cabo el análisis metabolómico de los SLC de las 10 cepas de bacterias mediante RMN (Figura 4.10). Los resultados revelaron un total de 250 compuestos diferentes, incluyendo metabolitos antimicrobianos como acetato, acetoína, etanol, lactato, N-carbamoil-beta-alanina, fenilglicina, fenilalanina, arginina, aspartato y ácido

ascórbico. De todos los compuestos encontrados, acetato fue el más abundante, con una concentración de 54,97 mM.

De acuerdo con el análisis de componentes principales, los compuestos arginina, ascorbato y aspartato estuvieron altamente correlacionados. La cepa S8 fue la única que presentó estos tres metabolitos, diferenciándose del resto de las bacterias. La cepa B7 mostró un alto contenido de acetoína; finalmente, en las cepas B12, B2 y S6 se detectaron los compuestos N-carbamoil-beta-alanina y fenilalanina, ambos muy correlacionados (Figura 4.11).



**Figura 4.10.** Espectros de los sobrenadantes libres de células de las bacterias estudiadas obtenidos a través de la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.



**Figura 4.11.** Análisis de componentes principales (CP1=50,2 %, CP2=24,9 %) de los metabolitos antimicrobianos identificados por RMN en los sobrenadantes de las 10 bacterias con potencial probiótico aisladas de kéfir de agua.

#### 4.4. Discusión

Para seleccionar los cultivos bacterianos potencialmente probióticos se debe evaluar su supervivencia frente a distintos factores de estrés con el fin de determinar si son capaces de resistir condiciones adversas y, por lo tanto, se pueden considerar buenos candidatos para ser utilizados como probióticos en suplementos alimenticios (Tuomola *et al.*, 2001). En este capítulo de tesis se estudiaron las 10 bacterias aisladas de kéfir de agua y seleccionadas por su capacidad antimicrobiana frente a patógenos de larvas de abejas (Capítulo 3) con el fin de determinar si eran capaces de sobrevivir bajo las condiciones propias de las abejas melíferas y de las colmenas. Los aislamientos se caracterizaron genéticamente por análisis del gen ARNr 16S y fisiológicamente a través de pruebas *in vitro* de tolerancia a diferentes pHs (3, 5 y 6), concentraciones de NaCl (3; 6,5 y 10 %), temperaturas (10, 25 y 40 °C) y altas concentraciones de azúcar (30, 50 y 70 %).

De acuerdo al análisis del gen ARNr 16S, las bacterias aisladas del kéfir de agua fueron identificadas como *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*.

*Liquorilactobacillus satsumensis* y *Lentilactobacillus hilgardii*. El género *Lactobacillus* ha sido recientemente reclasificado en 25 géneros (Zheng *et al.*, 2020), por lo que los nombres corresponden a los que anteriormente eran *Lactobacillus casei*, *L. paracasei*, *L. satsumensis* y *L. hilgardii*, respectivamente. Estas especies han sido previamente reportadas en el kéfir (Gulitz *et al.*, 2012; Arrieta-Echeverry *et al.*, 2023; Oviedo-León *et al.*, 2024). Wulansari *et al.* (2022) estudiaron la incorporación de *Lacticaseibacillus casei* junto con leche de avena en la producción de kéfir y encontraron que mejoró la calidad y las características sensoriales del producto. En el mismo sentido, Karaffová *et al.* (2021) investigaron la cepa probiótica *Lacticaseibacillus paracasei* Ž2 aislada de gránulos de kéfir sobre la respuesta inmune de ratones y encontraron que esta cepa estimuló su inmunidad intestinal local. En cuanto a *Liquorilactobacillus satsumensis*, ha sido identificada entre las bacterias lácticas presentes en el kéfir de agua (de Almeida *et al.*, 2022). Ha sido estudiada tanto por su potencial probiótico como prebiótico (Oviedo-León *et al.*, 2024). Finalmente, la especie *Lentilactobacillus hilgardii* se ha reportado como una de las tres especies principales de bacterias lácticas que contribuyen a la fermentación del kéfir de agua (Gamba *et al.*, 2021).

La resistencia de los cultivos bacterianos a bajos valores de pH es un factor importante para tener en cuenta ya que aquellos microorganismos que son tolerantes a la acidez tienen mayores probabilidades de sobrevivir al tracto gastrointestinal y llegar al intestino en un número adecuado para lograr su colonización (Sica, 2013). El pH gástrico de la abeja melífera decrece hacia la región posterior del tubo digestivo, con valores de 6 (ventrículo anterior), 5,7 (ventrículo medio) y 5,6 (ventrículo posterior) (Terra y Ferreira, 1994). Las 10 cepas bacterianas sobrevivieron a los pH ácidos a los que fueron sometidas, presentando el menor crecimiento a pH 3. A valores de 5 y 6, las bacterias lograron un mayor crecimiento. De manera similar, Plessas *et al.* (2020) evaluaron las propiedades de 10 bacterias lácticas aisladas de gránulos de kéfir. A pH 4, todas las cepas tuvieron las mayores tasas de supervivencia, pero presentaron una significativa reducción en la viabilidad a pH 2.

La supervivencia de las bacterias a altas concentraciones de NaCl se evaluó como otro indicador de la capacidad de estas a tolerar condiciones adversas. En términos generales, todas las cepas sobrevivieron a una concentración de 3 % NaCl, pero su crecimiento disminuyó a medida que aumentó la salinidad, y algunas no sobrevivieron a 10 % NaCl. Resultados similares fueron reportados por Rahman *et al.* (2015) quienes caracterizaron dos especies de *Lactobacillus* y de *Bifidobacterium*. Las bacterias presentaron un buen crecimiento a 1 – 7 % NaCl, un crecimiento moderado a 8 – 9 % y no pudieron crecer a 10 % NaCl.

El crecimiento de las bacterias a distintas temperaturas fue evaluado ya que el objetivo es incorporar el probiótico en el alimento que se coloca en la colmena, y, por lo tanto, estará expuesto a las condiciones ambientales donde se localice el apiario. Las abejas son poiquilotermas, por lo cual, la temperatura es un factor muy importante en todas las actividades que realizan. Su temperatura corporal cambia de acuerdo con la del ambiente, y, para sobrevivir, pueden adaptarse en un rango muy amplio que oscila entre 0 y 40 °C (Crane, 1990). Sin embargo, la temperatura ambiental óptima para realizar sus actividades está entre los 21 y 35 °C. Temperaturas inferiores ralentizan el metabolismo, mientras que temperaturas más elevadas aumentan la tasa respiratoria y aceleran el metabolismo. Una tasa metabólica alta aumenta el consumo de energía y acelera el envejecimiento fisiológico. Para mantener una temperatura adecuada en la colmena, las abejas se agrupan y ventilan, según las necesidades (Genç y Genç, 2019). En esta tesis, las bacterias estudiadas presentaron un menor crecimiento a 10 °C y la mayoría de las cepas no sobrevivió a 40 °C. Por las razones expuestas previamente, esto no sería una limitación ya que, una vez dentro de la colmena, las abejas mantendrán la temperatura estable, oscilando entre los 34 y 35 °C, temperatura a la que las bacterias pudieron crecer adecuadamente.

La tolerancia osmótica de las bacterias se evaluó debido a que el probiótico seleccionado podría ser incorporado en la colmena junto con el jarabe con el que suplementan las colonias muchos apicultores. Los sustitutos de miel recomendados para la alimentación de las colmenas son el jarabe de maíz de alta fructosa (JMAF) y el jarabe de sacarosa. El JMAF posee una composición de sólidos de 55 % fructosa, 41 % glucosa y 4 % de otros azúcares/polisacáridos. Por su parte, el jarabe de sacarosa se prepara en la proporción de 2 kg de azúcar por cada litro de agua (2:1) y contiene 66 % de azúcar (Moja *et al.*, 2022). El crecimiento de las cepas bacterianas aumentó con concentraciones de 30 y 50 % de jarabe, y luego disminuyó al alcanzar la concentración de 70 %. La buena tolerancia a altas concentraciones de azúcar es una gran ventaja ya que demuestra que las bacterias evaluadas pueden sobrevivir en el jarabe que suele ser utilizado para alimentar a las abejas.

Un requisito importante al seleccionar una cepa probiótica es su capacidad para crecer adecuadamente, alcanzar un número viable al llegar al intestino y, así, colonizarlo. Los valores obtenidos durante la fase exponencial de crecimiento demuestran que las 10 cepas de bacterias pudieron crecer en el medio MRS, con niveles de crecimiento buenos para la obtención de inóculos destinados a la producción de un suplemento probiótico (Salazar Alzate *et al.*, 2005). Un recuento de  $1 \times 10^6$  UFC/g es la mínima concentración de probióticos en el intestino necesaria para lograr un efecto en

animales (Minelli y Benini, 2008). El tiempo de duplicación y la tasa de crecimiento de las cepas fueron variables y mayores a los observados para bacterias lácticas por otros autores. Por ejemplo, Jurado-Gómez y Gúzman-Insuasty (2015) reportaron un tiempo de duplicación de 33 min para *Lactobacillus lactis*, presentando así un nivel de crecimiento que le permitiría competir con bacterias patógenas en el intestino. Por su parte, Sharma *et al.* (2021) reportaron tasas de crecimiento entre 0,14 y 0,17 para *L. plantarum*, valores obtenidos a través de la utilización de modelos cinéticos.

Una vez obtenido el probiótico es necesario conservarlo adecuadamente para poder ser comercializado fácilmente. Es fundamental que durante la preservación por largos períodos de tiempo se mantengan inalteradas sus propiedades tecnológicas y probióticas (Bolla, 2011). Existen diferentes metodologías para la conservación de microorganismos, tales como el secado por calor, secado en frío o liofilización (Golowczyc *et al.*, 2009). El proceso de liofilización tiene como desventaja que puede atenuar o matar las células bacterianas. Es por lo que, durante el procedimiento, se incorporan estabilizadores que protegen a las células, tales como polisacáridos, inulina, quitosano, leche descremada, pectina, entre otros aditivos (Yang *et al.*, 2006). En esta tesis, el número de UFC de las cepas bacterianas fue menor comparado con el recuento inicial, antes de ser sometidas a la liofilización. Sin embargo, todas las bacterias sobrevivieron a este proceso, con un porcentaje de supervivencia que varió ampliamente. Esta fluctuación se debe en parte a los agentes crioprotectores utilizados. Yang *et al.* (2006) también utilizaron leche en polvo como aditivo a distintas concentraciones (0, 2, 5 y 10 %). Sus resultados mostraron que la leche descremada impidió la muerte celular de las dos especies de BAL estudiadas, y tuvo el mejor efecto a la concentración de 10 %. Otros factores que afectan la supervivencia de los microorganismos incluyen las condiciones de crecimiento, el tipo de cultivo, el procesamiento y las condiciones de rehidratación (To y Etzel, 1997).

Se llevó a cabo el estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en las cepas bacterianas. El perfil bioquímico obtenido para cada una de ellas fue comparado con el de *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei*, con el fin de corroborar que las cepas seleccionadas pertenecieran al grupo de las bacterias lácticas. De acuerdo con los resultados observados, los cultivos bacterianos presentaron propiedades bioquímicas típicas del género *Lactobacillus*. Las bacterias pertenecientes a este género, como se describió previamente, son las más utilizadas para la obtención de suplementos con propiedades probióticas, pudiendo ser incorporadas en forma individual o en combinación con otros microorganismos (Salminen *et al.*, 1993).

Una gran cantidad de compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias

lácticas han sido identificados y caracterizados en numerosos estudios debido a su potencial para inhibir microorganismos indeseados. Dichos compuestos son muy variables, desde ácidos orgánicos de estructura simple y productos primarios del metabolismo, hasta compuestos complejos y péptidos de gran tamaño. Los principales compuestos antimicrobianos producidos por las BAL son el ácido láctico y el ácido acético, los cuales pueden actuar en forma sinérgica (Narendranath *et al.*, 2001). Existen, además, otros productos del metabolismo que pueden contribuir con su capacidad antimicrobiana, pero suelen ser difíciles de cuantificar (Arena *et al.*, 2016; Siedler *et al.*, 2019). A través de la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  fue posible analizar los sobrenadantes completos y detectar un amplio rango de sustratos del medio y metabolitos excretados por las bacterias. Una vez caracterizados estos compuestos, se identificaron aquellos relacionados con su actividad antimicrobiana.

Los compuestos lactato y acetato fueron detectados en todos los sobrenadantes bacterianos evaluados. Estos ácidos orgánicos son los principales compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas y han sido reportados como responsables de inhibir el crecimiento de distintos microorganismos patógenos (George-Okafor *et al.*, 2020). Por ejemplo, Maggi *et al.* (2013) estudiaron el efecto de ácidos orgánicos (láctico y acético) producidos por BAL sobre el desarrollo de colonias de abejas y para el control de *Nosema ceranae*. La administración *in vitro* de ácido láctico y acético no tuvo efecto tóxico sobre las abejas y las colonias alimentadas con ácido láctico aumentaron su población y el contenido de cuerpos grasos de las abejas. Además, los ácidos orgánicos redujeron la intensidad del patógeno luego de la segunda aplicación del tratamiento. El etanol fue otro de los compuestos antimicrobianos detectados en todos los sobrenadantes bacterianos. Braglia *et al.* (2021) investigaron el potencial para controlar la nosemosis de distintos ingredientes incorporados en la dieta de las abejas. Entre ellos analizaron el etanol y encontraron que una concentración de 4 % de etanol 0,69 M en la dieta fue suficientemente alta para generar estrés celular en las abejas, pero no lo suficiente como para causar diferencias en las tasas de mortalidad o en el desarrollo de *Nosema*.

Entre los metabolitos identificados, N-carbamoil-beta-alanina, fenilglicina y fenilalanina, pertenecen al grupo de los aminoácidos. La presencia de estos compuestos puede sugerir que sean bacteriocinas las responsables de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes evaluados (Fuochi *et al.*, 2019). Se ha reportado un amplio rango de bacteriocinas producidas por bacterias. Por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus* produce acidofilina, lactocidina y acidolina, mientras que *L. plantarum* produce lactolina.

Las bacteriocinas elaboradas por las bacterias Gram-positivas tienen un espectro de acción estrecho y actúan sólo sobre bacterias relacionadas filogenéticamente (Kumar Bajaj *et al.*, 2015). Los mecanismos mediados por bacteriocinas por los cuales las bacterias provocan la muerte incluyen la destrucción de las células objetivo a través de la formación de poros y/o la inhibición de la pared celular (Nielsen *et al.*, 2010; Hassan *et al.*, 2012).

Notablemente, dos compuestos antimicrobianos, arginina y ácido ascórbico, fueron detectados únicamente en el sobrenadante de una de las bacterias evaluadas, *Lactocaseibacillus paracasei* (S8). Existen 10 aminoácidos considerados esenciales para las abejas. Entre ellos se encuentra la arginina. En la alimentación de las abejas se debe asegurar el equilibrio general de aminoácidos esenciales y vitaminas B ya que son los nutrientes que regulan el tamaño de las glándulas hipofaríngeas y las señales inmunológicas en estos insectos (Hendriksma *et al.*, 2019; Jong *et al.*, 2009; Danihlík *et al.*, 2018). En este sentido, Daisley (2021) desarrolló un suplemento con el agregado de tres cepas probióticas de lactobacilos y comparó el perfil de aminoácidos en suplementos nutricionales, con y sin el agregado de las cepas. El contenido nutricional de los suplementos se contrastó con 16 fuentes de polen como puntos de referencia en relación a las demandas fisiológicas de las abejas. Sus resultados demostraron un ligero aumento de ocho aminoácidos, entre ellos, arginina, en los suplementos probióticos comparados con los controles. Por su parte, el ácido ascórbico es un antioxidante capaz de eliminar radicales libres (Lugo-Zarate *et al.*, 2021). Esta capacidad puede utilizarse como uno de los criterios al seleccionar probióticos entre las bacterias lácticas (Klimbo *et al.*, 2021). Los insectos tienen una alta tasa metabólica lo cual genera grandes cantidades de radicales libres. Es por ello que poseer un sistema antioxidante eficaz es de particular importancia para los insectos (Candy *et al.*, 1997). La vitamina C (ácido ascórbico) no se considera esencial para las abejas; sin embargo, suele recomendarse su administración, especialmente en dietas artificiales, debido a la falta de estimación de la demanda de dicha vitamina en las abejas (Black, 2006). Farjan *et al.* (2012) estudiaron el efecto de la suplementación de la dieta con ácido ascórbico sobre el estado antioxidante en la cría de abejas en desarrollo durante la primavera. Encontraron que la media de las pérdidas de abejas durante el invierno fue un 33 % menor en las colmenas que recibieron la vitamina C. En otro estudio, se demostró que la suplementación con vitamina C en la dieta de las abejas redujo moderadamente la infestación con *Varroa destructor* y podría mejorar el estado general de las colmenas (Łopieńska-Biernat *et al.*, 2019).

Los compuestos detectados en los sobrenadantes de las 10 bacterias

evaluadas les confieren una ventaja competitiva dentro del complejo ambiente microbiano como consecuencia de la actividad antimicrobiana asociada a su producción, fundamental para inhibir el crecimiento de patógenos en el tracto intestinal. Este es uno de los principales requisitos que debe cumplir un microorganismo probiótico. En base a ello y a los resultados de supervivencia frente a las pruebas de estrés a las que fueron sometidas las bacterias, se seleccionaron tres cepas (B2, b3 y S6) con potencial para ser utilizadas como probióticos en el suplemento nutricional destinado a la alimentación de las abejas (Capítulo 6).

## Conclusiones

- A partir del análisis del gen ARNr 16S, los aislamientos de bacterias fueron identificados como miembros de los géneros *Lacticaseibacillus*, *Liquorilactobacillus* y *Lentilactobacillus*.
- Las 10 cepas de bacterias caracterizadas fisiológicamente sobrevivieron a las pruebas *in vitro* a las que fueron sometidas: tolerancia a pH ácido, resistencia a altas concentraciones de NaCl, crecimiento a distintas temperaturas y tolerancia a osmolaridad.
- Las 10 cepas bacterianas presentaron una adecuada cinética de crecimiento y supervivencia posterior a la liofilización, propiedades importantes para un probiótico.
- De acuerdo con la determinación de los perfiles de fermentación de carbohidratos, las bacterias presentaron propiedades bioquímicas típicas del género *Lactobacillus*.
- Mediante Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H (<sup>1</sup>H-RMN), en los sobrenadantes libres de células se detectaron 250 compuestos diferentes producidos por las bacterias.
- En los sobrenadantes bacterianos se identificaron los compuestos antimicrobianos acetato, acetoína, etanol, lactato, N-carbamoil-beta-alanina, fenilglicina, fenilalanina, arginina y ácido ascórbico. El acetato fue el metabolito más abundante presente en los sobrenadantes bacterianos.
- Las cepas bacterianas B2, b3 y S6 fueron seleccionadas como potenciales probióticos para ser incorporados al suplemento nutricional destinado a las abejas en los ensayos de campo que se describirán en el Capítulo 6.

## **Capítulo 5: Identificación y evaluación de las propiedades probióticas de levaduras con actividad antimicrobiana**

### **5.1. Introducción**

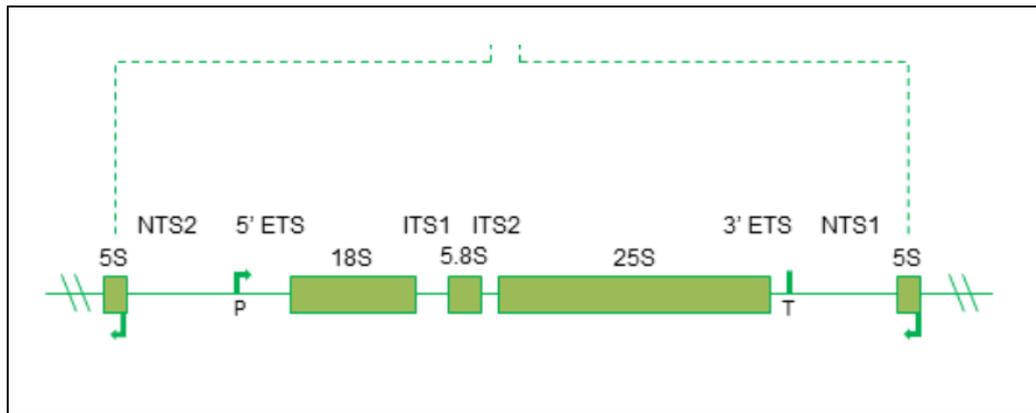
Las levaduras son hongos que se multiplican generalmente por gemación, en forma de agregados sueltos de células independientes que pueden ser globosas, ovoides, cilíndricas o alargadas. El crecimiento de las levaduras en medio sólido se caracteriza por la formación de colonias de aspecto similar a las colonias bacterianas (Figura 5.1). La mayoría de las levaduras utilizan azúcares como principal fuente de energía y carbono para su metabolismo a través de la vía glucolítica. En anaerobiosis, la glucosa que ingresa a la vía glucolítica permite obtener energía mediante la fermentación alcohólica, por acción sucesiva sobre el piruvato de la piruvato-decarboxilasa y la alcohol-deshidrogenasa, dando como producto etanol. En aerobiosis, parte del piruvato es oxidado completamente a CO<sub>2</sub> mediante la respiración celular. Sin embargo, una parte de la glucosa sigue siendo metabolizada mediante fermentación láctica, aún en aerobiosis (Gancedo y Serrano, 1989).

Las levaduras más estudiadas en el mundo son cepas provenientes de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* y *Candida utilis*. En el caso de *S. cerevisiae*, su uso más extendido está asociado a la panificación y las industrias de fabricación de cerveza, vinos y alcohol. Esta levadura es una de las especies considerada como microorganismo GRAS, por lo que ha sido aprobada para su uso como aditivo alimentario (Suárez-Machín *et al.*, 2016).



**Figura 5.1.** Fotografía en lupa de colonias de levaduras creciendo en placa con medio de cultivo sólido Hongos y Levaduras (Britania, Argentina) a 25 °C.

Para identificar hongos, uno de los métodos empleados es la secuenciación de regiones ribosómicas. Las dos regiones más utilizadas son las correspondientes a los dominios D1 y D2 ubicados en el extremo 5' del gen 25S (Kurtzman y Robnett, 1998) y la región que comprende los espaciadores transcritos internos y el gen ribosomal 5.8S (ITS1-5.8S rADN-ITS2) (Figura 5.2) (James *et al.*, 1997). Al comparar con las secuencias depositadas en bases de datos es posible identificar una levadura desconocida a nivel taxonómico de especie, cuando el porcentaje de homología de sus secuencias es superior o igual a 99 % (Kurtzman y Robnett, 1998).

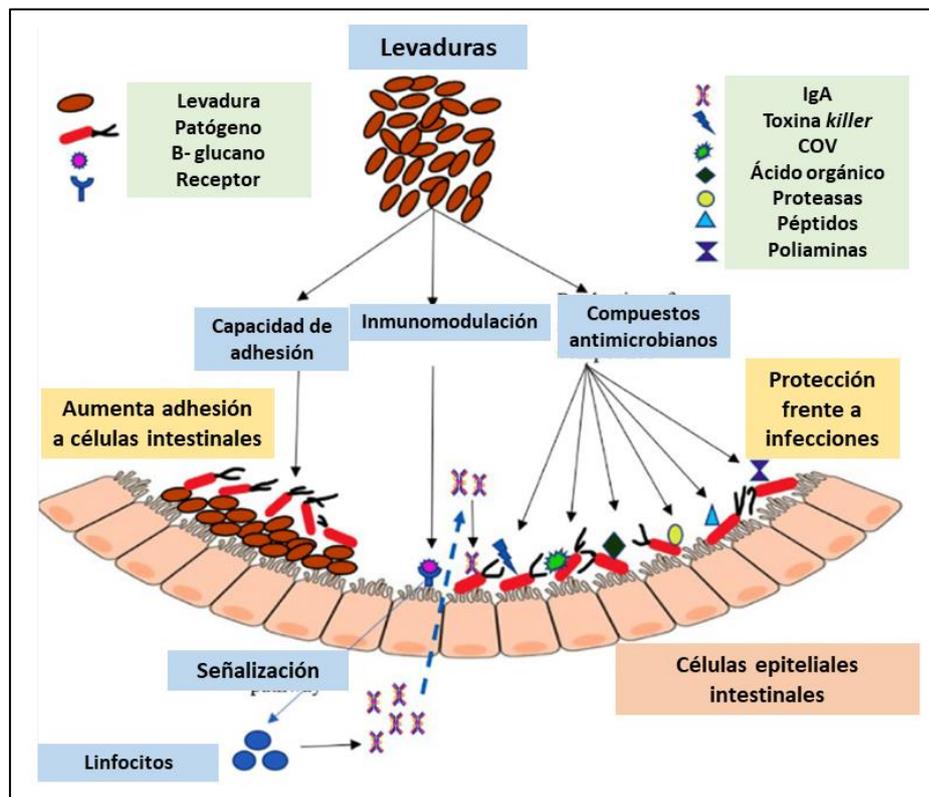


**Figura 5.2.** Mapa del gen que codifica para las tres moléculas de rRNA (18S, 5.8S y 25S) encontradas en el ribosoma de las levaduras. Los rRNAs 5.8S, 18S y 25S están flanqueados por dos regiones espaciadoras externas (5'ETS y 3'ETS) y separados por dos regiones espaciadoras internas (ITS1 separando 18S de 5.8S e ITS2 separando a 5.8S de 25S). Hay dos regiones espaciadoras que no se transcriben (NTS). Las letras P y T indican la región promotora y terminadora del transcrito policistrónico. (Tomado de Espinar Marchena, 2017).

A nivel mundial, el uso de levaduras tiene diversos fines, entre ellos, la producción de preparados probióticos (Hill *et al.*, 2014; Marco *et al.*, 2017). La búsqueda de microorganismos que puedan ser candidatos a probióticos implica una evaluación inicial *in vitro* de propiedades que pueden dividirse en dos grandes grupos. Por un lado, las características funcionales, que incluyen, principalmente, la capacidad de supervivencia en el sitio de interés, la actividad antimicrobiana y el efecto en el hospedador. Por otro lado, las propiedades tecnológicas implican la producción de gran cantidad de biomasa y la resistencia a procesos de conservación, como la liofilización, (método explicado previamente en el capítulo 4) (Staniszewski y Kordowska-Wiater, 2021).

Las levaduras producen diversas moléculas tales como ácidos orgánicos, poliaminas, proteasas y micotoxinas, las cuales actúan como compuestos antimicrobianos que destruyen microorganismos patógenos (Figura 5.3) (Shruthi *et al.*, 2022). La actividad antimicrobiana de las levaduras se atribuye principalmente a la producción de etanol. Otros metabolitos como dióxido de carbono, reuterina, diacetilo, compuestos proteicos o péptidos de bajo peso molecular también serían responsables de su capacidad inhibitoria (Ruggirello *et al.*, 2019). Por otra parte, la actividad antagónica puede deberse a la producción de enzimas hidrolíticas y a compuestos volátiles tales como acetato, acetato de etilo, acetato de isobutilo, alcohol fenético y 2-

pentanona, entre otros (Nally *et al.*, 2015). Finalmente, existe un gran grupo de compuestos antimicrobianos, conocidos como toxinas *killer*, las cuales tienen un gran espectro de actividad frente a muchos microorganismos patógenos. Estas son proteínas extracelulares, glicoproteínas o glucolípidos que alteran la membrana celular de organismos susceptibles (Muccilli y Restuccia, 2015).



**Figura 5.3.** Representación de la actividad antagonista de levaduras frente a patógenos y los principales modos de acción. (Tomado de Shruthi *et al.*, 2022).

En esta tesis, las levaduras aisladas del kéfir de agua, seleccionadas por su actividad inhibitoria frente a patógenos de interés apícola (Capítulo 3), fueron caracterizadas y evaluadas a través de distintas pruebas *in vitro* con el fin de determinar su potencial como probiótico para ser incorporadas en el suplemento nutricional destinado a alimentar abejas.

### Objetivos específicos

1. Identificar las levaduras obtenidas del kéfir de agua mediante caracterización genotípica.

2. Evaluar el potencial probiótico de las levaduras aisladas del kéfir a través de distintas pruebas *in vitro*.
3. Caracterizar e identificar los metabolitos presentes en los sobrenadantes de las levaduras por Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H.

## 5.2. Materiales y Métodos

### 5.2.1. Identificación genotípica de las levaduras seleccionadas

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* de actividad antimicrobiana frente a los patógenos *Paenibacillus larvae* y *Ascosphaera apis* (Capítulo 3), se seleccionaron los 10 aislamientos de levaduras con mayor capacidad inhibitoria, los cuales fueron identificados genotípicamente.

#### 5.2.1.1. Extracción de ADN de levaduras

Para la obtención del ADN de las levaduras se llevó a cabo el protocolo propuesto por Polaina y Adam (1991). Se prepararon cultivos líquidos de cada uno de los aislamientos en medio HyL. Se colocó una alícuota de un ml del cultivo en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min. Luego, se resuspendió en 100 µl de TE *buffer* (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5) conteniendo 3 % SDS. Se mantuvo a temperatura ambiente por 15 min, con agitación ocasional. Posteriormente, se agregó fenol y 0,5 ml de TE a cada tubo. Luego, se adicionó éter para eliminar el fenol residual y se añadió etanol (2,5 volúmenes) para recuperar los ácidos nucleicos. Se conservó a -20 °C hasta su utilización.

#### 5.2.1.2. Amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN de las levaduras se analizó empleando los cebadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Avin *et al.*, 2014). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl conteniendo 1 U ADN Taq polimerasa (PB-L, Argentina), cebadores 1 µM, buffer 1X, ADN Taq polimerasa (PB-L, Argentina), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs y el correspondiente templado de ADN. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador de ADN (Bio-Rad, USA).

La amplificación de ADN de levaduras se llevó a cabo según Avin *et al.* (2014)

con modificaciones. Se realizó un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min seguido de un programa de 30 ciclos que implicó una desnaturalización a 94 °C por 30 s, hibridación de los cebadores a 57 °C por 30 s, síntesis de ADN a 72 °C por 45 s y un paso de extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos de PCR amplificados fueron secuenciados bidireccionalmente usando el servicio de MacroGen, Korea (<http://macrogen.com/>). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos de nucleótidos del GenBank utilizando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

## **5.2.2. Evaluación de la capacidad probiótica**

Los 10 aislamientos de levaduras seleccionados fueron evaluados a través de pruebas *in vitro* para conocer su potencial probiótico. Las mismas se describen a continuación.

### **5.2.2.1. Caracterización fisiológica de las levaduras seleccionadas**

La capacidad de los 10 aislamientos de levaduras de crecer a diferentes pHs (3, 5 y 6), concentraciones de NaCl (3; 6,5 y 10 %) y temperaturas (10, 35 y 40 °C), se evaluó con el fin de caracterizarlas fisiológicamente. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado con cultivos inoculados en caldo HyL e incubados a 25 °C por 24 h para pH y NaCl, y por 48 h para la prueba de temperatura, en aerobiosis. Luego de ese período, se realizó el recuento de UFC por la técnica de *drop plate* (Herigstad *et al.*, 2001) y se midió la absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 265 PDA-UV-VIS). Cada aislamiento se cultivó en HyL con pH 7, sin NaCl y a 25 °C, como control para cada una de las condiciones estudiadas.

### **5.2.2.2. Ensayo de tolerancia osmótica**

Se evaluó la capacidad de los microorganismos de sobrevivir en condiciones de alta concentración de azúcares: 30, 50 y 70 % p/v. Se inocularon 0,5 ml de cada cultivo puro con 10<sup>8</sup> UFC/ml, por triplicado en tubos con caldo enriquecido con las distintas concentraciones de jarabe y en tubos sin jarabe (control). Las muestras se incubaron a 25 °C en aerobiosis por 72 h. Luego de ese tiempo, se evaluó el número de UFC de cada cultivo por la técnica de *drop plate* y midiendo la absorbancia de las muestras a 600 nm.

### 5.2.2.3. Cinética de crecimiento

Se determinó por el método de turbidimetría, utilizando un espectrofotómetro TECAN M1000 (UV/VIS, fluorescencia y luminiscencia) y microplacas de 96 pocillos. Con ese fin, para obtener cultivos puros activos se inocularon 0,5 ml de un cultivo de 24 h en 5 ml de medio HyL líquido y se incubaron a 25 °C por 24 h. Se diluyeron (1:20) en agua destilada estéril (275 µL ADE y 15 µL cultivo por pocillo). Se midió la D.O inicial a 600 nm y se ajustó a 0,1. Se realizó la curva de crecimiento de cada cultivo midiendo a 600 nm cada 15 min durante 24 h. Posteriormente, se calculó el tiempo de duplicación y la tasa de crecimiento de cada microorganismo con las siguientes ecuaciones:

•Medida del número de generaciones que ocurren por unidad de tiempo en un cultivo exponencial ( $h^{-1}$ ):

$$\text{Tasa de crecimiento } (\mu): \mu = (\text{LN}(\text{Abs}_{t1}) - \text{LN}(\text{Abs}_{t0})) / 0,25$$

•Tiempo que tarda una población en duplicar el número de células (h):

$$\text{Tiempo de duplicación } (g): g = \text{LN}(2) / \mu$$

### 5.2.2.4. Evaluación de la supervivencia posterior a la liofilización

Se realizó un conteo de las células viables previo a la liofilización y luego de 48 h de preservación para determinar la supervivencia tras el proceso. Para ello, se obtuvieron colonias puras en medio HyL y se inocularon en un criovial con 1 ml de solución lioprotectora de leche descremada en polvo al 10 % p/v. Se homogeneizó utilizando vórtex. Luego, se llevaron los crioviales al liofilizador (Heto FD1.0). Tras 48 h de realizada la liofilización, se adicionaron 2 ml de leche descremada en polvo al 10 % a cada criovial. Se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente ( $23 \pm 2$  °C) para lograr una correcta hidratación. Se realizaron diluciones decimales y se sembró por *drop plate* en placas con medio de cultivo. Luego de la incubación, se realizó el recuento de UFC (recuento post- liofilización).

### 5.2.3. Caracterización de los metabolitos presentes en los sobrenadantes microbianos por Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Para determinar la naturaleza de los compuestos presentes en los SLC, se obtuvieron cultivos líquidos puros de 24 h de cada aislamiento. Se centrifugaron a 15.000 rpm por 10 min a 4 °C y se filtraron utilizando un filtro de 0,22 µm (Sartorius). Los sobrenadantes se transfirieron (540 µl) a un criovial estéril y se diluyeron con una

solución estándar de 5 mM DSS-d6 (Chenomx Inc., Edmonton Canada, IS-2 Chenomx Internal Standard—DSS-d6) y 0,1 % azida de sodio en 99% óxido de deuterio (D<sub>2</sub>O). Las muestras se homogeneizaron y se mantuvieron a -20 °C hasta su posterior análisis (Ganobis *et al.*, 2020).

Las muestras se analizaron por RMN de la misma manera que se procedió con los sobrenadantes bacterianos (Capítulo 4).

#### **5.2.4. Análisis estadístico**

El software utilizado, las transformaciones realizadas, así como todos los análisis estadísticos practicados fueron los mismos que se describieron previamente para las bacterias (Capítulo 4).

### **5.3. Resultados**

#### **5.3.1. Identificación genotípica de las levaduras seleccionadas**

La Tabla 5.1 presenta los resultados del análisis molecular para la identificación de las 10 cepas de levaduras aisladas del kéfir de agua que presentaron mayor inhibición frente a los patógenos *P. larvae* y *A. apis*.

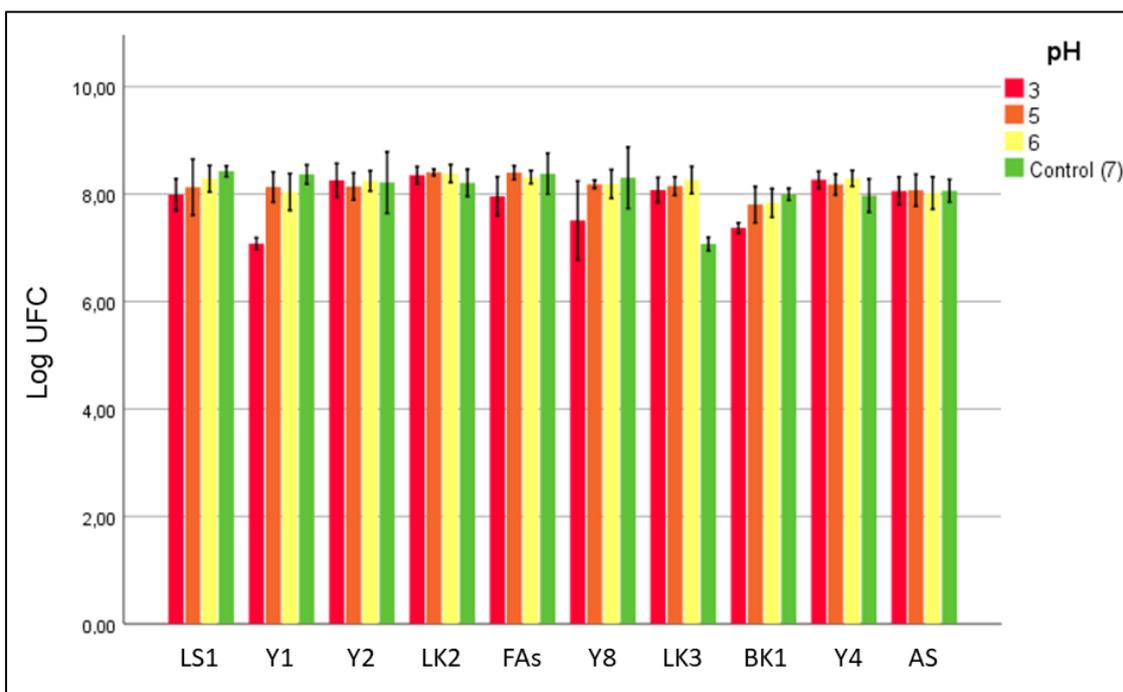
**Tabla 5.1.** Identificación genotípica de las 10 cepas de levaduras aisladas del kéfir de agua y seleccionadas por su actividad antimicrobiana sobre *Paenibacillus larvae* y *Ascosphaera apis*.

<b>CEPA</b>	<b>IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE DE MAYOR COINCIDENCIA / NÚMERO DE ACCESO AL GENBANK</b>	<b>SIMILITUD (%)</b>
<b>LS1</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFM40198/ LC413770.1	99,76
<b>Y1</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK113-7D/ CP046092.1	99,76
<b>Y2</b>	<i>Saccharomyces uvarum</i> CBS:2444/ KY105230.1	91,14
<b>LK2</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> T63/ CP008315.1	97,10
<b>FAS</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / CP046092.1	99,10
<b>Y8</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LV06_ITS1/ ON262409.1	87,32
<b>LK3</b>	<i>Pichia kluyveri</i> / MN268784.1	98,25
<b>BK1</b>	<i>Pichia kluyveri</i> DBMY81/ KJ706300.1	90,36
<b>Y4</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> / MH608341.1	98,70
<b>AS</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS:2962/ KY105051.1	96,26

### 5.3.2. Evaluación de la capacidad probiótica

#### 5.3.2.1. Tolerancia a pH ácido

Se evaluó el efecto sobre cada cepa de levadura de distintos pH (3, 5, 6, control 7) luego de 24 h (Figura 5.4). En la mayoría de las cepas no se detectaron cambios en el log UFC según el pH del medio (Tabla 5.2). En los casos en que sí hubo diferencias, se observó una ligera reducción del logaritmo de UFC al disminuir el pH.



**Figura 5.4.** Tolerancia de las 10 cepas de levaduras a diferentes pH (3, 5, 6). Los resultados están expresados como la media del log de UFC a las 24 h para cada valor de pH (control pH 7).

**Tabla 5.2.** Comparación del efecto del pH sobre las cepas de levaduras estudiadas a las 24 h.

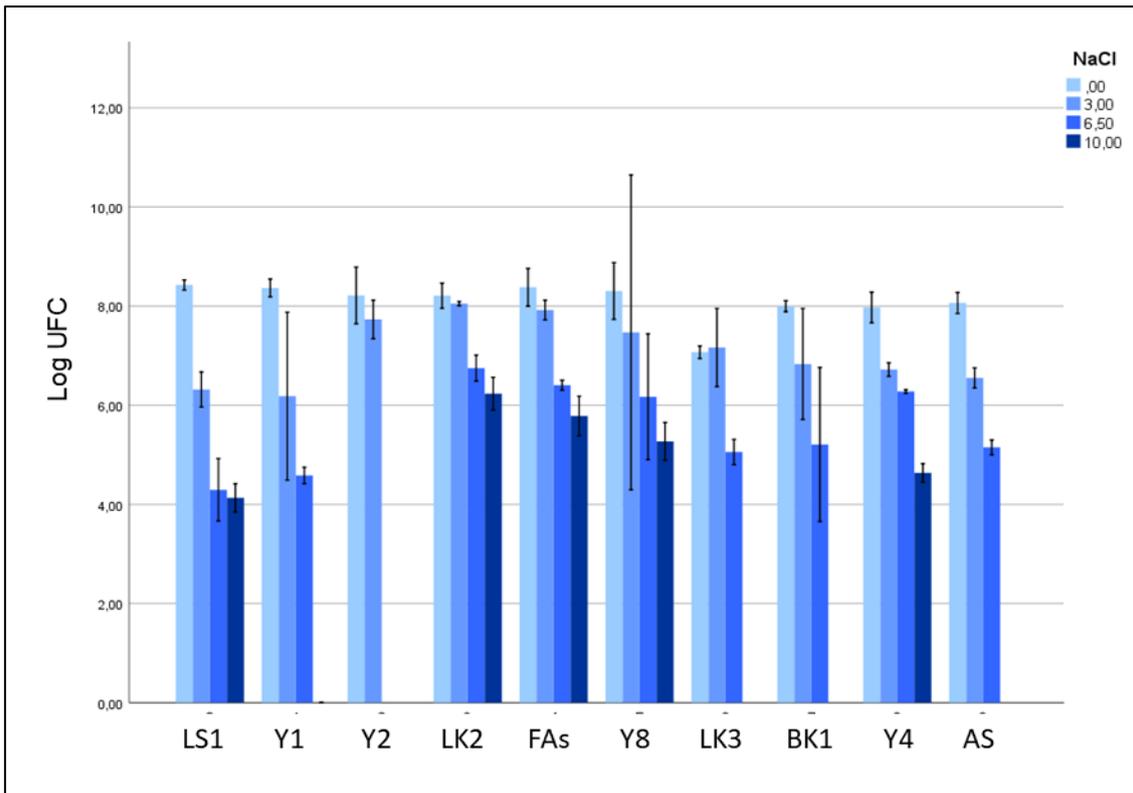
LEVADURA	pH			
	3	5	6	7 (Control)
LS1	-	-	-	-
Y1	a*	b	b	b
Y2	-	-	-	-
LK2	-	-	-	-
FAS	-	-	-	-
Y8	-	-	-	-
LK3	b	b	b	a
BK1	a	b	b	b
Y4	-	-	-	-
AS	-	-	-	-

\* Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

- ANOVA no encontró diferencias estadísticamente significativas.

### 5.3.2.2. Resistencia a altas concentraciones de NaCl

Se evaluó el comportamiento de las levaduras en cada concentración de NaCl (control 0 %, 3 %, 6,5 %, 10 %) luego de 24 h (Figura 5.5). Se encontraron diferencias significativas entre las cepas en todos los tratamientos (Tabla 5.3). Se observó una tendencia general (con distinta intensidad) a presentar un menor crecimiento a medida que aumentó la concentración de NaCl.



**Figura 5.5.** Resistencia de las 10 cepas de levaduras a diferentes concentraciones salinas (3 %, 6,5 %, 10 %). Los resultados están expresados como la media del log de UFC a las 24 h para cada concentración de NaCl (control 0 %).

**Tabla 5.3.** Comparación del efecto de la concentración de NaCl sobre las cepas de levaduras estudiadas a las 24 h.

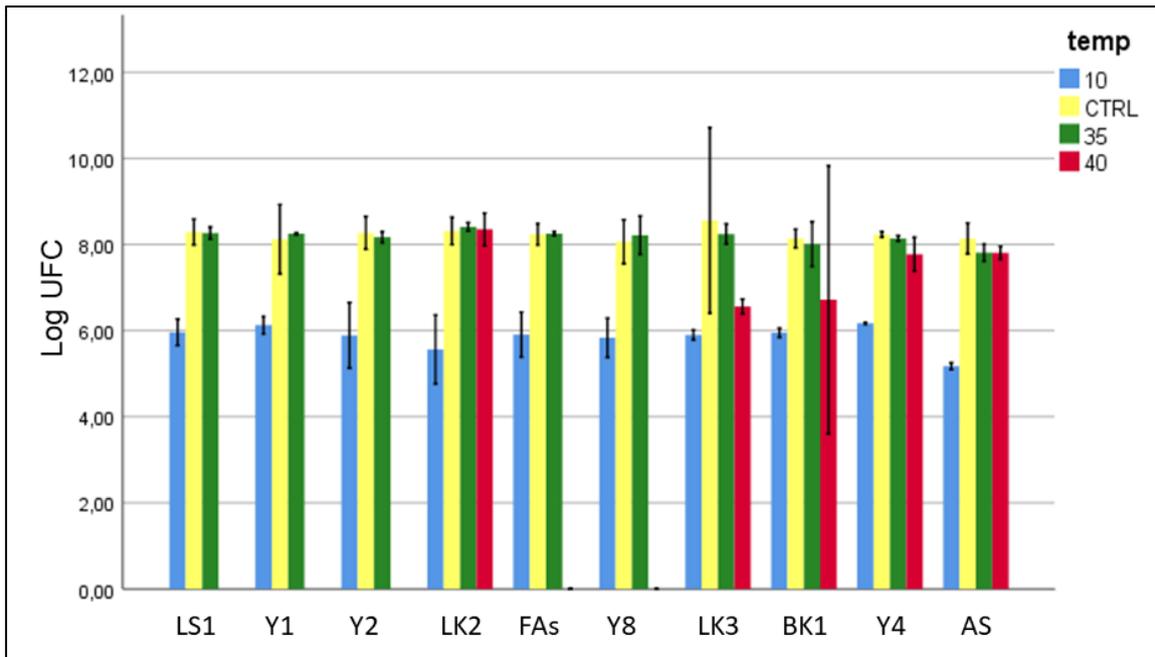
LEVADURA	[NaCl]				BROWN-FORSYTHE (SIG.)
	0%(Control)	3%	6,5%	10%	
LS1	a*	b	c	c	<0,01
Y1	a	ab	b	c	<0,05
Y2	a	b	—	—	<0,05
LK2	a	a	b	c	<0,01
FAS	a	b	c	c	<0,01
Y8	ab	abc	bc	c	<0,05
LK3	a	a	b	c	<0,01
BK1	a	a	a	—	<0,01
Y4	a	b	c	d	<0,01
AS	a	b	c	—	<0,01

\* Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

— No sobrevivió

### 5.3.2.3. Crecimiento a diferentes temperaturas

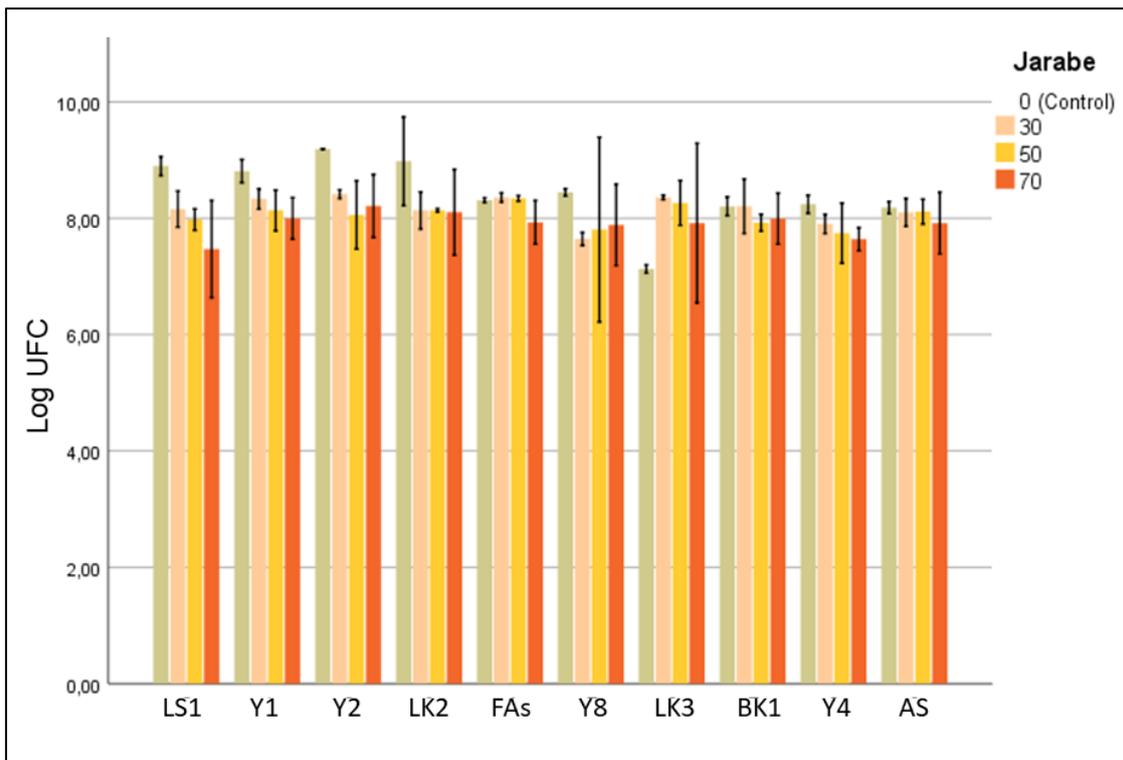
Se comparó el crecimiento de las levaduras, luego de 48 h, a las temperaturas 10 °C, 35 °C, 40 °C, con respecto a un control a 25 °C (Figura 5.6). No hubo diferencias significativas entre las cepas a 10 °C (Brown-Forsythe,  $p=0,083$ ), a 35 °C (Brown-Forsythe,  $p=0,173$ ) ni a 25 °C (control) (Brown-Forsythe,  $p=0,254$ ). Todas las levaduras presentaron un menor crecimiento a 10 °C, mientras que a 35 °C el crecimiento no se diferenció respecto del control (25 °C). Sin embargo, solo sobrevivieron cinco levaduras (LK2, LK3, BK1, Y4, AS) cuando se estudió el crecimiento a 40 °C.



**Figura 5.6.** Crecimiento de las 10 cepas de levaduras a diferentes temperaturas (10 °C, 35 °C, 40 °C). Los resultados están expresados como la media del log de UFC a las 48 h para cada temperatura (control a 25 °C: CTRL).

#### 5.3.2.4. Tolerancia osmótica

Se evaluó el efecto sobre las levaduras de distintas concentraciones de jarabe (control 0 %, 30 %, 50 %, 70 %) a las 72 h de incubación (Figura 5.7). En la mayoría de las cepas, el control sin agregado de jarabe se diferenció del tratamiento de 30 %, pero no de las concentraciones de 50 y 70 % (Tabla 5.4). En general, se registró una disminución estadísticamente significativa del crecimiento al aumentar la concentración osmótica.



**Figura 5.7.** Tolerancia de las 10 cepas de levaduras a diferentes concentraciones de jarabe (30 %, 50 %, 70 %). Los resultados están expresados como la media del log de UFC a las 72 h para cada concentración (control 0 %).

**Tabla 5.4.** Comparación del efecto de la concentración de jarabe sobre las cepas de levaduras estudiadas a las 72 h.

LEVADURA	JARABE (%)				BROWN-FORSYTHE (SIG.)
	0 (Control)	30	50	70	
LS1	b*	a	a	ab	<0,05
Y1	b	a	a	a	<0,01
Y2	b	a	ab	ab	+
LK2	b	a	ab	ab	<0,05
FAS	-	-	-	-	0,05
Y8	-	-	-	-	0,06
LK3	-	-	-	-	0,08
BK1	-	-	-	-	0,11
Y4	b	a	ab	a	<0,05
AS	-	-	-	-	0,21

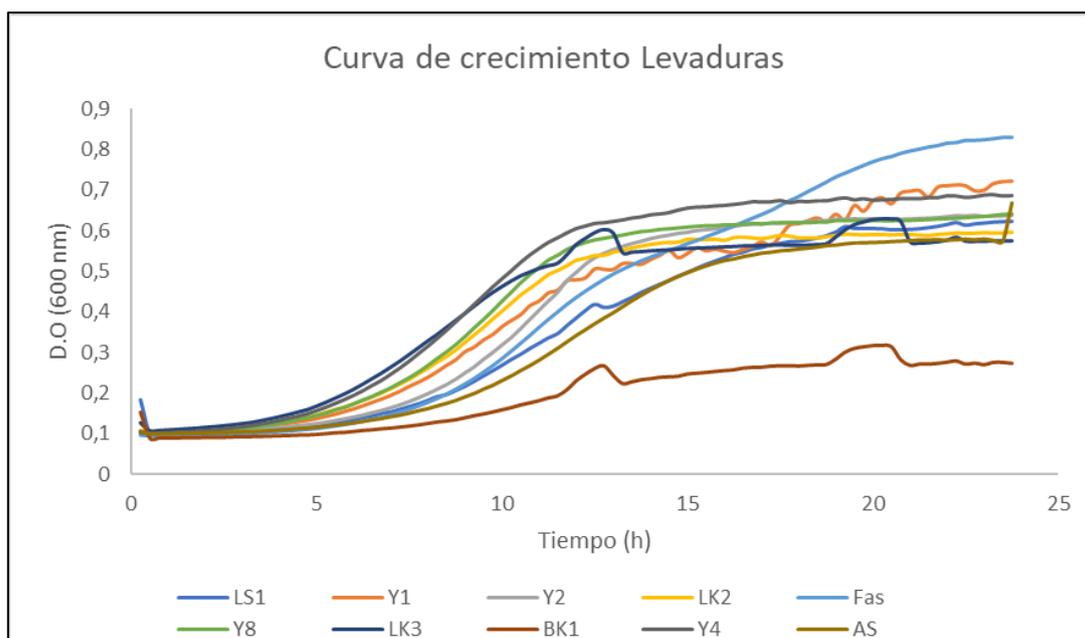
\*Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ )

- ANOVA de Brown-Forsythe no encontró diferencias estadísticamente significativas.

+ Prueba de Brown-Forsythe no se pudo realizar porque, como mínimo, un grupo tiene una varianza 0.

### 5.3.2.5. Cinética de crecimiento

Se evaluó la cinética de crecimiento de las levaduras en condiciones normales (pH 7, temperatura 25 °C, sin agregado de NaCl ni de jarabe) durante 24 h. Todas las cepas presentaron la curva de crecimiento característica de un microorganismo, es decir, una primera fase de latencia, seguida de una fase exponencial, estacionaria, y, finalmente, una fase de muerte (Figura 5.8). El tiempo de duplicación varió entre un mínimo de 2,88 h y un de máximo de 5,25 h y la tasa de crecimiento entre 0,14 h<sup>-1</sup> y 0,23 h<sup>-1</sup> (Tabla 5.5).



**Figura 5.8.** Curva de crecimiento de las 10 cepas de levaduras aisladas de kéfir. Se observa una fase inicial de latencia seguida de una fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

**Tabla 5.5.** Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación de las 10 cepas de levaduras aisladas del kéfir de agua.

	LEVADURA									
	LS1	Y1	Y2	LK2	FAs	Y8	LK3	BK1	Y4	AS
<b>Tasa de crecimiento (<math>h^{-1}</math>)</b>	0,17	0,19	0,23	0,20	0,20	0,21	0,20	0,14	0,23	0,17
<b>Tiempo de duplicación (h)</b>	3,98	3,50	2,88	3,30	3,20	3,12	3,20	5,25	2,96	3,72

### 5.3.2.6. Supervivencia posterior a la liofilización

La Tabla 5.6 resume la supervivencia de las levaduras tras la liofilización. Las cepas LS1, Y1, LK2, Y8, LK3, BK1, Y4 presentaron una disminución en el número de UFC luego del proceso (Prueba t para muestras apareadas,  $p < 0,01$ ). Mientras que Y2, FAs, AS no presentaron cambios significativos en su crecimiento después de ser liofilizadas.

**Tabla 5.6.** Supervivencia al proceso de liofilización de las 10 cepas de levaduras aisladas de kéfir de agua.

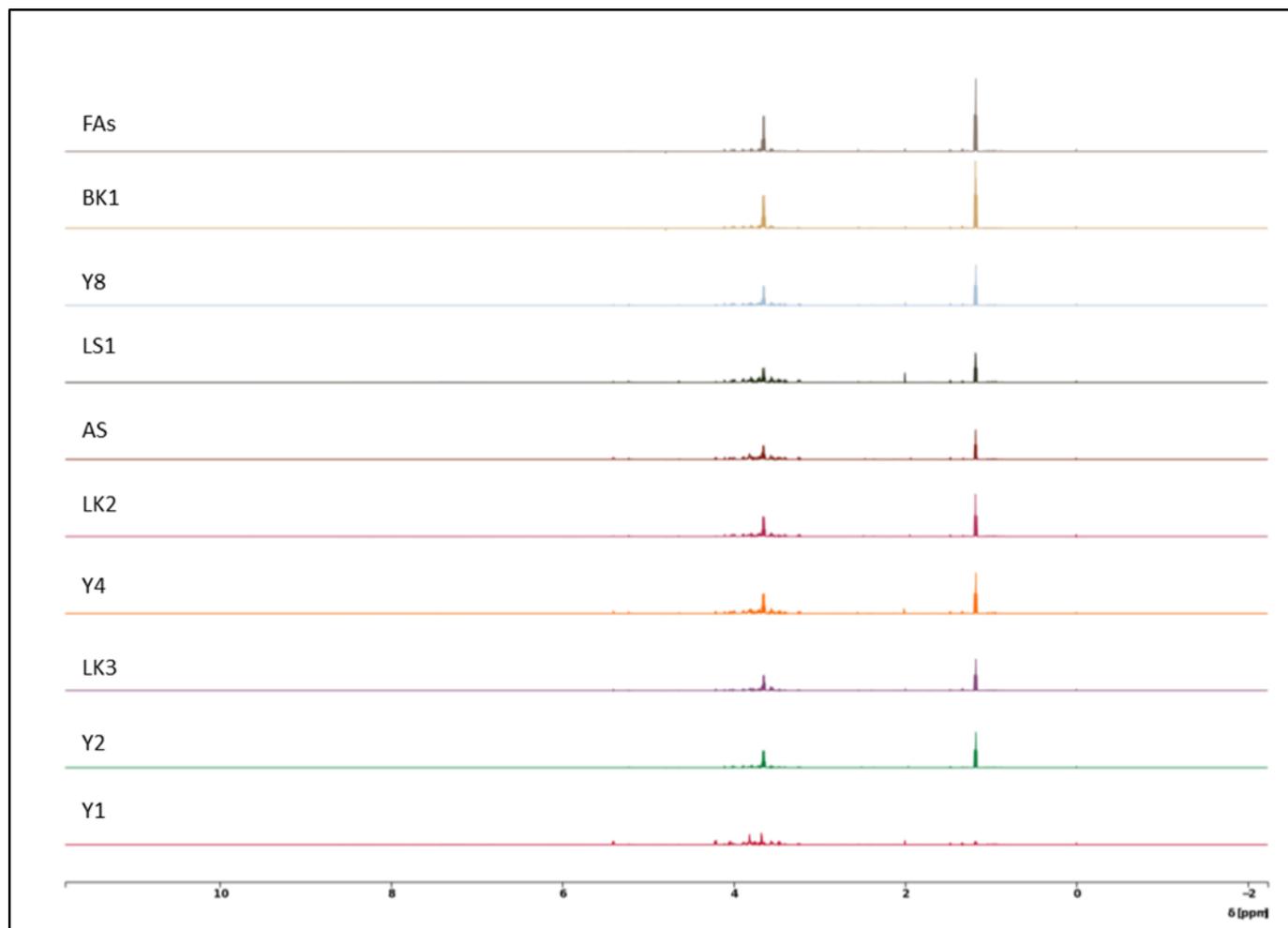
LEVADURA	Log UFC/ml antes de liofilización	Log UFC/ml después de liofilización	Reducción del Log UFC/ml
LS1	8,09 ± 0,04 <sup>+</sup>	7,34 ± 0,07 <sup>*</sup>	0,75
Y1	7,44 ± 0,05	7,11 ± 0,07	0,33
Y2	7,28 ± 0,08	7,25 ± 0,04	0,03
LK2	6,90 ± 0,03	6,38 ± 0,03	0,52
FAS	7,33 ± 0,02	7,38 ± 0,05	-0,05
Y8	7,01 ± 0,02	6,22 ± 0,07	0,79
LK3	7,41 ± 0,04	6,99 ± 0,05	0,42
BK1	7,42 ± 0,19	7,08 ± 0,04	0,34
Y4	7,56 ± 0,02	7,20 ± 0,04	0,36
AS	7,31 ± 0,07	7,32 ± 0,09	-0,02

<sup>+</sup> Cada dato es el promedio de tres repeticiones ± desvío estándar.

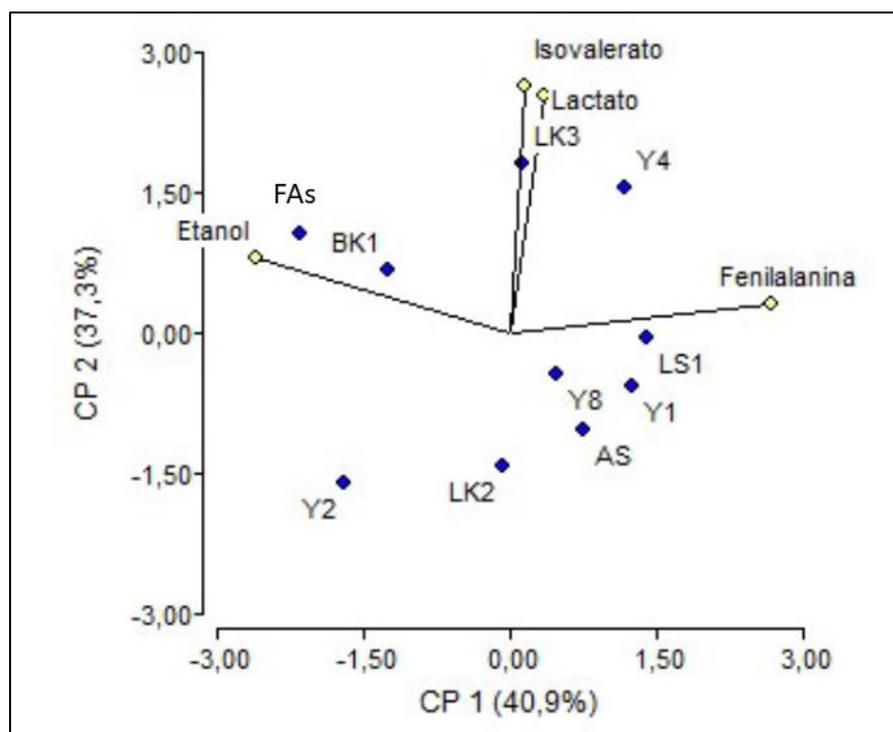
<sup>\*</sup> Los valores de la columna 'Log UFC/ml después de liofilización' se obtuvieron luego de la rehidratación hasta su volumen original.

### 5.3.3. Caracterización de los metabolitos presentes en los sobrenadantes microbianos por Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

El análisis metabolómico de los SLC de las 10 levaduras seleccionadas (Figura 5.9) permitió conocer 207 compuestos diferentes producidos por las mismas. Los metabolitos antimicrobianos identificados incluyeron etanol, isovalerato, lactato y fenilalanina. El etanol fue el compuesto más abundante, con una concentración máxima de 186,03 mM. De acuerdo con el análisis de componentes principales, se observó que cepas con mucho contenido de etanol, tuvieron bajos niveles de fenilalanina, y viceversa. La cepa BK1 fue la única capaz de producir ácido 2-hidroxiisocaproico, arabitol y prolina, mientras que solamente LS1 produjo arginina. Por su parte, los sobrenadantes de las cepas FAs y BK1 presentaron alto contenido de etanol; Y1 y LS1 gran contenido de fenilalanina. Finalmente, los sobrenadantes de las cepas Y4 y LK3 mostraron altos niveles de isovalerato y también gran contenido de lactato (Figura 5.10).



**Figura 5.9.** Espectros de los sobrenadantes libres de células de las 10 levaduras estudiadas obtenidos a través de la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.



**Figura 5.10.** Análisis de componentes principales (CP1=40,9 %, CP2=37,3 %) de los metabolitos antimicrobianos identificados por RMN en los sobrenadantes de levaduras con potencial probiótico aisladas de kéfir de agua.

#### 5.4. Discusión

Al evaluar un microorganismo para ser seleccionado como probiótico se deben tener en cuenta tanto sus propiedades funcionales como tecnológicas (Staniszewski y Kordowska-Wiater, 2021). Estas últimas son útiles a la hora de elegir un candidato e incluyen la producción de grandes cantidades de biomasa y la resistencia a procesos de conservación, como la liofilización (Libudzisz, 2002). En este capítulo de tesis se estudiaron las 10 levaduras aisladas de kéfir de agua y seleccionadas por su capacidad antimicrobiana frente a patógenos apícolas (Capítulo 3), con el fin de determinar si eran capaces de sobrevivir bajo las condiciones propias de las abejas melíferas y de las colmenas. Los aislamientos se caracterizaron genéticamente y fisiológicamente a través de pruebas *in vitro* de tolerancia a diferentes pHs (3, 5 y 6), concentraciones de NaCl (3; 6,5 y 10 %), temperaturas (10, 35 y 40 °C) y altas concentraciones de azúcar (30, 50 y 70 %).

De acuerdo con la caracterización genotípica, siete de las 10 levaduras aisladas del kéfir de agua fueron identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*. Esta es la especie de levadura más prevalente en el kéfir de agua (Laureys y De Vuyst 2014;

Syrokou *et al.*, 2019). *S. cerevisiae* es responsable de la presencia del etanol en el kéfir debido a su metabolismo de fermentación alcohólica. Esto también reduce la concentración de ácido láctico y contribuye a las características organolépticas del producto obtenido (Magalhaes *et al.*, 2010). Así mismo, una levadura fue identificada como *Saccharomyces uvarum*. A diferencia de *S. cerevisiae*, esta especie produce menos cantidad de ácido acético, mayores niveles de glicerol y ácido succínico y sintetiza ácido málico. Además, se caracteriza por una mayor capacidad de liberar compuestos aromáticos deseables (Rainieri *et al.*, 1999). Adicionalmente, se identificaron dos levaduras como *Pichia kluyveri*. Dentro de este género, *P. kluyveri* es la especie más estudiada debido a su utilización en la producción de vino. Su metabolismo permite aumentar la presencia de compuestos aromáticos como ésteres y tioles, contribuyendo al aroma del producto (Vicente *et al.*, 2021). Esta especie no ha sido reportada en el kéfir de agua, pero sí en un estudio llevado a cabo con muestras de kéfir de leche de diferentes partes del mundo (Ding *et al.*, 2022).

La mayoría de los probióticos son consumidos oralmente para alcanzar el tracto gastrointestinal. Esto implica que se deba evaluar la resistencia del potencial probiótico a las condiciones ambientales del tubo digestivo (McFarland, 2015). La simulación de la digestión en condiciones *in vitro* implica someter a los microorganismos a un medio con sales y el agregado de ácido para disminuir el pH (Saito *et al.*, 2014). La supervivencia de las cepas en el tracto gastrointestinal es fundamental para que puedan colonizar el intestino y llevar a cabo un efecto beneficioso en el hospedador (Sica, 2013). Las 10 levaduras sobrevivieron a los tres pHs a los que fueron sometidas. En términos generales, el menor crecimiento se produjo a pH 3 y presentaron buenos niveles de crecimiento a pHs 5 y 6, lo cual es importante ya que estos son los valores de acidez que se miden cuando se estudia el tubo digestivo de la abeja (Crane, 1990).

En cuanto a la tolerancia a NaCl, las cepas presentaron un menor crecimiento a medida que aumentaron los niveles de NaCl, y un 40 % de las levaduras no sobrevivió a la elevada concentración de 10 % NaCl. De manera similar a estos resultados, Diosma *et al.* (2013) identificaron cuatro especies de levaduras en el kéfir, incluyendo *S. cerevisiae*, y seleccionaron 13 cepas en base a su resistencia al bajo pH y sales biliares. Lima *et al.* (2017) obtuvieron cepas de *S. cerevisiae* del kéfir que mostraron buenas propiedades probióticas, incluyendo resistencia a las condiciones de digestión *in vitro*. La supervivencia a altas concentraciones de NaCl permitió evaluar la capacidad de las levaduras a tolerar condiciones adversas, requisito fundamental para un probiótico.

El crecimiento de las levaduras a distintas temperaturas fue evaluado y se observó que a 10 °C presentaron el menor número, con respecto al control a 25 °C.

Únicamente cinco levaduras sobrevivieron a 40 °C. Mientras que todas las cepas crecieron adecuadamente a 35 °C. La capacidad de crecer a la temperatura a la que será expuesto el microorganismo es fundamental a la hora de seleccionar un potencial probiótico. En este caso, una buena supervivencia a 35 °C es lo que se necesita ya que la levadura será incorporada al alimento de las abejas en las colmenas, y, en el interior de estas, la temperatura se mantiene constante entre los 34 y 35 °C (Crane, 1990).

Luego de la cosecha de miel, o en tiempos de escasez de alimentos, los apicultores suplementan las colonias con carbohidratos. Esto se logra alimentando con una solución de sacarosa, jarabe de alta fructosa o jarabes de frutas (Neupane y Thapa, 2005). El jarabe es consumido por las abejas y los carbohidratos son integrados al flujo de alimento de la colonia y transportado a los panales de almacenamiento (DeGrandi-Hoffmann y Hagler, 2000). Teniendo en cuenta que el probiótico podría ser incorporado al jarabe con el cual se suplementan las colmenas, se analizó la tolerancia osmótica de las levaduras seleccionadas para evaluar si podían resistir una alta concentración de azúcares. Las cepas presentaron el mismo crecimiento en el medio sin agregado de azúcar y con una concentración del 30 %. Si bien su número disminuyó a concentraciones mayores de jarabe (50 y 70 %), esto no es una limitación ya que los jarabes utilizados como sustitutos no superan el 66 % de azúcares (Moja *et al.*, 2022).

Las 10 cepas de levaduras presentaron un buen crecimiento en medio HyL y la fase exponencial se extendió entre las 5 y 12 h de crecimiento. De manera similar, Ortiz *et al.* (2008) evaluaron la cinética de dos cepas de *S. cerevisiae* y obtuvieron la mayor producción de biomasa durante las primeras 8 h, seguida de una fase de desaceleración. Los recuentos de UFC alcanzados por todas las cepas fueron adecuados ya que un mínimo de  $10^6$  UFC/ml es el que deben alcanzar para ser utilizadas como probióticos (White y Hekmat, 2018). Debido a que la viabilidad del microorganismo es clave para ejercer beneficios para la salud, algunos investigadores sugieren aumentar esta dosis a niveles de  $10^7$  UFC/ml (Staniszewski y Kordowska-Wiater, 2021).

En cuanto al proceso de liofilización, en esta tesis todas las levaduras sobrevivieron, pero sólo tres aislamientos no presentaron una disminución en el número luego del proceso. De manera similar, Bolla *et al.* (2011) utilizaron leche ultrapasteurizada como crioprotector durante la liofilización y obtuvieron altos valores de supervivencia de bacterias y levaduras aisladas del kéfir. Estos resultados demuestran que la liofilización es un método adecuado para preservar levaduras ya que no altera sus propiedades y las mismas se pueden rehidratar y recuperar fácilmente. El uso de crioprotectores, como azúcares o proteínas de la leche, permite minimizar o evitar daños

en las células, ya que previenen la formación de cristales de hielo (Alvarado, 1979).

Uno de los principales mecanismos de acción de los probióticos es producir sustancias antimicrobianas (Pais *et al.*, 2020). Doscientos siete compuestos diferentes fueron producidos por las 10 levaduras aisladas y estudiadas en esta tesis. Es interesante destacar que ciertos compuestos fueron producidos por dos cepas únicamente. Estos casos se describen a continuación.

La cepa *Pichia kluyveri* (BK1) fue la única en producir ácido 2-hidroxiisocaproico, arabitol y prolina. El ácido 2-hidroxiisocaproico es un metabolito del aminoácido leucina con actividad fungicida (Sakko *et al.*, 2013). También inhibe la formación de *biofilms* producidos por microorganismos. Esto ha sido reportado por Leska *et al.* (2022) quienes estudiaron la capacidad de adhesión de bacterias lácticas y la eliminación de *biofilms* de patógenos que afectan a las abejas melíferas. Este ácido inhibió la formación de biopelículas, lo cual puede contribuir a aumentar la viabilidad de las colonias y mejorar las condiciones en los apiarios. Por su parte, el arabitol es uno de los componentes del néctar de algunas especies de plantas, por ejemplo, del cerezo, el cual es particularmente atractivo para las abejas. En su composición, los azúcares más abundantes son la fructosa, glucosa y sacarosa. Mientras que arabinosa, ramnosa, maltosa y alcoholes como glicerol, manitol y arabitol se encuentran en menores cantidades (Akšić *et al.*, 2020). Por último, la prolina es una fuente de energía para la síntesis de proteínas en los invertebrados (Osanai y Yonezawa, 1986). Este aminoácido cumple un rol importante en el metabolismo del vuelo en los insectos (Bursell *et al.*, 1974) y se ha reportado que una alta concentración de L-prolina en el pan de polen tiene un efecto fagoestimulante en la dieta de las abejas (Degrandi-Hoffman *et al.*, 2013). Darvishzadeh *et al.* (2015) determinaron la potencialidad del uso de L-prolina en la alimentación de las abejas obreras en condiciones de laboratorio para el desarrollo de las glándulas hipofaríngeas. Sus resultados demostraron que L-prolina aumentó el diámetro de los acinos de las mencionadas glándulas y el consumo de jarabe por parte de las abejas. En otro estudio, Noor-ul-Ane y Jung (2022) evaluaron el rol de la prolina, ácido glutámico y sorbitol en la cría *in vitro* de las abejas. La suplementación con prolina ayudó al rápido desarrollo de las larvas y pupas, y también aumentó el peso de las pupas y abejas adultas alimentadas con las dietas suplementadas con este aminoácido.

Únicamente la cepa *Saccharomyces cerevisiae* (LS1) produjo arginina. Este compuesto es importante, por un lado, desde el punto de vista de su producción por parte de las levaduras ya que se ha reportado que la arginina ejerce un efecto crioprotector sobre las células de estas. Es almacenado en las vacuolas, lo cual sugiere que esta acumulación sería importante en la resistencia de las células de levaduras

frente a la congelación (Morita *et al.*, 2002). Por otro lado, desde la perspectiva de las abejas, es importante ya que L-arginina es el precursor del óxido nítrico. Este ácido, junto con el ácido abscísico, cumple funciones en la defensa de las abejas. Se ha demostrado que la suplementación *in vitro* de la dieta de larvas de abejas con L-arginina mejora la activación del sistema inmune de los granulocitos en respuesta a heridas causadas por patógenos. Si un patógeno traspasa las barreras físicas y químicas, las abejas melíferas pueden protegerse de la infección con respuestas inmunitarias celulares y humorales que representan una segunda línea de defensa (Negri *et al.*, 2013; Negri *et al.*, 2017).

La producción de compuestos antimicrobianos, así como la actividad inhibitoria sobre patógenos y la supervivencia a diferentes pruebas de tolerancia *in vitro*, convierte a las levaduras evaluadas en excelentes candidatos a ser utilizados como probióticos. En base a los resultados obtenidos en el laboratorio se seleccionaron tres cepas (FAs, Y8, y LK3) con potencial para ser utilizadas como probióticos en el suplemento nutricional destinado a la alimentación de las abejas (Capítulo 6).

## Conclusiones

- A partir de la caracterización genotípica, las levaduras aisladas del kéfir de agua fueron identificadas como pertenecientes a los géneros *Saccharomyces* y *Pichia*.
- Las 10 cepas de levaduras sobrevivieron a las pruebas *in vitro* a las que fueron sometidas: tolerancia a pH ácido, resistencia a altas concentraciones de NaCl, crecimiento a distintas temperaturas y tolerancia osmótica.
- Las 10 cepas de levaduras presentaron una adecuada cinética de crecimiento y supervivencia posterior a la liofilización, propiedades importantes para un probiótico.
- Mediante Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H (<sup>1</sup>H-RMN), en los sobrenadantes libres de células de las levaduras se detectaron un total de 207 compuestos diferentes.
- En los sobrenadantes de las levaduras se identificaron los compuestos antimicrobianos etanol, isovalerato, lactato y fenilalanina. El etanol fue el metabolito más abundante presente en los sobrenadantes de las levaduras.

- Las cepas de levaduras FAs, Y8, y LK3 fueron seleccionadas como potenciales probióticos para ser incorporados al suplemento nutricional destinado a las abejas en los ensayos de campo que se describirán en el Capítulo 6.

## **Capítulo 6: Evaluación a campo de un producto nutricional elaborado con microorganismos probióticos aislados de kéfir de agua**

### **6.1. Introducción**

Las abejas melíferas (*Apis mellifera*) requieren en gran medida de diversos recursos florales para nutrirse. En circunstancias naturales, estos les proveen de macronutrientes, es decir, proteínas, carbohidratos y ácidos grasos, y micronutrientes como vitaminas y minerales, que les permiten satisfacer sus requerimientos nutricionales. Una nutrición deficiente puede provocar que las abejas sean más susceptibles a factores como la toxicidad de los pesticidas y el ataque de patógenos (Di Pasquale *et al.*, 2013). En las últimas décadas, las abejas, los insectos polinizadores más importantes, han sufrido una gran disminución en su población a nivel mundial debido a la falta de nutrientes provocada por la pérdida de hábitats (Goulson *et al.*, 2015).

La pérdida de hábitats, consecuencia principal de los monocultivos, redujo drásticamente la diversidad vegetal en todo el mundo, lo que se traduce en que las abejas disponen de menos fuentes de polen para su sustento y, por lo tanto, consumen una menor variedad de nutrientes (Banerjee *et al.*, 2018). Adicionalmente, una gran cantidad de enfermedades causadas por parásitos y patógenos pueden impactar en la supervivencia de las abejas. Desde el punto de vista microbiológico, los principales organismos implicados en la pérdida de las colonias incluyen a bacterias (*Paenibacillus larvae*, *Melissococcus plutonius*), hongos (*Ascosphaera apis*, *Nosema ceranae*) y virus (Hristov *et al.*, 2020).

El uso indiscriminado de antibióticos en apicultura para el control de patógenos puede llevar a la aparición de organismos resistentes, así como contaminar la miel y otros productos apícolas. Además, afecta el metabolismo y la inmunidad de las abejas y puede tener efectos negativos en su microbiota. Todo esto influye en el estado general de la colonia, ya que los microorganismos de las abejas sanas son fundamentales para la regulación del sistema inmune, el crecimiento y el desarrollo (Harriet *et al.*, 2017). Es por ello que asegurar una correcta nutrición es fundamental para lograr una apicultura sustentable. En este contexto, es necesario recurrir a alternativas naturales para controlar enfermedades. Entre ellas, se puede mencionar el uso de aceites esenciales (Albo *et al.*, 2016), fitomoléculas como ácido abscísico (Szawarski *et al.*, 2019), ácido indolacético y ácido giberélico, metabolitos secundarios de ácidos (Szawarski *et al.*, 2020), prebióticos como eugenol, quitosano y naringenina (Klassen *et al.*, 2021) y la

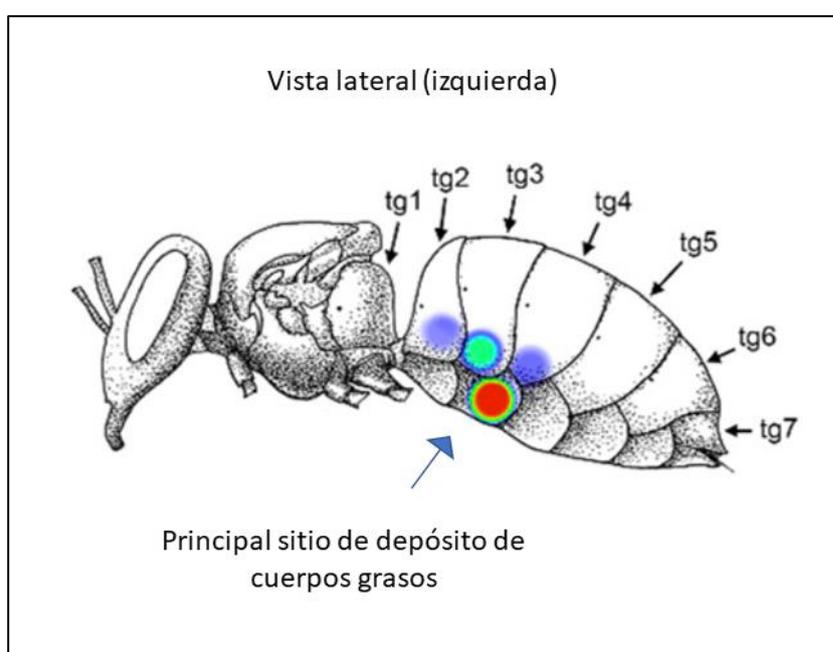
suplementación con probióticos (Daisley, 2021). Los probióticos representan un complemento o alternativa a los antibióticos que pueden ser aplicados en las colonias para prevenir y controlar enfermedades (Maruščáková *et al.*, 2020).

Los probióticos se obtienen, en la mayoría de los casos, del intestino de las abejas, del polen fresco, del pan de polen y de las larvas de abejas (Dietemann *et al.*, 2012; Lamei *et al.*, 2020). Sin embargo, existen otras fuentes innovadoras que pueden ser estudiadas. Entre ellas, el kéfir representa una opción natural del cual pueden aislarse potenciales cepas probióticas (Nejati *et al.*, 2020) que podrían ser utilizadas como una estrategia en apicultura. Si bien la nutrición artificial de colmenas es tema de estudio a nivel mundial y en Argentina existen antecedentes en el estudio de probióticos en apicultura (Audisio y Benitez-Ahrendts, 2011; Audisio *et al.*, 2012; Audisio, 2016), los suplementos para abejas en el mercado interno argentino no incorporan microorganismos. Por otro lado, existen suplementos nutricionales con probióticos aislados de kéfir de agua en producción animal pero no en nuestro país. Por ejemplo, en España se utiliza comercialmente el kéfir y productos derivados del mismo para alimentación en ganadería (<https://www.aspenat.es/caribou/>).

La aceptación o preferencia de las abejas por un tipo de alimento es una variable que indica la propiedad de este de ser agradable al gusto de un individuo. Es decir, es la medida en la que un alimento es sabroso o atractivo para ser consumido (Solá-Oriol *et al.*, 2012). Los insectos reconocen el alimento a través de una combinación de respuestas conductuales, mecanismos sensoriales y la percepción de olores. Su sistema sensorial se basa en señales visuales, olfativas y gustativas (Borkakati *et al.*, 2019). Se ha establecido que las abejas melíferas muestran una preferencia por las fuentes de polen ricas tanto en proteínas como en lípidos. También considerarían el valor nutricional al elegir el alimento (Ghosh *et al.*, 2020).

La administración del producto nutricional a las abejas en las colmenas permite evaluar la eficacia del suplemento contra patógenos y el impacto en la fortaleza de las colonias. Esto se logra mediante el registro de variables como el peso promedio de las abejas, número de celdas del panal con cría y abejas adultas, larvas con síntomas de enfermedad y la cantidad de miel y polen en la colmena. También, se pueden analizar las variables nutricionales de cuerpos grasos y contenido lipídico, dos parámetros asociados con el estatus nutricional de las abejas individuales (Ament *et al.*, 2011). Los cuerpos grasos (Figura 6.1.) son el principal sitio de depósito de lípidos y de proteínas, almacenan nutrientes y es donde se sintetizan proteínas como la vitelogenina y distintos péptidos antimicrobianos (Ament *et al.*, 2011; Wilson-Rich *et al.*, 2008). La vitelogenina está implicada en la organización social de las abejas y en la resistencia al estrés

oxidativo (Wheeler y Kawooya, 1990). Los péptidos antimicrobianos son un componente esencial en la inmunidad innata de los insectos, protegiéndolos de la invasión frente a patógenos. Entre ellos se destacan apidaecina, abaecina, defensina e himenoptaecina (Casteels *et al.*, 1993). Los probióticos ayudan a aumentar la expresión de los genes y el nivel de transcripción de los mencionados péptidos antimicrobianos (Smriti *et al.*, 2024). La dosis, el tiempo, la duración de la administración y el número de cepas probióticas pueden influir en la eficacia de los tratamientos. En este sentido, es necesario contar con guías y protocolos para estandarizar el uso de probióticos en apicultura (Alberoni *et al.*, 2016; Chmiel *et al.*, 2021).



**Figura 6.1.** Esquema del cuerpo de una abeja donde se visualizan los cuerpos grasos. La parte inferior del metasoma (región abdominal) de la abeja adulta es el área donde predomina el tejido corporal graso, justo debajo de la cutícula. tg1 a 7: tergitos. (Tomado de Ramsey *et al.*, 2019)

Para finalizar esta tesis se desarrolló un suplemento nutricional incorporando los microorganismos con potencial probiótico evaluados y seleccionados durante los ensayos realizados en el laboratorio (Capítulos 3, 4 y 5). El objetivo fue alimentar a las abejas con este suplemento probiótico y evaluar su preferencia a través de ensayos a campo para contribuir a mitigar los actuales problemas nutricionales de la colonia.

## Objetivos específicos

1. Desarrollar un suplemento nutricional con un probiótico para ser administrado a las abejas en las colmenas.
2. Determinar la preferencia del nuevo suplemento formulado a través de ensayos a campo.
3. Analizar la condición nutricional de abejas y de pupas alimentadas con suplementos modificados mediante la incorporación de un microorganismo probiótico.

## 6.2. Materiales y Métodos

### 6.2.1. Descripción de los microorganismos probióticos seleccionados

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de actividad inhibitoria *in vitro* frente a los patógenos *P. larvae* y *A. apis* (Capítulo 3) y a las pruebas de evaluación del potencial probiótico (Capítulos 4 y 5), se seleccionaron dos microorganismos para ser incorporados en el suplemento alimenticio.

De todas las bacterias anaerobias, se eligió a *Lacticaseibacillus paracasei* (B2). Ésta es una bacteria Gram positiva, catalasa-negativa, oxidasa-negativa, no reductora de nitrato, fermentadora de glucosa sin producción de CO<sub>2</sub> y capaz de fermentar lactosa. En el ensayo de difusión por pozo en agar presentó la mayor actividad inhibitoria sobre *P. larvae*. No resultó tóxica para las larvas cuando fue incorporada a su dieta en el ensayo de cría de larvas en el laboratorio. Respecto a las pruebas probióticas, sobrevivió a todas las condiciones de estrés a las que fue sometida, es decir, distintos pH, concentración de NaCl y osmolaridad. Creció a 10 °C y a 25 °C, pero no lo hizo a 40 °C. Finalmente, en el SLC, se detectó una alta concentración del metabolito antimicrobiano acetato, como también de fenilalanina, N-Carbamoil-β-alanina y acetoína.

Entre las levaduras evaluadas se seleccionó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* (FAs). Es catalasa y oxidasa positiva, no reductora de nitrato y no fermentadora de lactosa. En el ensayo de difusión por pozo en agar, tuvo un fuerte efecto inhibitorio sobre *P. larvae* y presentó buena inhibición frente a *A. apis*. El sobrenadante incorporado a la dieta de las larvas no resultó tóxico en ensayos de laboratorio. De todas las cepas, mostró las mejores propiedades probióticas, es decir, mayor supervivencia frente a las condiciones a los que fueron expuestas (acidez, altas concentraciones de NaCl, diferentes temperaturas y alta presión osmótica). El SLC presentó un alto contenido de etanol y de otros compuestos antimicrobianos como isovalerato, lactato y fenilalanina.

## 6.2.2. Preparación del suplemento con un probiótico en el laboratorio

La bacteria se hizo crecer en caldo MRS en condiciones de anaerobiosis a 35 °C y la levadura se cultivó en medio HyL en aerobiosis a 25 °C, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento ( $D.O_{600}= 0,2$  a  $0,9$  para la bacteria,  $D.O_{600}= 0,1$  a  $0,4$  para la levadura). Además, se prepararon SLC de cada microorganismo. Para ello, los cultivos puros de 24 h se centrifugaron a 15.000 rpm por 10 min (Hanil modelo combo 514R) y los sobrenadantes obtenidos se filtraron dos veces con un filtro cuyo tamaño de poro fue de  $0,22 \mu\text{m}$  (Sartorius).

El suplemento nutricional se preparó a partir de uno comercial de una cooperativa apícola de Argentina (torta), el cual es un sustituto de polen que posee un alto y balanceado contenido de lípidos y de proteínas. Se trabajó con cuatro grupos y/o tratamientos:

1. **Grupo control (J1):** torta estándar (170 g),
2. **Grupo vehículo (J2):** torta estándar con el agregado de 35 ml de medio de cultivo MRS/HyL estéril,
3. **Grupo sobrenadante (J3):** torta estándar con el agregado de 35 ml del sobrenadante libre de células del potencial probiótico,
4. **Grupo probiótico (J4):** torta estándar con el agregado de 35 ml del cultivo líquido del potencial probiótico.

Para la preparación de los suplementos, las tortas comerciales se colocaron en un recipiente, se mezclaron y se amasó hasta lograr una consistencia homogénea. Luego, esta masa se separó en cuatro recipientes, uno por tratamiento, y a cada uno de ellos (excepto al control J1) se incorporó el medio de cultivo (J2), sobrenadante (J3) o cultivo microbiano (J4), según correspondiera. Finalmente, quedaron tortas de 170 g cada una y se colocaron entre dos hojas de papel manteca (30 cm x 45 cm) (Figura 6.2).



**Figura 6.2.** Suplemento nutricional para alimentar abejas preparado a partir de uno comercial.

### **6.2.3. Ensayos de preferencia a campo en las colmenas**

Se realizaron dos ensayos de preferencia a campo en las colmenas del apiario experimental del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (Bahía Blanca, Argentina). El primero se llevó adelante en el mes de octubre de 2023 con el agregado de la cepa de la bacteria elegida como potencial probiótico (B2) en los tratamientos correspondientes. En el mes de noviembre del mismo año, se realizó el segundo ensayo en el cual se estudió la preferencia trabajando con la cepa de levadura seleccionada (FAs).

Se trabajó con 10 colmenas Langstroth con cuatro cuadros de cría y dos de miel. Siete colmenas fueron alimentadas una vez por semana, durante cuatro semanas (cuatro bloques) con cada uno de los grupos de suplemento nutricional descriptos en el punto 6.2.2. Estas tortas se colocaron encima de los cabezales de los cuadros de la cámara de cría. Cada semana, al retirar las tortas de un bloque y comenzar el siguiente, el orden de las tortas sobre los cuadros se modificó, girando en el sentido de las agujas del reloj (Figura 6.3). Tres colmenas sirvieron como control, por lo cual no fueron suplementadas con ningún tratamiento alimenticio.



**Figura 6.3.** Colmena del ensayo de preferencia con las tortas de los cuatro grupos/tratamientos: Grupo control (J1), Grupo vehículo (J2), Grupo sobrenadante (J3) y Grupo probiótico (J4). La flecha azul indica el cambio de ubicación, en sentido de las agujas del reloj, de los tratamientos cada semana.

Con el objetivo de evaluar la preferencia de las abejas por cada uno de los tratamientos se realizó un registro del consumo de los suplementos (Figura 6.4). Para ello, a los dos y cuatro días de iniciado el ensayo, se pesaron las tortas de las colmenas utilizando una balanza (Kern EMB 2000-2) y se colocaron nuevamente en las colmenas. Al finalizar cada bloque del ensayo, luego de siete días, las tortas remanentes se retiraron y se pesaron para evaluar cuál de los tratamientos había sido más consumido por las abejas. Adicionalmente, se recolectaron abejas adultas y abejas a punto de emerger, el primer y el último día del ensayo, luego de un mes, para analizar las variables de cuerpos grasos en abejas adultas y contenido lipídico en pupas.



**Figura 6.4.** Evaluación del consumo de los suplementos nutricionales en la colmena: registro del peso de las tortas en una balanza luego de siete días.

#### **6.2.4. Evaluación de la condición nutricional de abejas adultas y pupas**

##### **6.2.4.1. Abejas adultas**

La medición de los cuerpos grasos en abejas adultas se analizó según Wilson Rich *et al.* (2008) y De Piano *et al.* (2020) con modificaciones. Se trabajó con un *pool* de 25 abejas adultas, se seccionaron sus abdómenes y se los dejó secar a temperatura constante de 35 °C durante tres días. Al tercer día, se pesó el conjunto de los 25 abdómenes y se registró el peso exacto. Luego, se hizo un lavado en éter etílico en un volumen aproximado de entre 5 y 10 ml, de modo que el éter cubriera completamente los abdómenes, durante 24 h para disolver la grasa. Se transfirieron a nuevos tubos limpios y se los dejó secar nuevamente a 35 °C durante tres días. Posteriormente, se registró nuevamente el peso exacto. La grasa corporal se calculó como el porcentaje de cambio en el peso abdominal después del lavado con éter etílico y/o como el cambio en el peso abdominal (diferencia) después del lavado con éter.

##### **6.2.4.2. Pupas de abejas**

Al inicio y al final del ensayo, se recolectaron aproximadamente 25 pupas de abejas obreras en estado ojo violeta (próximas a emerger) y se las conservó en freezer

a -20 °C. Se trabajó con cinco pupas elegidas al azar por colmena, se las colocó en placas de Petri y se las llevó a estufa a 60 °C por 24 h. A continuación, se colocaron las placas con las pupas deshidratadas en un desecador y se registró el peso seco de cada pupa (peso pre-Goldfish) individualmente y se colocó cada una en un sobre de papel de filtro. Los mismos se introdujeron en un equipo Goldfish con el fin de determinar el contenido graso, utilizando hexano como solvente de extracción por 6 h. Se retiraron los sobres y se llevaron nuevamente a estufa a 60 °C por 24 h. Finalmente, se registró el peso seco de cada pupa (peso post-Goldfish) y se comparó con el inicial. A continuación, se calculó el porcentaje de lípidos con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ lípidos} = (\text{peso pre-Goldfish} - \text{peso post-Goldfish}) / \text{peso pre-Goldfish}$$

#### **6.2.5. Supervivencia del microorganismo probiótico en el suplemento nutricional desarrollado**

Con el objetivo de conocer el número de UFC de cada microorganismo en el grupo J4, el día del inicio del bloque/semana se realizó el recuento de UFC en placa. Para esto, 1 g de torta se homogeneizó en 9 ml de agua peptonada estéril, se prepararon diluciones decimales y se sembraron 100 µl por diseminación en superficie en medio MRS (bacteria) y medio HyL (levadura). Las placas se incubaron a 35 °C en anaerobiosis para la bacteria y a 25 °C en aerobiosis en el caso de la levadura. De la misma manera, luego de siete días en las colmenas, en cada bloque, se realizó el recuento en placa de UFC de las tortas J4 de dos colmenas al azar, para conocer si el microorganismo había sobrevivido en el suplemento y en la colmena. Estos recuentos se repitieron cuatro veces: el día 1 de cada bloque (inicio de semana) y luego de los siete días en los cuales las tortas J4 estuvieron en condiciones de campo.

#### **6.2.6. Análisis estadístico**

Para analizar los datos de los ensayos de preferencia se aplicaron modelos mixtos generalizados, ya que no siguieron una distribución normal ni presentaron homocedasticidad. Luego, se compararon los modelos estimados y se eligió el que mejor ajuste presentó de acuerdo con la prueba de criterio de información de Akaike (AIC). Para los análisis de supervivencia de los probióticos y las variables medidas en abejas, se realizó la prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales. Se comparó el logaritmo de UFC al inicio y al final del ensayo (análisis de supervivencia) y

el contenido lipídico en abejas adultas y pupas al inicio y al final del ensayo (variables en abejas). Para los análisis previamente descritos, se utilizó el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2008) y SPSS.

### **6.3. Resultados**

#### **6.3.1. Evaluación de la preferencia de las abejas por los tratamientos**

##### **6.3.1.1. Ensayo con la bacteria probiótica**

Luego de siete días, en cada bloque, se comparó el consumo promedio de cada uno de los cuatro tipos de tratamientos/tortas. De acuerdo con la exploración de modelos estimados, el modelo que mejor ajuste presentó fue cuando la heterocedasticidad se debió a las colmenas. El tratamiento J2 (medio de cultivo) presentó diferencias estadísticamente significativas (Prueba LSD Fisher,  $p < 0,05$ ) respecto a los otros tratamientos, siendo el suplemento menos consumido por parte de las abejas.

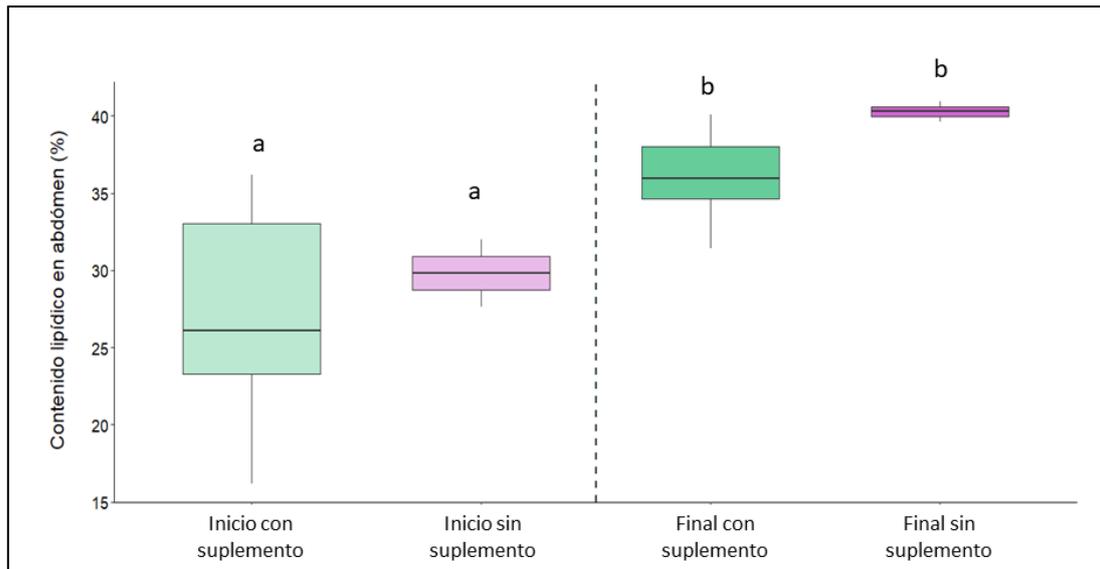
##### **6.3.1.2. Ensayo con la levadura probiótica**

Luego de siete días, en cada bloque, se comparó el consumo promedio de cada uno de los cuatro tipos de tratamientos/tortas. De acuerdo con la exploración de modelos estimados, el modelo que mejor ajuste presentó fue cuando la heterocedasticidad se debió a las colmenas. El tratamiento J1 (control) presentó diferencias estadísticamente significativas (Prueba LSD Fisher,  $p < 0,05$ ) respecto a los otros tratamientos, siendo el suplemento más consumido por parte de las abejas.

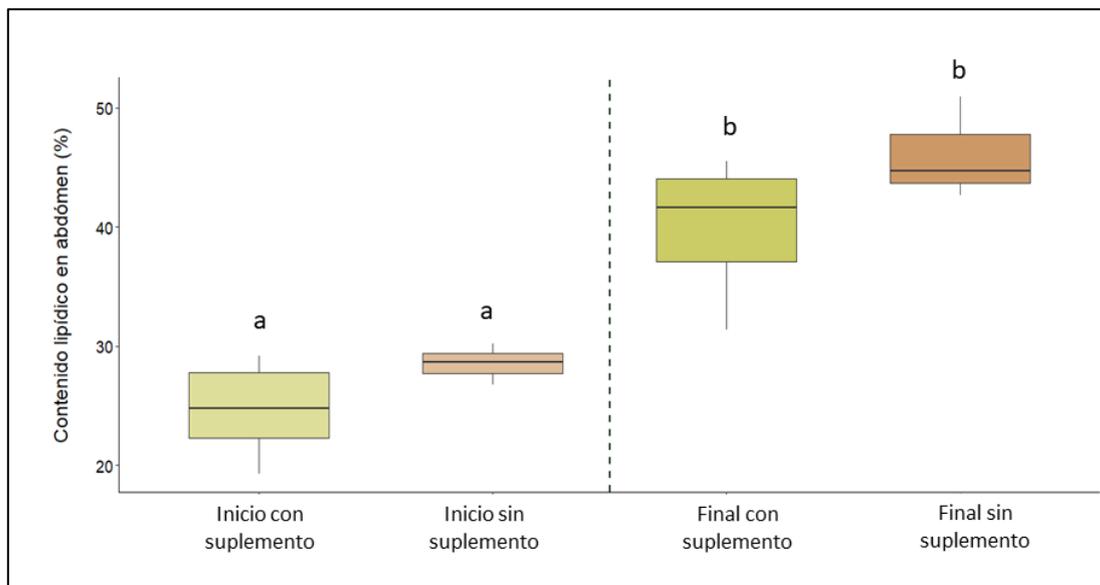
#### **6.3.2. Evaluación de la condición nutricional de abejas y de pupas**

##### **6.3.2.1. Abejas adultas**

En ambos ensayos de preferencia se registró un aumento estadísticamente significativo en la determinación de los cuerpos grasos en las abejas que consumieron los cuatro tratamientos evaluados, entre el inicio del ensayo y luego de un mes. Sin embargo, cuando se analizaron los resultados de las colmenas control, es decir aquellas abejas que no consumieron ningún suplemento, también hubo un aumento en sus cuerpos grasos luego del mes que se realizó el ensayo (Figuras 6.5 y 6.6).



**Figura 6.5.** Ensayo de preferencia con una bacteria probiótica: contenido lipídico en abdomen de abejas adultas determinado al inicio y al final del ensayo. Los resultados están expresados como la media del porcentaje del contenido lipídico. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

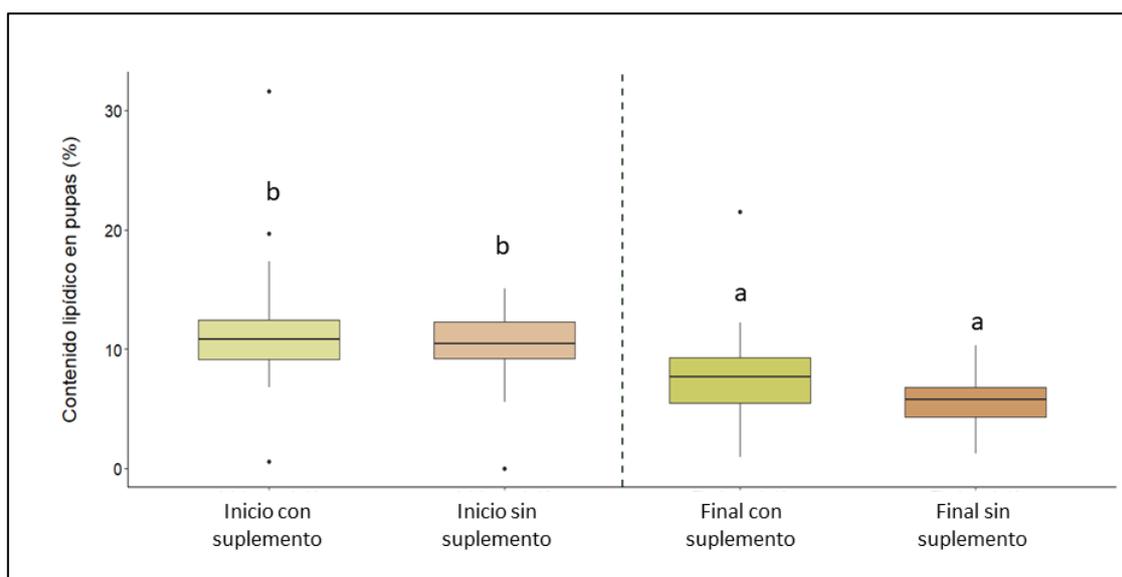


**Figura 6.6.** Ensayo de preferencia con una levadura probiótica: contenido lipídico en abdomen de abejas adultas determinado al inicio y al final del ensayo. Los resultados están expresados como la media del porcentaje del contenido lipídico. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

### 6.3.2.2. Pupas de abejas

En el ensayo de preferencia que incluyó la bacteria probiótica (J4), no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la determinación del contenido lipídico en las pupas entre el inicio del ensayo y luego de un mes de consumir las tortas. Debido a un problema durante la recolección de pupas en las colmenas control, no se pudo comparar el contenido lipídico con pupas cuyas abejas no habían consumido ninguno de los tratamientos.

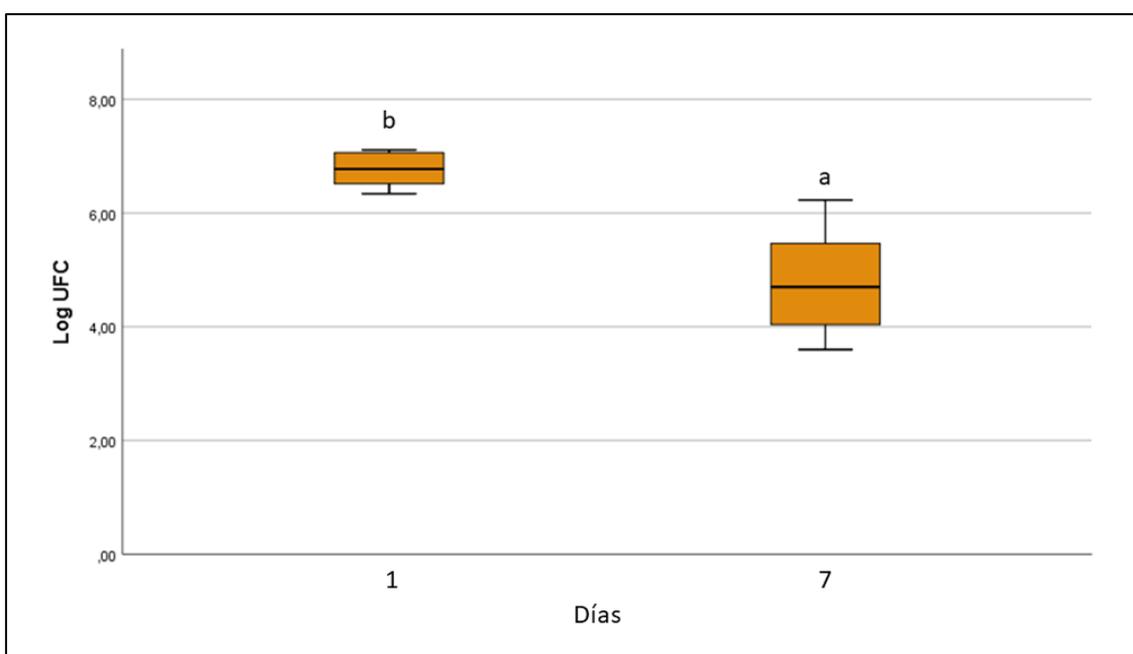
Por su parte, en el segundo ensayo de preferencia, donde se incluyó un tratamiento con una levadura probiótica (J4), se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre las pupas de abejas de las colmenas tratadas, entre el inicio y el final del ensayo. Se registró un menor contenido lipídico en las pupas que consumieron los cuatro tratamientos evaluados (tortas) durante un mes. Sin embargo, este descenso en el contenido lipídico también se registró en las pupas de las colmenas control (Figura 6.7).



**Figura 6.7.** Ensayo de preferencia con una levadura probiótica: contenido lipídico en pupas de abejas determinado al inicio y al final del ensayo. Los resultados están expresados como la media del porcentaje del contenido lipídico. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

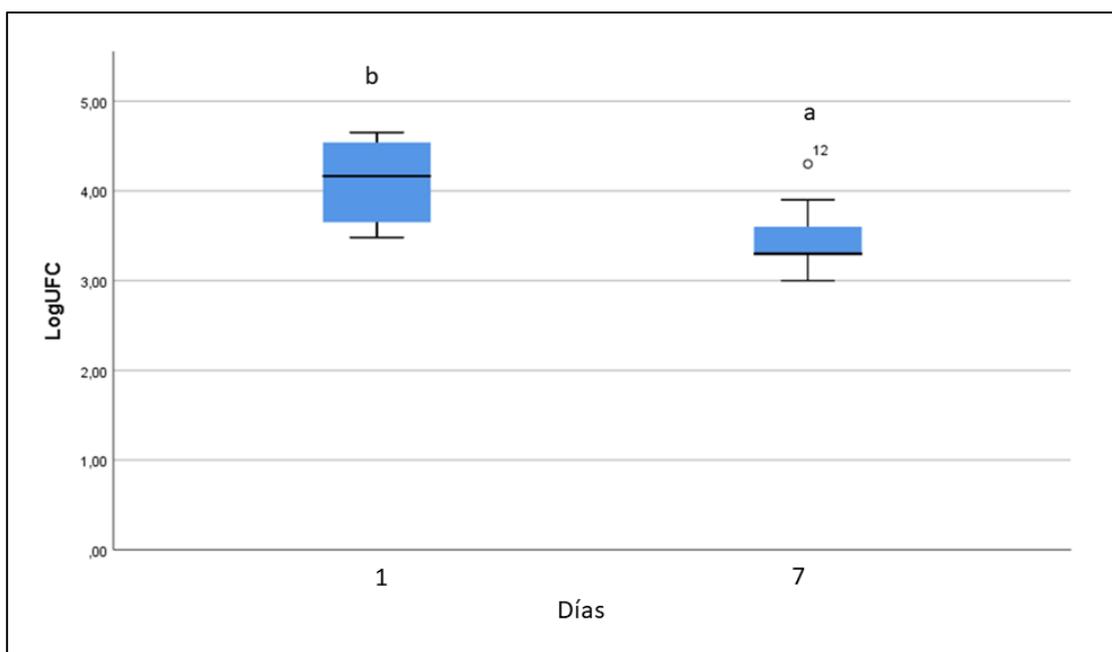
### 6.3.3. Supervivencia del microorganismo probiótico en el suplemento nutricional desarrollado

Para el caso de la bacteria probiótica, se realizó el promedio de los 4 bloques, cada uno de 7 días de duración, y se comparó el número promedio de UFC en el suplemento con el cultivo bacteriano el día del inicio del bloque (cada semana) y después de haber estado una semana en la colmena. Se observó que hubo una disminución en el número de UFC ( $p < 0,01$ ) de la bacteria en el suplemento luego de siete días. El promedio del logaritmo de UFC disminuyó de  $6,76 \pm 0,29$  a  $4,69 \pm 0,93$  (Figura 6.8).



**Figura 6.8.** Supervivencia de la cepa bacteriana B2 al inicio del ensayo (día 1) y después de siete días en la colmena. Los resultados están expresados como la media del log de UFC. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

De igual manera, cuando se trabajó con la levadura probiótica, se promedió el número de UFC del cultivo de la levadura de los 4 bloques. Luego, se comparó el número promedio de UFC en el suplemento con el cultivo el día del inicio del bloque (cada semana) y después de haber estado una semana en la colmena. Se registró un menor número de UFC ( $p < 0,05$ ) de la levadura en el suplemento comparado con el recuento inicial. El promedio del logaritmo de UFC disminuyó de  $4,10 \pm 0,49$  a  $3,48 \pm 0,44$  (Figura 6.9).



**Figura 6.9.** Supervivencia de la cepa de la levadura FAs al inicio del ensayo (día 1) y después de siete días en la colmena. Los resultados están expresados como la media del log de UFC. Letras iguales indican que no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

#### 6.3.3.1. Comparación de la supervivencia de los microorganismos probióticos

Se comparó el promedio de la reducción del número de UFC entre la bacteria y la levadura, luego de siete días en las colmenas para los 4 bloques del ensayo. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre las medias. Es decir, los dos microorganismos presentaron la misma capacidad de supervivencia en el suplemento en las condiciones de la colmena durante una semana.

### 6.4. Discusión

En esta tesis se formuló un nuevo suplemento nutricional para abejas con el agregado de un microorganismo previamente evaluado y seleccionado como potencial probiótico. Se incorporó una cepa de bacteria y una de levadura, de manera individual, para obtener un suplemento alimenticio con potencial probiótico, evaluar su preferencia, y determinar la condición nutricional de las abejas que lo consumieron.

En los dos ensayos a campo en colmenas se evaluó la aceptación y/o preferencia de las abejas por uno de los cuatro suplementos formulados. Cuando se incorporó la bacteria al suplemento, los resultados respecto a la preferencia

demonstraron que no hubo diferencias significativas entre la palatabilidad del control, sin agregado de probiótico (J1), y la del suplemento modificado por el agregado del probiótico, tanto en la forma de sobrenadante (J3) como de cultivo de células (J4). Esto implicaría una buena aceptación por parte de las abejas del suplemento que incluye un microorganismo probiótico. Respecto al ensayo con la levadura, en este caso, se observó un mayor consumo del suplemento control (J1). Sin embargo, el consumo de los otros suplementos modificados (J2, J3 y J4) no difirieron estadísticamente entre sí. Esto demostraría que tanto un sobrenadante (J3) así como un cultivo de levadura (J4), podrían ser incorporados al suplemento para las abejas porque fueron consumidos indistintamente.

En los ensayos a campo realizados tanto con la bacteria como con la levadura probiótica se registró un aumento en el porcentaje de cuerpos grasos luego de cuatro semanas en las abejas adultas que consumieron el suplemento nutricional probiótico. Sin embargo, este aumento también se observó en las abejas de las colmenas control, es decir, aquellas abejas que no consumieron ningún tipo de suplemento. Esto indicaría que el aumento de grasa corporal detectado al final del ensayo no fue consecuencia del consumo de los distintos tratamientos evaluados. Por su parte, al evaluar el contenido lipídico en pupas, en el ensayo de preferencia que incluyó un tratamiento con una levadura probiótica se observó un menor porcentaje de contenido lipídico en las colmenas del ensayo, así como en las colmenas control. Con lo cual, al igual que con la variable cuerpos grasos, la variación registrada en el contenido lipídico en las pupas no fue debida al consumo de los cuatro suplementos (tratamientos) evaluados. De manera que las variables porcentaje de cuerpos grasos y determinación del contenido lipídico no permitieron detectar diferencias entre colmenas tratadas y sin tratar. Sin embargo, los resultados obtenidos permiten afirmar que se mantuvo el estado nutricional de las colmenas. Estas observaciones coinciden con trabajos de otros autores donde se muestra variabilidad en dichos parámetros nutricionales. Por ejemplo, Kazimierczak – Baryczko y Szymas (2006), encontraron que la adición de preparaciones con probióticos al sustituto alimenticio estimuló el desarrollo de los cuerpos grasos de las abejas. Por otra parte, De Piano *et al.* (2020) estudiaron el efecto de SLC producidos por bacterias lácticas en los parámetros nutricionales de cuerpos grasos y proteínas solubles. Si bien ningún sobrenadante aumentó el contenido de lípidos en el abdomen, sí mantuvieron el estado nutricional de las abejas. Finalmente, Canché-Collí *et al.* (2021) utilizaron un sustituto de polen estándar como dieta control y lo enriquecieron con levaduras asociadas a las abejas (*Starmerella bombicola*, *S. etchellsii*, *S. bombicola* 2, *Zygosaccharomyces mellis* y *Saccharomyces cerevisiae*). Obtuvieron como resultado

que el porcentaje de grasa corporal en las abejas individuales fue ligeramente inferior en las abejas que recibieron los tratamientos comparados con el control sin el agregado de levaduras.

La supervivencia del microorganismo incorporado al suplemento se evaluó luego de su exposición en la colmena. Tanto en el caso de la bacteria como en la levadura, el crecimiento disminuyó de manera estadísticamente significativa en condiciones de colmena, es decir a campo,. Este resultado era esperable ya que ningún microorganismo aumenta o mantiene su número en condiciones que no son las más adecuadas para su crecimiento. Al comparar la supervivencia de la bacteria con respecto a la levadura, no hubo diferencias entre ellas. Esto implicaría que los dos microorganismos evaluados a campo son potenciales candidatos para ser incluidos en suplementos nutricionales. En un ensayo similar, Daisley (2021) no registró diferencias significativas en la supervivencia de las tres cepas probióticas incorporadas a los suplementos durante los primeros seis días. Luego de ese tiempo, se produjo una marcada disminución en el número de microorganismos viables. En esta tesis, el número promedio inicial de UFC correspondiente al cultivo bacteriano fue de  $10^6$  UFC/ml y en el caso de la levadura el número fue de  $10^4$  UFC/ml. Teniendo en cuenta que la supervivencia de los microorganismos disminuye en el suplemento y durante la exposición en la colmena, una posibilidad sería incorporarlos al suplemento en una dosis más alta. Por ejemplo, Arredondo *et al.* (2023) trabajaron con una mezcla microbiana en una dosis inicial de  $10^7$  UFC/ml, que fue aplicada una vez a la semana, durante tres semanas consecutivas. El valor de UFC disminuyó a  $10^6$  UFC/ml luego de ocho horas de iniciado el ensayo a campo. Mientras que Kazimierczak – Baryczko y Szymas (2006) incorporaron  $11 \times 10^9$  bacterias por mg del probiótico, en tres dosis (0,5; 1 y 2 mg) al sustituto alimenticio con el cual alimentaron a las abejas en las colmenas. Trabajaron con dos formulaciones probióticas, obteniendo distintos resultados. En una de las preparaciones probióticas el efecto fue positivo sólo en la dosis más alta (2 mg), en tanto que la segunda preparación ejerció efectos positivos en las tres dosis aplicadas.

## **Conclusiones**

- Los ensayos realizados en esta tesis demostraron que fue posible incorporar microorganismos viables a un suplemento nutricional y que el mismo fue consumido por las abejas.

- Los suplementos alimenticios con el agregado de sobrenadantes libres de células y de cultivos microbianos fueron aceptados y consumidos por las abejas.
- La incorporación de la cepa de bacteria y de la levadura probióticas al suplemento mantuvo el estado nutricional de las abejas adultas y de las pupas.
- Al comparar el número de UFC de la cepa bacteriana y de la cepa de levadura en el suplemento luego de su exposición en la colmena, ambos microorganismos presentaron la misma supervivencia en el suplemento en las condiciones de campo.

## **Capítulo 7: Consideraciones finales y perspectivas**

En esta tesis se desarrolló un suplemento nutricional con el agregado de microorganismos potencialmente probióticos obtenidos de fuentes no tradicionales, como una alternativa natural, simple y sustentable para mejorar la nutrición de las abejas, con el fin de contribuir a mitigar los problemas nutricionales que afectan a las colmenas actualmente. Los resultados obtenidos evidenciaron el rol de los microorganismos del kéfir de agua como potenciales probióticos para ser incorporados en la alimentación de las abejas (Figura 7.1).

La caracterización del kéfir de agua como fuente alternativa no tradicional de probióticos para abejas, permitió conocer su composición química y microbiológica, siendo esto fundamental ya que cada producto es único y se diferencia de otros kéfires. De acuerdo al análisis químico, el kéfir se caracterizó por su acidez, bajo contenido de etanol y la presencia de macro minerales como Na, K y Mg. Respecto a la comunidad microbiana presente en los gránulos y sobrenadante del kéfir, predominaron las bacterias anaerobias, bacterias microaerófilas y levaduras. Estos microorganismos permanecieron viables en el kéfir durante un período de 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, con ciertas fluctuaciones en su número. Las bacterias fueron identificadas como miembros de los géneros *Lacticaseibacillus*, *Liquorilactobacillus* y *Lentilactobacillus*. Por su parte, las levaduras se identificaron como pertenecientes a los géneros *Saccharomyces* y *Pichia*.

Un total de 60 microorganismos fueron aislados del kéfir de agua. Veinte cepas (10 bacterias y 10 levaduras) mostraron una fuerte actividad inhibitoria frente al patógeno *Paenibacillus larvae*. En tanto que, cinco bacterias y 10 levaduras presentaron buena inhibición frente a *Ascosphaera apis*, cuando se trabajó con el ensayo de difusión por pozo en agar. Los resultados obtenidos con las levaduras del kéfir son novedosos ya que no se ha reportado que especies de levaduras hayan sido utilizadas para controlar el crecimiento de estos patógenos. Por lo tanto, estos estudios son de gran relevancia por el potencial uso de las levaduras para controlar dos importantes enfermedades para la apicultura.

El control del crecimiento *in vitro* de los patógenos apícolas *P. larvae* y *A. apis* por parte de las cepas se asoció a los metabolitos secundarios presentes en los sobrenadantes microbianos. Principalmente, el compuesto acetato en las bacterias y etanol en las levaduras. Esta instancia de evaluación resultó clave para seleccionar las cepas microbianas con mayor actividad antimicrobiana que luego fueron probadas

respecto de sus propiedades probióticas. En cuanto a los ensayos de cría y alimentación de larvas de abejas en el laboratorio, estos demostraron que el kéfir de agua y el sobrenadante de las bacterias y levaduras evaluadas no resultaron tóxicos para las larvas. Por lo tanto, podrían ser incorporados en la alimentación de las abejas con el fin de mejorar o complementar sus dietas nutricionales.

Las 10 cepas de bacterias y 10 de levaduras con mayor capacidad antimicrobiana frente a los patógenos apícolas fueron caracterizadas fisiológicamente a través de pruebas *in vitro* de tolerancia a diferentes pHs (3, 5 y 6), concentraciones de NaCl (3; 6,5 y 10 %), temperaturas (10, 25, 35 y 40 °C) y altas concentraciones de azúcar (30, 50 y 70 %). También, se analizó su cinética de crecimiento y la capacidad de supervivencia posterior a la liofilización. Las tres cepas bacterianas (B2, b3 y S6) y tres cepas de levaduras (FAs, Y8, y LK3) con mayor supervivencia y mejores atributos fueron seleccionadas como potenciales probióticos. Mediante Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H (<sup>1</sup>H-RMN), en los SLC de las 10 cepas bacterianas se detectaron 250 compuestos diferentes. Entre ellos se identificaron los compuestos antimicrobianos acetato, acetoína, etanol, lactato, N-carbamoil-beta-alanina, fenilglicina, fenilalanina, arginina y ácido ascórbico. Mientras que, en los SLC de las levaduras se detectaron un total de 207 compuestos diferentes. Se identificaron los compuestos antimicrobianos etanol, isovalerato, lactato y fenilalanina.

En base a la actividad antimicrobiana frente a patógenos, la mayor supervivencia a diferentes pruebas de tolerancia *in vitro* y a la capacidad de producción de compuestos antimicrobianos, se seleccionó una cepa de bacteria y una de levadura para ser incorporadas en el suplemento alimenticio en la siguiente y última etapa de evaluación. De todas las bacterias anaerobias, se eligió a *Lactocaseibacillus paracasei* (B2). Entre las levaduras, se escogió la cepa *Saccharomyces cerevisiae* (FAs). De esta manera, se formuló un nuevo suplemento nutricional para abejas con el agregado de los microorganismos previamente caracterizados y seleccionados como probióticos.

A través de dos ensayos de preferencia realizados a campo se evaluó la efectividad de cada suplemento probiótico. En los dos ensayos, con la bacteria y con la levadura, las abejas consumieron todos los suplementos. Esto demuestra que el probiótico, tanto en la forma de sobrenadante como de cultivo celular, podría ser incorporado en el alimento destinado a las abejas. Además, se evaluaron las variables porcentaje de cuerpos grasos en abejas adultas y determinación del contenido lipídico en pupas de abejas. Como resultado se obtuvo que la incorporación de la cepa de bacteria y de la levadura probióticas al suplemento mantuvo el estado nutricional de las abejas adultas y de las pupas. Finalmente, tanto la cepa de la bacteria como de la

levadura permanecieron viables en el suplemento luego de su exposición a las condiciones de la colmena. Los ensayos a campo realizados demostraron que fue posible incorporar microorganismos viables a un suplemento nutricional y que el mismo fue consumido por las abejas.

En vista de todos los resultados obtenidos se aceptan las hipótesis propuestas en esta tesis. En primer lugar, los microorganismos aislados a partir de kéfir de agua tienen el potencial para actuar como probiótico. En segundo lugar, el suplemento nutricional con potencial probiótico constituye una alternativa eficaz para enfrentar los problemas nutricionales que se evidencian actualmente a nivel de colonia.

A través de la incorporación de microorganismos probióticos en los suplementos destinados a la alimentación de las abejas los apicultores podrían mitigar los impactos negativos sobre estos insectos y promover el bienestar general de las colonias. Para ello, serán necesarias más investigaciones, con lo cual se plantea en un futuro continuar y profundizar en el estudio de:

- Los mecanismos de acción que subyacen a las propiedades antimicrobianas de los microorganismos utilizados como probióticos.
- La combinación de sobrenadantes libres de células/cultivos microbianos de distintas cepas de bacterias y de levaduras para ser incorporadas en el suplemento nutricional.
- La realización de un ensayo de consumo para evaluar el estado general de las colonias a través de la medición de variables como número de abejas en cada cuadro, área abierta y operculada y producción de miel.
- El efecto del suplemento probiótico sobre el estado nutricional e inmunológico de las abejas a través de la utilización de técnicas de biología molecular que permitan evaluar la carga de los virus más importantes, analizar la expresión de los genes relacionados con la inmunidad tales como vitelogenina, defensina y fenoloxidasas y el análisis de la microbiota intestinal.

Para concluir, se destaca que esta tesis aporta conocimiento sobre un tema de estudio a nivel mundial como es la nutrición artificial de colmenas y la utilización de microorganismos probióticos para tal fin. Esta última es una temática muy reciente y novedosa que no tiene antecedentes en nuestro país. Por lo tanto, son grandes y prometedoras las aplicaciones de los suplementos probióticos en el presente y futuro de la apicultura. Continuar con investigaciones en esta área permitirá desarrollar

alternativas sustentables para la nutrición apícola y, así, contribuir a mejorar el bienestar de estos invaluable insectos polinizadores.



**Figura 7.1.** Estudio de microorganismos aislados de kéfir de agua para determinar su potencial como probióticos destinados a la alimentación de abejas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abel CBL, Lindon JC, Noble D, Rudd BAM, Sidebottom PJ, Nicholson JK. (1999) Characterization of Metabolites in Intact *Streptomyces citricolor* Culture Supernatants Using High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance and Directly Coupled High-Pressure Liquid Chromatography: Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 270, 220:230
- Ament SA, Chan QW, Wheeler MM, Nixon SE, Johnson SP, Robinson GE. (2011) Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. *Journal of Experimental Biology*, 214(22): 3808-3821. <https://doi.org/10.1242/jeb.060244>
- Aislabie JM, Jordan S, Barker GM. (2008) Relation between soil classification and bacterial diversity in soils of the Ross Sea region, Antarctica. *Geoderma*, 144, Issues 1–2: 9-20 <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.10.006>
- Akualing JS, Rejeki IPS. (2018) ANTIBIOGRAM (Antibiogram). *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*, 23(1): 90-95.
- Akšić MF, Čolić S, Meland M, Natić M. (2020) Sugar and Polyphenolic Diversity in Floral Nectar of Cherry. In: Mérillon, JM., Ramawat, K. (eds) *Co-Evolution of Secondary Metabolites. Reference Series in Phytochemistry*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-96397-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-96397-6_8)
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3):403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2. PMID: 2231712.
- Alberoni D, Gaggia F, Baffoni L, Di Gioia, D. (2016) Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(22):9469-9482. DOI 10.1007/s00253-016-7870-4.
- Alberoni D. (2018) “Beneficial microorganisms for honey bees health”. Tesis en Scienze e tecnologie agrarie, ambientali e alimentari, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna.
- Albo, GN., Reynaldi, FJ., Altamirano, R., Vivot, W., Córdoba, SB. (2016). Evaluación de la actividad inhibitoria, in vivo e in vitro, del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* y cinco diluyentes sobre cultivos de *Ascosphaera apis*. *Analecta Veterinaria*, 36(1): 5–11. <https://doi.org/10.24215/15142590ep.5-11>
- Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. (2000) Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (5): 2001-2005. doi: 10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990) Basic local alignment search tool.

Journal of Molecular Biology, 5;215(3):403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2. PMID: 2231712.

- Al-Ghamdi A, Khan KA, Ansari MJ, Almasaudi SB, Al-Kahtani S. (2017) Effect of gut bacterial isolates from *Apis mellifera jemenitica* on *Paenibacillus larvae* infected bee larvae. Saudi Journal of Biological Sciences. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.07.005>
- Alquisira-Ramírez EV, Peña-Chora G, Hernández-Velázquez VM, Alvear-García A, Arenas-Sosa I, Suarez-Rodríguez R. (2017) Effects of *Bacillus thuringiensis* strains virulent to *Varroa destructor* on larvae and adults of *Apis mellifera*. Ecotoxicology and Environmental Safety 142: 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.050>
- Alvarado J de D. (1979). Ensayos de Almacenamiento y estudio de un Mecanismo de Secado a temperaturas Bajas en Papa (*Solanum tuberosum*). Tesis para optar por el título de Magister Scientifcae. CESNA-INCAP. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 68 p. y anexos
- Ammons MCB, Tripet BP, Carlson RP, Kirker KR, Gross MA, Stanisich JJ, Copié V. (2014) Quantitative NMR metabolite profiling of methicillin-resistant and methicillin-susceptible staphylococcus aureus discriminates between biofilm and planktonic phenotypes. Journal of Proteome Research, 13 (6): 2973–2985. doi: 10.1021/pr500120c
- Anderson D, Giacón H, Gibson N. (1997) Detection and thermal destruction of the chalkbrood fungus (*Ascophaera apis*) in honey. Journal of Apicultural Research, 36:163-168.
- Angulo L, Lopez E, Lema C. (1993) Microflora present in kefir grains of the Galician region (north-west of Spain. Journal of Dairy Research, 60(2): 263-267.
- Antúnez K, Mendoza Y, Santos E, Invernizzi C. (2013) Differential expression of vitellogenin in honey bees (*Apis mellifera*) with different degrees of *Nosema ceranae* infection. Journal of Apicultural Research 52(5) DOI 10.3896/IBRA.1.52.5
- Antunez K, Arredondo D, Castelli L, Silva F, Añón G, Harriet J, Campá J, Invernizzi C, Zunino P (2019) Desarrollo de una estrategia natural para el control de *Varroa destructor*, integrando el uso de probióticos y productos orgánicos. FPTA 329. ISSN: 978-9974-38-415-6.
- AOAC. (1995) Official methods of analysis 16th Ed. Association of official analytical chemists. Washington DC, USA.
- Arauz LJ, Jozalaa AF, Mazzolab PG, Vessoni Pennaa TC. (2009) Nisin biotechnological production and application: a review. Trends in Food Science and Technology, 20: 146–154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.056>
- Arena MP, Silvain A, Normanno G, Grieco F, Drider D, Spano G, Fiocco D. (2016) Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms Frontiers in Microbiology, 7: 464 DOI: 10.3389/fmicb.2016.00464
- Aronstein KA, Murray KD. (2010) Chalkbrood disease in honey bees. Journal of Invertebrate

- Pathology, 103: 20–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.018>.
- Arredondo D, Castelli L, Porrini MP, Garrido PM, Eguaras MJ, Zunino P, Antúnez K. (2018) *Lactobacillus kunkeei* strains decreased the infection by honey bee pathogens *Paenibacillus larvae* and *Nosema ceranae*. *Beneficial Microbes*, 27;9(2): 279-290. doi: 10.3920/BM2017.0075
- Arredondo D, Añón G, Campá J, Harriet J, Castelli L, Zunino P. Antúnez K. (2023) Supplementation of honey bee production colonies with a native beneficial microbe mixture. *Beneficial Microbes*, 0: 1–16. DOI: 10.1163/18762891-20220099
- Arrieta-Echeverri MC, Fernandez GJ, Duarte-Riveros A, Correa-Álvarez J, Bardales JA, Villanueva-Mejía DF, Sierra-Zapata L. (2023) Multi-omics characterization of the microbial populations and chemical space composition of a water kefir fermentation. *Frontiers in Molecular Bioscience*, 2 (10):1223863. doi: 10.3389/fmolb.2023.1223863. PMID: 37849822; PMCID: PMC10577418.
- Audisio MC, Torres MJ, Sabaté DC, Ibarguren C, Apella MC (2011) Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiological Research* 166: 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.01.003>
- Audisio MC. (2016) Gram-Positive Bacteria with Probiotic Potential for the *Apis mellifera* L. Honey Bee: The Experience in the Northwest of Argentina. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*. DOI 10.1007/s12602-016-9231-0
- Aupinel P, Fortini D, Dufour H, Tasei JN. (2005) Improvement of artificial feeding in a standard *in vitro* method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of Insectology*, 58 (2): 107-111
- Avin FA, Bhassu S, Tan YS, Shahbazi P, Vikineswary S. (2014) Molecular divergence and species delimitation of the cultivated oyster mushrooms: integration of IGS1 and ITS. *The Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2014/793414>.
- Badel S, Bernardi T, Michaud P. (2011) New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29:54-66. <http://dx.doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2010.08.011>.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2): 71-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bamford S, Heath LAF. (2015) The Infection of *Apis mellifera* larvae by *Ascosphaera apis*. *Journal of Apicultural Research*, 28:1, 30-35. DOI:10.1080/00218839.1989.11100817
- Banerjee S, Schlaeppi K, van der Heijden MGA. (2018) Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9):567-576. doi: 10.1038/s41579-018-0024-1
- Barbour EA, Priest FG. (1986) The preservation of lactobacilli: A comparison of three methods. *Letters in Applied Microbiology*, 2(4): 69-71. <https://doi.org/10.1111/j.1472->

765X.1986.tb01518.x

- Bartel LC, Abrahamovich E, Mori C, López AC, Alippi AM. (2019) *Bacillus* and *Brevibacillus* strains as potential antagonists of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. *Journal of Apicultural Research*, 58(1): 117-132, DOI: 10.1080/00218839.2018.1495439
- Barreto JA. (2018) Plan Estratégico Apícola 2030: mirando al futuro. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Barribeau SM. *et al.* (2015) A depauperate immune repertoire precedes evolution of sociality in bees. *Genome Biology*, 16(1):83. doi: 10.1186/s13059-015-0628-y.
- Biesmeijer JC. *et al.* (2006) Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science*, 313: 351–354.
- Binda S, Hill C, Johansen E, Obis D, Pot B, Sanders ME, Tremblay A, Ouwehand C (2020) Criteria to qualify microorganisms as “probiotic” in foods and dietary supplements. *Frontiers in Microbiology*, 11:1662. doi: 10.3389/fmicb.2020.01662
- Black J. (2006) Honey bee nutrition. Review of research and practices. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Australian Government. RIRDC Publication No 06/052, 67 pp.
- Bonilla-Rosso G, Engel P. (2018) Functional roles and metabolic niches in the honey bee gut microbiota. *Current Opinion in Microbiology*, 43: 69–76. doi: 10.1016/j.mib.2017.12.009
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30: 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bolla PA. (2011) Development of a dehydrated functional food consisting on microorganisms isolated from kefir. PhD Thesis; Chemistry Department, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Bs. As, Argentina.
- Bolla P, Serradell M, de Urraza P, De Antoni G. (2011) Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiótico properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *Journal of Dairy Research*, 78(1):15-22. doi: 10.1017/S0022029910000610.
- Borkakati RN, Venkatesh MR, Saikia DK, Sasanka SB. (2019) A brief review on food recognition by insects: Use of sensory and behavioral mechanisms. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7(3): 574–579.
- Braglia C, Alberoni D, Porrini MP, Garrido PM, Baffoni L, Di Gioia D. (2021) Screening of Dietary Ingredients against the Honey Bee Parasite *Nosema ceranae*. *Pathogens*, 10(9):1117. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091117>
- Bursell E, Biling KC, Hagrovem JW, McCabem CT, Slack E. (1974) Metabolism of the blood meal in tsetse flies (a review). *Acta Tropica Parasit*, 31: 297-320
- Cabana MJ, Tejerina MR, José J, Castro RM, Benítez Ahrendts MR. (2021) Potencial probiótico de bacterias aisladas de pan de polen para mejorar la producción y sanidad de *Apis mellifera*. *IDESIA (Chile) Volumen 39, N° 1, marzo, 2021.*

- Caldas de Pinho Pessoa Filho, MA. (2011) *Metagenômica: princípios e aplicações em BIOTECNOLOGIA: estado da arte e aplicações na agropecuária*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011.730 p.: il.ISBN 978-85-7075-059-4
- Camarotte A. (2013) *Caracterización de cepas proteolíticas de bacterias psicrótrofas aisladas de leche cruda bovina refrigerada*. Tesis de grado. Facultad de Ciencias. Universidad de la República Uruguay.
- Canché-Collí C, Estrella-Maldonado H, Medina-Medina LA, Moo-Valle H, Calvo-Irabien LM, Chan-Vivas E, Rodríguez R, Canto A. (2021) Effect of yeast and essential oil-enriched diets on critical determinants of health and immune function in Africanized *Apis mellifera*. *PeerJ*, 9:e12164 <https://doi.org/10.7717/peerj.12164>
- Candy DJ, Becker A, Wegener B. (1997) Coordination and integration of metabolism in insect flight. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117B: 497-512. [http://dx.doi.org/10.1016/S0305-0491\(97\)00212-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-0491(97)00212-5)
- Carasi P, Malamud M, Serradell MA. (2022) Potentiality of Food-Isolated *Lentilactobacillus kefir* Strains as Probiotics: State-of-Art and Perspectives. *Current Microbiology*, 79: 21. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02728-x>
- Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Tempst P. (1993) Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268: 7044–7054.
- Çevik T, Aydoğdu NS, Özdemir N, Kök Taş T. (2019) The Effect of Different Sugars on Water Kefir Grains. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(1): 40-45, 2019 DOI: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7isp1.40-45.2687>
- Charboneau R, Gosselin P, Thibault C. (1992) Irradiation and AFB. *American Bee Journal*, 132:249-251.
- Chen YL, Lee CC, Lin YL, Yin KM, Ho CL, Liu T. (2015) Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. *BMC Bioinformatics*, 16(18): S13. doi: 10.1186/1471-2105-16-S18-S13
- Chmiel JA, Pitek AP, Burton JP, Thompson GJ, Reid G. (2021) Meta-analysis on the effect of bacterial interventions on honey bee productivity and the treatment of infection. *Apidologie*. DOI: 10.1007/s13592-021-00879-1
- Coico R. (2001) Gram Staining. *Current Protocols in Immunology*. doi:10.1002/0471142735.ima03os23
- Corona O, Randazzo W, Miceli A, Guarcello R, Francesca N, Erten H, Moschetti G, Settanni L. (2016) Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. *Food Science and Technology*, 66:572-581.
- Crailsheim K, Brodschneider R, et al. (2013). Standard methods for artificial rearing of *Apis mellifera* larvae. *Journal of Apicultural Research*, 52(1): 1-15 DOI: 10.3896/IBRA.1.05

- Crane E. (1990) Honeybees as individual insects en Bees and beekiping: science, practice and world resources. Ed. Heinemann Newnes.
- Cross ML. (2002) Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34: 245–253 doi: 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00632.x.
- Daisley BA, Pitek AP, Chmiel JA, Al KF, Chernyshova AM, Faragalla KM, Burton J.P, Thompson GJ, Reid G (2019) Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bee. *The ISME Journal* <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0541-6>
- Daisley BA, Pitek AP, Chmiel JA, Al KA, Chernyshova AM, Faragalla KM, Burton JP, Thompson GJ, Reid G. (2020) Novel probiotic approach to counter *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. *The ISME Journal*, 14(2):476-491. doi: 10.1038/s41396-019-0541-6.
- Daisley BA, Pitek AP, Chmiel JA, Gibbons S, Chernyshova AM, Al KA, Faragalla KM, Burton JP, Thompson GJ, Reid G. (2020b) *Lactobacillus* spp. attenuate antibiotic-induced immune and microbiota dysregulation in honey bees. *Communications Biology*, 3(1):534. doi: 10.1038/s42003-020-01259-8.
- Daisley BA, Chmiel JA, Pitek AP, Thompson GJ, Reid G. (2020c) Missing Microbes in Bees: How Systematic Depletion of Key Symbionts Erodes Immunity. *Trends in Microbiology*, 28 (12): 1010-1021. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.06.006>
- Daisley BA. (2021) "Microbial innovations for disease management in honey bees". Electronic Thesis and Dissertation Repository. 8055. <https://ir.lib.uwo.ca/etd/8055>
- Danihlík J. *et al.* (2018) Does the pollen diet influence the production and expression of antimicrobial peptides in individual honey bees? *Insects*, 9: 79.
- Darvishzadeh A, Hosseinaveh V, Nehzati G, Nozari J. (2015) Effect of proline as a nutrient on hypopharyngeal glands during development of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Arthropods*, 4(4): 137-143
- Davis C, Ward W. (2003) Control of chalkbrood disease with natural products: a report for the RIRDC. Publication N° 03/107Kingston, ACT, AU, pp. 1-23.
- De Almeida Brasiel PG, Dutra Medeiros J, Barbosa FerreiraMachado A, Schuchter Ferreira M, Do Carmo Gouveia Peluzio M, Potente Dutra Luquetti SC. (2021) Microbial community dynamics offermented kefir beverages changes over time. *International Journal of Dairy Technology*, 74, <http://dx.doi.org/10.1111/1471-0307.12759>.
- de Almeida KV, Zanetti VC, Camello-Silva C, Alexandre LA, da Silva AC, da Silva Mendes G, Marchesan Maran E, Verruck S, Quintão Teixeira LJ. (2022) Análise metataxonômica da diversidade microbiana de kefir de água. *CBCTA 2022*
- DeGrandi-Hoffman G, Hagler J. (2000) The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker. *Insectes Sociaux*, 47: 302–306. <https://doi.org/10.1007/PL00001720>

- Degrandi-Hoffman G, Eckholm BJ, Huang MH. (2013) A comparison of bee bread made by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera*) and its effects on hemolymph protein titers. *Apidologie*, 44: 52-63. DOI <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0154-9>
- DeGrandi-Hoffman, G. *et al.* (2008) Comparisons of pollen substitute diets for honey bees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations. *Journal of Apicultural Research*, 47: 265–270. DOI: 10.1080/00218839.2008.11101473
- de Oliveira Leite AM, Miguel MA, Peixoto RS, Rosado AS, Silva JT, Paschoalin VM. (2013) Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Braz J Microbiol*, 30;44(2):341-9. doi: 10.1590/S1517-83822013000200001.
- De Piano FG, Maggi MD, Meroi Arceitto FR, Audisio MC, Eguaras M, Ruffinengo SR. (2020) Effects of bacterial cell-free supernatant on nutritional parameters of *Apis mellifera* and their toxicity against *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Science*, 64 (1) DOI 10.2478/JAS-2020-0009
- De Vuyst L, Vandamme EJ (Eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*, Blackie, London, 1994.
- Destro TM, da Fontoura Prates D, Shinji Watanabe L, García S, Biz G, Aparecida Spinosa W. (2019) Organic brown sugar and jaboticaba pulp influence on water kefir fermentation. *Ciência e Agrotecnologia* vol.43. ISSN 1981-1829. <https://doi.org/10.1590/1413-7054201943005619>.
- Dietemann V, *et al.*, (2012) *Varroa destructor*: research avenues towards sustainable control. *Journal of Apicultural Research*, 51(1): 125-132. DOI 10.3896/IBRA.1.51.1.15
- Dietrich A, Steffi Matchado M, Zwiebel M, Ölke B, LauberM, Lagkouvardos I, Baumbach J, Haller D, Brandl B, Skurk T, Hauner H, Reitmeier S. (2022) Namco: a microbiome explorer. *MicrobGenom*, 8, <http://dx.doi.org/10.1099/mgen.0.000852>, mgen000852.
- Ding F, Krasilnikova AA, Leontieva MR, Stoyanova LG, Netrusov AI. (2022) Analysis of Kefir Grains from Different Regions of the Planet Using High-Throughput Sequencing. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, 77 (4): 286–291. doi: 10.3103/S0096392522040010.
- Dingman DW, Stahly DP. (1983) Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (4): 860-869.
- Diosma G, Romanin DE, Rey-Burusco MF, Londero A, Garrote GL. (2014) Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1):43-53. doi: 10.1007/s11274-013-1419-9.
- Di Pasquale, G. Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet JL, Alaux C. (2013) Influence of pollen nutrition on honey bee health: do pollen quality and diversity matter? *PLoS One* 5;8(8):e72016. doi:

10.1371/journal.pone.0072016

- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. (2008) InfoStat, versión 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina InfoStat Versión 2011. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/233842986\\_InfoStat\\_Version\\_2011](https://www.researchgate.net/publication/233842986_InfoStat_Version_2011) [accessed Feb 09 2024].
- Dolezal AG, Toth AL. (2018) Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Current Opinion in Insect Science*, 26: 114 – 119. doi: 10.1016/j.cois.2018.02.006.
- Dwiloka B, Rizqiyati H, Setiani BE (2020) Physicochemical and sensory characteristics of green coconut (*Cocos nucifera* L.) water kefir. *International Journal of Food Studies*, 9 (2). <https://doi.org/10.7455/ijfs/9.2.2020.a7>
- Endo A, Salminen S. (2013) Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6):444-448.
- Erban T. *et al.* (2017) Bacterial community associated with worker honeybees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood. *PeerJ*, 5, e3816 doi: 10.7717/peerj.3816
- Espinar Marchena FJ. Tesis doctoral (2017) Estudio del ensamblaje ribosómico en *Saccharomyces cerevisiae*. Departamento de Genética, Universidad de Sevilla. Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor en Biología.
- Etleva V, Thanas P, Pashk L, Myqerem T (2010) Using combined probiotic to improve growth performance of weaned piglets on extensive farm conditions. *Livestock Science*, 134: 249–251. DOI: 10.1016/j.livsci.2010.06.155.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2017. Método para determinar la concentración inhibitoria mínima de los antifúngicos en hongos formadores de conidios. Documento EDEF 9.3.1
- Evans JD, Lopez DL. (2004) Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 97 (3): 752–756. doi: 10.1603/0022-0493(2004)097[0752:bpiair]2.0.co;2.
- Farjan M, Dmitryjuk M, Lipiński Z, Biernat-Łopieńska E, Żółtowska, K. (2012) Supplementation of the honey bee diet with vitamin C: The effect on the antioxidative system of *Apis mellifera carnica* brood at different stages, *Journal of Apicultural Research*, 51(3): 263-270. DOI: 10.3896/IBRA.1.51.3.07
- Farnworth ER. (2005) Kefir -a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2:1-17.
- Fiorda FA, de Melo Pereira GV, Thomaz-Soccol V, Rakshit SK, Soccol CR. (2016) Evaluation of a potentially probiotic non-dairy beverage developed with honey and kefir grains: Fermentation kinetics and storage study. *Food Science and Technology International*, 0(0): 1–11. DOI: 10.1177/1082013216646491

- Fiorda FA, de Melo Pereira GV, Thomaz-Soccol V, Rakshit SK, Binder Pagnoncelli MG, Porto de Souza Vandenberghe L, Soccol CR. (2017) Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiology*, DOI: 10.1016/j.fm.2017.04.004
- Floyd AS, Mott BM, Maes P, Copeland DC, McFrederick QS, Anderson KE. (2020) Microbial Ecology of European Foul Brood Disease in the Honey Bee (*Apis mellifera*): Towards a Microbiome Understanding of Disease Susceptibility. *Insects*, 20;11(9):555. doi: 10.3390/insects11090555.
- Foley K, Fazio G, Jensen A, Hughes W. (2012) Nutritional limitation and resistance to opportunistic *Aspergillus* parasites in honey bee larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111: 68–73. doi: 10.1016/j.jip.2012.06.006.
- Forsgren E, Olofsson TC, Alejandra Vasquez A, Fries I. (2010) Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *Apidologie*, 41: 99–108 DOI: 10.1051/apido/2009065
- Forssten SD, Laitila A, Maukonen J, Ouwehand AC. (2020) Probiotic triangle of success; strain production, clinical studies and product development. *FEMS Microbiology Letters*, 367. DOI: 10.1093/femsle/fnaa167
- Franzetti L, Galli A, Pagani MA, Noni I. (1998) Microbiological and chemical investigations on sugar Kefir drink. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* 48: 67-80.
- Fothergill AW. (2012) Antifungal susceptibility testing: clinical laboratory and standards institute (CLSI) methods en *Interactions of yeasts, moulds, and antifungal agents*. Humana Press.
- Fuochi V, Coniglio MA, Laghi L, Rescifina A, Caruso M, Stivala A, Furneri PM. (2019) Metabolic characterization of supernatants produced by *Lactobacillus* spp. With in vitro anti-legionella activity, *Frontiers in Microbiology*, 10: 1403. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.01403>.
- Gamba RR, Koyanagi T, León Peláez A, De Antoni G, Enomoto T. (2021) Changes in Microbiota During Multiple Fermentation of Kefir in Different Sugar Solutions Revealed by High-Throughput Sequencing. *Current Microbiology*, 78:2406–2413 <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02501-0>
- Ganobis CM, Sameer M, Al-Abdul-Wahid, Renwick S, Yen S, Carriero C, Aucoin MG, Allen-Vercoe E. (2020) 1D 1H NMR as a Tool for Fecal Metabolomics. *Current Protocols in Chemical Biology*, 12, e83. doi: 10.1002/cpch.83
- Gancedo C, Serrano R. (1989) Energy yielding metabolism. In: A.H. Rose and J.S. Harrison, eds. *The Yeasts*. Academic Press, London., pp. 205-259.
- García Girou N. (2002) Fundamentos de la Producción Apícola Moderna, págs. 37 y 38.
- García Girou N. (2008) Nutrición y Alimentación. *Revista Campo y Abejas*. Junio 2008. Año XI

pág 4.

- Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. (2000) Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68(4): 639-652. doi: 10.1017/s0022029901005210.
- Genç M, Genç F. (2019) Stress Factors on Honey Bees (*Apis mellifera* L.) and The Components of Their Defense System Against Diseases, Parasites, and Pests, *Mellifera*, 19(1):7-20.
- Genersch E. (2010) American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103 Suppl 1:S10-9. doi: 10.1016/j.jip.2009.06.015. Epub 2009 Nov 11. PMID: 19909971.
- Genersch E, Forsgren E, Pentikainem J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwiski J, Fries I. (2006) Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63928-0>.
- George-Okafor UU, Ozoani F, Tasié K, Mba-Omeje. (2020) The efficacy of cell-free supernatants from *Lactobacillus plantarum* Cs and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 314 for the preservation of home-processed tomato-paste. *Scientific African*. 8, e00395, <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00395>.
- Gerhardt P. (1981) *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology. Washington DC.
- Ghosh S, Jeon H, Jung C. (2020) Foraging behavior and preference of pollen sources by honey bees (*Apis mellifera*) relative to protein contents. *Journal of Ecology and Environment*, 44, 4. <https://doi.org/10.1186/s41610-020-0149-9>
- Gilliam M, Taber S, Bray Rose J. (1978) Chalkbrood disease of honey bees, *Apis mellifera* L.: a progress report. *Apidologie*, 9 (1): 75.89
- Giraffa G. (2004) Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol Rev*, 28(2):251-60. doi: 10.1016/j.femsre.2003.10.005.
- Goktas H, Dikmen H, Demirbas F, Sagdic O, Dertli E. (2021) Characterisation of probiotic properties of yeast strains isolated from kefir samples. *International Journal of Dairy Technology*. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12802>.
- Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. (2007) Protective action of lactobacillus kefir carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar. *enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 118(3): 264-273. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.042
- Golowczyc MA, Gugliada MJ, Hollmann A, Delfederico L, Garrote GL, Abraham AG. (2008) Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: Potential use as probiotic. *Journal of Dairy Research*, 75(2): 211-217. doi: 10.1017/S0022029908003117

- Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. (2015) Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347, 1255957. doi: 10.1126/science.1255957.
- Guardia López AR. (2024) Sumando valor y Desarrollo a la cadena apícola Ministerio de desarrollo agrario de la provincia de buenos aires (MDA). En *Revista MDA* 4(3): 7-11. Noviembre 2023. La Plata, Argentina
- Gulitz A, Stadie J, Wenning M, Ehrmann MA, Vogel RF. (2011) The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 522 (151): 284–288.
- Gulitz A, Stadie J, Ehrmann MA, Ludwig W, Vogel RF. (2012) Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 114: 1082-1091. doi:10.1111/jam.12124
- Haedo J, Stalldecker P, Marrero HJ. (2017) Plantas nativas del Sudoeste Bonaerense potencialmente útiles para la conservación de los polinizadores en agroecosistemas. *BioScriba*, 8(1): 12-23.
- Handelsman J. (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4): 669. doi: 10.1128/MMBR.69.1.195.2005
- Harwood G, Amdam G, Freitak D. (2019) The role of vitellogenin in the transfer of immune elicitors from gut to hypopharyngeal glands in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 112: 90–100. doi: 10.1016/j.jinsphys.2018.12.006.
- Harriet J, Campá JP, Grajales M, Lhéritier C, Gómez Pajuelo A, Mendoza-Spina Y, Carrasco-Letelier L. (2017) Agricultural pesticides and veterinary substances in Uruguayan beeswax. *Chemosphere*, 177: 77-83. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.02.131.
- Hassan M, Kjos M, Nes IF, Diep DB, Lottipour F. (2012) Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 113: 723-726. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x>
- Hendriksma H, Hartel S, Steffan-Dewenter I. (2011) Honey bee risk assessment: new approaches for *in vitro* larvae rearing and data analyses. *Methods in Ecology and Evolution - British Ecological Society*, 2: 509–517. DOI: 10.1111/j.2041-210X.2011.00099.x
- Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. (2001) How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 1;44(2):121-9. doi: 10.1016/s0167-7012(00)00241-4.
- Hill C, Guarner F, Reid G, *et al.*, (2014) Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and

- appropriate use of the term probiotic. *Nature Review Gastroenterology and Hepatology*, 11(8):506-14. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.
- Hillmann B, Al-Ghalith GA, Shields-Cutler RR, Zhu Q, Gohl DM, Beckman KB, Knight R, Knights D. (2018) Evaluating the Information Content of Shallow Shotgun Metagenomics. *mSystems*, 3:10.1128/msystems.00069-18. <https://doi.org/10.1128/msystems.00069-18>
- Hristov P, Shumkova R, Palova N, Neov B (2020) Factors Associated with Honey Bee Colony Losses: A Mini-Review. *Veterinary Sciences*. 7(4), 166; <https://doi.org/10.3390/vetsci7040166>
- Ibacache-Quiroga C, González-Pizarro K, Charifeh M, Canales C, Díaz-Viciedo R, Schmachtenberg O, Dinamarca MA. (2022) Metagenomic and functional characterization of two Chilean kefir beverages reveals a dairy beverage containing active enzymes, short-chain fatty acids, microbial amyloids, and bio-film inhibitors. *Foods*, 11:900. <http://dx.doi.org/10.3390/foods11070900>.
- Iorizzo M, Testa B, Lombardi SJ, Ganassi S, Ianiro M, Letizia F, Succi M, Tremonte P, Vergalito F, Cozzolino A, Sorrentino E, Coppola R, Petrarca S, Mancini M, De Cristofaro A. (2020a) Antimicrobial Activity against *Paenibacillus larvae* and Functional Properties of *Lactiplantibacillus plantarum* Strains: Potential Benefits for Honeybee Health. *Antibiotics*, 9, 442; doi:10.3390/antibiotics9080442.
- Iorizzo M, Lombardi SJ, Ganassi S, Testa B, Ianiro M, Letizia F, Succi M, Tremonte P, Vergalito F, Cozzolino A, Sorrentino E, Coppola R, Petrarca S, Mancini M, De Cristofaro A (2020b) Antagonistic Activity against *Ascosphaera apis* and Functional Properties of *Lactobacillus kunkeei* Strains. *Antibiotics* 9, 262; doi:10.3390/antibiotics9050262.
- Iorizzo M, Testa B, Lombardi SJ, Ganassi S, Ianiro M, Letizia F, Succi M, Tremonte P, Vergalito F, Cozzolino A, Sorrentino E, Petrarca S, Mancini M, De Cristofaro A, Coppola R. (2021) Probiotic Properties and Potentiality of *Lactiplantibacillus plantarum* Strains for the Biological Control of Chalkbrood Disease. *Journal of Fungi*, 7(5), 379; <https://doi.org/10.3390/jof7050379>
- Irigoyen I, Arana I, Castiella M, Torre P, Ibáñez FC (2004) Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry* 90: 613-620.
- ISAPP 2018. <https://isappscience.org/for-scientists/resources/microbiome/>
- Iwasawa S, Ueda M, Miyata N, Hirota T, Ahiko K. (1982) Identification and fermentation character of kefir yeast. *Agricultural and biological chemistry*, 46: 2631– 2636
- James S, Cai J, Roberts IN, Collins MD. (1997) Phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 453– 460.
- Jensen AB, Aronstein K, Flores JM, Vojvodic S, Palacio MA, Spivak M. (2013) Standard

- methods for fungal brood disease research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1)  
doi:10.3896/IBRA.1.52.1.13
- Jong DD, Silva EJ, da Kevan PG, Atkinson JL. (2009) Pollen substitutes increase honey bee haemolymph protein levels as much as or more than does pollen. *Journal of Apicultural Research*, 48: 34–37.
- Jurado-Gámez, Gúzman-Insuasty. (2015) Determination of kinetic, tests and growth inhibition effect of *Lactobacillus casei in vitro* in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli*. *Revista de Medicina, Veterinaria y Zootecnia*, 62(2): 23-39.
- Kaftanoglu O, Linksvayer TA, Page RE. (2011) Rearing honey bees, *Apis mellifera*, in vitro 1: Effects of sugar concentrations on survival and development. *Journal of Insect Science*, 11:96
- Kalamaki MS, Angelidis AS. (2020) High-throughput, sequence-based analysis of the microbiota of Greek kefir grains from two geographic regions. *Food Technology and Biotechnology*, 58:138 - 46, <http://dx.doi.org/10.17113/ftb.58.02.20.6581>.
- Kanlder O, Weiss N. (1986) Regular nonsporng Gram positive rods. Section 14. In: Garrity G (Ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York, pp 1208-1260.
- Karaffová, V, Mudroňová D, Mad'ar M, Hřčková G, Faixová D, Gancarčíková S, Ševčíková Z, Nemcová R. (2021) Differences in Immune Response and Biochemical Parameters of Mice Fed by Kefir Milk and *Lactocaseibacillus paracasei* Isolated from the Kefir Grains. *Microorganisms*, 9(4): 831. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040831>
- Kazmierczak – Baryczko M, Szymas B. (2006) Improvement of the composition of pollen substitute for honey bee (*Apis mellifera* L.), through implementation of probiotic preparations. *Journal of Apicultural Science*, 50 (1).
- Kazou M, Grafakou A, Tsakalidou E, Georgalaki M. (2021) Zooming into the Microbiota of Home-Made and Industrial Kefir Produced in Greece Using Classical Microbiological and Amplicon-Based Metagenomics Analyses. *Frontiers in Microbiology*, 12:621069. doi: 10.3389/fmicb.2021.621069
- Klassen S, VanBlyderveen W, Eccles L, Kelly PG, Borges D, Goodwin PH, Petukhova T, Wang Q, Guzman-Novoa E. (2021) *Nosema ceranae* Infections in Honey Bees (*Apis mellifera*) Treated with Pre/Probiotics and Impacts on Colonies in the Field. *Veterinary Science*, 8, 107. <https://doi.org/10.3390/vetsci8060107>
- Klein AM. *et al.* (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 274: 303–313. DOI:<https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Klimko AI, Cherdyntseva TA, Netrusov AI, et al. (2021) Inhibition of Ascorbate Autoxidation by New Strains of Lactic Acid Bacteria. *Moscow Univ. Biol.Sci. Bull.* 76: 249–252.

<https://doi.org/10.3103/S0096392521040052>

- Łopieńska-Biernat E, Farjan M, Żółtowska K, Dmitryjuk M, Lipiński Z, Szypulska E. (2019) Supplementing With Vitamin C the Diet of Honey Bees Parasitized With *Varroa destructor*. Effect on Carbohydrate Metabolism. *Journal of Agricultural Science*, 11 (2). p. 1. ISSN 1916-9752
- Koroleva NS. (1988) Starters for fermented milks, section 4: kefir and kumys starters. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 227: 3540.
- Kreger V, Rij MJW. (1984) *The yeasts. A taxonomy study*. Elsevier, Amsterdam.
- Kumar MR, Yeap KS, Mohamad NE, Abdullah JO, Khalid M, Leow AT, Alitheen NB. (2021) Metagenomic and phytochemical analyses of kefir water and its subchronic toxicity study in BALB/c mice. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21:183, <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-021-03358-3>.
- Kurtzman CP, Robnett CJ. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit 26S ribosomal ADN partial sequences. *Anton van Leeuwenhoek*, 73:331–371.
- Lamei S, Stephan J, Nilson B, Sieuwerts S, Riesbeck K, de Miranda J, Forsgren E (2020) Feeding Honeybee Colonies with Honeybee-Specific Lactic Acid Bacteria (Hbs-LAB) Does Not Affect Colony-Level Hbs-LAB Composition or *Paenibacillus* larvae Spore Levels, Although American Foulbrood Affected Colonies Harbor a More Diverse Hbs-LAB Community. *Microbial Ecology* 79:743–755. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01434-3>
- Laureys D, De Vuyst L. (2014) Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80:2564-72, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03978-13>.
- Leite AMO, Leite DCA, del Águila EM, Alvares TS, Peixoto RS, Miguel MAL, Silva JT, Paschoalin VMF (2013) Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal of Dairy Science* 96 :4149–4159.
- Leska A, Nowak A, Czarnecka-Chrebelska KH. (2022) Adhesion and Anti-Adhesion Abilities of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria and Biofilm Eradication of Honeybee (*Apis mellifera* L.) Pathogens. *Molecules*, 27(24):8945. <https://doi.org/10.3390/molecules27248945>
- Libudzisz, Z. (2002) Probiotics and prebiotics in fermented milks. *Pediatrica Współczesna*, 4: 19–25.
- Lima M, Soares de Souza K, Campos Albuquerque W, Couto Teixeira J, Holanda Cavalcanti M, Figueiredo Porto AL. (2017) *Saccharomyces cerevisiae* from Brazilian kefir-fermented milk: An *in vitro* evaluation of probiotic properties. *Microbial Pathogenesis*, 110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.010>

- Liu J, Lin C. (2000) Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. *Journal of Food Science*, 65(4): 716-721.
- Liu J, Wang S, Lin Y, Lin C. (2002) Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer*, 44(2): 182-187
- Liu J, Wang S, Chen M, Chen H, Yueh P, Lin C. (2006) Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soymilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *British Journal of Nutrition*, 95(5): 939-946.
- Liu W, Zhang M, Xie J, Wang H, Zhao X, Chen B, Suo H. (2019) Comparative analyses of microbial community diversities of Tibetan kefir grains from three geographic regions. *International Journal of Dairy Technology*, 72. <http://dx.doi.org/10.1111/1471-0307.12616>.
- Li C, Li X, Han H, Cui H, Peng M, Wang G, Wang Z. (2016) Effect of probiotics on metabolic profiles in type 2 diabetes mellitus. *Medicine (Baltimore)*, 95(26):e4088. doi: 10.1097/MD.0000000000004088
- Londero A. (2012) Alimentos funcionales: Obtención de un producto probiótico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismos de kéfir. Tesis doctoral; Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Bs. As., Argentina.
- Lugo-Zarate L, Cruz-Cansino N, Cervantes-Elizarrarás A, Delgado-Olivares L, Ariza-Ortega JA, Zafra-Rojas QY. (2021) Bacterias ácido lácticas de bebidas vegetales fermentadas: Producción de metabolitos y propiedades antimicrobianas. *Educación y Salud Boletín Científico Instituto de Ciencias de la Salud Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*, 9 (18): 175-186
- Magalhães KT, de Melo Pereira GV, Ribeiro Dias D, Freitas Schwan R. (2010) Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26:1241–1250. DOI 10.1007/s11274-009-0294-x
- Maggi M, Negri P, Plischuk S, Szawarski N, De Piano F, De Feudis L, Eguaras M, Audisio C. (2013) Effects of the organic acids produced by a lactic acid bacterium in *Apis mellifera* colony development, *Nosema ceranae* control and fumagillin efficiency. *Veterinary Microbiology*, 167, (3–4): 474-483 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.030>
- Maggi M, Antúnez K, Invernizzi C, Aldea P, Vargas M, Negri P, Brasesco C, De Jong D, Message D, Weinstein Teixeira E, Principal J, Barrios C, Ruffinengo S, Rodríguez da Silva R, Eguaras M (2016) Honeybee health in South America. *Apidologie*, 47:835–854 DOI: 10.1007/s13592-016-0445-
- Makrasa L, Triantafyllou V, Fayol-Messaoudic D, Adrianya T, Zoumpouloub G, Tsakalidoub

- E, Servinc A, De Vuyst L. (2006) Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*, 157: 241–247 doi:10.1016/j.resmic.2005.09.002
- Mantilla CL, Portacio AB. (2012) Potencial probiótico de cepas nativas para uso como aditivos en la alimentación avícola. *Revista Colombiana Biotecnología*, 14(1): 31-40.
- Marco ML, Heeney D, Binda S, Cifelli CJ, Cotter PD, Foligné B, Ganzle M, Kort R, Pasin G, Pihlanto A, Smid E, Hutkins R. (2017) Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44:94–102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>
- Marini MF. (2008) El avance de la frontera agrícola en el área adyacente al Sistema Sierras de la Ventana (Buenos Aires, Argentina). *Investigaciones Geográficas*, 47: 111-121.
- Maruščáková IC, Schusterová P, Bielik B, Toporčák J, Bíliková K, Mudroňová D. (2020) Effect of Application of Probiotic Pollen Suspension on Immune Response and Gut Microbiota of Honey Bees (*Apis mellifera*) Probiotics and Antimicrobial Proteins. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09626-6>
- Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. (2013) Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS Microbiology Letters*, 348(1):79–85. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12248>
- Matheson A. (1996) World bee health update 1996. *Bee World* 77, 45–51.
- Matheson A, Reid M. (1992) Strategies for the prevention and control of American foulbrood. Parts I, II, and III. *Am. Bee. J.* 132, 399–402. 133, 471-475; 143, 534-547.
- Matissek R, Schnepel F, Steiner G. (1998) *Food analysis: Fundamentals, methods, applications*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 1998: 430.
- McFarland LV. (2015) From yaks to yogurt: The history, development, and current use of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60, S85–S90. doi: 10.1093/cid/civ054
- McFarland LV, Evans CT, Goldstein EJC. (2018) Strain-Specificity and Disease-Specificity of Probiotic Efficacy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Medicine*, 7;5:124. doi: 10.3389/fmed.2018.00124. PMID: 29868585; PMCID: PMC5949321.
- Minelli PEB, Benini A. (2008) Relationship between number of bacteria and their probiotic effects. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 20: 180–183. DOI: 10.3402/mehd.v20i4.7577
- Ministerio de Agricultura, ganadería y pesca Argentina. [https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/cambio\\_rural/boletin/07\\_apicultura.php](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/cambio_rural/boletin/07_apicultura.php). Página consultada en marzo 2022.
- Moja J, Rodríguez G, Bedascarrasbure MB. (2022) Nutrición y alimentación de abejas en Manual de Buenas prácticas de alimentación de abejas: Un aporte a la calidad de la miel

- argentina. Convenio INTA- Nexco. ISBN 978-987-88-5100-6 . pp. 41-82.
- Monar Guerrero MA, Dávalos Teran I. (2013) Microbial characterization of handcrafted water kefir of Ecuadorian origin. PhD Thesis; College of Agriculture, Food and Nutrition, San Francisco de Quito University, Ecuador.
- Moliné MDLP, Fernández NJ, Damiani N, Churio MS, Gende LB. (2020) The effect of diet on *Apis mellifera* larval susceptibility to *Paenibacillus larvae*. Journal of Apicultural Research, 59(5), 817-824. DOI:<http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2020.1727086>
- Moradi M, Molaei R, Guimaraes JT. (2021) A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. Enzyme and Microbial Technology, 143; 109722. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109722>
- Moreno J, Peinado R. (2012) The Transformation of Must into Wine. In Enological Chemistry. Academic Press, pp 157 – 182. ISBN 9780123884381, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-388438-1.00011-X>.
- Morita Y, Nakamori S, Takagi H. (2002) Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 94 (5): 390-394 [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80214-6](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80214-6)
- Morse RA, Nowogrodzky R. (1990) Honey bee pests, predators and diseases. 2° edition. Ed. Cornell University.
- Muccilli S, Restuccia C. (2015) Bioprotective Role of Yeasts. Microorganisms, 3(4):588-611. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3040588>
- Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, Vanengelsdorp D, Pettis JS. (2010) High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. PLoS One, 19;5(3):e9754. doi: 10.1371/journal.pone.0009754. PMID: 20333298; PMCID: PMC2841636.
- Nally MC, Pesce VM, Maturano YP, Rodriguez Assaf LA, Toro ME, Castellanos de Figueroa LI, F. Vazquez F. (2015) Antifungal modes of action of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. International Journal of Food Microbiology. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.024
- Narendranath NV, Thomas KC, Ingledew WM. (2001) Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 26(3):171-7. doi: 10.1038/sj.jim.7000090. PMID: 11420658.
- Naug D. (2009) Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. Biological Conservation, 142(10), 2369–2372. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.04.007>
- Negri P, Maggi M, Correa-Aragunde N, Brasesco C, Eguaras M, Lamattina L. (2013) Nitric oxide participates at the first steps of *A. mellifera* cellular immune activation in response to

- non-self recognition. *Apidologie*, 44, 575–585. 10.1007/s13592-013-0207-8
- Negri P, Ramirez L, Quintana S, Szawarski N, Maggi M, Le Conte Y, Lamattina L, Eguaras M. (2017) Dietary Supplementation of Honey Bee Larvae with Arginine and Abscisic Acid Enhances Nitric Oxide and Granulocyte Immune Responses after Trauma. *Insects*, 8(3):85. <https://doi.org/10.3390/insects8030085>
- Nejati F, Junne S, Neubauer P. (2020) A Big World in Small Grain: A Review of Natural Milk Kefir Starters. *Microorganisms*, 8(2), 192; <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020192>
- Nemo R, Bacha K. (2020) Microbial, physicochemical and proximate analysis of selected Ethiopian traditional fermented beverages. *LWT*, 131. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109713>
- Neupane KR, Thapa RB. (2005) Alternative to off season sugar supplement feeding of honeybees, *Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science*, 26: 77–81. <https://doi.org/10.3126/jiaas.v26i0.615>.
- Nielsen DS, Cho, GS, Hanak A, Huch M, Franz CM, Arneborg N. (2010) The effect of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strains on the intracellular pH of sessile and planktonic *Listeria monocytogenes* single cells. *International Journal of Food Microbiology*, 141 Suppl 1:S53-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.040.
- Noor-ul-Ane M, Jung C. (2022) Effect of non-essential amino acids (proline and glutamic acid) and sugar polyol (sorbitol) on brood of honey bees. *Frontiers in Ecology and Evolution*, Volume 10 <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.1009670>
- Olmos AF, García de la Fuente C, Saéz Nieto JA, Valdezate Ramos S. (2010) Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. En *Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Öner Z, Karahan AG, Çakmakçı ML. (2010) Effects of different milk types and starter cultures on kefir. *Gıda* 35:177–182.
- Ortiz Baldera M. (2006) Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo. Trabajo de investigación para obtener el título de Químico en alimentos. Universidad Autónoma del estado de Hidalgo.
- Ortiz A, Reuto J, Fajardo E, Sarmiento S, Aguirre A, Arbeláez G, Gómez D, Quevedo-Hidalgo B. (2008) Evaluación de la capacidad probiótica “*in vitro*” de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. *Universitas Scientiarum*, 13( 2): 138-148
- Osanai M, Yonezawa Y. (1986) Changes in amino acid pools in the silkworm *Bombyx mori* during embryonic life. Alanine accumulation and its conversion to proline during diapause. *Insect Biochemistry*, 16: 373-97
- Ottogalli G, Galli A, Resmini P, Volonterio G. (1973) *Composizione microbiologica, chimica ed*

- ultrastruttura dei granuli di kefir. *Annuario Microbiologia*, 23: 109–121.
- Oviedo-León JF, Cornejo-Mazón M, Ortiz-Hernández R, Torres-Ramírez N, Hernández-Sánchez H, Castro-Rodríguez DC. (2024) Exploration of adherence properties of *Liquorilactobacillus* and *Lentilactobacillus* isolated from two different sources of tepache kefir grains. *PLoS ONE*, 19(2): e0297900. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297900>
- Pais P, Almeida V, Yılmaz M, Teixeira MC. (2020) *Saccharomyces boulardii*: What Makes It Tick as Successful Probiotic? *Journal of Fungi*, 6(2): 78. doi:10.3390/jof6020078
- Panghal A, Janghu S, Virkar K, Gat Y, Kumar V, Chhikara N (2018) Potential non-dairy probiotic products—A healthy approach. *Food Bioscience*, 21: 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.12.003>
- Parker CT, Tindall BJ, Garrity GM. (2019) International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69: S1–S111. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000778>
- Parolin C, Foschi C, Laghi L, Zhu CL, Banzola N, Gaspari V, D'Antuono A, Giordani B, Severgnini M, Consolandi C, Salvo M, Cevenini R, Vitali B, Marangoni A. (2018). Insights into vaginal bacterial communities and metabolic profiles of chlamydia trachomatis infection: positioning between eubiosis and dysbiosis. *Frontiers in Microbiology*, 28; 9:600. doi: 10.3389/fmicb.2018.00600
- Parte AC. (2018) LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68: 1825–1829. doi: 10.1099/ijsem.0.002786
- Picard C, Di Cello F, Vestura M, Fani R, Guckert A. (2000) Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:948–955. doi:10.1128/AEM.66.3.948-955.2000
- Plessas S, Kiousi DE, Rathosi M, Alexopoulos A, Kourkoutas A, Mantzourani I, Galanis A, Bezirtzoglou E. (2020) Isolation of a *Lactobacillus paracasei* Strain with Probiotic Attributes from Kefir Grains. *Biomedicines*, 8, 594. doi:10.3390/biomedicines8120594.
- Prado MR, Blandón LM, Vandenberghe L, Rodrigues C, Castro GR, Thomaz-Soccol V, Soccol CR (2015) Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology* 6:1177. doi: 10.3389/fmicb.2015.01177
- Polaina J, Adam AC. (1991) A fast procedure for yeast DNA purification. *Nucleic Acids Res* 19:5443.
- Potts SG. *et al.* (2016) Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540: 220–229. DOI <https://doi.org/10.1038/nature20588>
- Ptaszyńska AA, Borsuk G, Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M, Małek W. (2016) Are commercial

- probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee nose mites? *Parasitology Research*, 115: 397–406. doi: 10.1007/s00436-015-4761-z.
- Rahman K, Dash BK, Forhad KS, Rahman SM, Hossain KM. (2015) Characterization of probiotic bacteria isolated from regional chicken feces. *African Journal of Microbiology Research*, 9(12): 880-885. DOI: 10.5897/AJMR2015.7384
- Rainieri S, Zambonelli C, Hallsworth J, Pulvirenti A, Giudici P. (1999) *Saccharomyces uvarum*, a distinct group within *Saccharomyces sensu stricto*, *FEMS Microbiology Letters*, 177 (1): 177–185. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13729.x>
- Ramsey SD, Ochoa R, Bauchan G, Gulbranson C, Mowery JD, Cohen A, Lim D, Joklik J, Cicero JM, Ellis JD, Hawthorne D, van Engelsdorp D. (2019) *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 116(5):1792-1801. doi: 10.1073/pnas.1818371116.
- Randazzo W, Corona O, Guarcello R, Francesca N, Germana MA, Erten H, Moschetti G, Settanni L. (2016) Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiology* 54: 40-51
- Rauch S, Ashiralieva A, Hedtke K, Genersch E. (2009) Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood of honeybees. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10): 3344–3347. doi:10.1128/AEM.02839-08
- Raymann K, Shaffer Z, Moran NA. (2017) Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLoS Biology*, 15, e2001861
- Razdan K, Parihar J, Bajaj BK. (2012) Isolation and characterization of a lipolytic and phytase producing probiotic for potential application in poultry feed. *Online Journal of Animal and Feed Research*, 2: 369-377.
- Reid G, Bruce AW, Fraser N, Heinemann C, Owen J, Henning B. (2001) Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 30: 49–52. doi: 10.1111/j.1574-695X.2001.tb01549.x.
- Research Council (U.S.). Committee on metagenomics: challenges and functional applications, n. The new science of metagenomics: revealing the secrets of our microbial planet. [S. l.], 2007. 158 p
- Reynaldi FJ, De Giusti MR, Alippi AM. (2004) Inhibition of the growth of *Ascosphaera apis* by *Bacillus* and *Paenibacillus* strains isolated from honey. *Revista Argentina de Microbiología*, 36: 52-55.
- Reynaldi FJ. (2006) “Evaluación de antibióticos para el control de loque americana en colmenas de abejas melíferas”. Tesis Doctoral. Unidad de Bacteriología del CIDEFI, Fac. Cs. Agr. y Ftiles. UNLP. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.

- Rinderer TE, Collins MA. (1986) Behavioural Genetics. In: Bee Genetics and Breeding. (Rinderer, T.E., ed.). Academic Press, Inc. London, United Kingdom.
- Rodicio MR, Mendoza MC. (2004) Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4):238-45
- Rodríguez MA, Fernández LA, Daisley BA, Reynaldi FJ, Allen-Vercoe E, Thompson GJ. (2023) Probiotics and in-hive fermentation as a source of beneficial microbes to support the gut microbial health of honey bees. *Journal of Insect Science*, 23 (6). <https://doi.org/10.1093/jisesa/iead093>
- Romero Luna HE, Hernández-Sánchez H, Ribas-Aparicio RM, Cauich-Sánchez PI, Dávila-Ortiz G. (2018) Evaluation of the Probiotic Potential of *Saccharomyces cerevisiae* Strain (C41) Isolated from Tibicos by *In Vitro* Studies. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9471-2>.
- Rondón L, Samaniego M, Bocourt R, Rodríguez S, Milián G, Ranilla MJ, Laurencio M, Pérez M. (2008) Isolation, identification and partial characterization of the probiotic properties of *Lactobacillus* sp. strains obtained from the gastrointestinal tract of broilers, *CYTA - Journal of Food*, 6:1, 56-63, DOI: 10.1080/11358120809487628.
- Rosa DD, Dias MMS, Grześkowiak ŁM, Reis SA, Conceição LL, do, CG, Peluzio M. (2017) Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, 30 (01): 82–96. doi: 10.1017/S0954422416000275.
- Rosi J, Rossi J. (1978) The kefir microorganisms: The lactic acid bacteria. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 29: 291–305.
- Roy D. 2001. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 69: 167–182.
- Ruggirello M, Nucera D, Cannoni M, Peraino A, Rosso F, Fontana M, Cocolin L, Dolci P. (2019) Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. *Food Research International*, 115: 519–525 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.002>
- Saito VS, dos Santos TF, Vinderola CG, Romano C, Nicoli JR, Araújo LS, Costa MM, Andrioli JL, Uetanabaro AP. (2014) Viability and resistance of lactobacilli isolated from cocoa fermentation to simulated gastrointestinal digestive steps in soy yogurt. *Journal of Food Science*, 79 M208eM213.
- Sakko M, Moore C, Novak-Frazer L, Rautemaa V, Sorsa T, Hietala P, Järvinen A, Bowyer P, Tjäderhane L, Rautemaa R. (2013) 2-hydroxyisocaproic acid is fungicidal for *Candida* and *Aspergillus* species. *Mycoses*, 57 (4): 214-221 <https://doi.org/10.1111/myc.12145>
- Salazar Alzate BC, Montoya Campuzano OI, Sepúlveda Valencia JU. (2005) Viabilidad de un

aislado nativo de *Lactobacillus brevis* en una bebida láctea Fermentada. Archivos Latinoamericanos de Nutrición versión impresa ISSN 0004-0622 ALAN v.55 n.4 Caracas dic. 2005

- Salminen S, Deighton MA, Gorbach SL. (1993) Lactic acid bacteria in health and disease, In: Salminen, S.; von Wright, A., eds. Lactic acid bacteria. New York:Marce IDekker Inc, pp. 199-225
- Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA. (2019) Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. Nature Reviews. Gastroenterology and Hepatology, 16: 605–616. doi: 10.1038/s41575-019-0173-3.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. (2009) Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 75: 7537–7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09
- Schwarz RS, Moran NA, Evans JD. (2016) Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 113: 9345–9350. doi: 10.1073/pnas.1606631113.
- Sharma A, Mukherjee S, Reddy Tadi SR, Ramesh A, Sivaprakasam S. (2021) Kinetics of growth, plantaricin and lactic acid production in whey permeate based medium by probiotic *Lactobacillus plantarum* CRA52. LWT, 139, 110744. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110744>
- Shimanuki H. (1990) Bacteria. En: Morse RA, Nowogrodzki R, editors. Honey bee pests, predators and diseases. Ithaca, NY, Cornell University Press, p. 27-47.
- Shruthi B, Nagaraj D, Somashekaraiah R, Gunduraj A, Divyashree S, Sreenivasa MY. (2022) Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review. Biotechnology Reports, 34:e00716. DOI: 10.1016/j.btre.2022.e00716
- Sica MG. (2013) Bacterias lácticas del estuario de Bahía Blanca. Evaluación de sus propiedades probióticas para su potencial uso en el cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis doctor en Bioquímica, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
- Sindi A, Badahur Badsha MD, Unlu G (2020) Bacterial Populations in International Artisanal Kefirs. Microorganisms, 8(9), 1318; <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091318>
- Siedler S, Balti R, Neves AR. (2019) Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food, Current Opinion in Biotechnology, 56: 138–146, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.015>
- Simova E, Beshkova D, Angelov A, Hristozova T, Frengova G, Spasov Z. (2002) Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. Journal of Industrial

- Microbiology and Biotechnology, 28(1): 1-6. doi: 10.1038/sj/jim/7000186.
- Situm T. (2020) A comparison of ethanol content of water kefir products to kombucha products and their compliance to British Columbia's Liquor Control and Licensing Act. BCIT Environmental Public Health Journal. <https://doi.org/10.47339/ephj.2020.21>
- Smart KA, Chambers KM, Lambert I, Jenkins C, Smart CA (1999) Use of Methylene Violet Staining Procedures to Determine Yeast Viability and Vitality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 57: 1, 18-23, DOI: 10.1094/ASBCJ-57-0018
- Smriti Rana A, Singh G, Gupta G. (2024) Prospects of probiotics in beekeeping: a review for sustainable approach to boost honeybee health. *Archives of Microbiology*, 206:205 <https://doi.org/10.1007/s00203-024-03926-4>
- Solá-Oriol D, Torrallardona D, Pérez JF. (2012) Influencia de la percepción sensorial sobre el consumo voluntario en lechones: palatabilidad de las materias primas en piensos de iniciación. XXVIII Curso de especialización FEDNA., Madrid 2012.
- Spivak M, Reuter GS. (2001) Resistance to American Foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie*, 32: 555-565.
- Stadie J, Gulitz A, Ehrmann MA, Vogel RF. (2013) Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiology*, 35: 92-98. doi: 10.1016/j.fm.2013.03.009.
- Staniszewski A, Kordowska-Wiater M. (2021) Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts—Characteristics and Food Application *Foods*, 10(6), 1306; <https://doi.org/10.3390/foods10061306>
- Sturtevant AP. (1932). Relation of commercial honey to the spread of American foulbrood. *Journal of Agricultural Research*, 45: 257-285
- Suárez-Machín C, Garrido-Carralero NA, Guevara-Rodríguez CA. (2016) Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. 50, núm. 1, enero-abril, 2016, pp. 20-28
- Subsecretaría de Programación Microeconómica, Ministerio de Hacienda de la Nación. Registro DNDA en trámite. (2018) Ciudad Autónoma de Buenos Aires – República Argentina. URL: <https://www.argentina.gob.ar/hacienda>
- Syrokou MK, Papadelli M, Ntaikou J, Paramithiotis S, Drosinos EH. (2019) Sugary kefir: microbial identification and biotechnological properties. *Beverages*, 5:61, <http://dx.doi.org/10.3390/beverages5040061>.
- Szawarski N, Saez A, Domínguez E, Dickson R, De Matteis A, Eciolaza C, Justel M, Aliano A, Solar P, Bergara I, Pons C, Bolognesi A, Carna G, Garcia W, Garcia O, Eguaras M, Lamattina L, Maggi M, Negri P. (2019) Effect of Abscisic Acid (ABA) Combined with Two Different Beekeeping Nutritional Strategies to Confront Overwintering: Studies on Honey Bees' Population Dynamics and Nosemosis. *Insects*, 10, 329;

doi:10.3390/insects10100329

- Szawarski N, Giménez-Martínez P, Mitton G, Negri P, Meroi Arcerito F, Moliné MP, Fuselli S, Eguaras M, Lamattina L, Maggi M. (2020) Antimicrobial activity of indoleacetic, gibberellic and coumaric acids against *Paenibacillus larvae* and its toxicity against *Apis mellifera*. Spanish Journal of Agricultural Research, 18 (1), <https://doi.org/10.5424/sjar/2020181-15158>
- Tamang JP, Lama S. (2022) Probiotic properties of yeasts in traditional fermented foods and beverages. Journal of Applied Microbiology. <https://doi.org/10.1111/jam.15467>.
- Tamhane AC. (1979) A Comparison of Procedures for Multiple Comparisons of Means with Unequal Variances. Journal of the American Statistical Association, 74 (366a): 471-480, DOI: 10.1080/01621459.1979.10482541
- Tan LL, Ngiam JJ, Edric SZ, Conway PL, Loo JSC. (2022) *Liquorilactobacillus satsumensis* from water kefir yields a-glucan polysaccharides with prebiotic and synbiotic qualities. Carbohydrate Polymers, 290:119515, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119515.34>
- Tanada Y, Kaya HK. (1993) Insect pathology. Academic Press. San Diego, California (USA).
- Tang W, Li C, He Z, Pan F, Pan S, Wang Y. (2018) Probiotic Properties and Cellular Antioxidant Activity of *Lactobacillus plantarum* MA2 Isolated from Tibetan Kefir Grains. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 10(3): 523–533. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9349-8>
- Tanner G, Matthews K, Roeder H, Konopasek M, Bussard A, Gregory T. (2018) Current and future uses of probiotics. Journal of the American Academy of Physician Assistants. DOI: 10.1097/01.JAA.0000532117.21250.0f
- Terra WR, Ferriera C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comparative Biochemistry and Physiology, 109(1):1-62, DOI: 10.1016/0305-0491(94)90141-4
- Thoreux K, Schmucker DL. (2001) Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. Journal of Nutrition, 131: 807-812. DOI: 10.1093/jn/131.3.807.
- To BCS, Etzel MR. (1997) Spray Drying, Freeze Drying, or Freezing of Three Different Lactic Acid Bacteria Species. Journal of Food Science, 62(3): 576–578. doi:10.1111/j.1365-2621.1997.tb04434.x
- Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, Salminen S. (2001) Quality assurance criteria for probiotic bacteria. The American Journal of Clinical Nutrition, 73(2):393S-398S. doi: 10.1093/ajcn/73.2.393s. PMID: 11157347
- Turker G, Kizilkaya B, Cevik N (2013) The mineral composition of kefir produced from goat and cow milk. Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.11 (2): 62-65.
- van den Akker CHP, van Goudoever JB, Szajewska H, Embleton ND, Hojsak I, Reid D, Shamir R; ESPGHAN Working Group for Probiotics, Prebiotics & Committee on Nutrition. (2018)

- Probiotics for Preterm Infants: A Strain-Specific Systematic Review and Network Meta-analysis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 67(1):103-122. doi: 10.1097/MPG.0000000000001897. PMID: 29384838.
- Vardjan T, Mohar Lorbeg P, Rogelj I, Čanžek Majhenič A. (2013) Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 96(5):2729-36. doi: 10.3168/jds.2012-5829.
- Vázquez DE, Arredondo D. (2024) Taller de cría de abejas en laboratorio: periodo pre-imaginal
- Verce M, De Vuyst L, Weckx S. (2019) Shotgun metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel *Oenococcus* species. *Frontiers in Microbiology*, 10:479, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00479>.
- Vicente J, Calderón F, Santos A, Marquina D, Benito S. (2021) High Potential of *Pichia kluyveri* and Other *Pichia* Species in Wine Technology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3):1196. <https://doi.org/10.3390/ijms22031196>
- Vinderola CG, Duarte J, Thangavel D, Perdigon G, Farnworth E, Matar C. (2005) Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, 72:195-202. doi: 10.1017/s0022029905000828
- Walsh AM, Crispie F, Kilcawley K, O'Sullivan O, O'Sullivan MG, Claesson MJ, Cotter PD. (2016) Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir. *MSystems*, 1(5):e00052-e116. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00052-16>
- Weaver N. (1957) Effects of larval age on dimorphic differentiation of the female honey bee. *Annals of the Entomological Society of America*, 50: 283–294.
- Wheeler DE, Kawooya JK. (1990) Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 14: 73-79. <http://dx.doi.org/10.1002/arch.940140405>
- White J, Hekmat S. (2018) Development of Probiotic Fruit Juices Using *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 Fortified with Short Chain and Long Chain Inulin Fiber. *Fermentation*, 4(2), 27; <https://doi.org/10.3390/fermentation4020027>
- WHO/FAO (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.
- Winston ML. (1991) The biology of the honey bee. (Harvard University Press).
- Wilson-Rich N, Dres ST, Starks PT. (2008) The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 54(10-11): 1392-1399. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.016>
- Witthuhn RC, Schoeman T, Britz TJ. (2004) Isolation and characterization of the microbial population of different south african kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, 57(1): 33-37. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00126.x>
- Wu Y, Zheng Y, Chen Y, Wang S, Chen Y, Hu F, Zheng H. (2020) Honey bee (*Apis mellifera*)

gut microbiota promotes host endogenous detoxification capability via regulation of P450 gene expression in the digestive tract. *Microbial Biotechnology*, 4: 1201–1212. doi: 10.1111/1751-7915.13579

- Wulansari PD, Widodo W, Sunarti S, Nurliyani N. (2022). Incorporation of oat milk with probiotic *Lactocaseibacillus casei* AP improves the quality of kefir produced from goat milk. *Food Science and Technology*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.10322>
- Yang SH, Seo SH, Kim SW, Choi SK, Kim DH. (2006) Effect of ginseng polysaccharide on the stability of lactic acid bacteria during freeze-drying process and storage. *Archives of Pharmacal Research*, 29(9): 735–740. doi:10.1007/bf02974072
- Yerlikaya O, Akan E, Kinik O. (2022) The metagenomic composition of water kefir microbiota. *International Journal of Gastron Food Science*, 30:100621, <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-021-03358-3>
- Zheng H, Nishida A, Kwong W, Koch H, Engel P, Steele M, Moranet N. (2016) Metabolism of toxic sugars by strains of the bee gut symbiont *Gilliamella apicola*. *mBio* 7, e01326-16. doi: 10.1128/mBio.01326-16
- Zheng H, Powell JE, Steele MI, Dietrich C, Moran NA. (2017) Honeybee gut microbiota promotes host weight gain via bacterial metabolism and hormonal signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 114: 4775–4780. doi: 10.1073/pnas.1701819114.
- Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz C, Harris H, Mattarelli P, O'Toole P, Pot B, Vandamme P, Walter J, Watanabe K, Wuyts S, Felis G, Gänzle M, Lebeer S. (2020) A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70:2782–858, <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004107.5>
- Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM. (1996) DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, (2): 316–322.

## **ANEXO - Publicaciones científicas y presentaciones a Congresos**

A continuación, se detallan las publicaciones y presentaciones a congresos originados durante el desarrollo de esta tesis.

### **Publicaciones en revistas con Comité Editorial**

- **Rodríguez, MA.**, Fernández, LA., Díaz, ML., Gallo, CA., Corona, M., Evans, J., Reynaldi, FJ. Bacterial diversity using metagenomics of 16s rDNA in water kefir, an innovative source of probiotics for bee nutrition. 2024. Revista Argentina de Microbiología, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.12.002>
- **Rodríguez, MA.**, Fernández, LA., Daisley BA., Reynaldi, FJ., Allen-Vercoe, E., Thompson, GJ. Probiotics and in-hive fermentation as a source of beneficial microbes to support the gut microbial health of honey bees. 2023. Journal of Insect Science, 23 (6). <https://doi.org/10.1093/jisesa/iead093>
- **Rodríguez, MA.**, Fernández, LA., Díaz, ML., Pérez, M., Corona, M., Reynaldi, FJ. Microbiological and chemical characterization of water kefir: An innovative source of potential probiotics for bee nutrition. Revista Argentina de Microbiología. 2022: 30(40):30-35 <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.09.003>

### **Publicaciones en revistas de divulgación científica (con Comité Editorial)**

- Fernández, LA., Ledesma, MF., **Rodríguez, MA.**, Reynaldi, FJ, Echazarreta, JM., López, G., Tourn, E. 2024. Nutrición en *Apis mellifera* L. Digestibilidad de nutrientes y desarrollo de complementos alimenticios con probióticos. Campo & Abejas N° 154, mayo/junio 2024, págs. 3-6.
- Battiston, TE, **Rodríguez, MA**, Fernández, LA. 2022. Probióticos y abejas: aliados en la apicultura. Ciencia Hoy N° 181, Vol 31, agosto/septiembre 2022, págs. 50-54.
- Fernández, LA., **Rodríguez, MA.**, Cibanal, IL., Iáconis, D., Gallez, LM. 2020. Los productos apícolas: Un complemento en la dieta para enfrentar mejor el covid-19. Informe técnico. Campo & Abejas N° 130, junio 2020, págs. 6-11.

## Presentaciones a Congresos

- Daisley, BA., Mallory, E., Chernyshova, AM., Pitek, AP., **Rodríguez, MA.**, Killam, SM., Lacika, JF., Allen-Vercoe, E., Thompson, GJ. 2023. "The Canadian Bee Gut Project". 48° Congreso Internacional de Apicultura – APIMONDIA, Santiago de Chile, Chile, del 4 al 8 de septiembre de 2023.
- **Rodríguez, MA.**, Daisley, BA., Fernández, LA., Díaz, ML., Gallo CA., Corona, M., Evans, J., Reynaldi, FJ., Thompson, GJ. 2023. "Potential probiotic bacteria isolated from water kefir and their inhibitory effect against the contagious bee pathogen *Paenibacillus larvae*". 53<sup>rd</sup> Ontario Ecology Ethology and Evolution Colloquium - OE3C 2023, London, Ontario (Canadá), del 25 al 27 de mayo de 2023.
- **Rodríguez, MA.**, Ibañez Battiston, T., Fernández, LA., Reynaldi, FJ. 2022. "Sustancias solubles liberadas por levaduras aisladas de kéfir de agua: efecto sobre *Ascosphaera apis* y su potencial uso en alimentación de larvas de abejas". XV Congreso Latinoamericano de Apicultura – FILAPI 2022, Cusco (Perú), (envío de resumen), del 17 al 19 de noviembre de 2022.
- **Rodríguez, MA.**, Fernández, LA., Diaz, ML., Reynaldi, FJ. 2021. "Levaduras aisladas de kéfir de agua: potencial probiótico y su efecto sobre *Paenibacillus larvae*". I Congreso Virtual de Microbiología Veterinaria, La Plata, Buenos Aires (Argentina), del 4 al 6 de agosto de 2021.
- **Rodríguez, MA.**, Fernández, LA., Reynaldi, FJ., Gallez, LM. 2020. "Efecto de bacterias con potencial probiótico aisladas de kéfir de agua sobre el patógeno *Paenibacillus larvae*". XIV Congreso Latinoamericano de Apicultura – FILAPI 2020, (Chile), evento online, del 3 al 7 de noviembre de 2020.
- **Rodríguez, MA.**, Fernández, LA., Gallez, LM. 2019. "Ensayos preliminares sobre la actividad probiótica *in vitro* de sobrenadante de kéfir en la alimentación de larvas de *Apis mellifera*". XV Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires Capital (Argentina), del 25 al 27 de septiembre de 2019.