

ESTUDIO PRELIMINAR *IN VIVO* DEL EFECTO DE *APILACTOBACILLUS KUNKEEI* (LSAJ) Y *LACTOBACILLUS HELSINGBORGENSIS* (LSAI) SOBRE PATÓGENOS Y PARÁSITOS DE *APIS MELLIFERA*

IN VIVO PRELIMINARY STUDY OF THE EFFECT OF *APILACTOBACILLUS KUNKEEI* (LSAJ) AND *LACTOBACILLUS HELSINGBORGENSIS* (LSAI) ON PATHOGENS AND PARASITES OF *APIS MELLIFERA*

Jose J. ¹, Cabana M. J. ^{1,2*} y Benítez Ahrendts M. R. ^{1,2,3}

¹ Catedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias-UNJu; ² Laboratorio de Sanidad Apícola y Melipónica; ³ Instituto de Ecorregiones Andinas (INECOA-CONICET)

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

Período de Publicación:
Diciembre 2024

Historial:
Recibido: 31/07/2024
Aceptado: 04/11/2024

RESUMEN

En la provincia de Jujuy se registra pérdidas de colmenas de *Apis mellifera* ocasionada por *Varroa destructor* y *Nosema* spp. Una alternativa para controlar dicho parásito y patógeno es la utilización de bacterias lácticas potencialmente probióticas, que suministradas en cantidades necesarias generan bienestar en la microbiota intestinal de las abejas, haciéndolas resistente frente a las enfermedades. En este estudio se aplicaron dos bacterias lácticas autóctona de la provincia de Jujuy, *Apilactobacillus kunkeei* (LSAJ) y *Lactobacillus helsingborgensis* (LSAI) aislados de pan de polen y se evaluó su efecto *in vivo* sobre *V. destructor* y *N. spp.* El ensayo se realizó en colmenas de la Finca Experimental Emilio Navea de la Facultad de Ciencias Agrarias (UNJu), desde Marzo a Julio del 2019. Las bacterias fueron vehiculizadas a las colmenas en jarabe que contenía 125 gr de azúcar /litro de agua, y se emplearon colmenas testigos a las cuales se les suministró solamente el jarabe. Se evaluaron los índices de *V. destructor* y *N. spp.* un mes antes de iniciar los ensayos, donde se tomaron muestras de todas las colmenas, posteriormente se aplicaron las bacterias lácticas una vez al mes durante un período de 4 meses. En cada mes de aplicación se recogieron muestras de las colmenas para realizar los análisis. Los resultados indicaron una disminución de los valores de *V. destructor* en las colmenas con ambos tratamientos con índices del 0% en los 4 meses, mientras que para el control registraron valores mayores del 1%. En lo que respecta a *N. spp.*, el control reportó $1,0 \times 10^6$ esporas/abejas, mientras que *L. helsingborgensis* 60,000 esporos /abejas y *A. kunkeei*, 20,000 esporos/abejas, siendo *A. kunkeei* quien presentó valores muy bajos, reduciendo más del 70% *N. spp.* Por lo que *A. kunkeei* evidenció mejor efecto *in vivo* sobre ambas enfermedades.

Palabras clave: bacterias lácticas, *Varroa destructor*, *Nosema* spp.

SUMMARY

In Jujuy province, losses of *Apis mellifera* hives caused by *Varroa destructor* and *Nosema* spp. are recorded. An alternative to control this parasite and pathogen is the use of potentially probiotic lactic acid bacteria, which, supplied in necessary quantities, generates well-being in the intestinal microbiota of bees, making them resistant to diseases. In this study, two lactic acid bacteria native to Jujuy province, *Apilactobacillus kunkeei* (LSA) and *Lactobacillus helsingborgensis* (LSAI), isolated from pollen bread, were applied and their effect in vivo on *V. destructor* and *N. spp* was evaluated. The test was carried out in hives located at the Emilio Navea Experimental Farm of the Agricultural Sciences Faculty (UNJu), from March to July 2019. The bacteria were transported to the hives in syrup containing 125g of sugar/litre of water, and control hives were used to which only the syrup was supplied. The indices of *V. destructor* and *N. spp* were evaluated one month before starting the trials, where samples were taken from all the hives, subsequently the lactic acid bacteria were applied once a month for a period of 4 months. In each month of application, samples were collected from the hives for analysis. The results indicated a decrease in the values of *V. destructor* in the hives with both treatments with rates of 0% in the 4 months, whereas for the control the values recorded were over 1%. Regarding *N. spp*, the control reported 1.0×10^6 spores/bees, while *L. helsingborgensis* 60,000 spores/bees and *A. kunkeei*, 20,000 spores/bees, with *A. kunkeei* presenting very low values, by reducing more than 70% *N. spp*. Therefore, *A. kunkeei* showed a better in vivo effect on both diseases.

Keywords: lactic acid bacteria, *Nosema* spp., *Varroa destructor*.

INTRODUCCIÓN

Los apiaros en la provincia de Jujuy se encuentran afectados en su mayoría por el ácaro *Varroa destructor* y el microsporidio *Nosema* spp., que producen colmenas débiles, con poca productividad y ocasionando muchas veces su pérdida (Tejerina *et al.*, 2022).

N. spp afecta a la microbiota intestinal causando nosemosis, cuyas esporas se propagan a partir de la alimentación, afectando a las abejas obreras. Este microsporidium coloniza el epitelio del intestino medio encargado de la absorción de los nutrientes, causando disentería y lesiones, provocando posteriormente la muerte de las abejas (Tauber *et al.*, 2019; Soklic & Gregorc, 2016).

Así mismo otras de las enfermedades que afectan a las abejas es el parásito *V. destructor* causante de la varroasis, un ácaro que parasita a las abejas adultas y larvas, alimentándose de los tejidos grasos de las abejas (Ramsey *et al.*, 2019). Estos mismos autores señalan que las abejas afectadas por la varroasis presentan el tejido del cuerpo dañado, con obstaculización en la producción de péptidos antimicrobianos e impedimento a la respuesta inmunológica.

Sin embargo, el empleo de antibióticos o antifúngicos para controlar estas enfermedades como otras comprende tratamientos de larga duración, y uso de profilaxis que no eliminan al patógeno completamente. Lo cual provoca mecanismos de resistencias a antibiótico, produciendo disbiosis intestinal y dejando residuos en productos de la colmena (Jia *et al.*, 2022; Krongdang *et al.*, 2017).

Por tal razón en los últimos tiempos para controlar las enfermedades se comenzó aplicar bacterias lácticas potencialmente probióticas, definiendo a las mismas como “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio en el anfitrión” (Morelli & Capurso 2012). Lashani *et al.*, (2020) y De Melo Pereira *et al.*, (2018) mencionan que para considerar una bacteria láctica como potencial probiótico deben cumplir ciertas condiciones como no ser potencialmente patógena, formar parte del nicho ecológico que se pretenda aplicar, y ser obtenidas del huésped destinatario.

Es importante destacar que los efectos que presentan los *Lactobacillus* es por ser cepas dependientes, demostrando diferentes comportamientos frente a las diversas enfermedades (Iorizzo *et al.*, 2020).

En el año 2021 el laboratorio de Sanidad apícola de la Facultad de Ciencias Agrarias Unju, aisló bacterias autóctonas del pan de polen de apiarios de la provincia de Jujuy. Las cuales se identificaron como *Lactobacillus helsingborgensis* (LSAI) y *Apilactobacillus kunkeei* (LSAJ) que demostraron en ensayos *in vitro* ser potencialmente probióticas (Cabana *et al.*, 2021).

En esta investigación se planteó realizar el análisis preliminar del efecto *in vivo* de *A. kunkeei* (LSAJ) y *L. helsingborgensis* (LSAI) sobre *Varroa destructor* y *Nosema* spp de *Apis mellifera* en un apiario de la localidad El Carmen, Jujuy.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención del material biológico

Las bacterias *A. kunkeei* (LSAJ-MF435935), *L. helsingborgensis* (LSAJ-MF435934), se aislaron de panes de pólenes provenientes de apiarios del departamento Dr. Manuel Belgrano, de la provincia de Jujuy. Conservadas en el cepario del Laboratorio de Sanidad Apícola y melipónica (FCA-UNJu).

Análisis preliminares del efecto *in vivo* de *A. kunkeei* y *L. helsingborgensis* sobre un patógeno y parásito de *Apis mellifera* en un apiario de la localidad el Carmen, Jujuy.

El ensayo se efectuó en el apiario demostrativo que posee el Laboratorio de Sanidad Apícola. Ubicado en la Finca Experimental Emilio Navea, de la Facultad de Ciencias Agrarias, paraje Severino de la localidad de El Carmen, durante los meses de Marzo – Julio del 2019.

Selección de colmenas

Se seleccionaron 3 colmenas para cada tratamiento con bacterias lácticas y 3 colmenas testigos/control. Las cuales se ubicaron en forma paralelas en tres grupos, cada grupo contaba con una colmena testigo. Las cámaras de crías se igualaron al momento de iniciar el ensayo.

Aplicación de bacterias lácticas *A. kunkeei* y *L. helsingborgensis* en las colmenas ensayos

Se aplicó una concentración de 1×10^8 UFC/mL de cada bacteria por colmena tratamiento. Los lactobacilos fueron activados 24 horas antes de la aplicación en 5 ml de caldo De Man, Rogosa & Sharpe (MRS, Britania, Buenos Aires, Argentina). Vehiculizadas en un jarabe de sacarosa de uso comercial que contenía 125 gr/litro de agua que se aplicaron en alimentadores tipo Doolittle. Las colmenas testigo/control recibieron el jarabe de sacarosa sin las bacterias.

Los suministros se realizaron una vez al mes por un período de 4 meses, transcurrido este lapso de tiempo se analizó la incidencia total de *V.destructor* y *N. spp.* en todas las colmenas.

El análisis de la incidencia de varroasis y nosemosis, se realizó en el laboratorio de Sanidad Apícola de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Jujuy.

Determinación de la incidencia de *V. destructor*

La incidencia de varroasis se evaluó en cada mes de ensayo y posteriormente su efecto final, mediante la prueba del frasco (De Jong *et al.*, 1980). Se utilizaron frascos de boca ancha que contenían 200 ml de agua con 5 gotas de detergente. El cual consistió en deslizar cada frasco etiquetado para cada colmena, en ambos lados de cuadros con crías abiertas desde arriba hacia abajo, tomando aproximadamente muestras de 300 abejas por colmena.

Posteriormente en el laboratorio se procedió a agitar los frascos y filtrar las muestras, contando el número de abejas y el número de *Varroa* obtenidas por cada colmena tratamiento y testigo. La variable de niveles de infestación de *Varroa* se evaluó con la siguiente fórmula: $[\text{ácaros} / \text{abejas}] \times 100 = \text{porcentaje de parasitismo}$. Índices mayores al 1 % se consideraron niveles altos de varroasis, menores del 1% valores bajos.

Determinación la incidencia de *N. spp.*

La incidencia de *N. spp.* en los meses de aplicación y el efecto final, se determinó de acuerdo a la técnica de Cantwell (1970). Para el análisis se recolectó abejas pecoreadoras (adultas) en la entrada de cada colmena, empleando también las abejas capturadas para la determinación de incidencia de varroasis. (Abejas nodrizas). Se procedió a separar 30 abdómenes de abejas, macerándolas con 30 ml de agua y se agitó la muestra, colocando posteriormente una alícuota en la cámara de Neubauer. Luego se procedió a contabilizar el número de esporas en los 25 cuadrantes de la cámara.

La variable de infestación de *N. spp.* se determinó con la siguiente fórmula expresada por Tapia González *et al.*, (2017) : $N^\circ \text{ de esporas por abejas} = [N^\circ \text{ total de esporas contadas} / 80] \times 4.000.000$. Siendo los índices de infestación: muy leve (10^4 - 10^6), leve (10^6 - 5×10^6), moderado (5×10^6 - 10^7), semifuerte (10^7 - 2×10^7), fuerte (2×10^7), según la tabla de Jaycox (Molina *et al.*, 1990).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos de *V. destructor* y *N.spp.*, se empleó el programa estadístico INFOSTA. Aplicando un diseño experimental en bloque (DBCA) y la interacción para determinar el efecto de los tratamientos en cada uno de los meses de aplicación. Para una mejor comprensión de los datos se utilizó el Test de Tukey (Di Rienzo *et al.*, 2011).

RESULTADO

Efecto de los diferentes tratamientos de bacterias lácticas en *V. destructor* por cada mes de aplicación

Antes de la aplicación de las bacterias, las incidencias de varroasis para las colmenas elegidas para el tratamiento con *L. helsingbergensis* correspondieron a 6,5 % y del 7,25 % para aquellas que obtuvieron los tratamientos con *A. kunkeei*, mientras que las testigos indicaron el 9,6 % de varroasis.

En el primer mes de aplicación, las colmenas testigos presentaron un promedio de 7,75% de varroasis. Mientras que los tratamientos presentaron un promedio del 0 % para *A. kunkeei* y del 0% para *L. helsingbergensis*. En el segundo mes de aplicación el porcentaje del efecto de la enfermedad en ambas colmenas tratamiento fue del 0 %, mientras que el testigo presentó el 6, 75% de varroasis.

En el tercer y cuarto mes de aplicación, se mantuvo una constante del índice de varroasis para los dos tratamientos siendo 0%, mientras que el testigo presentó el 6, 5% y 6 % para los respectivos períodos.

El análisis estadístico demostró diferencia significativa con un p –valor de <0,0001 entre la interacción de los diferentes meses de aplicación de los tratamientos y los testigos. La comparación de las medias no registraron diferencia entre las aplicación de los diversos tratamientos con bacterias lácticas en cada mes de aplicación.

Se registró el efecto de los tratamientos por cada mes de aplicación de las bacterias en un lapso de 4 meses, registrando descenso inmediato del porcentaje de *V. destructor* en los meses de ensayos (Fig. 1).

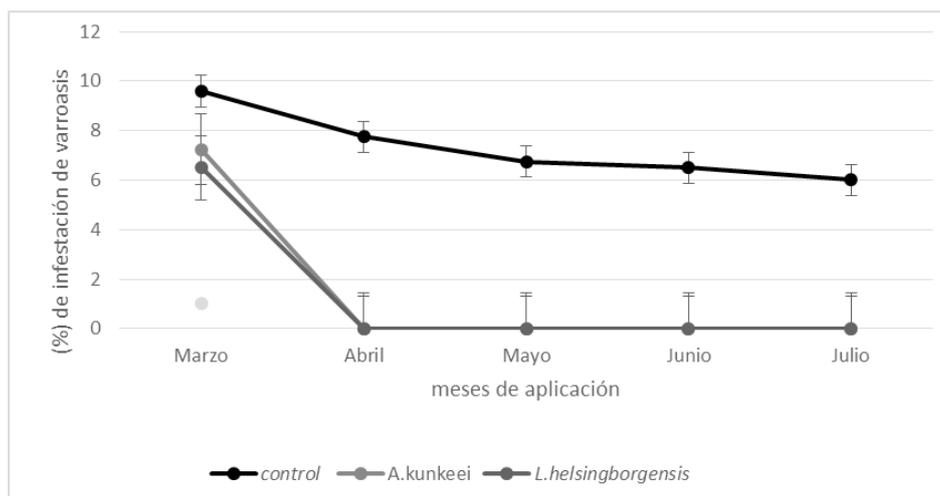


Figura 1: Efecto de los diferentes tratamientos de bacterias lácticas en *V. destructor* por cada mes de aplicación.

Determinación de la incidencia de *V. destructor*

Se observó la incidencia de ambos tratamientos con bacterias lácticas en *V. destructor*, registrando valores del 0% de varroasis para *A. kunkeei* y *L. helsingborgensis*. El análisis estadístico comprobó diferencia significativa con un p-valor de 0,001 entre los tratamientos y el testigo, y al realizar la comparación entre las medias no se registró diferencia significativa entre ambos tratamientos con bacterias lácticas (Fig.2).

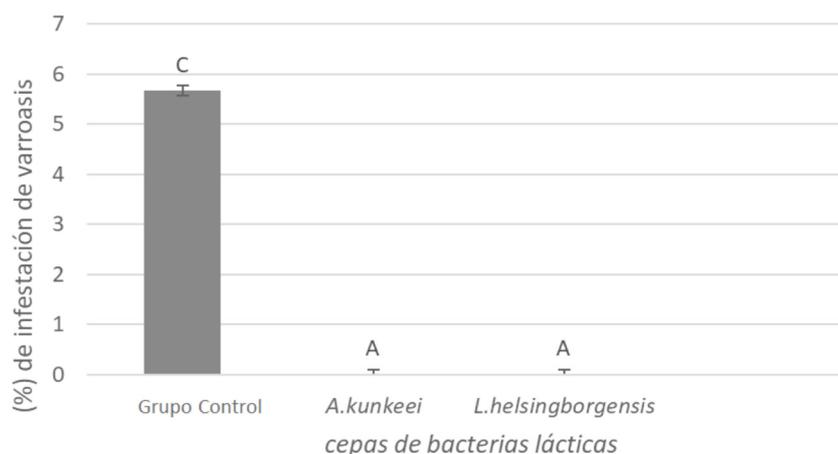


Figura 2: Determinación de la incidencia de *V. destructor* en las colmenas sometidas a tratamientos con las cepas de bacterias lácticas y colmenas control.

Efecto de los diferentes tratamientos de bacterias lácticas en *N. spp.* por cada período de aplicación.

Los valores de índice de *N. spp.* antes de realizar los tratamientos con las bacterias lácticas para el testigo indicaron $1,7 \times 10^6 \pm 143,614$ esporos/abejas, *L. helsingborgensis* $1,4 \times 10^6 \pm 377,492$ esporos/abejas y *A. kunkeei* $1,3 \times 10^6 \pm 288,140$ esporos/abejas.

En cuanto al primer mes de aplicación, para el tratamientos con *A. kunkeei*, se registró una valor de índice de *N. spp.* de $2,9 \times 10^5 \pm 141,993$ esporos/abejas, seguido por *L. helsingborgensis* $1,1 \times 10^6 \pm 432,232$ esporos/abejas y el testigo $1,5 \times 10^6 \pm 207,103$ esporos/abejas. Para el segundo mes de aplicación, se presentó una disminución de *N. spp.* en los tratamientos como en el testigo. En las aplicaciones llevadas a cabo en los meses 3 y 4, se continúa presentando una disminución de la infección de *N. spp.*, siendo para el tratamiento con *A. kunkeei* $2 \times 10^4 \pm 17,931$ esporos/abeja *L. helsingborgensis* $4 \times 10^5 \pm 356,043$ esporos/abeja y testigo $8 \times 10^5 \pm 341,567$ esporos/abejas.

Al realizar el análisis estadístico se observó diferencia entre la interacción de las aplicaciones de los tratamientos por cada mes de suministro, presentando un p valor de $<0,0001$, registrando un mejor efecto *A. kunkeei* (Fig.3).

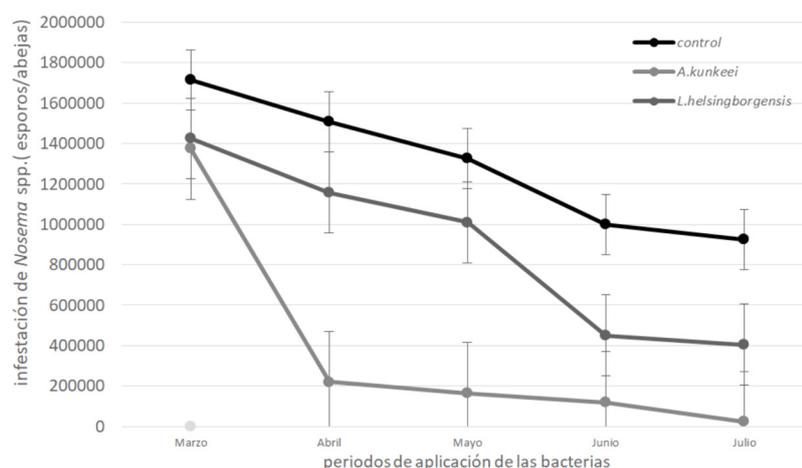


Figura 3: Efecto de los diferentes tratamientos de bacterias lácticas en *N. spp.* por cada mes de aplicación.

Determinación de la incidencia de *N. spp.*

Se observó que la incidencia final de nosemosis en los tratamientos realizados con bacterias lácticas fue para: *A. kunkeei* 20,000 esporos /abejas, *L. helsingborgensis* 60,000 esporos /abejas, quienes registraron según la tabla de Jaycox (1990) un nivel muy leve de infección. Mientras que el grupo control registró $1,0 \times 10^6$ esporas /abejas.

En análisis de las medias registró un valor promedio de $1,1 \times 10^6$ de incidencia de *N. spp.* para los testigos. En relación a los tratamientos realizados con *L. helsingborgensis* se registró una media de $5,8 \times 10^5$ esporos/abejas y para *A. kunkeei* la media fue de $2,8 \times 10^5$ esporos/abejas. Reduciendo *L. helsingborgensis* más del 50% *N. spp.* y *A. kunkeei* más del 72% el microsporidium.

Al realizar el análisis estadístico se comprobó una diferencia significativa con un p-valor de $<0,0001$, entre los tratamientos y los testigos. La comparación de las medias indicó que el mejor control lo presentó *A. kunkeei* sobre el patógeno (Fig.4).

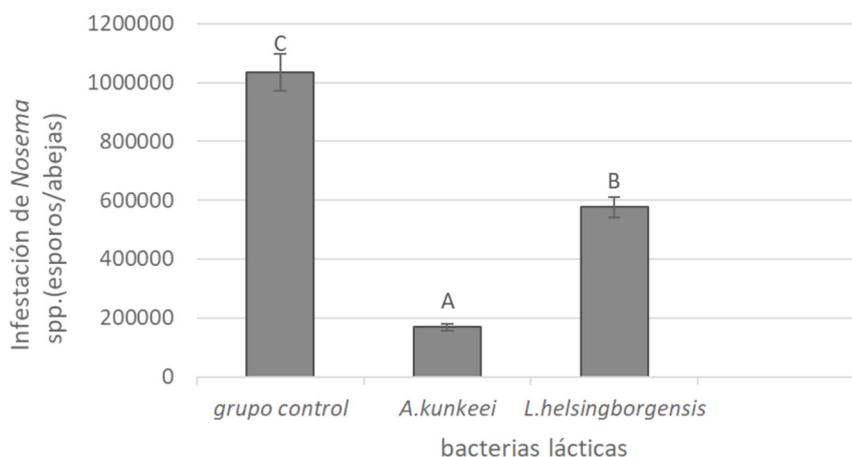


Figura 4: Determinación la incidencia de *N. spp.* en colmenas sometidas a tratamientos con las cepas bacterias lácticas y colmenas control.

DISCUSIÓN

Al realizar el análisis de la interacción de la incidencia de varroasis a partir de las aplicaciones de los lactobacilos en cada mes del ensayo, se registró que el efecto de las bacterias fue inmediata, concordando con los estudios realizados por Tejerina *et al.*, (2020) & Audisio, (2017) quienes demostraron la disminución de la incidencia del ácaro en colmenas juveñas, con bacterias lácticas obtenidas del intestino de abejas de la provincia de Salta.

En lo que respecta al efecto de las bacterias en los 4 meses se comprobó una reducción total del ácaro, indicando estos resultados que la aplicación de *A. kunkeei* y *L. helsingborgensis* podrían mejorar la microbiota intestinal de las abejas, y contribuir a mantener la microbiota resistentes frente al parásito durante los períodos de su dinámica poblacional. Lo cual se vincula con lo expuesto por Marche *et al.*, (2019) donde comprobaron que *V. destructor* afecta la microbiota intestinal de las abejas obreras disminuyendo la cantidad de *Lactobacillus spp.*, provocando una disbiosis intestinal, observando abejas débiles y susceptibles a contraer enfermedades. Por lo que las bacterias *A. kunkeei* y *L. helsingborgensis* producirían ácidos orgánicos que inhibirían al parásito, relacionándose estos resultados a lo expuesto por De Piano *et al.*, (2020) quienes manifestaron que los lactobacilos generan ácidos orgánicos como: ácido láctico, ácido felioláctico o ácido acético que afectarían la viabilidad de *V. destructor*.

Estudios llevados a cabo por Milani (2001) y (Akyol & YeniNar, 2009) demostraron que las aplicaciones de ácidos orgánicos generan la muerte de ácaro. Sin embargo, García Vicente *et al.*, (2024) indicaron que el efecto de las bacterias lácticas se relaciona a la dosis y tiempo de exposición sobre el ácaro.

En cuanto a *N. spp.*, se evidenciaron índices de infestación muy leves para las colmenas que recibieron *L. helsingborgensis* y *A. kunkeei*, en comparación con el testigo que obtuvo porcentajes leve de *N. spp.* Cuyos resultados corresponderían a que las bacterias lácticas liberan compuestos metabólicos que reducirían la colonización de los esporos del *N. spp.*; coincidiendo con lo señalado por Zheng *et al.*, (2018) quienes enunciaron que las bacterias lácticas producen compuestos metabólicos que generan un efecto inhibitorio sobre *N. spp.*

Además se han reportado varios estudios de aplicación de bacterias lácticas aisladas del intestino de abejas de la provincia de Salta en colmenas que han demostrado efectos contra *Nosema*; como la bacteria *L. johnsonii* y *L. salivarius* quienes disminuyeron del 50 % al 80% *N. ceranae*, en comparación con colonias controles (Tejerina *et al.*, 2020; Audisio *et al.*, 2017). Por otra parte, Garrido *et al.*, (2023) demostraron que la mezcla de bacterias lácticas (*A. kunkeei* y *B. coryneformey*), como los extractos de plantas comerciales

HiveAlive aplicados en colmenas redujeron el 70% de *N. ceranea*

Los resultados estadísticos de comparación de medias en cada mes de aplicación señalaron un mejor efecto biocontrolador de *A. kunkeei*, en comparación con *L. helsingborgensis*, evidenciando que *L. helsingborgensis* necesitaría mayor tiempo de adaptación en la microbiota intestinal, como así también producirían metabolitos secundarios que tendrían menor efectividad para disminuir la infección de *Nosema*. Lo cual, se vincula a lo expuesto por Borges *et al.*, (2021) en el que señalaron en sus ensayos que no todos los compuestos antimicrobianos de algunas especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Bacillus* producen compuestos efectivos contra nosemosis. Los resultados obtenidos con *A. kunkeei* indicarían que presenta compuestos antimicrobianos con mayor efecto inhibitorio sobre *N.spp*.

CONCLUSIÓN

Los ensayos realizados mostraron que *A. kunkeei* demostró ser el más efectivo frente a *N. spp.* y *V. destructor*, evidenciando valores muy bajos para estas enfermedades, por lo que la aplicación de bacterias lácticas como *A. kunkeei* demostró prevenir y controlar las enfermedades estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Akyol E y YeniNar H. (2009). Uso de ácido oxálico para controlar *Varroa destructor* en abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) Colonias. Turk. J. Vet. Anim. Sci, 33:2.
- Audisio, M.C. (2017). Gram-positive bacteria with probiotic potential for the *Apis mellifera* L. honey bee: the experience in the northwest of Argentina. Probiotics Antimicro, 9: 22–31.
- Borges, D.; Guzman-Novoa, E.; Goodwin, P. H. (2021). Effects of Prebiotics and Probiotics on Honey Bees (*Apis mellifera*) Infected with the Microsporidian Parasite *Nosema ceranae*. Microorganisms, 9, 481.
- Cabana, M. J., Tejerina, M. R., José, J., Castro, R. M., Benítez Ahrendts, M. R. (2021). Potencial probiótico de bacterias aisladas de pan de polen para mejorar la producción y sanidad de *Apis mellifera*. Idesia Arica, 39(1):45-51.
- Cantwell G E. (1970). Standard methods for counting *Nosema* spores. Am. Bee J., 110: 222–223.
- De Jong, D. (1980). *Varroa jacobsoni*, Survey Techniques U.S.A. Entomology Leaflet N° 109. Univ. Maryland. USA.
- De Melo Pereira, G. V.; de Oliveira Coelho, B.; Magalhães, A. I.; Thomaz-Soccol, V.; Soccol, C. R. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. Biotechnol. Adv, 36: 2060–2076.
- De Piano, F.G.; Maggi M.D.; Meroi Arceitto F.R.; Audisio M.C.; Eguaras M.; Ruffinengo, S.R. (2020). Efectos del sobrenadante libre de células bacterianas sobre los parámetros nutricionales de *Apis mellifera* y su toxicidad contra *Varroa destructor*. J. Apic. Sci, 64:55–66.
- Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, L.; González Tablada, M.; Robledo, C.W. (2011). Grupo INFOSTAT. FCA. Universidad Nacional de Córdoba.
- Garrido, P. M.; Porrini, M. P.; Alberoni, D.; Baffoni, L.; Scott, D.; Mifsud, D.; et al. (2023). Beneficial Bacteria and Plant Extracts Promote Honey Bee Health and Reduce *Nosema ceranae* Infection. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 1:16.
- Iorizzo, M.; Pannella, G.; Lombardi, S. J.; Ganassi, S.; Testa, B.; Succi, M.; Sorrentino, E.; Petrarca, S.; De

- Cristofaro, A.; Coppola, R. et al. (2020). Inter- and Intra-Species Diversity of Lactic Acid Bacteria in *Apis mellifera* ligustica Colonies. *Microorganisms* 8: 1578.
- Jia, S.; Wu, Y.; Chen, G.; Wang, S.; Hu, F.; Zheng, H. (2022). The Pass-on Effect of Tetracycline-Induced Honey Bee (*Apis mellifera*) Gut Community Dysbiosis. *Front. Microbiol* 12: 781746.
- Krongdang, S.; Evans, J. D.; Pettis, J. S.; Chantawannakul, P. (2017). Multilocus Sequence Typing, Biochemical and Antibiotic Resistance Characterizations Reveal Diversity of North American Strains of the Honey Bee Pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLoS ONE*, 12: e0176831.
- Lashani, E.; Davoodabadi, A.; Dallal, M. M. S. (2020). Some probiotic properties of *Lactobacillus* species isolated from honey and their antimicrobial activity against foodborne pathogens. *Veterinary Research Forum* 11 (2): 121-126.
- Marche, M. G.; Satta, A.; Floris, I.; Pusceddu, M.; Buffa, F.; Ruiu, L. (2019). Quantitative Variation in the Core Bacterial Community Associated with Honey Bees from *Varroa*-Infested Colonies. *J. Apic. Res*, 58: 444-454.
- Milani N. (2001). Actividad de los ácidos oxálico y cítrico en el ácaro *Varroa destructor* en ensayos de laboratorio. *Apidologie*, 32:127-138.
- Molina, A.; Guzmán, E.; Message, D.; De Jong, D.; Pesante, D.; Mantilla, C.; Zozaya, A.; Jaycox, E.; Alvarado, F.; Handal, S.; Meneses, G. (1990). Enfermedades y plagas de la abeja melífera occidental. San Salvador: OIRSA-BID.
- Morelli, L. y Capurso, L. (2012). FAO/WHO guidelines on probiotics 10 years latter. *J Clin Gastroenterol*, 46: 1-2.
- Ramsey, S. D.; Ochoa, R.; Bauchan, G.; Gulbranson, C.; Mowery, J. D.; Cohen, A.; Lim, D.; Joklik, J.; Cicero, J. M.; Ellis, J. D.; et al. (2019). *Varroa destructor* Feeds Primarily on Honey Bee Fat Body Tissue and Not Hemolymph. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 116:1792-1801.
- Soklic, M.; Gregorc, A. (2016). Comparison of the two microsporidia that infect honeybees—A review. *Agricultura* 13: 49-56.
- Tapia González, M. J.; Alcazar Ocegüera, G.; Macías Macías, J. O.; Contreras Escareño, F.; Tapia Rivera, J. C. T.; Chavoya Morena, F. J.; Martínez González, J. C. (2017). Nosemosis in worker bees and their relationship with environmental factors in Jalisco, Mexico. *Rev Mex Cienc Pecu*, 8 (3):325-330.
- Tauber, J.; Nguyen, V.; Lopez, D. L.; Evans, J. (2019). Effects of a Resident Yeast from the Honeybee Gut on Immunity, Microbiota, and Nosema Disease. *Insects*, 10 (9): 296
- Tejerina, M.R.; Cabana, M. J.; Benítez-Ahrendts, M. R. (2022). Incidencia de factores ambientales sobre la prevalencia de *Varroa* spp. y *Nosema* spp. en zonas fitogeográficas de la provincia de Jujuy, Argentina. *Idesia Arica*, 40(2): 103-112.
- Tejerina; M. R.; Benítez-Ahrendts, M. R.; Audisio, M. C. (2020). *Lactobacillus salivarius* A3iob reduces the incidence of *Varroa destructor* and *Nosema* Spp. in commercial apiaries located in the northwest of Argentina. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 12: 1360-1369.
- Zheng, L. H.; Steele, M.I.; Sean, P.; Leonard, S.P.; Motta, E.V.S.; Moran, N.A. (2018). Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Anim*, 47(11): 317-325